



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
" SCIENZE FARMACEUTICHE "

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

Studi di composizione chimica ed attività biologica di oli essenziali  
provenienti della regione amazzonica dell'Ecuador del Sud

Settore Scientifico Disciplinare CHIM / 09

**Dottorando**

Dott. Paco Noriega

**Tutore**

Prof. Steano Manfredini

Anni 2010/2014

## Abstract.

The present study evaluates the chemical composition and biological activity of essential oils from five medicinal plants of the southern Amazon of Ecuador. The species studied were: *Siparuna aspera* (Ruiz & Pav), *Siparuna macrotrepala* Perkins, *Piper leticianum* C. DC, *Piper augustum* Rudge and *Hedychium coronarium* J. Koenig. These species were collected from the Kutuku mountains in the province of Morona Santiago.

The essential oils of *S. aspera*, *S. macrotrepala*, *P. Leticianum* and *P. augustum* has been obtained by fresh steam leaves distillation and the essential oil of *H. coronarium* has been obtained by steam rhizome distillation.

The chemical characterization was performed by GC (Gas Chromatography) and GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry). The most abundant compounds were: *S. aspera*; germacrene D 23,272%, bicyclogermacrene 7,831%,  $\alpha$ -pinene 6,958%,  $\delta$ -cadinene 4,653%,  $\delta$ -elemene 4,526% e  $\alpha$ -copaene 4,459%. *S. macrotrepala*; germacrene D 41,124%, bicyclogermacrene 11,797%,  $\delta$ -cadinene 5,008%,  $\alpha$ -copaene 4;380%,  $\beta$ -caryophyllene 3,429%. *P. augustum*; germacrene D 41,124%, bicyclogermacrene 11,797%,  $\delta$ -cadinene 5,008%,  $\alpha$ -copaene 4; 380%,  $\beta$ -caryophyllene 3,429%. *P. leticianum*;  $\beta$ -caryophyllene 21,803%, germacrene D 9,007%,  $\alpha$ -(E, E)-farnesene 5,098%,  $\beta$ -elemene 5,064%, bicyclogermacrene 3,959%,  $\delta$ -cadinene 2,852%. *H. coronarium*; 1, 8-Cineole 33,690%,  $\beta$ -pinene D 29,954%,  $\alpha$ -Pinene 9,968%,  $\alpha$ -terpineol 5,705%. The structures of the main chemicals were confirmed by GC-MS and <sup>1</sup>H NMR.

The Antioxidant activity was evaluated by Spectrophotometric 1,1 -diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Spectrophotometric (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS), luminol-photochemiluminescence (PCL) assay and DPPH-(high performance) thin layer chromatography (DPPH-(HP) TLC). None of the oils showed a higher antioxidant activity compared to the natural reference: the essential oil of *Thymus vulgaris*.

The essential oil of *H. coronarium* showed good activity against *L. grayi*, *K. oxitoca* and *S. mutans* compared to the natural reference, the essential oil of *Thymus vulgaris*.

Cytotoxic and mutagen protective activity of *H. coronarium* essential oil were evaluated by *Sacharomyces cerviseae* D7 Test. The cytotoxic effect was reached at a

concentration of 0.6uL/plate while the protective mutagenic activity occurred in a concentration range of 0,5 y 2 uL/plate. The SOS-Chromo test demonstrated the absence of geno-toxicity.

Challenge test in cosmetic formulation with essential oil of *H. coronarium*, shows their utility to extend the shelf life.

Key words: Essential oil, *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotrepala*, *Piper Leticianum*, *Piper augustum*, *Hedychium coronarium*, *Piper leticiaunum*, GC, CG-MS, NMR, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, (HP) TLC-bioautography, D7 Test, SOS.Chromo test, Challeng test.

### **Riassunto**

Il scopo del presente progetto di ricerca è stato la valutazione della composizione chimica e dell'attività biologica di cinque oli essenziali provenienti di piante medicinali della regione amazzonica del sud dell'Ecuador. Le specie studiate sono: *Siparuna aspera* (Ruiz & Pav), *Siparuna macrotrepala* Perkins, *Piper leticianum* C. DC., *Piper augustum* Rudge e *Hedychium coronarium* J. Koenig. Le piante sono state prelevate in nella cordigliera di Kutuku nella provincia di Morona Santiago.

Gli oli essenziali di *S. aspera*, *S. macrotrepala*, *P. Leticianum* e *P. augustum* sono stati estratti per distillazione in corrente di vapore dalle foglie fresche mentre che per estrarre l'olio di *H. coronarium* è stato usato il rizoma.

Per la caratterizzazione chimica sono stati utilizzati GC (Gas Cromatografia) e GC-MS (Gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa). I composti più abbondanti per ogni olio sono stati: *S. aspera*; germacrene D 23,272%, bicyclogermacrene 7,831%,  $\alpha$ -pinene 6,958%,  $\delta$ -cadinene 4,653%,  $\delta$ -elemene 4,526% e  $\alpha$ -copaene 4,459%. *S. macrotrepala*; germacrene D 41,124%, bicyclogermacrene 11,797%,  $\delta$ -cadinene 5,008%,  $\alpha$ -copaene 4,380%,  $\beta$ -caryophyllene 3,429%. *P. augustum*; germacrene D 41,124%, bicyclogermacrene 11,797%,  $\delta$ -cadinene 5,008%,  $\alpha$ -copaene 4,380%,  $\beta$ -caryophyllene 3,429%. *P. leticianum*;  $\beta$ -caryophyllene 21,803%, germacrene D 9,007%,  $\alpha$ -(E, E)-farnesene 5,098%,  $\beta$ -elemene 5,064%, bicyclogermacrene 3,959%,  $\delta$ -cadinene 2,852%. *H. coronarium*; 1, 8-Cineole 33,690%,  $\beta$ -pinene D 29,954%,  $\alpha$ -Pinene 9,968%,  $\alpha$ -terpineol 5,705%.

Le strutture delle molecole più importanti sono state cofirmate per GC-MS e  $^1\text{H}$  NMR.

Per valutare l'attività antiossidante sono stati usati i seguenti metodi: Spettrofotometrico 1,1 -dyphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Spettrofotometrico (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS), luminol-photochemicalluminisce (PCL), e il DPPH autobiografico in cromatografia ad alta risoluzione (DPPH-(HP) TLC). Tra gli oli ricercati nessuno ha mostrato una attività significativa in confronto con il riferimento naturale, l'olio essenziale di *Thymus vulgaris*.

L'olio essenziale di *H. coronarium* dimostra avere una buona attività antibatterica per *L. grayi*, *K. oxitoca* and *S. mutans*, in confronto con il riferimento naturale, l'olio essenziale di *Thymus vulgaris*.

L'attività citotossica e mutageno protettiva dell'olio di *H. coronarium* è stata valutata per il test *Sacharomyces cerviseae* D7. La citotossicità ricade a valore di 0,6uL/plate e l'attività mutageno protettiva tra 0,5 ey 2 uL/plate. Il The SOS-Chromo test dimostra che il olio non è genotossico.

La valutazione del Challenge test in una formulazione cosmetica con l'olio di *H. coronarium*, dimostra che quello può essere utilizzato per preservare il prodotto.

Parole chiave:

Essential oil, *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotrepala*, *Piper Leticianum*, *Piper augustum*, *Hedychium coronarium*, *Piper leticiaunum*, GC, CG-MS, NMR, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, (HP) TLC-bioautography, D7 Test, SOS.Chromo test, Challeng test.

## INDICE.

INTRODUZIONE	
Pag 01	
1. CONTESTO DELLA RICERCA	Pag 02
2. GLI OLI ESSENZIALI	Pag 05
3. ECUADOR AMAZZONICO: NOTIZIE ANTROPOLOGICHE (ETNIE) E FITOGEOGRAFICHE DI SINTESI, LE PIANTE STUDIATE E LE ZONE DI RACCOLTA	Pag 24
STRATEGIA E OBIETTIVI	Pag 33
MATERIALI E METODI	Pag 37
A) METODI DI ESTRAZIONE E ANALISI CHIMICHE	Pag 39
B) STUDI DI BIOATTIVITÀ	Pag 46
C) FORMULAZIONI COSMETICHE A BASE DI OLI ESSENZIALI	Pag 56
RISULTATI E DISCUSSIONI	Pag 65
CONCLUSIONI	Pag 112
BIBLIOGRAFIA	Pag 116
RINGRAZIAMENTO	Pag 127
ARTICOLI ACCETTATE	Pag 129

# **INTRODUZIONE**

## **Contesto della ricerca.**

Le motivazioni che hanno mosso questo progetto di ricerca di dottorato sono legate da un lato alla continua e complessa evoluzione che il mercato salutistico richiede al prodotto naturale come viatico di benessere, dall'altro alla volontà di valorizzare l'uso di specie vegetali appartenenti ad un ecosistema come quello amazzonico, tanto vasto quanto ancora poco studiato come risorsa di fitocomplessi e principi attivi dalla ricca proiezione salutistica. I gruppi di ricerca che si sono coordinati attorno a queste motivazioni sono da tempo impegnati in progettualità condivise tra Università di Ferrara e Università Politecnica Salesiana di Quito con il fine di caratterizzare e valorizzare risorse botaniche amazzoniche individuandone potenzialità d'uso nel campo della farmacia e dei prodotti del benessere. L'Amazzonia è infatti considerata uno degli habitat naturalistici più ricchi e complessi del mondo, costituendo una fonte di sostanze attive e di biodiversità di inestimabile valore e caratterizzandosi come uno degli *hot spot* biodiversi più interessanti oltre che senz'altro il più vasto in assoluto (Schultes, 1990).

La progettualità del presente lavoro di dottorato presenta però anche radici profonde in motivazioni più estese, che varcano il confine della conoscenza scientifica e della sua applicazione come finalità. Tali motivazioni sono legate alla volontà di inserire questo progetto in una filosofia di studio trasversale ovvero che tiene conto della proprietà intellettuale delle fonti e del loro sfruttamento sostenibile da parte delle popolazioni e delle etnie indigene dell'amazzonia. Questo aspetto di sostanziale caratterizzazione etica prima ancora che scientifica è un ulteriore elemento di arricchimento e di coagulo tra tutti i componenti dei gruppi di ricerca che si sono coordinati attorno a questo lavoro.

La progressione delle conoscenze attraverso queste motivazioni di cui questo dottorato non è che un frammento di un lungo cammino, ha portato ad inserire il presente studio in un piano di ricerca ampio che segue il seguente schema di ordine generale:

- Individuazione delle piante officinali attraverso la ricerca di elementi etnobotanici a sostegno di utilizzi salutistici seppur tradizionali;
- Considerazioni rispetto alla valorizzazione e salvaguardia del patrimonio intellettuale sviluppabile da studi come quello qui presentato;
- Considerazioni rispetto al possibile sfruttamento sostenibile delle fonti individuate, alla possibilità di sviluppare processi in linea con la conservazione e la sostenibilità

ambientale, con particolare riferimento al patrimonio biodiverso nella sua globalità e complessità;

- Considerazioni rispetto ai possibili indirizzi salutistici e di inserimento sfruttamento della fonte sul mercato (cosmetico, erboristico in senso più ampio, dietistico);
- Considerazioni rispetto alle possibili ricadute in ragione del rispetto proprietà intellettuale e dei benefici economici riconducibili alle etnie amazzoniche interessate.

Il progetto di ricerca del presente dottorato ha dunque una colonna portante di carattere sia scientifico in senso stretto (caratterizzazione chimica e biologica della fonte vegetale amazzonica) sia anche etico (conservazione della proprietà intellettuale e ricadute della ricerca sul benessere socio-economico delle etnie che utilizzano le fonti vegetali). Il profilo etico vuole essere un elemento di arricchimento di un lavoro di dottorato che per sua natura ed impostazione di fondo deve caratterizzarsi di un profilo marcatamente chimico farmaceutico.

Inevitabilmente però, il contesto culturale e di ricerca che caratterizza questa tesi di dottorato presenta comunque e necessariamente profonde interconnessioni tra discipline diverse, quali la botanica farmaceutica, la chimica e la biologia farmaceutica, con il fine di ordine generale di caratterizzare dal punto di vista sia chimico che biologico estratti ottenuti da specie vegetali di provenienza amazzonica.

La ricerca si colloca nell'ambito di una serie di attività previste dall'accordo quadro sottoscritto dall'Università degli Studi di Ferrara e l'Università Politecnica Salsiana (UPS) di Quito (29 giugno, 2007) e facenti parti di un progetto più ampio conosciuto come NTFP (Non Timber Forest Products).

Tale ricerca è infatti parte di un percorso di studio condiviso sulle risorse vegetali amazzoniche, rispetto alla loro importanza etnomedica come strumento tradizionale di salute per le popolazioni indigene (etnia Shuar) così come possibile fonte di molecole di interesse salutistico per il moderno mercato erboristico rispetto al settore cosmetico e fitoterapico in genere. Ad oggi, queste ricerche svolte in complementarietà con l'UPS di Quito hanno portato a pubblicazioni che determinano la traccia principale su cui fare leva per un possibile sviluppo, anche commerciale, di tali studi. Le ricerche sono state svolte con il sostegno di fondazioni ecuadoregne di ispirazione salesiana quali la Fundacion Chankuap (Macas, Ecuador, Provincia di Morona Santiago) che ha come obiettivo lo sfruttamento sostenibile delle risorse amazzoniche a supporto e

valorizzazione del patrimonio etnofarmaceutico dell'etnia Shuar e più in generale della biodiversità della regione amazzonica del sud dell'Ecuador. È importante sottolineare come il percorso di cooperazione e di ricerca sin qui svolto abbia tra i suoi pilastri di maggior sostegno - oltre ai risultati ottenuti sul piano laboratoristico e della proiezione applicativa delle risorse botaniche - anche l'acquisizione di notizie etnobotaniche ed etnofarmaceutiche su numerose specie vegetali a sostegno di ulteriori future indagini. A consolidamento di tali aspetti, presso l'UPS di Quito è stato istituito un erbario di essiccata di piante medicinali utilizzate dalla tradizione etnofarmaceutica amazzonica che conta oggi oltre 2000 piante. Tra le quali, anche quelle oggetto di questo elaborato.

I gruppi di ricerca coagulati attorno a queste motivazioni e a questa architettura di ricerca di ordine generale, sono da tempo impegnati nello studio di miscele terpeniche ottenute da matrici vegetali di diversa provenienza, con particolare riferimento a piante amazzoniche in uso alle etnie Achuar e Shuar dell'oriente ecuadoriano. L'interesse è maturato nel tempo anche in ragione del forte impatto applicativo che tali estratti hanno rispetto a prodotti salutistici; si pensi ad esempio all'uso di oli essenziali in cosmesi, se non in prodotti di interesse fitoterapico. Sulla scia di questa impostazione e filone di ricerca si è pensato di dare seguito a questo interesse prendendo in considerazione piante amazzoniche dell'oriente ecuadoriano verificando le caratteristiche fitochimiche rispetto all'olio essenziale e valutando la bioattività (efficacia e sicurezza) dei fitocomplessi terpenici rispetto a modelli di indagine in vitro mirati ad aspetti funzionali con prevalente applicabilità cosmetica (vedi sezione "obiettivi del dottorato di ricerca").

Il percorso di ricerca di dottorato descritto in questo contesto di tesi si struttura perciò nella esposizione e combinazione sinergica tra diverse strategie e tecniche di indagine chimica e biologica, al fine di investigare la fonte vegetale, i principi attivi, i potenziali effetti, con tecniche di valutazione bioguidata.

Il presente lavoro di ricerca ha in particolare la finalità di valutare la caratterizzazione chimica di alcuni oli essenziali ottenuti da specie vegetali quali *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotepala* (Siparunacee), *Piper leticianum*, *Piper augustum* (Piperacee), *Hedychium coronarium* (Zingiberacee), piante utilizzate a scopo medicinale dalle popolazioni indigene (etnia Shuar) che vivono nella foresta amazzonica del sud dell'Ecuador.

### **Gli oli essenziali**

Gli oli essenziali sono delle complesse miscele di sostanze organiche di varia natura chimica (alcoli, aldeidi, chetoni, esteri, terpeni, ecc.), di origine vegetale; si presentano come sostanze di natura prevalentemente lipofila, liquide con varia viscosità, volatili e profumate come la pianta dalla quale provengono (Pelle, 1996).

Gli oli essenziali sono presenti in percentuale diversa in quasi tutte le piante, ma convenzionalmente si considerano "aromatiche" quelle piante che contengono oli essenziali in percentuale da 0,01% al 20% in riferimento al peso della pianta fresca.

Gli oli essenziali possono essere ottenuti prevalentemente per distillazione in corrente di vapore di diverse parti di una pianta o da essudati resinosi da essa derivati.

**Alcune specie di piante note per essere fonte di oli essenziali e le parti utilizzate per ottenerli**

<b>Specie vegetale</b>	<b>Nome comune</b>	<b>Parte usata</b>
<i>Armoracia rusticana</i>	Cren	Radice
<i>Vetiveria zizanioides</i>	Vetiver	Radice
<i>Acorus calamus</i>	Calamo aromatico	Rizoma
<i>Zingiber officinale</i>	Zenzero	Rizoma
<i>Cinnamomun zeylanicum</i>	Cannella	Corteccia
<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	Foglie
<i>Jasminum officinalis</i>	Gelsomino	Petali dei fiori
<i>Lavanda</i> sp.	Lavanda	Sommità fiorite
<i>Vanilla planifolia</i>	Vaniglia	Frutti
<i>Citrus bergamia</i>	Bergamotto	Epicarpo dei frutti
<i>Miristica fragrans</i>	Noche moscata	Semi
<i>Santalum album</i>	Sándalo	Legno
<i>Abies alba</i>	Abete bianco	Gemme

<i>Styrax tonkinensis</i>	Benzoino	Resina
---------------------------	----------	--------

Nell'ambito della fitoterapia gli oli essenziali costituiscono una categoria di derivati vegetali di particolare interesse, sia per il loro impiego terapeutico, sia per la crescente richiesta del mercato di "prodotti naturali", visti dai più come indiscutibile garanzia di salute e benessere. Questa tendenza si nota in maniera considerevole anche nel campo della cosmesi, dove si assiste alla continua ricerca di nuove piante sconosciute ed esotiche per cercare di attirare l'attenzione del pubblico. Diversi studi hanno individuato proprietà funzionali ascrivibili agli oli essenziali (es. Attività antiossidante) giustificandone l'uso in cosmesi non più solo circoscritto alla profumazione, ampliando in questo modo le proiezioni applicative di tali fitocomplessi. Rispetto a queste evidenze di bioattività, gli oli essenziali risquottono sempre maggiore interesse rispetto al settore dietistico grazie alle loro proprietà batteriostatiche, fungicide e nuovamente antiossidanti.

#### **Le proprietà degli oli essenziali: localizzazione istologica e funzione**

Normalmente l'attività metabolica che porta alla formazione di miscele terpeniche nella pianta risulta molto intensa durante tutto il periodo della fase vegetativa. Da un punto di vista istologico, vengono prodotti ed accumulati in particolari strutture istologiche fino al periodo della fioritura (antesi). Tale periodo, per le piante aromatiche, solitamente coincide con il tempo balsamico, cioè il momento durante il quale la pianta contiene i propri principi attivi nella massima concentrazione e nel miglior rapporto qualitativo per una proiezione applicativa. In seguito, con il passaggio alla fase riproduttiva successiva all'antesi, i ritmi produttivi rallentano e subentra una fase in cui si verifica soprattutto la traslocazione dei prodotti già formati negli organi vegetali preposti all'accumulo (foglie, fiori, frutti, corteccia, radici, rizomi) (Catizone et al.,1986).

Riguardo alla diffusione degli oli essenziali possiamo distinguere due grandi categorie:

- Oli essenziali la cui produzione ed accumulo avviene principalmente a seguito dell'attività di strutture specializzate con rilascio all'esterno della pianta. La ragione di un tale processo è piuttosto evidente se si considera l'attrazione che le essenze producono sugli agenti impollinatori.

- Oli essenziali accumulati in strutture specializzate interne. In questi casi l'essenza è localizzata in ampi spazi schizogeni, lisigeni o schizo-lisigeni, originati principalmente dal progressivo accumulo dell'olio essenziale. La funzione di quest'ultimo appare in questi casi meno evidente rispetto ai precedenti. Tuttavia, le proprietà biologiche e le caratteristiche organolettiche di molti oli essenziali portano decisamente ad ipotizzare un ruolo allelopatico (Bruni, 1999).

I tessuti coinvolti nella produzione ed accumulo delle miscele terpeniche (tessuti di secrezione) sono distinguibili in:

**Tessuti secretori esterni**, strutture che secernono sostanze all'esterno della pianta:

- Cellule epidermiche ad essenza: sono cellule che, isolate oppure riunite in tessuti, riversano fuori di esse il prodotto della loro attività, sono presenti ad esempio nei petali, come nella Rosa di Damasco (*Rosa damascena*);

- Peli ghiandolari: sono tricomi forniti di una o più cellule capaci di elaborare e di segregare nello spazio sottocuticolare sostanze particolari, tra cui le miscele terpeniche. I peli ghiandolari sono strutture comuni e possono essere a testa secretrice unicellulare, a testa secretrice pluricellulare, peltati e squame secretrici.

**Tessuti secretori interni**, la cui attività di secrezione permette la formazione di essenze che permangono all'interno della cellula o della struttura istologica deputata all'accumulo. Le sostanze possono anche essere riversate in spazi intercellulari che si formano per schizogenia o lisigenia.

- Cellule ad essenza, presenti in parti diverse della pianta, come ad esempio radici, rizomi, corteccia, foglie, fiori, frutti e semi; ad esempio radice di Cren (*Armoracia rusticana*), rizoma di Calamo aromatico (*Acorus calamus*).

- Tasche o sacche, ovvero spazi intercellulari che si formano in seguito alla dissoluzione delle cellule secretici d'olio essenziale, al posto delle cellule rimane quindi una lacuna che ospiterà l'olio. Questo tipo di tessuti è comune nella famiglia delle Rutacee (*Citrus* sp.). Sulla base delle modalità istologiche di formazione si distinguono in strutture lisigene (le cavità si formano per lisi cellulare), schizogene (le cavità si formano per allontanamento delle cellule tra di loro), schizo-lisigene (le cavità si formano con modalità sia lisigene che schizogene).

- Canali schizogeni (o canali secretori, o vitte), si formano nello stesso modo delle tasche schizogene, ma la cavità ha forma fortemente allungata.

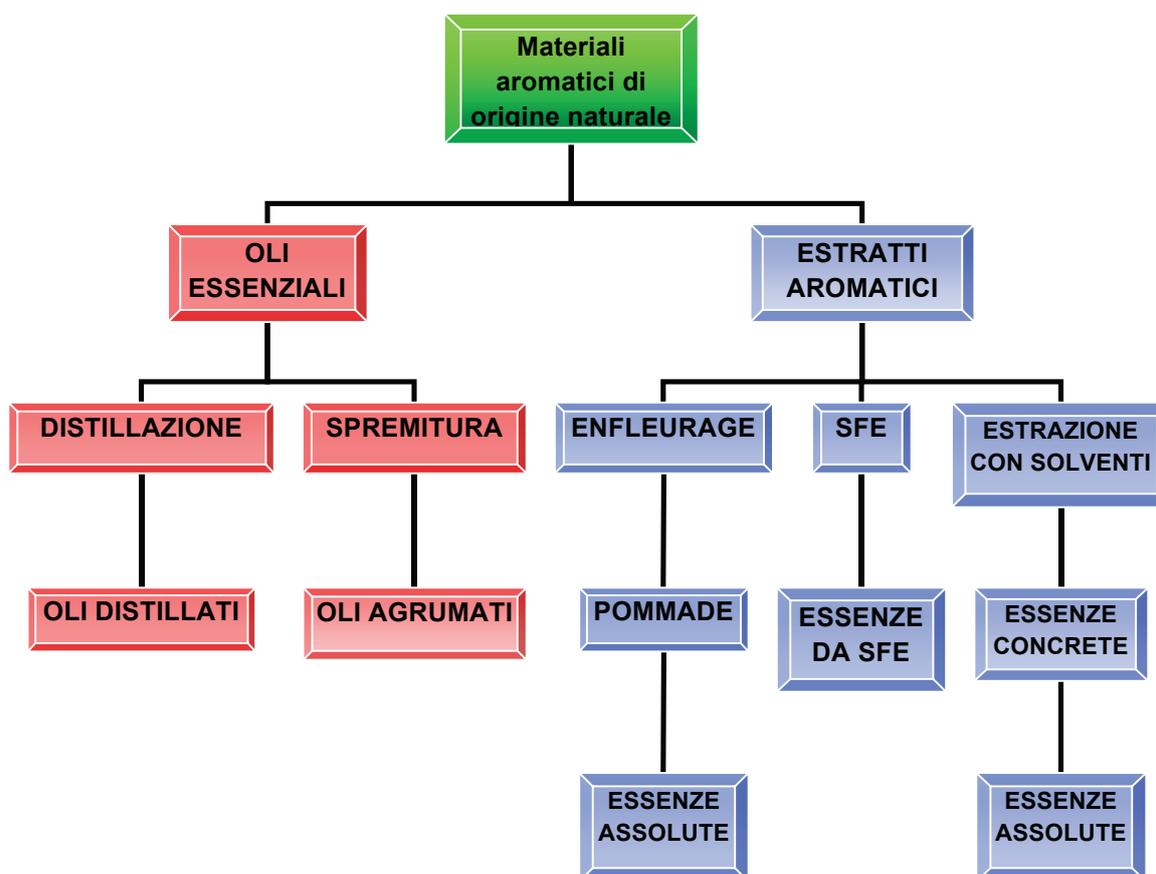
### ***Variabili che incidono sulla qualità e resa degli oli essenziali***

Le essenze possono presentare differenze sia dal punto di vista della composizione chimica, sia dal punto di vista della resa di prodotto dalla pianta fresca. Queste variazioni sono determinate da fattori che possono essere classificati come naturali (genetici, ecologici) e artificiali (raccolta, preparazione, conservazione, alterazioni) (Bruni, 1999). Si distinguono fattori naturali endogeni, ovvero ciclo ontogenetico della pianta, età, e tempo balsamico, e fattori genetici, quali ibridazione, poliploidia, selezione e mutazione. Tra gli altri numerosi fattori, troviamo naturalmente anche variabili naturali esogene, ovvero ad esempio i fattori climatici, il terreno (composizione, granulometria, ecc.), allelopatia (vicinanza con altre specie vegetali ad essenza), luce, temperatura, grado di piovosità, ecc. non vanno infine trascurati fattori artificiali legati alle scelte agronomiche da effettuare, in caso di coltivazione delle piante aromatiche, al fine di indirizzare la tecnica colturale verso l'ottenimento di buone produzioni sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (es. l'epoca e la densità di semina, la concimazione, l'irrigazione, i trattamenti di difesa, ecc.).

### **L'estrazione degli oli essenziali**

La modalità estrattiva più idonea viene scelta in base alle caratteristiche del materiale vegetale, del tessuto che contiene gli oli essenziali, alle caratteristiche chimico fisiche dell'essenza e in base al prodotto che si vuole ottenere.

Le rese di estrazione degli oli essenziali sono generalmente basse, dallo 0,05% al 2% in riferimento al peso della pianta essiccata; le rese inoltre dipendono da diverse variabili: periodo e condizioni climatiche alla raccolta, periodo che intercorre tra la raccolta della pianta e il momento dell'estrazione, assieme ad altri fattori diversi e spesso difficilmente prevedibili (ad esempio: perizia nella raccolta, presenza/assenza di fattori di patogenicità della pianta). Per gli oli essenziali destinati all'uso terapeutico le farmacopee ammettono solo due procedimenti: la distillazione in corrente di vapore e la spremitura (o sfumatura) quest'ultimo caso riferito esclusivamente alle piante delle Rutacee (agrumi).

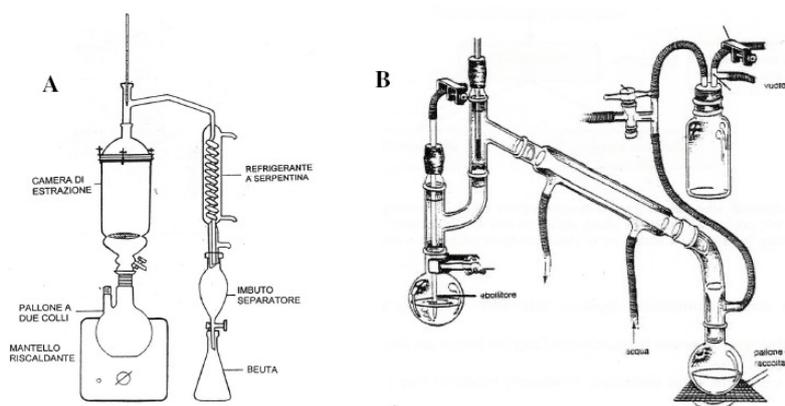


### I diversi metodi per ottenere oli essenziali e sostanze aromatiche (miscele terpeniche)

Tuttavia anche gli oli essenziali ottenuti con metodiche non previste dalle Farmacopee (Enfleurage, Estrazione con solventi, estrazione con fluidi supercritici o SFE) possono comunque ritrovare proiezioni applicative importanti in ambito salutistico. In taluni casi si rende però necessaria una lavorazione successiva all'estrazione dell'essenza tale da rimuovere elementi non idonei alla funzionalità dell'olio; in altri casi, come per l'estrazione con fluidi supercritici (SFE), tali processi possono risultare non necessari.

**La distillazione in corrente di vapore:** la distillazione è una tecnica estrattiva che sfrutta un'importante caratteristica degli oli essenziali: la volatilità. Le essenze infatti sono sostanze con tensione di vapore relativamente bassa, eppure i componenti degli oli essenziali hanno temperature di ebollizione abbastanza alte: si trovano infatti tra 150°C e 300°C alla pressione atmosferica di 760 mmHg; dato che però non è possibile distillare ad una temperatura così elevata, a meno di degradare la fonte e i composti d'estrazione, si esegue la distillazione in presenza di acqua o di vapore sfruttando le proprietà descritte dalla legge di Dalton, e cioè che durante la distillazione a pressione

atmosferica il punto di ebollizione sarà dato dalla temperatura alla quale la somma delle tensioni parziali di vapore eguaglia la pressione atmosferica. Tale temperatura sarà un po' al di sotto dei 100°C, cioè al di sotto della temperatura di ebollizione del componente più volatile (l'acqua), questo comporta il vantaggio di poter lavorare a temperature non troppo alte per gli oli essenziali, che contengono anche composti termolabili importanti nella caratterizzazione d'impiego del prodotto di estrazione. Per diminuire ulteriormente la temperatura di regime si può operare una distillazione sottovuoto (fig.20), lavorando quindi ad una pressione minore di quella atmosferica ma poiché in generale la tensione del vapore dell'acqua al diminuire della temperatura si abbassa molto più lentamente di quella dei componenti dell'olio essenziale, si avrà un distillato in cui la percentuale di olio sarà bassa. Si dovrà perciò usare molta più acqua per recuperare l'olio essenziale. Questo dato fa preferire, in genere, la distillazione a pressione ambiente (fig.20). Si può anche realizzare la distillazione lavorando a pressioni superiori a 760 mmHg, la temperatura di operazione aumenta il rapporto acqua/olio trascinato, facendo aumentare nel distillato la quantità di olio essenziale e quindi la resa: questo comporta notevoli vantaggi economici, ma è una scelta da optare solamente quando i componenti dell'olio essenziale non sono molto sensibili al calore.



### *Apparecchiature per distillazione*

**La sfumatura (o spremitura).** Questa tecnica è in genere riservata a quelle droghe aromatiche che contengono gli oli essenziali in cellule o strutture superficiali; è il caso ad esempio dei frutti delle Rutacee: Arancio (*Citrus aurantium*), Limone (*Citrus limon*),

Umetta (*Citrus aurantifolia*), Bergamotto (*Citrus bergamia*), Mandarino (*Citrus nobilis*), Cedro (*Citrus medica*); gli oli essenziali degli agrumi si trovano infatti negli otricoli dell'epicarpo dei frutti. Le essenze di questi frutti sono inoltre facilmente perossidabili e non possono sopportare un'estrazione a caldo. L'epicarpo del frutto fresco viene sottoposto a pressione meccanica che provoca la rottura di tasche essenziali e la fuoriuscita dell'olio essenziale.

**Enfleurage.** Questo è uno dei metodi più antichi per l'estrazione di essenze e sfrutta la solubilità in grasso o in oli fissi dei componenti terpenici che costituiscono l'olio. L'enfleurage consiste nella stesura su lastre di vetro o acciaio di uno strato di grasso su entrambi i lati; vengono scelti i grassi privi di odori sgradevoli e con scarsa o nulla predisposizione all'irrancidimento e ad alterazioni nel tempo (generalmente grassi minerali). Anticamente si usavano sego purificato e sugna, attualmente si utilizzano grassi sintetici, paraffine e glicerine. Al di sopra del grasso, a distanza di qualche millimetro, viene posta una griglia ricoperta di fiori, che verranno sostituiti ogni 24-72 ore; in genere vengono fatte una trentina di sostituzioni di droga prima di saturare il grasso. Il prodotto che si ottiene è un grasso saturo della fragranza del fiore, in quanto le componenti volatili dell'olio essenziale sono state assorbite e concentrate nello stesso. Questo prodotto, chiamato pommade, è classificato in base alle cariche di fiori che ha estratto, quindi la "pommade n° 20" significa che è stata ottenuta sostituendo venti volte i fiori sul grasso: questo indice è detto valore floreale.

Per separare l'essenza dal grasso è necessaria un'estrazione con solventi (in genere esano o etere di petrolio), dopodiché si separa l'essenza dai solventi semplicemente facendo evaporare questi ultimi. Il prodotto ottenuto viene chiamato essenza concreta che deve poi essere trattata con alcool etilico puro per allontanare cere, resine e altri componenti indesiderati; una volta allontanato l'alcool etilico quello che si ottiene è un liquido viscoso altamente concentrato, detto "assoluta". Se l'alcool non viene allontanato, il prodotto viene generalmente utilizzato tal quale dall'industria dei profumi. La concreta subisce un'estrazione con etanolo ad alta gradazione (nel quale le sostanze indesiderate sono solo parzialmente solubili) e un raffreddamento fino a -20°C. Le resine e le cere in questo modo precipitano e possono essere isolate tramite filtrazione o centrifugazione, mentre l'alcool viene eliminato con una distillazione a pressione ridotta, ottenendo così l'essenza "assoluta", una massa vischiosa di olio essenziale. L'assoluta può subire diversi trattamenti con alcool, ma una piccola percentuale di cera può sempre rimanere presente.

Sebbene sia una metodica oggi in disuso, viene ancora conservata per particolari droghe, è infatti usata nel caso in cui l'olio essenziale sia contenuto in fiori molto delicati, che non sopportano un'eccessiva manipolazione o per estrarre essenze di grande finezza che, con altro sistema estrattivo, potrebbero alterarsi. L'enfleurage è ancora usato per Tuberosa (*Polianthes tuberosa*), Rosa pallida (*Rosa centifolia*), Eliotropio (*Heliotropium peruvianum*).

**Estrazione con solventi organici.** Si utilizza questo metodo per piante poco ricche di oli essenziali, o per quelle essenze facilmente alterabili dal calore per le quali non si può utilizzare la distillazione in corrente di vapore. Alcuni esempi sono: Gelsomino (*Jasminum officinale*), Iris (*Iris sp.*), Mughetto (*Convallaria majalis*), Ylang-ylang (*Cananga odorata*), Caprifoglio (*Lonicera caprifolium*), Magnolia (*Magnolia grandiflora*), Vaniglia (*Vanilla planifolia*). Vengono generalmente utilizzati dei solventi organici bassobollenti, immiscibili con l'acqua, a bassa tossicità, inerti nei confronti degli oli essenziali, inodori, possibilmente poco costosi e facilmente smaltibili (es. esano, etere di petrolio, butano, benzene). L'alcool non viene più utilizzato perché risulta essere poco selettivo ed il suo impiego viene riservato per lavorazioni successive all'estrazione con gli altri solventi.

