



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE FARMACEUTICHE"

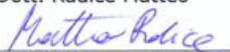
CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Manfredini Stefano

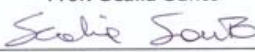
**Studi di attività biologica e applicazione cosmeceutica di derivati
di specie della zona sud orientale amazzonica ecuadoriana**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

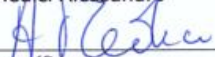
Dottorando
Dott. Radice Matteo


(firma)

Tutore
Prof. Scalia Santo


(firma)

Cotutore
Prof. Medici Alessandro


(firma)

Anni 2007/2010



Your E-Mail Address

matteoradice@hotmail.com

Subject

Dichiarazione di conformita'

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Radice Matteo

nato a

Novara

Provincia

NO

il giorno

28 luglio 1972

avendo frequentato il corso di Dottorato di Ricerca in:

SCIENZE FARMACEUTICHE

Ciclo di Dottorato

XXII

Titolo della tesi in Italiano

Studi di attivita' biologica e applicazione cosmeceutica di derivati di specie della zona sud orientale amazzonica ecuadoriana

Titolo della tesi in Inglese

Biological activity and cosmeccutical application of derivatives of species from the south eastern Ecuadorian Amazon

Titolo della tesi in altra Lingua Straniera

Tutore - Prof:

Scalia Santo

Settore Scientifico Disciplinare (SSD)

CHIM/08

Parole chiave (max 10)

cosmeceutica, attivita' biologica, amazzonia, valorizzazione biodiversita', estrazione oli vegetali

Consapevole - Dichiaro

CONSAPEVOLE --- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; -- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; -- 3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 4 copie di cui una in formato cartaceo e tre in formato .pdf, non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito : <http://www.unife.it/dottorati/dottorati.htm> alla voce ESAME FINALE - disposizioni e modulistica; -- 4) del fatto che l'Università sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali

Centrali di Roma e Firenze. --- DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITA' --- 1) che la copia della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo, è del tutto identica a quelle presentate in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrò in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; -- 2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie; -- 3) che il contenuto e l'organizzazione della tesi è opera originale da me realizzata e non compromette in alcun modo i diritti di terzi, ivi compresi quelli relativi alla sicurezza dei dati personali; che pertanto l'Università è in ogni caso esente da responsabilità di qualsivoglia natura civile, amministrativa o penale e sarà da me tenuta indenne da qualsiasi richiesta o rivendicazione da parte di terzi; -- 4) che la tesi di dottorato non è il risultato di attività rientranti nella normativa sulla proprietà industriale, non è stata prodotta nell'ambito di progetti finanziati da soggetti pubblici o privati con vincoli alla divulgazione dei risultati, non è oggetto di eventuali registrazioni di tipo brevettale o di tutela. --- PER ACCETTAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO

Firma Dottorando

Ferrara, lì 1 febbraio 2011 Firma del Dottorando

Matteo Rosello

Firma Tutore

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore

Sandra SoenB

A Manuel, alla sua famiglia ed alla nostra amicizia

INDICE

1. OBIETTIVI E STRATEGIA_____	1
2. 1INTRODUZIONE_____	4
3. MATERIALI E METODI_____	20
4. RISULTATI_____	52
5. CONCLUSIONI_____	85
6. NOTA FINALE_____	93
7. BIBLIOGRAFIA_____	95

1 OBIETTIVI E STRATEGIA

La finalità del presente lavoro di dottorato è stata quella di individuare ed isolare, da specie botaniche amazzoniche d'interesse etnocosmetico, oli vegetali o altri fitocomplessi valutandone la composizione, i metodi alternativi di estrazione e le funzionalità cosmetiche. L'intero progetto troverà poi espressione nella realizzazione di una linea di prototipi cosmetici di cui verrà studiata la stabilità microbiologica e chimico-fisica. In particolare, alcuni prototipi verranno formulati secondo le direttive della cosmesi biologica e naturale (disciplinare ECOCERT).

Per la realizzazione degli obiettivi è stata adottata la strategia descritta di seguito:

- 1) individuazione delle fonti botaniche da valutare per la presenza delle materie prime di interesse cosmetico;
- 2) selezione ed estrazione di oli vegetali caratteristici della zona sud orientale dell'Ecuador;
- 3) caratterizzazione della composizione chimica degli oli selezionati;
- 4) sviluppo di alcuni prototipi formulativi cosmetici a partire da olio di *Oenocarpus bataua*;
- 5) realizzazione di alcuni test di attività biologica di interesse cosmetico.

L'individuazione delle fonti vegetali amazzoniche da investigare si è concretizzata ricorrendo a metodi etnofarmacobotanici classici e facendo leva sulla consolidata rete di eventi di tipo esperienziale, produttivo ed investigativo presente nella regione amazzonica dell'oriente ecuadoriano.

Successivamente la ricerca si è focalizzata sui seguenti percorsi:

- 1) sperimentazione di metodi estrattivi alternativi e da applicare in aree rurali;
- 2) realizzazione di prototipi cosmetici certificabili ECOCERT .

Si è deciso quindi di concentrare l'attenzione su di una specie, l'*Oenocarpus bataua*, ed in modo più specifico sull'olio ottenuto dal dattero e sui possibili usi cosmetici.

Nella parte conclusiva del progetto si sono affrontati i seguenti aspetti:

- 1) analisi gas-cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa dell'insaponificabile dell'olio di ungurahua;
- 2) studi di purificazione dell'olio mediante estrazione con fluidi supercritici;
- 3) stabilità chimico fisica e microbiologica dei prototipi formulativi ECOCERT.

Completata l'analisi GC - MS dei vari componenti dell'olio si è potuto affinare il lavoro di caratterizzazione chimica ed affiancarlo alle prove di funzionalità cosmetica ed alla realizzazione dei prototipi "bio". La realizzazione di prodotti cosmetici a partire dall'olio di ungurahua rappresenta un elemento di elevata rilevanza scientifica per le controparti latino americane in quanto apre opportunità di sviluppo applicativo basate su di una risorsa naturale locale.

Le suddette fasi della ricerca hanno trovato evoluzione e concretezza nel tempo attraverso rapporti cooperativi che coinvolgono istanze di ricerca di cui fanno parte le Università di Ferrara e l'Università Politecnica Salesiana con il "Centro de Investigación y Valorización de la Biodiversidad" (CiVaBi, Quito, Ecuador), e realtà produttive (Fundación Chankuap, Macas, Ecuador), con il supporto esperienziale della ONG italiana VIS (Volontariato Internazionale per lo Sviluppo).

2 INTRODUZIONE

CONTESTO DEL LAVORO: RICERCA, APPLICAZIONE E COOPERAZIONE ALLO SVILUPPO

Il presente lavoro di dottorato è volto alla valorizzazione scientifica di materie prime provenienti dalla regione sud-orientale del settore amazzonico ecuadoriano. Il lavoro è stato svolto a partire dall'anno 2007 e parte delle attività sono state eseguite presso i laboratori del CiVaBi (Centro de Investigacion y Valoracion de la Biodiversidad) dell'Università Politecnica Salesiana, rispettivamente ubicati presso la città di Macas (Regione Morona Santiago) e di Quito (Regione Pichincha). Va ricordato che il progetto scientifico è stato pensato all'interno della collaborazione tra il "Centro di Ateneo per la Cooperazione Internazionale" dell'Università di Ferrara, l'Università Politecnica Salesiana, la ONG italiana VIS¹ (Volontariato Internazionale per lo Sviluppo) e la ONG locale Fundación Chankuap. Gli attori citati, a partire dal 1998, hanno promosso una serie di progetti di sviluppo volti alla valorizzazione e tutela della biodiversità amazzonica ecuadoriana e delle popolazioni locali, con particolare attenzione allo sviluppo delle condizioni socio-economiche di alcune comunità Shuar e Achuar.

Si può quindi affermare che il presente lavoro di dottorato rappresenta una modalità sperimentale di collaborazione tra realtà accademiche, ONG e comunità locali; va inoltre valutato che il progetto scientifico è nato all'interno di un contesto di cooperazione allo sviluppo e, quindi, la strategia e le scelte investigative sono volte ad una valorizzazione applicativa delle risorse naturali. Per tale motivo, oltre che per le condizioni rurali dove si è svolta una parte del lavoro, le attività di ricerca sono state indirizzate alla finalità di sviluppare prodotti e filiere produttive in grado di creare un impatto socio economico sostenibile presso la comunità locale.

Una prima indagine etnocosmetica permette di affermare che il contesto della foresta pluviale amazzonica ecuadoriana è noto per la sua elevata biodiversità ed è prodigo di specie di elevato interesse cosmetico (Sacchetti *et al.*, 2004).

Dopo una prima revisione bibliografica ed etnobotanica delle specie proposte nel piano di lavoro, si è deciso di optare per quelle che potessero fornire "oli vegetali fissi", la cui applicazione cosmeceutica è tecnicamente più immediata e per i quali era più semplice reperire in loco la strumentazione adeguata allo studio analitico ed

¹ www.volint.it

allo sviluppo di prototipi formulativi. Inoltre, le specie soggette a studio sono parte della etnocosmesi delle popolazioni indigene locali.

La selezione della matrice vegetale è stata facilitata dall'osservazione delle abitudini locali e dalle pratiche, appunto, di etnocosmesi. Si è deciso quindi di approfondire e valorizzare gli studi relativi ad un olio locale, chiamato "olio di ungurahua", che viene ottenuto dall'estrazione dei datteri maturi della specie *Oenocarpus bataua* (Fam. *Arecaceae*), conosciuta appunto con il nome di ungurahua.

Identificata quindi una specie amazzonica di chiaro interesse etnocosmetico, sono state previste le seguenti fasi di lavoro:

1. Studio di metodiche estrattive alternative al metodo tradizionale e compatibili con i disciplinari di ecobiocosmesi;
2. Studio di specifiche funzionalità cosmeceutiche dell'olio di *Oenocarpus bataua*;
3. Formulazione di prototipi ad uso cosmeceutico.

In Ecuador, l'uso tradizionale di questo prodotto è conosciuto principalmente dalle etnie Shuar e Achuar, viene utilizzato prevalentemente per la protezione e cura del capello e della cute, nella sua applicazione come olio per i capelli ed emolliente per il corpo. Differenti derivati del dattero, anch'essi a base di olio, sono utilizzati come alimento presso altre popolazioni (Balick *et al.*, 2004)

Non esiste molta letteratura scientifica relativa alla specie in studio, soprattutto dal punto di vista cosmetico non vi sono particolari studi applicativi e questo ha indotto ad approfondire le potenzialità funzionali dell'olio di ungurahua.

Il valore del sapere tradizionale: la etnocosmesi

Il contesto geografico e culturale dove si è svolto il lavoro porta naturalmente all'approfondimento del concetto di etnocosmesi, che in questo caso abbraccia la sua definizione più ortodossa e vicina quindi ai più comuni concetti di etnobotanica, etnomedicina ed etnofarmacologia (Bruni, 2003). Si intende per etnocosmesi una scienza interdisciplinare e transdisciplinare che si occupa dell'uso e della percezione del cosmetico all'interno di un determinato gruppo umano, una scienza intermedia tra la cosmetologia e l'antropologia culturale. L'antropologia culturale ha dedicato

particolari attenzioni alle culture amazzoniche ed al loro rapporto con la natura, quindi con le specie vegetali e, non ultima, la cosmesi naturale. Oggi si tende ad avvicinare alla suddetta definizione anche un'idea più ampia ed attuale, con l'etnocosmesi moderna si identifica la scienza che studia le caratteristiche tecnologiche, formulative e di marketing di prodotti destinati a diversi gruppi etnici, caratterizzati ognuno non solo per differenti caratteristiche cutanee bensì anche per un diverso concetto di bellezza e cura del corpo (Kumar *et al.*, 2009).

Non sfugge a questo concetto la cosmesi definita “funzionale”; infatti possiamo chiaramente intendere che anche i prodotti rivolti al trattamento di inestetismi e lievi disfunzioni cutanee vengono oggi formulati sulla base delle caratteristiche cutanee e genetiche dei diversi soggetti (Proserpio, 2002).

Tornando alla definizione primaria, esattamente come avviene per l'etnomedicina, possiamo affermare che i territori ad elevata biodiversità, tanto biologica quanto culturale, si rivelano vere miniere di saperi e conoscenze ancestrali, risultando un bacino di raccolta fondamentale per il ricercatore cosmetologo. Il contesto amazzonico ecuadoriano rappresenta quindi un territorio “eletto” in tal senso e, avendo cura di rispettare i diritti di proprietà intellettuale delle controparti locali, si possono effettuare delle attività di ricerca di rilevante interesse cosmetico (Estella, 2001). La componente di collaborazione con le controparti locali, prima fra tutte la Fondazione Chankuap, ha permesso un'immediata ricaduta applicativa di tali studi e la conseguente generazione di filiere produttive in campo cosmetico. Si verifica quindi un connubio virtuoso tra ricerca di base ed applicata che permette di dare risposte immediate alle necessità di sviluppo economico locali, sperimentando inoltre modelli produttivi sostenibili ed autogestiti, come dev'essere nell'ottica della cooperazione allo sviluppo (Tiezzi, 1999).

Ciò è quanto avvenuto durante il presente lavoro di dottorato in quanto l'approfondimento delle tematiche di carattere cosmetologico ha permesso, già nel primo anno di studio, la creazione di una linea cosmetica pensata come filiera produttiva solidale e sostenibile. La linea cosmetica creata è di proprietà della controparte locale, la Fondazione Chankuap, e rappresenta una fonte di economia monetaria per questa ONG locale e per i beneficiari della filiera.

Usi sostenibili e percorsi di valorizzazione della biodiversità

Oenocarpus bataua rappresenta ovviamente una risorsa che la biodiversità amazzonica offre alle popolazioni locali. La trasformazione, l'uso e la commercializzazione dei suoi derivati fanno già parte delle tradizioni di molte etnie locali, in special modo l'etnia Shuar e Achuar. Va però considerato che la sostenibilità dell'intera filiera vede oggi l'affacciarsi di mercati nuovi, più ampi ed aggressivi del tradizionale baratto tra comunità locali. Le stesse popolazioni indigene quindi sono attratte dai proventi della vendita dell'olio che, sul mercato locale ecuadoriano, viene acquistato a 7 – 10 USD/litro². La Fondazione Chankuap ha avviato da alcuni anni programmi di ripopolamento e monitoraggio della specie, nonostante questo, la sostenibilità della filiera presenta ancora forti criticità come la raccolta indiscriminata e l'abbattimento della palma.

In precedenza, i clan Shuar e Achuar vivevano come molte comunità di cacciatori-raccoglitori ed avevano abitudini seminomadi, quindi abitavano un territorio 10 – 15 anni, abbandonandolo poi quando le risorse erano diminuite. La zona recuperava comunque molto rapidamente le caratteristiche di foresta primaria e le specie soggette a caccia o raccolta si sviluppavano nuovamente. Negli ultimi 40 – 50 anni le comunità sono progressivamente diventate stanziali a causa del contatto con missionari e “coloni”, questi ultimi, come per molte zone amazzoniche, rappresentano i principali antagonisti per il possesso della terra e sono portatori di modelli agricoli intensivi causa di deforestazione. Anche se il territorio Shuar e Achuar non è ancora raggiungibile via terra, ed è rappresentato quindi da isole di relativa antropizzazione all'interno della stessa, il cambiamento culturale e la creazione di piccole piste di atterraggio ha accelerato il passaggio dalle abitudini dei cacciatori-raccoglitori a quelle agricole, creando di fatto comunità stanziali che crescono rapidamente. Si è prodotto quindi un progressivo sfruttamento delle risorse vegetali ed animali in prossimità degli insediamenti, fenomeno che ha coinvolto anche l'ungurahua e che ha reso sempre più difficoltoso il suo utilizzo (Descola, 1996).

Come precedentemente accennato, il metodo tradizionale di raccolta dell'ungurahua prevede l'abbattimento della palma. Nella tradizione Shuar e Achuar il frutto viene raccolto per l'estrazione dell'olio, il tronco viene usato per le costruzioni ed inoltre

² Fonte: Fundación Chankuap, www.chankuap.org – Macas (Ecuador)

ospita larve di coleotteri (*Rhyncophorus palmarus*) che fanno parte della dieta delle comunità indigene. Per diminuire l'impatto ambientale sulla specie in studio si è deciso di sperimentare un metodo di raccolta alternativo che prevede di non sacrificare la palma. Il sistema è denominato "bicicletta" e consiste in un insieme di attrezzature che permettono di arrampicarsi sulla palma in sicurezza, tagliare l'infruttescenza e scendere. L'attrezzatura non prevede punte o ramponi e quindi non danneggia la corteccia della palma. Il metodo alternativo è stato introdotto nel gennaio 2006 in collaborazione con alcuni tecnici italiani specializzati e sono stati formati 20 promotori Achuar. Ad oggi sono in uso due biciclette presso il territorio Achuar ma il processo incontra ancora difficoltà di tipo logistico e culturale. Si rende necessario attuare parallelamente un accurato piano di gestione della risorsa basato anche sulla riforestazione.

Scalata della palma mediante l'uso della "bicicletta"



Cosmesi tradizionale e cosmesi certificata biologica

La sostenibilità della filiera dell'olio di unguahua passa quindi per una precisa valorizzazione del prodotto. Alla luce delle informazioni etnobotaniche e della complessità del contesto si è deciso di approfondire l'utilizzo cosmetico dell'olio. Va detto che le quantità prodotte dalle comunità Achuar presso le comunità di Yutsunsa e Makusar, gli attuali fornitori della Fondazione Chankuap, sono estremamente variabili e comunque di piccola entità; non superano infatti poche centinaia di litri all'anno. Si è quindi valutato che la valorizzazione in campo cosmetico fosse possibile grazie al fatto che non richiede gli importanti investimenti del settore farmaceutico ed i volumi elevati di quello alimentare. La strategia adottata con la controparte locale segue quindi quella, tutta mediterranea, della valorizzazione dell'olio di oliva in cosmesi, arrivando quindi alla creazione di differenti prototipi formulativi che possano dare valore aggiunto al prodotto.

Alle considerazioni legate al territorio vanno poi aggiunte delle riflessioni più ampie relative alle tendenze del settore cosmetico. Ormai da tempo la Fitocosmesi sembra aver soppiantato le altre tendenze formulative legate ai derivati di sintesi, a quelli petrolchimici e siliconici (Bruni, 1999). Il mercato offre ancora un ventaglio decisamente ampio di prodotti ma è ormai diffusa profondamente la relazione diretta tra cosmesi e prodotto di origine vegetale. Si può aggiungere anzi che il moderno concetto di prodotto cosmetico ha mutuato dall'ambito alimentare la tendenza del prodotto "Biologico". Quest'ultimo approccio si spiega con la sempre maggiore diffidenza dell'opinione pubblica nel prodotto di sintesi ma anche verso il prodotto naturale coltivato secondo i criteri dell'agricoltura intensiva. La nuova percezione di qualità si è spostata verso il prodotto di nicchia, coltivato o raccolto secondo criteri biologici, quindi in assenza di trattamenti fitoiatrici tradizionali o concimazioni con prodotti di sintesi. A questo si aggiunge una sempre maggiore pressione mediatica da parte di blogger³ e riviste sulla presunta o parzialmente vera tossicità di alcune classi di ingredienti, tra i più additati restano alcune classi di conservanti (parabeni) e tensioattivi (SLES), i derivati siliconici, i profumi e coloranti di sintesi, i composti etossilati ed i derivati petrolchimici.

Mentre la "rivoluzione bio" investiva il mondo cosmetico, la cosmesi tradizionale aveva già subito importanti mutazioni dovute all'impatto della BSE e del sempre più

³ <http://www.biodizionario.it/>

pressante messaggio di abolizione dei test su animali e delle materie prime di origine animale.

Anche la relativamente recente Direttiva 2003/15/CE, che inserisce misure cautelative nei confronti di alcuni allergeni di origine vegetale, non ha scalfito la rivoluzione verde del concetto di cosmesi.

Negli ultimi anni si sono aggiunti altri concetti relativi al prodotto cosmetico che poco hanno a che fare con gli aspetti tecnico-scientifici ma che costringono produttori e formulatori ad assecondare le richieste dei consumatori, tra questi citiamo la preferenza verso il “piccolo produttore” rispetto alla grande distribuzione, anch’essa mutuata dal mondo biologico, l’idea del “Km 0”, che traduce il concetto di una minore distanza tra produttore e consumatore per abbattere le emissioni di CO₂, la ridefinizione di un packaging contenuto e composto da materiali riciclabili, il rifiuto degli OGM.

Infine, la crescente coscienza ecologica si è spostata dai prodotti ai processi e le ultime tendenze di alcuni settori di consumatori, come per esempio i membri dei GAS (*Gruppi di Acquisto Solidale*), per i quali sulla scelta del cosmetico influisce anche l’impronta ecologica del sito produttivo e l’utilizzo di energie rinnovabili per sostenere il processo produttivo (Rete Nazionale G.A.S., 2010).

La più recente indicazione in tema di cosmesi biologica è oggi rappresentata dagli standard COSMOS (*Cosmetic Organic and Natural Standard*) per la cosmesi biologica e naturale. COSMOS nasce dall’armonizzazione delle linee guida dei seguenti certificatori europei: BDIH⁴ (Germania), BIOFORUM (Belgio), COSMEBIO & ECOCERT (Francia), ICEA⁵ (Italia), SOIL ASSOCIATION (UK).

Va ricordato che gli Standard COSMOS non sono ancora riconosciuti come ufficiali dalla Comunità Europea e non si può omettere che, soprattutto nel web, la comunicazione relativa a liste di ingredienti “buoni” o “cattivi” è frutto di interpretazioni personali ed arbitrarie, che danno al consumatore informazioni spesso contrastanti e che impoveriscono il ventaglio di scelta del formulatore. Il presente lavoro vuole essere un tentativo, non dogmatico, di far convivere le necessità di sviluppo tecnologico e scientifico di una realtà amazzonica, le richieste dei

⁴ “Bundesverband Deutscher Industrie- und Handelsunternehmen für Arzneimittel, Reformwaren, Nahrungsergänzungsmittel und Körperpflegemittel” (Federal association of German industry and trading companies for pharmaceuticals, health food, food supplements and personal care)

⁵ “Istituto per la certificazione Etica e Ambientale”

consumatori più esigenti in tema di cosmesi solidale ed il necessario impegno scientifico per lo sviluppo di una filiera produttiva.

Una descrizione esaustiva dei suddetti standard e della loro variazione negli anni esula dal presente lavoro di dottorato, si possono comunque descrivere brevemente alcuni principi guida che accomunano tutte le linee di cosmesi biologica o naturale:



- Gli standard COSMOS privilegiano e promuovono l'utilizzo di materie prime da produzione biologica;
- Sono favorite tutte quelle filiere che puntano alla conservazione della diversità biologica;
- I prodotti, i processi ed i materiali devono rispondere a criteri di sostenibilità sociale ed ambientale;
- Si deve porre particolare attenzione alla tutela della salute umana, integrando le filiere produttive ai criteri della "Green Chemistry";
- Vengono descritte dettagliatamente le quantità di materie prime di origine naturale e/o biologica che devono essere utilizzate per ottenere la certificazione;
- Esistono elenchi di materie prime vietate o limitate ed altri di materie prime permesse;
- Esistono elenchi di processi e reazioni di sintesi vietate o permesse per la produzione degli ingredienti;
- Esistono metodi estrattivi vietati e permessi per l'isolamento dei fitocomplessi a partire dalle matrici vegetali;
- Esistono normative ed indicazioni relative al tipo di packaging permesso, ai test su animali;
- Esistono linee guida relative all'ispezione, certificazione e controllo, cioè alle tappe necessarie per ottenere e mantenere la certificazione (COSMOS, 2009).

Prendendo atto dell'evoluzione del concetto di cosmetico, il formulatore si trova quindi a dover progettare il proprio lavoro secondo nuovi paradigmi, unendo la competenza scientifica a concetti di sostenibilità ambientale vincolanti per le materie prime "bio".

Le formulazioni "biologiche" o "naturali" sviluppate nel presente lavoro sono state ottenute seguendo le normative ECOCERT. La scelta è caduta su questo disciplinare perché l'ente certificatore è presente anche in Ecuador e quindi la controparte locale

avrà modo di ottenere per le formule sviluppate un'adeguata assistenza per la certificazione.

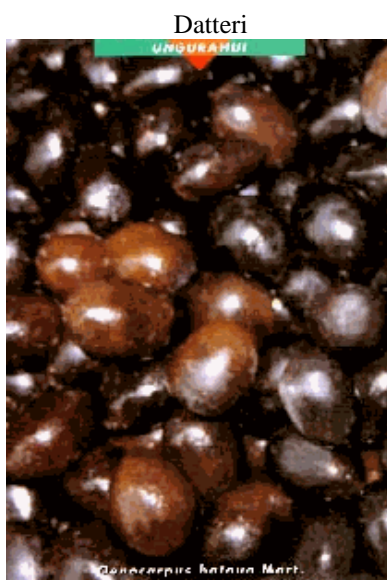
Le linee guida Ecocert possono essere riassunte in modo esaustivo dalle schede qui riprodotte e riportate dalla stessa web page dell'organismo⁶. Una più dettagliata descrizione degli standard ECOCERT è disponibile presso la stessa pagina web.

COSMETICO BIOLOGICO

<p>Per essere certificato “Biologico” un cosmetico dovrà possedere i seguenti requisiti formulativi:</p> <ul style="list-style-type: none">• Gli ingredienti naturali e/o di origine naturale devono costituire non meno del 95% in peso sul totale della formula;• Gli additivi di sintesi, non devono superare il 5% in peso e sono utilizzabili solo quelli elencati nel disciplinare;• Almeno il 95 % (in peso) di ingredienti sul totale degli ingredienti vegetali deve provenire da produzioni biologiche conformi al Reg. CE 834/2007 (sostituisce Reg. CE 2092/91);• Il quantitativo in peso della quota di ingredienti provenienti da coltivazioni biologiche conformi a Reg. CE 834/2007 non deve essere inferiore al 10% sul totale degli ingredienti.
COSMETICO NATURALE

<p>Per essere certificato “Naturale” un cosmetico dovrà possedere i seguenti requisiti formulativi:</p> <ul style="list-style-type: none">• Gli ingredienti naturali e/o di origine naturale devono costituire non meno del 95% in peso sul totale della formula;• Gli additivi di sintesi, non devono superare il 5% in peso e sono utilizzabili solo quelli elencati nel disciplinare;• Almeno il 70 % (in peso) di ingredienti sul totale degli ingredienti vegetali deve provenire da coltivazioni biologiche conformi al Reg. CE 834/2007;• Il quantitativo in peso della quota di ingredienti provenienti da coltivazioni biologiche conformi a Reg. CE 834/2007 non deve essere inferiore al 5% sul totale degli ingredienti.

⁶ www.ecocertitalia.it e www.ecosmetica.it

Oenocarpus bataua, scheda etnobotanica

Divisione	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Monocotyledonae</i>
Famiglia	<i>Areaceae</i>
Genere	<i>Oenocarpus</i>
Specie	<i>O. bataua</i>
Sinonimi	<i>Jessenia bataua</i> (Mart.) Burret <i>Oenocarpus oligocarpa</i>
Nome comune	Ungurahua, seje, milpesos, patabá
Nome comune Achuar	kunkuk



Descrizione botanica

L'ungurahua è una specie originaria della foresta pluviale amazzonica, è presente in diversi paesi tra i quali Ecuador, Colombia, Perù, Brasile, Panamá, Venezuela (Balick, 1988; Henderson, 1995).

Molto comune delle zone tropicali dell'oriente ecuadoriano, può raggiungere anche altezze di 20 – 30 m con un diametro (diametro del fusto a petto d'uomo) di ca 20 - 30 cm. I datteri sono grandi circa 3 - 5 cm e dalla caratteristica forma di oliva, il mesocarpo è molto sottile e duro e poggia su uno strato fibroso che avvolge il seme. I datteri sono raccolti in infruttescenze curve a forma di coda di cavallo della lunghezza

di approssimativamente 1 m. Per quanto si conosce la pianta fruttifica ogni 2 anni, con produzione di datteri intorno ai 700kg/ha (Miller, 2002).

Le foglie sono pinnate, erette o estese e raggiungono anche 11 m di lunghezza. Contiene da 65 a 110 pinne per foglia, distribuite regolarmente e su un solo piano. Il sistema radicale è superficiale e ben sviluppato, le radici avventizie si sviluppano lateralmente per una distanza di 6 – 7 m (Borgtoft, 1993).

Si riportano di seguito altre immagini della specie in esame ed il contesto ecologico-culturale in cui è inserita.

Pianta adulta di *O. batauta*



Infruttescenza acerba di *O. bataua*



Tipica casa Achuar





Fotografie tratte dal testo: "Estracción de aceite de kunkuk', shimpi y shaké (*Oenocarpus* sp) en el territorio Achuar – Amazonía Ecuatoriana" – Fundación Consultora Don Bosco – Informe final.

L'identificazione tassonomica della fonte vegetale é avvenuta presso l'Erbario Nazionale dell'Ecuador, presso la capitale Quito, e svolta sotto la supervisione del Prof. Marco Cerna, esperto di Botanica tropicale dell'Università Politecnica Salesiana (UPS). Le metodiche adottate erano quelle classiche valutando, per confronto con campioni autentici le parti botaniche isolate per lo scopo. Un campione della pianta è stato conservato come essiccato presso il "Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CiVaBi)" della UPS di Quito.

Distribuzione

La specie è presente in tutta la zona nord del continente Sudamericano ed in particolare Ecuador, Colombia, Perù, Venezuela, Brasile e nei territori di Panama e Trinidad. In Ecuador è comune su entrambi i versanti andini e vive in una fascia compresa tra il livello del mare e 1.000 m.s.l.m..

In Ecuador si trova prevalentemente in zone umide con precipitazioni medie comprese tra 1523 e 6315 mm, con temperature medie annuali tra 21,2 e 27,2 °C. In Brasile è

stata incontrata anche in aree pantanose o caratterizzate da periodi secchi (Borgtoft, 1993).

Riportiamo di seguito un areale di distribuzione elaborato in base alle informazioni bibliografiche in possesso ad oggi.

Areale di distribuzione di *Oenocarpus bataua*



Crescita e riproduzione

Esiste pochissima letteratura a riguardo, da alcuni studi effettuati in Ecuador su 9 individui si evince che il ritmo di crescita varia tra 14 e 72 cm per anno e che non esiste una correlazione diretta tra ritmo di crescita ed età dell'individuo. Lo studio mostra anche che ogni anno vengono formati da 1,1 a 1,7 nuovi bottoni di

infiorescenza e che il tempo trascorso tra la presenza del bottone e lo sviluppo di frutti maturi è di circa 2 anni (Jativa *et al.*, 1994).

Fenologia

La fioritura e fruttificazione della specie risentono fortemente delle condizioni climatiche e pedologiche. In Colombia si registra che la fioritura avviene durante tutti i periodi dell'anno con picchi di massima nei periodi secchi, in Suriname si ha invece prevalenza nella stagione piovosa e la fruttificazione avviene tra gennaio e aprile ed in Brasile da settembre a gennaio. In Ecuador la fioritura avviene lungo tutto l'anno con un massimo da febbraio ad aprile, in concomitanza con la fine della stagione secca (Borgtoft, 1993).

Impollinazione

Nell'amazzonia ecuadoriana è stato osservato che l'antesi è connessa alla produzione della fragranza e che l'antesi staminale dura 3 settimane, seguita da una settimana di antesi pistillare durante la quale la temperatura dell'infiorescenza aumenta. Non si è notata produzione di nettare e di conseguenza si presume che la ricompensa per le specie entomologiche visitanti sia il polline ed i tessuti, sia ad uso alimentare che per la deposizione delle uova (Borgtoft, 1993).

Dispersione

A causa dei diversi usi a cui è soggetto il dattero, la specie umana, unitamente ad un elevato numero di volatili, contribuisce certamente alla diffusione dell'*Oenocarpus bataua* (Borgtoft, 1993).

Usi tradizionali e potenziali

Il dattero e l'olio da esso ottenuto sono i prodotti di maggior interesse commerciale ed etnobotanico. Dal mesocarpo si ottiene, dopo breve cottura, un composto eterogeneo che viene lasciato fermentare fino ad ottenere una bevanda spesso denominata "chicha".

L'olio viene ottenuto mediante un metodo tradizionale che prevede la cottura dei datteri in acqua calda (ca 50°C) per alcuni minuti, successivamente si separa in un mortaio la polpa e si prosegue con la seconda cottura in acqua bollente fino ad affioramento dell'olio.

I dati di letteratura indicano una composizione di acidi grassi molto simile a quella dell'olio d'oliva, con prevalenza di acido palmitico (ca. 12%) e acido oleico (ca. 81%) (da Cruz Rodriguez *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda la composizione dell'olio di ungurahua ottenuto mediante il metodo tradizionale, esistono alcuni dati presso l'Università di Ferrara che risalgono al 2004 ed altri provenienti da uno studio eseguito per conto della stessa Fundación Chankuap presso il laboratorio francese ITERG⁷. Tutti campioni provengono dallo stesso gruppo di produttori della regione di Morona Santiago.

Tradizionalmente, l'olio viene utilizzato come alimento, come combustibile per lampade e come cosmetico, in special modo per curare la bellezza e la lucentezza dei capelli. Tanto nella tradizione indigena quanto in quella colona, l'olio di ungurahua viene riconosciuto come un rimedio contro la caduta dei capelli. Gli usi medicinali conosciuti presso le comunità native indicano il trattamento della tubercolosi, di forme di infiammazione bronchiale e delle vie aeree superiori e per la cura dell'asma. Alcuni autori riportano anche l'uso dell'olio come analgesico (Mors *et al.*, 2000).

Tossicità ed effetti collaterali

Non si conoscono dati relativi alla tossicità acuta e cronica od eventuali effetti collaterali avversi relazionati al consumo dell'olio di ungurahua.

⁷ Institut des corps gras Centre Technique Industriel – analisi CP B 07/06/332 – [PR A1 07/06/184] – Rapport final

3 MATERIALI E METODI

Come previsto dal progetto di dottorato, il presente lavoro si sviluppa in tre diverse fasi che sono caratterizzate da relativi metodi e materiali. Si deve inoltre sottolineare che alcune fasi della ricerca sono state realizzate presso le zone di produzione in Ecuador. Soprattutto per la prima fase del lavoro, quella relativa ai metodi estrattivi dell'olio di unguahua, è stato necessario studiare soluzioni specifiche che hanno una forte connotazione sperimentale anche nella loro componente tecnologica ed impiantistica.

L'analisi dei materiali e metodi utilizzati, passando da quelli più semplici della prima fase alle tecniche estrattive ed analitiche delle successive evidenzia la complessità, ed al contempo la rilevanza, di trasferire presso aree isolate e prive di infrastrutture le normali necessità della ricerca di base ed applicata. Questa chiave di lettura vuole indicare come un'esperienza di ricerca deve e può adattarsi al contesto di un progetto di sviluppo.

3.1 ESTRAZIONE TRADIZIONALE

Il dattero dell'*Oenocarpus bataua* presenta una polpa dura e resistente, difficile da lavorare nella spremitura a freddo senza una precedente separazione della polpa.

Il metodo di estrazione tradizionale delle popolazioni Achuar prevede un periodo di alcune ore di macerazione in acqua per ammorbidire la polpa, la successiva separazione meccanica di quest'ultima per mezzo di rudimentali mortai e pestelli, come indicato nelle figure sotto, ed infine la separazione dell'olio per cottura della polpa in acqua bollente per un periodo di 4-5 ore (Consultora Don Bosco, 2009).

Lavorazione tradizionale dei datteri



Particolare della fase di separazione della polpa



Olio ottenuto al termine della cottura della polpa



3.2 ESTRAZIONE A FREDDO MEDIANTE PRESSA

La pressa per estrazione a freddo

Il metodo di estrazione a freddo rappresenta il primo passo di una metodologia alternativa a quella applicata dalle comunità indigene locali. E' facile intuire che questa fase del lavoro ha una caratterizzazione chiaramente applicativa e volta a migliorare il processo in loco. La pressa è stata realizzata in Ecuador con la collaborazione di un'azienda meccanica locale (vedi figure sotto), parte della sperimentazione è stata condotta in collaborazione con il personale della Fundación Chankuap e del VIS.

La pressa idraulica è stata realizzata per standardizzare ed ottimizzare il processo estrattivo, il quale è stato dimensionato alle esigue quantità produttive delle comunità Achuar ed alla periodicità della produzione. Si è studiato quindi un sistema estrattivo a basso costo che fosse applicabile al contesto sociale e tecnico locale.

Modalità d' estrazione a freddo

Il processo di estrazione è stato condotto su 10 Kg di frutti in triplicato ed ha previsto una prima fase di lavaggio dei datteri seguita da riscaldamento a 40 °C per circa 10 minuti. In seguito è stata separata manualmente la polpa dal nocciolo e rapidamente congelata. Dopo circa 12 ore la polpa è stata scongelata e pressata, il liquido bifasico ottenuto è stato filtrato e separato mediante imbuto separatore, come indicato nelle immagini che seguono. L'olio ottenuto, nuovamente filtrato, è stato trattato con solfato

di sodio anidro e raccolto in contenitori di vetro scuro, successivamente posti al riparo da fonti di luce e calore.

Pressa idraulica per l'estrazione a freddo dell'olio di *O. batnua*



Particolare della pressa



**Sistema bifasico (olio-acqua)
ottenuto dalla spremitura a freddo dei
datteri di *O. batnua***



**Separazione fasi con imbuto
separatore**



Il processo di estrazione a freddo è stato poi introdotto presso alcune comunità Achuar dove si estrae l'olio di unguurahua. Si mostrano di seguito alcune immagini.

Estrazione a freddo dell'olio di *O. batoua* in foresta in una comunità Achuar



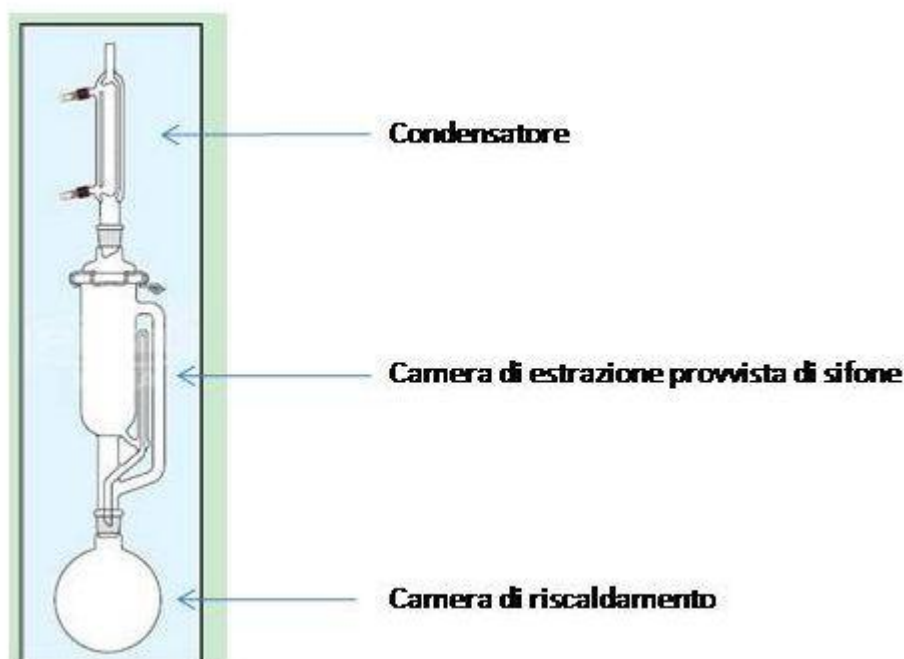
3.3 ESTRAZIONE SOXLET

L'estrattore Soxhlet

Questo metodo di estrazione prevede la separazione di una componente lipidica da un supporto solido, in questo caso la polpa dell'ungurahua. Un solvente viene ciclicamente messo in contatto con la sostanza da sottoporre ad estrazione, viene fatto evaporare per riscaldamento, condensato, sifonato e separato quindi per distillazione. Ad esaurimento del processo il solvente si è così arricchito della componente lipidica da estrarre e può essere allontanato al rotavapor, lasciando come residuo l'olio estratto. Nella pratica industriale il processo non è applicabile per gli elevati costi di esercizio e tempi di estrazione. Viene impiegato in laboratorio prevalentemente per spingere al limite l'estrazione della matrice solida ed ottenere il titolo di componente lipidica per la caratterizzazione della pianta.

Si riporta nella figura sottostante lo schema relativo all'estrattore Soxhlet; l'apparecchiatura è costituita da una camera di riscaldamento per il solvente, una camera di estrazione provvista di sifone e da un condensatore a ricadere (Morelli *et al.*, 2005).

Schema grafico dell'estrattore Soxlet



Modalità d'estrazione con Soxlet

Il ditale è stato riempito di una quantità nota di polpa di dattero sminuzzata. Si è montato l'apparecchio inserendo, in quest'ordine e dal basso verso l'alto, un pallone della capacità di 250 ml, la camera di estrazione provvista di sifone e contenente il ditale riempito, il refrigerante a ricadere. Si è riempito il pallone con 150 ml di esano (Sigma-Aldrich) ed alcuni nuclei d'ebollizione, si è aperta l'acqua di raffreddamento del refrigerante e si è iniziato a riscaldare mediante mantello riscaldante. Il volume del solvente era tale da permettere il sifonamento dalla camera di estrazione, al contempo mantenere un volume accettabile in camera di distillazione per evitare fenomeni di surriscaldamento o carbonizzazione dell'estratto. Si è lasciato in condizioni di riflusso per 1 ora. Dopo raffreddamento si è allontanato il solvente con evaporatore rotante operante sottovuoto. L'olio ottenuto è stato pesato e congelato.

3.4 ESTRAZIONE CON ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA

E' evidente che la tecnologia SFE (Supercritical Fluid Extraction) rappresenta per il presente progetto una delle metodologie di lavoro più interessanti. Se l'implementazione della pressa a freddo rappresenta un'importante applicazione per lo sviluppo della filiera locale, l'estrazione con fluidi supercritici vuole essere la tecnologia elettiva per valutare alcune caratteristiche chimico-fisiche specifiche dell'olio di unguahua evitando l'utilizzo di solventi organici.

Tale tecnica utilizza come mezzo di estrazione un fluido che si trova in condizioni di temperatura e pressione superiori a quelle critiche, cioè al di sopra del suo punto critico. Il fluido si trova quindi nello stato fisico denominato "supercritico" e possiede proprietà intermedie tra quelle caratteristiche dei gas e dei liquidi. Si nota in particolare che, variando la pressione o la temperatura di lavoro, si incide sulla densità del fluido e su altre caratteristiche come la viscosità, la costante dielettrica e la conduttività elettrica. A densità particolarmente elevate quindi, un fluido supercritico è capace di solubilizzare varie sostanze in modo del tutto simile ad un tradizionale solvente, senza però incappare nei problemi di purificazione dei comuni solventi organici (Martinez, 2008).

Se, come nel presente lavoro, si usa anidride carbonica come fluido supercritico, i vantaggi prodotti dall'uso della SFE sono molteplici:

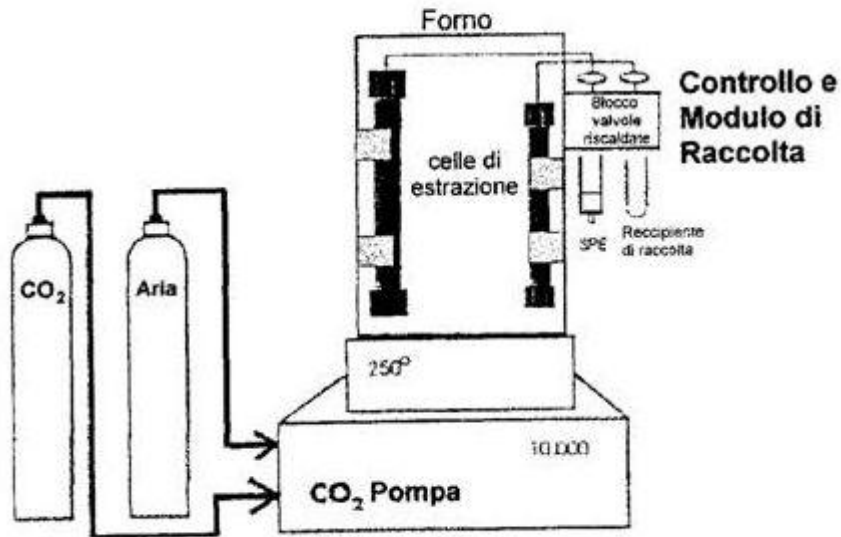
- ✓ la CO₂ non è tossica o infiammabile;
- ✓ si ottengono estratti puri e privi di solventi;
- ✓ la CO₂ è un gas di facile impiego, economico ed ecocompatibile;
- ✓ modesto carico termico dei componenti poiché la CO₂ raggiunge la temperatura critica a 31°C.

L'impianto

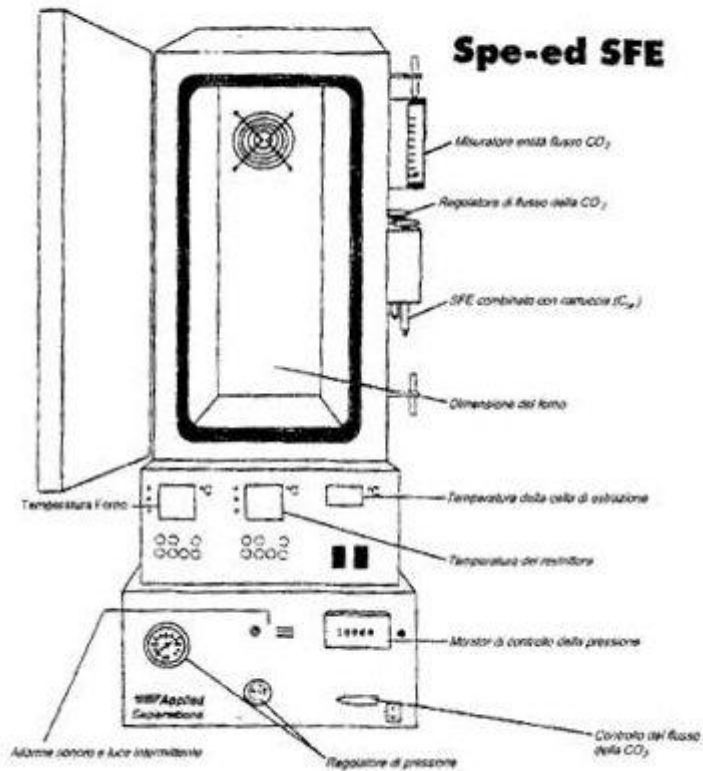
L'estrazione con fluidi supercritici è stata condotta mediante l'uso dell'estrattore SPE-ED-SFE modello 7010/680 atm, illustrato nell'immagine sottostante. Lo strumento è composto da una pompa ad aria che invia la CO₂ ad un recipiente di estrazione posizionato in un forno a temperatura controllata. La pompa viene raffreddata mediante un bagno refrigerante e la temperatura non supera i 4 °C. La cella di

estrazione è collegata ad un restrittore variabile controllato termicamente, quest'ultimo permette il mantenimento delle condizioni di pressione supercritica nel sistema.

Diagramma schematico dell'apparecchiatura SPE-ED-SFE



Dettaglio apparecchiatura SPE-ED-SFE



Modalità d'estrazione con anidride carbonica supercritica

La matrice vegetale da estrarre è costituita dalla polpa liofilizzata del dattero di *Oenocarpus bataua*. La polpa, dopo una prima fase di ammorbidimento del dattero in acqua, viene separata manualmente dal seme ed immediatamente liofilizzata. Il campione ottenuto è stato macinato con mulino Pulverisette 14 Fritsh (dimensioni setaccio: 2.0) e conservato in freezer. Al termine della liofilizzazione il contenuto di umidità è pari al 12,7%. Il peso del campione estratto per ogni operazione è compreso tra 2 e 2,5 g.

Il processo di estrazione con CO₂ supercritica, a partire dalla matrice solida (polpa liofilizzata), si sviluppa nelle seguenti fasi:

- L'estrattore viene caricato con il liofilizzato che è stato precedentemente introdotto nell'apposito cestello e chiuso, come tutte le altre unità dell'impianto;
- Si porta lo strumento alla temperatura di esercizio (in questo caso 50°C);
- Mediante la pompa si porta la pressione fino a 400 bar. In questa fase la CO₂ inizia a solubilizzare ed estrarre alcuni composti presenti del campione;
- La soluzione supercritica viene quindi inviata al separatore;
- Il tempo di estrazione è di 15 minuti;
- L'estratto viene quindi raccolto in diversi contenitori di vetro;
- Al termine l'estrattore viene isolato dalla linea e si procede con la depressurizzazione. La CO₂ contenuta viene rilasciata in atmosfera.

Nel presente lavoro sono state effettuate estrazioni sia sulla polpa liofilizzata sia sull'olio puro. In questo secondo caso la procedura operativa è descritta di seguito.