**Estrazione con fluidi supercritici (SFE).** La caratteristica principale di questa tecnica estrattiva è quella di utilizzare fluidi supercritici, SFE (Supercritical Fluid Extraction) le cui proprietà sono intermedie tra quelle dello stato liquido e quelle dello stato aeriforme: la densità è simile a quella di un liquido, mentre la viscosità si avvicina a quella del gas. Per variare opportunamente la densità del fluido, è sufficiente agire sulla pressione e sulla temperatura. L'estrazione mediante fluidi supercritici presenta diversi vantaggi: innanzitutto è veloce, il processo può durare dai 10 ai 60 minuti, mentre con le tecniche tradizionali l'estrazione richiede tempi più lunghi. L'azione della fase mobile può essere facilmente controllata, le proprietà solvatanti del fluido supercritico possono essere infatti regolate modulando pressione e temperatura, e questo permette di regolare selettivamente l'estrazione. L'estrazione con fluidi supercritici offre inoltre i vantaggi di operare a temperature basse e senza residui di solvente, con effetti positivi sulla qualità degli oli essenziali. Il fluido supercritico più utilizzato è l'anidride carbonica, che presenta un punto critico a 31,1°C e 73,8 bar. L'utilizzo di questo solvente determina alcuni ulteriori vantaggi: non inquina, è economico, non è infiammabile, permette di lavorare a basse temperature (intorno ai 50°C), inerte, a temperatura ambiente è un gas per cui al termine dell'estrazione il prodotto è privo di solvente.

**Trattamenti post estrazione.** Per meglio soddisfare le esigenze del mercato o per poter essere usati per fini terapeutici e salutistici minimizzando eventuali controindicazioni, spesso alcuni oli devono subire trattamenti specifici quali:

- Distillazione frazionata sotto vuoto: è un trattamento molto diffuso che consente di migliorare le caratteristiche organolettiche (colore, odore, sapore) degli oli essenziali greggi, oppure di eliminare composti con proprietà sconvenienti per l'uso terapeutico. La distillazione frazionata consente di effettuare una separazione precisa delle sostanze specifiche dal resto dell'olio essenziale, sfruttando il diverso punto di ebollizione.

- Deterpenazione: consiste nell'eliminazione degli idrocarburi monoterpenici dai costituenti sesquiterpenici e dai composti ossigenati. Il prodotto ottenuto è un olio essenziale che viene definito deterpenato. Taluni monoterpeni possono infatti risultare irritanti per la pelle, si ossidano facilmente e possono andare incontro a processi di polimerizzazione, dando luogo a modificazioni delle caratteristiche organolettiche, delle proprietà e della solubilità dell'essenza. Gli oli essenziali deterpenati sono in genere più stabili, hanno maggiore solubilità in acqua e alcool a basso titolo, sono privi di potere irritante, ed in più hanno maggiore potere battericida, grazie alla maggior concentrazione di composti ossigenati; per contro, si conservano con minore facilità. La deterpenazione può avvenire: a caldo, con una distillazione frazionata sotto vuoto; a freddo, mediante l'utilizzo di solventi; con metodi fisici, tramite cristallizzazione per raffreddamento; con metodi chimici, sfruttando la reattività dei terpeni con basi forti.

- Oli essenziali attivati: si ottengono modificando la costituzione originale dell'olio tramite perossidazione. Tale operazione ne esalta l'attività battericida, ottenendo oli essenziali più interessanti per l'uso antisettico. La perossidazione consiste nel far agire ozono o aria ozonizzata in determinate condizioni di temperatura e pressione direttamente sull'olio essenziale, così da determinare la formazione di perossidi in una percentuale che è direttamente proporzionale al tempo e all'intensità dell'azione perossidante. Gli oli essenziali attivati inoltre penetrano più facilmente attraverso la cute perché la loro tensione superficiale è maggiore delle essenze naturali, tuttavia è necessario tener conto del fatto che sono anche più irritanti di queste ultime, dunque si rende indispensabile emulsionare gli oli perossidati con veicoli adatti.

**La conservazione degli oli essenziali.** I contenitori delle essenze devono essere di vetro scuro, di acciaio o di materiale smaltato, di metallo stagnato o zincato, in ogni caso di materiale inerte, non poroso e che oscuri alla luce. I contenitori devono essere sempre

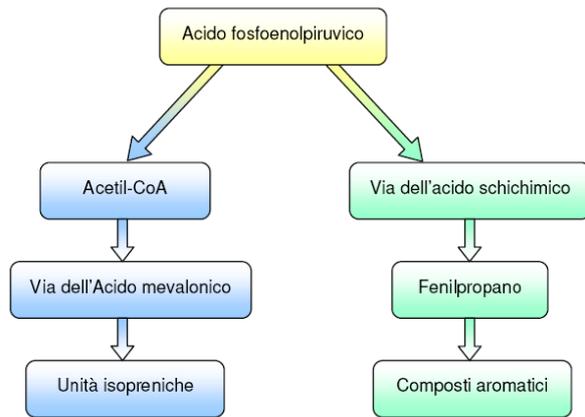
ben chiusi per evitare che l'aerazione provochi ossidazione cambiando le proprietà organolettiche dell'olio o provocando resinificazione. Per ovviare all'inconveniente può essere aggiunto un antiossidante liposolubile. I contenitori vanno poi conservati ad una temperatura compresa tra i 5 ed i 15°C; temperature più elevate possono provocare fenomeni di degradazione o comunque possono velocizzare tutte le possibili reazioni alterative.

### **Caratteristiche chimico fisiche e composizione chimica degli oli essenziali**

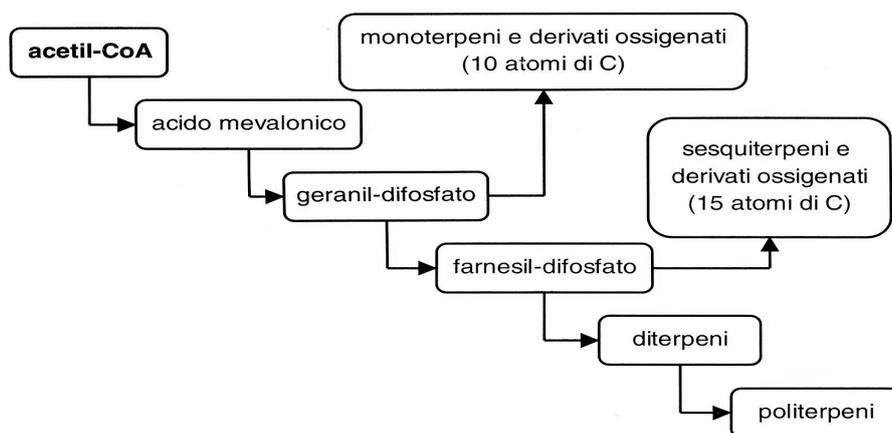
Gli oli essenziali sono, nella maggior parte dei casi, liquidi a temperatura ordinaria, volatili, di consistenza oleosa, più o meno fluidi (la loro densità è molto spesso inferiore a quella dell'acqua e varia da 0,759 a 1,187), di odore aromatico, incolore o colorati (ad esempio l'essenza di *Chamomilla recutita* è di colore blu), destrogiri o levogiri ma raramente otticamente inattivi. Sono poco solubili in acqua, alla quale però trasmettono il loro aroma perché lievemente idrofili, mentre sono solubili in alcool, etere, cloroformio e nella maggior parte dei solventi organici. Risultano solubili anche negli oli fissi, dai quali si distinguono per la loro volatilità. In alcuni casi il costituente principale dell'olio essenziale è solido a temperatura ambiente come accade per il timolo (olio essenziale di *Thymus vulgaris*), il mentolo (*Mentha x piperita*), l'anelolo (*Pimpinella anisum*) (Pedretti, 1990). Questi parametri, specifici per ogni essenza, sono usati per il riconoscimento e per il controllo qualitativo.

Gli oli essenziali sono miscele complesse di sostanze appartenenti a due fonti biogenetiche distinte (fig.26) :

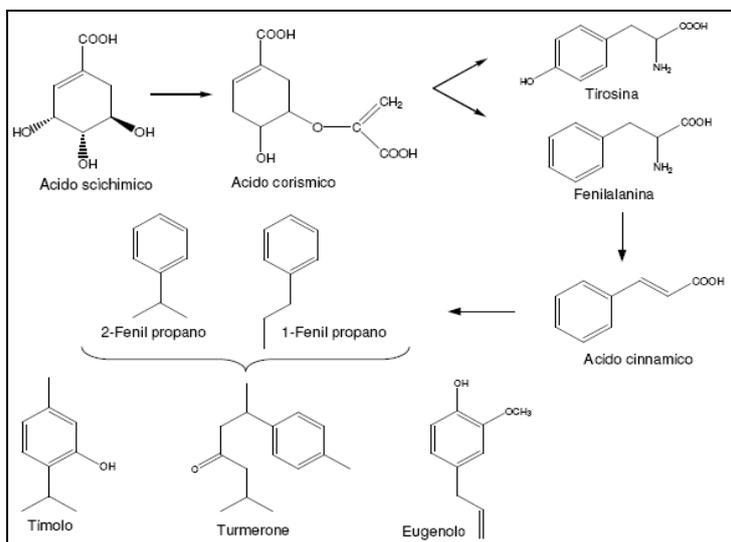
- quella dei terpeni, quasi esclusivamente costituita da mono e sesquiterpeni;
- quella delle molecole dette aromatiche, che generalmente si vogliono far derivare dal fenilpropano.



La biosintesi dei composti che formano gli oli essenziali si può dire che abbia inizio dal fosfoenolpiruvato (PEP), da cui prende il via la biogenesi dei fenilpropanoidi e dell'acetil-coenzimaA (AcCoA) da cui ha inizio la catena biogenetica dei terpeni (Bruni, 1999).



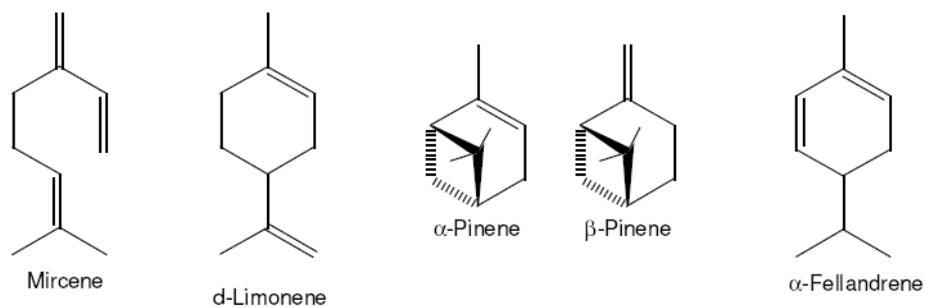
I prodotti aromatici derivanti dal fenilpropano costituiscono un gruppo particolarmente importante, solitamente responsabili dei caratteri organolettici degli oli essenziali. Questi composti aromatici si formano a partire dall'acido fosfoenolpiruvico, come i terpeni, ma la biosintesi poi prosegue seguendo la via dell'acido schichimico, fino al fenilpropano (vedi schema). Da questa molecola derivano composti aromatici di vario tipo, come l'eugenolo e l'anelolo.



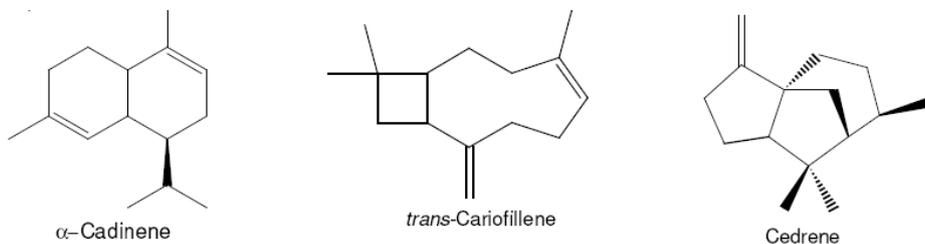
La composizione degli oli essenziali è molto complessa, ma è comunque possibile caratterizzare e classificare i costituenti sulla base degli elementi costitutivi:

**a) idrocarburi (elementi caratterizzanti C e H):**

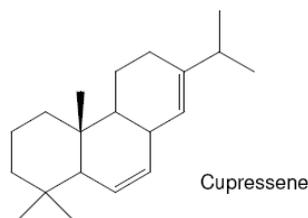
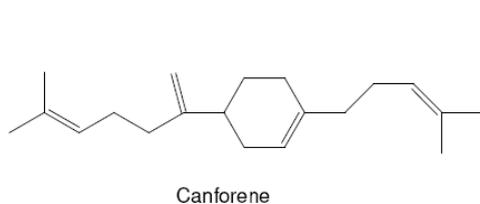
- **Idrocarburi monoterpenici (C10) alifatici e aromatici insaturi mono e biciclici**  
ad esempio: mircene, limonene, pinene, phellandrene.



- **Idrocarburi sesquiterpenici (C15)** ad esempio: cadinene, cariofillene cedrene, turmerone, zingiberene, bisabolene.

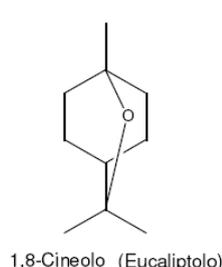
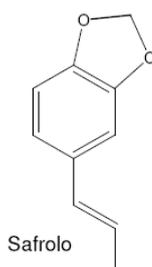
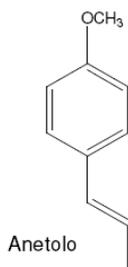


- *Azuleni ad esempio: camazulene, eucazulene, guajazulene, vetivazulene.*
- **Idrocarburi diterpenici (C<sub>20</sub>)** ad esempio: canforene e cupressene.



### **b) gruppo dei composti contenenti C, H, O:**

- **Alcoli (gruppo funzionale –OH)** ad esempio: linalolo, geraniolo, santalolo, mentolo, nerolo, borneolo.
- **Aldeidi (gruppo funzionale HC=O)** ad esempio: aldeide cinnamica, aldeide cuminica, citrale (geraniale + nerale), vanillina.
- **Chetoni (gruppo funzionale C=O)** ad esempio: carvone, tujone, canfora, fencone, mentone.
- **Fenoli (anello benzenico–OH)** ad esempio: timolo, eugenolo, carvacrolo.
- **Eteri (gruppo funzionale C-O-C')** ad esempio: anetolo, safrolo, eucaliptolo.



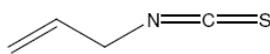
- **Esteri (gruppo funzionale O-C=O)** ad esempio: formiato di linalile, salicilato di metile, acetato di geranile, acetato di bornile, benzoato di benzile, acetato di terpenile.
- **Acidi organici (gruppo funzionale HO-C=O)** ad esempio: acido benzoico, acido cinnamico, acido salicilico, acido cuminico.
- **Perossidi (gruppo funzionale O-O)** ad esempio: ascaridolo.

### **c) Gruppo dei composti contenenti C, H, O, N, S:**

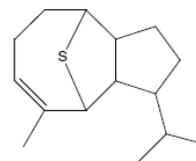
- **Derivati azotati** ad esempio: damascenina, antranilato di metile, indolo, acido cianidrico.
- **Derivati solforati e solfo-cianici (N=C=S)** ad esempio: diallildisolfuro, isotiocianato di allile, ismintolfuro.



Diallil disolfuro



Isotiocianato di allile



Ismint solfuro

### Controllo di qualità degli oli essenziali

Solitamente nel controllo qualità di una sostanza, si fa riferimento alla sua purezza considerando la percentuale del componente principale o di quello più interessante dal punto di vista applicativo. Nel campo degli oli essenziali, in quanto miscele complesse di origine naturale e di composizione variabile, il concetto di purezza è inteso in senso lato; infatti, più che alla percentuale dei singoli componenti si guarda al prodotto nel suo insieme. Sugli oli essenziali si possono svolgere diversi tipi di controlli, alcuni basati sulle tecniche classiche e dettati dalle Farmacopee, altri sviluppati più recentemente e applicati con successo anche agli oli essenziali.

### Determinazioni fisiche

- Esame organolettico: si controllano colore, odore, sapore. Questi ultimi due sono soggettivi, ed è necessaria una notevole esperienza. Per l'odore si deve tenere conto della nota percepita all'apertura del contenitore e sommarvi le impressioni percepite dall'evaporazione lenta su carta. A questo scopo si impiega una striscia di carta assorbente lunga circa 15 cm e larga 7/8 mm; l'estremità della striscia viene intinta nell'olio per circa 2 cm e si inizia ad odorare per percepire le note di testa. Si ripetono le odorazioni successive ad intervalli di quindici minuti, annotando le variazioni di odore per un periodo variabile da una a diverse ore. Il test va eseguito preferibilmente in parallelo con un campione di riferimento. La prova del sapore, invece, non può essere eseguita su qualsiasi olio essenziale, ma va riservata ad esempio, agli oli agrumari, di Menta, d'Anice, dopo opportuna diluizione (da 2000 a 5000 volte).

- Densità relativa: viene misurata sino alla terza o quarta cifra decimale, e va specificata la temperatura alla quale viene misurata.

- Potere rotatorio: molti oli essenziali contengono costituenti che hanno uno o più atomi di carbonio asimmetrici. Queste sostanze quando attraversate da luce polarizzata, sono in grado di ruotarne il piano o verso destra o verso sinistra.
- Indice di rifrazione: è il valore del rapporto tra i seni degli angoli di incidenza e di rifrazione di un raggio luminoso che passi dall'aria alla sostanza in esame.

### **Determinazioni chimiche**

- Determinazione dell'indice di esteri: l'indice di esteri è dato dal numero in milligrammi di KOH (idrossido di potassio) necessari per saponificare gli esteri contenuti in 1 grammo di sostanza in esame.
- Determinazione del residuo all'evaporazione delle essenze: costituisce la percentuale in peso dopo l'evaporazione a bagnomaria.
- Determinazione dell'acqua delle essenze: si mescolano 10 gocce di essenza con 1 ml di carbonio disolfuro. La soluzione che si ottiene deve rimanere limpida.
- Determinazione degli esteri estranei nelle essenze: si riscalda a bagnomaria per 2 minuti 1 ml di essenza con 3 ml di soluzione di potassio idrossido (100 g/l) in alcool, preparata al momento dell'uso. Non si devono formare cristalli nei 30 minuti successivi, anche dopo raffreddamento.
- Determinazione di oli grassi ed essenze resinificate nelle essenze: si lascia cadere 1 goccia di essenza su carta da filtro, la goccia deve evaporare completamente nel corso delle 24 ore senza lasciare alcuna macchia traslucida o grassa.
- Determinazione della solubilità delle essenze in alcool: serve per determinare la qualità delle essenze e dei propri componenti.
- Determinazione dell'1,8-cineolo nelle essenze: è basata sulla determinazione della temperatura di cristallizzazione che assume l'ortocresolo in presenza di una quantità maggiore o minore di eucaliptolo. I valori di 1,8-cineolo che si ottengono vanno confrontati con quelli della monografia dell'olio essenziale preso in esame. Se i valori ottenuti in relazione ai saggi rientrano in quelli della farmacopea, è possibile associare un'importanza di carattere officinale all'essenza.

### **Tecniche analitiche di controllo**

Ad oggi, la gas cromatografia, associata alla spettrometria di massa, rappresenta lo strumento ideale e principe per un approccio iniziale concreto alla caratterizzazione di un olio essenziale, rivelandone anche aspetti di indicazione proiettiva verso un utilizzo piuttosto che un altro.

La gascromatografia, nota anche come GC, è una tecnica cromatografica impiegata a scopo analitico, essa si basa sulla diversa ripartizione di varie sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con la fase mobile, costituita da un gas inerte. La fase mobile è un gas permanente (detto carrier o gas di trasporto) che fluisce attraverso una colonna in cui è invece posta la fase stazionaria. All'uscita da questa colonna un rivelatore segnala il passaggio dei diversi componenti della miscela ad un sistema di elaborazione dei segnali. Quest'ultimo fornisce il gascromatogramma, in cui la quantità di sostanza fluita, ossia separata dal suo assorbente è diagrammata in funzione del tempo che la sostanza ha impiegato per attraversare la colonna. Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi, purchè siano opportunamente solubilizzati e possano essere vaporizzati. Questa condizione è stata poi superata dalla HPLC, un'altra tecnica che fra l'altro consente di lavorare a temperatura ambiente e dunque evita il danneggiamento di eventuali sostanze termolabili.

La gascromatografia può essere applicata in tutti i campi della tecnologia e della ricerca, viene usata soprattutto per l'analisi quantitativa, infatti l'altezza o l'area dei picchi possono essere correlate con la quantità dei diversi componenti della miscela analizzata. Importante sottolineare che ad ogni modo si possono usare i parametri gascromatografici per ricavare informazioni qualitative.

Il gascromatografo con rilevazione di massa, ossia l'accoppiamento della gascromatografia con lo spettrometro di massa, consente di effettuare analisi qualitative e quantitative di qualsiasi specie chimica, con limiti di rilevabilità estremamente bassi. La spettroscopia di massa viene usata principalmente per determinare la massa molare; inoltre, poiché lo spettro rappresenta una sorta di "fingerprinting" delle molecole, è di fondamentale importanza per identificare sostanze incognite.

Proprio per questo motivo lo spettrofotometro di massa viene spesso accoppiato al gascromatografo o al cromatografo HPLC. La GC-MS, in particolare permette di analizzare in tempo reale i singoli picchi di uscita dalla colonna, effettuando la

determinazione quantitativa mediante il confronto dello spettro registrato con gli spettri memorizzati nella banca dati.

### **Campi di applicazione degli oli essenziali**

Le essenze hanno da sempre accompagnato le culture delle civiltà, acquisendo via via, dalle più antiche alle contemporanee, poliedricità di usi e indicazioni, dall'uso ritualistico-religioso, a quello condimentario, a quello cosmetico e terapeutico. In ogni caso, sono entrate a far parte delle culture di tutto il mondo. Gli usi sempre più diversificati degli oli essenziali, nonché la sempre più diffusa richiesta di mercato, hanno stimolato l'industria degli aromi, già in forte crescita agli inizi del XIX secolo, a sviluppare la produzione di oli essenziali di sintesi. Questi, erano e sono costituiti generalmente dal solo costituente principale dell'olio in Natura caratterizzandosi dunque delle proprietà funzionali principali ma senza quegli aspetti che caratterizzano un'essenza come fitocomplesso. Grazie alla riscoperta di questo aspetto costitutivo, che è anche espressione di una funzionalità complessa, oggi il mercato delle essenze naturali trova rinnovato vigore.

**L'aromaterapia** è un metodo terapeutico basato sull'utilizzazione di oli essenziali. Il termine "aromaterapia" fu coniato nel 1928 da Rene Gattefossé; nel 1964, col titolo di Aromatherapie, furono pubblicati i risultati degli studi clinici del dottor Jean Valnet, il quale impiegava gli oli essenziali nel suo trattamento di disturbi medici di varia natura, in particolare psichiatrici. Margherite Maury, una biochimica francese, si interessò all'aromaterapia nel periodo della seconda guerra mondiale, utilizzandola insieme ad altri rimedi e prodotti di bellezza naturali. Sviluppò in Francia una branca separata dell'aromaterapia che impiegava gli oli per uso esterno, piuttosto che interno, e li combinava con il massaggio per ottenere un risultato più completo. Paul Belaiche si occupò principalmente delle patologie infettive trattabili con le essenze e dei metodi per valutarne l'efficacia individuale mediante l'aromatogramma, metodo semplice *in vitro* per valutare il potere battericida degli oli essenziali.

**L'industria degli aromatizzanti** sta conoscendo negli ultimi anni un grande sviluppo, soprattutto in campi quali quello farmaceutico, alimentare e cosmetico. Da sempre sono stati questi gli ambiti di applicazione, ma oggi il mercato dell'aromatizzazione si accompagna a quello nella naturalità, che dà un valore aggiunto al prodotto, e all'aspetto funzionale nel senso più ampio dell'olio essenziale. Il concetto di aromatizzazione è dato dalla necessità di rendere i prodotti più adatti alle richieste di mercato, quindi sia in

campo farmaceutico che in campo alimentare, la motivazione è data dal bisogno di rendere, ad esempio, più appetibili i prodotti.

**Aromatizzazione in campo salutistico.** L'aromatizzazione di un farmaco concorre alla sua accettazione. Un farmaco infatti dal gusto e dal profumo gradevoli risulta meglio accetto al paziente rispetto ad uno con un gusto sgradevole; questo costituisce uno stimolo per la psicologia del paziente che lo dispone in modo positivo alla guarigione (Bruni, 1999). I prodotti disponibili per l'aromatizzazione dei farmaci possono essere di sintesi, di emisinthesi o naturali; tra i prodotti aromatizzanti naturali, ovviamente, gli oli essenziali giocano un ruolo fondamentale. La scelta del composto aromatizzante deve tener conto della preparazione farmaceutica coinvolta, e, a seconda delle caratteristiche chimico fisiche, si renderà necessario scegliere aromatizzanti diversi.

**Aromatizzazione in campo alimentare.** L'industria alimentare fa un largo uso di sostanze aromatizzanti nella formulazione di prodotti alimentari per vari motivi: conferire sapore e odore a una miscela di ingredienti che, provenendo spesso da processi più o meno complessi di elaborazione, hanno perduto il gusto originale; standardizzare i prodotti alimentari anche dal punto di vista dei caratteri organolettici; venire incontro alle sempre più esigenti preferenze di mercato e, aspetto non secondario, favorire anche la conservabilità dei prodotti.

**In campo cosmetico** gli oli essenziali trovano applicazioni in diversi ambiti, possono innanzitutto essere impiegati come componente profumata di un cosmetico, come aromatizzante di particolari cosmetici in cui è importante anche l'effetto gustativo (come nei dentifrici, collutori, sticks labiali), oppure possono trovare un'importante proiezione applicativa nell'ambito della cosmesi funzionale.

Il settore dell'aromacosmesi, si interessa di trattamenti cosmetici a base di oli essenziali o di piante aromatiche che li contengono. Le proprietà farmacoterapeutiche delle essenze stanno alla base del loro uso in aromaterapia e sono molto spesso le stesse che ne determinano l'impiego funzionale in cosmetologia; così essenze dalle proprietà antinfiammatorie, come ad esempio l'olio di Camomilla, trovano applicazione in cosmetici emollienti. Come nell'ambito della nutrizione, gli oli essenziali possono trovare applicazione nella cosmesi funzionale, come emollienti, restitativi, antiossidanti, ecc. Quindi un cosmetico funzionalizzato ad uso topico od endogeno deve apportare sostanze al fine di compensare le carenze o le eventuali disfunzioni metaboliche, nel

rispetto delle proprietà biologiche e fisico-chimiche della cute: i cosmetici devono perciò avere affinità per la natura e le proprietà del tessuto cutaneo.

**I Profumi.** Il profumo può essere definito come una miscela di sostanze odorose, generalmente di origine vegetale od animale. Probabilmente la scoperta del profumo è legata alla combustione di materiale vegetale, e ancora oggi permane in alcuni casi l'uso di liberare fumi odorosi mediante la combustione, come ad esempio si fa con l'incenso e la mirra. Un tempo i profumi erano composizioni basate su miscele di oli essenziali e di altri derivati odorosi naturali, ma col progredire della sintesi chimica e l'aumento nei consumi, l'impiego degli oli essenziali naturali è diminuito. Attualmente le essenze naturali costituiscono non più del 10% dei profumi, il resto è ricostruito per sintesi. Le note di un profumo vengono percepite in modo diverso a seconda della volatilità dei componenti, per questo si classificano solitamente in:

Note di testa - Il profumo esplode con le note di testa che devono attirare l'attenzione. Emanano un profumo leggero ed effimero. Sono spesso note agrumate (limone, bergamotto, mandarino, arancio), o erbacee (salvia, rosmarino, lavanda). Si sviluppano e si arricchiscono gradualmente unendosi alle note di cuore che sono le note dominanti del profumo.

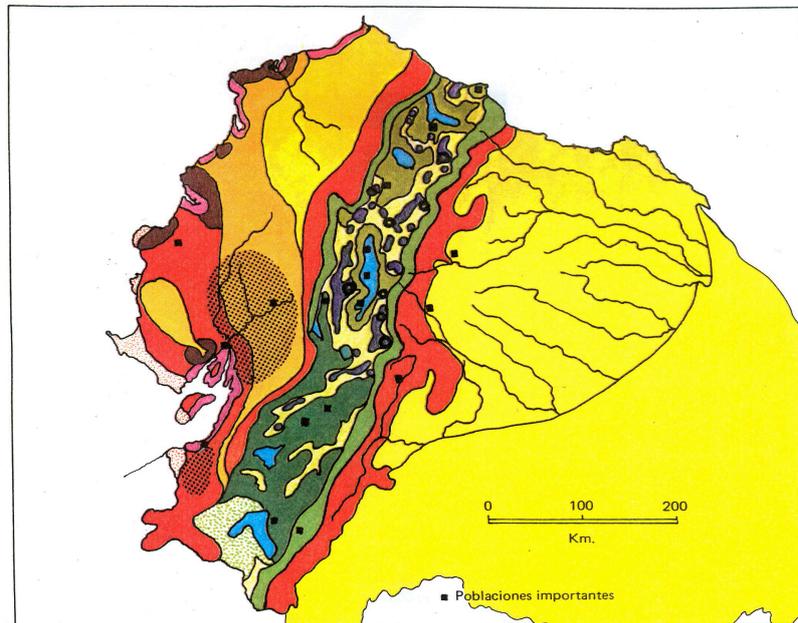
Note di cuore - Hanno più tenuta delle note di testa. La loro fragranza ha bisogno di tempo per svilupparsi. Le note di cuore danno carattere al profumo. Sono generalmente fiorite (rosa, garofano, gelsomino, ylang-ylang, tuberosa, mughetto) o speziate (chiodo di garofano, cannella, coriandolo, noce moscata).

Note di fondo - Le note di fondo intensificano il carattere del profumo e gli danno tenuta. Queste note hanno bisogno di più tempo per svilupparsi, ma durano più a lungo delle altre. Si sentono quasi impercettibilmente attraverso le note di testa, sostengono e prolungano le note di cuore. Controllano le diverse velocità di evaporazione delle note di testa e delle note di cuore. Sono spesso note balsamiche (benzoino, galbano, mirra) o boisée (legno di cedro, patchouli, vétiver, sandalo).

**Ecuador amazzonico: notizie antropologiche (etnie) e fitogeografiche di sintesi, le piante studiate e le zone di raccolta**

L'Ecuador è una nazione situata al nord-ovest di Sudamerica con un'estensione territoriale di 275.830 Km<sup>2</sup>. L'Ecuador ha nel suo territorio il 10% di tutte le specie vegetali ad oggi conosciute su tutto il pianeta (Arguello 2008). È considerato per questo un Paese “megadiverso”, dove la densità di specie viventi differenti è di 9,2 per Km<sup>2</sup>.

Tipi di vegetazione in Ecuador



- |  |  |
|--|--|
|  Mangrovie                          |  Platerie inter-andina                        |
|  Costa Arida                        |  Vegetazione arbustiva dal sud                |
|  Savana                             |  Vegetazione aerofila dal sud                 |
|  Bosco deciduo                      |  Desertiche e semi-desertiche zone delle Ande |
|  Bosco semi-deciduo                 |  Brughiere                                    |
|  Foreste pluviale di pianura        |  Brughiere umide                              |
|  Foreste sempre pluviale di pianura |  Brughiere secche                             |
|  Bosco nuvoloso o sub-andino        |  Aree de inondazione                          |

La regione amazzonica dell'Ecuador ne occupa oltre la metà dell'estensione totale del territorio, ha tipicamente un'alta umidità e una temperatura tropicale (media 25-26 °C); le precipitazioni hanno valori compresi tra 4000 a 5000 mm per anno (Patzelt 2004). In queste regioni ad oggi si contano circa 8200 specie vegetali diverse.

Rispetto alla suddivisione geografica, si possono individuare differenti etnie native, suddivise in quattordici nazionalità indigene tra cui ricordiamo le più importanti: Wao, Achuar, Shuar, Cofán, Secoya, Siona, Kichwa, Kandwash, Shiwiar e Záparo, per quello che riguarda la regione amazzonica; Kichwa nella regione andina; Awa, Chachi, Epera e Tsáchila nelle regioni costiere ed insulari. Ogni etnia ha un patrimonio etnobotanico ed etnomedico importante ed esclusivo. Il popolo Shuar in particolare è il più numeroso e conta oggi circa 110.000 abitanti localizzati prevalentemente nelle provincie di Morona Santiago, Pastaza e Zamora Chinchipe (de la Torre & Balslev 2008). La sussistenza della popolazione Shuar è legata all'agricoltura e all'allevamento del bestiame, ma oggi le politiche di deforestazione e di sfruttamento minerario del territorio rischiano di erodere in modo importante ed irreparabile il patrimonio culturale di tale etnia (Eguiguren & Jiménez 2011; Morales et al 2010). Lo studio delle risorse vegetali che rappresentano parte del patrimonio etnomedico Shuar è una delle strategie che mirano alla salvaguardia della loro cultura e alla promozione di nuove iniziative di sostentamento maggiormente coerenti con la loro tradizione, come ad esempio lo sfruttamento eco-sostenibile delle piante appartenenti alla loro etnomedicina, come possibile risorsa cosmetica o fitoterapica.

Il presente elaborato vuole perciò rappresentare un nuovo tassello di questo percorso di riscoperta e valorizzazione del patrimonio etnobotanico ed etnomedico degli Shuar dell'Ecuador amazzonico e, sullo stesso solco tracciato per le ricerche sviluppate in precedenza, questo studio prevede la collaborazione dell'Università degli Studi di Ferrara, la UPS di Quito e la Fundacion Chankuap (Macas, Ecuador).

Il presente lavoro di dottorato ha come finalità la caratterizzazione chimica e di bioattività di alcune piante patrimonio etnobotanico e della medicina tradizionale della popolazione Shuar dell'oriente meridionale dell'Ecuador amazzonico. In questa indagine sono coinvolti il Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie (SVEB) dell'Università degli Studi di Ferrara, l'area delle Scienze della Vita dell'Università Politecnica Salesiana, il Centro per la Cooperazione Internazionale della Università de Ferrara. Qualora le ricerche conducano ad una possibile proiezione commerciale in ambito prevalentemente cosmetico delle piante oggetto dello studio, come per gli studi svolti in precedenza è previsto un ruolo determinante da parte della fondazione salesiana *Fundacion Chankuap* (Macas, Ecuador, provincia di Morona-Santiago).

Come già sottolineato le piante oggetto d'indagine sono *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotrepala* (Siparunaceae), *Piper leticianum*, *Piper augustum* (Piperaceae), *Hedygium coronarium* (Zingiberaceae). La tradizione etnomedica Shuar ne indica diversi usi etnomedici (vedi schede botanico-farmacognostiche di seguito) e sulla base di queste premesse d'uso etnobotanico si è pensato di concentrare lo studio sulla frazione prevalentemente terpenica di tali piante e dunque sull'olio essenziale. Il lavoro di dottorato è stato incentrato dunque sull'ottimizzazione del processo di estrazione, sullo studio dei componenti chimici (HPTLC, GC-MS, RMN) e sull'analisi di alcune attività biologiche (antiossidante, antimicrobica, citotossicità, mutagenesi e mutageno-protezione) (vedi sezione "Obiettivi del dottorato di ricerca").

### **Descrizione sintetica delle piante oggetto dello studio**

Si riportano di seguito alcune note sintetiche di descrizione botanica delle piante oggetto dello studio, della loro distribuzione e segnalazione etnomedica secondo la tradizione Shuar. Sono piante generalmente poco studiate (si vedano gli aspetti specifici su ciascuna specie nella sezione dedicata ai risultati e discussione) sia sotto il profilo di caratterizzazione chimica che di bioattività. Certamente, la loro localizzazione geografica e il loro areale di distribuzione legato alla foresta amazzonica contribuiscono a rendere il loro profilo fitochimico particolarmente interessante sia per caratterizzazione quali-quantitativa della frazione terpenica sia per la possibile proiezione applicativa in ambito salutistico (cosmetico). È noto infatti che un'accentuata biodiversità guida il biochimismo vegetale verso una forte specializzazione sia relativamente alla qualità sia alla quantità di metaboliti secondari, contribuendo a rendere esclusivi e spiccatamente originali i fingerprinting delle risorse vegetali cresciute in luoghi così spiccatamente biodiversi come la foresta amazzonica.