Il processo di estrazione con CO₂ supercritica, a partire dalla matrice liquida, si sviluppa nelle seguenti fasi:

- Il campione di olio viene adsorbito su una matrice inerte (hydromatrix) fino ad ottenere una massa compatta e facile alla pesata. Il rapporto tra la matrice e

l'olio è 1 a 2. Il contenitore viene riempito con una quantità di circa 5 gr (\pm 0,5) del suddetto composto;

- L'estrattore viene caricato nell'apposito cestello e chiuso, come tutte le altre unità dell'impianto;
- Si porta lo strumento alla temperatura di esercizio (in questo caso 50°C);
- Mediante la pompa si porta la pressione impostata fino a 300 bar. In questa fase la CO₂ inizia a solubilizzare ed estrarre alcuni composti presenti del campione;
- La soluzione supercritica viene quindi inviata al separatore;
- Il tempo di estrazione è di 15 minuti;
- L'estratto viene quindi raccolto in diversi contenitori di vetro;
- Dopo questa prima fase si ripete il ciclo portando la pressione rispettivamente a 400 e 500 bar. In tutti i casi il tempo previsto per l'estrazione è di 15 minuti;
- Al termine l'estrattore viene isolato dalla linea e si procede con la depressurizzazione. La CO₂ contenuta viene rilasciata in atmosfera.

3.5 ESTRAZIONE PER DISTILLAZIONE MOLECOLARE

La distillazione molecolare rappresenta una delle tecnologie più avanzate per la raffinazione degli oli vegetali.

La tecnica del vuoto applicata alla distillazione è certamente in uso da molti decenni, la variazione delle due variabili principali, temperatura e pressione, permette di distillare una enorme quantità di miscele con enormi spazi applicativi. Esistono però composti organici di medio ed alto peso molecolare che, nelle normali condizioni di distillazione sotto vuoto, obbligano ad elevare le temperature oltre la soglia di labilità dei prodotti stessi, con conseguente degradazione della molecola. Per questo motivo queste molecole sono definite “fisse” e tale aggettivo si estende spesso agli oli vegetali, distinguendoli da quelli essenziali che sono notoriamente volatili e facili alla distillazione.

E' noto che le molecole in moto termico, allo stato gassoso, si urtano vicendevolmente e che la loro velocità è inversamente proporzionale alla radice quadrata del loro peso molecolare. Nei liquidi, tenendo in considerazione le forze gravitazionali e di natura elettrostatica, le molecole vengono considerate sostanzialmente libere di muoversi.

Il passaggio di una molecola dalla fase liquida a quella gassosa dipende appunto dall'energia necessaria per liberarsi dalla superficie. Tale energia viene comunemente fornita dall'introduzione di calore nel sistema ma, come anticipato, questo aumento può determinare la degradazione di alcune molecole. Nel caso della distillazione tradizionale si instaura quindi un equilibrio tra la fase liquida e quella gassosa, nel caso della distillazione molecolare invece si deve ricorrere alla teoria cinetica dei gas per capire il comportamento delle molecole.

Nella distillazione sotto vuoto comunemente conosciuta (rotavapor) troviamo una fase liquida che, in determinate condizioni di temperatura e pressione, va in equilibrio con la sua fase gassosa e vede le molecole dirigersi da una zona più calda ad una refrigerata che provoca la condensazione e l'allontanamento del distillato. In tutti i casi il processo di ebollizione è migliorato e condotto a temperature inferiori dalla presenza del vuoto.

Nella distillazione molecolare si ottiene la separazione di due liquidi senza passare per il processo di ebollizione, un liquido risulta essere il condensato e l'altro il residuo o indistillato. Ciò è possibile solamente diminuendo o equiparando il libero percorso medio delle molecole alla distanza tra superficie evaporante e superficie condensante.

Il processo prevede quindi il passaggio di un film sottile di liquido lungo la superficie evaporante, si ha quindi un progressivo aumento dell'energia termica delle molecole che porta alla loro separazione della fase liquida, ma questo avviene prima che il liquido stesso sia arrivato alla temperatura di ebollizione. Tale condizione si può verificare solo arrivando ad una condizione di vuoto spinto e mantenendo appunto la distanza tra superficie evaporante e riscaldante inferiore o uguale al libero percorso medio delle molecole (Bondioli *et al.*, 1992).

L'impianto

Impianto di distillazione molecolare e dati tecnici



Dati tecnici:	
Materiale:	Vetro borosilicato 3.3
Evaporatore area di superficie:	5 dm ²
Tipica throughput*:	ca. 0,3 - 1,5 kg / h *
Tergicristallo sistema:	sistema autopulente tergicristallo a rulli
Temperatura di evaporazione:	fino a 350 ° C
Pressione di funzionamento*:	fino a <0,001 mbar
Riscaldamento:	termica (termostato a bagno d'olio)

*A seconda del tipo di prodotto

Modalità d'estrazione con distillazione molecolare

1 litro di campione di olio di unguahua viene preventivamente degassato e, nel caso specifico del presente lavoro, sottoposto alla misura dell'indice di acidità (IA) prima della distillazione molecolare. Lo studio vuole appunto verificare come la tecnologia descritta possa influire sul citato parametro di qualità dell'olio.

Prima della distillazione si conferma un valore di acidità, iniziale pari a 1,4 mg/KOH. Si passa quindi al distillatore molecolare che presenta una trappola ad azoto liquido per gli in condensabili. Le condizioni di lavoro iniziali sono:

- vuoto 10^{-3} mm/Hg. Il sistema di vuoto prevede con pompa rotativa (vuoto primario) e poi a diffusione (vuoto spinto);
- temperatura 180 °C, tempo di lavoro – ca 1 l/hora

ANALISI GC-MS

ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI – METODOLOGIA OPERATIVA E STRUMENTO

Transmetilazione di acidi grassi

10 mg di olio sono stati sciolti in 1 ml di etere etilico anidro (Sigma-Aldrich) ed aggiunti di 20µl di metilacetato (Sigma-Aldrich) e 20µl di una soluzione di CH₃ONa in metanolo anidro 1M (Na metallico in metanolo distillato su Mg), in seguito si è agitare brevemente.

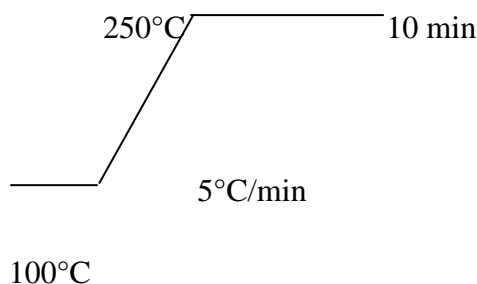
La soluzione si è intorbida immediatamente e i derivati sali sodici sono precipitati. Dopo 5 minuti a temperatura ambiente la reazione viene bloccata aggiungendo almeno 30µl di una soluzione satura di acido ossalico in etere etilico sotto agitazione.

Si è centrifugato per 2 minuti per precipitare l'ossalato e si è portato a secco il solvente sotto azoto. Riprendere con Et₂O o esano ed iniettare.

Analisi GC

I campioni sono stati analizzati quali-quantitativamente per via gascromatografica, utilizzando un gascromatografo Trace (ThermoQuest), con detector FID a

ionizzazione di fiamma ed equipaggiato con una colonna Varian VF-5ms (diametro interno = 0.25mm, lunghezza 30m, spessore del film = 0.25 μ m). Le condizioni operative sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore 300°C, temperatura al detector 300°C; rapporto di split di 1/50; gas carrier elio. L'analisi gascromatografica è stata eseguita impostando la seguente programmata: un incremento di temperatura del forno da 100°C a 250°C con una velocità di 5°C/min, seguito da un'isoterma a 250°C per 10 minuti.



Un'aliquota di ciascun campione è stata disciolta in etere etilico (Sigma-Aldrich) e in seguito iniettata nel gascromatografo.

Analisi GC-MS

L'analisi qualitativa dei campioni transmetilati è stata eseguita con un gascromatografo Varian GC-3800 equipaggiato con una colonna Varian FactorFour VF-5ms (5%-fenil-95%-dimetil-polisilossano; diametro interno: 0.25 mm, lunghezza: 30 m, film: 0.25 μ m) associato ad uno spettrometro di massa Varian MS-4000 caratterizzato da una sorgente ionica ad impatto elettronico ed integrato ad una libreria NIST.

Le condizioni operative del gascromatografo erano le stesse utilizzate per l'analisi gascromatografica, mentre le condizioni sperimentali dello spettrometro di massa erano le seguenti: voltaggio 70 eV, corrente di emissione 20 μ A, 1 scan/sec, range di analisi della massa 40-650 Da, temperatura della trappola 150°C, temperatura della transfer-line 300°C. Una miscela di idrocarburi alifatici (C₈-C₂₄) in esano (Sigma) è stata iniettata per calcolare gli indici di ritenzione sfruttando l'equazione generalizzata di *Van del Dool and Kartz* (1963).

Oltre al confronto dei dati ottenuti dalla massa di ciascun composto con spettri di massa presenti in banca dati, i componenti sono stati identificati comparando i relativi

tempi di ritenzione (RT), gli Indici di Kovats (KI) ed i dati della massa (grado di frammentazione) con una miscela standard di 37 metil esteri di acidi grassi (37 Component FAME Mix – Supelco).

ANALISI DELLA FRAZIONE INSAPONIFICABILE - METODOLOGIA OPERATIVA E STRUMENTO

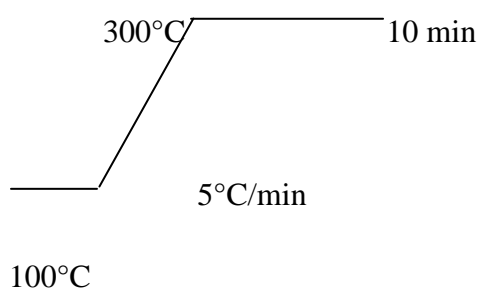
Saponificazione

40 mg di campione di olio di unguahua sono stati saponificati con 5ml di KOH metanolica 1M per 24 ore a 28°C. La soluzione è stata poi estratta 2 volte con 2ml di esano (Sigma) e 0,2ml di etanolo (Sigma) in imbuto separatore. Le frazioni organiche riunite e anidificate con Na₂SO₄ anidro, vengono portate a secco sotto flusso di azoto e silanizzate con 2ml di una miscela 5:2:1 di piridina/esametildisilazano/trimetilclorosilano precedentemente centrifugata.

Dopo 1 ora a temperatura ambiente il liquido viene riscaldato in un bagno a 80°C ed evaporato sotto flusso di azoto. Il residuo viene risospeso in 0,3 ml di esano in ultrasuoni per 2 min e centrifugato, ed il surnatante viene iniettato in GC.

Analisi GC

I campioni sono stati analizzati quali-quantitativamente per via gascromatografica, utilizzando un gascromatografo Trace (ThermoQuest), con detector FID a ionizzazione di fiamma ed equipaggiato con una colonna Varian VF-5ms (diametro interno = 0.25mm, lunghezza 30m, spessore del film = 0.25µm). Le condizioni operative sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore 300°C, temperatura al detector 350°C; rapporto di split di 1/20; gas carrier elio. L'analisi gascromatografica è stata eseguita impostando la seguente programmata: un incremento di temperatura del forno da 100°C a 300°C con una velocità di 5°C/min, seguito da un'isoterma a 300°C per 10 minuti



Analisi gascromatografica-spettrometria di massa

La descrizione dello strumento e la metodologia operativa è la medesima riportata nel paragrafo 2.6.1.

Anche in tal caso, oltre al confronto dei dati ottenuti dalla massa di ciascun composto con spettri di massa in banca dati, i componenti sono stati identificati comparando i relativi tempi di ritenzione (RT), gli Indici di Kovats (KI) ed i dati della massa (grado di frammentazione) con composti standard e dati di letteratura.

3.6 SCREENING FITOCHIMICO

Questa metodologia di indagine fitochimica è stata realizzata presso i laboratori dell'Università Politecnica Salesiana di Quito (Ecuador). Va considerato che, pur non essendo una metodologia particolarmente innovativa era la sola possibile in un contesto tecnologico e strumentale ancora da strutturare.

Le informazioni relative alle famiglie chimiche presenti negli estratti del dattero rappresentano un'interessante avvio per una sperimentazione scientifica più ampia. Il lavoro ha aperto la strada ad una prima analisi della frazione non lipidica della polpa, a completamento quindi degli studi condotti sull'olio estratto con i vari metodi precedentemente descritti.

Lo studio prevede la produzione di estratti che vengono suddivisi successivamente in vari campioni, ognuno di essi viene sottoposto quindi a saggi di tipo chimico-fisico o reazioni che inducono la presenza di precipitati o colorazioni caratteristiche. Ogni saggio risulta essere selettivo per una determinata classe di composti. Va ricordato che i risultati ottenuti sono preliminari e soggetti a volte a falsi negativi in quanto le concentrazioni delle molecole in esame possono essere inferiori alla sensibilità del metodo (Morelli *et al.*, 2005).

Lo screening fitochimico prevede una serie di estrazioni successive con solventi a polarità crescente; nello specifico i solventi usati sono stati etere etilico (Sigma-Aldrich), etanolo (Sigma-Aldrich), acqua. Il metodo utilizzato è rivolto ad uno studio qualitativo dei gruppi di composti presenti nella polpa.

Partendo da 100 gr di polpa, si prepara un primo estratto macerando in 300 ml di etere etilico il campione per 48 h, dopo aver filtrato si ottiene quindi in primo estratto

(etereo) ed il residuo solido viene nuovamente macerato, con le stesse modalità precedentemente descritte, con 300 ml di etanolo. Si ripete la filtrazione ottenendo il secondo estratto (etanolico) e si conclude macerando il residuo solido con 300 ml di acqua distillata, sempre con le stesse modalità. Tutte le macerazioni vengono condotte a temperatura ambiente ed in triplicato.

I tre estratti ottenuti vengono quindi suddivisi in aliquote e sottoposti a successivi saggi secondo quanto indicato da Migdalia (2001).

Valutazione quali-quantitativa della frazione polifenolica

Metodo Folin-Ciocalteu

I polifenoli sono costituiti da una struttura aromatica con gruppi funzionali ossidrilici. Tale struttura li rende sostanze ad attività antiossidante, in grado di quindi di catturare atomi di ossigeno libero (forma radicalica), reagire con esso e ridurne di conseguenza la capacità ossidante. Tale processo previene il danneggiamento delle cellule e dei tessuti negli organismi viventi. L'analisi comunemente utilizzata per determinare il contenuto dei polifenoli totali è il saggio spettrofotometrico che utilizza il reagente di Folin-Ciocalteu. La reazione tra fenoli e il reagente di Folin-Ciocalteu prevede l'ossidazione del gruppo fenolico (R-OH) con una miscela di acido fosfotungstenico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e acido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) alla forma chinoide (R=O) in ambiente alcalino. I prodotti di riduzione (ossidi metallici) sono responsabili della colorazione blu del campione e presentano un massimo di assorbimento a 765 nm, che è proporzionale al contenuto fenolico totale, espresso come g/l di equivalenti di acido gallico (GAE).

Il metodo scelto per la realizzazione dell'esperimento è quello proposto da Singleton (1965) opportunamente modificato: a 100 ml di campione sono stati aggiunti 7,9 ml di acqua distillata e 500 ml del reagente di Folin-Ciocalteu. Per innescare la reazione dopo 2 minuti vengono aggiunti 1,5 ml di soluzione Na_2CO_3 anidro al 20%, in modo da ottenere un volume totale finale di 10 ml. I campioni così ottenuti vengono incubati al buio a temperatura ambiente per 2 ore, dopodichè viene misurata l'assorbanza di ciascuno a 765 nm. I dati quantitativi sono stati ricavati per interpolazione utilizzando una curva di taratura dell'acido gallico

Determinazione del contenuto in proantocianidine

Tra i bioflavonoidi, le proantocianidine oligomeriche costituiscono una famiglia di polifenoli naturali costituiti da un numero variabile di unità flavaniche (catechina, epicatechina). Tali molecole hanno la caratteristica, se riscaldate in ambiente acido, di idrolizzarsi e fornire antocianidine (da qui la denominazione di proantocianidine).

L'analisi delle proantocianidine è stata effettuata come riportato da Porter (1986): a 1 mg di ciascun estratto disciolto in 1 ml di MeOH sono stati aggiunti 6 ml di *n*-butanolo/HCl (95/5) e 200 ml di $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in HCl 2M. La miscela così ottenuta è stata posta in un bagno termostato a 95°C per 40'. Dopo raffreddamento, è stata misurata l'assorbanza di ciascuna miscela di reazione con uno spettrofotometro ThermoSpectronic Helios g alla lunghezza d'onda di 550 nm, unitamente ad una soluzione standard di cianidin cloruro utilizzata come controllo positivo al posto dell'estratto.

Così come nell'indice in polifenoli totali, anche il tenore in proantocianidine anziché essere espresso con un indice convenzionale, viene riferito ad uno standard puro che in questo caso è il cianidin cloruro. Si procede costruendo una curva di taratura preparando un range opportuno di concentrazioni di cianidin cloruro, e dal valore dell'assorbanza si ricava la concentrazione in proantocianidine.

3.7 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

L'estratto liofilizzato di polpa di unguirahua è stato testato per la sua attività antiossidante *in vitro*. Lo studio delle sostanze antiossidanti trova una vastissima letteratura scientifica che interessa tanto la cosmesi funzionale quanto altri settori delle scienze biologiche (Sacchetti *et al.*, 2004).

La polvere liofilizzata è stata utilizzata per uno screening dell'attività antiossidante *in vitro* mediante i seguenti test: DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e β -carotene test secondo quanto indicato da Nzowa (2010).

La determinazione dell'attività antiossidante di un fitocomplesso o di un principio attivo è un'operazione complessa sul piano operativo ed interpretativo. Esistono infatti numerosi i test *in vitro* ed *in vivo* in grado di rivelare una specifica caratteristica di un'espressione biologica spesso poliedrica nei suoi meccanismi biochimici. Va comunque considerato che l'espressione dell'attività antiossidante non è sempre facilmente dimostrabile e non è raro che, per uno stesso fitocomplesso o principio attivo, il confronto dei risultati di test effettuati *in vitro* ed *in vivo* porti a conclusioni

non coerenti. Si richiede pertanto un'attenta valutazione della qualità e tipologia dei saggi condotti e dell'integrazione delle evidenze espresse, considerando che l'attività biologica di un fitocomplesso è la risultante di un'azione sinergica di più composti piuttosto che l'espressione di una singola molecola.

Tra i numerosi metodi che possono essere utilizzati per la valutazione dell'attività antiossidante (TEAC -Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity assay-, TRAP -Peroxyl Radical Trapping Antioxidant capacity-, LDL -Low Density Lipoprotein-, DMPD -Direction of Maximum Potential Drop-, FRAP -Ferric Reducing Ability assay, ORAC -Oxygen Radical Absorbance Capacity assay-, DPPH, PCL -Photo Chemio-Luminescence-, β -carotene bleaching test, etc.), solo alcuni (TEAC, DPPH, PCL) sono applicabili sia a composti idrofili che lipofili, assicurando in questo modo un miglior confronto tra i risultati e coprendo un più ampio ventaglio di possibili applicazioni.

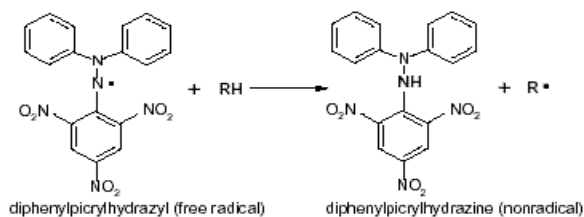
Volendo perseguire la complementarità dei dati ottenibili si è optato per un approccio multiple-test *in vitro* per la determinazione del potere antiossidante dell'estratto, utilizzando due diversi metodi sperimentali:

1. metodo del radicale 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]);
2. β -carotene "bleaching test"

Metodo del radicale 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH[•])

L'attività "radical scavenger" è stata valutata seguendo la procedura riportata da Wang (1998). Essa prevede la riduzione del radicale cromatico stabile DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilidrazil) in presenza di composti antiossidanti. La reazione che avviene è la cessione di un idrogeno dall'antiossidante R-H al DPPH[•] (figura sottostante).

Reazione di riduzione del DPPH[•]



A 900 µl di una soluzione alcolica di DPPH[•] 4 mg/100 ml di etanolo (1×10^{-4} M) (Sigma-Aldrich St.Louis, USA) sono stati aggiunti differenti volumi, da 0-100 µl, di una soluzione metanolo/acqua 75/25 dell'estratto liofilizzato 1 mg/ml. I campioni così ottenuti sono stati posti in agitazione per 30 minuti alla velocità di 200 rpm a temperatura ambiente; in seguito è stata misurata con uno spettrofotometro (ThermoSpectronic Helios γ , Cambridge UK) l'assorbanza di ciascun campione alla lunghezza d'onda di 517nm .

Come controllo positivo è stata utilizzato un noto antiossidante di sintesi, il Trolox (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) alle stesse concentrazioni dei campioni, mentre come controllo negativo è stata impiegata una soluzione alcolica di DPPH[•] 1×10^{-4} M in cui l'estratto è stato sostituito da un'aliquota corrispondente dell'opportuno solvente.

L'attività antiossidante dell'estratto (e del Trolox) è stata calcolata in relazione alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito alla cattura del radicale; più precisamente come percentuale di inibizione della formazione del radicale DPPH[•] secondo la seguente equazione:

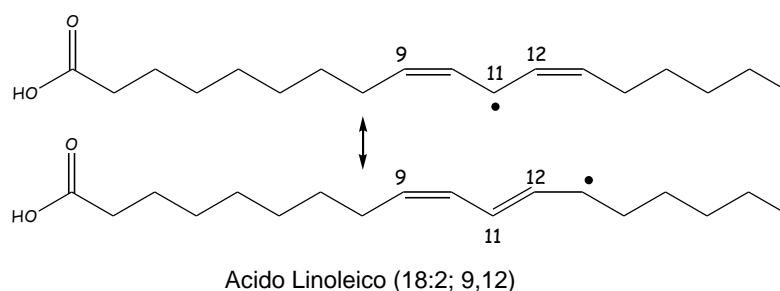
$$\% \text{ INIBIZIONE} = 1 - (A_A/A_B) \times 100$$

dove A_A rappresenta l'assorbanza del DPPH[•] che ha reagito con l'estratto (o con il Trolox) e A_B rappresenta l'assorbanza del DPPH[•] senza campione ed è stata espressa come l'IC₅₀, ovvero come concentrazione, in µg/ml, necessaria per inibire il 50% di formazione del radicale DPPH[•].

β-Carotene “Bleaching test”

Questo metodo di valutazione dell'attività antiossidante di estratti vegetali è basato sull'ossidazione accoppiata del β-carotene e dell'acido linoleico. In presenza di ossidanti avviene infatti l'ossidazione sul C₁₃ dell'acido linoleico con formazione del radicale perossile, responsabile della propagazione della catena radicalica a seguito dell'acquisizione di un idrogeno o da una seconda molecola di acido linoleico o dal β-carotene.

Reazione di formazione del radicale perossile.



La tecnica prevede la misurazione della decolorazione (bleaching) del β -carotene dovuta all'ossidazione causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico per effetto della temperatura (Taga *et al.*, 1984). La presenza di composti antiossidanti inibisce la degradazione del β -carotene, l'effetto visibile a livello macroscopico è la persistenza della caratteristica colorazione arancione.

La miscela di incubazione è ottenuta preparando una soluzione a concentrazione 1mg/ml di β -carotene (type I synthetic, Sigma-Aldrich St.Louis, USA) in cloroformio, dalla quale sono stati prelevati 200 μ l per essere aggiunti alla miscela contenente 20 μ l di acido linoleico e 200 μ l di Tween 40 (Sigma). Il cloroformio è stato rimosso tramite evaporazione al rotavapor (Buchi 461, Switzerland) a 40°C per 5 min circa. Successivamente sono stati aggiunti lentamente 50 ml di H₂O distillata per ottenere una emulsione omogenea. A 5 ml di quest'ultima sono stati aggiunti 200 μ l di soluzione di estratto, diluita a varie concentrazioni, a partire da una soluzione madre di 1 mg/ml: su ogni campione preparato sono state effettuate due letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 470 nm contro un bianco costituito dall'emulsione privata del β -carotene: una immediata e un'altra dopo 1h di incubazione a 50°C.

Come controllo positivo è stato utilizzato il Trolox solubilizzato in acqua alle concentrazioni dei campioni, mentre il controllo negativo era composto solamente dall'emulsione precedentemente descritta, in cui la frazione di estratto è stata sostituita da una pari quantità di acqua.

L'attività antiossidante dell'estratto (e del Trolox) è stata espressa come percentuale di inibizione dell'ossidazione del β -carotene secondo l'equazione riportata di seguito (Kumazawa *et al.*, 2002):

$$AA = 100[(DRc-DRs)/DRc]$$

dove $DRc = [\ln(a/b)/60]$ rappresenta la percentuale di degradazione del controllo, $DRs = [\ln(a/b)/60]$ è invece la percentuale di degradazione in presenza del campione, **a** è l'assorbanza iniziale al tempo 0 e **b** è l'assorbanza dopo 60 min di incubazione.

3.8 FUNZIONALITÀ COSMETICHE DELL'OLIO DI UNGURAHUA

L'olio di unguhua è stato sottoposto ad una serie di test preliminari atti ad individuare delle funzionalità cosmetiche specifiche che riassumiamo di seguito:

- Attività idratante cutanea
- Elasticità cutanea

Preparazione dei test di funzionalità cosmetica

I test di efficacia sui derivati di *O. bataua* sono stati condotti su un gruppo di volontarie sufficientemente ampio al fine di effettuare un trattamento statistico dei dati. Sono state quindi selezionate 15 volontarie sane ed informate, con un'età compresa tra 18 e 50 anni. A tutte le volontarie sono state fornite informazioni esaustive e dettagliate riguardo lo scopo dello studio, della procedura di esecuzione, degli ingredienti e delle eventuali reazioni avverse conosciute. Ogni volontaria ha quindi firmato un documento di consenso informativo contenente le suddette informazioni.

I test vengono condotti in un ambiente a temperatura ed umidità relativa costanti (T° media 23°C , umidità media 54%). Le partecipanti all'esperimento vengono accolte ed acclimatate per un periodo di circa trenta minuti, inoltre viene chiesto loro di non fare particolari movimenti o sforzi fisici che potrebbero falsare i parametri fisici della cute. Viene indicato di evitare l'uso di detergenti o creme nella zona in esame per almeno due giorni prima dell'esame ed in particolare, nelle 12 ore precedenti al test. Le misurazioni vengono effettuate sulle facce palmari degli avambracci in quanto risultano povere di annessi cutanei, quali peli e ghiandole sebacee, quindi meno soggette a interferenze con la misura.

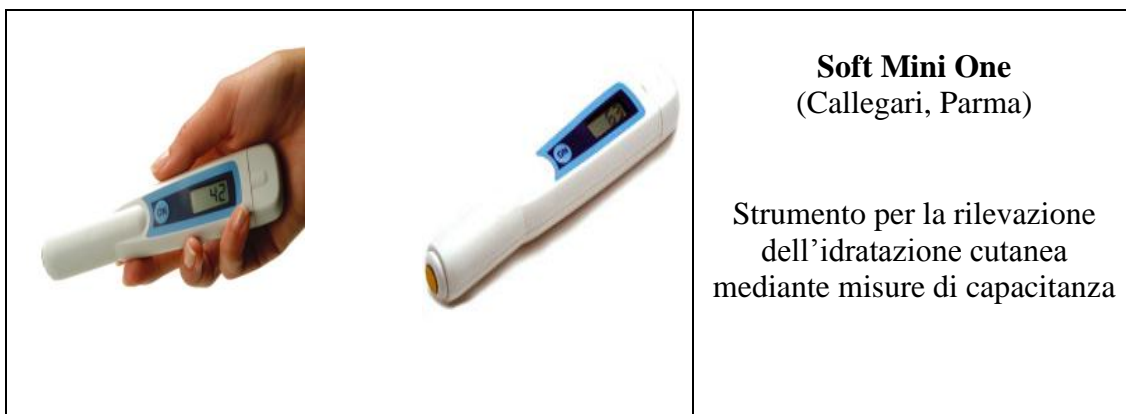
Attività idratante cutanea

Si misura il grado iniziale di idratazione e di elasticità (T_0 , prima dell'applicazione dei prodotti oleosi), per ciascuna area, si applicano quindi per 10 minuti le differenti

sostanze testate, fra cui l'olio di *O. bataua*, e si rimuove l'eccesso tamponando l'area con un panno. Si prosegue quindi con le misurazioni successive delle aree trattate ad intervalli di tempo via via superiori: T5, T15, T30, T60, T90.

La valutazione dell'idratazione cutanea può essere influenzata da differenti fattori ed obbliga chi conduce i test ad uno stretto controllo dei parametri esterni ai quali è sottoposta la cute durante l'esperimento, si deve quindi avere cura nell'eseguire i test a temperatura ed umidità costante, si deve evitare l'esposizione a correnti d'aria fonti di calore, si devono preparare le volontarie a non esporsi a insolazioni, agenti chimici o detergenti e/o altri cosmetici che possano falsare il risultato del test. Esistono altri fattori specifici per ogni soggetto testato quali il contenuto di acqua nei tessuti cutanei, integrità cutanea e grado di invecchiamento cutaneo (Fluhr, 2011).


Lo strumento utilizzato per la misurazione dell'attività idratante è il corneometro. Tale apparecchio permette la misura del grado di umidità degli strati superficiali dell'epidermide. La lettura dello strumento si basa sull'uso di una sonda che permette la misura della capacitance elettrica cutanea, tale misura varia in relazione alla quantità di acqua contenuta dalla cute in una determinata posizione.



Il metodo di lettura è immediato, si posiziona la sonda nella zona in cui si intende eseguire la misura esercitando una leggera pressione in modo tale da portare lo stantuffo del sensore a fine corsa. L'indice d'idratazione cutanea appare dopo pochi secondi sul display dello strumento. Condizioni di esercizio: temperatura 15°C/35°C, umidità 90% non condensata.

Elasticità cutanea

Le condizioni in cui viene condotto il test sono identiche a quelle relative all'attività idratante. I dati sperimentali sono stati ottenuti mediante l'uso di un cutometro. Tale apparecchio permette la misura del grado di elasticità cutanea e quindi la sua tonicità. La lettura dello strumento si basa sull'uso di una sonda che misura la deformazione del tessuto in seguito ad una depressione localizzata.

	<p style="text-align: center;">Soft Mini Three (Callegari, Parma)</p> <p style="text-align: center;">Strumento per la determinazione dell'elasticità cutanea e della deformazione residua della cute</p>
---	---

Per la lettura dell'elasticità cutanea, si deve posizionare lo strumento nella zona interessata esercitando una lieve ma costante pressione. Si deve quindi premere e rilasciare lo stantuffo della sonda, avendo cura di avere sempre la medesima pressione. Il display dello strumento permette in pochi secondi di visualizzare il valore di elasticità cutanea rilevato.

Condizioni di esercizio: temperatura 15°C/35°C, umidità 90% non condensata.

3.9 FORMULAZIONE DI PROTOTIPI AD USO COSMETICO

Come più volte ricordato, il presente lavoro di dottorato si è svolto principalmente all'interno di un progetto di cooperazione allo sviluppo volto alla creazione di filiere produttive basate sulla trasformazione di risorse naturali locali quali l'olio di *O. bataua*. Sono state sviluppate in tutto **14 formule** contenenti diverse percentuali di olio d'ungurahua. Le formule possono essere classificate nei seguenti gruppi:

- 4 oli per massaggi - contenuto ungurahua **40%**
- 1 olio repellente contro gli insetti - contenuto ungurahua **40%**
- 2 emulsioni consistenti - contenuto ungurahua **4%**
- 2 emulsioni fluide - contenuto ungurahua **3%**
- 4 saponi solidi - contenuto ungurahua **13%**
- 1 crema capillare - contenuto ungurahua **6%**

Tutte le formule citate, parallelamente al presente lavoro di dottorato, hanno dato vita alla linea cosmetica Ikiam® della Fondazione Chankuap, attualmente in vendita in Ecuador e presso un importatore del commercio equo e solidale italiano.

Il paragrafo che segue riassume le formule ed i metodi produttivi riguardanti le emulsioni che sono state identificate come studio di interesse per il presente lavoro. Si tratta di due tipi di emulsioni (fluide e consistenti) che rappresentano formulazioni cosmetiche tradizionali, contenenti quindi molecole non approvate dai disciplinari ECOCERT. A queste si aggiungono altre 3 emulsioni alternative (A, B, C) che rappresentano il restyling delle formule sviluppate alla luce delle normative di eco-bio cosmesi.

Apparecchiature

Tutte le fasi di sperimentazione in ambito formulistico sono state condotte su lotti preliminari da banco di 500 g, una volta verificata la stabilità preliminare e la gradevolezza sono stati prodotti lotti semiindustriali per mezzo di un turboemulsore Dumek con capacità di 10 litri. Tutte le prove sono state effettuate in triplicato.

Turboemulsionatore DUMEK da 10 litri



Formulazione prototipi cosmetici

Di seguito vengono indicate le formule utilizzate per la produzione dei prototipi cosmetici contenenti olio di *O. bataua*.

FORMULE TRADIZIONALI
Crema nutriente alla citronella e crema nutriente alla curcuma
(Emulsioni consistenti)

CREMA NUTRIENTE ALLA CITRONELLA	
MATERIA PRIMA – INCI NAME	%
Crodamol IPP – Isopropyl palmitate	7,00
Olio Ungurahua – <i>Oenocarpus bataua</i>	4,00
Emulgade 1000 NI – Cetearyl Alcohol, Cetareth - 20	4,00
Burro di Cacao – <i>Theobroma cacao</i>	3,00
Dow corning 200 – Dimethicone	1,00
Vitamina E acetato – Tocopheryl Acetate	1,00
Vitamina B complex – Aqua, Propylene Glycol, Faex	1,00
Phenova – Phenoxyethanol, Methyl paraben, Ethylparaben, Butylparaben,	0,40
OE Citronella – <i>Cymbopogon citratus</i>	0,20
Ultrez 21 – Acrylates/C10 – 30 alkyil, Acrylate crosspolymer	0,10
Trietanolamina – TEA	0,10
Colorante verde (soluzione C= 10mg/mL) -	0,03
Acido citrico – Citric Acid	0,005
Acqua demineralizzata – Aqua	78,2
Totale	100,0

<i>PREPARAZIONE FASE ACQUOSA</i>	
a) Caricare nel turboemulsore:	
	– ACQUA DEMINERALIZZATA
	– ULTREZ 21
b) Impostare la temperatura a 75°C ed avviare il riscaldamento. Azionare il vuoto, avviare	
c) Ridurre la velocità di agitazione delle pale (60%) e caricare il turbo dall'imbutto superiore	
	– PHENOVA
	– ACQUA DEMINERALIZZATA
b) Mantenere l'agitazione ed il vuoto fino al raggiungimento della temperatura prevista	
<i>PREPARAZIONE FASE GRASSA</i>	
a) Miscelare a parte:	
	– CRODAMOL IPP
	– OLIO DI UNGURAHUA
	– EMULGADE 1000 NI
	– BURRO DI CACAO
b) Scaldare a completa fusione dei grassi senza superare i 75 °C	
<i>FORMAZIONE DELL'EMULSIONE</i>	
a) Caricare la fase grassa a 75°C nell'imbutto.	
b) Aprire la valvola lentamente ed iniziare l'emulsione incorporando la fase grassa "a	
c) Spegnere la turbina, impostare la temperatura a 25 °C ed avviare il raffreddamento.	
Ridurre l'agitazione planetaria (40%) e mantenerla per tutta la fase di raffreddamento.	

<i>AGGIUNTA DI SOSTANZE FUNZIONALI E PROFUMI</i>	
a) Alla temperatura di 40°C, sotto agitazione planetaria e con la turbina insrita a	
	– VITAMINA E ACETATO
	– DOW CORNING 200
	– OLIO ESSENZIALE CITRONELLA
b) Al termine disattivare la turbina, mantenere l'agitazione planetaria per 5'.	
c) Aggiungere dall'imbutto:	
	– VITAMINA B COMPLEX
	– ACQUA DEMINERALIZZATA
d) Mantenere l'agitazione a velocità bassa 2'.	
<i>AGGIUNTA DI SOSTANZE AUSILIARIE</i>	
a) In un recipiente a parte miscelare:	
	– ACIDO CITRICO
	– ACQUA DEMINERALIZZATA
	– COLORANTE VERDE (Sol. C=10mg/mL)
b) Aggiungere la miscela al prodotto, in condizioni di bassa agitazione, ed aggiungere:	
	– TRIETANOLAMINA
	– ACQUA DEMINERALIZZATA
c) Al termine delle aggiunte, ripristinare il vuoto ed agitare con le pale per 5'.	
d) Continuare il raffreddamento fino a 25°C	
e) Scaricare il prodotto	

La formula alla curcuma presenta alcune lievi variazioni degli ingredienti. All'olio essenziale di citronella viene sostituito olio essenziale di curcuma (*Curcuma longa*) (Fondazione Chankuap) nella percentuale dello 0,14 % e un profumo di sintesi (Camomilla) (Quimica Comercial) allo 0,16 %. Viene anche aggiunta una soluzione di colorante rosso diluita (C=10mg/MI) allo 0,016 %. La quantità di acqua demineralizzata finale risulta essere quindi identica alla formula 6.

FORMULE TRADIZIONALI
Crema fluida alla citronella e crema fluida allo zenzero
(Emulsioni fluide)

CREMA FLUIDA ALLO ZENZERO	
MATERIA PRIMA – INCI NAME	%
Crodamol IPP – Isopropyl Palmitate	9,0
Olio d'ungurahua – <i>Oenocarpus bataua</i>	3,0
Emulgade 1000 NI – Cetearyl Alcohol, Cetareth – 20	4,0
Burro di cacao – <i>Theobroma cacao</i>	2,0
Dow corning 200 – Dimethicone	1,0
Vitamina E acetato – Tocopheryl Acetate	1,0
Vitamina B complex – Aqua, Propylene Glycol, Faex	1,0
Phenova – Phenoxyethanol, Methyl paraben, Ethylparaben, Butylparaben,	0,4
Olio essenziale Zenzero - <i>Zingiber officinalis</i>	0,2
Acido citrico – Citric acid	0,005
Acqua demineralizzata – Aqua	78,4
Totale	100,0

* la % di olio essenziale è identica per le due formule

Il procedimento è riconducibile a quello delle emulsioni precedentemente descritte. La crema fluida alla citronella è stata prodotta seguendo la stessa procedura e quantità di materie prime ad esclusione dell'olio essenziale, sostituito con quello di citronella (*Cymbopogon citratus*) (Fondazione Chankuap).

FORMULE ECO-BIO O NATURALI*

* da definizione ECOCERT

Emulsione A – formula ecologica e biologica secondo disciplinare ECOCERT

Ingredienti INCI Name	%
Water	76,2
<i>Oenocarpus bataua</i>	10,0
Cetearyl alcohol	3,7
Isopropyl myristate	2,5
Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside (Montanov 68)*	2,1
Arachidyl Alcohol and Behenyl Alcohol and Arachidyl Glucoside (Montanov 202)*	2,0
<i>Theobroma cacao</i>	1,0
Undecylenoyl Glicine (Lipacide C8G)*	1,0
Potassium sorbate	0,5
Sodium benzoate	0,5
<i>Citrus lemon</i> (olio essenziale)	0,3
Citric acid	0,1
Xantan gum	0,1
	Tot. 100,0

Emulsione B - formula ecologica e biologica secondo disciplinare ECOCERT

Ingredients INCI Name	%
Water	76,4
<i>Oenocarpus bataua</i>	7,0
<i>Theobroma cacao</i>	3,0
Isopropyl myristate	3,0
C14-C22 Alkylalcohol and C12-20 Alkylglucoside (Montanov L)*	3,0
Myristyl Alcohol and Myristyl Glucoside (Montanov 14)*	2,0
Caprylic/capric Triglyceride	2,0
Dipalmitoil Hydroxyproline	1,0
Undecylenoyl Glicine	1,0

Potassium sorbate	0,5
Sodium benzoate	0,5
<i>Lemon grass</i> (essential oil)	0,3
Xantan gum	0,2
Citric acid	0,1
	Tot. 100,0

Emulsione C - formula ecologica secondo disciplinare ECOCERT

Ingredients INCI Name	Origine vegetale		%
Water		Approvato	79,8
Isopropyl palmitate	X	Approvato	6,0
<i>Oenocarpus bataua</i>	X	Biologico	5,0
Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside (Montanov 68)*	X	Approvato	5,0
Cetearyl alcohol	X	Approvato	1,0
Capryloyl Glycine (Lipacide UG)*	X	Approvato	1,0
<i>Lemon grass</i> (olio essenziale)	X	Biologico	1,0
Potassium sorbate		Approvato	0,5
Sodium benzoate		Approvato	0,5
Xantan gum		Approvato	0,2
			Tot. 100,0

I metodi di produzione, fatte le debite variazioni relative agli ingredienti, sono uguali a quelli descritti in precedenza.

3.10 STABILITÀ CHIMICO-FISICA E MICROBIOLOGICA DEI PROTOTIPI COSMETICI

Stabilità chimico – fisica

Le formule sviluppate per la linea cosmetica locale sono state successivamente completate con studi di stabilità e relativi dossier tecnici. Il lavoro attinente al dottorato si è invece concentrato sugli studi di stabilità dei prototipi formulativi.

Gli studi sono stati condotti alle seguenti temperature: 4°C, Temperatura Ambiente (RT) e 40°C. I campioni sono stati controllati rispettivamente dopo 1, 2 e 5 mesi. Sono stati valutati i caratteri organolettici (aspetto, colore, profumo), il pH e la viscosità.

Stabilità microbiologica (Challenge Test)

La stabilità microbiologica del prodotto cosmetico nel tempo è un parametro determinante per la vita commerciale del prodotto e, soprattutto, per la sicurezza del consumatore. Le fasi procedurali consistono in:

- Conta microbica preliminare sui campioni da esaminare;
- Preparazione dei microrganismi per l'inoculo;
- Inoculo dei campioni;
- Controlli ad intervalli prestabiliti della sopravvivenza dei microrganismi;
- Valutazione dei risultati.

I microrganismi utilizzati sono stati i seguenti:

- Bacilli Gram -:
 - *Escherichia coli* (ATCC 10536), per i fermentativi in quanto indice di contaminazione fecale;
 - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), per i non fermentativi in quanto ubiquitaria e patogeno;
- Cocchi Gram +:
 - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), in quanto comune saprofita della pelle e potenziale patogeno;
- Lieviti:
 - *Candida albicans* (ATCC 10231), in quanto molto diffusa in natura e spesso implicata in situazioni patologiche;

- Muffe:
Aspergillus niger (ATCC 16404), in quanto spesso responsabile dell'inquinamento di prodotti mal preservati.

Tali microrganismi sono notoriamente rappresentativi delle possibili contaminazioni ambientali dei prodotti cosmetici (funghi, lieviti, muffe, batteri). E' stata inoculata ai prototipi cosmetici una quantità di colonie compresa fra 10^6 e 10^8 UFC/ml, si procede alla successiva valutazione della variazione di carica microbica mediante il conteggio in piastra. Tale conteggio permette di determinare il numero di colonie sopravvissute e viene eseguito ad intervalli di tempo regolari partendo dal Tempo 0, corrispondente alla inoculazione del microrganismo e dopo 2, 7, 14 e 28 giorni. Il sistema conservante del prodotto è costituito da quelle molecole che, direttamente o indirettamente, influiscono sulla capacità dei contaminanti di sopravvivere nella fase acquosa. La capacità di abbattere la totalità della carica contaminante od un elevato numero di colonie rappresenta quindi l'efficacia del sistema preservante e la sicurezza microbiologica della formula, se riprodotta seguendo buone pratiche di lavorazione.

L'osservazione della riduzione di carica microbica (per ciascuna specie) entro un certo intervallo di tempo segue i criteri di accettabilità emanati da CTPA (Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association – UK, ed. 1990) e da CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association – USA, ed. 1993).

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

ESTRAZIONE OLIO DI *Oenocarpus bataua*

Metodi estrattivi alternativi a confronto

Il metodo di estrazione utilizzato dagli Achuar è una procedura tradizionale, condotta con le modalità e gli strumenti rudimentali di un contesto estremamente rurale. La polpa del dattero si ammorbidisce mediante immersione in acqua e si procede poi alla cottura della stessa in acqua; la cottura prolungata permette l'affioramento dell'olio che viene raccolto con cotone o altri metodi manuali. E' intuitivo pensare che tale metodica presenta delle criticità in relazione alla stabilità chimico-fisica ed alla variabilità del prodotto. Si deve comunque considerare che il contesto in cui si opera è estremamente diverso dagli standard produttivi caratteristici delle aziende estrattive, in quanto le comunità dove si ottiene l'olio sono totalmente prive di infrastrutture. Al contempo si evidenzia la necessità di produrre *in loco* perché sarebbe troppo oneroso trasportare i datteri fuori dalle comunità indigene, raggiungibili esclusivamente via fiume o mediante piccoli aerei Cessna. Le problematiche descritte obbligano la ricerca di soluzioni su piccola scala e utilizzabili dalle popolazioni locali. Si è pensato quindi di utilizzare una pressa per l'estrazione a freddo, soluzione che risulta essere più adeguata per il territorio locale e più sostenibile dal punto di vista economico, difatto le presse sono già in uso presso alcune comunità.

Una prima estrazione eseguita nel 2007 in triplicato, aveva dato rendimenti medi molto bassi, come evidenziato nella Tabella 1.

Tabella 1 – Prove di estrazione a freddo dell'olio di *O. bataua* dai datteri; valori medi di resa

<i>Metodo</i>	<i>Peso datteri (kg)</i>	<i>Quantità polpa estratta (kg)</i>	<i>Rendimento olio (g)</i>	<i>Rendimento %</i>
Estrazione a freddo I ^a prova	41	14	0,506	3,6

Il ridotto rendimento in olio è stato probabilmente dovuto ad imperfezioni della pressa che sono state corrette proprio in seguito al primo esperimento. In sintesi, le parti della macchina che dovevano sopportare la pressione esercitata sulla polpa erano sottodimensionate e portavano alla deformazione di una parte della pressa. Il problema è stato risolto dopo una lunga fase di lavoro con l'azienda costruttrice. E' stato quindi possibile ripetere l'esperimento con una pressa modificata come indicato in Tabella 2.

Tabella 2 - Prove di estrazione a freddo dell'olio di *O. bataua* dai datteri, con pressa modificata; valori medi di resa

<i>Metodo</i>	<i>Peso datteri (kg)</i>	<i>Quantità polpa estratta (kg)</i>	<i>Rendimento olio (Kg)</i>	<i>Rendimento %</i>
Tradizionale Achuar	10	3,2	0,256	8,0
Estr. a freddo – II ^a prova	1	0,3	0,029	9,7
Estr. a freddo – III ^a prova	10	3,4	0,287	8,4

Va ricordato che il rendimento percentuale ottenuto mediante estrazione soxlet dalla polpa fresca è del **10%**, questo permette di valutare positivamente i dati di rendimento ottenuti dall'estrazione a freddo in quanto i valori non si discostano di molto dall'estrazione con solventi, considerata la più efficace. La resa del metodo tradizionale non è drasticamente differente da quella ottenuta con il metodo a freddo, sono però considerevolmente differenti sono i tempi di realizzazione dell'estrazione come si evince dalla Tabella 3.

Tabella 3 – Tempo impiegato per l'estrazione dell'olio di ungurahua, previa separazione manuale della polpa, espresso in minuti

<i>Metodo</i>	<i>Tempo</i>
Tradizionale	120 - 180
Estrazione a freddo	20 - 25

La fruttificazione della palma avviene solo una volta all'anno e la raccolta è vincolata alle esigenze e tempistiche dei produttori Achuar. Ottenere datteri freschi di ungurahua è decisamente difficile e si deve quindi fare una prima valutazione dei dati in possesso. Ulteriori prove sono necessarie per confermare il dato. Si evidenzia quindi che il rendimento dell'estrazione a freddo, tramite la pressa, risulta leggermente superiore a quello tradizionale e si avvicina al rendimento massimo espresso dall'estrazione Soxhlet. Va inoltre ricordato che l'estrazione a freddo, oltre a evitare l'esposizione dell'olio al riscaldamento, riduce di circa **1/6** il tempo di lavorazione della polpa. Va comunque ricordato che, considerato il particolare contesto antropologico in cui si è condotto il lavoro, l'introduzione di una nuova tecnologia è soggetta a fattori che non dipendono dalla sola valutazione tecnico-scientifica ma sono influenzati da considerazioni di tipo economico, culturale e financo magico-religiose.

Considerati i parametri quantitativi, si sono inoltre valutati quelli qualitativi dell'olio perché, ovviamente, le attività sperimentali volgono al miglioramento della qualità dell'olio e non solo del rendimento d'estrazione.