#### ***Siparuna aspera* (Ruiz & Pav)**



*Siparuna aspera* (Ruiz & Pav) (Renner & Hausner 2005)

**Sinonimi:** *Citrosma aspera* (Ruiz & Pav) (Renner & Hausner 1997), *Citrosma limoniodora* Pav. ex Tul. (Renner & Hausner 2005), *Siparuna ecuadorica* Heilborn (Renner & Hausner 1997).

**Nome comune:** limoncillo (nome castizo), Mejentsuna (nome Shuar)

#### **Classificazione botanica**

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Sub classe: Magnoliidae Takht.

Superordine: Magnolianaes Takht.

Ordine: Laurales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Famiglia: Siparunaceae (A. DC.) Schodde

Genere: *Siparuna* Aubl (Renner 2005)

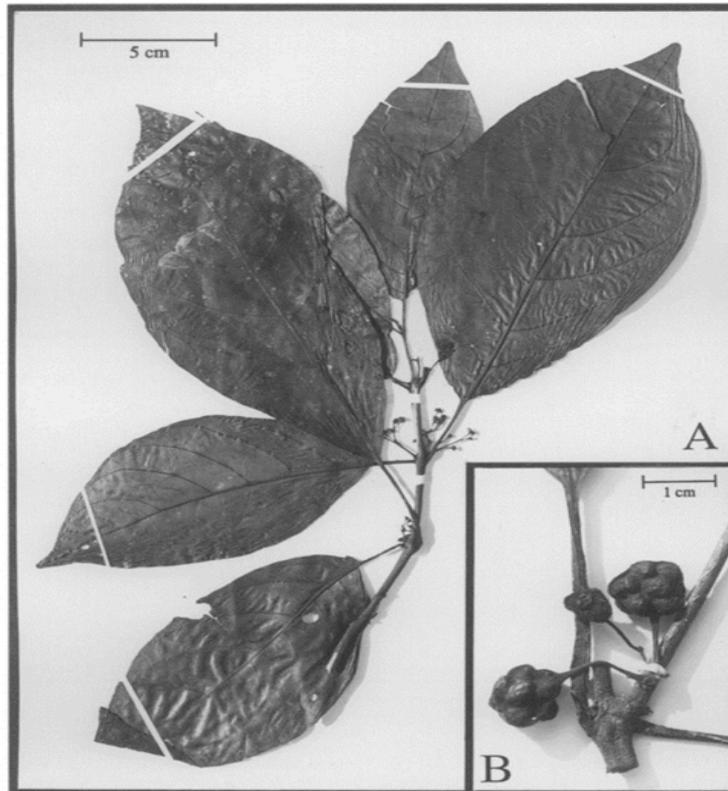
Pianta nativa dell'Ecuador e del sud America in genere (Bolivia, Colombia, Peru, Venezuela). In Ecuador presenta areali localizzati nelle province di Napo, Pastaza, Morona Santiago, Orellana, Sucumbios, Pichincha, Tungurahua e Zamora.

È un arbusto o albero dioico, 2-10 metri di altezza, con un diametro medio di 25 cm; presenta giovani ramoscelli di sezione quadrangolare, coperti di tricomi. Foglie opposte,

ellittiche con apice acuto, ricoperte di tricomi; presentano nervature secondarie, margine dentato o irregolarmente seghettato.

L'etnia Shuar usa infusione della foglia per abbassare la febbre.

***Siparuna macrotepala* Perkins**



*Siparuna macrotepala* Perkins (Renner & Hausner 2005)

**Nome comune:** limoncillo (nome castizo), Tsuna (nome Shuar)

**Classificazione botanica**

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Sub classe: Magnoliidae Novak ex Takht.

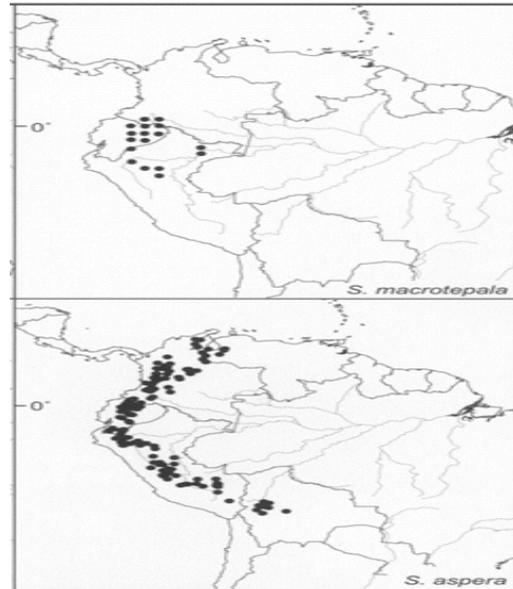
Superordine: Magnolianaes Takht.

Ordine: Laurales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Famiglia: Siparunaceae (A. DC.) Schodde

Genere: *Siparuna* Aubl (Renner 1997)

Pianta nativa dell'Ecuador ma presente anche in Colombia e Perù. In Ecuador si trova nelle province di Morona Santiago, Napo, Sucumbios e Pastaza (Jørgensen et al 1994).



Areale di distribuzione di *S. aspera* e *S. macrotepala* (Renner & Hausner 2005)

Arbusto o albero dioico, 3-10m di altezza, con rami quadrangolari e con quattro nervature longitudinali distinte, ricoperti con radi tricomi. Foglie opposte; obovate, o oblanceolate, apice acuminato, con 6-9 paia di nervature secondarie. Fiori con 4-5, tepali spatolati o oblunghi.

L'etnia Shuar usa infusione della foglia come anti malaria e per combattere l'influenza.

### ***Piper Leticianum* C. DC.**

**Sinonimi:** *Piper conejoense* Trel. & Yunck. (Renner 1990)

**Nome comune:** Untuntuntup (nome Shuar)

### **Classifica botanica.**

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Sub classe: Magnoliidae Novak ex Takht.

Superordine: Magnolianaes Takht.

Ordine: Piperales Bercht. & J. Presl



Sub classe: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordine: Magnolianaes Takht.

Ordine: Piperales Bercht. & J. Presl

Famiglia: Piperaceae Giseke

Genere: *Piper* L.

Pianta nativa dell'Ecuador si trova ampiamente distribuita in tutta l'America tropicale, ma è presente anche in Bolivia (Parker & Bailey 1991), Brazil (Forzza 2010), Costa Rica (Burguer 1971), Guyana Francese (Funk et al 2007), México (Garcia & del Castillo 2011), Nicaragua (Callejas 2001), Panama (D' Arcy 1987), Suriname (Funk et al 2007) e Venezuela ( Hokche & Huber 2008). In Ecuador si trova nelle province di Carchi, Esmeraldas, Morona, Napo, Pastaza, Sucumbios, Los Rios (Jørgensen et al 1994).

Arbusto di 2-3 metri di altezza, può arrivare fino 8 metri; foglie ellittiche-ovate, con apice acuto, nervatura pennata (Woodson 1950).

L'etnia Shuar usa la foglia e l'infruttescenza per combattere la carie dentale.

***Hedychium coronarium* J. Koenig**



*Hedychium coronarium* J. Koenig. (foto di Paco Noriega)

**Sinonimi:** *Hedychium coronarium* var. baimao Z. Y. Zhu (Wu et al 200), *Hedychium spicatum* Buch.-Ham.ex Sm. (Jørgensen et al 2013).

**Nome comune:** Lirio de muerto (nome castizo) Ajejà (nome Shuar)

## **Classificazione botanica**

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Sub classe: Magnoliidae Novák ex Takht

Superordine: Liliales Takht

Ordine: Zingiberales Griseb

Famiglia: Zingiberaceae Martinov

Genere: *Hedychium* J. Koenig

Pianta nativa dell'Asia tropicale, introdotta in Ecuador, si trova comunemente in Argentina (Fabris 1968), Belize (Balick 2000), Cina (Wu et al 2000), Costa Rica (Mass 2003), Guatemala (Standley & Steyermark 1952), Honduras (Molina 1975), India (Wu et al 2000), Madagascar (Perrier de la Bathie 1946), México (Breedlove 1986), Sud Africa (Gibbs et al 1987), Sri Lanka (Wu et al 2000) e Vietnam (Wu et al 2000). In Ecuador si trova nelle province di Esmeraldas, Morona, Guayas, Los Rios, Napo, Pastaza, Sucumbios, (Jørgensen et al 1994).

Le piante del genere *Hedychium* si caratterizzano per presentare infiorescenze ellissoidali o ovoidali; i fiori presentano 3-5 brattee floreali densamente embricate in 5-8 spirali.

È nota sul piano etnomedico per avere proprietà analgesiche, antisettiche e coadiuvanti la digestione (per insufficienze/disturbi epatici).

# **Strategia e Obiettivi**

## **Obiettivi del dottorato di ricerca.**

Gli oli essenziali sono il prodotto del metabolismo secondario delle piante e sono generalmente materiali volatili fragranti composti da una mistura complessa di

idrocarburi mono- e sesquiterpenici, e di materiali ossigenati derivati biosinteticamente da questi. Altri costituenti comuni includono i fenil propanoidi derivati dal percorso dell'acido shichimico e i loro prodotti di trasformazione, e altri composti provenienti dal metabolismo degli acidi grassi e degli amminoacidi. A parte questi gruppi di composti maggioritari, sono presenti molti altri composti che includono composti azotati e solforati. Il nostro gruppo di ricerca svolge da molti anni attività di studio e di applicazione di oli essenziali, sia per la particolare via biosintetica da cui essi derivano, sia per le notevoli applicazioni in campo della salute (farmaceutico, cosmetico, alimentare) (Sacchetti et al 2005). Le strutture di particolare interesse sono per noi i sesquiterpeni e i fenil propanoidi (Vertuani et al 2011; Haloci et al 2011).

La foresta Amazzonica rappresenta una fonte inestimabile di piante aromatiche, ricche quindi di oli essenziali. Il presente lavoro ha come finalità la selezione e valutazione di piante medicinali aromatiche, utilizzate nella pratica tradizionale (Etno-Farmacia) dal popolo indigeno della foresta amazzonica del sud dell'Ecuador. In questa indagine scientifica sono stati coinvolti: il Dipartimento di Scienza della Vita dell'Università degli Studi di Ferrara, l'area delle Scienze della Vita della Università Politecnica Salesiana e il Centro per la Cooperazione Internazionale della Università di Ferrara.

Per questo lavoro, da un panel di circa 2000 piante presenti presso l'erbario della Università Politecnica Salesiana, sono state selezionate cinque piante, per il loro contenuto in oli essenziali e quindi per l'aroma molto pronunciato: *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotrepala*, *Piper augustum*, *Piper leticianum* e *Hedychium coronarium*.

Il lavoro di dottorato è stato incentrato sull'ottimizzazione dei processi di estrazione, lo studio dei componenti chimici (HPTLC, GC-MS, RMN) e valutazione della attività biologica (antiossidante, antimicrobica, citotossicità, mutagenica e mutageno-protettiva).

Le linee generali seguite dal progetto sono illustrate sul diagramma (Fig. 2), campionando le piante dalla foresta della Cordigliera del Kutukù.

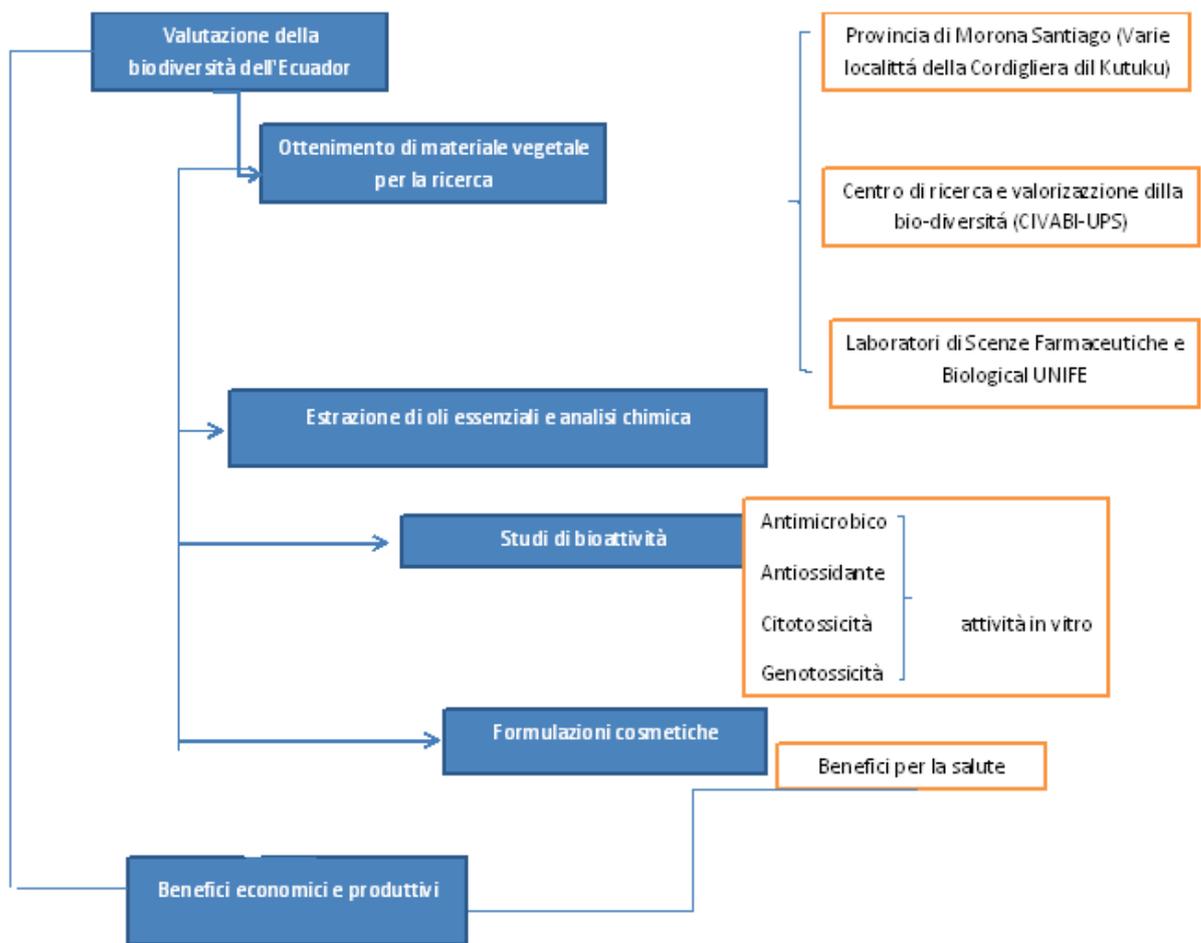


Figura 2. Schema delle linee operative del lavoro svolto durante il dottorato di ricerca

La ricerca ha previsto quanto segue.

- Indagine delle applicazioni dal punto di vista farmaceutico e cosmetico delle Piante medicinali e delle loro proprietà da analisi di letteratura (Fig. 3 ).
- Messa a punto di idonee metodologie estrattive (distillazione in corrente di vapore), e studio fitochimico degli oli essenziali (1H NMR, GC-FID, GC-MS, HP-TLC).
- Valutazione della attività biologica in vitro per determinare l'efficacia degli oli essenziali, e selezionare i composti più rappresentativi.
- Formulazione degli oli essenziali risultati migliori in prodotti cosmetici

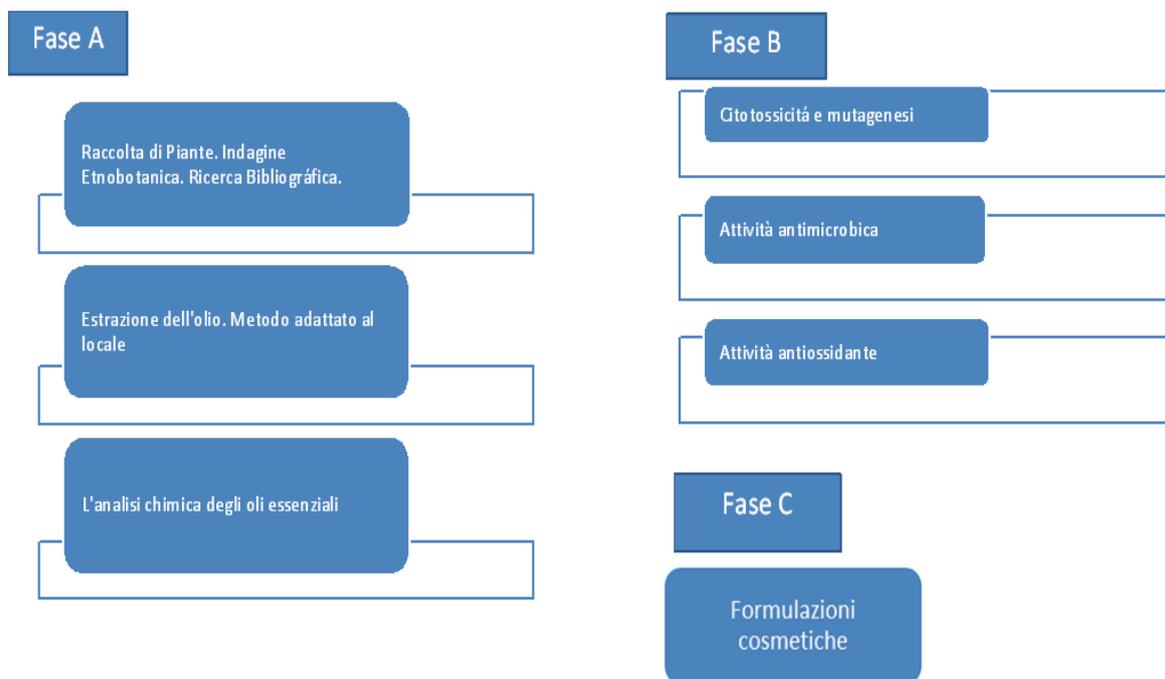


Figura 3. Fasi della Ricerca

# **MATERIALI E METODI**

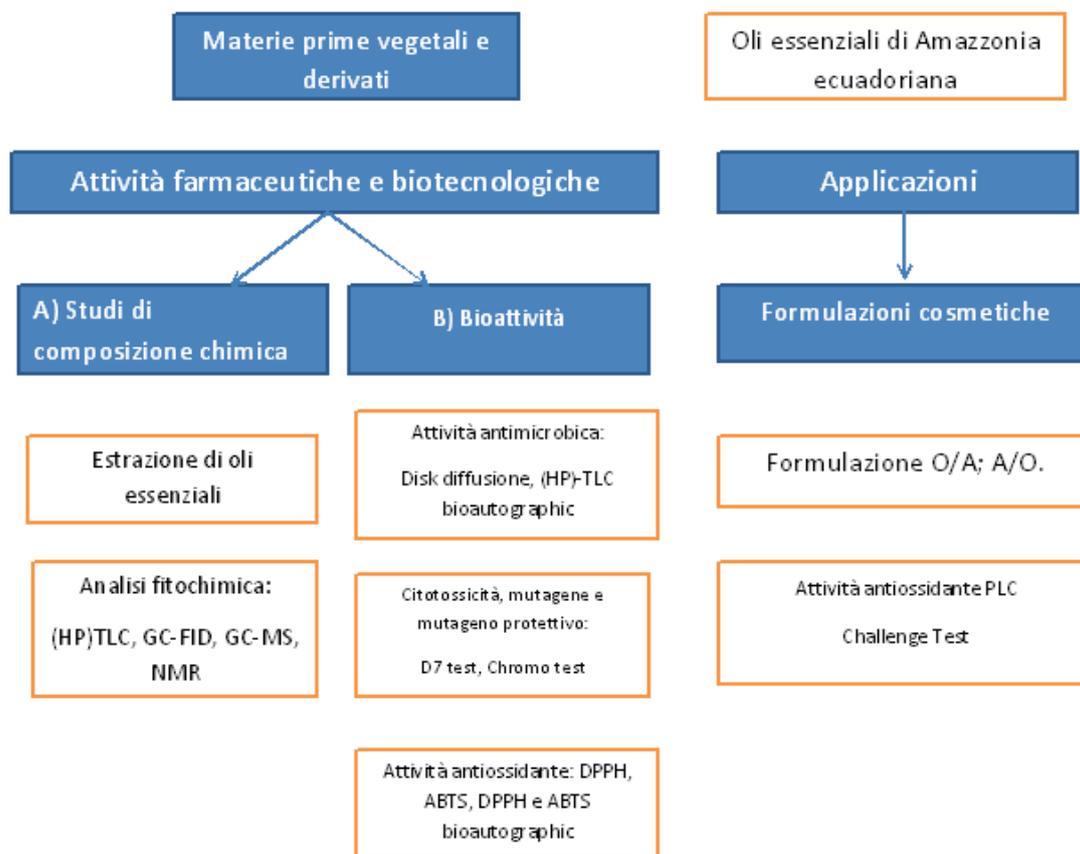


Figura 10. Schema generale della ricerca.

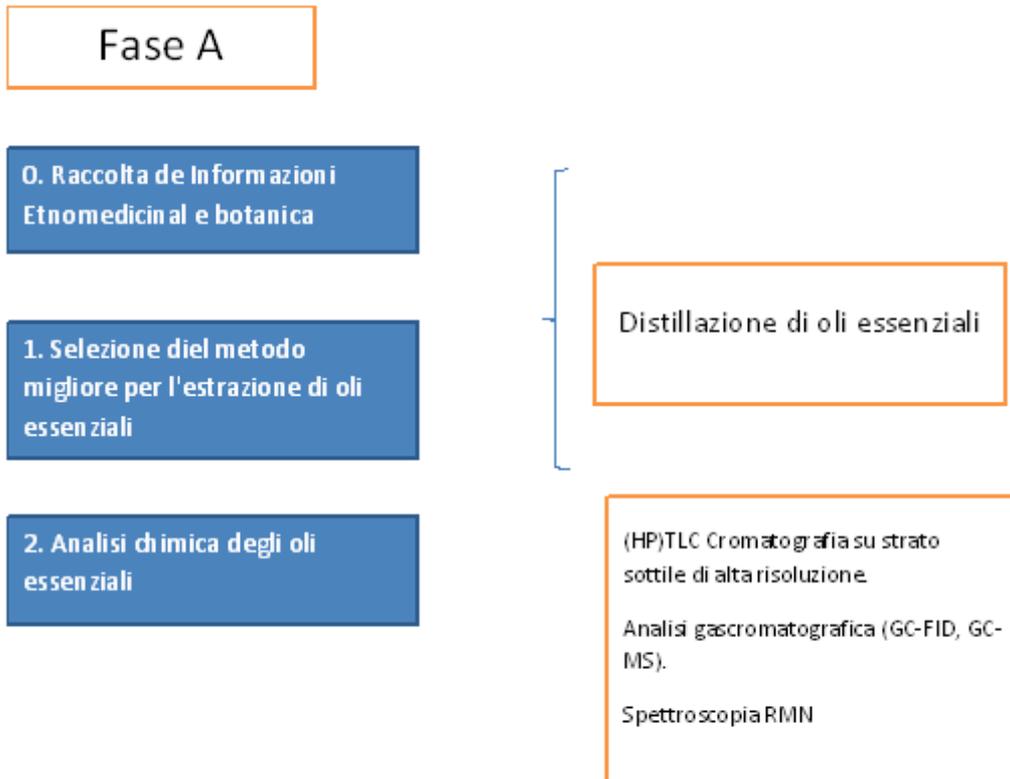


Figura 11. Schema fase A.

**D) Metodi di estrazione e analisi chimiche.**

**A) 1 Metodi di estrazione.**

**A) 1.1 Estrazione di oli essenziali.**



Figura 12. Processo di estrazione di oli essenziali.

Gli oli essenziali sono stati estratti da piante selvatiche, la loro raccolta è stata effettuata in due momenti diversi e in tre luoghi della provincia di Morona Santiago, come mostrato in tabella 2 e figura 13.

Specie	Luogo e data di raccolta
<i>Siparuna aspera</i>	<p>Data di raccolta: 26/06/2010</p> <p>Posizione: Parroquia San Luis del Upano, Provincia de Morona Santiago.</p> <p>Latitudine: S 2° 28' 43"</p> <p>Longitudine: W 78 ° 8' 59"</p> <p>Altezza: 820msm</p>
<p><i>Siparuna macrotepala</i></p> <p><i>Piper augustum</i></p> <p><i>Piper leticianum</i></p>	<p>Data di raccolta: 14/11/2010</p> <p>Posizione: Estación Biológica Shakaim, parroquia Chiguaza, provincia di Morona Santiago.</p> <p>Latitudine: S 02°03' 52.2",</p> <p>Longitudine: W 77°52' 32.5"</p> <p>Altezza: 1200 msm</p>
<i>Hedychium coronarium</i>	<p>Data di raccolta: 14/11/2010</p> <p>Posizione: Macas, provincia de Morona Santiago.</p> <p>Latitudine: S 2° 10'</p> <p>Longitudine: W 78° 0' .</p> <p>Altezza: 1080 msm</p>



Tabella 2. Dati di raccolta delle piante medicinali.

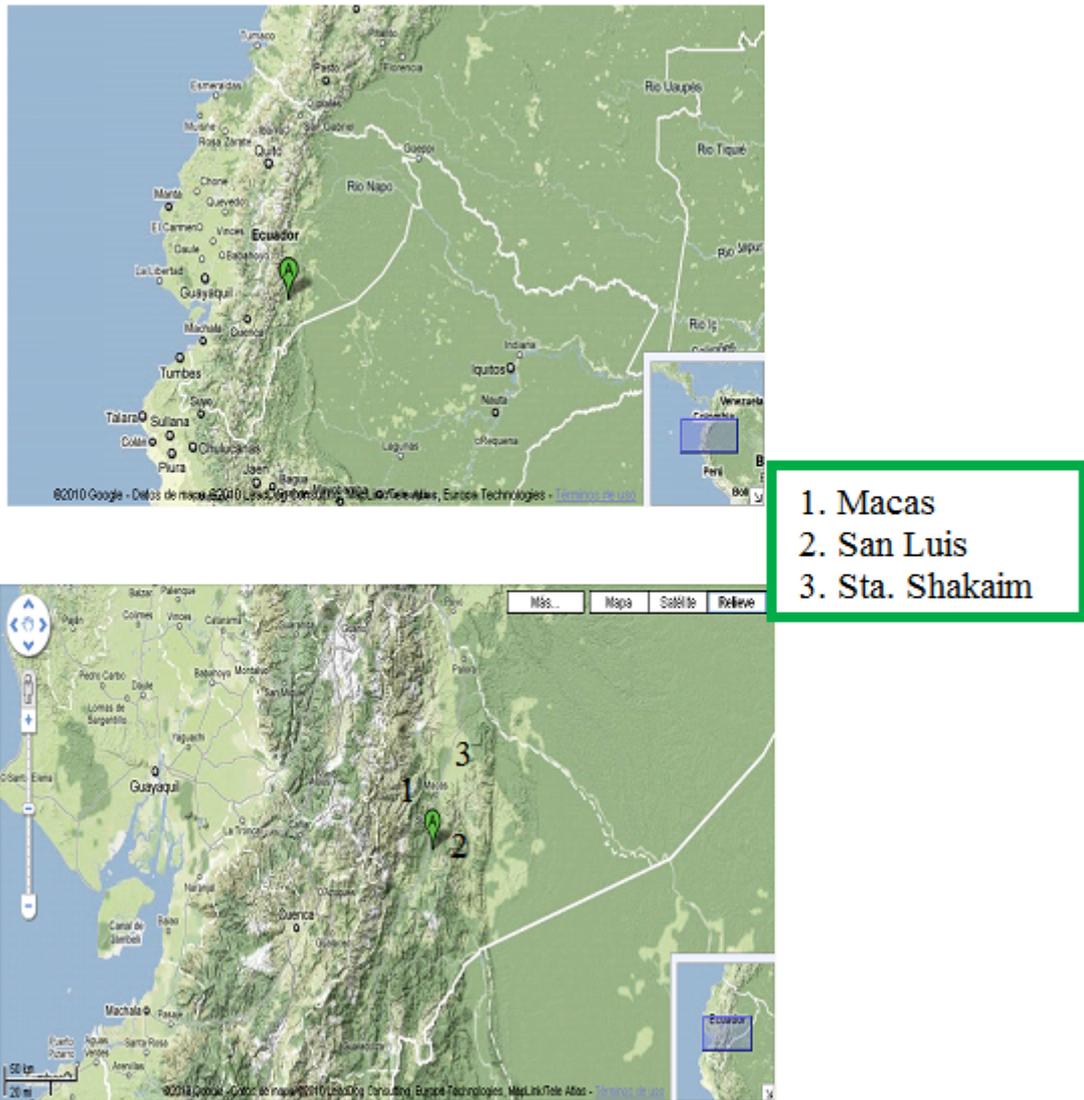


Figura 13. Posizioni delle località di raccolta.

Per l'estrazione degli oli essenziali è stato utilizzato il metodo della distillazione conosciuto come “distillazione con acqua e vapore di acqua” (Noriega 2009; Sharapin 1999), questo metodo prevede la generazione di vapore all’interno dello stesso reattore, il campione vegetale analizzato è sempre fresco ed è collocato sopra un contenitore di acqua in ebollizione attraverso una rete metallica. Il distillatore utilizzato supporta un volume di 250 litri massimo ed è stato fornito dalla fondazione Chankuap (Fig. 14). Per

le specie: *S. aspera*, *S. macrotepala*, *P. leticiaunum* e *P. agustum* le foglie sono state distillate, mentre per *H. coronarium* sono stati utilizzati i rizomi.



**Figura 14. Distillatore di oli essenziali**

Per le foglie il tempo di distillazione è stato di sei ore, mentre per i rizomi è stato di otto ore.

Per ogni olio essenziale è stata determinata la resa di estrazione, le caratteristiche organolettiche ed il suo peso specifico mediante il metodo del picnometro (Miranda 2000).

#### **A) 2. Composizione chimica degli oli essenziali.**

Gli studi sulla composizione degli oli essenziali sono stati effettuati utilizzando i seguenti metodi analitici: GC, GC/MS, HP TLC,  $^1\text{H}$  NMR.

##### **A) 2.1 Analisi di Gas Cromatografia.**

La gas cromatografia (GC), come tutte le cromatografie, si basa sulla diversa ripartizione di varie sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, costituita nello specifico da un gas inerte. Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi. L'unico limite di questa tecnica è rappresentato dal fatto che il campione deve essere volatile in un intervallo di temperatura compreso tra la temperatura ambiente e i 300 °C circa, temperatura compatibile con la maggior parte delle colonne cromatografiche usate. I meccanismi di separazione che si sfruttano in gas cromatografia sono sostanzialmente due:

- adsorbimento: la fase stazionaria è un solido sulla cui superficie si trovano dei siti attivi in grado di stabilire una serie di legami secondari (dipolo-dipolo, ponte idrogeno, Van der Waals, dipolo-dipolo indotto, ecc.) con le diverse molecole della

miscela da risolvere, quindi si definisce cromatografia gas-solido (GSC, gas-solid chromatography);

- ripartizione: la fase stazionaria è liquida e si verifica una vera e propria solubilizzazione delle sostanze che si ripartiscono tra le due fasi immiscibili. Questa tecnica è definita cromatografia gas-liquido (GLC, gas-liquid chromatography) ed è la più utilizzata.

La fase mobile è caratterizzata da un gas, detto anche gas di trasporto, gas vettore o gas carrier. Generalmente, vengono scelti gas chimicamente inerti, a bassa viscosità ed ottenibili con un elevato grado di purezza (99,9999%) quali l'azoto, l'elio o l'argon; per molte applicazioni viene anche utilizzato idrogeno, che però presenta problemi di sicurezza, e in taluni casi anche anidride carbonica.

Dopo che il campione è stato eluito all'interno della colonna capillare, all'estremità finale della colonna viene raccolto da un rivelatore, che produce un gas cromatogramma in funzione del tempo, fissato a zero l'istante in cui il campione è stato introdotto in colonna. Il cromatogramma si presenta come una sequenza di picchi di varia ampiezza e altezza distribuiti lungo l'asse del tempo; dalla misura dell'ampiezza dei vari picchi si ottiene una misura quantitativa dei componenti presenti nel fitocomplesso. L'analisi gas cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa permette l'identificazione dei picchi sia in base al loro tempo di ritenzione che alla loro frammentazione e la quantificazione dei composti in funzione dell'area sottesa dai picchi.

Per l'analisi gas cromatografica si utilizza un cromatografo marca Varian GC 3800 attrezzato con una colonna Varian FactorFour VF-5ms (5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane, 0,25mm, 30m, 0,10µm), accoppiato a un spettrometro di massa Varian 4000 con ionizzazione elettronica (EI), e con una banca dati collegata (libreria NIST).

#### **A) 2.1.1 Analisi dei costituenti degli oli essenziali per GC, GC/MS.**

I componenti volatili sono stati identificati per confronto degli indici di ritenzione (RI), mediante studio della frammentazione MS comparata con la libreria di spettri NIST e con standard commerciali. Per la determinazione dell'RI si effettua un confronto con la banca dati presente in letteratura (Adams, 2007), e con il (RI) sperimentale calcolato a

partire di una miscela di idrocarburi alifatici puri (24 composti) forniti da Sigma Aldrich.

### **Condizioni gas cromatografiche.**

Le condizioni operative per il gas cromatografo sono le seguenti: temperatura dell'iniettore 280°C, rapporto di split di 1/50 e come gas carrier è stato utilizzato elio (1 ml/min). L'analisi gas cromatografica è stata eseguita impostando le seguenti condizioni di temperatura: incremento di temperatura del forno da 55°C a 100°C con una velocità di 1°C/min, seguito da un ulteriore innalzamento fino 250°C a una velocità di 5°C/min, per poi rimanere costante a questa temperatura per 15 minuti. La durata totale dell'acquisizione del cromatogramma è stata pari a 90 minuti (Fig 15).

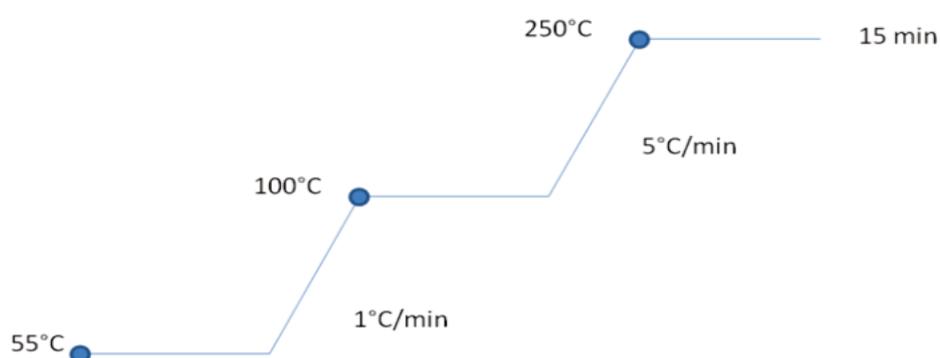


Figura 15. Programmata di temperatura del gas cromatografo.

Un'aliquota di campione di olio essenziale (circa 0,1 ml) è stata disciolta in 2 ml di cloruro di metilene ed in seguito iniettata nel gas cromatografo (1µl).

### **Condizioni dello spettrometro di massa (MS).**

Le condizioni sperimentali dello spettrometro di massa sono state le seguenti: voltaggio 70 eV, corrente di emissione 10 µA, 1 scan/sec, range di analisi della massa 40-400 Da, temperatura della trappola 150°C, temperatura della transfer-line 300°C.

L'indice di Kovats è calcolato a partire dai tempi di ritenzione ottenuti dal cromatogramma di una miscela di idrocarburi puri alle stesse condizioni degli oli essenziali (Fig. 16). Per la nostra indagine è stata utilizzata la formula adatta per l'analisi cromatografica con programma di temperatura (Tab. 3).