La Tabella 4 permette di confrontare alcuni parametri qualitativi determinanti per un olio vegetale. I campioni sono stati ottenuti mediante estrazione tradizionale ed estrazione a freddo:

Tabella 4 Parametri qualitativi dell'olio di *O. bataua*, confrontati con quelli di oliva

Parametro	Olio di <i>O. bataua</i> *		Olio di oliva raffinato **	Olio di oliva extra vergine
	ET	EF		
Indice di acidità (% ac. oleico)	0,53	0,54	≤ 0,3	≤ 3,3
Indice di iodio	72,95	72,44	75 – 94	75 – 94
Indice di saponificazione	191,26	194,08	184 - 196	184 - 196
Indice dei perossidi (meq O ₂ /Kg)	1,54	1,97	≤ 20	≤ 10

* INEN 38, AOAC 993.20, AOAC 920.160, AOAC 965.33

**"Norma commerciale applicabile agli oli d'oliva ed agli oli di sansa d'oliva" - Risoluzione N.RIS. 3/89-IV/03.

ET = estrazione con metodo tradizionale; EF = estrazione a freddo

Inoltre, su un campione di olio estratto mediante il metodo tradizionale stoccato per molto tempo, è stata applicata come metodologia estrattiva la distillazione molecolare. Il campione, come descritto nel precedente capitolo dei materiali e metodi, è stato sottoposto quindi ad un processo estrattivo che permette l'ottenimento di un prodotto maggiormente raffinato ed in linea con i requisiti di certificazione ecologica e biologica.

La distillazione molecolare, come previsto, ha permesso di abbattere il valore di indice d'acidità (IA) (espresso in % di acido oleico) da un valore di **0,70** a **0,28**, mantenendo sostanzialmente invariati gli altri parametri di qualità. Gli oli ad uso cosmetico non sono soggetti, come l'olio di oliva, ad una specifica normativa, spesso le aziende produttrici e quelle cosmetiche usano dei parametri di controllo qualità condivisi. Per due parametri fondamentali indice di acidità (IA) ed indice dei perossidi (IP), i limiti solitamente concessi sono i seguenti:

- **IA < 5** oppure **IA < 3**
- **IP < 1** oppure **IP < 0,5**

Alla luce delle seguenti considerazioni, possiamo dire che i campioni testati di olio di unghurua mostrano parametri di qualità decisamente buoni, quantomeno se confrontati al comune olio di oliva. Viene inoltre dimostrato che, se l'olio viene trasformato e stoccato seguendo delle buone modalità di lavoro, il processo di irrancidimento viene evitato o limitato. Sorprendentemente, l'olio ottenuto con il metodo tradizionale non presenta parametri qualitativi estremamente differenti da quello estratto con la metodica a freddo. Come descritto, la fase finale del processo di estrazione tradizionale prevede la bollitura della polpa e la conseguente separazione dell'olio per affioramento, in tali condizioni di temperatura ed esposizione all'aria ed alla luce sarebbe ragionevole pensare ad uno sviluppo elevato dei perossidi che i dati analitici non evidenziano.

L'ipotesi più plausibile per spiegare questo risultato può essere ricondotta ai tempi di esecuzione delle prove, in entrambi i casi tutte le fasi del processo sono state condotte rapidamente ed i campioni sono stati analizzati immediatamente dopo l'estrazione. Si pensa quindi che precedenti lotti di olio, con valori di IP ed IA decisamente superiori, dovessero il loro irrancidimento alle cattive condizioni di stoccaggio dei datteri più che alla metodologia di estrazione.

Va ricordato che la distillazione molecolare è un metodo particolarmente adatto per lo sviluppo di materie prime consone ai disciplinari della eco-biocosmesi. Essendo difatti un metodo di raffinazione basato su un processo fisico non introduce nel ciclo di produzione della materia nessun tipo di altre impurezze, come nel caso dell'estrazione con solventi organici, che possano essere incompatibili con un concetto di cosmesi biologica.

ESTRAZIONE CON ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA

Per approfondire ulteriori processi estrattivi compatibili con la cosmesi biologica, si è ritenuto opportuno estrarre l'olio mediante fluidi supercritici ed in tal caso è stato possibile partire dalla polpa liofilizzata del dattero. Quindi, la maggior parte dei dati in nostro possesso riguardano la composizione dell'olio di *Oenocarpus bataua* estratto secondo il metodo tradizionale, con pressione a freddo e con estrazione mediante fluidi supercritici a partire da polpa liofilizzata.

Anche in questo caso deve essere sottolineato il fatto che, nell'ottica di valorizzare processi e modalità compatibili con i disciplinari della ecobiocosmesi, le tecniche estrattive selezionate, dall'estrazione a freddo alla certamente più complessa estrazione con fluidi supercritici, rappresentano processi fisici compatibili ed auspicabili per lo sviluppo di materie prime certificabili. L'uso della CO₂ come fluido di estrazione è decisamente alternativo alle più classiche estrazioni con solventi, operazioni più semplici ma incompatibili con un processo mirato alla "green chemistry" ed alle linee guida di disciplinari avanzati come quello espresso da COSMOS: "using processing and manufacturing that are clean and respectful of human health and environment (COSMOS Standard, 2009).

Non va dimenticato però che il trasferimento *in loco* di tecnologie più complesse, come appunto l'estrazione con fluidi supercritici, rappresenta un impegno economico ed un percorso tecnico-scientifico non facile per un progetto attivo in un paese in via di sviluppo. La sintesi di complessità tecnologica e sostenibilità dei processi torna ad essere una delle principali sfide scientifiche della cooperazione allo sviluppo e della ricerca in generale.

Per quanto riguarda l'estrazione SFE, sono state fatte delle prove iniziali di estrazione da un campione di olio grezzo adsorbito su una matrice inerte. Tali prove hanno permesso di ottimizzare poi il procedimento estrattivo dalla polpa di dattero liofilizzata.

I parametri fondamentali che influenzano l'efficienza estrattiva in SFE sono la temperatura e la pressione, in questo studio si è deciso di variare solamente le condizioni di pressione del fluido supercritico come riportato nella Tabella 5, in quanto l'aumento della temperatura avrebbe potuto causare la degradazione dei composti termolabili dell'olio e variarne la qualità.

Tabella 5 – Condizioni di pressione, temperatura e tempo usate nell'estrazione con fluidi supercritici

Prova	1	2	3	4
Pressione (bar)	100	300	400	500
Temperatura (°C)	50	50	50	50
Tempo (minuti)	15	15	15	15

Per valutare l'efficienza dei processi estrattivi esaminati è stato determinato il contenuto di acidi grassi di vari campioni mediante analisi GC – MS . I risultati ottenuti sono illustrati nella Tabella 6.

I dati sono stati confrontati anche con precedenti dati bibliografici del 2004, ottenuti presso gli stessi laboratori dell'Università di Ferrara, e con quelli forniti dalla controparte ecuatoriana nel 2007 (Iterg 2007).

Tabella 6 – Acidi grassi identificati mediante analisi GC-MS di campioni di olio di *O. bataua*, ottenuti mediante differenti metodi d'estrazione

Ac. grassi identificati		Ecuador 2009 Trad.¹ %	UNIFE 2009 - 1 SFE² da polpa liofilizzata %	UNIFE 2009 - 2 SFE da olio grezzo %	Fraz 2 SFE %	Fraz 3 SFE %	Fraz 4 SFE %	Fraz 5 SFE %
14 : 0	Ac. miristico	1,1						
16 : 0	Ac. palmitico	12,6	10,2	11,7	11,5	11,0	9,8	9,0
16 : 1	Ac. palmitoleico	0,7	1,1					
18 : 0	Ac. stearico	3,1	3,2	4,9	4,3	4,3	4,8	5,0
18 : 1	Ac. oleico	78,0	75,9	72,7	72,7	74,4	74,1	76,9
18 : 2	Ac. linoleico	4,2	3,8					
18 : 3	Ac. linolenico	0,3		2,5	3,1	3,2	3,1	2,5
20 : 0	Ac. arachico		0,1					

¹Trad.= estrazione tradizionale, ²SFE= estrazione mediante CO₂ supercritica

I dati sono stati confrontati con una precedente analisi del 2004 effettuata presso i laboratori dell'Università di Ferrara e con quelli forniti dalla controparte ecuatoriana nel 2007 (Iterg 2007)

Tabella 7 - Acidi grassi identificati mediante analisi GC-MS di campioni di olio di *O. bataua*, ottenuti mediante differenti metodi d'estrazione

Ac. grassi identificati		UNIFE 2004 Trad.¹ %	UNIFE 2007 Trad. %	ITERG 2007 Trad. %
14 : 0	Ac. miristico	0,4		< 0,1
16 : 0	Ac. palmitico	11,7	11,1	11,7
16 : 1	Ac. palmitoleico	1,0	0,6	0,8
18 : 0	Ac. stearico	2,8	2,8	2,3
18 : 1	Ac. oleico	80,7	81,9	81,7
18 : 2	Ac. linoleico	2,3	1,0	2,3
18 : 3	Ac. linolenico	0,7	< 0,1	0,6
20 : 0	Ac. arachico	0,1		< 0,1
20 : 1	Ac. eicosenoico	0,1	0,2	< 0,1

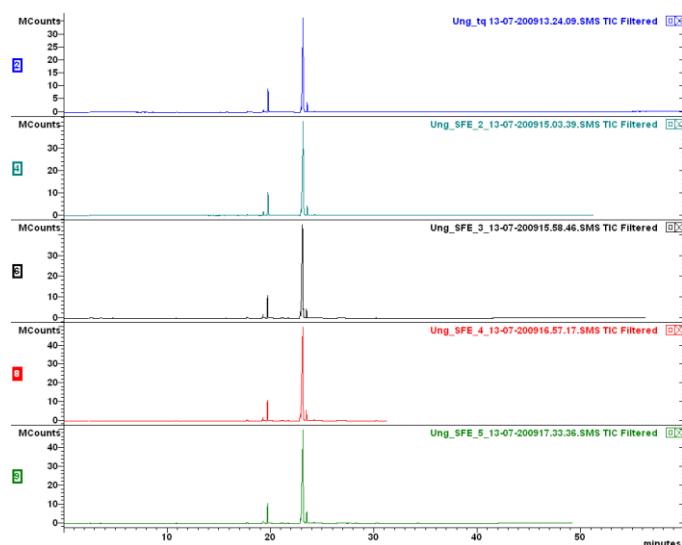
¹Trad.= estrazione tradizionale

Come possiamo vedere dalla Tabella 7, tutti i dati ottenuti fino ad oggi sono coerenti e confermano la presenza prevalente di acido oleico (80 - 81%), acido palmitico (11 - 12%), acido stearico (2 - 3%), acido linoleico (2 - 4%) unitamente a tracce di altri acidi grassi.

I dati espressi dalla tabella 7 permettono di affermare che la variazione delle condizioni di estrazione mediante fluidi supercritici non influisce sulla composizione dell'estratto finale e che non si evidenziano particolari differenze di composizione rispetto al metodo estrattivo tradizionale ed a quello mediante pressione a freddo. Quest'ultimo risultato è in accordo con i dati relativi ai parametri qualitativi indicati in Tabella 4. Possiamo affermare inoltre, che l'olio di unguahua presenta una composizione in acidi grassi simile a quella dell'olio di oliva, quest'ultimo infatti si caratterizza per la presenza di acido oleico in una quantità prossima o superiore al 70% ed acido linoleico per un 4-12% (Proserpio, 1999).

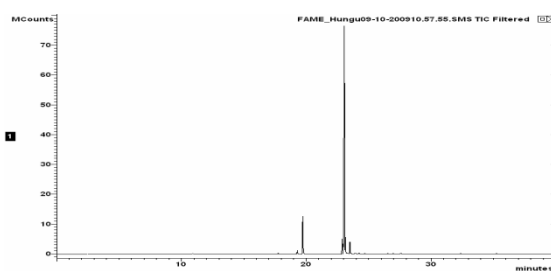
Anche in tal caso, come emerso per le attività relative alla resa di produzione, la difficoltà a reperire campioni di dattero o di olio ha reso particolarmente complessa l'attività di ricerca e ad elevato *time consuming*. Di seguito si riportano i tracciati GC - MS relativi alle estrazioni SFE eseguite su un campione di olio estratto con il metodo tradizionale, adsorbito su una matrice inerte e nuovamente estratto con fluidi supercritici.

Figura 1 – Cromatogrammi relativi all'analisi GC-MS di campioni di olio di *O. bataua* estratto con metodo tradizionale



I tracciati possono essere confrontati con quello relativo ad un campione di olio estratto direttamente dalla polpa liofilizzata del dattero:

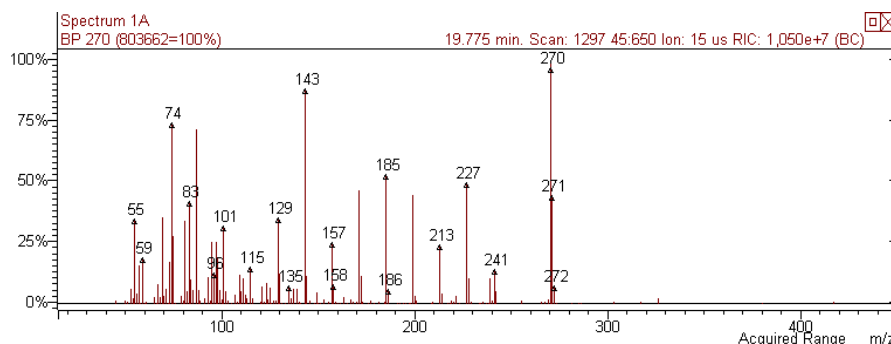
Figura 2 – Cromatogramma relativo all'analisi GC-MS di campioni di olio di *O. bataua* estratto da polpa liofilizzata

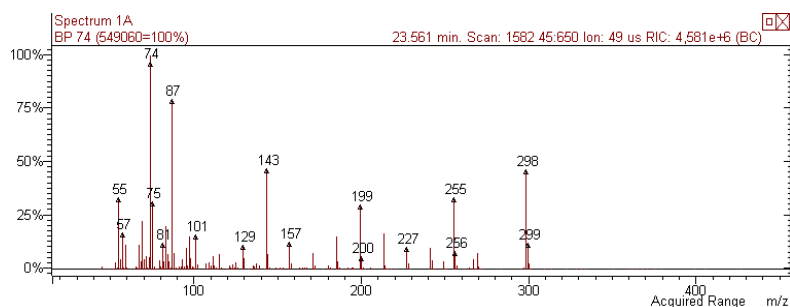
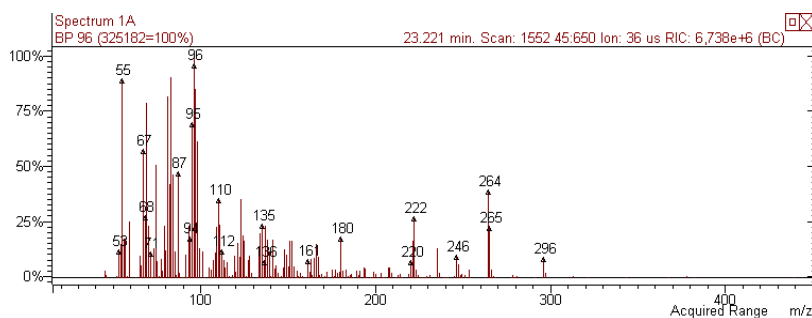


Il confronto evidenzia la sostanziale omogeneità dei dati e ci permette di affermare, nuovamente, che non si evincono evidenze analitiche particolari estraendo l'olio con il metodo tradizionale o trattandolo con l'estrazione SFE.

Si mostrano ora gli spettri MS di alcuni picchi rappresentativi dell'olio di ungruhua:

Figura 3 – Spettri MS corrispondente all'olio di di *O. bataua*





ANALISI DELLA FRAZIONE INSAPONIFICABILE

Unitamente allo studio sulla composizione degli acidi grassi dell'olio, è stata fatta l'estrazione della frazione insaponificabile sia da un campione di olio estratto con il metodo tradizionale sia da un campione di olio ottenuto mediante fluidi supercritici, la Tabella 8 mostra i risultati ottenuti:

Tabella 8 – Caratterizzazione della frazione in saponificabile dell'olio di *O. bataua*

Composti	Campione A (2007) Metodo tradizionale Area%	Campione B (2008) Metodo tradizionale Area%	Campione C (2009) SFE Area %
Squalene	0,887	0,917	1,828
Ergosta-5,7,22 triene			0,646
Campesterolo	2,479	2,562	1,746
Stigmasterolo	3,768	3,894	2,866
β-Sitosterolo	12,209	12,618	12,32
Δ-5-avenasteolo	2,559	2,645	2,599
tipo Lupeolo	14,470	14,955	17,270
Cicloartenolo	31,844	32,910	6,408
Lupeolo	14,062	14,533	34,35
24-Methylenecycloartanolo	4,826	4,987	3,152
tipo Lupeol	3,889	4,019	5,352

Di seguito vengono riportate immagini delle molecole più abbondanti della frazione insaponificabile dell'olio di unguahua.



L'analisi dei campioni in esame ha permesso di valutare due campioni di insaponificabile ottenuti da olio grezzo, ottenuto quindi con il metodo tradizionale, il terzo campione che può essere posto a confronto è stato invece ottenuto da olio estratto mediante SFE.

Pur essendo uno studio preliminare siamo in grado di ipotizzare che i metodi estrattivi influiscono sensibilmente sulla frazione insaponificabile, difatti nel campione ottenuto con il metodo tradizionale si evidenzia una quantità di cicloartenolo pari a 31,8% quasi 6 volte superiore, mentre la quantità di lupeolo risulta quasi doppia nel campione estratto con fluidi supercritici. Si evidenziano invece dati confrontabili nel caso di: campesterolo, stigmasterolo, beta – sitosterolo, altre strutture non identificate simili al lupeolo (15),

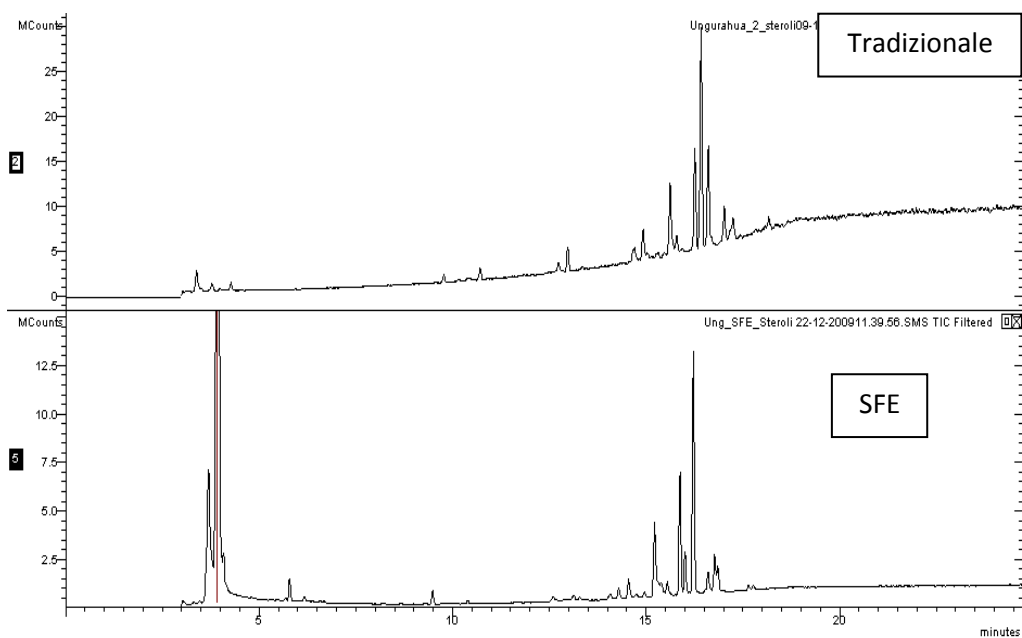
Pare dunque che l'estrazione con fluidi supercritici permetta di ottenere un estratto più ricco di componenti, che presumibilmente vengono invece persi durante il processo di estrazione tradizionale.

Come per la composizione degli acidi grassi, confrontiamo l'olio di unguahua a quello di oliva. In questo caso possiamo affermare che, almeno per quanto riguarda i campioni estratti, vi sono rilevanti differenze che meriterebbero ulteriori approfondimenti. L'insaponificabile di olio di oliva presenta una percentuale di idrocarburi insaturi elevata (70 – 80%), e lo squalene rappresenta il componente maggioritario (circa 75% sul totale degli idrocarburi insaturi). I fitosteroli e gli alcoli lineari triterpenici rappresentano le altre due frazioni maggioritarie raggiungendo rispettivamente valori compresi tra il 6 – 8% ed il 7 – 10% del totale (Proserpio, 1999).

I dati relativi all'olio di ungurahua, anche se ancora esigui per una valutazione definitiva, mostrano una netta prevalenza di composti sterolici (β-sitosterolo, lupeolo, cicloartenolo) ed una sostanziale assenza di squalene o idrocarburi insaturi.

I grafici sottostanti permettono di evidenziare ulteriormente le differenze di composizione tra il campione di insaponificabile ottenuto da olio grezzo estratto con il metodo tradizionale e quello ottenuto mediante estrazione SFE:

Figura 4 – Differenze di composizione della frazione insaponificabile dell'olio di ungurahua estratto con metodo tradizionale e SFE



STUDIO DELLA FRAZIONE NON LIPIDICA DEL DATTERO

Unitamente allo studio della frazione lipidica estratta sono stati condotti alcuni studi relativi alla composizione della frazione non lipidica, la tabella 9 mostra i risultati dello screening fitochimico.

Tabella 9 – Risultati screening fitochimico

<i>SCREENING FITOCHIMICO</i>	CAMPIONE: POLPA DI UNGURAHUA	
ESTRATTO ETereo		
<i>Saggio</i>	<i>Analita</i>	<i>Risultato</i>
SUDAN	GRASSI	POSITIVO
DRAGENDROF	ALCALOIDI	LIEVEMENTE POSITIVA
BALJET	LATTONI	NEGATIVO
ESTRATTO ETANOLICO		
<i>SAGGIO</i>	<i>ANALITA</i>	<i>RISULTATO</i>
CATECHINE	CATECHINE	NEGATIVO
FEHLING	ZUCCHERI RIDUTTORI	NEGATIVO
BALJET	LATTONI	LIEVEMENTE POSITIVA
LIBERMAN BOUCHARD	TRITERPENI STEOIDEI	POSITIVO
SCHIUMA	SAPONINE	NEGATIVO
CLORURO FERRICO	FENOLI E TANNINI	POSITIVO
NINHIDRINA	AMINOACIDI	POSITIVO
BORNTRAGER	CHINONI	POSITIVO
SHINODA	FLAVONOIDI	LIEVEMENTE POSITIVA
KEDDE	CARDENOLIDI	NEGATIVO
ANTOCIANIDINE	ANTOCIANIDINE	POSITIVO
ESTRATTO ACQUOSO		
ALCALOIDI	ALCALOIDI :	NEGATIVO
TANNINI	TANNINI	POSITIVO
FLAVONOIDI	FLAVONOIDI	NEGATIVO
ZUCCHERI RIDUTTORI	ZUCCHERI RIDUTTORI:	NEGATIVO
SAPONINE	SAPONINE	POSITIVO

Il primo studio della polpa evidenzia la presenza di alcune classi di composti potenzialmente interessanti per applicazioni cosmeceutiche come **triterpeni stereoidei, fenoli, tannini, flavonoidi e antocianidine.**

I risultati dello screening fitochimico incoraggiavano un approfondimento relativo all'attività antiossidante della frazione non lipidica. E' stato prodotto quindi un successivo estratto solido mediante percolazione in alcol 96 ° e sono stati condotti

studi relativi alla presenza di polifenoli totali e proantocianidine totali, i risultati sono esposti nella tabella 10.

Tabella 10 – Risultati analisi polifenoli totali e proantocianidine totali

	Polifenoli totali g Ac. gallico/ 100g estratto secco	Procianidine totali G Cianidin CI/ 100g estratto
Polpa Ungurahua	18,85	3,53

Il test ha confermato la presenza di una quantità discreta di polifenoli totali. Come noto in letteratura il contenuto di polifenoli è potenzialmente correlabile alla capacità antiossidante di un estratto (Soong *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2002). Si è deciso quindi di proseguire applicando allo stesso estratto i seguenti test di attività antiossidante *in vitro*:

- DPPH test
- β – carotene (bleaching test)

Ed i risultati sono riportati nella tabella 11.

Tabella 11 - DPPH test e β -carotene test dell'olio di *O. bataua*

Polpa Ungurahua	DPPH Test ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	β – carotene test ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	IC 50 = 36,50 estratto di polpa liofilizzato	IC50 = 29,58 estratto di polpa liofilizzato
	IC 50 = 5,25 Trolox, antiossidante di sintesi come controllo positivo.	IC50 = 0,14 Trolox, antiossidante di sintesi come controllo positivo.

Nel caso del DPPH test la differenza di attività tra l'estratto della polpa e l'antiossidante di sintesi di riferimento (Trolox) è di un solo ordine di grandezza e ciò si traduce in una discreta attività antiossidante dell'estratto, conclusione coerente con il contenuto di polifenoli totali. Al contrario, nel β – carotene test l'attività dell'estratto è decisamente inferiore (2 ordini di grandezza rispetto al Trolox) e indica quindi una scarsa attività antiossidante. Va considerato che il β - carotene test, per il tipo di reazioni coinvolte nella metodica, è più performante su estratti lipofili e può conseguentemente dare risultati contrastanti per estratti alcolici.

VALUTAZIONE DELLE FUNZIONALITA' COSMETICHE DELL'OLIO DI UNGURAHUA

Attività idratante

La letteratura scientifica relativa all'*Oenocarpus bataua* non è molta e sicuramente non vi sono particolari approfondimenti relativi alle funzionalità cosmetiche dell'olio. L'attività idratante di un cosmetico è un parametro ampiamente studiato e facilmente misurabile, rappresenta inoltre un'attività biologica di sicuro interesse commerciale.

La letteratura scientifica ha permesso di dimostrare da molto tempo che l'eutrofia della cute è strettamente correlata con la sua idratazione. La pelle è l'organo di frontiera del corpo umano e la sua funzione protettiva e fisiologica è strettamente correlata all'equilibrio del bilancio idrico sistemico. Va ricordato che il nostro organismo è costituito per circa il 70 % da acqua e questa rappresenta l'elemento fondamentale del citoplasma delle cellule, dei fluidi fisiologici e della quasi totalità degli eventi biochimici atti al funzionamento del nostro organismo. Il concetto di idratazione cutanea si traduce sostanzialmente nel contenuto di acqua presente nella pelle, considerando che essa è presente tanto nel derma, più profondo e complesso fisiologicamente, sia nello strato corneo dove, pur essendo prevalente la componente lipidica, vi sono proteine come la cheratina che legano molecole di acqua e mantengono quindi una preziosa riserva cutanea.

La presenza di acqua nello strato corneo conferisce alla pelle flessibilità, morbidezza, elasticità e, nel complesso, assicura il buon funzionamento di questo importante organo. Si devono però considerare le dinamiche fisiologiche alle quali è soggetto il tessuto, quindi, l'impoverimento del patrimonio idrico cutaneo può assumere quindi carattere patologico nelle forme più severe ma, più comunemente, rappresenta una delle numerose disfunzioni cutanee che delimitano nettamente il campo della cosmesi funzionale.

La carenza di idratazione cutanea porta ad una cute arida e può sfociare in problemi più complessi, screpolature, desquamazione la cui manifestazione è accompagnata da prurito e dolore (xerosi).

Le alterazioni della barriera cutanea, e di conseguenza il fenomeno della secchezza cutanea, possono essere ricondotte a molteplici cause, ecco le principali:

- uso continuativo di detergenti aggressivi;
- stati patologici;
- esposizione a vari agenti atmosferici;
- lavaggi troppo frequenti;
- eccessiva esposizione ai raggi UV;
- senescenza

Una corretta prevenzione di tali fattori rappresenta la prima difesa, quando la cute non presenta uno stato patologico il problema è tipicamente cosmetico ed appunto la cosmesi funzionale o la cosmeceutica devono dare le risposte adeguate.

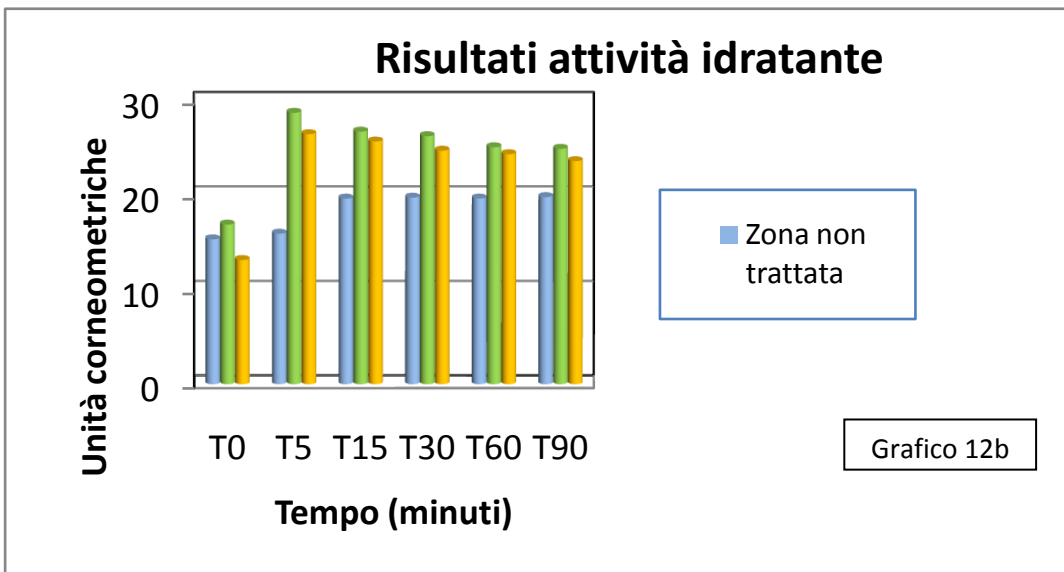
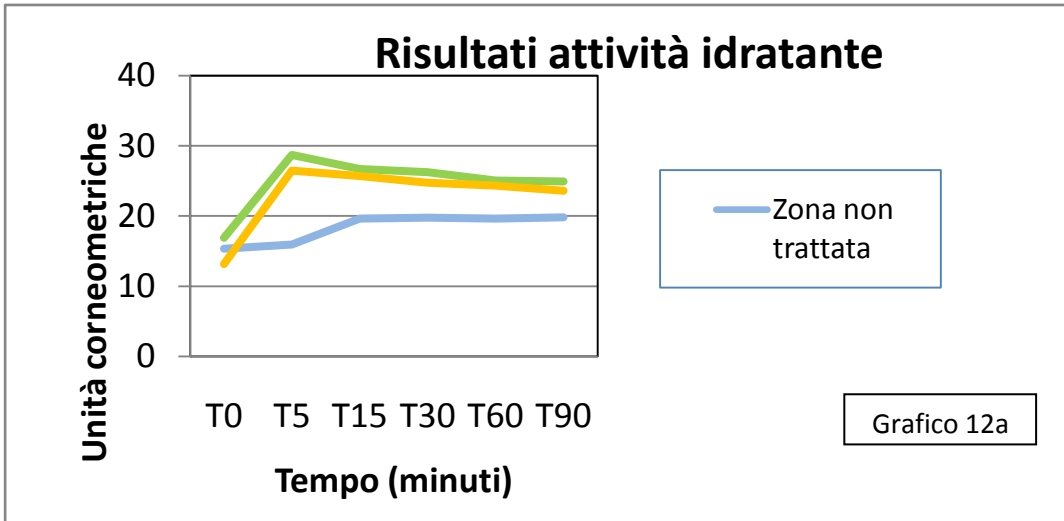
Ripristinare la corretta idratazione cutanea significa quindi proteggere e ricostituire il film idrolipidico cutaneo, la cui composizione è complessa e suddivisa in due frazioni, quella lipidica e quella idrosolubile.

Idratare significa quindi apportare alla pelle sostanze che reintegrano il film idrolipidico o ne favoriscono l'azione. Si possono apportare sostanze umettanti (polialcoli, poliglicoli, polietilenglicoli, ecc.) sostanze occlusive, che limitano la perdita di umidità mediante traspirazione ma favoriscono la comedogenesi (vaseline e petrolati), corpi lipidici di derivazione vegetale (oli, burri, cere) che sono decisamente più biocompatibili e di facile assorbimento cutaneo. Un vero reintegrante è costituito dalle varie miscele "NMF simili", altri idratanti importanti sono i polimeri idrofili (naturali e di sintesi) in grado di stendere un sottile film idratato sulla cute e, non ultimi, alcuni derivati saccaridici. L'effetto dell'olio di unguurahua è stato comparato con quello di un altro olio vegetale di comune uso cosmetico, l'olio di mandorle dolci; i due oli sono stati a loro volta comparati con una zona di cute non trattata. La valutazione del parametro è stata ottenuta mediante l'uso del corneometro ed il test è stato condotto su volontari sani informati.

Per ogni sostanza in esame sono stati quindi determinati i valori medi, i risultati sono riportati quindi nella tabella 12 e analizzati successivamente mediante i grafici 12a e 12b.

Tabella 12 – Risultati test di idratazione cutanea dell'olio di unguurahua.

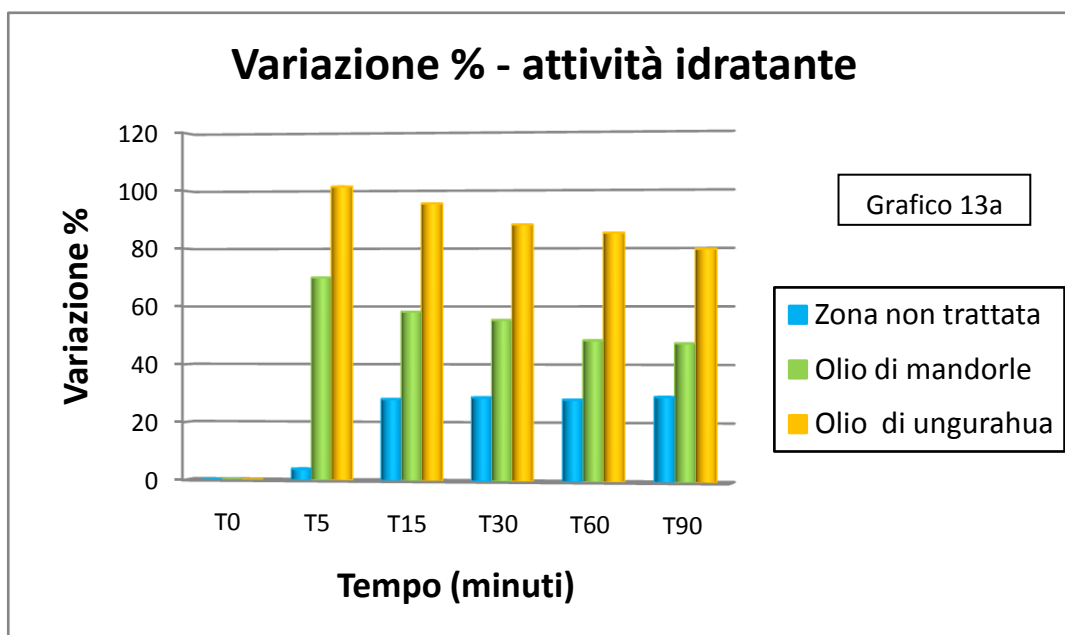
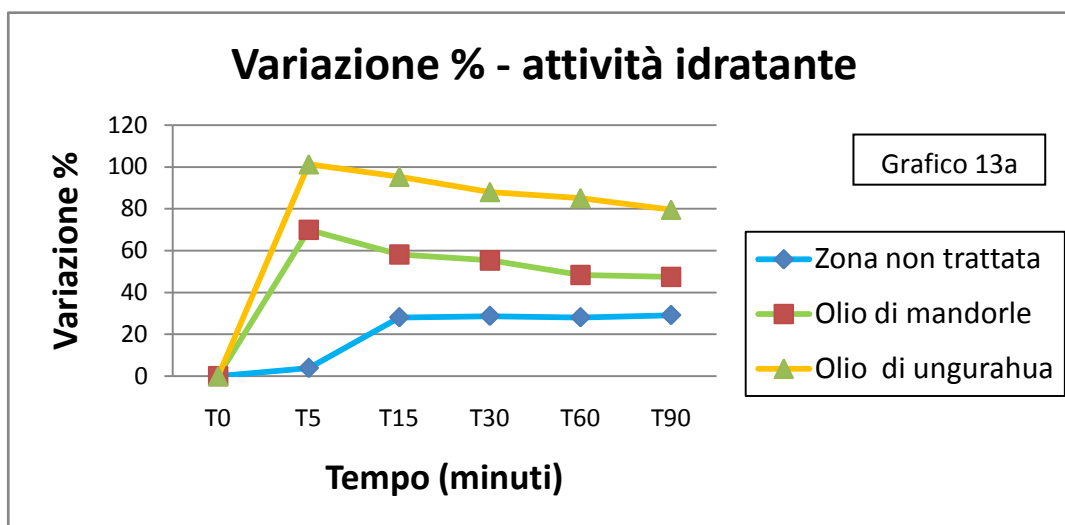
IDRATAZIONE CUTANEA	Valori ottenuti per ogni intervallo di tempo					
	T0	T5	T15	T30	T60	T90
zona non trattata	15,33	15,93	19,64	19,74	19,64	19,80
OLIO MANDORLE	16,89	28,71	26,72	26,24	25,07	24,90
OLIO UNGURAHUA	13,14	26,45	25,67	24,71	24,33	23,60



Di seguito sono riportati i risultati relativi alla variazione percentuale (tabella 13 e grafici 13a e 13b).

Tabella 13 – Valori di variazione percentuale del test di idratazione cutanea dell’olio di unguurahua.

IDRATAZIONE CUTANEA VARIAZIONE %	Valori ottenuti per ogni intervallo di tempo					
	T0	T5	T15	T30	T60	T90
zona non trattata	0	3,91	28,11	28,77	28,11	29,16
OLIO MANDORLE	0	69,98	58,20	55,36	48,43	47,42
OLIO UNGURAHUA	0	101,31	95,36	88,05	85,16	79,60



Il test evidenzia, soprattutto analizzando i dati di variazione %, che l'olio di unguahua possiede una buona attività idratante, superiore o quantomeno paragonabile a quella del più comune olio di mandorle dolci, prodotto molto utilizzato e rinomato in cosmetologia. Va soprattutto sottolineato però, che entrambi gli emollienti danno un aumento significativo dell'idratazione rispetto al campione di cute non trattata.

Elasticità cutanea

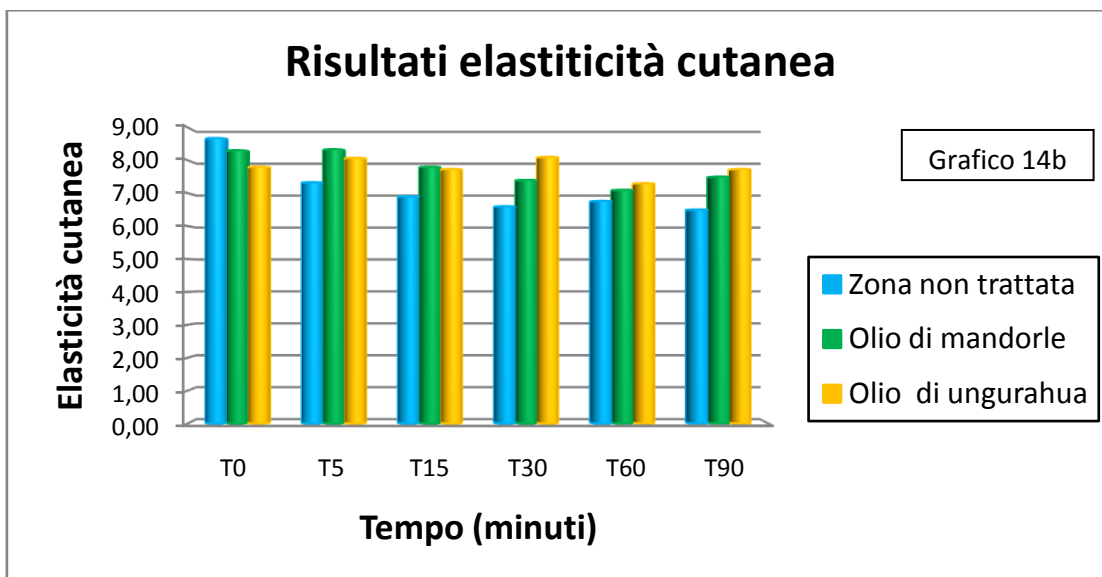
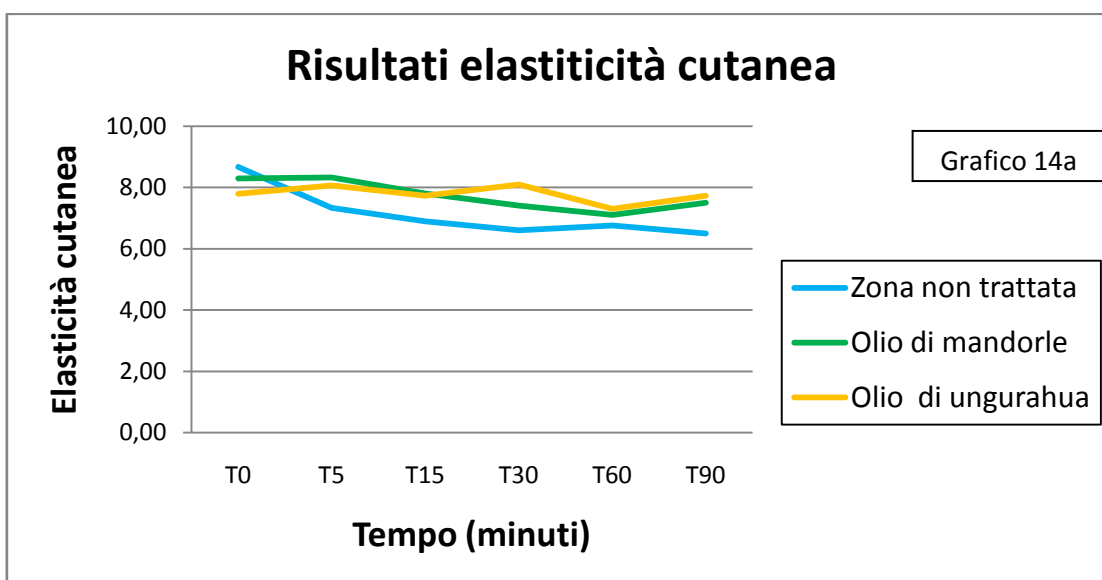
Anche in tal caso si tratta di un parametro rilevante per lo studio di applicazioni cosmetiche delle materie in esame. L'elasticità cutanea rappresenta la capacità di un tessuto di tornare alla normalità a seguito di una variazione della tensione. Come per l'idratazione cutanea si tratta di un parametro che indica la buona salute della pelle ed il mantenimento delle migliori caratteristiche estetiche. La buona elasticità cutanea è quindi conseguenza della buona salute dei tessuti cutanei e l'elastina gioca un ruolo fondamentale.

Le fibre elastiche sono presenti nel derma superficiale, appena al di sotto dell'epidermide e sono intrecciate con fibre di collagene con le quali formano un reticolo in grado di rendere la cute di dare alla cute tonica ed elastica. La gravidanza, la senescenza e le brusche variazioni di peso sono fattori fisiologici che influenzano l'elasticità dei tessuti; esistono però processi di degenerazione fisiologica dovuti al fotoaging ed alla presenza di radicali liberi, portano a variazioni del tessuto cutaneo ed alla conseguente diminuzione dell'elasticità cutanea.

Anche in tal caso, per ogni sostanza in esame sono stati quindi determinati i valori medi, i risultati sono riportati quindi nella tabella 14 e analizzati successivamente mediante i grafici 14a e 14b.

Tabella 14 – risultati test di elasticità cutanea dell’olio di unguhahua. .

ELASTICITA’ CUTANEA	Valori ottenuti per ogni intervallo di tempo					
	T0	T5	T15	T30	T60	T90
zona non trattata	8,67	7,33	6,90	6,60	6,78	6,50
OLIO MANDORLE	8,30	8,33	7,80	7,40	7,10	7,50
OLIO UNGURAHUA	7,80	8,07	7,73	8,10	7,30	7,73



Il campione di unguhahua non ha evidenziato invece un effetto significativo in relazione all’elasticità cutanea. Va detto che il risultato del test sembra apportare dubbi sulla metodica utilizzata. Di fatto, la misura dell’elasticità cutanea a breve termine ha evidenziato modifiche non significative di questo parametro cutaneo da parte di nessuno degli estratti esaminati, si nota anzi un comportamento non coerente anche per quanto riguarda la zona non trattata.

SVILUPPO DI PROTOTIPI DI PRODOTTI COSMETICI A BASE DI OLIO DI UNGURAHUA

Sviluppo prototipi cosmetici

Lo stadio finale del progetto di ricerca sviluppato nel corso di questa tesi è stato caratterizzato dallo sviluppo di formulazioni cosmetiche contenenti olio di ungurahua. Parallelamente all'ottimizzazione dei metodi di estrazione dell'olio si sono sviluppati prototipi formulativi all'interno dei quali l'olio di ungurahua viene considerato un emoliente ed idratante naturale.

L'olio è stato utilizzato come componente della fase grassa in creme idratanti e nutrienti, come ingrediente in oli per massaggi e per l'ottenimento di saponi solidi mediante saponificazione, con il metodo classico dell'impasto a freddo.

La fase di sviluppo di prodotti cosmetici si è articolata in due momenti: un primo sviluppo di formule cosiddette "tradizionali", quindi non soggette alle normative della cosmesi ecologica e biologica; il passaggio successivo è stato lo sviluppo di prodotti certificabili secondo le indicazioni ECOCERT.

Le due definizioni di cosmesi citate servono semplicemente a descrivere due tipologie di prodotti che, pur rispettando le normative vigenti, si affidano a strategie formulative differenti. La necessità di sviluppare le due tipologie di formule ha caratterizzato anche l'andamento del progetto di sviluppo in Ecuador e le richieste dei mercati. La linea di cosmesi tradizionale sviluppata per la controparte ecuadoriana guadagnava porzioni di mercato a livello nazionale, dall'Europa e dagli Stati Uniti arrivavano invece richieste per un restyling dei prodotti ispirati appunto ai disciplinari di "ecobio" cosmesi.

In questo lavoro si vuole assumere una posizione assolutamente non dogmatica o ideologica nei confronti delle due filosofie.

Il panorama attuale delle certificazioni in ambito cosmetico è in continua mutazione e, a livello europeo, i vari enti certificatori stanno armonizzando il proprio lavoro nella normativa COSMOS.

Come accennato, lo sviluppo delle formule tradizionali e di quelle biologiche risponde anche a concrete esigenze del progetto VIS in Ecuador, la creazione di una linea cosmetica per il mercato locale e la realizzazione di prototipi più adatti al mercato europeo e statunitense.

Come accennato, le differenti normative presentano, anche se in forme diverse, delle liste di materie prime approvate o vietate. I criteri che regolano la scelta sono stati

precedentemente citati e possono essere facilmente intesi analizzano alcune materie prime approvate. Le tabelle 15 e 16 permettono di evidenziare le differenze tra due formulazioni simili ma fedeli alle due scelte formulistiche precedentemente descritte:

Tabella 15 – esempio formula tradizionale

CREMA FLUIDA ALLA CITRONELLA	
Ingredients INCI Name	%
Isopropyl Palmitate	9,0
<i>Oenocarpus bataua</i>	3,0
Cetearyl Alcohol, Cetareth – 20	4,0
<i>Theobroma cacao</i>	2,0
Dimethicone	1,0
Tocopheryl Acetate	1,0
Aqua, Propylene Glycol, Faex	1,0
Phenoxyethanol, Methyl paraben, Ethylparaben, Butylparaben, propylparaben, isobutylparaben	0,4
Olio essenziale *	0,2
Citric acid	0,005
Aqua	78,4
Totale	100,0

Tabella 16 – esempio di formula BIO

Ingredients INCI Name	Origine vegetale		%
Water			76,2
<i>Oenocarpus bataua</i>	X	Biologico	10,0
Cetearyl alcohol	X	Approvato	3,7
Isopropyl myristate	X	Approvato	2,5
Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside (Montanov 68)*	X	Approvato	2,1
Arachidyl Alcohol and Behenyl Alcohol and Arachidyl Glucoside (Montanov 202)*	X	Approvato	2,0
<i>Theobroma cacao</i>	X	Biologico	1,0
Undecylenoyl Glicine (Lipacide C8G)*	X	Approvato	1,0
Potassium sorbate		Approvato	0,5
Sodium benzoate		Approvato	0,5
<i>Citrus lemon</i> (essential oil)	X	Biologico	0,3
Citric acid		Approvato	0,1
Xantan gum		Approvato	0,1
			Tot. 100,0

La differenza fondamentale tra le due formulazioni nasce dall'esigenza di sostituire le materie prime della formula tradizionale che i disciplinari ECOCERT vietano, in sintesi:

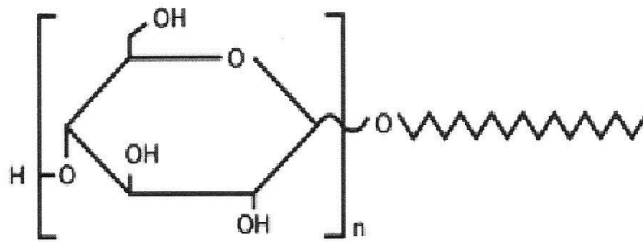
- ✓ Sostituire l'emulsionante etossilato (Cetearyl Alcohol, Cetareth – 20 – Emulgade 1000 NI) con uno approvato (Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside - Montanov 68);
- ✓ Eliminare i derivati siliconici (Dimethicone - Dow corning 200)
- ✓ Eliminare gli ingredienti che contengono glicole propilenico (Aqua, Propylene Glycol, Faex - Vitamina B complex)
- ✓ Sostituire il sistema preservante basato sui parabeni (Phenoxyethanol, Methyl paraben, Ethylparaben, Butylparaben - Phenova) con altre molecole, altrettanto efficaci, ma approvate dal disciplinare ECOCERT (Undecylenoyl Glicine - Lipacide C8G, Sodium benzoate, Potassium sorbate)

Esaminiamo in dettaglio il tipo di emulsionante scelto per il restyling “ecobio”, esso risponde al nome INCI: Cetearyl alcohol and Cetearyl glucoside (serie Montanov della Seppic⁸). Si tratta di glucolipidi ottenuti da derivati di origine naturale quali glucosio e oli vegetali. Le fonti naturali sono rispettivamente grano, mais o manioca per la frazione glucosidica e la colza ed il cocco per gli oli vegetali. Le coltivazioni da cui derivano devono essere “OGM free”

L'alcol cetilstearyllico si ottiene per frazionamento della miscela di alcoli grassi ottenuti per idrogenazione degli acidi grassi dell'olio di cocco. L'idrogenazione è preceduta dalla saponificazione dei trigliceridi degli oli vegetali vengono saponificati ed idrogenati, successivamente si separano gli alcoli frazionando la miscela olio di cocco. La successiva reazione di condensazione tra alcoli grassi e derivati glucosidici porta alla formazione di un legame glicosidico particolarmente resistente all'idrolisi.