Data File	RT (min)	Area	Amount/RF	Peak Name
mixture 24	3.436	1,01E+07	1,278	<b>C8</b>
mixture 24	6.035	1,39E+07	1,764	<b>C9</b>
mixture 24	11.035	3,45E+07	4,383	<b>C10</b>
mixture 24	18.928	1,72E+07	2,182	<b>C11</b>
mixture 24	29.290	2,10E+07	2,666	<b>C12</b>
mixture 24	40.921	2,32E+07	2,942	<b>C13</b>
mixture 24	49.982	2,57E+07	3,255	<b>C14</b>
mixture 24	54.315	5,52E+07	7,002	<b>C15</b>
mixture 24	57.408	2,98E+07	3,782	<b>C16</b>
mixture 24	60.012	3,30E+07	4,183	<b>C17</b>
mixture 24	62.324	3,44E+07	4,361	<b>C18</b>
mixture 24	64.446	3,66E+07	4,641	<b>C19</b>
mixture 24	66.456	7,67E+07	9,729	<b>C20</b>
mixture 24	68.308	3,98E+07	5,048	<b>C21</b>
mixture 24	70.113	4,09E+07	5,192	<b>C22</b>
mixture 24	71.837	3,99E+07	5,069	<b>C23</b>
mixture 24	73.480	3,93E+07	4,989	<b>C24</b>
mixture 24	75.080	7,34E+07	9,318	<b>C25</b>
mixture 24	76.812	3,46E+07	4,391	<b>C26</b>
mixture 24	78.984	2,95E+07	3,749	<b>C27</b>
mixture 24	81.716	2,71E+07	3,435	<b>C28</b>
mixture 24	85.210	2,45E+07	3,103	<b>C29</b>
mixture 24	89.767	2,79E+07	3,538	<b>C30</b>

**Tabella 3. Tempi di ritenzione di una miscela di idrocarburi C8-C30.**

$$I = \left[ \frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

**Figura 16. Formula per calcolare l'indice di Kovats con programma di temperatura.**

**A) 2.2 Separazione dei composti terpenici maggioritari degli oli essenziali per (HP)TLC.**

Lo studio più importante sui sesquiterpeni è stato fatto con la tecnica (HP)TLC. Il metodo utilizzato è una modificazione di quello proposto e adottato da Wagner (Wagner, Bladt 2009). Per ognuno dei cinque oli è stata preparata una soluzione di 30 mg/ml in metanolo ed è stata seminata su una piastra di gel di silice (HP)TLC (Merck silice gel 60 con indicatore di fluorescenza F<sub>254</sub>). Le bande di 10mm sono state caricate con un'attrezzatura Linomat IV Camag e il volume di semina è stato di

10 µL. Per la separazione dei componenti è stato utilizzato n-esano come solvente. Le macchie sono state rivelate mediante una lampada UV a 254 e 366 nm.

### **A) 2.3 Analisi NMR degli oli essenziali.**

I cinque oli essenziali puri sono stati analizzati con  $^1\text{H}$  NMR. E' stata utilizzata un'attrezzatura Varian Gemini-400, che opera a 399,97 MHz ad una temperatura di 303 K. Il campione è stato preparato dissolvendo 10 mg di olio essenziale in 0,8 ml di cloroformio deuterato in tubicini per NMR di 5 mm. Gli spettri  $^1\text{H}$  sono stati eseguiti utilizzando uno standard di sequenze di pulso "s2pul".

#### **A) 2.3.1 Analisi NMR della frazione a Rf 0,8 di *Siparuna* sp.**

L'analisi gas cromatografica ha evidenziato che la frazione isolata (Rf = 0,8) in entrambi gli oli essenziali di *S. aspera* e *S. macrotrepala* corrisponde al Germacrene D, che risulta essere il componente più abbondante. Come ulteriore conferma della struttura di questa molecola è stata effettuata una (TLC) preparativa su una lastra di 10 x 20 cm, con un totale di nove posti di semina e con un volume di 60 µL. Si recupera la molecola con cloroformio, quindi si evapora il solvente in corrente di azoto e il residuo è disciolto in 1 mL di cloroformio deuterato per l'analisi  $^1\text{H}$  NMR come precedentemente descritto.

### **E) 1 Studi di Bioattività.**

#### **B) 1.1 Test antiossidante.**

##### **B) 1.1.1 Saggio spettrofotometrico DPPH.**

L'attività "radical scavenger" è stata valutata seguendo la procedura riportata da Wang *et al* 1998 e Sacchetti *et al* 2003, la quale prevede la riduzione del radicale cromoforo stabile DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) in presenza di composti antiossidanti. La reazione prevede la cessione di un atomo di idrogeno da parte della sostanza antiossidante R-H al radicale DPPH (Fig. 17). Il radicale DPPH, nella sua forma ossidata, è di colore rosso porpora, mentre la forma ridotta risulta essere incolore, pertanto l'aggiunta di un agente antiossidante fa virare la colorazione della soluzione a giallo.

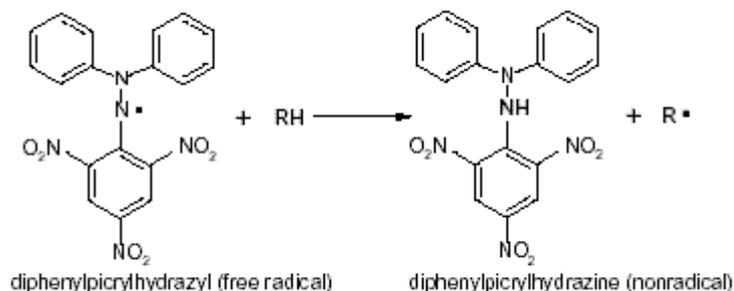


Figura 17. Reazione di riduzione del DPPH

Ad una soluzione alcolica di DPPH  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) sono stati aggiunti gli oli essenziali a diverse concentrazioni. Poiché spesso sono stati riscontrati problemi di solubilità dei campioni, tali sostanze sono state analizzate attraverso due metodiche differenti.

**Primo metodo (adatto per oli ricchi di monoterpeni) applicato a *H coronarium*.**

Sono stati analizzati 100 microlitri di soluzioni variando il rapporto olio essenziale-etanolo.

In seguito, sono stati aggiunti 900 ml di tampone Tris-HCl (100 mM) tamponato a pH 7.4 e 50 mL di Tween 20 (0.5%).

A questa soluzione è stato aggiunto 1 ml di soluzione alcolica di DPPH 0.5mM.

**Secondo metodo (adatto per oli ricchi di sesquiterpeni) applicato a *S aspera*, *S. macrotepala*, *P. leticianum*, *P augustum*.**

Questo metodo si applica a sostanze con caratteristiche lipofile.

L'olio essenziale è stato sciolto in una soluzione madre 0.5 ml/ml di Tween 20. Successivamente sono state effettuate diluizioni, a partire da questa soluzione madre, con DMSO per raggiungere un volume finale di 100 microlitri. A quest'ultima sono stati aggiunti 2.9 ml di soluzione alcolica di DPPH (4 mg/100 ml di EtOH).

I campioni così ottenuti dal primo o dal secondo metodo sono stati posti in agitazione per 30 minuti alla velocità di 200 rpm a temperatura ambiente; in seguito è stata

misurata con uno spettrofotometro (Thermo Spectronic Helios, Cambridge UK) l'assorbanza di ciascun campione alla lunghezza d'onda di 517 nm .

Come controllo positivo è stato utilizzato olio essenziale di *Thymus vulgaris* (chemiotipo timolo) ed è stato calcolato l' IC<sub>50</sub> come parametro di riferimento per valutare l'attività degli oli essenziali in studio.

L'attività antiossidante degli oli è stata calcolata in base alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito alla cattura del radicale libero; più precisamente come percentuale d'inibizione della formazione del radicale DPPH secondo la seguente equazione:

$$\% \text{ INIBIZIONE} = 1 - (A_A/A_B) \times 100$$

dove A<sub>A</sub> rappresenta l'assorbanza del DPPH con l'estratto e A<sub>B</sub> rappresenta l'assorbanza del DPPH senza l'estratto. Si costruisce una curva di taratura relativa al rapporto % di inibizione sulla concentrazione. L'attività antiossidante è espressa come IC<sub>50</sub>, ovvero come concentrazione, in mg/ml, necessaria per inibire il 50% di formazione del radicale DPPH.

Il risultato finale di potere antiossidante è espresso in mg di sostanza in ml di soluzione.

Oltre al confronto con l'olio essenziale di *Thymus vulgaris*, sono stati valutati altri standard puri presenti in laboratorio (β-caryophyllene, β-pinene e 1,8 cineole). Inoltre è stata misurata l'attività antiossidante della frazione R<sub>f</sub> = 0,8 di *Siparuna sp.*, corrispondente al Germacrene D.

### **B) 1.1.2 Saggio DPPH su (HP)TLC: DPPH Fingerprinting**

Per valutare in modo più specifico l'attività antiossidante dei composti che caratterizzano gli oli analizzati è stato condotto un saggio DPPH direttamente su lastre (HP) TLC. Lo scopo era quello di valutare la capacità delle singole bande del fitocomplesso o del relativo estratto, di sbiancare una soluzione metanolica di DPPH allo 0,2%. Tale soluzione, di un colore rosso porpora, è stata spruzzata uniformemente sulla lastra (Simionatto *et al.*, 2007). I campioni sono stati depositati mediante un

elettrodepositore automatico Linomat IV (Camag). La lastra così ottenuta è stata sviluppata immergendola in n-esano e spruzzandola con una soluzione di DDPH.

### **B) 1.1.3 Saggio ABTS spettrofotometrico**

Il metodo (Miller et al., 1993; Scartezzini et al., 2006) prevede l'impiego di un composto radicalico l'ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt). Il principio di funzionamento del test è uguale al saggio DDPH. Normalmente l'ABTS radicalizzato è di colore blu scuro, ma l'aggiunta di un agente antiossidante ne determina la decolorazione.

- E' stata preparata una soluzione madre di ABTS 2 mM dissolvendo 0,011 g di ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) in 10 ml di acqua bidistillata. La soluzione deve essere azzurrina: se blu scura, significa che l'ABTS è già ossidato e non è quindi più utilizzabile (Fig. 18).
- Successivamente è stata preparata una soluzione 70 mM di  $K_2S_2O_8$  ottenuta solubilizzando 0,0946 g di  $K_2S_2O_8$  in 5 ml di acqua bidistillata.
- Alla soluzione di ABTS radicale sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di  $K_2S_2O_8$ . La soluzione ottenuta è stata agitata e conservata al buio per un tempo minimo di sei ore, per favorire il processo di radicalizzazione. La soluzione così ottenuta può essere conservata per 2 giorni.
- Per la preparazione del reattivo: diluire 1 ml di ABTS radicalizzato con 25 ml di EtOH fino a ottenere un'  $A_{734\text{ nm}} = 0,70 \pm 0,02$
- Per la preparazione del bianco, sono stati aggiunti 990  $\mu$ l di soluzione di ABTS radicalizzato a 10  $\mu$ l di etanolo. Si procede dunque con la lettura dell'assorbanza.
- Per la preparazione dei campioni, 990  $\mu$ L di soluzione di ABTS radicalizzato sono stati aggiunti a 10  $\mu$ L del campione in esame. Si procede dunque con la lettura dell'assorbanza.
- In una cuvetta sono stati inseriti 900  $\mu$ l di soluzione di ABTS radicalizzato e sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di estratto. Si procede con la lettura del campione.
- L'attività antiossidante degli oli essenziali è stata calcolata calcolata come percentuale di decolorazione del ABTS radicalizzato.

$$\% \text{ Decolorazione} = 1 - (\text{Assorbanza ABTS con Campione} / \text{Assorbanza ABTS Bianco}) \times 100$$

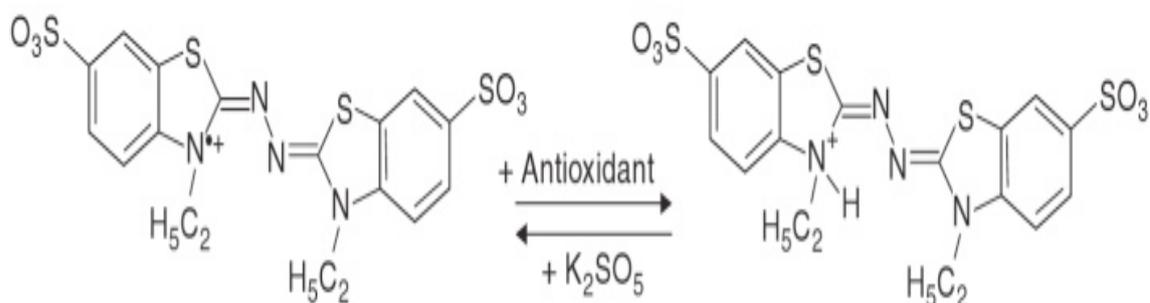


Figura 18. Reazione del radicale ABTS

#### B) 1.1.4 Attività antiossidante valutata con la metodica PCL

La fotochemiluminescenza (PCL), consente di quantificare sia la capacità antiossidante sia di sostanze pure che di matrici complesse di varia origine: sintetica, vegetale, animale, umana etc. La metodica può essere condotta secondo due diversi protocolli: ACW (Antioxidant Capacity Watersoluble) e Acl (Antioxidant Capacity Lipidsoluble), consentendo di quantificare, per uno stesso prodotto complesso, sia il potere antiossidante della componente idrosolubile che di quella liposolubile. Infatti, nella componente idrosolubile rientrano normalmente antiossidanti appartenenti alle famiglie dei flavonoidi, mentre nei liposolubili rientrano composti come tocoferoli, tocotrienoli, carotenoidi ecc (Ziosi et al 2010).

Con questo metodo, le proprietà antiossidanti delle sostanze prese in esame possono essere determinate in maniera rapida ed efficace, limitando le perdite di attività legate a degradazione dei campioni (Lewin & Popov 1994; Popov & Lewin 1996)

La metodologia è basata sull'autossidazione fotoindotta del Luminol, accompagnata da un'intensa chemiluminescenza (Popov & Lewin 1999 ; Popov et al 1987). La presenza di antiossidanti inibisce l'autossidazione del Luminol, dovuta all'interazione con il radicale superossido  $O_2^{\cdot-}$  generato per via fotochimica. Il Luminol assume il ruolo sia di fotosensibilizzatore che di marker chemiluminescente. In presenza di sostanze che

agiscono come radical scavenger, l'intensità della PCL viene attenuata in funzione della concentrazione.

La PCL permette di valutare la capacità antiossidante mediante la costruzione di una retta di taratura con un antiossidante standard di riferimento.

Il protocollo ACL prevede l'utilizzo del Trolox® come standard di riferimento, mentre per l'ACW si utilizza l'acido ascorbico. I risultati finali vengono quindi espressi rispettivamente in micromoli equivalenti di Trolox o acido ascorbico su grammo di sostanza.

## **B) 1.2 Test di attività antimicrobica.**

### **B) 1.2.1 Metodo di diffusione di disco.**

Come mostrato in vari studi scientifici (Bruni et al 2004; Guerrini et al 2009) il metodo di diffusione di disco é tra i metodi più utilizzati per valutare l'attività antimicrobica in oli essenziali, espressa come la minima concentrazione inibente di crescita del microorganismo (MIC).

Sono stati usati i seguenti terreni di cultura:

- Terreno NA (Nutrient Agar) per i batteri Gram -;
- Terreno TSA (Tryptic soy agar) per i batteri Gram +;
- Terreno YEPD per i lieviti.

I ceppi utilizzati per condurre l'analisi sono: quattro ceppi Gram -, sei ceppi Gram + e tre lieviti (Tab. 3).

Gram -		Gram +		Lieviti	
<i>Escherichia coli</i> (EC)	<b>ATCC 4350</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> (EF)	<b>ATCC 29212</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SC)	<b>ATCC 2365</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i> (KOX)	<b>ATCC 29516</b>	<i>Listeria grayi</i> (LIST)	<b>ATCC 19120</b>	<i>Candida albicans</i> (CAND)	<b>ATCC 48274</b>
<i>Proteus vulgaris</i> (PVU)	<b>ATCC 6361</b>	<i>Micrococcus luteus</i> (MLU)	<b>ATCC 9622</b>	<i>Malassezia furfur</i> (MF)	<b>DSM 6170</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>CBS 76039</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (SAU)	<b>ATCC 29213</b>		

(PA)					
		Staphylococcus epidermidis (SE)	<b>DSM 20044</b>		
		Streptococcus mutans (SMU)	<b>DSM 20523</b>		

Tabella 3. Ceppi batterici usati per valutare l'attività antimicrobica.

### **Preparazione del terreno e dei ceppi.**

Nel caso dei ceppi batterici, la coltura è stata lanciata 48 ore prima del test, nel caso dei lieviti invece una settimana prima. Le colture sono state lasciate crescere in incubazione per 24 ore (o 3 giorni se lievito). Trascorso questo lasso di tempo, sono state piastrate con diluizioni progressive su terreno solido per procedere con la conta cellulare. Successivamente le piastre sono state incubate altre 24 ore (o 3 giorni se lievito) ed in seguito riposte in frigorifero a +4 °C per fermare la crescita cellulare.

Il giorno successivo (o 3 giorni dopo nel caso dei lieviti) sono state contate le cellule cresciute nelle piastre per risalire alla concentrazione presente nella beuta contenente il brodo di coltura. In seguito la beuta è stata messa in agitazione per un paio d'ore prima dell'esperimento con lo scopo di riattivare opportunamente il microrganismo.

### **Saggio d'attività antibatterica.**

In base alle conte effettuate, il brodo contenente il nostro microrganismo è stato diluito fino ad una concentrazione di  $10^6$  UFC/ml per i batteri o  $10^5$  UFC/ml per i lieviti. In seguito, in condizioni di sterilità, sono stati versati 100 µl di brodo di coltura per ogni piastra petri (diametro 9 cm) e sono stati piastrati con un'ansa ad "L" sterile assicurandosi di seminare in maniera uniforme il microrganismo su tutta la superficie della piastra.

Per ogni piastra è stato inserito un apposito dischetto (diametro 6 mm), in precedenza sterilizzato al centro, e sono stati versati sulla superficie del disco 10 µl di diverse diluizioni di olio essenziale (500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 e 0,2 µl/ml). Infine le piastre sono state poste in incubazione per 24 ore (o 3 giorni per i lieviti) a 37 °C. La

concentrazione con cui i microrganismi sono stati seminati, garantisce la formazione di un tappeto uniforme di cellule che ricopre completamente la piastra.

Trascorso il periodo di incubazione è possibile misurare il diametro dell'alone d'inibizione, determinato da una zona in cui non si osserva crescita del microrganismo.

### B) 1.2.2 (HP) TLC Autobiografico Test Antimicrobico.

Sono varie le ricerche che citano il test autobiografico (HP)-TLC per valutare l'attività antimicrobica di singoli composti o matrici complesse ( Rossi et al 2011; Shahverdi et al 2007; Dhar et al 2004).

Il metodo prevede l' utilizzo del colorante TTC (2,3,4- Triphenyltetrazoliumchloride) come controllo dell' attività antimicrobica. TTC, reagendo con le deidrogenasi batteriche, porta alla formazione di composti che conferiscono una colorazione rosso intenso al terreno inoculato, fatta eccezione per i punti in cui è presente la sostanza con potenziale antibatterico (Fig. 19).

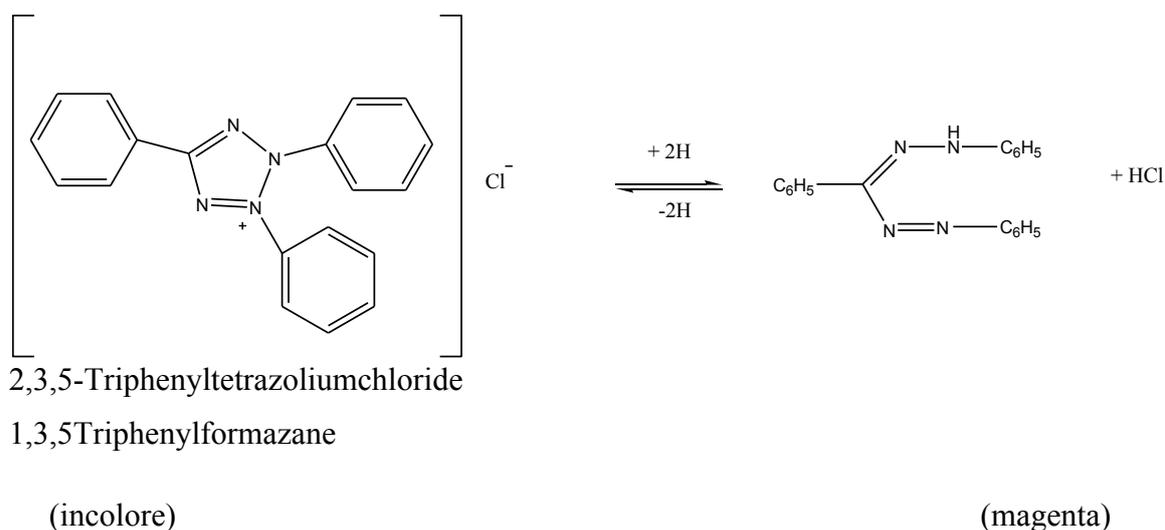


Figura 19. Reazione di colorazione per evidenziare attività antimicrobica.

### Preparazione colture.

La coltura del ceppo cellulare interessato è stata lanciata 48 ore prima del test e lasciata crescere in incubazione per 24 ore. Trascorso questo lasso di tempo, le colture sono state piastrate con diluizioni progressive su terreno solido per procedere con la conta cellulare. In seguito le piastre sono state incubate per 24 ore e riposte in frigorifero a +4 °C, per fermare la crescita cellulare.

Il giorno successivo, le cellule cresciute nelle piastre sono state contate per risalire alla concentrazione di microrganismo presente nella beuta contenente il brodo. La beuta è stata poi messa in agitazione per un paio d'ore prima dell'esperimento, per riattivare opportunamente il microrganismo.

## **TLC**

Le TLC possono essere preparate, qualche ora prima dell'esperimento, con due diverse modalità: in un caso depositando semplicemente varie bande, a diversa concentrazione della sostanza da testare, sulla lastrina; nell'altro caso depositando la sostanza alla base della lastra e immergendo la lastra all'interno di una opportuna camera di eluizione.

### **Preparazione del terreno**

Prima del test di valutazione della capacità antimicrobica, sono stati preparati, per ogni TLC, 25 ml di terreno agarizzato in beute da 100 ml. Il terreno, una volta sciolto, è stato autoclavato 15 minuti a 121 °C.

### **Saggio d'attività antimicrobica**

In base alle conte effettuate, il brodo contenente il microrganismo indagato, è stato diluito fino ad una concentrazione di  $10^9$  UFC/ml per i batteri o  $10^8$  UFC/ml per i lieviti.

I terreni, appena autoclavati, sono stati portati ad una temperatura di 47-48 °C, quindi è stato aggiunto 1 ml (ogni 25 ml di terreno) di colorante 2,3,5-tripheniltetrazolium-chloride, Sigma Aldrich (TTC). Infine, sono stati aggiunti 250 µl di soluzione contenente il microrganismo per ottenere così una concentrazione finale pari a  $10^7$  UFC/ml per i batteri o  $10^7$  UFC/ml per i lieviti.

Il tutto è stato versato delicatamente e in maniera uniforme sulla lastra TLC e lasciato solidificare sotto cappa per 15 minuti. Il terreno così ottenuto, è stato posto in frigorifero a +4 °C per circa un'ora, in modo tale da favorire il trasferimento delle sostanze depositate dalla TLC all'agar.

Come ultimo step, il preparato è stato incubato 24 ore alla temperatura di 37 C per i batteri o 3 giorni per i lieviti.

## **B) 1.3 Valutazione della citotossicità, attività mutagenica e mutagena protettiva dell'olio di *H. coronarium*.**

Inseguito alla valutazione dell'attività antimicrobica è stato scelto l'olio essenziale di *H. coronarium* per valutare l'attività citotossica, mutagenica e mutagena protettiva dell'estratto.

#### **B) 1.3.1 *Sacharomyces cerevisiae* D7 Test.**

Il Test D7 *Sacharomyces cerevisiae* D7 è stato utilizzato per valutare la citotossicità e l'attività mutagena protettiva in prodotti naturali. Come dimostrato da diversi studi (Rossi et al 2011 ; Knezevic et al 2007), si tratta di un metodo veloce e a basso costo. Mediante incorporazione su piastra pre-test, è stata valutata la riduzione della resistenza colonica, con una significatività statistica del 10%, impiegando la minima concentrazione citotossica per l'olio di *H. coronarium* (1mg/plate).

Non sono stati valutati effetti genoossici e mutanti dalla conta colonica. All'interno del campione testato, non è stata osservato nessun effetto di conversione genica (GCC) o mutazione puntiforme (MC), a concentrazioni non citotossiche del campione, confermando la sicurezza di quest'olio essenziale amazzonico.

#### **B) 1.3.2 SOS-Chromo Test.**

Il SOS-CHROMOTEST test, è un metodo ampiamente utilizzato per la determinazione dell'attività genotossica in diversi materiali come acqua, sedimenti, aria, composti chimici, componenti alimentare, cosmetici e fluidi biologici.

Il SOS-CHROMOTEST test sfrutta i meccanismi intrinseci delle cellule per rilevare la presenza di genotossicità nei campioni analizzati. Tutte le cellule viventi possiedono un sistema per la rilevazione di lesioni presenti a livello del materiale genetico, in modo tale da attivare un il complesso enzimatico SOS per la riparazione dei danni.

Ogni volta che viene individuata dalla cellula la presenza di una lesione, il promotore del complesso SOS attiva la trascrizione dei geni SOS.

Questa è il meccanismo alla base del funzionamento del SOS-CHROMOTEST. Il test permette di rilevare danni a livello del materiale genetico, prima che intervenga il sistema di riparazione delle cellule. Il SOS-CHROMOTEST batterico è stato dunque appositamente progettato per rilevare danni a livello del DNA (Fish et al 1987 & Quillardet et al 1982).

#### **Procedura SOS-Chromotest**

Per la realizzazione del Chromotest si è seguita la procedura SOS-Chromotest Kit ebpi.

### **Sviluppo del SOS-CHROMOTEST.**

Si procede con la diluizione della sospensione batterica e con l' SOS-CHROMOTEST.

La sospensione batterica, sviluppata durante la notte, è stata analizzata misurando l' OD a 600 nm.

### **Sviluppo della colorazione nel SOS-CHROMOTEST.**

Dopo un'incubazione di due ore, il campione genotossico interagisce con il DNA batterico del SOS-CHROMOTEST, inducendo la sintesi del  $\beta$ -galattosidasi. La relativa quantità di enzima, prodotto come risultato di quest'interazione, è stato misurato con l'aggiunta di un substrato cromogenico. Per garantire il successo dell'analisi, è stata testata la vitalità dei batteri utilizzando Alkaline Phosphatase.

Il cromogeno blu ha prodotto un colore blu chiaramente visibile, più adatto per la valutazione quantitativa (spettrofotometrica) e visiva o semi-quantitativa.

### **Determinazione della Genotossicità visibile.**

L'analisi può essere effettuata in modo visibile o in modo strumentale, attraverso uno spettrofotometro.

E' stato effettuato un confronto tra la densità del colore delle culture di sfondo (pozzi che hanno ricevuto solo il solvente) e la densità del colore delle colture trattate (pozzi che hanno ricevuto il materiale diluito).

Una semplice comparsa di colore non è segnale di genotossicità: deve essere confrontato con la decolorazione prodotta dal controllo positivo.

## **C) 1 Formulazioni Cosmetiche a base di oli essenziali.**

### **C) 1.1 Valutazione antiossidante delle formulazioni cosmetiche a base di oli essenziali.**

Il metodo conosciuto come Phochemiluminescence (PCL), è adatto per la valutazione dell' attività antiossidante in formulazioni cosmetiche di oli essenziali, come riportato in letteratura (Mambro & Fonseca 2005; Maia Campo et al 2008; Sacchetti et al 2004).

Sono state preparate tre formulazioni: un'oleolita, un'emulsione O/A ed un'emulsione A/O. Per ogni formulazione sono stati preparati quattro campioni da 20 gr ciascuno, dove sono stati inseriti gli oli essenziali di *H coronarium*, *S aspera* e *S macrotrepala*.

Le formulazioni sono descritte di seguito (Tab. 4; Tab. 5; Tab. 6).

<b>Ingrediente</b>	<b>INCI</b>	<b>Quantità %</b>
<b>MC 30</b>	Hydrogenated polyisobutene	30
<b>Cetiol CC</b>	Dicaprylyl carbonate	30
<b>Olio silicone volatile</b>	Cyclopentasiloxane	10
<b>Tegesoft TN</b>	C12-15 alchyl benzoate	29
<b>Olio essenziale</b>		1

Tabella 4. Formulazione cosmetica: oleolita

<b>Ingrediente</b>	<b>INCI</b>	<b>Quantità %</b>
<b>Fase 1</b>		
<b>Emulgade SE</b>	Glyceryl stearate, Ceteareth-20, Ceteareth-12, Cetearyl alcohol, Cetyl palmitate	8
<b>Lanette O</b>	Cetearyl alcohol	1,5
<b>MC 30</b>	Hydrogenated polyisobutene	3,5
<b>Nexbase</b>	Hydrogenated Polyisobutene	2

<b>Cetiol V</b>	Decyl oleate	1,5
<b>Olio silicone volatile</b>	Cyclopentasiloxane	2
<b>KF96A/6CS</b>	Dimethicone	0,5
<b>Phenonip</b>	Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Ethylparaben, Propylparaben	0,5
<b>Acqua</b>	Acqua	q.b
<b>EDTA</b>	Disodium EDTA	0,1
<b>Glicerina</b>	Glycerin	3
<b>Olio essenziale</b>		1

Tabella 5. Formulazione cosmetica: emulsione O/A.

<b>Ingrediente</b>	<b>INCI</b>	<b>Quantità %</b>
<b>Arlacel P135</b>	Peg-30 Dipolyhydroxystearate	1,5
<b>Nexbase</b>	Hydrogenated polydecene	8
<b>Cetiol SN</b>	Cetearyl isononanoate	8
<b>Cetiol V</b>	Decyl oleate	2

<b>Acqua</b>	Acqua	Qb
<b>Phenonip</b>	Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Ethylparaben, Propylparaben	0,5
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Magnesium sulfate	0,5
<b>Fase 3</b>		
<b>Olio essenziale</b>		1

Tabella 6. Formulazione cosmetica: emulsione A/O

Il protocollo d'analisi è lo stesso usato per gli oli puri, ma è differente la preparazione dei campioni, infatti è necessario disciogliere le formulazioni cosmetiche in modo opportuno, al fine di evitare la formazione di particolato che possa andare ad intasare i capillari dello strumento, compromettendone così il funzionamento.

**C) 1.2 Valutazione dell'attività antimicrobica dell'olio essenziale di *Hedychium coronarium* inserito in una formulazione cosmetica: Challenge test.**

In seguito ai buoni risultati di attività antimicrobica dell'olio essenziale di *H. coronarium*, questo è stato scelto per studiare tale attività in una formulazione cosmetica. Lo studio, conosciuto come Challenge test, consente la valutazione preliminare dell'efficacia del sistema conservante del prodotto cosmetico in vitro (Russell 2003) ; lo scopo del test è perciò quello di determinare l'efficacia del sistema conservante di un prodotto cosmetico. Il saggio prevede la contaminazione del prodotto con microrganismi di diverse specie e la successiva valutazione della carica microbica mediante il conteggio in piastra del numero di germi vivi dopo un determinato intervallo di tempo (Challenge Test 2009).

## **Procedura sperimentale.**

I microorganismi normalmente utilizzati sono cinque: *Escherichia coli* (Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Candida albicans* (lievito), ed *Aspergillus niger* (muffa). Ogni microorganismo ha la sua certificazione ATCC (American Type Culture Collections).

Il campione è stato suddiviso in aliquote uguali, di 20 gr, e posto in tante provette quanti sono i ceppi ATCC da analizzare, in questo caso cinque. In seguito ogni provetta contenente il campione è stata sottoposta ad inoculo separato con il microorganismo a titolo noto, che deve essere distribuito uniformemente.

La grandezza dell' inoculo iniziale deve corrispondere a  $10^6$  (unità formanti colonia)/gr, per i miceti, e a  $10^7$  UFC/gr per i batteri.

L'unità di misura UFC comprende il numero di microorganismi contati in unità formanti colonie (unità vitali), cresciuti su piastre con terreno di coltura in agar. E' stata prelevata un' aliquota del campione che è stata poi dispersa in un diluente neutralizzante idoneo al sistema conservante, e da questa soluzione sono state eseguite diluizioni successive.

Da ogni diluizione è stato prelevato 1ml, posto in piastra Petri, e mescolato con il terreno agarizzato (metodo d' inclusione su piastra), che è poi stato gelificato. Quindi le piastre sono state incubate alle temperature e nei tempi indicati per ciascun ceppo.

Il terreno utilizzato è il TSA (triptone soy agar) ed ogni analisi è stata realizzata in doppio.

La determinazione delle unità formanti colonia per grammo (UFC/gr) è stata eseguita al T0, cioè al momento dell' inoculo dei microorganismi nel prodotto cosmetico, ed in seguito ad ogni tempo di contatto, prestabilito per 28 giorni; in particolare sono state eseguite le determinazioni a: T 48h (dopo 2 giorni dall' inoculo), T 7g (dopo 7 giorni dall' inoculo), T 14g (dopo 14 giorni dall' inoculo) e T 28g (dopo 28 giorni dall' inoculo)

## **Valutazione dei Risultati.**

I criteri d'interpretazione dei risultati della determinazione delle UFC/gr, sono quelli previsti dalla Farmacopea Europea: se si osserva una riduzione nell' inoculo entro 24-48 ore il rischio è basso, mentre se si osserva entro i 7 giorni è accettabile; il rischio invece è inaccettabile se la riduzione si verifica entro 14 o 28 giorni.

L'attività antimicrobica è stata poi classificata, anche in base all' efficacia di preservazione, come: adeguata, se sopravvive lo 0,2% dei germi inoculati; discutibile, se sopravvive meno dell' 1% dei germi inoculati; inefficiente, se sopravvive meno del 10% dei germi inoculati; inadeguata, se sopravvive più del 10% dei germi inoculati.

E' stata preparata anche una formulazione cosmetica di tipo emulsione (O/A), la quale in seguito è stata sottoposta a Challenge test. Poiché l' attività antimicrobica dell' olio puro non è molto alta si è deciso di utilizzare l' olio di *Hedychium coronarium* assieme ad un sistema conservante dall' attività nota; il conservante impiegato è stato Dermosoft 1388 ECO, il quale è attivo ma non presenta un' attività sufficiente a preservare da solo la formulazione cosmetica, e che quindi necessita di essere utilizzato in sinergia con un' altra sostanza ad attività preservante.

Le formulazioni utilizzate sono le seguenti (Tab. 7; Tab. 8; Tab 9).