⁸ <http://www.seppic.com/>

Figura 5 – struttura degli emulsionanti delle serie Montanov



L'intero processo non prevede l'uso di solventi organici o reagenti chimici in grado di lasciare residui, difatti sia la saponificazione che la condensazione appartengono alla lista dei processi chimici permessi dai disciplinari biologici (Cosmos Standard Guideline, 2009). L'emulsionante ottenuto presenta quindi una parte idrofila costituita dalla frazione glucosidica ed una lipofila rappresentata dalla catena dell'acido grasso. Grazie alla struttura glucolipidica, questi emulsionanti offrono un'alternativa a quelli etossilati e non presentano il problema della possibile presenza di tracce di solventi, ossido di etilene o diossano.

Altre molecole di interesse cosmetico e di provenienza vegetale sono i lipoaminoacidi. Anche in questo caso si parte da risorse vegetali OGM free. Le proteine dell'avena o del girasole subiscono una reazione di idrolisi che permette la successiva estrazione dell'aminoacido glicina, dall'olio di cocco l'acido ottanoico o caprilico. Il risultato della reazione di acilazione è (INCI: Capryloyl glycine) è un ingrediente funzionale particolarmente interessante per le applicazioni cosmeceutiche. Oltre a costituire un vettore cutaneo per la glicina la sua struttura permette una blanda acidificazione cutanea. E' stata inoltre dimostrata l'efficacia del lipoaminoacido nel lenire gli effetti della dermatite seborroica ed i problemi correlati all'eccessiva produzione sebacea grazie all'attività inibente nei confronti di *Pytyrosporum ovale* e della 5 α -reduttasi. Infine, i lipoaminoacidi utilizzati nel presente lavoro rappresentano dei sistemi conservanti "alternativi" ed approvati dalle normative biologiche, in quanto il loro utilizzo consente una buona performance in termini di stabilità microbiologica ed una diminuzione della dose dei conservanti tradizionali⁹ necessaria per assicurare la stabilità microbiologica del prodotto.

⁹ Documentazione scientifica SEPPIC - Lipacide™ C8G, Lipacide™ UG

Un altro lipoaminoacido particolarmente interessante può essere ottenuto dall'acilazione della glicina con acido undecilenico, le caratteristiche sono riconducibili a quelle della già citata capriloil glicina.

Nel caso del presente studio sono state sviluppate alcune emulsioni e le ulteriori scelte formulative sono ovviamente vincolate all'utilizzo di oli vegetali, sia per dare corpo ed emolienza alla crema, sia per le già citate finalità di valorizzazione di materie prime locali. Le profumazioni di sintesi sono state sostituite da oli essenziali e non sono stati utilizzati coloranti.

Strategie ed evidenze per lo sviluppo dei prototipi cosmetici

Come evidenziato nei capitoli introduttivi, il seguente lavoro di dottorato unisce alle finalità di ricerca la necessità di produrre risultati tangibili a favore delle controparti latino americane. Lo sviluppo dei prodotti si può quindi suddividere in due processi distinti che hanno finalità differenti.

Il primo gruppo di formule, racchiuse nel paragrafo 3.3.4, rappresenta la linea cosmetica che tuttora fa parte dei prodotti in commercio in Ecuador. Le formulazioni rispondevano ad una precisa esigenza del 2007 in cui la controparte locale doveva sviluppare una linea cosmetica atta al mercato ecuatoriano. In questo caso si sono scelte appunto delle formulazioni più comuni e non ancora ispirate agli standard della ecobio cosmesi.

Il paragrafo 3.3.5 invece descrive il lavoro di sviluppo prodotti che porterà ad un restyling della linea tradizionale o ad una sua versione più appetibile per il mercato europeo. In questo caso appunto le linee guida sono quelle del disciplinare ECOCERT

Formulazioni tradizionali

Sono state sviluppate **14 formule** contenenti diverse percentuali di olio d'ungurahua.

Le formule possono essere raggruppate nei seguenti gruppi:

- 4 oli per massaggi - contenuto ungurahua **40.0%**
- 1 olio repellente contro gli insetti - contenuto ungurahua **40.0%**
- 2 emulsioni consistenti - contenuto ungurahua **4.0%**
- 2 emulsioni fluide - contenuto ungurahua **3.0%**
- 4 saponi solidi - contenuto ungurahua **13.0%**
- 1 crema capillare - contenuto ungurahua **6.0%**

Ad eccezione della crema capillare all'ungurahua e dei saponi solidi, che sono in una fase di sperimentazione iniziale, tutte le altre formulazioni sono state sottoposte a studi di stabilità a temperatura ambiente.

Dopo **3 mesi** dall'inizio dello studio **non si sono verificati eventi sfavorevoli** relativi alle formulazioni o all'interazione con il packaging (compatibilità), non si sono evidenziate quindi delle variazioni considerevoli delle caratteristiche organolettiche (aspetto, colore, odore) della consistenza e del pH dei prodotti.

Sono stati condotti, con esito positivo, anche gli studi di stabilità accelerata a 40°C.

Formulazioni Ecologiche e Naturali secondo disciplinare ECOCERT

Come anticipato, una fase successiva dello sviluppo di prototipi formulativi ha portato alla creazione di tre emulsioni che rispettano i disciplinari ECOCERT (vedi tabella 17, 18, 19)

Tabella 17 - **Emulsione A** – formula ecologica e biologica secondo disciplinare ECOCERT

Ingredients INCI Name	Origine vegetale		%
Water			76,2
<i>Oenocarpus bataua</i>	X	Biologico	10,0
Cetearyl alcohol	X	Approvato	3,7
Isopropyl myristate	X	Approvato	2,5
Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside	X	Approvato	2,1
Arachidyl Alcohol and Behenyl Alcohol and Arachidyl Glucoside	X	Approvato	2,0
<i>Theobroma cacao</i>	X	Biologico	1,0
Undecylenoyl Glicine	X	Approvato	1,0
Potassium sorbate		Approvato	0,5
Sodium benzoate		Approvato	0,5
<i>Citrus lemon</i> (essential oil)	X	Biologico	0,3
Citric acid			0,1
Xantan gum		Approvato	0,1
			Tot. 100,0

Tabella 18 - **Emulsione C** - formula ecologica e biologica secondo disciplinare ECOCERT

Ingredients INCI Name	Origine vegetale		%
Water			76,4
<i>Oenocarpus bataua</i>	X	Biologico	7,0
<i>Theobroma cacao</i>	X	Biologico	3,0
Isopropyl myristate	X	Approvato	3,0
C14-C22 Alkylalcohol and C12-20 Alkylglucoside	X	Approvato	3,0
Myristyl Alcohol and Myristyl Glucoside	X	Approvato	2,0
Caprylic/capric Triglyceride	X	Approvato	2,0
Dipalmitoil Hydroxyproline	X	Approvato	1,0
Undecylenoyl Glicine	X	Approvato	1,0
Potassium sorbate		Approvato	0,5
Sodium benzoate		Approvato	0,5
<i>Lemon grass (essential oil)</i>	X	Biologico	0,3
Xantan gum		Approvato	0,2
Citric acid			0,1
			Tot. 100,0

Tabella 19 - **Emulsione C** - formula ecologica secondo disciplinare ECOCERT

Ingredients INCI Name	Origine vegetale		%
Water		Approvato	79,8
Isopropyl palmitate	X	Approvato	6,0
<i>Oenocarpus bataua</i>	X	Biologico	5,0
Cetearyl Alcohol and Cetearyl Glucoside	X	Approvato	5,0
Cetearyl alcohol	X	Approvato	1,0
Capryloyl Glycine	X	Approvato	1,0
<i>Lemon grass (essential oil)</i>	X	Biologico	1,0
Potassium sorbate		Approvato	0,5
Sodium benzoate		Approvato	0,5
Xantan gum		Approvato	0,2
			Tot. 100,00

Per le tre formule sono stati adottati i seguenti parametri di valutazione:

Parametro ECOCERT 1

La % degli ingredienti naturali e di origine naturale deve essere > 95%

Parametro ECOCERT 2

Gli ingredienti vegetali certificati biologici devono essere superiori al 50% per le formule definite “Ecologiche” e superiori al 90% per le formule definite “Ecologiche e Biologiche”

Parametro ECOCERT 3

La totalità degli ingredienti certificati biologici deve essere superiore al 5% per le formule definite “Ecologiche” e superiori al 10% per le formule definite “Ecologiche e Biologiche”

Sono stati inoltre evitati ingredienti non ammessi dal disciplinare. Vediamo ora nello specifico (Tabella 20) la valutazione di ogni formula secondo i criteri di certificazione ECOCERT.

Tabella 20 – Valutazione delle formule bio secondo i criteri di ammissibilità ECOCERT

Formula	Parametro 1	Parametro 2	Parametro 3	Vautazione finale
Emulsione A	99 %	100 %	11,2 %	Cosmetico Ecologico e Biologico
Emulsione B	99 %	100 %	10,3 %	Cosmetico Ecologico e Biologico
Emulsione C	99 %	100 %	6,0 %	Cosmetico Ecologico

Delle tre formule riportiamo i risultati degli studi di stabilità in vetro (tabelle 21, 22, 23). Gli studi sono stati condotti alle seguenti temperature: 4°C, Temperatura Ambiente (RT) e 40°C. I campioni sono stati controllati rispettivamente dopo 1, 2 e 5 mesi. Per i campioni a temperatura ambiente sono stati valutati i caratteri organolettici (aspetto, colore, profumo), il pH e la viscosità.

Tabella 21 - **Emulsione A** – risultati studio di stabilità chimico-fisica.

Parametri	4°C	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		5,2 – 5,4	5,3	5,3
Parametri	RT	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		5,2 – 5,4	5,3	5,4
Viscosità		11.000 – 12.000	13.000 – 13.500	14.000 - 15.000
Parametri	40°C	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		5,2 – 5,4	5,3	5,4

L'emulsione A non ha evidenziato particolari variazioni allo studio di stabilità, solo un lieve e stabilizzato aumento della viscosità rispetto al tempo zero.

Tabella 22 - **Emulsione B** – risultati studi stabilità chimico-fisica

Parametri	4°C	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		5.0 – 5.2	5,2	5,1
Parametri	RT	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		5.0 – 5.2	5,3	5,2
Viscosità		16.000 – 18.000	21.000 – 22.000	17.000 – 18.000
Parametri	40°C	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Parzialmente conforme
Colore		Conforme	Conforme	Lievemente ingiallito
Profumo		Conforme	Conforme	Parzialmente diminuito
pH		5.0 – 5.2	5,5	5,2

L'emulsione B ha presentato una minore stabilità alle alte temperature senza presentare comunque coalescenza temperatura ambiente, il prodotto ha evidenziato una lieve variazione della colorazione ed una più significativa perdita del profumo alle alte temperature.

Tabella 23 - **Emulsione C** – risultati studi stabilità chimico-fisica

Parametri	4°C	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		4,9 – 5,1	5.0	4,9
Parametri	RT	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		4,9 – 5,1	4,9	4,8
Viscosità		7.000 – 9.000	11.000 – 12.000	11.000 – 12.000
Parametri	40°C	T0	T1	T5
Aspetto		Conforme	Conforme	Conforme
Colore		Conforme	Conforme	Conforme
Profumo		Conforme	Conforme	Conforme
pH		4,9 – 5,1	5,0	5,0

L'emulsione C non ha evidenziato particolari variazioni.

Per tutte le emulsioni si è scelto un pH finale leggermente acido dovuto alla presenza di lipoaminoacidi con funzione coadiuvante nei confronti del sistema preservante. Tali lipoaminoacidi presentano una maggiore funzionalità e pH compresi tra 5.0 e 5.5.

Delle tre formule bio sono stati effettuati anche i Challenge Test, studi che permettono di verificare la stabilità microbiologica che identificano lo studio della , riportiamo di seguito i risultati (tabelle 24, 25, 26) .

Tabella 24 - **Emulsione A** – Risultati studio di stabilità microbiologica.

Microrganismi	T0	T2 gg	T7 gg	T14 gg	T28 gg
<i>Escherichia coli</i>	7,5	2,9	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,2	2,9	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	2,9	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	6,1	1,9	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	6,3	1,9	0	0	0

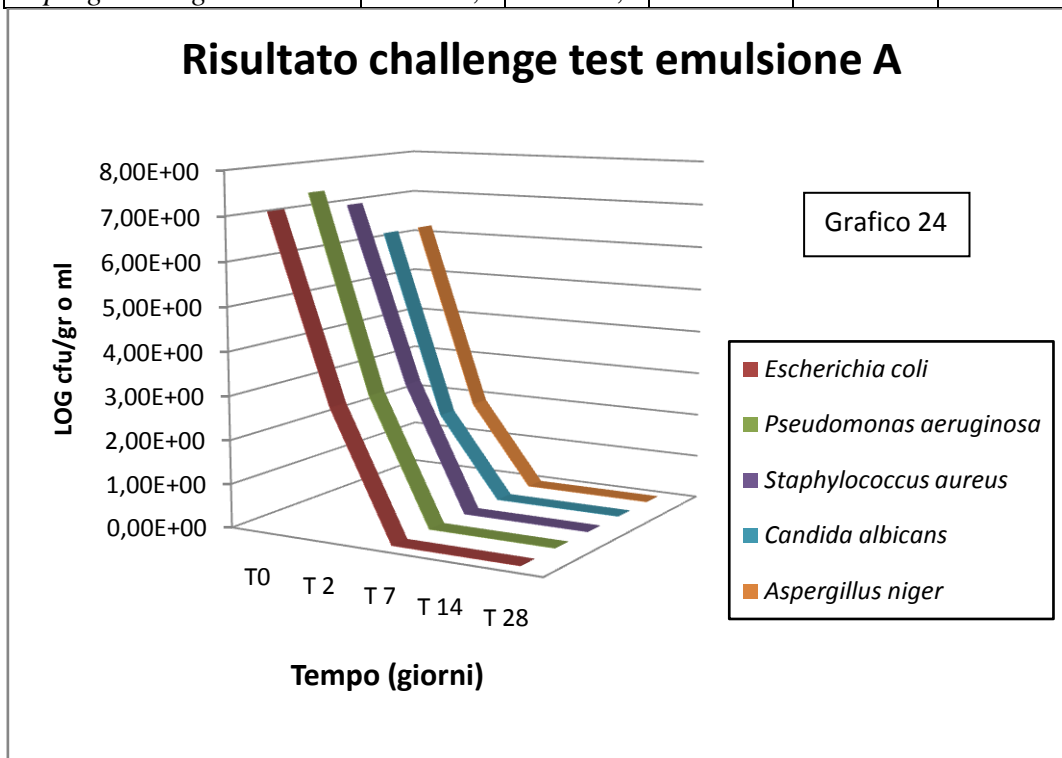


Tabella 25 - **Emulsione B** – Risultati studi stabilità microbiologica.

Microrganismi	T0	T2 gg	T7 gg	T 14 gg	T28 gg
<i>Escherichia coli</i>	7,1	2,9	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,4	2,9	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,0	2,9	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	6,2	1,9	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	6,2	1,9	0	0	0

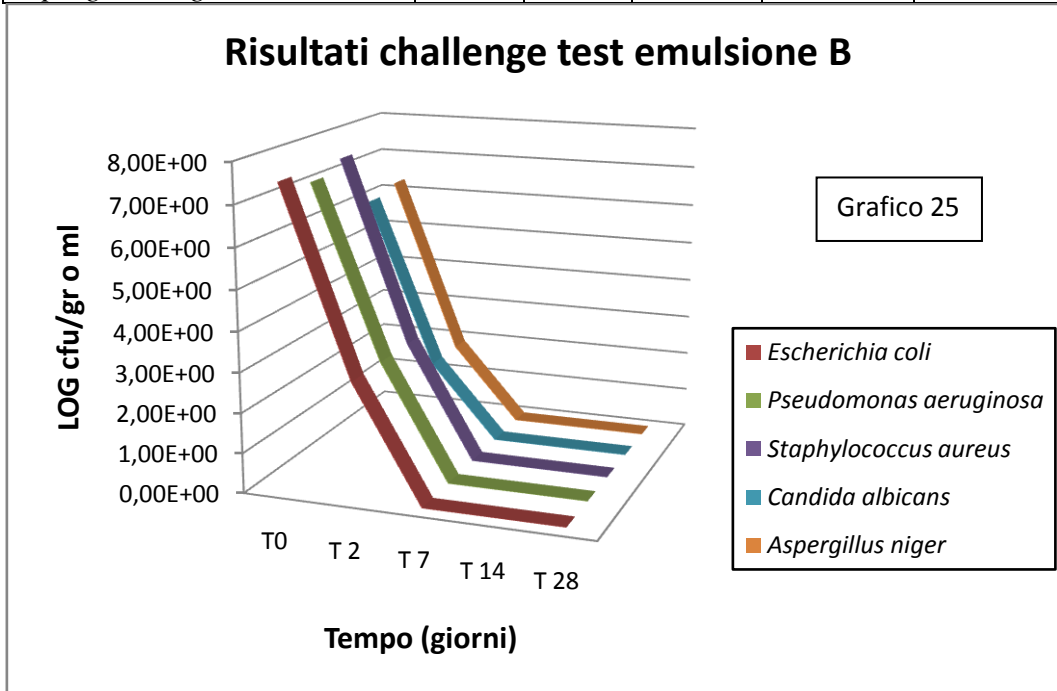
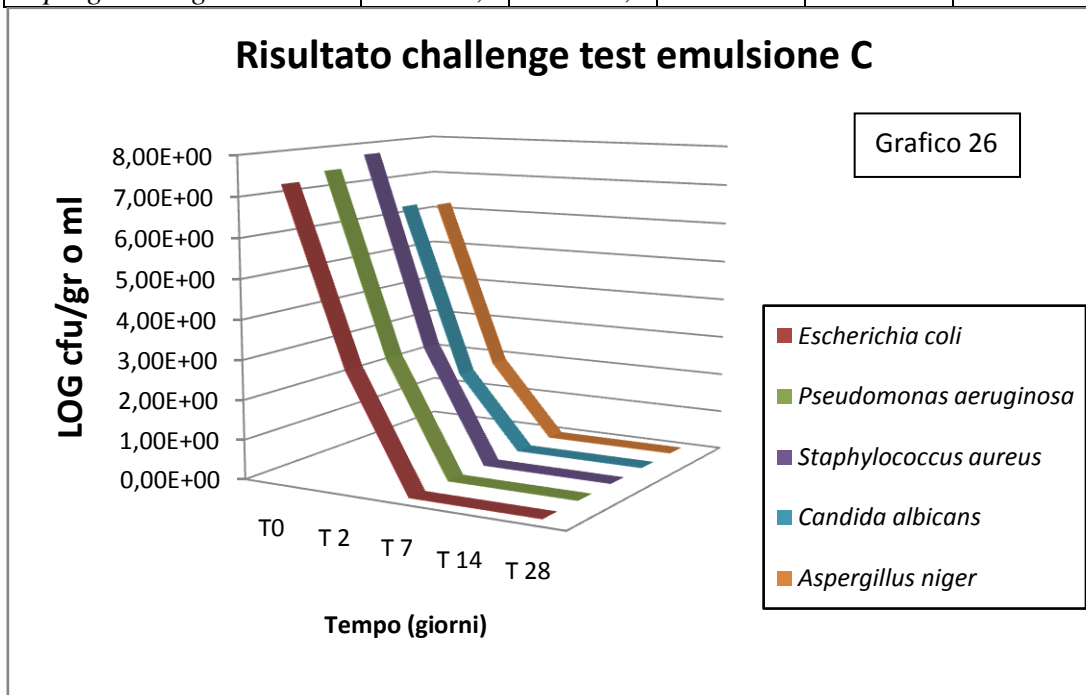


Tabella 23 - **Emulsione C** – Risultati studi stabilità chimico-fisica

Microrganismi	T0	T 2gg	T 7gg	T 14 gg	T 28 gg
<i>Escherichia coli</i>	7,3	2,9	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,5	2,9	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,8	2,9	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	6,3	1,9	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	6,2	1,9	0	0	0



I risultati dei challenge test sono positivi in quanto le colonie si negativizzano in tutti i casi prima del settimo giorno. Il risultato assume un discreto interesse dal punto di vista formulativo perché le tre formule testate presentano un sistema conservante composto da molecole approvate dai disciplinari ECOCERT. Si dimostra inoltre che per entrambi i lipoaminoacidi testati, capriloil glicina e undecinoleil glicina, l'effetto sinergico in presenza di conservanti alimentari risulta essere efficace. Va considerato comunque, che lo studio sull'efficacia del sistema conservante potrebbe essere approfondito con altre molecole anch'esse approvate dai disciplinari ECOCERT.

5 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di dottorato è stato ideato e sviluppato nell'ottica di sperimentare un percorso di collaborazione tra la ricerca scientifica e la cooperazione internazionale allo sviluppo, con la finalità di produrre dati di interesse scientifico ma, al contempo, di creare delle soluzioni applicative che possano dare un impatto positivo nei confronti di un determinato contesto di cooperazione internazionale.

Il lavoro di ricerca prevedeva di individuare ed isolare, da specie botaniche amazzoniche d'interesse etnocosmetico, oli vegetali o altri fitocomplessi, studiarne la composizione, sperimentare alcuni metodi alternativi di estrazione e testare eventuali funzionalità cosmetiche. L'intero progetto ha trovato poi espressione nella realizzazione di una linea di prototipi cosmetici di cui verrà studiata la stabilità microbiologica e chimico-fisica. Alcuni prototipi verranno formulati secondo le direttive della cosmesi biologica e naturale. All'inizio del presente lavoro, come accennato nell'introduzione, si è deciso di seguire il disciplinare ECOCERT.

L'obiettivo della ricerca del primo anno di dottorato si è articolato secondo una duplice strategia:

- 1) una prima individuazione delle fonti botaniche da valutare per la presenza delle materie prime di interesse cosmetico;
- 2) la selezione e l'estrazione di oli vegetali caratteristici della zona sud orientale dell'Ecuador;
- 3) la caratterizzazione della composizione chimica degli oli selezionati;
- 4) lo sviluppo di alcuni prototipi formulativi cosmetici a partire da olio di *Oenocarpus bataua*;
- 5) la realizzazione di alcuni test di attività biologica di interesse cosmetico.

L'individuazione delle fonti vegetali amazzoniche da investigare si è concretizzata ricorrendo a metodi etnofarmacobotanici classici e facendo leva sulla consolidata rete di eventi di tipo esperienziale, produttivo ed investigativo presente nella regione amazzonica dell'oriente ecuadoriano.

L'obiettivo della ricerca del secondo anno di dottorato si è strutturato in due percorsi:

- 1) sperimentazione di metodi estrattivi alternativi e da applicare in aree rurali;
- 2) realizzazione di prototipi cosmetici certificabili ECOCERT .