<b>Ingrediente</b>	<b>INCI</b>	<b>Quantità %</b>
Fase 1		
Emulgade SE	Glyceryl stearate, Cetareth-20, 8 Cetareth-12, Cetearyl alcohol, Cetyl palmitate	
Lanette O	Cetearyl alcohol	1,5
MC 30	Hydrogenated polyisobutene	3,5
Nexbase	Hydrogenated polyisobutene	2
Cetiol V	Decyl oleate	1,5
Olio silicone volatile	Cyclopentasiloxane	2
KF96A/6CS	Dimethicone	0,5

Fase 2		
Acqua Milli-Q	Aqua	q.b.
Glicerina	Glycerin	3

Tabella 7. Emulsione O/A controllo positivo senza alcun conservante

<b>Ingrediente</b>	<b>INCI</b>	<b>Quantità %</b>
<b>Fase 1</b>		
Emulgade SE	Glyceryl stearate, Cetareth-20, Cetareth-12, Cetearyl alcohol, Cetyl palmitate	8
Lanette O	Cetearyl alcohol	1,5
MC 30	Hydrogenated polyisobutene	3,5
Nexbase	Hydrogenated polyisobutene	2
Cetiol V	Decyl oleate	1,5
Olio silicone volatile	Cyclopentasiloxane	2
KF96A/6CS	Dimethicone	0,5
<b>Fase 2</b>		
Acqua Milli-Q	Aqua	q.b.
Glicerina	Glycerin	3
<b>Fase 3</b>		
<b>Dermosoft 1388 ECO</b>	Aqua, Glycerin, Sodium levulinate, Sodium anisate	3

Tabella 8. Emulsione O/A solo conservante noto

<b>Ingrediente</b>	<b>INCI</b>	<b>Quantità %</b>
<b>Fase 1</b>		
<b>Emulgade SE</b>	Glyceryl stearate, Cetareth-20, Cetareth-12, Cetearyl alcohol, Cetyl palmitate	8
<b>Lanette O</b>	Cetearyl alcohol	1,5
<b>MC 30</b>	Hydrogenated polyisobutene	3,5
<b>Nexbase</b>	Hydrogenated polyisobutene	2
<b>Cetiol V</b>	Decyl oleate	1,5
<b>Olio silicone volatile</b>	Cyclopentasiloxane	2
<b>KF96A/6CS</b>	Dimethicone	0,5
<b>Fase 2</b>		
<b>Acqua Milli-Q</b>	Aqua	q.b.
<b>Glicerina</b>	Glycerin	3
<b>Fase 3</b>		
<b>Olio essenziale</b> <i>Hedychium coronarium</i>	Hedychium coronarium oil	1
<b>Dermosoft 1388 ECO</b>	Aqua, Glycerin, Sodium levulinate, Sodium anisate	3

Tabella 9. Emulsione O/A conservante noto + olio essenziale *Hedychium coronarium*



# RISULTATI E DISCUSSIONI

## A) 1. Metodi di estrazione.

### A) 1.1 Estrazione di oli essenziali.

Dopo il tempo previsto per l'estrazione degli oli essenziali, questi sono stati separati dalla acqua con l'ausilio di un imbuto separatore. Immediatamente i campioni sono stati trasferiti al laboratorio del CIVABI in Quito. Dopo aver rimosso l'acqua in eccesso con solfato di sodio anidro è stata calcolata la resa di olio e sono state determinate le proprietà organolettiche (Tab. 10) (Fig. 20 ).

<b>Specie</b>	<b>Resa % di olio</b>	<b>Caratteristiche organolettiche</b>
---------------	-----------------------	---------------------------------------

	<b>essenziale</b>	
<i>Siparuna aspera</i>	0,15%.	Odore: agrumi intenso Colore: verde oliva
<i>Siparuna macrotepala</i>	0,05%.	Odore: agrumi Colore: giallo debole
<i>Piper leticianum</i>	0,02%	Odore: agrumi Colore: giallo
<i>Piper augustum</i>	0,02%.	Odore: agrumi Colore: giallo
<i>Hedychium coronarium</i>	0,04%	Odore: nota di zenzero Colore: giallo

Tabella 10. Resa degli oli essenziali e caratteristiche organolettiche.



Figura 20. Oli essenziali in laboratorio.

### A) 2. Composizione chimica degli oli essenziali.

La composizione chimica degli oli essenziali è stata determinata per via gascromatografica (GC-FID e GC-MS) e tramite valutazione spettroscopica  $^1\text{H}$  NMR.

Per facilitare la discussione i risultati vengono di seguito presentati per ciascun olio essenziale.

### ***Siparuna aspera.***

In questo olio essenziale abbiamo rilevato la presenza di settantanove composti con una resa superiore al 0,1%, di cui cinquantasei, equivalenti al 93,33%, sono stati identificati chimicamente. Per stabilirne l'identità chimica è stato confrontato lo spettro di massa sperimentale con quello presente nella libreria NIST, l'indice di Kovats di letteratura con quello ottenuto sperimentalmente (Fig. 21) (Tab 11). L'analisi  $^1\text{H}$  NMR dell'olio conferma la presenza di germacrene D (Fig. 22) come composto principale.

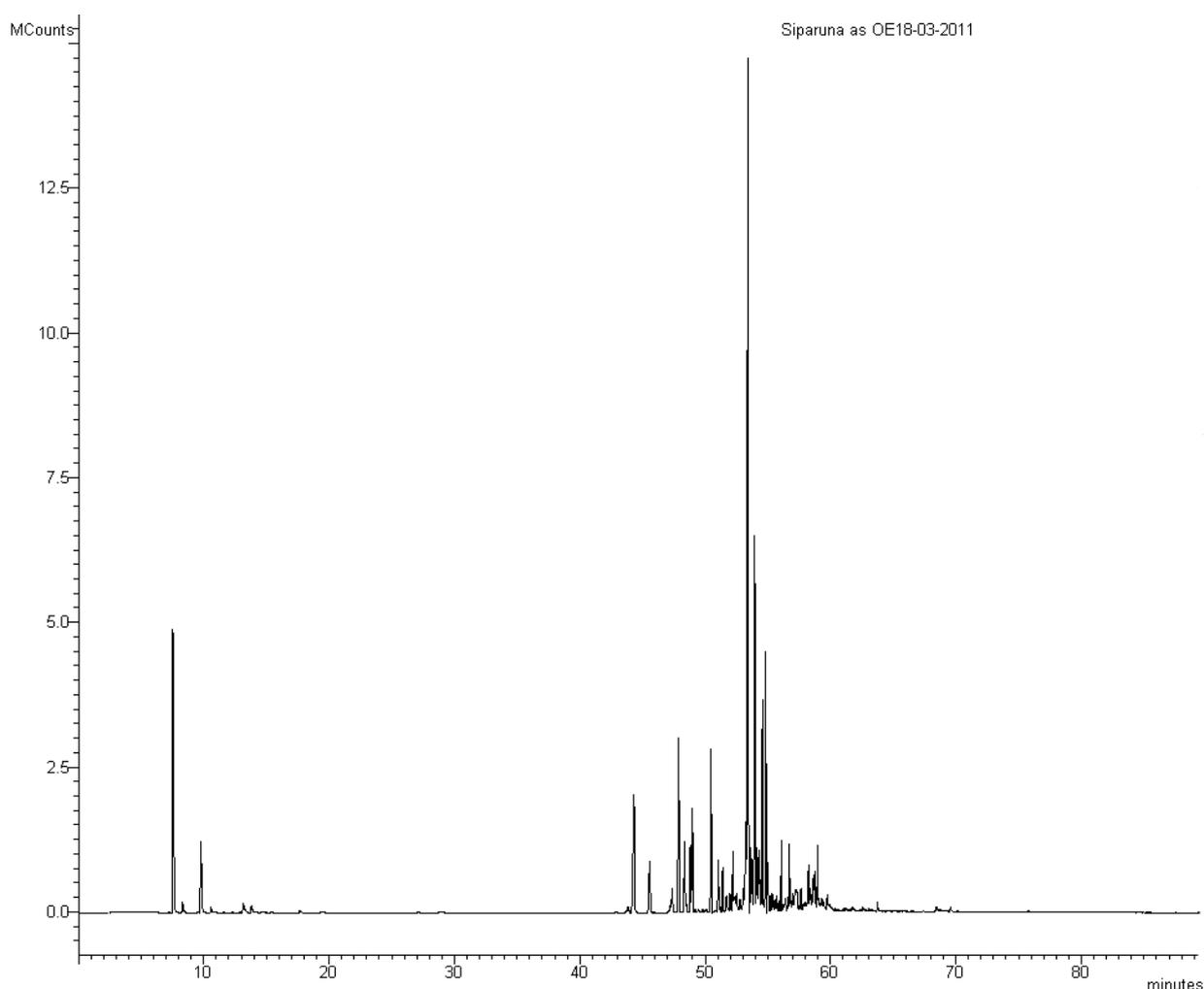


Figura 21. Cromatogramma dell'olio essenziale di *S. aspera*.

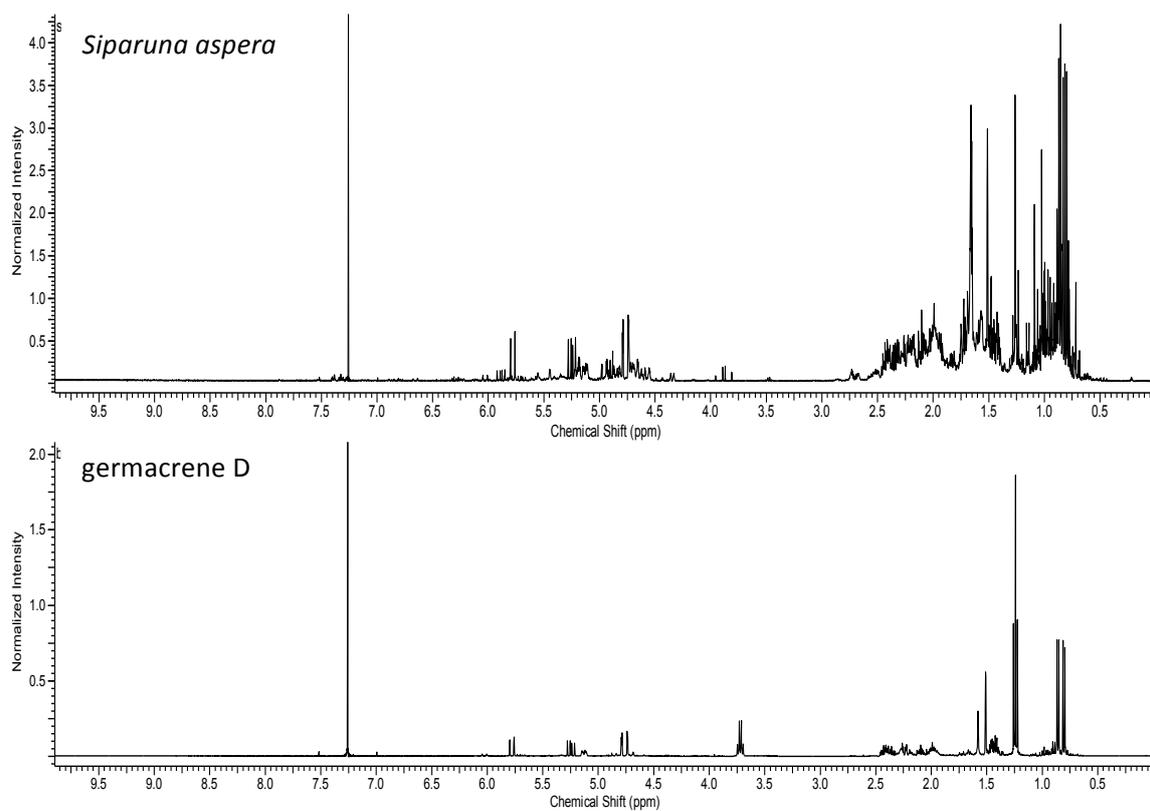


Figura 22.  $^1\text{H}$  RMN dell'olio di *S. aspera*

N	RT (min)	Composto	KI Teorico	KI esperimentale	Identificazione	<i>Siparuna aspera</i>
						Area %
1	7.544	$\alpha$ -pinene	939	930	MS	<b>6,96</b>
2	8.315	camphene	954	946	MS	<b>0,29</b>
3	9.777	$\beta$ -pinene	979	975	MS	<b>2,08</b>
4	10.592	myrcene	991	991	MS	<b>0,14</b>
5	13.163	limonene	1029	1027	MS	<b>0,26</b>
6	13.250	1,8-cineole	1031	1028	MS	<b>0,13</b>
7	13.804	cis-ocimene	1037	1035	MS	<b>0,25</b>
8	28.857	$\alpha$ -terpineol	1189	1190	MS	<b>0,09</b>
9	43.851	nd	1331	1332		<b>0,25</b>

10	44.318	$\delta$ -elemene	1338	1337	MS	4,53
11	45.568	$\alpha$ -cubebene	1351	1351	MS	1,68
12	47.225	cyclosativene	1371	1370	MS	0,18
13	47.357	$\alpha$ -ylangene	1375	1371	MS	0,69
14	47.887	$\alpha$ -copaene	1377	1377	MS	4,46
15	48.348	$\beta$ -bourbonene	1388	1382	MS	1,70
16	48.489	$\beta$ -cubebene	1388	1384	MS	0,27
17	48.812	iso-longilofolene	1390	1387	MS	1,52
18	48.976	$\beta$ -elemene	1391	1389	MS	2,33
19	50.462	$\beta$ -caryophyllene	1419	1411	MS	3,34
20	51.046	$\beta$ -copaene	1432	1425	MS	0,99
21	51.173	$\beta$ -gurjunene	1434	1427	MS	0,14
22	51.394	$\alpha$ -guaiene	1440	1433	MS	0,97
23	51.683	aristolene	1450	1439	MS	0,48
24	51.977	<i>cis</i> -muurola-3,5-diene	1450	1446	MS	0,43
25	52.208	$\alpha$ -humulene	1455	1451	MS	1,19
26	52.300	allo-aromadendrene	1460	1453	MS	0,21
27	52.386	9-epi- $\beta$ - caryophyllene	1466	1455	MS	0,37
28	52.526	dauca-5,8-diene	1472	1459	MS	0,50
29	52.771	nd	1473	1464		0,37
30	53.066	$\gamma$ -gurjunene	1477	1471	MS	0,74
31	53.230	$\gamma$ -muurolene	1480	1475	MS	2,24
32	53.430	germacrene D	1485	1480	MS, NMR	23,27
33	53.646	$\beta$ -selinene	1490	1485	MS	0,87
34	53.747	valencene	1496	1487	MS	0,70

35	53.948	bicyclogermacrene	1500	1492	MS	7,83
36	54.115	$\alpha$ -muurolene	1500	1495	MS	1,12
37	54.235	$\beta$ -himachalene	1505	1498	MS	1,16
38	54.338	germacrene A	1509	1501	MS	1,14
39	54.456	$\alpha$ -(E,E)-Farnesene	1506	1505	MS	0,30
40	54.576	$\gamma$ -cadinene	1514	1508	MS	4,32
41	54.830	$\delta$ -cadinene	1523	1517	MS	4,65
42	55.021	nd		1523	MS	0,92
43	55.266	trans-cadina-1(2),4-diene	1535	1531	MS	0,34
44	55.410	$\alpha$ -cadinene	1539	1535	MS	0,28
45	55.567	$\alpha$ -calacorene	1546	1540	MS	0,27
46	55.727	nd		1546		0,28
47	55.872	nd		1550		0,20
48	56.077	germacrene B	1561	1557	MS	1,28
49	56.396	nd		1567		0,28
50	56.608	nd		1574		0,23
51	56.708	spathulenol	1578	1577	MS	1,19
52	56.827	caryophyllene oxide	1583	1581	MS	0,15
53	56.966	viridiflorol	1593	1586	MS	0,36
54	57.070	nd		1589		0,17
55	57.154	nd		1592		0,31
56	57.226	nd		1594		0,36
57	57.277	nd		1596		0,22
58	57.330	guaiol	1601	1597	MS	0,36
59	57.634	$\beta$ -oplophenone	1068	1609	MS	0,47

60	57.842	1,10-di-epi-cubenol	1619	1617	MS	0,11
61	57.912	nd		1619		0,11
62	58.007	nd		1623		0,16
63	58.082	nd		1626		0,14
64	58.190	1-epi-cubenol	1629	1630	MS	0,41
65	58.248	nd		1632		0,80
66	58.357	nd		1636		0,43
67	58.447	nd		1640		0,28
68	58.601	tau-cadinol	1640	1646	MS	0,66
69	58.667	tau-muurolol	1642	1648	MS	0,46
70	58.743	$\alpha$ -muurolol	1646	1651	MS	0,77
71	58.968	$\alpha$ -cadinol	1654	1660	MS	1,19
72	59.049	nd		1663		0,26
73	59.190	nd		1668		0,19
74	59.305	nd		1673		0,25
75	59.492	nd		1680		0,19
76	59.735	khusinol	1680	1689	MS	0,37
77	59.903	eudesma-4(15),7- dien-1-b-ol	1688	1696	MS	0,16
78	63.851	nd		1881		0,18
79	68.425	nd		2106		0,11
		<b>Totale identificati</b>				<b>93,33</b>

Tabella 11. Composizione chimica dell'olio essenziale di *S. aspera*.

I principali composti nell'olio essenziale sono: germacrene D 23,27%, bicyclogermacrene 7,83%,  $\alpha$ -pinene 6,96%,  $\delta$ -cadinene 4,65%,  $\delta$ -elemene 4,53% e  $\alpha$ -copaene 4,46% (Fig. 23).

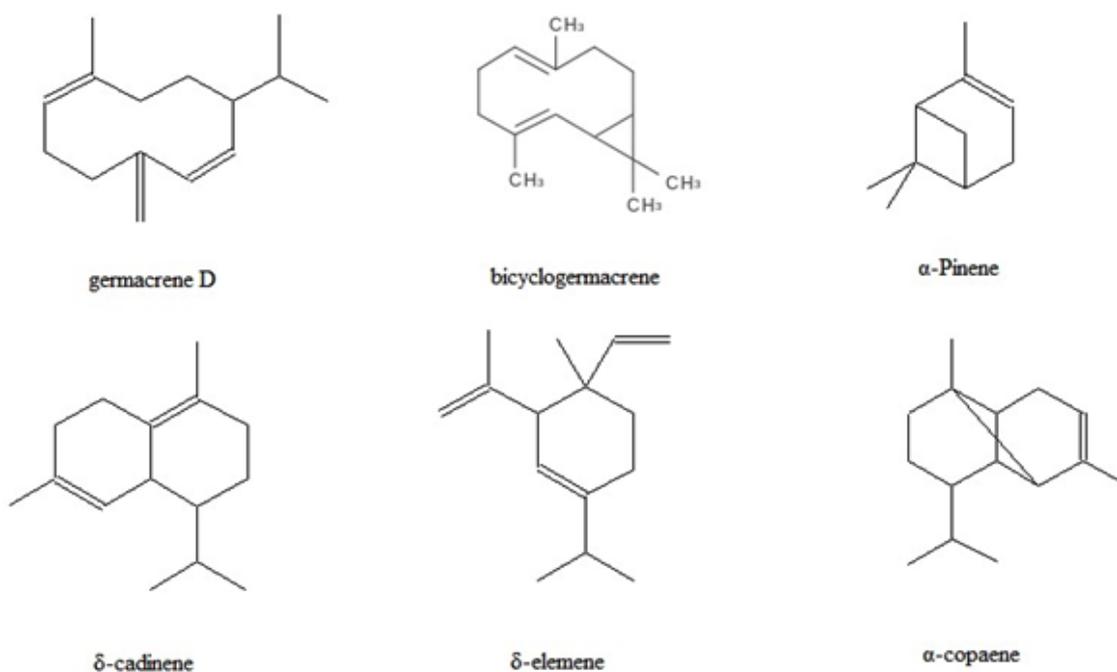


Figura 23. Principali composti dell'olio di *S. aspera*

### ***Siparuna macrotepala.***

In questo olio essenziale abbiamo rilevato la presenza di sessantasei composti con una resa superiore al 0,1%, di cui quarantotto, equivalenti al 94,61% del totale, sono stati identificati chimicamente. Per stabilirne l'identità chimica è stato confrontato lo spettro di massa sperimentale con quello presente nella libreria NIST, l'indice di Kovats di letteratura con quello ottenuto sperimentalmente (Fig. 24) (Tab. 12). L'analisi  $^1\text{H}$  NMR dell'olio conferma la presenza di germacrene D (Fig. 25), come composto principale, separato e identificato per confronto con la letteratura (Bortolomeazzi *et al.*, 2001).

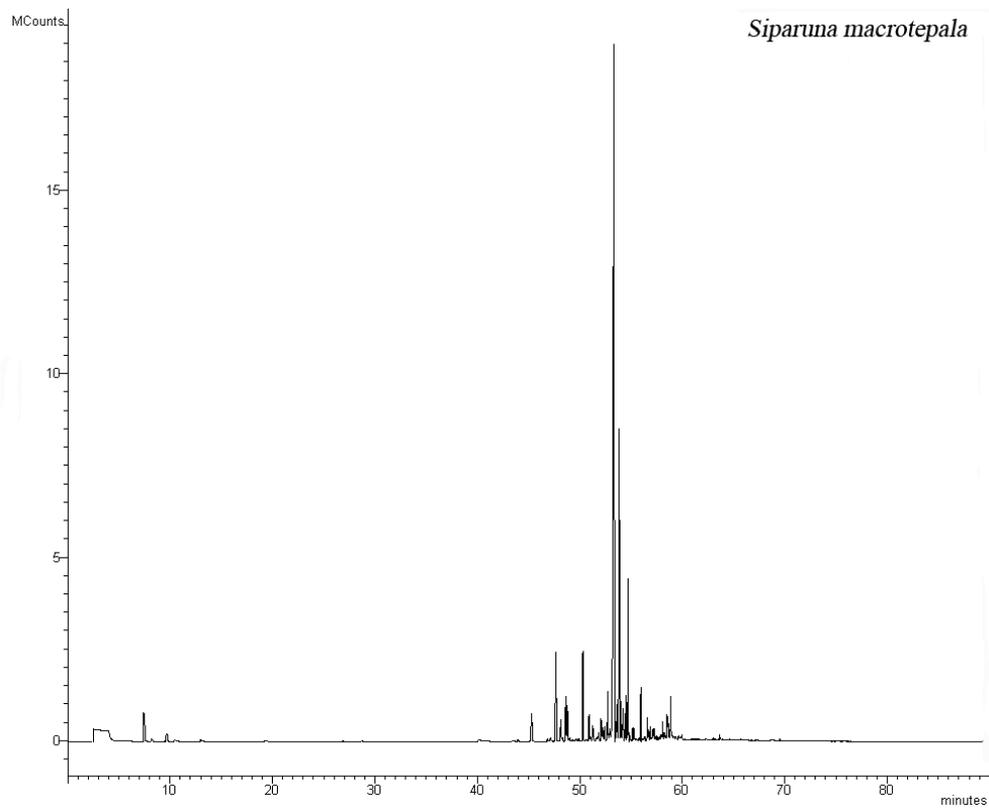


Figura 24. Cromatogramma dell'olio essenziale di *S. macrotepala*.

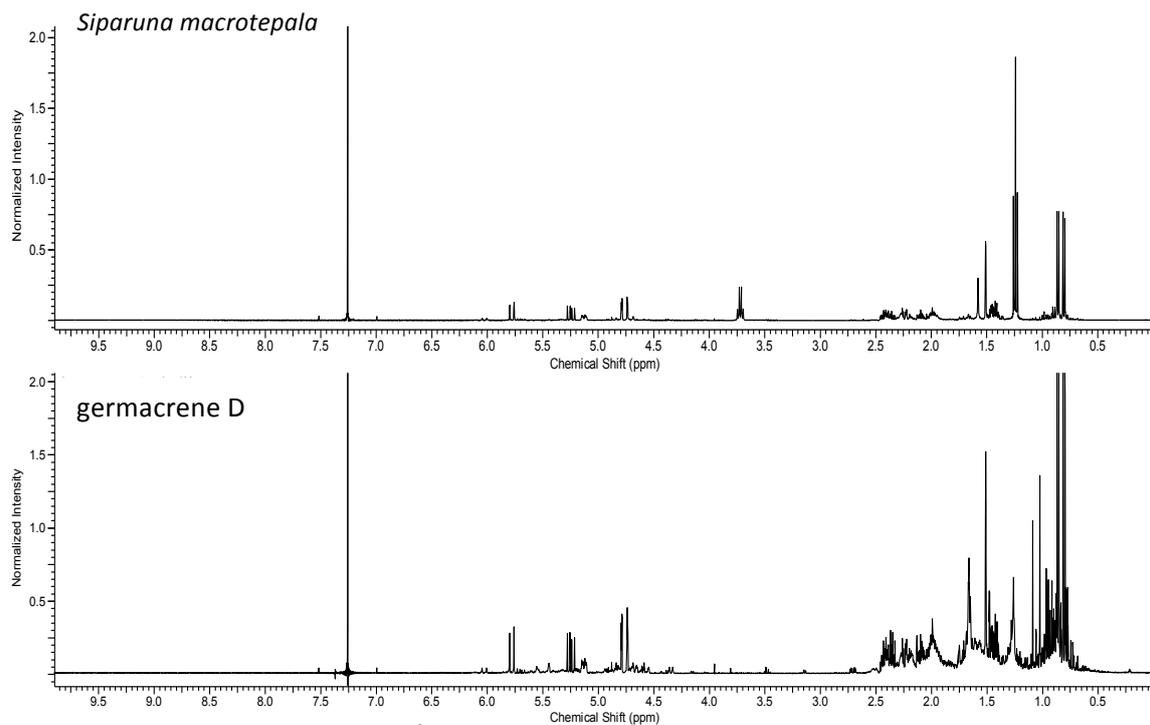


Figura 25.  $^1\text{H}$  NMR dell'olio di *S. macrotepala*

N	RT (min)	Composto	KT teorico	KT sperimentale	Identificazione	<i>Siparuna macrotepala</i>
						% Area
1	7.507	$\alpha$ -pinene	939	929	MS	1,84
2	8.210	camphene	954	944	MS	0,16
3	9.692	$\beta$ -pinene	954	973	MS	0,54
4	10.461	myrcene	991	989	MS	0,13
5	13.014	limonene	1029	1025	MS	0,14
6	40.152	2-undecanone	1294	1293	MS	0,30
7	43.984	nd	1331		MS	0,13
8	45.283	$\alpha$ -cubebene	1351	1348	MS	1,80
9	46.843	cyclosativene	1357	1365	MS	0,13
10	47.142	$\alpha$ -ylangene	1375	1369	MS	0,20
11	47.677	$\alpha$ -copaene	1377	1375	MS	4,38
12	48.150	$\beta$ -bourbonene	1388	1380	MS	1,0
13	48.300	nd		1381	MS	0,19
14	48.628	$\beta$ -cubebene	1388	1385	MS	1,89
15	48.790	$\beta$ -elemene	1391	1387	MS	1,54
16	49.027	nd			MS	0,14
17	49.920	nd			MS	0,11
18	50.308	$\beta$ -caryophyllene	1419		MS	3,43
19	50.900	$\beta$ -copaene	1432	1421	MS	0,98
20	51.038	nd			MS	0,17
21	51.262	$\alpha$ -guaiene	1440	1430	MS	0,68

22	51.600	nd			MS	0,15
23	51.713	cis-muurola-3,5-diene	1450		MS	0,13
24	51.832	trans-muurola-3,5-diene	1454		MS	0,36
25	52.076	$\alpha$ -humulene	1455	1448	MS	0,77
26	52.162	nd			MS	0,19
27	52.259	allo-aromadendrene	1460		MS	0,45
28	52.409	cis-muurola-4(14),5-diene	1467		MS	0,52
29	52.718	nd		1463	MS	1,69
30	52.927	$\gamma$ -muurolene	1480		MS	0,52
31	53.338	germacrene D	1485	1477	MS, NMR	42,12
32	53.538	$\beta$ -selinene	1490	1482	MS	0,49
33	53.635	muurola-4(14),5-diene trans	1494	1484	MS	1,06
34	53.849	bicyclogermacrene	1450	1489	MS	11,80
35	54.003	$\alpha$ -muurolene	1500	1493	MS	1,20
36	54.135	nd			MS	0,50
37	54.226	nd			MS	0,92
38	54.368	$\alpha$ -(E,E)-Farnesene	1506		MS	0,17
39	54.484	$\gamma$ -cadinene	1514	1505	MS	1,36
40	54.609	cubebol	1515	1510	MS	0,26
41	54.715	$\delta$ -cadinene	1523	1513	MS	5,01
42	54.834	zonarene	1530		MS	0,19
43	55.163	trans-cadina-1(2),4-diene	1535		MS	0,37

44	55.302	$\alpha$ -cadinene	1539		MS	0,36
45	55.464	$\alpha$ -calacorene	1546		MS	0,11
46	55.969	germacrene B	1561	1553	MS	1,65
47	56.346	nd			MS	0,10
48	56.604	spathulenol	1578		MS	0,80
49	56.722	caryophyllene oxide	1583		MS	0,13
50	56.865	globulol	1585		MS	0,47
51	57.123	viridiflorol	1593		MS	0,43
52	57.234	guaiol	1601		MS	0,45
53	57.410	$\beta$ -oplophenone	1608		MS	0,10
54	57.524	nd			MS	0,18
55	57.911	1,10-di-epi-cubenol	1619		MS	0,16
56	57.990	nd			MS	0,16
57	58.097	1-epi-cubenol	1629		MS	0,55
58	58.274	nd			MS	0,21
59	58.358	nd			MS	0,12
60	58.508	tau-cadinol	1640		MS	0,66
61	58.576	tau-muurolol	1642		MS	0,66
62	58.651	$\alpha$ -muurolol	1646		MS	0,52
63	58.879	$\alpha$ -cadinol	1654		MS	1,47
64	59.635	nd			MS	0,11
65	59.952	nd			MS	0,23
66	63.851	nd			MS	0,27
		<b>Totale identificati</b>				<b>94,61</b>

Tabella 12. Composizione chimica dell'olio essenziale di *S. macrotepala*.

I principali composti nell'olio essenziale sono: germacrene D 41,12%, bicyclogermacrene 11,80%,  $\delta$ -cadinene 5,01%,  $\alpha$ -copaene 4,38%,  $\beta$ -caryophyllene 3,43% (Fig. 26).

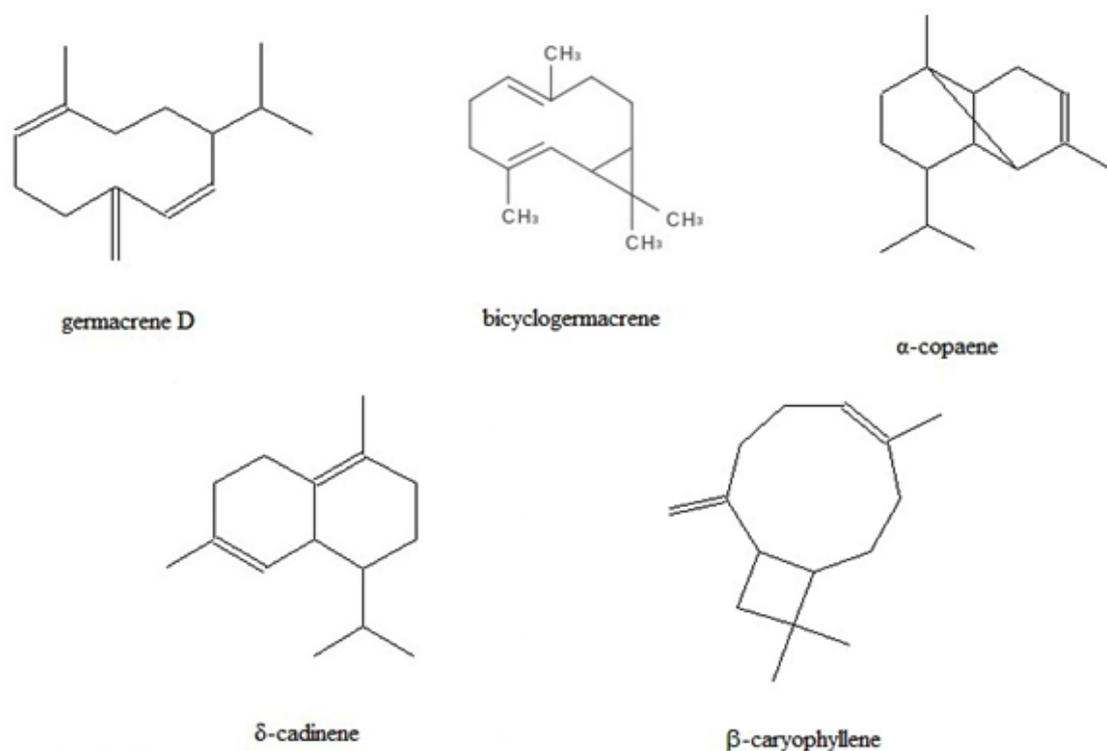


Figura 26. Principali composti dell'olio di *S. macrotepala*

### *Piper augustum*

In questo olio essenziale abbiamo rilevato la presenza di sessantotto composti con una resa superiore al 0,1%, di cui cinquantatre, equivalenti al 93,92%, sono stati identificati chimicamente. Per stabilirne l'identità chimica è stato confrontato lo spettro di massa sperimentale con quello presente nella libreria NIST, l'indice di Kovats di letteratura con quello ottenuto sperimentalmente (Fig. 27) (Tab. 13). L'analisi <sup>1</sup>H NMR dell'olio conferma la presenza di  $\beta$ -caryophyllene e germacrene D (Fig. 28).

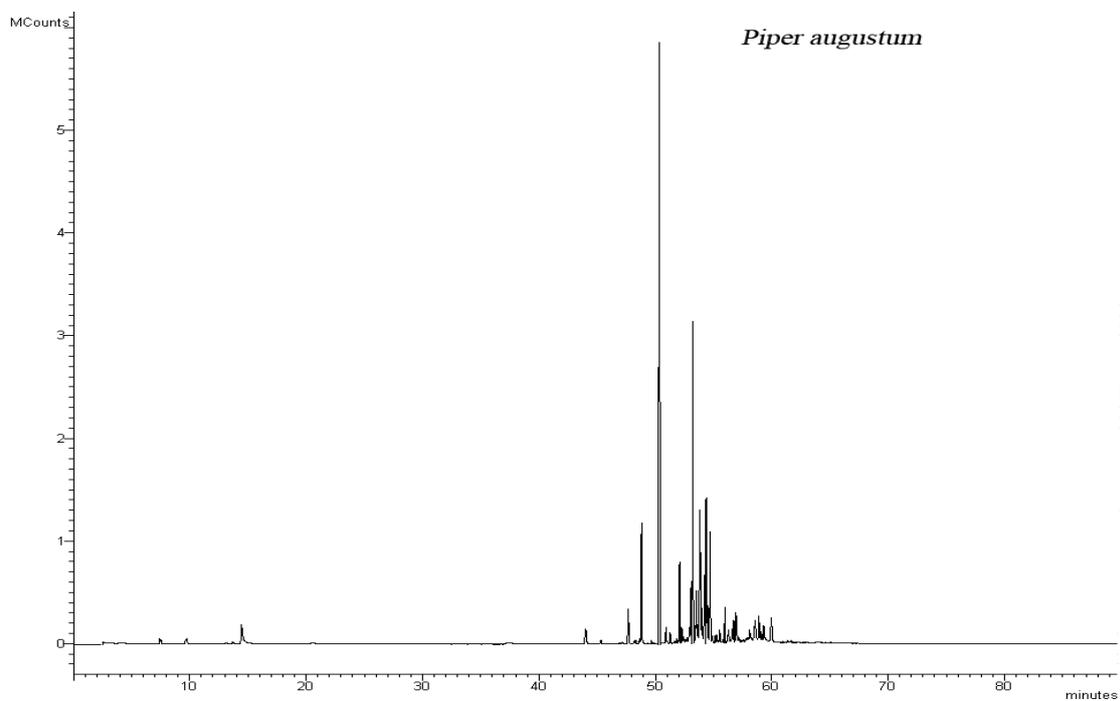
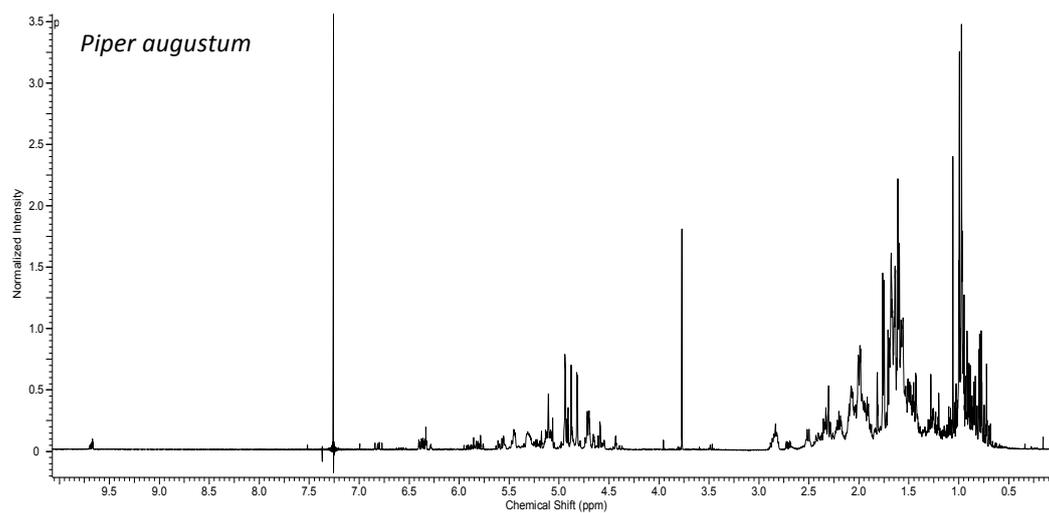


Figura 27. Cromatogramma dell'olio essenziale di *P. augustum*



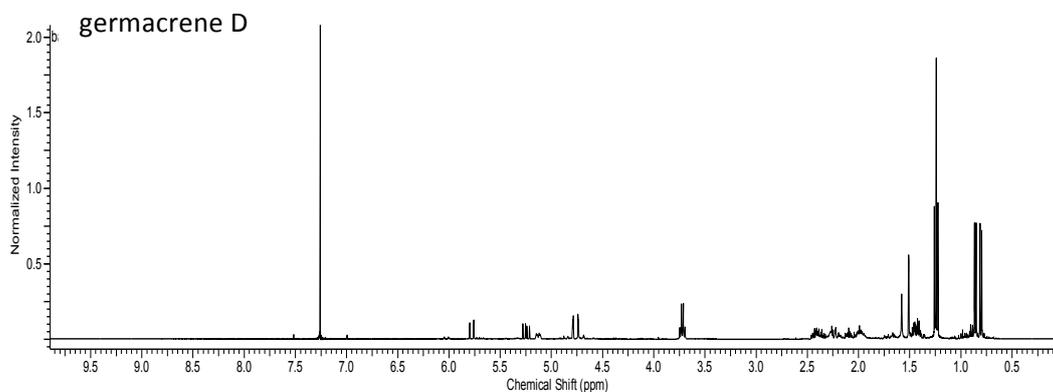
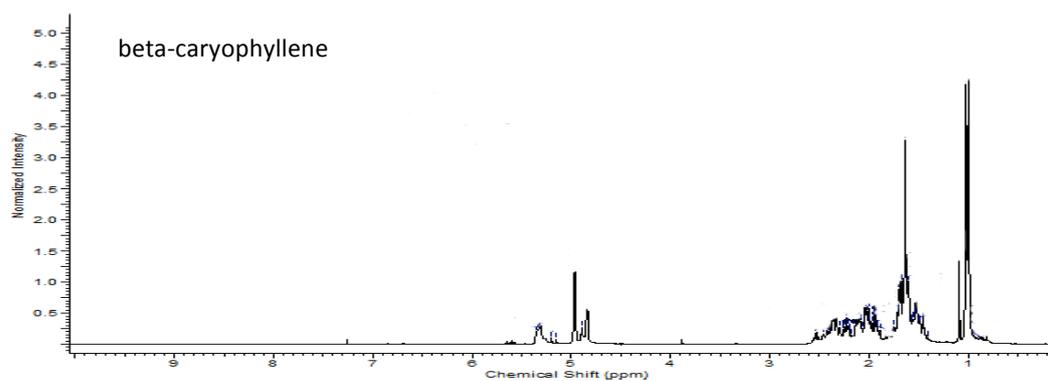


Figura 28.  $^1\text{H}$  NMR dell'olio di *P. augustum*

N	RT (min)	Composto	KT teorico	KT sperimentale	identificazione	<i>Piper augustum</i>
						% Area
1	7.436	$\alpha$ -pinene	939		MS	0,38
2	9.655	$\beta$ -pinene	979		MS	0,45
3	13.087	limonene	1029		MS	0,15
4	13.707	<i>cis</i> -ocimene	1037		MS	0,16
5	14.457	<i>trans</i> -ocimene	1050		MS	1,84
6	20.461	nd				0,26
7	37.229	3,5-dimethoxytoluene	1269		MS	0,45
8	44.015	$\delta$ -elemene	1338		MS	1,25
9	45.326	$\alpha$ -cubebene	1351		MS	0,27

10	47.177	$\alpha$ -ylangene	1375		MS	0,14
11	47.682	$\alpha$ -copaene	1377		MS	1,87
12	48.172	$\beta$ -bourbonene	1388		MS	0,15
13	48.322	nd				0,21
14	48.645	$\beta$ -cubebene	1388		MS	0,24
15	48.807	$\beta$ -elemene	1391		MS	5,78
16	49.665	$\beta$ -longipinene	1401		MS	0,15
17	50.352	$\beta$ -caryophyllene	1419		MS, NMR	27,09
18	50.917	$\beta$ -copaene	1432		MS	0,65
19	51.048	$\gamma$ -elemene	1437		MS	0,12
20	51.279	aromadendrene	1441		MS	0,50
21	51.671	nd				0,12
22	51.852	<i>cis</i> -muurolo-3,5-diene	1450		MS	0,19
23	52.088	$\alpha$ -humulene	1455		MS	3,11
24	52.272	allo-aromadendrene	1460		MS	0,56
25	52.421	9-epi-beta-caryophyllene	1466		MS	0,25
26	52.746	nd				0,15
27	52.941	$\gamma$ -gurjunene	1477		MS	0,65
28	53.048	$\gamma$ -muurolene	1480		MS	1,88
29	53.224	germacrene D	1485		MS, NMR	11,22
30	53.517	$\beta$ -selinene	1490		MS	1,82
31	53.623	valencene	1496		MS	0,60
32	53.804	bicyclogermacrene	1500		MS	5,21
33	53.887	$\alpha$ -(Z,E)-farnesene			MS	3,18
34	54.005	$\alpha$ -muurolene	1500		MS	1,27

35	54.145	$\beta$ -himachalene	1505		MS	0,35
36	54.223	germacrene A	1509		MS	2,37
37	54.361	$\alpha$ -(E,E)-farnesene	1506		MS	5,59
38	54.489	$\gamma$ -cadinene	1514		MS	1,41
39	54.710	$\delta$ -cadinene	1523		MS	4,58
40	54.833	trans-calamenene	1529		MS	0,17
41	54.903	nd				0,17
42	55.175	trans-cadina-1(2),4-diene	1535		MS	0,29
43	55.313	$\alpha$ -cadinene	1539		MS	0,30
44	55.538	nd				0,52
45	55.803	nd				0,16
46	55.978	germacrene B	1561		MS	1,19
47	56.263	E-nerolidol	1563		MS	0,50
48	56.338	nerolidyl acetate			MS	0,13
49	56.607	spathulenol	1578		MS	0,61
50	56.735	caryophyllene oxide	1583		MS	0,76
51	56.909	nd				1,08
52	56.987	nd				0,96
53	57.133	viridiflorol	1593		MS	0,21
54	57.220	guaiol	1601		MS	0,13
55	57.921	nd				0,14
56	58.105	1-epi-cubenol	1629		MS	0,44
57	58.172	nd				0,21
58	58.292	nd				0,13
59	58.522	tau.-cadinol	1640		MS	0,48

60	58.585	tau.-muurolol	1642		MS	0,66
61	58.661	$\alpha$ -muurolol	1646		MS	0,39
62	58.891	$\alpha$ -cadinol	1654		MS	0,82
63	58.966	selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1660		MS	0,60
64	59.108	intermedeol	1667		MS	0,26
65	59.308	nd				0,47
66	59.944	nd				0,68
67	59.984	nd				0,83
68	61.367	cyclocolorenone	1761		MS	0,12
		<b>Totale identificati</b>				<b>93,92</b>

Tabella 13. Composizione chimica dell' olio essenziali di *P. augustum*

I principali composti nell'olio essenziale sono:  $\beta$ -caryophyllene 27,09%, germacrene D 11,22%,  $\beta$ -elemene 5,78%,  $\alpha$ -(E,E)-farnesene 5,59%, bicyclogermacrene 5,21%,  $\delta$ -cadinene 4,58% (Fig. 29).

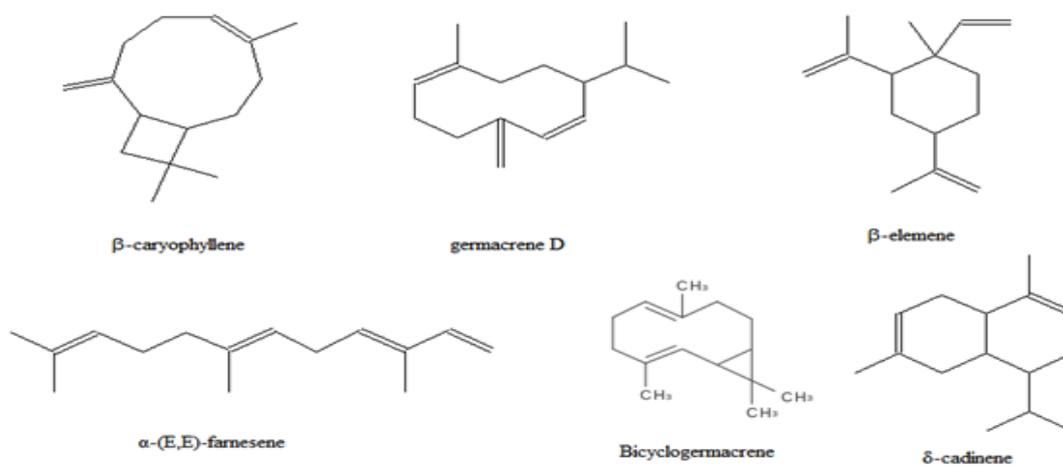


Figura 29. Principali composti dell'olio di *P. augustum*

### *Piper leticianum*

In questo olio essenziale abbiamo rilevato la presenza di settantaquattro composti con una resa superiore al 0,1%, di cui sessanta, equivalenti al 91,56%, sono identificati chimicamente. Per stabilirne l'identità chimica è stato confrontato lo spettro di massa sperimentale con quello presente nella libreria NIST, l'indice di Kovats di letteratura con quello ottenuto sperimentalmente (Fig. 30) (Tab. 14). L'analisi  $^1\text{H}$  NMR dell'olio conferma la presenza di  $\beta$ -caryophyllene e germacrene D (Fig. 31).

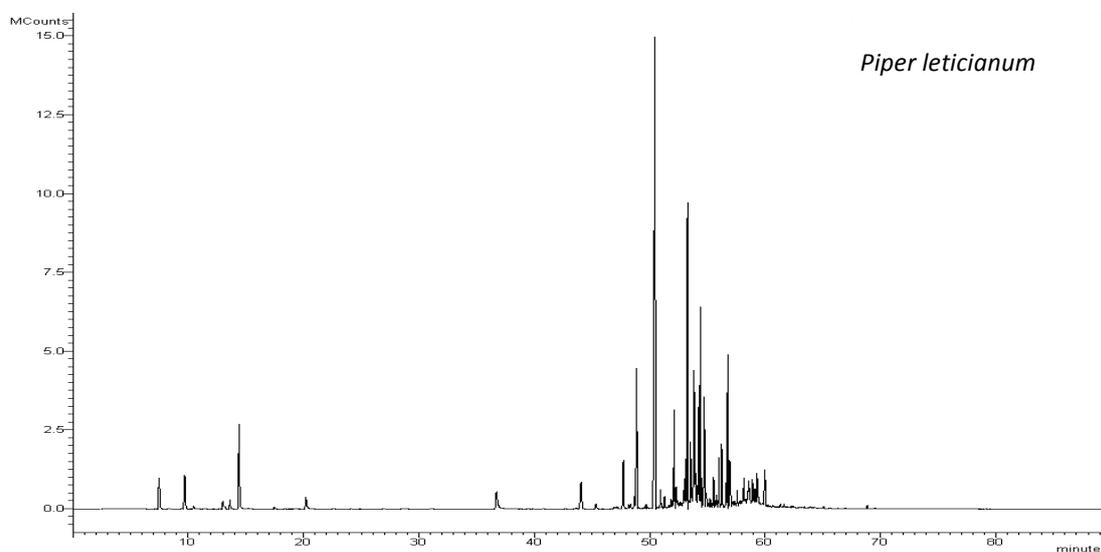
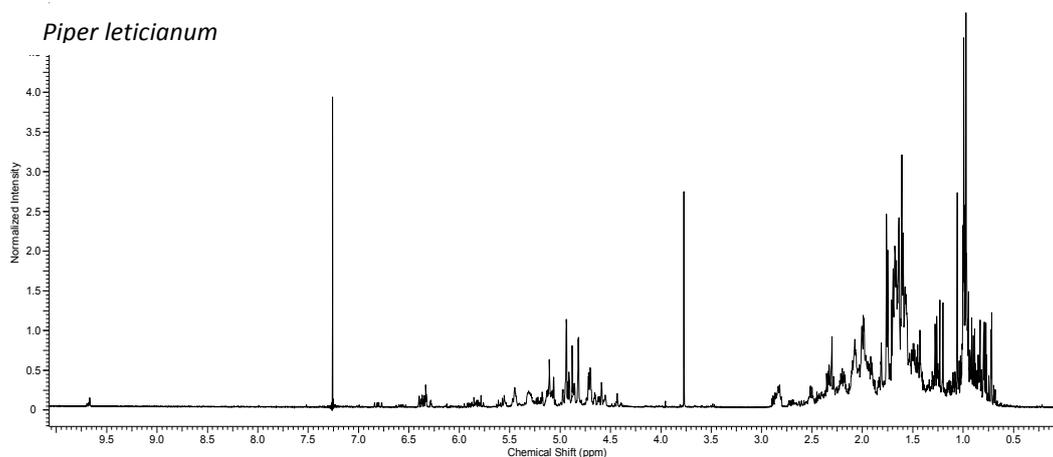


Figura 30. Cromatogramma dell'olio essenziale di *P. leticianum*



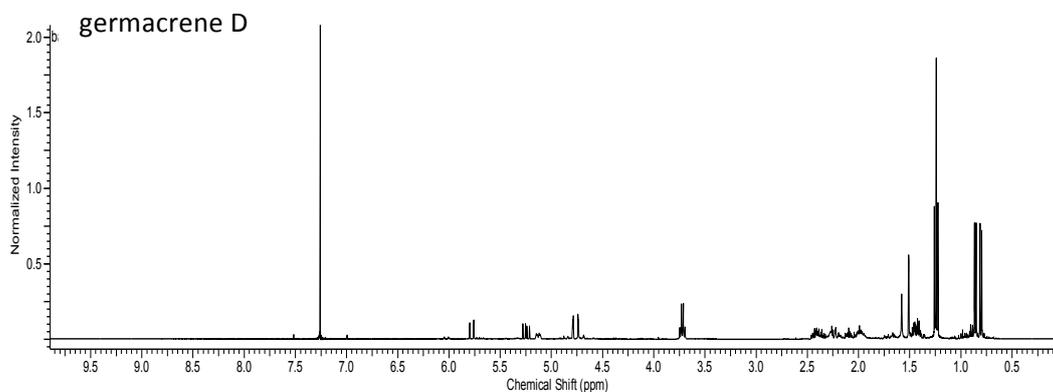
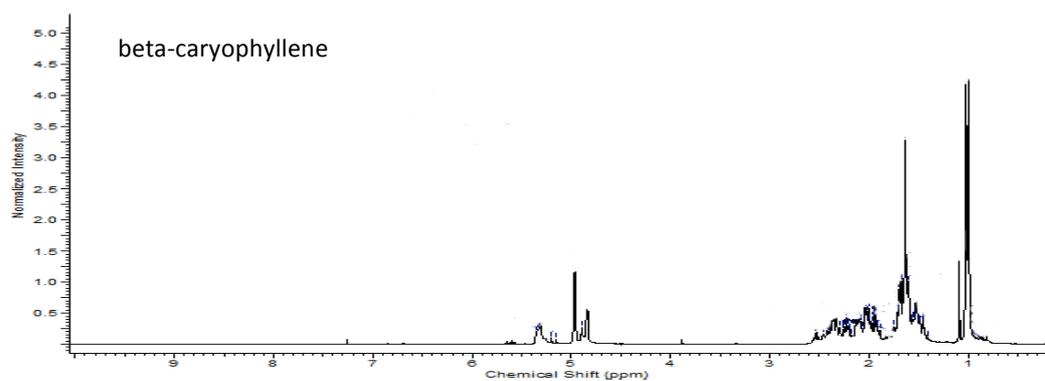


Figura 31.  $^1\text{H}$  NMR dell'olio di *P. leticianum*

N	RT (min)	Composto	KT teorico	KT sperimentale	Identificazione	<i>Piper leticianum</i>
						% Area
1	7.524	$\alpha$ -pinene	939	930	MS	1,48
2	9.708	$\beta$ -pinene	979	973	MS	1,69
3	10.475	myrcene	991	989	MS	0,14
4	13.024	limonene	1029	1025	MS	0,36
5	13.197	eucalyptol	1031	1027	MS	0,10
6	13.630	cis-ocimene	1037	1033	MS	0,36
7	14.421	trans-ocimene	1050	1043	MS	3,54
8	20.209	perillene	1101	1112	MS	0,66
9	36.729	3,5-dimethoxytoluene	1269	1264	MS	1,35

10	44.057	$\delta$ -elemene	1338	1335	MS	1,55
11	45.352	$\alpha$ -cubebene	1351	1349	MS	0,27
12	47.719	$\alpha$ -copaene	1377	1375	MS	1,88
13	48.199	$\beta$ -bourbonene	1388	1380	MS	0,16
14	48.344	nd		1382	MS	0,18
15	48.676	$\beta$ -cubebene	1388	1386	MS	0,43
16	48.868	$\beta$ -elemene	1391	1388	MS	5,06
17	49.694	$\beta$ -longipinene	1401	1397	MS	0,13
18	50.473	$\beta$ -caryophyllene	1419	1411	MS, NMR	21,80
19	50.940	$\beta$ -copaene	1432	1422	MS	0,54
20	51.070	$\gamma$ -elemene	1437	1425	MS	0,08
21	51.296	aromadendrene	1441	1430	MS	0,40
22	51.864	cis-muurolo-3,5-diene	1450	1443	MS	0,31
23	52.123	$\alpha$ -humulene	1455	1449	MS	2,93
24	52.293	allo-aromadendrene	1460	1453	MS	0,56
25	52.428	9-epi- $\beta$ -caryophyllene	1466	1456	MS	0,24
26	52.597	$\alpha$ -guaiene	1470	1460	MS	0,11
27	52.972	$\gamma$ -gurjunene	1477	1469	MS	0,53
28	53.104	$\gamma$ -muurolene	1480	1472	MS	1,25
29	53.293	germacrene D	1485	1476	MS, NMR	9,01
30	53.546	$\beta$ -selinene	1490	1482	MS	1,53
31	53.649	valencene	1496	1485	MS	0,38
32	53.841	bicyclogermacrene	1500	1489	MS	3,96
33	53.914	$\alpha$ -(Z,E)-farnesene		1491	MS	2,71
34	54.034	$\alpha$ -muurolene	1500	1494	MS	0,83

35	54.176	$\beta$ -himachalene	1505	1497	MS	0,22
36	54.264	germacrene A	1509	1499	MS	2,64
37	54.400	$\alpha$ -(E,E)-Farnesene	1506	1503	MS	5,10
38	54.512	$\gamma$ -cadinene	1514	1506	MS	0,69
39	54.666	7-epi- $\gamma$ -selinene	1522	1511	MS	0,49
40	54.745	$\delta$ -cadinene	1523	1514	MS	2,85
41	54.862	trans-calamenene	1529	1518	MS	0,21
42	54.929	nd		1520	MS	0,32
43	55.195	trans-cadina-1(2),4- diene	1535	1528	MS	0,22
44	55.333	$\alpha$ -cadinene	1539	1533	MS	0,17
45	55.544	nd		1540	MS	0,81
46	55.799	nd		1548	MS	0,46
47	55.999	germacrene B	1561	1554	MS	1,17
48	56.240	E-nerolidol	1563	1562	MS	1,66
49	56.645	spathulenol	1578	1575	MS	0,80
50	56.768	caryophyllene oxide	1583	1579	MS	3,83
51	56.923	nd		1584	MS	1,21
52	56.999	nd		1587	MS	1,16
53	57.140	viridiflorol	1593	1591	MS	0,10
54	57.237	guaiol	1601	1594	MS	0,19
55	57.387	carotol	1595	1599	MS	0,20
56	57.594	humulene 1,2-epoxide	1608	1607	MS	0,46
57	57.762	1,10-di-epi-cubenol	1619	1614	MS	0,12
58	57.841	10-epi- $\gamma$ -eudesmol	1623	1617	MS	0,14
59	57.931	nd		1620	MS	0,15

60	58.021	nd		1624	MS	0,13
61	58.112	1-epi-cubenol	1629	1627	MS	0,48
62	58.170	nd		1629	MS	0,75
63	58.295	nd		1634	MS	0,22
64	58.447	nd		1640	MS	0,25
65	58.529	tau-cadinol	1640	1643	MS	0,36
66	58.596	tau-muurolol	1642	1646	MS	0,65
67	58.671	$\alpha$ -muurolol	1646	1649	MS	0,53
68	58.901	$\alpha$ -cadinol	1654	1657	MS	0,71
69	58.972	selin-11-en-4-a-ol	1660	1660	MS	0,65
70	59.125	intermedeol	1667	1668	MS	0,51
71	59.306	nd		1673	MS	1,06
72	59.414	nd		1677	MS	0,27
73	59.962	nd		1698	MS	1,49
74	61,331	cyclocolorenone	1761	1757	MS	0,12
		<b>Totale identificati</b>				<b>91,56</b>

Tabella 14. Composizione chimica dell' olio essenziale di *P. leticianum*

I principali composti nell'olio essenziale sono:  $\beta$ -caryophyllene 21,803%, germacrene D 9,007%,  $\alpha$ -(E,E)-farnesene 5,098%,  $\beta$ -elemene 5,064%, bicyclogermacrene 3,959%,  $\delta$ -cadinene 2,852%, (Fig. 32).

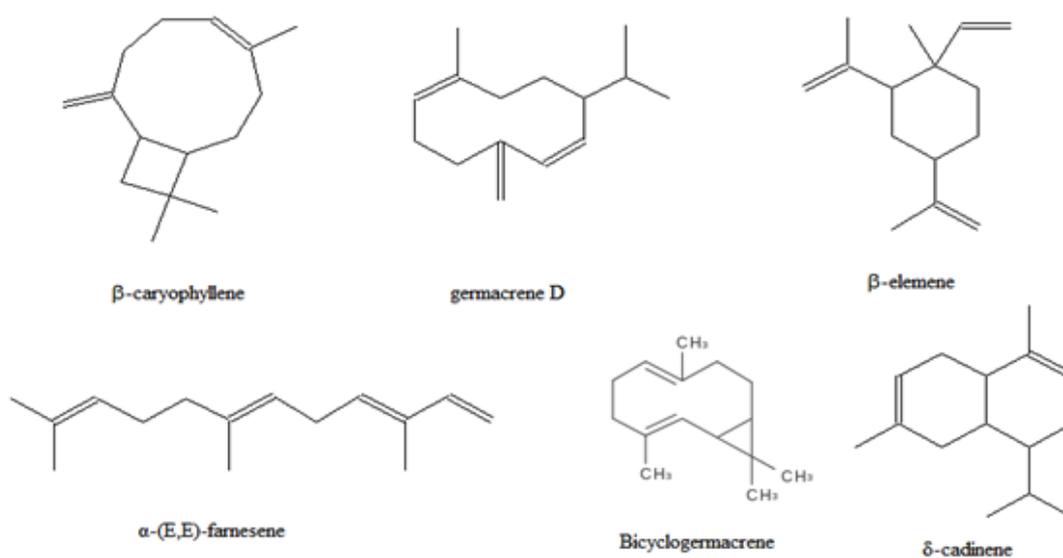


Figura 32. Principali composti dell'olio di *P. leticianum*

### ***Hedychium coronarium***

In questo olio essenziale abbiamo rilevato la presenza di trentatré composti con una resa superiore al 0,1%, di cui ventisette, equivalente al 93,39%, sono stati identificati chimicamente. Per stabilirne l'identità chimica ogni composto è stato confrontato lo spettro di massa sperimentale con quello presente nella libreria NIST, l'indice di Kovats di letteratura con quello ottenuto sperimentalmente (Fig. 33) (Tab. 15). L'analisi  $^1\text{H}$  NMR dell'olio conferma la presenza di 1,8-cineole e  $\beta$ -pinene (Fig. 34).

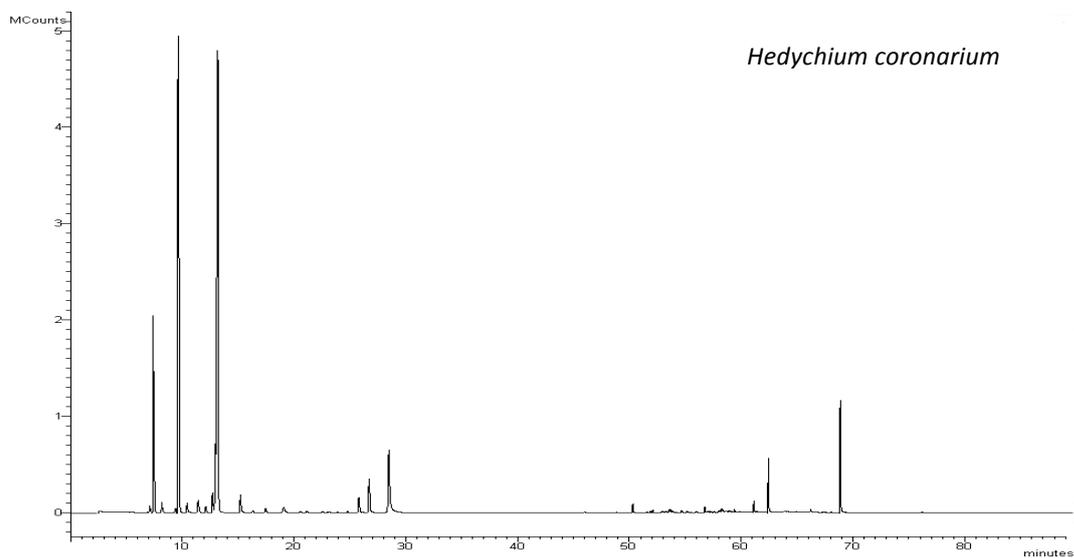
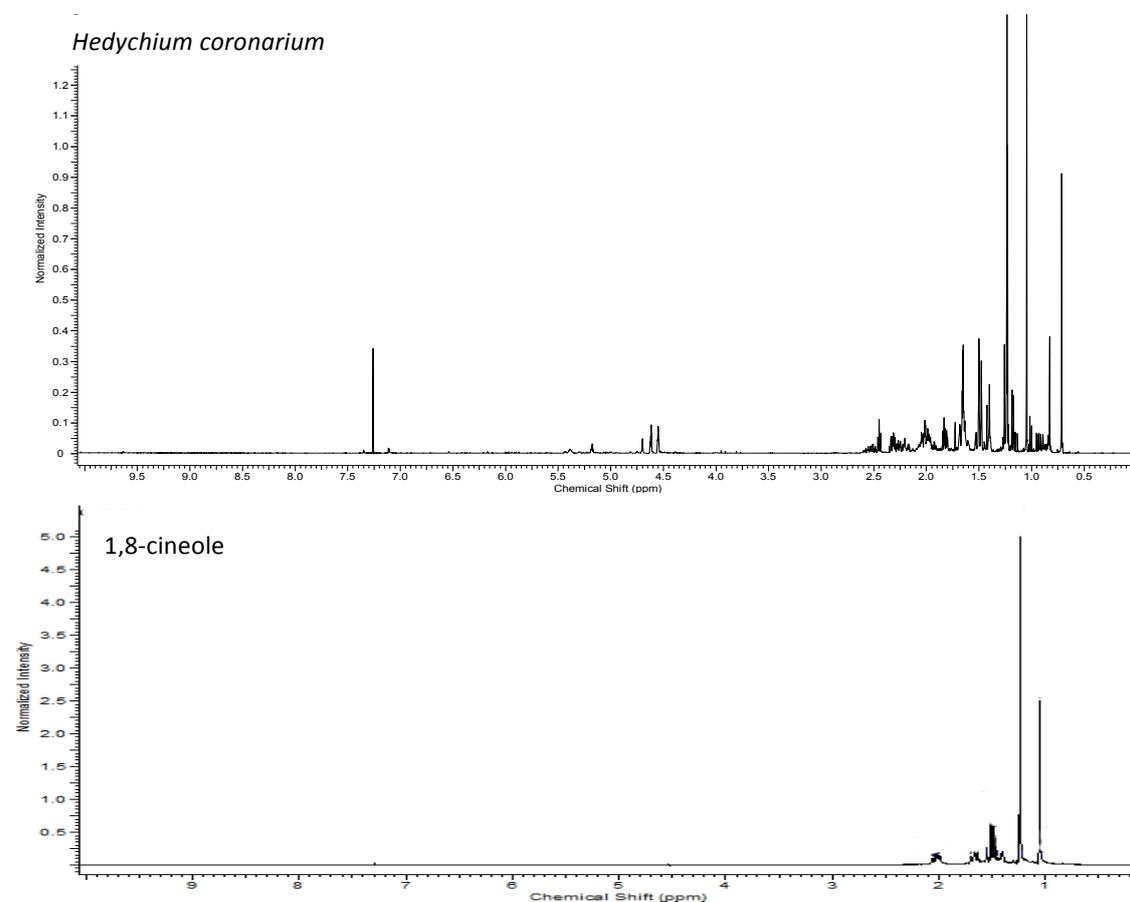


Figura 33. Cromatogramma dell'olio essenziale di *H. coronarium*



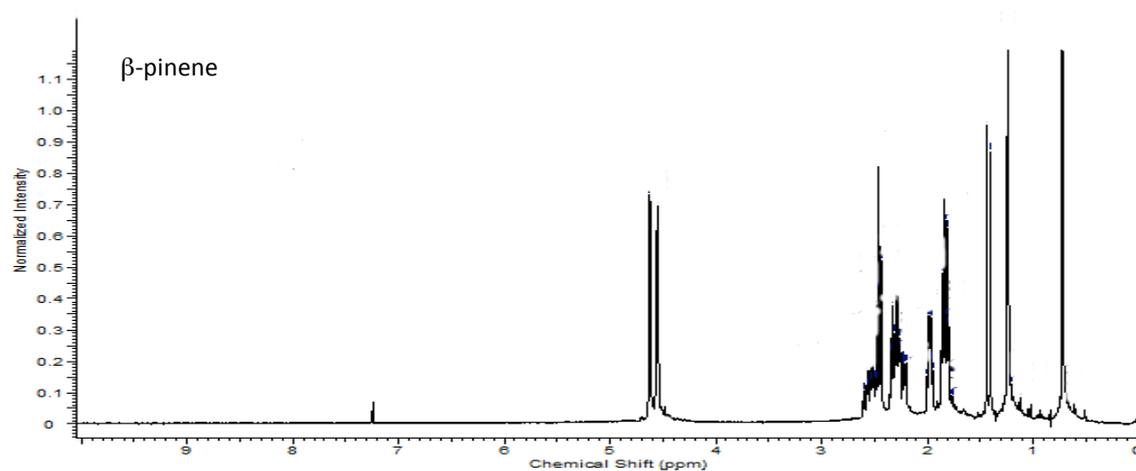


Figura 34.  $^1\text{H}$  NMR dell'olio di *H. coronarium*

No	RT (min)	Composto	KT Teorico	KT sperimentale	Identificazione	<i>Hedychium coronarium</i>
						Area %
1	7.422	$\alpha$ -pinene	939	930	MS	9,97
2	8.188	camphene	954	943	MS	0,60
3	9.442	sabinene	975	968	MS	0,33
4	9.647	$\beta$ -pinene	979	972	MS, NMR	29,95
5	10.442	myrcene	991	988	MS	0,512
6	11.433	$\alpha$ -phellandrene	1003	1005	MS	0,90
7	12.133	$\alpha$ -terpinene	1017	1014	MS	0,29
8	12.725	p-cymene	1025	1021	MS	1,16
9	12.992	limonene	1029	1025	MS	3,14
10	13.181	1,8-cineole	1031	1027	MS, NMR	33,69
11	15.217	$\gamma$ -terpinene	1060	1052	MS	1,21
12	16.312	cis-sabinene hydrate	1070	1067	MS	0,14
13	17.461	terpinolene	1089	1081	MS	0,31

14	19.085	linalool	1097	1102	MS	0,46
15	20.588	$\alpha$ -fenchol	1117	1115	MS	0,11
16	21.155	<i>cis</i> -p-menth-2-en1-ol	1122	1121	MS	0,11
17	22.556	<i>trans</i> -pinocarveol	1139	1135	MS	0,12
18	24.790	pinocarvone	1165	1157	MS	0,11
19	25.811	borneol	1169	1166	MS	1,09
20	26.732	4-terpineol	1177	1175	MS	2,41
21	28.496	$\alpha$ -terpineol	1189	1192	MS	5,71
22	45.984	$\alpha$ -terpinyl acetate	1349	1356	MS	0,14
23	50.307	$\beta$ -caryophyllene	1419	1409	MS	0,43
24	52.090	$\alpha$ -humulene	1455	1450	MS	0,109
25	53.537	$\beta$ -selinene	1490	1482	MS	0,10
26	53.644	drim-8(12)-ene	1492	1485	MS	0,12
27	56.740	caryophyllene oxide	1583	1578	MS	0,19
28	58.261	nd		1632		0,21
29	59.409	nd		1674		0,12
30	61.128	nd		1746		0,41
31	62.425	nd		1805		1,96
32	66.222	nd		1988		0,10
33	68.851	nd		2130		3,80
		<b>Totale identificati</b>				<b>93,39</b>

Tabella 15. Composizione chimica dell'olio essenziale di *H. coronarium*

I principali composti nell'olio essenziale sono: 1,8-Cineole 33,69%,  $\beta$ -pinene 29,95%,  $\alpha$ -pinene 9,97%,  $\alpha$ -terpineol 5,71% (Fig. 35). Il composto con KI 2130 è stato isolato

tramite colonna cromatografica: per la sua identificazione strutturale si sta procedendo ad ulteriori approfondimenti.