Tra il primo e secondo anno di dottorato si è deciso di focalizzare l'attenzione su di una specie, l'*Oenocarpus bataua*, ed in modo più specifico sull'olio ottenuto dal dattero e sui possibili usi cosmetici.

L'obiettivo della ricerca del terzo anno di dottorato si è concentrato su tre aspetti:

- 1) analisi gascromatografica dell'insaponificabile dell'olio di unguhua
- 2) studi di purificazione dell'olio mediante estrazione con fluidi supercritici
- 3) stabilità chimico fisica e microbiologica dei prototipi formulativi ECOCERT

Con l'analisi gascromatografica dei vari componenti dell'olio si è potuto completare il lavoro di caratterizzazione chimica ed affiancarlo alle prove di funzionalità cosmetica ed alla realizzazione dei prototipi "bio". La realizzazione di prodotti cosmetici a partire dall'olio di unguhua rappresenta un elemento di elevata rilevanza per le controparti latino americane in quanto apre opportunità di sviluppo applicativo basate su di una risorsa naturale locale.

Le suddette fasi della ricerca hanno trovato evoluzione e concretezza nel tempo attraverso rapporti cooperativi che coinvolgono istanze di ricerca di cui fanno parte le Università di Ferrara e l'Università Politecnica Salesiana con il "Centro de Investigación y Valorización de la Biodiversidad" (CiVaBi, Quito, Ecuador), e realtà produttive (Fundación Chankuap, Macas, Ecuador), con il supporto esperienziale della ONG italiana VIS (Volontariato Internazionale per lo Sviluppo).

La peculiarità del presente lavoro è la ricerca di un percorso scientifico multidisciplinare che volge alla valorizzazione della biodiversità locale, qui rappresentata dalla specie *Oenocarpus bataua*.

La strategia di ricerca ha toccato tutti gli ambiti relativi alle scienze cosmetiche e molti aspetti relativi allo studio dei prodotti di origine vegetale e della fitochimica in generale.

Esattamente come in un processo di filiera, lo studio di ricerca si è prima focalizzato sull'estrazione delle materie prime e sulle relative metodologie, approfondendo unitamente aspetti qualitativi e quantitativi. Sono stati quindi identificati i substrati d'interesse cosmetico: l'olio estratto dal dattero, l'insaponificabile dell'olio ed una frazione idrosolubile ottenuta ancora una volta dal dattero. Sui tre estratti è stato possibile condurre degli studi di funzionalità cosmetica (olio) ed attività antiossidante (frazione non lipidica della polpa). Si è deciso quindi di concentrare le attività sull'olio, che è diventato la materia prima d'elezione per lo sviluppo delle formulazioni cosmetiche. Gli studi relativi all'estrazione dell'olio hanno

dato un primo dato inaspettato. Si pensava infatti che il metodo di estrazione tradizionale, che prevede la separazione manuale della polpa del dattero e la susseguente cottura in acqua, dovesse produrre un olio con caratteristiche organolettiche e parametri di qualità decisamente inferiori rispetto all'olio spremuto a freddo. I dati ottenuti dimostrano invece, sorprendentemente, che sia l'estrazione tradizionale che la pressatura a freddo danno un olio di buona qualità alimentare e discreta qualità cosmetica. Sia per composizione in acidi grassi che per utilizzo finale, si è considerato come campione di confronto l'olio di oliva e, di conseguenza le normative ad esso applicate. Si rivaluta quindi il metodo tradizionale senza però dimenticare i vantaggi della spremitura a freddo, che permette di diminuire i tempi di produzione. Deve essere però sottolineato che per entrambi i metodi si è operato rapidamente e subito dopo la raccolta dei datteri. Si ipotizza quindi che vi siano due ulteriori fasi critiche in cui l'olio vede aumentare i valori di perossidi e indice di acidità. La prima è sicuramente la post-raccolta, quindi la fase di latenza tra la raccolta del dattero e l'estrazione dell'olio, fase che non abbiamo potuto approfondire e che esula in parte dalle motivazioni dello studio. La seconda fase critica, quella a cui probabilmente si devono dedicare le maggiori attenzioni, è quella dello stoccaggio dell'olio in seguito alla sua estrazione. Ricordiamo che questi derivati vegetali risentono della presenza di acqua, luce, calore, ossigeno e tracce di metalli, tutti fattori che inducono i processi di attivazione della perossidazione lipidica. Va inoltre considerato che l'applicazione della tecnica SFE alla polpa liofilizzata non ha dato rilevanti differenze di composizione in acidi grassi anche se pensando ad un processo industriale rappresenterebbe certamente il metodo di elezione per l'ottenimento di una materia prima ad uso cosmetico, soprattutto se pensata per prodotti certificati come biologici. L'applicazione della tecnica della distillazione molecolare deve essere intesa come ulteriore processo di purificazione, perché agisce principalmente nell'abbattimento dell'indice di acidità degli oli; si ricorda però che una corretta gestione dei processi di post-raccolta e di stoccaggio della materia prima sono fondamentali per il mantenimento della buona qualità dell'olio.

Le prime analisi fatte sull'insaponificabile dimostrano nuovamente una sostanziale equiparazione tra il metodo tradizionale e la spremitura a freddo, l'estrazione SFE sembra invece che permetta l'ottenimento di un estratto più ricco di composti. Va però considerato che questi studi devono essere approfonditi e condotti su un numero più esteso di campioni, durante i 4 anni di lavoro la reperibilità dei datteri è stata spesso compromessa da fattori ambientali e culturali. Tra i primi va considerato che la fruttificazione della palma avviene solo in due periodi dell'anno e con una distribuzione non omogenea per età delle piante e distribuzione della popolazione. A questo si aggiunge la difficoltà a coordinare il reperimento dei datteri in territorio Achuar, un territorio raggiungibile solo con aerei da turismo. Infine, gli

stessi produttori Achuar tendono spesso a consumare o trasformare il prodotto appena raccolto senza badare alle “esigenze della scienza” ma prioritizzando la prassi che regola il loro stile di vita e la loro quotidianità, l’aspetto antropologico ed il contesto geografico devono essere parte integrante dell’analisi del presente lavoro.

Lo studio della frazione non lipidica ha permesso di isolare un fitocomplesso che ha dato dei buoni risultati in termini di attività antiossidante; anche in tal caso, come per la frazione insaponificabile, un ulteriore approfondimento dovrebbe portare ad esiti di rilevante interesse cosmetico data l’unicità della materia prima e la scarsità di letteratura scientifica relativa alla specie.

Gli studi di funzionalità cosmetica sull’olio hanno dato risultati confortanti per quanto riguarda l’attività idratante, si sono invece evidenziati dubbi sulla metodologia del test di elasticità cutanea, che ha dato risultati incoerenti sia sul campione di unguahua testato sia su altri oli di riferimento.

Si ritiene comunque che l’insieme degli studi fatti sull’olio di unguahua permetta di affermare che vi è un interessante potenziale per lo sviluppo di prodotti cosmetici, la composizione è del tutto simile a quella dell’olio di oliva e l’attività idratante è del tutto paragonabile a quella di altri oli comunemente usati in cosmesi. Se a questo si aggiungono alcuni elementi di marketing tipici del mondo cosmetico, come la provenienza esotica e l’unicità del prodotto, si può affermare che la valorizzazione di questa specie rappresenta un potenziale commerciale parzialmente inespresso. Va poi ricordato che l’olio viene estratto dalle popolazioni locali in un territorio dominato dalla foresta primaria, con tecniche estrattive non invasive ed ispirate ai criteri di “green chemistry”, quindi il prodotto può essere facilmente certificato come “solidale” e di fatto è già entrato a far parte (anche grazie al presente lavoro) di alcune filiere produttive della cosmesi solidale¹⁰ e nel mercato locale ecuadoriano, il passo verso la certificazione biologica è altrettanto possibile e porterebbe l’olio ad una nuova visibilità nei confronti delle aziende che sposano questa filosofia produttiva.

La preparazione e lo studio dei prototipi cosmetici ha evidenziato che l’olio di unguahua presenta una buona versatilità e stabilità in presenza di differenti forme cosmetiche, dalle

¹⁰ Linea Natyr – CTM equo mercato -
http://www.altromercato.it/it/prodotti/COS/approf_cosm/materieprime/Oli_burri_vegetali/olio_ungurahua/?searchterm=ungurahua

emulsioni cosiddette “tradizionali”, sviluppate quindi con emulsionanti etossilati a emulsioni innovative e certificabili come biologiche secondo i criteri ECOCERT. Il prodotto è stato poi testato all’interno di oli per massaggi e saponi solidi dando in tutti i casi risultati positivi. Gli studi di stabilità chimico-fisica non hanno evidenziato particolari criticità in nessuna delle emulsioni sviluppate ed anche gli studi di stabilità microbiologica hanno dato esito positivo. Si può quindi affermare che il presente lavoro, unendo attività di ricerca fitochimica e ricerca applicata, ha portato allo sviluppo di una linea di cosmesi che valorizza la specie *Oenocarpus bataua* e sono stati prodotti prototipi certificabili ECOCERT.

In ultima analisi, sono stati raggiunti tutti gli obiettivi strategici identificati dalla strategia di lavoro. Senza dubbio si sono incontrate maggiori difficoltà di quanto previsto nella prima fase del lavoro, in quanto il reperimento di datteri e campioni di olio è stato condizionato e ritardato dalle difficoltà logistiche ed antropologiche citate in precedenza. Si deve quindi evidenziare che parte degli studi relativi alle tecniche di estrazione ed all’insaponificabile meritano un ulteriore approfondimento. Lo studio delle funzionalità cosmetiche e la successiva realizzazione di prototipi cosmetici è stata invece completata con successo, dando inoltre un positivo e tangibile effetto nel contesto in cui è stato condotto lo studio.

Dedichiamo un ultimo commento al contesto in cui si è svolto il lavoro di dottorato, alla relazione tra ricerca e cooperazione allo sviluppo ed all’impatto che le attività di ricerca hanno avuto sul contesto locale.

Come descritto, il territorio Achuar e, più in generale, il settore amazzonico ecuadoriano rappresentano una delle zone con la più alta biodiversità del pianeta. Nondimeno, esattamente come per altre importanti aree del pianeta, le popolazioni locali vivono la continua dicotomia tra sviluppo e conservazione, modernità e tradizione. Il contesto politico e sociale locale è caratterizzato da forti disuguaglianze economiche ed evidenti discriminazioni razziali nei confronti delle popolazioni native locali; allo stesso modo, ampie fasce della popolazione locale vivono sotto la soglia della povertà e lo sfruttamento irrazionale delle risorse diventa spesso l’unica via di sostentamento di molte comunità. La ricerca di modelli produttivi sostenibili diventa quindi una tematica centrale per lo sviluppo locale, quindi si può comprendere l’importanza di un lavoro di ricerca volto a valorizzare le risorse della biodiversità locale. Il ruolo dell’Università degli Studi di Ferrara è stato determinante, non solo mediante il presente lavoro di dottorato, per approfondire lo studio e la conoscenza delle risorse locali, permettendo un flusso di conoscenze e metodiche verso l’Ecuador. Parallelamente, le controparti locali hanno messo a disposizione delle conoscenze tradizionali

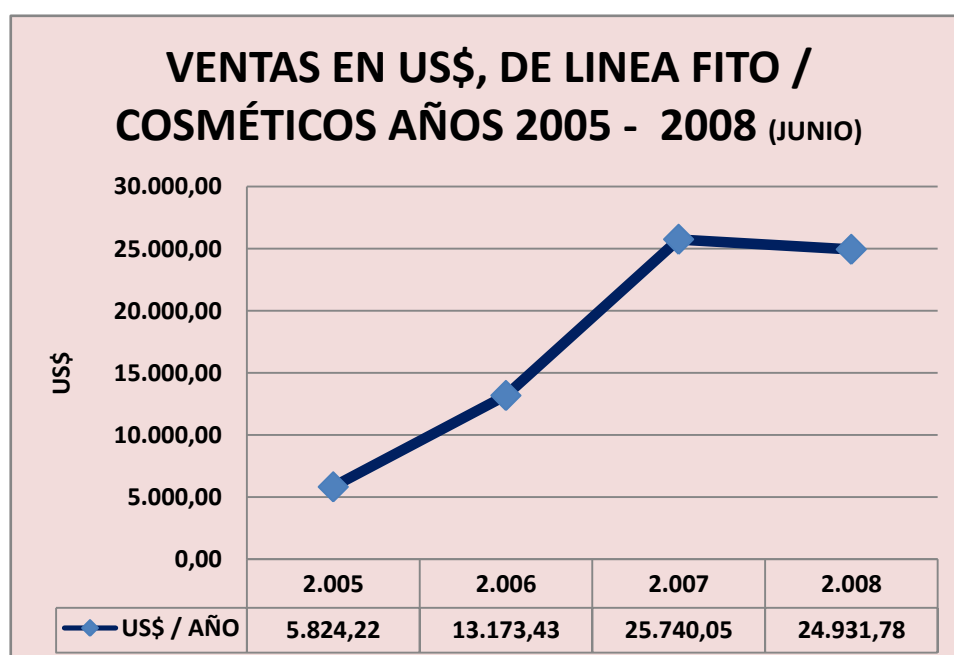
e delle matrici che hanno permesso a molti studenti lo sviluppo di tesi di laurea, tesi di dottorato e pubblicazioni.

Questo intercambio di specifiche conoscenze è stato poi canalizzato all'interno di un progetto di sviluppo, gestito dalla ONG VIS, che ha tradotto le conoscenze scientifiche in applicazioni, metodologie, buone pratiche e nuove filiere produttive.

Gli studi relativi all'olio di unguurahua hanno permesso la creazione in loco di una linea cosmetica presente ormai da alcuni anni nel mercato locale e venduta oggi anche in Italia, presso i canali del commercio equo e solidale. La creazione della filiera ha permesso lo sviluppo di una imprese ed infrastrutture attualmente funzionanti e totalmente indipendenti dall'intervento di progetti di cooperazione o sussidi stranieri, un risultato non banale per un progetto di cooperazione allo sviluppo.

La controparte locale, la Fondazione Chankuap, ha potuto valutare negli anni l'impatto economico delle filiere produttive ed è evidente la crescita di fatturato generata dalla vendita dei prodotti cosmetici ed erboristici sviluppati, tra questi vi sono le formule descritte nel presente lavoro di dottorato.

Le formule biologiche saranno probabilmente il prossimo passo operativo. La seguente tabella mostra l'andamento del fatturato relativo al periodo 2005 – 2008.



Si può quindi affermare che l'attività di ricerca scientifica ha dato in questi anni un risultato applicativo ed un impatto economico positivo nel contesto del progetto di sviluppo.

La sinergia tra università e cooperazione allo sviluppo può quindi portare a risultati tangibili ed immediati, favorendo processi a favore di popolazioni vulnerabili e sperimentando modelli alternativi di sviluppo.

6 NOTA FINALE

Prima dell'inizio di questo dottorato di ricerca e durante il suo svolgimento ho personalmente contribuito a realizzare altri studi fitochimici su piante amazzoniche della zona orientale dell'Ecuador. Nella presente "Nota Finale" sono riportate le pubblicazioni a cui ho partecipato.

- **Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., *Labiatae* in comparison with commercial essential oils.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 52 (11), 34-86-3491, 2004

Gianni Sacchetti^a, Alessandro Medici^a, Silvia Maietti^a, **Matteo Radice**^b, Mariavittoria Muzzoli^a, Stefano Manfredini^c, Elena Braccioli^c, Renato Bruni^d

^a Dipartimento delle Risorse Naturali e Culturali, Università degli Studi di Ferrara, C.so Porta Mare 2, I-44100 Ferrara, Italy

^b Fundación Chankuap, Macas, Ecuador

^c Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17-19, I-44100 Ferrara, Italy

^d Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Parco Area delle Scienze 11 A, I- 43100, Università degli Studi di Parma, Italy

- **Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods.** Food Chemistry 91, 621-632, 2005

Gianni Sacchetti^a, Silvia Maietti^a, Mariavittoria Muzzoli^a, Martina Scaglianti^b, Stefano Manfredini^b, **Matteo Radice**^c, Renato Bruni^d

^a Dipartimento delle Risorse Naturali e Culturali, Lab. Biologia farmaceutica & Biotrasformazioni, Università degli Studi di Ferrara, C.so Porta Mare 2, I-44100 Ferrara, Italy

^b Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17-19, I-44100 Ferrara, Italy

^c Fundación Chankuap, Macas, Ecuador

^d Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Sez. Biologia Vegetale o Orto Botanico, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 11 A, 43100 Parma, Italy

- **Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (*Euphorbiaceae*) stem bark essential oil: a new functional food ingredient?**

Ms. Ref. No.: FOODCHEM-D-10-02644R1 Food Chemistry

Damiano Rossi^a, Alessandra Guerrini^b, Silvia Maietti^b, Renato Bruni^c, Guglielmo Paganetto^b, Ferruccio Poli^d, Laura Scalvenzi^b, **Matteo Radice**^e, Katia Saro^b, Gianni Sacchetti^b

^a AGRUNIFE Centro di Ateneo per l'Agricoltura di Pianura, Università degli Studi di Ferrara, Via Conca73/B, I-44030 Malborghetto di Boara, Ferrara, Italy

^b Dipartimento di Biologia ed Evoluzione Sez. Risorse Agrotecologiche e Farmaceutiche-AgriUnife, Università degli Studi di Ferrara, C.so Ercole I d'Este 32, I-44100 Ferrara, Italy

^c Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma, V.le G.P. Usberti 11A, I-43100 Parma, Italy

^d Dipartimento di Biologia Evoluzionistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna, Via Irnerio42, I-40126 Ferrara, Italy

^e Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Ferrara, Via Fossato di Mortara, 17-19, I-44100 Ferrara, Italy

7 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Alonso M. A., Guillén D. A., Barroso G. C., Puertas B., and García A.. *Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content*, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (21), 5832–5836, 2002
- Balick M.J., Jessenia and Oenocarpus: *neotropical oil palms worthy of domestication*. Plant Production and Protection, paper no. 88, Rome, FAO, 1988
- Balick M.J., Gershoff S. N., *Nutritional evaluation of Jessenia bataua Palm: a source of high quality protein and oil from Tropical America*. In: *Economic Botany*, 35/3, 261 – 271, 2004
- Bondioli P., Mariani C., Lanzani A., Fedeli E., Mossa A., Muller A., *Lampante olive oil refining with supercritical carbon dioxide*, *JAOCS*, Vol. 69, No. 5, 1992
- Borgtoft Pedersen H., Baslev H., *PALMAS UTILES especies ecuatorianas para agroforesteria y extractivismo*, pag. 9, Edizioni ABYA-YALA, Quito (Ecuador), 1993
- Bruni A., *Farmacognosia generale e applicata*. Edizioni Piccin, pag. 215, 1999
- Bruni A., Nicoletti M., *Dizionario ragionato di erboristeria e di fitoterapia*,. Edizioni Piccin, pag. 455, 2003
- Consultora Don Bosco, *Extracción de aceite de kunkuk', shimpi y shaké (Oenocarpus sp.) en el Territorio Achuar – Amazonía Ecuatoriana*, Informe final, Quito-Junio 2009
- COSMOS Standard: Cosmetics organic and natural standard*, www.cosmos-standard.org/docs/COSMOS-standard_mai_09.pdf, 2009
- Da Cruz Rodriguez A. M., Darnet S., Meller da Silva L.H., *Fatty acid profile and tocopherol contents of Buriti (Mauritia flexuosa), Patawa (Oenocarpus bataua), Tucuma (Astrocaryum vulgare), Mari (Poraqueiba paraensis) and Inaja (Maximiliana maripa) fruits*, *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 21, No. 10, 2000-2004, 2010
- Descola P., *La selva culta*, Ed. Abya Yala, 1996
- Estella J., Manosalvas R., Mariaca J., *Instrumento para la aplicación de la Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones – Documento de trabajo – Convenio Ecociencia – INIAP*. (Quito – Ecuador), 2001
- Fluhr J. W., *Practical aspects of cosmetic testing*, Ed. Springer, 2011
- Henderson A., *The Palm of the Amazon*, Oxford University Press, UK, 1995

- Jativa M.I., Alarcon R., *Sobre la etnobotanica y la comercializacion de la unguahua (Oenocarpus bataua, Arecaceae) en la zona del Alto Napo, Ecuador*, en *Seria investigacion y monitoreo*, Vol. 3, Quito, Ecociencia
- Kumar A., Yadav D.K., *Significance of ethno-medicinal plants as herbal cosmetics*, *Journal of economic and taxonomic botany*, 33, No. 3, 621-623, 2009
- Kumazawa S., Taniguchi M., Suzuki Y., Shimura M., Known M., *Antioxidant activity of polyphenols in carob pods*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 373-377, 2002
- Martinez J.L., *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*, Ed. CRC Press, 2008
- Migdalia M., *Farmacognosia y Productos Naturales, Appunti del Master in fitochimica*, CiVaBi, Università Politecnica Salesiana (Quito-Ecuador), 42-50, 2001
- Miller C., *Fruit production of the Ungurahua palm (Oenocarpus bataua) in an indigenous managed Reserve*, in *Economic Botany* 56 (2), 165-176, 2002
- Morelli I., Flamini G., Pistelli L., *Manuale dell'erborista – Biosintesi, estrazione e identificazione delle sostanze di origine vegetale*, Ed. Tecniche Nuove, 2005
- Mors W., Rizzini C., Pereira N., *Medicinal plants from Brazil*. Reference Publications Inc., Michigan, ISBN:0-917256-42-5, pag. 501, 2000
- Nzowa L.K., Barboni L., Teponno R.B., Ricciutelli M., Lupidi G., Quassinti L., Bramucci M., Tapondjou L.A., *Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from Entada rheedii*, *Phytochemistry*, 71, 254-261, 2010
- Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G., *The conversion of procyanidin and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin*, *Phytochemistry*, 25, 223-230, 1986
- Proserpio G., *Chimica e Tecnica Cosmetica 2000 – Le sostanze di base*, Edizioni Sinerga, 1999
- Proserpio G., *Chimica e Tecnica Cosmetica 2000 – II volume. Sostanze funzionali, formalistica, controlli, legislazione*. Edizioni Sinerga, 9, 1999
- Rete Nazionale G.A.S., *G.A.S. e D.E.S.: territori in movimento*, 10° Convegno Nazionale Rete GAS, Osnago (Lecco) 5 e 6 giugno 2010

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*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3486-3491, 2004

Singleton V.L., Rossi J.A., *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*, American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158, 1965

Soong Y., Barlow J.P., *Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds*, Food Chemistry, 88(3), 411-417, 2004

Taga M.S., Miller E., Pratt D., *Chia seeds as source of natural lipid antioxidant*, Journal of American Oil Chemist's Society, 61(5), 928-931, 1984

Tiezzi E., Marchettini N., *Che cos'è lo sviluppo sostenibile?*, Donzelli Editore, 1998

VIS – Progetto Ecuador: <http://www.volint.it/vis/ecuador>

Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., Ho C.T., *Antioxidative phenolic compounds from sage (Salvia officinalis)*, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46, 4869-4873, 1998

RINGRAZIAMENTI

E' mio desiderio ringraziare tutti gli amici ed i collaboratori che mi hanno accompagnato durante il presente percorso di ricerca. In particolar modo sono grato al prof. Santo Scalia per il costante confronto sulle strategie ed i contenuti, al Prof. Gianni Sacchetti ed al suo gruppo di ricerca per l'intensa collaborazione nella realizzazione di alcuni studi fondamentali per il presente lavoro, alla Dott.ssa Jessica Sparapan ed a tutti coloro che hanno collaborato apportando consigli e competenze diverse.

Ringrazio inoltre gli amici e collaboratori del VIS – Volontariato internazionale per lo sviluppo, con i quali abbiamo potuto sperimentare una felice sintesi tra cooperazione internazionale allo sviluppo e ricerca scientifica.

Voglio inoltre ricordare i tanti collaboratori ecuadoregni della Universidad Politécnica Salesiana e della Fundación Chankuap che hanno messo a disposizione le loro conoscenze ed il loro tempo al fine di coadiuvare questo lavoro di ricerca e, cosa più importante, al fine di sperimentare modelli investigativi e produttivi sostenibili. Sono lieto che il nostro comune lavoro sia diventato una parziale ma concreta risposta per le popolazioni amazzoniche con cui condividiamo speranze e battaglie sociali.

In ultimo, desidero rivolgere il mio ringraziamento più profondo ai miei studenti di etnia Shuar e Achuar, alle loro famiglie ed alle loro comunità di provenienza. La ricchezza scoperta nella relazione con la loro cultura, la quotidianità delle esperienze di vita comune ed il fascino dell'Amazzonia rappresentano un bene prezioso che non mancherò di portare nei miei prossimi viaggi.

Matteo Radice