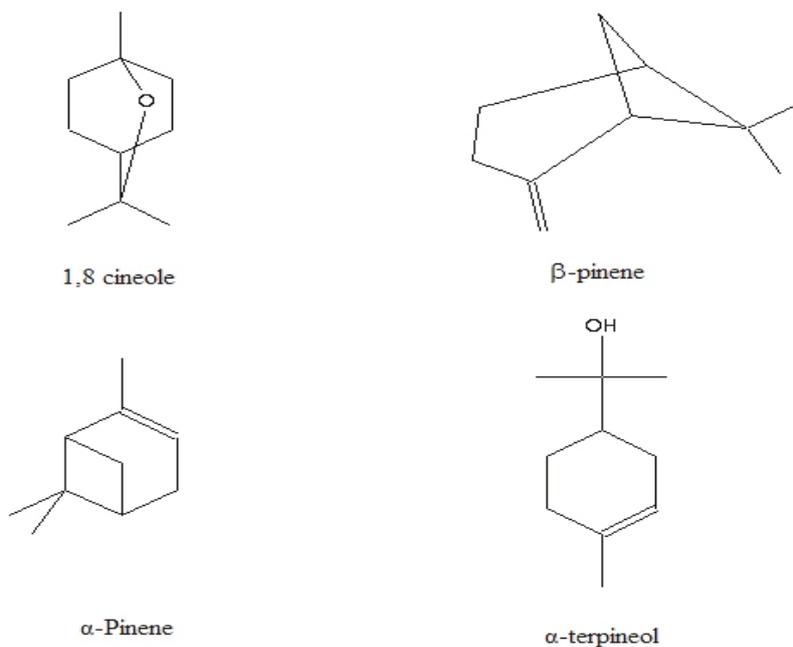


Figura 35. Principali composti dell'olio di *H. coronarium*

### A) 2.2 Studio dei composti terpenici maggioritari degli oli essenziali per (HP)TLC.

Al fine di procedere allo studio di attività biologica tramite test autobiografici su HPTLC sono state ricercate le condizioni migliori di separazione per i componenti dei vari oli essenziali. L'esano è risultato essere il miglior compromesso tra le fase mobili provate. Le lastre così sviluppate sono state visualizzate alla lunghezza d'onda di 254 e 366 nm (Fig. 36)

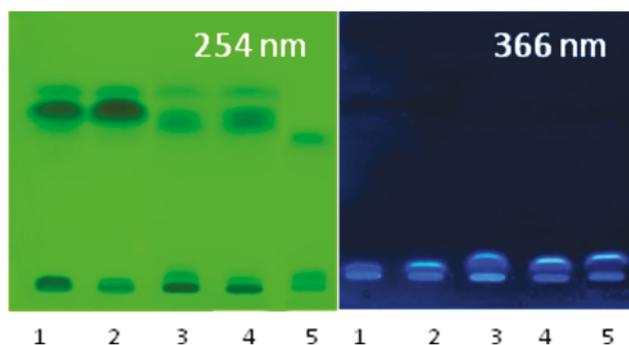


Figura 36. HPTLC degli oli essenziali a 254 e 366 nm

Legenda. 1:*Siparuna aspera*, 2:*Siparuna macrotrepala*,

3:*Piper augustum*, 4:*Piper leticianum*, 5:*Hedychium coronarium*

## B) 1. Studio di bioattività

### B) 1.1 Studio di attività antiossidante

#### B) 1.1.1 DPPH Spettrofotometrico

Dal test spettrofotometrico del DPPH è emerso che la capacità antiossidante degli oli essenziali è proporzionale alla concentrazione in opportuni intervalli di concentrazione. A seguito della costruzione di curve sperimentali aventi come ordinata la % di inibizione del radicale DPPH in funzione della concentrazione si è potuto ricavare il valore di IC 50 degli oli, che è stato confrontato con quello dell'olio di *Thymus vulgaris* (chemiotipo timolo), usato come controllo positivo e molecole pure commerciali o isolate come il germacrene D, principali componenti degli stessi oli (**Tabella 16**, **Figura 37**).

DPPH	IC 50 (ml/ml)
<i>S. aspera</i>	22,3
<i>S. macrotrepala</i>	31,6
<i>P. augustum</i>	6,8
<i>P. leticianum</i>	4,7
<i>H. coronarium</i>	10,1
<i>T. vulgaris</i>	0,78
b-caryophyllene	80,1
b-pinene	149,8
1,8-cineole	440,8

germacrene D	2,1
--------------	-----

Tabella 16. DPPH test: valori di IC50

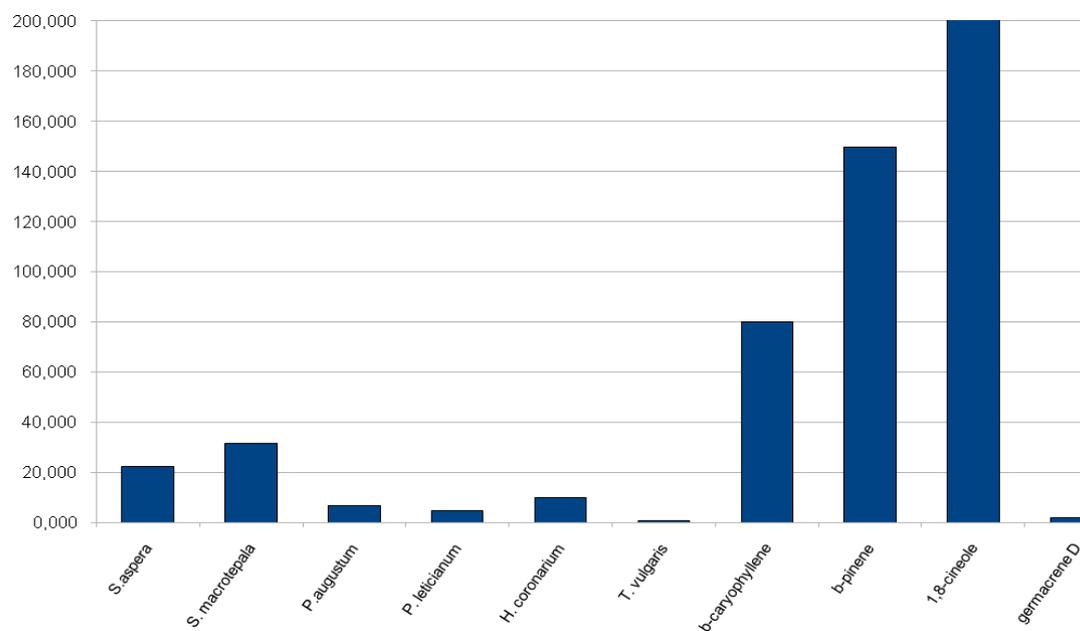


Figura 37. Confronto grafico tra IC50.

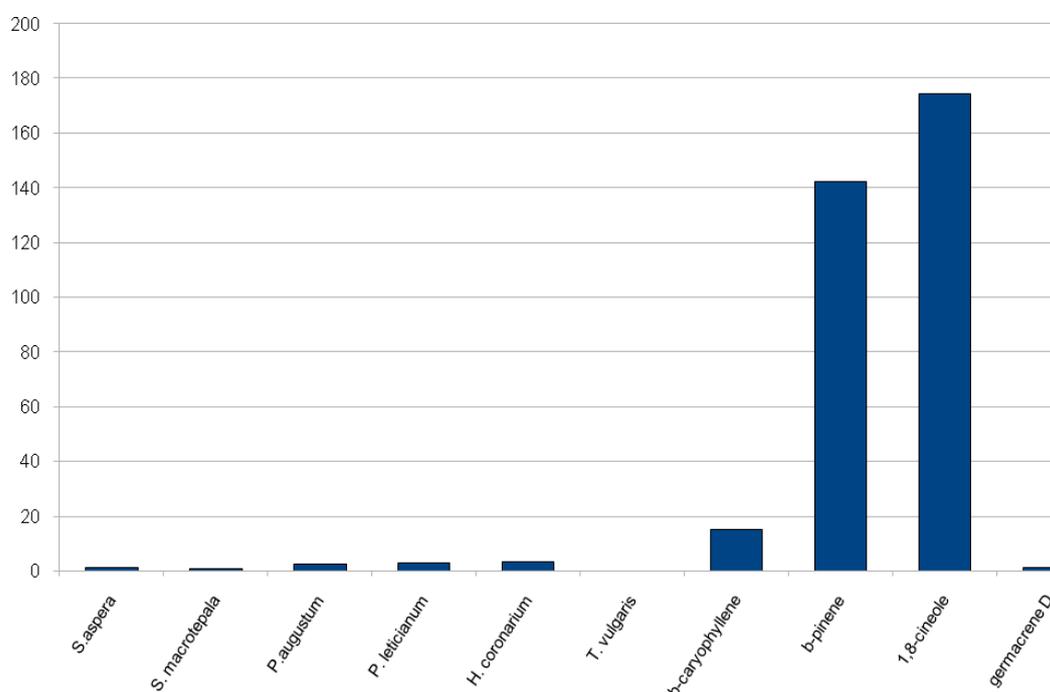
### B) 1.1.2 ABTS Spettrofotometrico

L'ABTS spettrofotometrico prevede la misura della decolorazione del radicale ABTS come risposta del potenziale antiossidante. A seguito della costruzione di curve sperimentali aventi come ordinata la % di inibizione del radicale ABTS in funzione della concentrazione si è potuto ricavare il valore di IC 50 degli oli, che è stato confrontato con quello dell'olio di *Thymus vulgaris* (chemiotipo timolo), usato come controllo positivo e molecole pure commerciali o isolate come il germacrene D, principali componenti degli stessi oli (Tab. 17) (Fig 38).

ABTS	IC 50 (ml/ml)
<i>S. aspera</i>	1,21
<i>S. macrotrepala</i>	0,86
<i>P. augustum</i>	2,38

<i>P. leticianum</i>	2,93
<i>H. coronarium</i>	3,2
<i>T. vulgaris</i>	0,06
$\beta$ -caryophyllene	15,1
$\beta$ -pinene	142
1,8-cineole	174,1
germacrene D	1,19

**Tabella 17.** Valori di IC50 nell'ABTS test



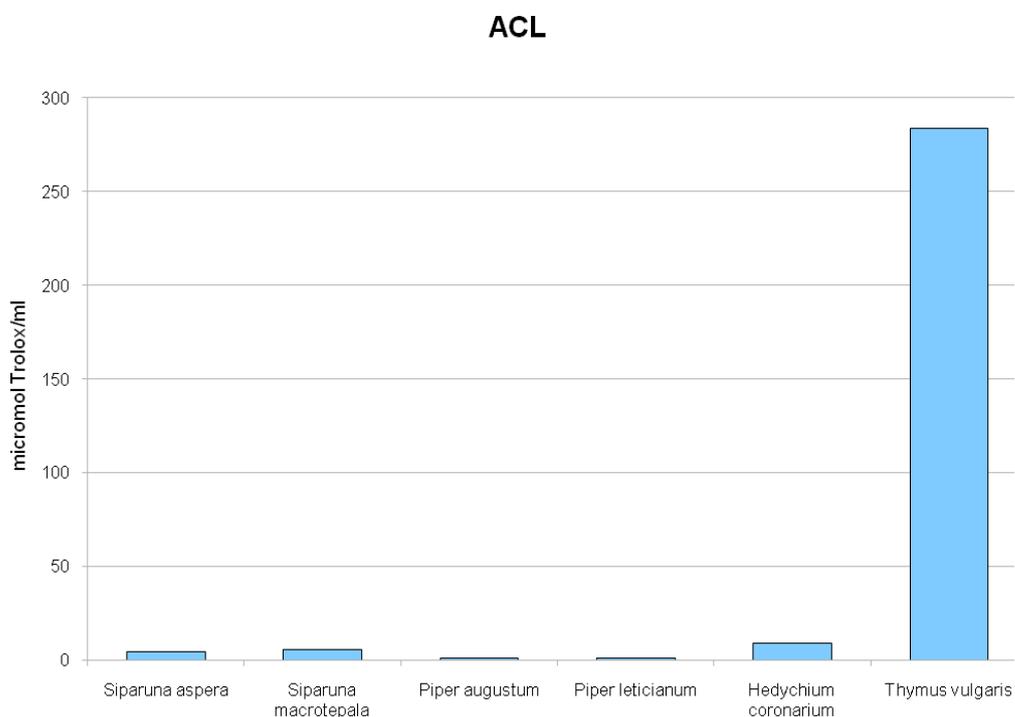
**Figura 38.** Confronto grafico tra IC50.

### A) 1.1.3 Attività antiossidante con il metodo della fotochemiluminescenza

A causa della naturale lipofilia degli oli essenziali la misurazione analitica utilizzata è l'ACL test. In questo metodo l'attività antiossidante si esprime come mmoli di trolox/ml: più alto è questo valore, maggiore è l'attività antiossidante (Tab 18) (Fig. 39). Come nei precedenti metodi di valutazione dell'attività antiossidante il controllo positivo è l'olio di *Thymus vulgaris*.

ACL	mmoli di trolox/ml
<i>Siparuna aspera</i>	4,72
<i>Siparuna macrotepala</i>	5,43
<i>Piper augustum</i>	1,07
<i>Piper leticianum</i>	1,35
<i>Hedychium coronarium</i>	9,04
<i>Thymus vulgaris</i>	283,33

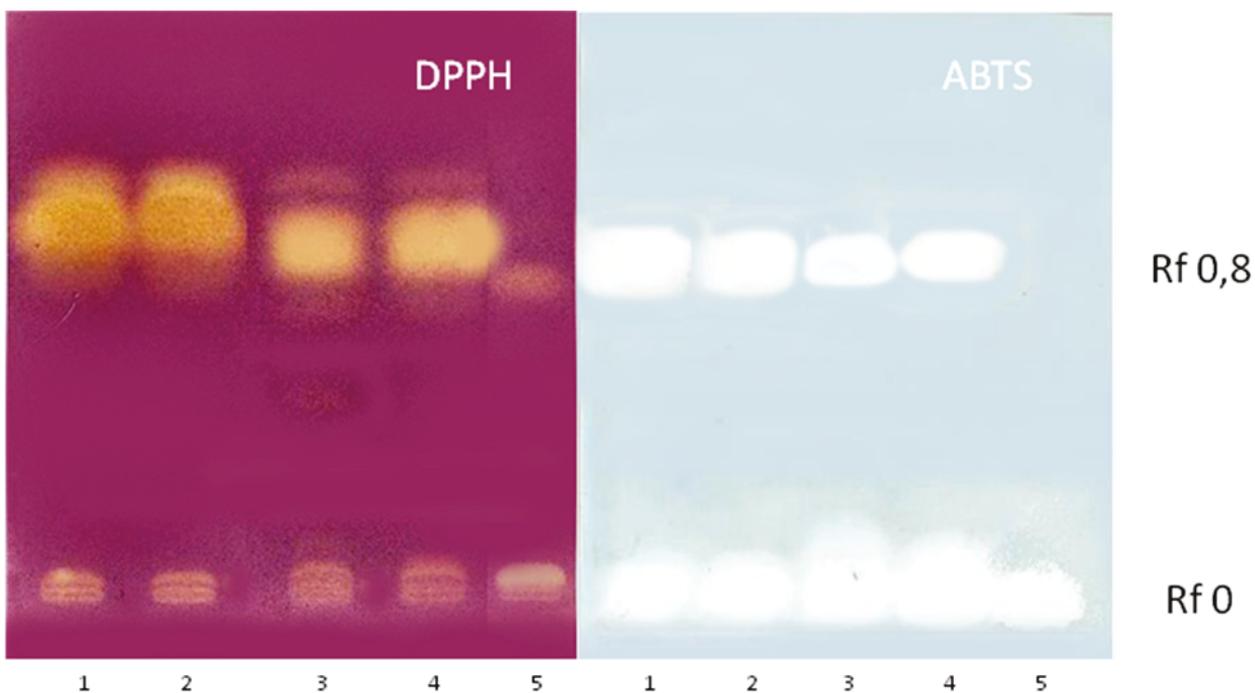
Tabella 18. Attività antiossidante con ACL test



**Figura 39.** Confronto grafico dei risultati con il metodo ACL

### **B) 1.1.4 Saggio DPPH e ABTS su HPTLC (autobiografico)**

Dopo la separazione dei principali composti e la rivelazione della lastra cromatografica con una soluzione di DPPH e ABTS rispettivamente, sono state evidenziate a diversi Rf le bande attive (fig. 40).



**Figura 40.** HPTLC DPPH e ABTS autobiografico

Legenda. 1:*Siparuna aspera*, 2:*Siparuna macrotrepala*,

3:*Piper augustum*, 4:*Piper leticianum*, 5:*Hedychium coronarium*

Come indicato in figura le bande più attive risultano essere a Rf 0,8 e a Rf 0 per gli oli del genere *Siparuna* e del genere *Piper*. L'analisi gas-cromatografica dei composti isolati ha permesso di identificare come principale componente a Rf 0,8 il germacrene D e a Rf 0 il b-caryophyllene, in accordo con il valore di IC50 ottenuto con i test spettrofotometrici. Per quanto concerne l'olio di *H. coronarium* le bande più attive sono a Rf 0: il composto principale isolato a questo Rf è l'1,8-cineolo che ha un IC50 molto elevato con entrambi i test. Potrebbe essere plausibile postulare che composti minori non identificati possano contribuire all'attività.

## **B) 1.2 Test di attività antimicrobica.**

### **B) 1.2.1 Metodo del disk diffusion.**

Per la valutazione della attività antimicrobica, si osserva la misura dell'alone d'inibizione intorno al disk (Fig. 41). La MIC si determina come la concentrazione minima che inibisce la crescita del microorganismo valutata in  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Tab. 19).

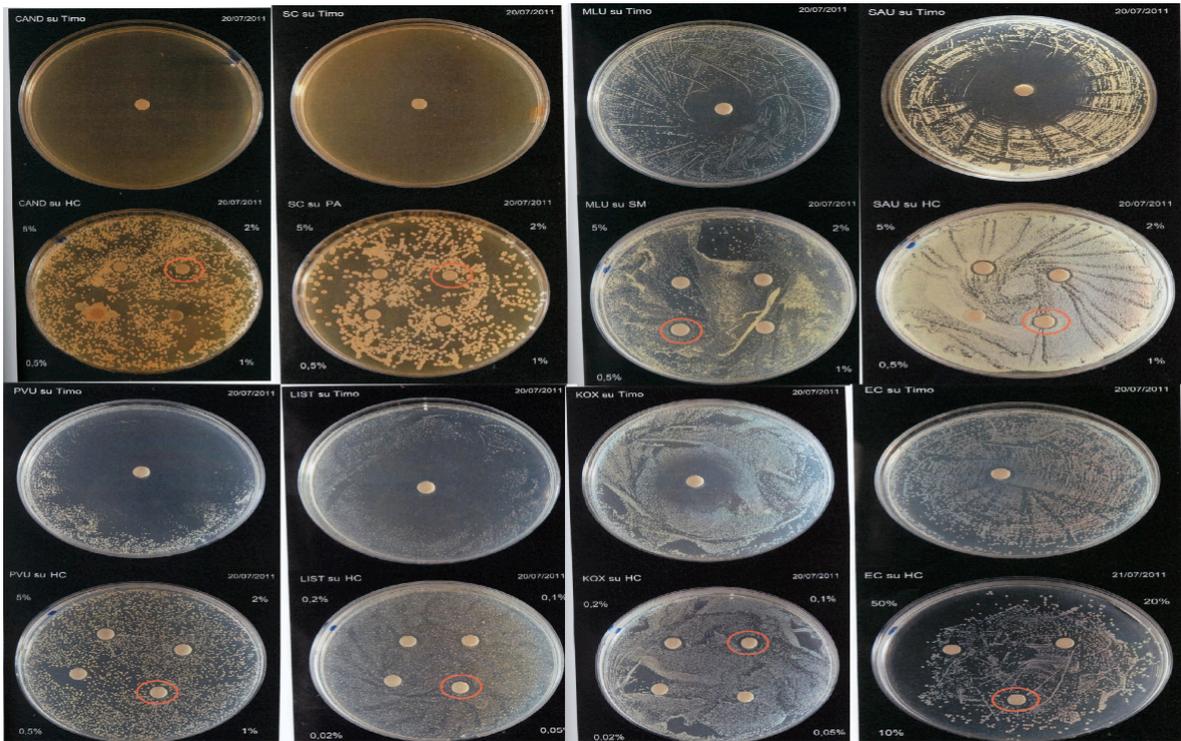


Figura 41. Misura dell'alone di inibizione su vari microrganismi

	MIC ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )														
	Gram +						Gram -				Lieviti				
	E F	LIS T	ML U	SA U	S E	SMU	EC	KO X	PV U	PA	SC	CAN D	M F		
<i>S. macrotepal</i>	10	10	5	50	20	2	50	0	20	20	0	10	0	50	20
<i>S. aspera</i>	10	10	20	100	20	1	50	0	50	50	10	50	0	100	50
<i>H. coronarium</i>	10	0,5	10	10	5	0,2	10	0	1	10	10	0	0	20	5
<i>P.</i>	10	20	20	100	20	>0,0	50	50	50	10	20	100	10	100	2

<i>augustum</i>						2	0			0			
<i>P. leticianum</i>	10	20	10	20	20		50	0	50	20	10	20	20
<i>Thymus vulgaris</i>	2	1	2	2	1	0,2	5	2	2	10	2	2	0,2

Tabella 19. Concentrazione minima inibitoria degli oli essenziali su vari microrganismi.

LEGENDA: EF=*Enterococcus faecalis* LIST=*Listeria grayi* MLU=*Micrococcus luteus*  
SAU=*Staphylococcus aureus* SE=*Staphylococcus epidermidis* SMU=*Streptococcus mutans*  
EC=*Escherichia coli* KOX=*Klebsiella oxytoca* PVU=*Proteus vulgaris*  
PA=*Pseudomonas aeruginosa* SC = *Saccharomyces cerevisiae* CAND = *Candida albicans*  
MF=*Malassezia furfur*

L'olio essenziale di *H. coronarium* manifesta la maggior attività antimicrobica ed, in alcuni casi, confrontabile con l'olio di timo, preso a confronto.

### B) 1.2.2 (HP)TLC Antimicrobica

Dato che l'olio essenziale di *Hedychium coronarium* è quello che ha i migliori risultati nella valutazione della MIC, si è deciso di ricercare l'attività antimicrobica per via autobiografica. Poichè l'olio non presenta una quantità considerabile di sesquiterpeni non è consigliabile usare la stessa fase mobile (n-esano) come per gli altri oli per ottenere la miglior separazione. La fase mobile scelta è stata una miscela di toluene (93), etil acetato (7), etere di petrolio (20); con questa è stato possibile ottenere una buona separazione dei componenti per verificarne la loro attività (Fig. 42). Le molecole sono state poi isolate iniettate in gas cromatografia.

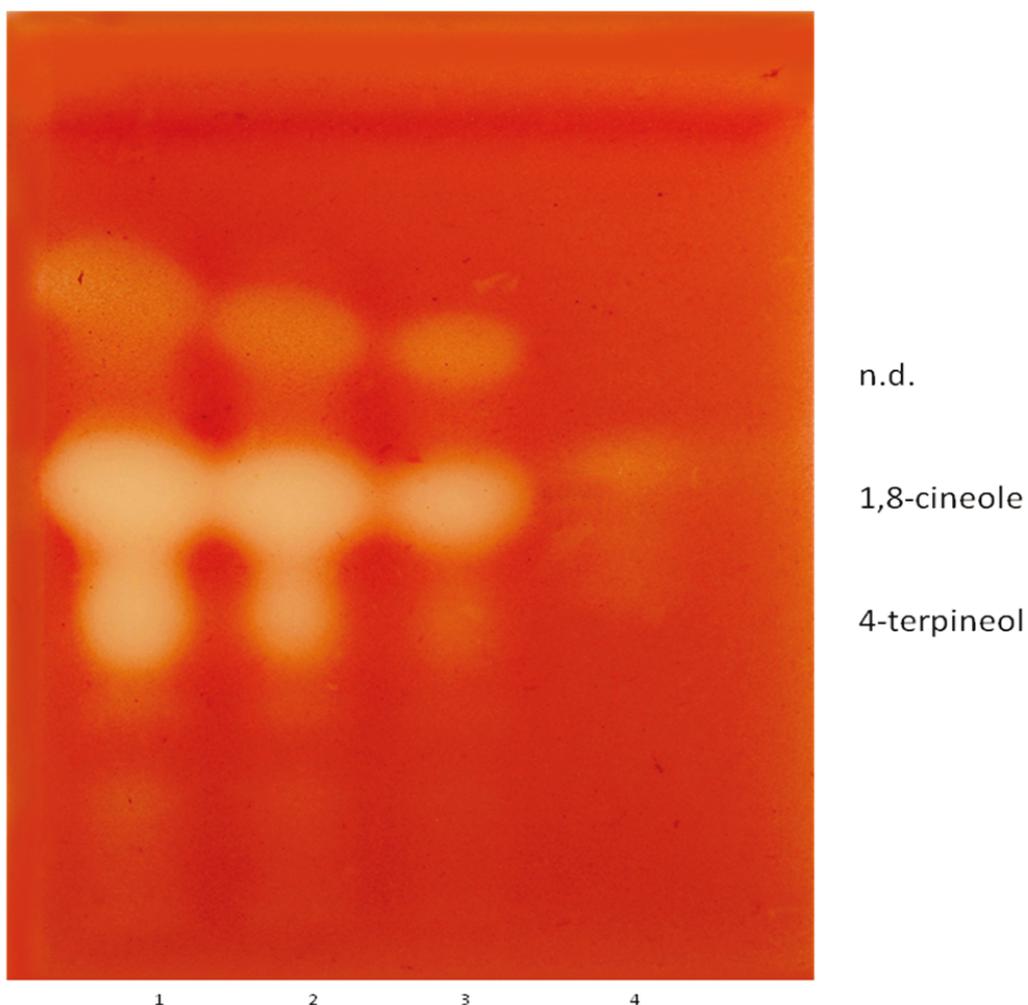


Figura 42. HPTLC antimicrobico di *H. coronarium* a concentrazioni decrescenti (*S. aureus*)

La TLC autobiografica evidenzia tre composti che hanno attività: 4-terpineol, 1,8-cineole e un composto sconosciuto in fase di identificazione e coincidente con il composto non identificato in gas-cromatografia avente KI 2130.

*H. coronarium* è la pianta che in quest'indagine presenta il numero più alto di pubblicazioni che la riguardano; recentemente (Zhan *et al.*, 2012) sono state identificate due nuove molecole di natura diterpenica (Fig. 43).

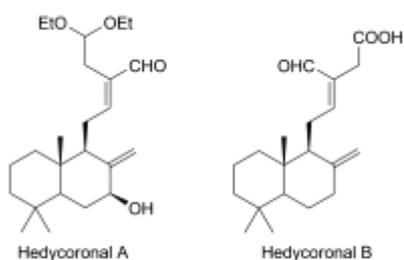


Figura 43. Nuove molecole scoperte in *H. coronarium*

## **B) 1.3 Valutazione della citotossicità, attività mutagenica e mutagena protettiva dell' olio di *H. coronarium*.**

### **B) 1.3.1 *Saccharomyces cerevisiae* D7 Test.**

#### **Citotossicità e attività mutagena.**

Il saggio utilizza il lievito *Saccharomyces cerevisiae* ceppo D7 secondo la metodica di Zimmermann (Zimmermann et al., 1975) e da indicazioni relative ad aspetti di attività citotossica (indicata come percentuale di sopravvissuti) e mutagena (espressa come conversione genica e mutazione puntiforme) del campione in esame. Nel range considerato (0,005-1 µl/ml) i risultati hanno evidenziato citotossicità a concentrazioni maggiori-uguali a 0,5 µl/ml con una percentuale di sopravvissuti del 47,37%. A concentrazioni inferiori, invece, il campione non ha mostrato attività genotossica con valori di conversione genica e mutazione puntiforme rientranti nei parametri fisiologici (rispettivamente  $0,4-0,8 \times 10^{-5}$  UFC per la conversione genica e  $0,1-0,5 \times 10^{-6}$  UFC per la mutazione puntiforme).

#### **Valutazione dell'attività mutagena protettiva (test D7)**

La valutazione dell'attività mutagena protettiva rispetto ad un mutageno noto (EMS, ethyl methanesulfonate) non ha dato risultati apprezzabili. Il campione non ha contrastato l'attività mutagena dell'EMS, facendo osservare un forte aumento nel numero di sopravvissuti nel terreno selettivo privo di triptofano (valutazione della conversione genica) ed isoleucina (valutazione della mutazione puntiforme).

### **B) 1.3.2 SOS Chromotest**

Il saggio di attività genoprotettiva dell'OE è stato preceduto da quello di genotossicità che ha confermato la citotossicità di tale fitocomplesso a concentrazioni superiori-uguali a 0,5 µl/ml ed ha verificato la mancanza di attività genotossica a concentrazioni non citotossiche, avvalorando quindi la già testata sicurezza dell'olio essenziale di *Hedychium coronarium*.

E' stata quindi indagata l'attività genoprotettiva dell'OE, che non ha dato risultati di rilievo: alla concentrazione massima non citotossica è stato osservato un decremento dell'assorbanza, quindi dell'attivazione del sistema SOS, del  $10,56 \pm 0,48$  %, con andamento dose-risposta, rispetto alla 4-nitro-N-ossi-chinolina (Fig. 51).

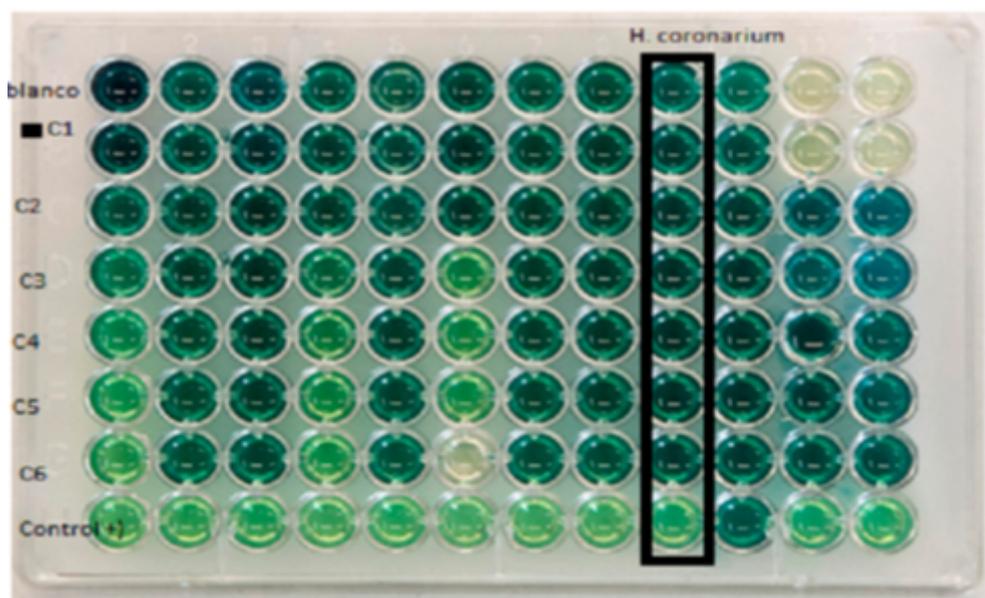


Figura 44. SOS- Chromo Test

### C) 1 Formulazioni Cosmetiche a base di oli essenziali.

#### C) 1.1 Valutazione antiossidante delle formulazioni cosmetiche a base di oli essenziali.

Sulla base degli oli disponibili, il test è stato eseguito sui tre più attivi al test della fotochemiluminescenza: *S. aspera*, *S. macrotepala* e *H. coronarium*. I risultati preliminari sugli oli puri dimostravano che l'attività era bassa in confronto con il controllo positivo naturale (olio di *Thymus vulgaris*), tuttavia le diverse formulazioni presentano qualche bassa attività (Tab. 20)

	OLEOLITA	EMULSIONE O/A	EMULSIONE A/O
FORMULA BASE	0,1865 ± 0,0048	0,0384 ± 0,0027	0,0510 ± 0,0026
Olio <i>H. coronarium</i>	0,3109 ± 0,0041	0,1909 ± 0,0059	0,2015 ± 0,0082
Olio <i>S. aspera</i>	0,3111 ± 0,0097	0,0760 ± 0,0038	0,0995 ± 0,0081
Olio <i>S. macrotepala</i>	2,2252 ± 0,0083	0,0793 ± 0,0069	0,1091 ± 0,0027

Tabella 20. Attività antiossidante delle formulazioni cosmetiche.

**C) 1.2 Valutazione dell'attività antimicrobica dell'olio essenziale de *Hedychium coronarium* inserito in una formulazione cosmetica: Challenge test.**

I risultati del Challenge test mostrano che il sistema conservante-olio essenziale è quello con cui, il criterio d'accettabilità è il migliore, a differenza delle formulazioni senza conservante o quella solo con il conservante noto (Tab. 21) (Tab. 22) (Tab. 23)

Risultati delle Analisi dopo i Tempi Prestabiliti e Calcolo della Corrispondente % di Riduzione										
Microorganismi	Inoculo T0	T 48 ore	% Riduzione	T 7gg	% Riduzione	T 14gg	% Riduzione	T 28gg	% Riduzione	Criterio accettabilità
<i>E. coli</i> ATCC 8739	2,80E+07	2,70E+07	3,57	3,50E+07	-25,00	3,70E+07	-32,14	6,60E+07	-135,71	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1,70E+07	1,70E+07	0,00	1,80E+07	-5,88	2,00E+07	-17,65	3,80E+07	-123,53	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2,50E+07	2,30E+07	8,00	2,30E+07	8,00	2,40E+07	4,0	2,90E+07	-16,00	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,60E+06	1,60E+06	0,00	1,70E+06	-6,25	1,70E+06	-6,25	2,00E+06	-25,00	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1,40E+06	1,40E+06	0,00	1,60E+06	-14,29	1,90E+06	-35,75	2,00E+06	-42,86	Non accettabile e non conforme EU PH

Tabella 21. Risultati Challenge Test: Emulsione O/A controllo positivo senza alcun conservante

Risultati delle Analisi dopo i Tempi Prestabiliti e Calcolo della Corrispondente % di Riduzione										
Micoorganismi	Inoculo T0	T 48 ore	% Riduzione	T 7gg	% Riduzione	T 14gg	% Riduzione	T 28gg	% Riduzione	Criterio accettabilità
<i>E. coli</i> ATCC 8739	2,90E+07	1,90E+05	99,34	4,20E+04	99,86	1,00E+04	99,97	9,00E+00	-135,71	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1,60E+07	4,20E+06	73,75	5,90E+05	96,31	6,70E+04	99,58	1,00E+03	-123,53	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	2,80E+07	1,30E+06	95,36	9,00E+00	100	9,00E+00	100,00	9,00E+00	-16,00	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,90E+06	2,30E+05	87,89	3,00E+03	99,84	2,00E+03	99,89	9,00E+00	-25,00	Non accettabile e non conforme EU PH
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1,60E+06	2,30E+05	85,63	9,00E+00	100,00	9,00E+00	100,00	9,00E+00	-42,86	Non accettabile e non conforme EU PH

Tabella 22. Risultati Challenge test: Emulsione O/A solo conservante noto

Risultati delle Analisi dopo i Tempi Prestabiliti e Calcolo della Corrispondente % di Riduzione										
Micoorganismi	Inoculo T0	T 48 ore	% Riduzione	T 7gg	% Riduzione	T 14gg	% Riduzione	T 28gg	% Riduzione	Criterio accettabilità
<i>E. coli</i> ATCC 8739	2,30E+07	2,80E+05	99,78	1,00E+03	99,99	9,00E+00	100	9,00E+00	100	accettabile e conforme EU PH
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1,80E+07	1,60E+06	91,11	2,00E+03	99,99	1,00E+03	99,99	9,00E+00	100	accettabile e conforme EU PH
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1,70E+06	1,20E+03	99,93	9,00E+00	99,99	9,00E+00	100,00	9,00E+00	100	accettabile e conforme EU PH
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,50E+06	1,70E+04	98,87	1,50E+03	99,90	1,00E+03	99,93	9,00E+00	100	accettabile e conforme EU PH
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1,30E+06	1,00E+03	99,99	9,00E+00	99,999	9,00E+00	100,00	9,00E+00	100	accettabile e conforme EU PH

Tabella 23. Risultati Challenge test: Emulsione O/A: conservante noto + olio essenziale

*Hedychium coronarium*

### Discussione alla sezione di caratterizzazione chimica e biologica

Le motivazioni che hanno mosso questo progetto di ricerca di dottorato sono legate da un lato alla continua e complessa evoluzione che il mercato salutistico richiede al prodotto naturale come viatico di benessere, dall'altro alla volontà di valorizzare l'uso di specie vegetali appartenenti ad un ecosistema come quello amazzonico, tanto vasto quanto ancora poco studiato come risorsa di fitocomplessi e principi attivi dalla ricca proiezione salutistica. I gruppi di ricerca che si sono coordinati attorno a queste motivazioni sono da tempo impegnati in progettualità condivise tra Università di Ferrara e Università Politecnica Salesiana di Quito con il fine di caratterizzare e valorizzare risorse botaniche amazzoniche individuandone potenzialità d'uso nel campo della farmacia e dei prodotti del benessere. L'Amazzonia è infatti considerata uno degli

habitat naturalistici più ricchi e complessi del mondo, costituendo una fonte di sostanze attive e di biodiversità di inestimabile valore e caratterizzandosi come uno degli *hot spot* biodiversi più interessanti oltre che senz'altro il più vasto in assoluto (Schultes, 1990).

La progettualità del presente lavoro di dottorato presenta però anche radici profonde in motivazioni più estese, che varcano il confine della conoscenza scientifica e della sua applicazione come finalità. Tali motivazioni sono legate alla volontà di inserire questo progetto in una filosofia di studio trasversale ovvero che tiene conto della proprietà intellettuale delle fonti e del loro sfruttamento sostenibile da parte delle popolazioni e delle etnie indigene dell'amazzonia. Questo aspetto di sostanziale caratterizzazione etica prima ancora che scientifica è un ulteriore elemento di arricchimento e di coagulo tra tutti i componenti dei gruppi di ricerca che si sono coordinati attorno a questo lavoro.

I gruppi di ricerca coagulati attorno a queste motivazioni e a questa architettura di ricerca di ordine generale, sono da tempo impegnati nello studio di miscele terpeniche ottenute da matrici vegetali di diversa provenienza, con particolare riferimento a piante amazzoniche in uso alle etnie Achuar e Shuar dell'oriente ecuadoriano. L'interesse è maturato nel tempo anche in ragione del forte impatto applicativo che tali estratti hanno rispetto a prodotti salutistici; si pensi ad esempio all'uso di oli essenziali in cosmesi, se non in prodotti di interesse fitoterapico. Sulla scia di questa impostazione e filone di ricerca si è pensato di dare seguito a questo interesse prendendo in considerazione piante amazzoniche dell'oriente ecuadoriano verificando le caratteristiche fitochimiche rispetto all'olio essenziale e valutando la bioattività (efficacia e sicurezza) dei fitocomplessi terpenici rispetto a modelli di indagine in vitro mirati ad aspetti funzionali con prevalente applicabilità cosmetica.

Il percorso di ricerca di dottorato descritto in questo contesto di tesi si struttura perciò nella esposizione e combinazione sinergica tra diverse strategie e tecniche di indagine chimica e biologica, al fine di investigare la fonte vegetale, i principi attivi, i potenziali effetti, con tecniche di valutazione bioguidata.

La caratterizzazione chimica e biologica di oli essenziali ottenuti da specie vegetali quali *Siparuna aspera*, *Siparuna macrotrepala* (Siparunaceae), *Piper leticianum*, *Piper augustum* (Piperaceae), *Hedygium coronarium* (Zingiberaceae), piante utilizzate a scopo medicinale dalle popolazioni indigene (etnia Shuar) che vivono nella foresta amazzonica del sud dell'Ecuador ha portato ad evidenze relativamente originali in quanto si tratta di specie poco studiate sotto questo profilo.

Si riportano di seguito alcune delle considerazioni estrapolabili tra quanto rilevato nella letteratura correlata e dai risultati emersi in questo lavoro di dottorato.

Il genere *Siparuna* delle Siparunaceae è relativamente poco studiato sotto il profilo etnobotanico ed officinale, tuttavia, dal momento che diverse specie fanno parte della tradizione etnomedica di diverse culture essendo alcune distribuite nelle fasce temperate calde del pianeta, è possibile risalire ad alcune interessanti notizie fitochimiche e di bioattività per alcune delle specie più rappresentative (Leitão et al., 1999).

*S. aspera* è una tra le specie meno studiate sotto il profilo fitochimico e funzionale. Gli unici rilevanti rilievi scientifici sotto il profilo officinale riguardano l'attività antiparassitaria (antimalarica ed antileishmaniosi) di estratti etanolici ottenuti da piante spontanee della flora amazzonica delle regioni dell'Ecuador e Perù (Valandeu et al., 2009; Luiza Cruz et al., 2013).

Per *S. macrotrepala*, invece, probabilmente perché più diffusa non solo nelle regioni amazzoniche ma anche in quelle temperate del globo e dunque senz'altro più utilizzata sotto il profilo etnomedico tra le specie del genere *Siparuna*, è stata senz'altro più investigata sotto il profilo fitochimico, anche se i lavori più significativi non risultano particolarmente recenti (El-Seedi et al., 1994).

I lavori più completi e significativi rispetto alle finalità per cui questo lavoro di tesi si caratterizza riguardano rilievi fitochimici che riportano sesquiterpeni ed alcaloidi dibenzochinolinici come composti caratterizzanti le specie investigate, composti ritenuti i maggiori responsabili della bioattività antiprotozoaria. Certamente il contenuto di questi composti caratterizzanti risulta particolarmente variabile in funzione della regione di raccolta (Leitão et al., 1999).

Rispetto alla qualità dell'attività biologica investigata non è dunque possibile fare confronti con quanto espresso in letteratura, mentre per quanto riguarda il profilo

fitochimico, la resa in olio essenziale ed il contenuto sesquiterpenico delle specie investigate è confrontabile con quanto videnziato per specie affini sud americane raccolte in regione amazzonica (Fischer et al., 2005)

Il genere *Piper* è certamente molto diffuso e ricco di specie di interesse etnomedico, differentemente espresso a seconda delle diverse culture. Nelle regioni sud americane, con particolare riferimento a quelle amazzoniche, specie appartenenti al genere *Piper* sono utilizzate per uso esterno nel trattamento di affezioni cutanee e con funzione cicatrizzante ed antisettica. Tale uso, sostanzialmente generalizzato tra le specie del genere *Piper*, è correlabile alla attività biologica della frazione terpenica, sostanzialmente caratterizzata da composti terpenici tra i quali i più diffusi ed abbondanti risultano essere  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -caryophyllene, limonene,  $\alpha$ -pinene e linalolo. Come accade in genere per tutte le specie vegetali ad oli essenziali (Rossi et al. 2011; Rossi et al., 2013), la quantità di tali composti risulta come atteso molto variabile in funzione della regione in cui la pianta cresce e viene raccolta. Questi aspetti sono emersi in modo sostanzialmente confrontabile con quanto merso per *Piper leticianum* e *Piper augustum*, entrambe specie particolarmente note dalla medicina tradizionale sud americana, con particolare riferimento a quella dell'Ecuador e del Perù per trattare prevalentemente affezioni cutanee e protozoosi (leismaniosi) (Valadeau et al., 2010; Nolan and Labe, 2008; Cicció 2005; Davis and Yost, 1983). Non sono stati rilevati in letteratura studi sulla bioattività di tali specie relativamente all'olio essenziale e a saggi riportati in questo elaborato.

*Hedychium coronarium* è forse tra le specie qui studiate quella maggiormente investigata sia sul piano fitochimico sia sul piano funzionale (Nakamura et al., 2008; Joy et al., 2007; Hisashi et al., 2002). Studi di caratterizzazione chimica dell'olio essenziale indicano come l'1,8-cineolo con concentrazioni variabili dal 41.42% al 37.44%, seguito dal  $\beta$ -pinene, presente in quantità variabili dal 10.39% al 17.4%, ed infine dall' $\alpha$ -terpineolo il cui contenuto è stato osservato essere variabile da 8.8% al 6.7%; oltre a questi, viene riportata la presenza, sebbene minoritaria, di diterpeni (edichilattoni) (Hisashi et al., 2002). L'attività biologica viene ascritta proprio a tali composti e diversi studi ne hanno attestato l'attività antimicrobica confrontabile con quanto da noi rilevato (Joy et al., 2007), mentre altri lavori interessanti riguardano attività correlabili con un uso digestivo dal momento che ne attestano proprietà epatoprotettive (Nakamura et al., 2008) e ad un uso esterno contro affezioni cutanee e

delle mucose correlabile ad una azione antinfiammatoria. Non sono rilevabili dati direttamente confrontabili con quanto espresso in letteratura anche se alcune attività antimicrobiche nonché antiossidanti possono essere riconducibili all'espressione antinfiammatoria ed antimicrobica attestata da lavori della letteratura correlata.

# CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha preso avvio dalla volontà del nostro gruppo di ricerca di continuare, in un ottica di re-investigazione delle soluzioni adottate nel corso della storia dell'uomo dalla Etnofarmacia, ad approfondire lo studio di oli essenziali. In particolare, in questo lavoro si sono investigate 5 piante aromatiche di origine amazzonica derivanti dall'erbario della Università Politecnica Salesiana di Quito. Un'analisi completa sulle specie vegetali inserite nel catalogo delle piante in via di

estinzione in Ecuador (Yanez et al 2011), ha messo in evidenza che nessuna di loro è in pericolo. In questa ottica le piante selezionate non rappresentano un problema per la conservazione della specie, anzi la loro valorizzazione rappresenta un'opportunità di sviluppo per le popolazioni locali.

La lavorazione dei campioni è stata condotta sul sito stesso di raccolta, in accordo con i principi di filiera corta e sostenibilità ambientale e sociale. In questo contesto, infatti, le piante selezionate sono ampiamente reperibili su tutta la Cordigliera e quindi il processo è facilmente riproducibile nelle diverse località, adatto ad un possibile sfruttamento sostenibile. Tra le specie vegetali investigate *S. aspera*, ha mostrato una ottima resa d'olio essenziale e quindi la più adatta ad un eventuale utilizzazione in un'economia di scala.

Abbiamo riscontrato in letteratura un'ampia disponibilità di informazione chimica sull'olio essenziale de *H. coronarium* mentre per tutti gli altri le informazioni sono scarse, per *Piper augustum* esiste un lavoro condotto in Costa Rica, o addirittura inesistenti. Questa rappresenta quindi per i rimanenti tre oli la prima indagine condotta sulla composizione chimica, questi risultati porteranno pertanto a più pubblicazioni scientifiche, in fase di stesura.

L'attività antiossidante è stata valutata attraverso test multipli che hanno portato a risultati diversi.

L'attività al DPPH test degli oli puri è risultata scarsa se si confronta con il riferimento naturale scelto (olio essenziale di *Thymus vulgaris*), *P. augustum* e *P. leticianum* hanno riportato il migliore risultato. *S. aspera* e *S. macrotepala* hanno un'attività più bassa.

L'ABTS test mostra un profilo diverso da quella del DPPH test, in quest'indagine *S. macrotepala* e *S. aspera* hanno attività più alta, mentre *H. coronarium* ha l'attività più bassa.

L'analisi PCL (ACL test) mostra un'attività antiossidante più alta per le due Piperaceae, mentre la più bassa è per *H. coronarium*. Come risultato comparativo, DPPH e PCL, hanno risultati concordanti, mentre l'ABTS test mostra risultati d'attività diversi e non correlabili.

Lo studio dell'attività antiossidante mediante la tecnica DPPH-HP-TLC, rivela una forte attività della frazione con  $R_f = 0,8$ , che corrisponde al germacrene D.

Per quanto attiene invece alla attività antimicrobica, l'olio essenziale di *H. coronarium* denota un'elevata attività, più alta degli altri oli e molto vicina a quella del controllo positivo (*Thimus Vulgaris*). In particolare, per *L. grayi* e *K. oitoca* l'attività è addirittura maggiore del controllo, mentre per *S. mutans* è uguale.

Un caso particolare si riscontra nella valutazione della MIC sul batterio *S. mutans*, dove tutti gli oli hanno una elevata attività, la maggiore è quella riscontrata nell'olio di *P. augustum* che supera quella del controllo positivo. Questo conferma le motivazioni alla base dell'uso tradizionale fatto dal popolo Shuar, presso il quale era in uso la masticazione delle foglie per curare carie dentali.

La valutazione HP-TLC della attività antimicrobica per l'olio di *H. coronarium*, ha rivelato che essa risiede in tre componenti dell'olio. Il 4-terpineolo, 1-8 cineolo, che è il composto più abbondante, ed una molecola ancora sconosciuta, ma di cui è stata identificata la natura diterpenica.

Al fine di valutare la potenziale citotossicità di questi oli essenziali, componente nota di molti prodotti naturali, è stato condotto un test su *Sacharomyces cerevisiae* D7 il quale ha dimostrato una citotossicità dell'olio di *H. coronarium* a concentrazioni vicine a 0,6 microl/plate. Non si è però riscontrata nessuna attività si può vedere che l'olio non è mutageno, e si è anzi osservata attività antimutagena a concentrazione tra 0, 2 e 0,5 microl/plate. Il Chromo test non ha riportato nessuna genotossicità.

Al fine di valutare la potenziale applicazione di questi oli essenziali si è esplorato lo sviluppo di formulazioni cosmetiche antiossidanti, utilizzando un olio della fam. Delle Siparunaceae, uno delle Piperaceae ed *H. coronarium*. I risultati della valutazione dell'attività antiossidante nelle formulazioni cosmetiche dimostra un aumento della attività inserendo concentrazioni dell'ordine dell'1% di olio nella formula, abbastanza elevata per un impiego diffuso.

Un risultato molto positivo di questa ricerca, relativamente alle formulazioni cosmetiche, è che l'impiego di miscele di conservanti tradizionali e olio di *H. coronarium*, garantisce la conservazione del prodotto per un lungo tempo consentendo il dimezzamento delle concentrazioni di conservante di sintesi. Questi risultati consentono di raccomandare l'uso di questo olio come conservante naturale nei prodotti cosmetici.

Come conclusione finale si può senz'altro affermare che la collaborazione tra le due università ha prodotto come risultato una sinergia molto utile, consentendo di investigare e contribuire a conservare l'elevata biodiversità dell'Ecuador attraverso l'esperienza nella ricerca dell'università Italiana. In particolare il gruppo di ricerca presso cui ho operato in Ecuador ed i gruppi di ricerca in Italia, hanno sviluppato sinergie di processo, integrazione ed ottimizzazione delle rispettive risorse con ricadute oltre che sull'ambiente formativo e di ricerca, anche sull'indotto produttivo a causa delle potenziali ricadute applicative degli oli investigati. Tali sinergie non mancheranno di portare frutti, oltre questo lavoro di tesi, in un prossimo futuro attraverso scambi e domande di finanziamento congiunto per sostenere la ricerca.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Adams RP, Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 2007.
- Arguello M. A. Introducción a la Flora y fauna del Ecuador; PROPAD Universidad Tecnológica Equinoccial, 1ª ed; 5,6,7 pp. Quito 2008.
- Aziz, M. A., Habib, M. R., Karim, M. R. Antibacterial and cytotoxic activities of *Hedychium coronarium* J. Koenig. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences; 5(6):969-972. 2009.
- Balick, M. J., M. H. Nee & D.E. Atha. Checklist of the vascular plants of Belize. Mem. New York Bot. Gard. 85: i-ix, 1-246. 2000.
- Beena J., Akhila R., Abraham, E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium*. Phytotherapy Research; 21(5):439-443. 29. 2007.
- Bortolomeazzi R., Berno P., Pizzale L., Conte L. Sesquiterpene, Alkene and Alkane Hydrocarbons in Virgin Olive Oils of Different Varieties and Geographical Origins. Journal Food and Feed Chemistry Vol 49: pp3278-3283. 2001.
- Brako, L. & J. L. Zarucchi. (eds.). Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 45: i-xl, 1-1286. 1993.
- Breedlove, D.E. Flora de Chiapas. Listados Floríst. México 4: i-v, 1-246. 1986.
- Bruni, A. Farmacognosia generale ed applicata. Piccin, 1999.
- Bruni R., Medici A., Andreotti E., Fantin C., Muzzoli M., Dehesa M., Romagnoli C., Sacchetti G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. Food Chemistry 85 415-421. 2004.
- Burger, W.C. 1971. Family 41. Piperaceae. 35: 5-218. In W.C. Burger (ed.) Fl. Costaricensis, Fieldiana, Bot. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Callejas, R. Piperaceae. En: Stevens, W.D., C. Ulloa, A. Pool & O.M. Montiel (eds.), Flora de Nicaragua. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 85(3): 1928-1984. 2001.
- Catizone, P., Marotti, M.; Toderi, G., Tétényi, P. Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche. Patron Editore, 1986.

- Ciccio J.F. Essential Oil from the Leaves of *Piper augustum* from “Alberto M. Brenes” Biological Preserve, Costa Rica. *Journal of Essential Oil Research* 2005, 17, 251-253. 2005.
- Cruz L., Spangenberg T., Lacerda M., Wells T. Malaria in South America: a drug discovery Perspective. *Malaria Journal*, 12: 168. 2013.
- D'Arcy, W.G. Flora of Panama. Checklist and Index. Part 1: The introduction and checklist. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 17: v–xxx, 1–328. 1987.
- Dhar P., Ayala U., Andarge E., Morissea S. Study of the Structural Changes on the Antimicrobial Activity of [3.1.1]-Bicyclics. *J. Essent. Oil Res.*, 16, 612-616. 2004.
- Dash, P. R., Mahmuda Nasrin Saha M. R. Evaluation of analgesic and neuropharmacological activities of methanolic rhizome extract of *Hedychium coronarium*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*; 2(4):979-984. 2011.
- Di Mambro V. M., Fonseca M. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 37, Issue 2, 23 February, Pages 287–295. 2005.
- Dixit, V. K., Varma, K. C. Anthelmintic properties of essential oils from rhizomes of *Hedychium coronarium* Koeing and *Hedychium spicatum* Koeing. *Indian Journal of Pharmacy*; 37(6):143-144. 1975.
- El-Seedi, H., Ghia, F., Torssell, K. B. G. Cadinane sesquiterpenes from *Siparuna macrotepala*. *Phytochemistry*; 35(6):1495-1497. 1994.
- Eguiguren M., Jiménez A. María Beatriz. Análisis del Conflicto Socio Ambiental "Rosa de Oro" Cantón San Juan Bosco, Morona Santiago. *Revista Jurídica Cognitio Juris | João Pessoa – ano i – número 3 – dezembro 2011* .
- Fabris, H. A. Amaryllidaceae, Zingiberaceae, Maranthaceae, Cannaceae. 4(1): 520–535. In A. L. Cabrera (ed.) *Fl. Prov. Buenos Aires*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires. 1968.
- Fish, F., Lampert, A. Halachmi, G. Riesenfeld and M. Herzberg.. The SOS chromotest Kit: A Rapid Method for the Detection of Genotoxicity. *Toxicity Assessment* 2: 137-147. 1987.
- Fischer D., Limberger R., Henriques A. & Moreno P. Essential oils from fruits and Leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from Southeastern Brazil. J.

- Essential Oil Res. 17(1):101-102. 2005.
- Flora of China Editorial Committee. Flora of China (Flagellariaceae through Marantaceae). 24: 1–431. In C. Y. Wu, P. H. Raven & D. Y. Hong (eds.) Fl. China. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis. 2000.
  - Forzza, R. C. Lista de espécies Flora do Brasil <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.
  - Funk, V. A., P. E. Berry, S. Alexander, T. H. Hollowell & C. L. Kelloff. Checklist of the Plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). Contr. U.S. Natl. Herb. 55: 1–584. 2007.
  - García-Mendoza, A. J. & J. Meave del Castillo. Diversidad Florística de Oaxaca: de Musgos a Angiospermas. 1–351. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. 2011.
  - Gibbs Russell, G. E., W. G. M. Welman, E. Retief, K. L. Immelman, G. Germishuizen, B. J. Pienaar, M. Van Wyk & A. Nicholas. List of species of southern African plants. Mem. Bot. Surv. S. Africa 2(1–2): 1–152(pt. 1), 1–270(pt. 2). 1987.
  - Guerrini A., Sacchetti G., Rossi D., Paganetto G., Muzzoli M., Andreotti E., Tognolini M., Maldonado M., Bruni R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environmental Toxicology and Pharmacology, Volume 27, Issue 1, January, Pages 39-48. 2009.
  - Guerrini A., Bruni R., Maietti S., Poli F., Rossi D., Paganetto G., Muzzoli M., Scalvenzi L., Sacchetti G.. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. Food Chemistry Volume 114, Issue 4, 15 June, Pages 1413-1420. 2009.
  - Haloci E. , Manfredini S., Papajani V., Bertuani S., Ziosi P. , Petre A., Chemical Characterization, Antibacterial Activity Assesment and Inclusion in Cyclodextrines of *Satureja Montana* L. Essential oils. European Journal of Pharmaceutical Sciences. (44) (1) 168-169 pp. 2011.

- Hokche, O., P. E. Berry & O. Huber. (eds.). Nuevo Catálogo de la Flora Vasculare de Venezuela. 1–860. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas. 2008.
- Idárraga-Piedrahita, A., Ortiz R. D. C., Callejas Posada R. & Merello M. Listado de las plantas vasculares del departamento de Antioquia. Fl. Antioquia: Cat. 2: 9–939. Universidad de Antioquia, Medellín.
- Itokawa, H., Morita, H., Katou, I., Takeya, K., Cavalheiro, A. J., Oliveira, R. C. B. de; Ishige, M.; Motidome, M. Cytotoxic diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. *Planta Medica*; 1988. 54(4):311-315. 1988.
- Jørgensen, P. M., M. H. Nee & S. G. Beck. (eds.). Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. USA* 2013.
- Jørgensen Peter M. y Leon Yanez S. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Missouri Botanical Garden Press. USA 1999.
- Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačićand B. & Simic D. Antigenotoxic Effect of Plant Extracts. *GENETIKA*, Vol. 39, No. 1,207 -226, 2007.
- Leitão G., Simas N., Soares S., De Brito A., Claros B., Brito T., Delle Monache F. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia* *Journal of Ethnopharmacology*, 65(2): 87–102. 1999.
- Lewin, G., Popov, I. “Photochemiluminescent detection of antiradical activity III: a simple assay of ascorbate in blood plasma”, *J Biochem Biophys Methods*, , 28, 277-282. 1994
- Macbride, J. F. *Monimiaceae, Flora of Peru*. *Publ. Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser.* 13(2/3): 784–819. 1938.
- Maas, P. J. M. & H. Maas van de Kamer. *Zingiberaceae*. En: *Manual de Plantas de Costa Rica*. Vol. 3. B.E. Hammel, M.H. Grayum, C. Herrera & N. Zamora (eds.). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 93: 846–856. 2003.
- Mares D., Andreotti E., Maldonado M., Pedrini P., Colalongo C., Romagnoli C. Three New Species of *Aspergillus* from Amazonian Forest Soil (Ecuador) . *Current microbiology*. Vol 57, Issue 3, Julio, Pages 222-229. 2009.
- Matsuda H., Morikawa T., Sakamoto Y., Toguchida I., Yoshikawa M. Antiinflammatory principles and three new labdane-type diterpenes, hedychilactones A, B, and C, from the rhizome of *Hedychium coronarium* Koeng. *Heterocycles*. 56(1-2): 45-50. 2002.

- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sciences* **84**, pp. 407–412. 1993.
- Mingfu W., Jiangang L., Meera R., Yu S., Edmond J., Tzou-Chi H. , and Chi-Tang H.. Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* 1998,46,4869–4873. 1998.
- Miranda M. & Cuellar A. 2001. *Farmacognosia y Productos Naturales*; La Habana 2001.
- Molina R. A. Enumeración de las plantas de Honduras. *Ceiba* 19(1): 1–118. 1975.
- Morales R., Tamayo M. y Martín C. Pueblos Indígenas, Recursos Naturales y Compañías Multinacionales: Hacia una Convivencia Responsable Estudio de Casos: Pueblo Mapuche Williche de Chiloé (Chile), Pueblo Shuar de la provincia de Zamora (Ecuador) y Comunidades Indígenas (Canadá). *Fundación Carolina No 40. Serie de Avances de Investigación.* 2010.
- Nakamura, S., Okazaki, Y., Ninomiya, K., Morikawa, T., Matsuda, H., Yoshikawa, M. Medicinal flowers. XXIV. Chemical structures and hepatoprotective effects of constituents from flowers of *Hedychium coronarium*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*; 56(12):1704-1709. 2008.
- Nolan L. & Labbe R. Future of Natural Products from Plants in the Struggle with Emerging Diseases: Case of Food-Borne Pathogens and Leishmaniasis *J. Herb, Spices and medicinal Plants.* 11(1,2): 161-190. 2008.
- Noriega P. Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. *La Granja.* Vol. 10(2). Pp 3-15. 2009.
- Om P., Rajput, M., Mahesh Kumar, Pant, A. K. Chemical composition and antibacterial activity of rhizome oils from *Hedychium coronarium* Koenig and *Hedychium spicatum* Buch-Ham. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*; 2010. 13(2):250-259. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium*. *Phytother. Res.* 21, 439-443. 2010.
- Parker III, T. A. & B. Bailey. A biological assessment of the Alto Madidi region and adjacent areas of Northwest Bolivia. *RAP Working Papers* 1: 1–108. 1991.

- Maia Campos P., Goncalves G. and Gaspar L. In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy of topical formulations containing vitamin C and its derivatives studied by non-invasive methods. *Skin Research and Technology* 2008; 14: 376–380. 2008.
- Patselt E. *Flora del Ecuador*. Imprefepp. 1ª ed. Quito. 16,17,190 pp. 2004
- Pelle, B. L'estrazione degli oli essenziali. *Erboristeria Domani* 1996, 9, 52-68.
- Perrier D.L.B , H. Zingiberacees. *Flore de Madagascar et des Comores*. 47: 1–32. 1946.
- Popov, I., Lewin, G. “Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants”, *J Biochem Biophys Methods*, , 31, 1-8. 1996.
- Popov, I., Lewin, G. “Oxidants and Antioxidants Part B – Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique”, *Methods in Enzymology*, 300, 437-456. 1999.
- Popov I., Lewin, G., Baehr, R. “Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase”, *Biomed Biochim Acta*, , 46, 775-779. 1987.
- Quillardet, Huisman, D’ari and Hofnung. SOS-CHROMOTEST, a direct assay for induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 5971-5975. 1982.
- Renner, S. S. & G. Hausner ; *Flora del Ecuador*; Harling & L. Andersson (eds.) University of Göteborg, Göteborg Siparunaceae. 59: 1–98. 1997.
- Renner, S. S. & G. Hausner.. *Siparunaceae*. *Fl. Neotrop.* 95: 1–247. 2005.
- Renner, S. S., H. Balslev & L.B. Holm-Nielsen. Flowering plants of Amazonian Ecuador–A checklist. *AAU Reports*. 24: 1–241. 1990.
- Renner, S. S. & G. Hausner. 49A. *Siparunaceae*. 59: 1–98, pl. 1–3. In G. W. Harling & L. Andersson (eds.) *Fl. Ecuador*. University of Göteborg, Göteborg. 1997.
- Renner, S. S. & G. Hausner. *Siparunaceae*. *Fl. Neotrop.* 95: 1–247. 2005.
- Rossi D., Guerrini A., Maietti S., Bruni R., Paganetto G., Poli F., Scalvenzi L., Radice M., Saro K., Sacchetti G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark

- essential oil: A new functional food ingredient?. *Food Chemistry* 126 837–848. 2011.
- Rossi D., Guerrini A., Paganetto G., Bernacchia G., Conforti F., Statti G., Maietti S, Poppi I., Tacchini M., Sacchetti G. “*Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food”. *Food Chemistry*. 139, 437-447. 2013.
  - Russell D. Challenge testing: principles and practice. *International Journal of Cosmetic Science*. Volume 25, Issue 3, pages 147–153, June 2003.
  - Report Challenge Test. Università degli studi di Ferrara, Dipartimento di medicina sperimentale e diagnostica, on line 12/05/2013.<http://www.orodispello.it/images/stories/pdf-product/challenge-test/Challenge%20Rassodante%20-%20Antismagliature%20-%20Bagno.pdf>. 2009.
  - Sacchetti G., Medici A., Maietti S., Radice M., Muzzoli M., Manfredini S., Braccioli E., Bruni R. Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils. *J. Agric. Food Chem*, 52 (11), pp 3486–3491. 2004.
  - Sacchetti G., Guerrini A., Noriega P., Bianchi A., Bruni R. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal* Volume 21, Issue 4, pages 674–676, July/August 2006.
  - Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91 621–632. 2005.
  - Sangeeta S., Ali, M. S., Achinto S., Bachar, S. C., Islam, M. S. Antiinflammatory and analgesic effects of *Hedychium coronarium* Koen. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*; 20(1):47-51. 2007.
  - Santos, B. C. B. dos; Barata, L. E. S.; Marques, F. A.; Baroni, A. C. M.; Karnos, B. A. C.; Oliveira, P. R. de; Palimecio Junior, G. G. Composition of leaf and

- rhizome essential oils of *Hedychium coronarium* Koen. from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*; 22(4):305-306. 2010.
- Scartezzini, P., F. Antognoni, M.A. Raggi, F. Poli, C. Sabbioni. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1-2), 113-118. 2006.
  - Schultes R. E. & Raffauf. *The Healing Forest*. Dudley T. R., General Editor, 1990.
  - Shahverdi, A. R., Abdolpour, F., Monsef-Esfahani, H. R., & Farsam, H. A. TLC bioautographic assay for detection of nitrofurantoin resistance reversal compounds. *Journal of Chromatography, B*, 850, 528–530. 2007.
  - Sharapin Nicolai; *Fundamento de Tecnología de Productos Fitoerapéuticos*; CITED, pp 101-107. 1999.
  - Simionatto, E., Bonani, V. F. L., Morel, A. F., Poppi, N. R., Raposo, J. L., Jr., Stuker, C. Z., et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18(5), 879–885. 2007.
  - Standley, P. C. & J. A. Steyermark. Zingiberaceae. In *Flora of Guatemala - Part III*. *Fieldiana, Bot.* 24(3): 191–203. 1952.
  - Suresh, G., Reddy, P. P., Babu, K. S., Shaik, T. B., Kalivendi, S. V. Two new cytotoxic labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 20(24):7544-7548. 2010.
  - Sushil J., Chanotiya, C. S., Garima A., Om P., Pant, A. K., Mathela, C. S. Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium* species. *Chemistry & Biodiversity*; 5(2):299-309. 2008.
  - Swenson, J. T., Nolan, L. L., Roth, J. L. Antileishmanial properties of Amazonian plant extracts. *Acta Horticulturae*; (426):201-209. 1996.
  - Trelease, W. & T. G. Yuncker. *The Piperaceae of northern South America*. 1–838. University of Illinois Press, Urbana. 1950.
  - Torre de la L. & Balslev H. *La diversidad cultural del Ecuador*; Herbario QCA & Herbario AAV. Quito & Aarhus, 39-52 pp. 2008.

- Valadeau C., Pabon, A., Deharo, E., Alban-Castillo, J., Estevez, Y., Lores Fransis, A., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D., Bourdy, G. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*; 123(3):413-422. 2009.
- Valadeau C., Alban Castillo J., Sauvain M., Lores A., Bourdy G. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 127(1): 175–192. 2010.
- Vertuani S., Beghelli E., Scalambra E., Malisardi G., Copetti S., Dal Toso R., Baldisseroto A., Manfredini S. Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidante, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. *Molecules* 16 (8) 7068-7080 pp. 2011.
- Wade D. E., Yost J. A. The ethnomedicine of the waorani of Amazonian Ecuador. *J. Ethnopharmacology*, 9(2,3): 273-297. 1983.
- Wagner H,S. *Bladt Plant Drug Analysis* ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2009
- Woodson. "Flora of Panama: Part iv, Piperaceae to Monimiaceae". Ed. Missouri Bot. Garden. 1950.
- Yanez S., Valencia R., Pitman N., Ulloa C., Navarrete H., *Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Segunda Edición. Publicaciones del Herbario QCA Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito 2011.*
- Yuncker, T. G. *Flora of Panama, Part IV. Fascicle 1. Piperaceae. Ann. Missouri Bot. Gard.* 37(1): 1–120. 1950.
- Zha-Jun Z., Yan-Tao W., Feng-Yung R., Gui-Wei-G.S. and Cheng-Rin L. Diterpenoids and Diarylheptanoid from *Hedychium coronarium* with Significant Anti-Angiogenic and Cytotoxic Activities. *Chemistry & Biodiversity* Volume 9, Issue 12, pages 2754-2760. December 2012.
- Zhao C., Gong Xiao J., Chen H., Yang Z., Zhou X. Analysis of volatile oil in *Hedychium coronarium* from Guizhou by SPME/GC/MS. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*; 2010. 25(7):1090-1092. 2010.



# **RINGRAZIAMENTO**

A María José, Paula y Sarita por la paciencia.

A los profesores Stefano Manfredini, Gianni Sacchetti, Alessandra Guerrini y Damiano Rossi, por el acompañamiento y disposición durante la investigación.

A los amigos del Departamento de SVeB, Silvia, Antonella, Massimo, Alessandro, Irene, por los buenos momentos.

A la Universidad Politécnica Salesiana por el apoyo para realizar el doctorado.

# **ARTICOLI ACCETTATE**

1. Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimppffii* Diels (limoncillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol 19 (2) 2014.
2. Chemical composition and bioactivity of five essential oils from the Ecuadorian Amazonian Forest. Acta Horticulturae No IMPNP2012.
3. Biological and chemo-diverse characterization of Amazonian (Ecuador) Citrus petitgrains

LABORATORIO CENTRAL DE FARMACOLOGIA  
REVISTA CUBANA DE PLANTAS MEDICINALES

Tel.: (53-7) 8776661 Ext. 1048  
Carvajal entre Agua Dulce y A, Cerro,  
E-mail: [revistaplant@infomed.sld.cu](mailto:revistaplant@infomed.sld.cu)  
La Habana, CP 12000, Cuba  
Sitio Web: [www.revplantasmedicinales.sld.cu](http://www.revplantasmedicinales.sld.cu)

La Habana, 14 febrero de 2014  
Año 56 de la Revolución.

#### ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO

Paco Noriega Rivera. Investigador del Centro de Investigación y  
Valoración de la  
Biodiversidad de la Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador. Av. 12 de  
Octubre y  
Wilson N2422 Quito-Ecuador. Email: [pnoriega@ups.edu.ec](mailto:pnoriega@ups.edu.ec)

Tenemos el gusto de informarle que su trabajo:

Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna*  
*schimpffii* Diels  
(limoncillo).

De los autores:

Paco Noriega Rivera, Alexandra Guerrini, Edwin Ankuash Tsamaraint.

Ha sido aceptado para publicación en volumen: 19 , número: 2 año 2014.

Saludos  
cordiales,



MSc. Ioanna Martínez Hormaza  
Directora  
Revista Cubana de Plantas Medicinales



Dra. Ana Ibis García Hernández  
Secretaria Comité Editorial  
Revista Cubana de Plantas Medicinales

**De:** Jalal Ghaemghami <[jalal@phytoessence.org](mailto:jalal@phytoessence.org)>

**Enviado:** martes, 4 de marzo de 2014 13:18

**Para:** Jalal Ghaemghami

**Asunto:** Fwd: Your Manuscripts [Reponse is requested before 06 March 2014]

Dear Colleagues:

I am pleased to share the following with you for the second time with all of you and request your response, please. Your prompt response will allow us to start printing enough copies of the publication and to manage its cost appropriately.

The next number of **Acta Horticulturae** that is the proceeding of IMPNP2012 symposium in Ecuador is ready for print. A copy of it will be available for you upon your request. **Please send your requests today** and include **your personal mailing address**. Only your personal mailing address will be used, there will not be any delivery to your institution or to your Post Office Box. All requests will be collected and I will respond to each request accordingly.

Best Regards,

**Jalal Ghaemghami**, PhD

International Society for **Phytocosmetic** Science

2014-03-11 18:34 GMT+01:00 Hartwig Schulz <[Hartwig.Schulz@jki.bund.de](mailto:Hartwig.Schulz@jki.bund.de)>:

Dear Alessandra Guerrini,

We have reached a decision regarding your submission to Journal of Applied Botany and Food Quality, "Biological and chemo-diverse characterization of Amazonian (Ecuador) Citrus petitgrains".

We decided that your manuscript needs to be revised before it becomes acceptable for publication in Journal of Applied Botany and Food Quality. Please read the reviewers' comments below carefully. Additional comments might be deposited in the OJS. Please log in and check.

When preparing the revised version, please highlight the changed passages in a bright colour (text highlighting, not 'track changes') to speed up the reevaluation by the reviewers.

Do not upload the changed manuscript as 'new submission'. Instead go to the 'review' page of your initial submission. At the bottom, you will find an upload field to enter your file into the system and a button to notify the

editor. If you want to send additional notes like answers to the reviewers requests, please attach them to the notification to the editor.

Best regards,

Hartwig Schulz

JKI, ÖPV

[Hartwig.Schulz@jki.bund.de](mailto:Hartwig.Schulz@jki.bund.de)

-----