



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN "SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE"

CICLO XXIX°

COORDINATORE Prof. Paolo Pinton

Caratterizzazione chimica e biologica di oli essenziali
dell'Amazzonia orientale e definizione di un loro profilo
applicativo in un contesto salutistico

Settore Scientifico Disciplinare BIO/15

Dottorando

Dott. Grandini Alessandro

(firma)

Tutori

Prof. Sacchetti Gianni

(firma)

Dott.ssa Guerrini Alessandra

(firma)

Anni 2014/2016

INDICE

QUADRO INTRODUTTIVO	1
<hr/>	
LA FORESTA COME FARMACIA: LA BIODIVERSITÀ COME VALORE AGGIUNTO NELLA RICERCA DI NUOVE SOLUZIONI SALUTISTICHE	1
L'AREA DI STUDIO: L'ECUADOR AMAZZONICO	6
L'ARCHETIPO DELLA PRESENTE RICERCA: GLI OLI ESSENZIALI	8
LA CHIMICA DEGLI OLI ESSENZIALI	9
VARIABILI CHE INCIDONO SULLA QUALITÀ E RESA DEGLI OLI ESSENZIALI	11
L'ESTRAZIONE	11
CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE E COMPOSIZIONE CHIMICA DEGLI OLI ESSENZIALI	19
CONTROLLO DI QUALITÀ DEGLI OLI ESSENZIALI	23
DETERMINAZIONI FISICHE	24
DETERMINAZIONI CHIMICHE	25
TECNICHE ANALITICHE DI CONTROLLO	25
OLI ESSENZIALI: USI TRADIZIONALI E MODERNI	27
SCOPO DELLA TESI	35
<hr/>	
RISULTATI E DISCUSSIONE	38
<hr/>	
<i>CHENOPODIUM AMBROSIODES</i> (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS	41
<i>CYMOPOGON CITRATUS</i> (DC.) STAPF.	46
<i>DACRYODES PERUVIANA</i> (LOES.) J.F. MACBR	51
<i>ENDLICHERIA KLUGII</i> O. C. SCHMIDT	56
<i>OCIMUM MICRANTHUM</i> WILLD.	60
<i>OCOTEA CERNUA</i> (NEES) MEZ.	65
<i>OCOTEA QUIXOS</i> (LAM.) KOSTERM	69
<i>PIPER CARPUNYA</i> RUIZ & PAV.	74
<i>SCHINUS MOLLE</i> L.	78
<i>TAGETES MINUTA</i> L.	84
ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE	88
ATTIVITÀ ANTIMICROBICA	91
ATTIVITÀ ANTIBATTERICA	91
ATTIVITÀ ANTIFUNGINA	93

ATTIVITÀ ANTICANDIDA ED ESPRESSIONI SINERGICHE DI BIOATTIVITÀ	94
ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA	98
ATTIVITÀ MUTAGENA	99
FORMULAZIONE COSMETICA	103
CONCLUSIONI	106
MATERIALI E METODI	108
REAGENTI	108
DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE	108
GASCROMATOLOGRAFIA ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA	109
SAGGIO DEL DPPH	111
BATTERI UTILIZZATI	112
METODO DELLE MICRODILUIZIONI SU PATOGENI UMANI	112
TEST DELLA COMPONENTE VOLATILE DELL'OLIO ESSENZIALE SU FUNGHI CRESCIUTI IN AGAR	113
METODO DELLE MICRODILUIZIONI SU <i>CANDIDA ALBICANS</i>	114
CHECKERBOARD TEST	114
TIME KILLING	115
TEST DI INIBIZIONE DELLA 5-LIPOSSIGENASI	116
TEST DI AMES	117
FORMULAZIONE COSMETICA	118
PANEL TEST	119
SAGGIO DI FOTOCHEMOLUMINESCENZA (PLC)	120
BIBLIOGRAFIA	121
APPENDICE	134
ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTA:	134
PRESENTAZIONI A CONGRESSI:	136

QUADRO INTRODUTTIVO

La foresta come farmacia: la biodiversità come valore aggiunto nella ricerca di nuove soluzioni salutistiche

A partire dalla seconda metà del secolo scorso si è resa sempre più evidente la capacità dell'uomo di modificare in modo irreversibile il clima globale e, in modo distruttivo, gli ecosistemi che abita e sfrutta; l'importanza fondamentale della tutela e della valorizzazione della biodiversità è stata portata all'attenzione della comunità internazionale. Nel 1992 la conferenza delle Nazioni Unite svoltasi a Rio de Janeiro ha dato una definizione del termine biodiversità nell'art. 2 della Convenzione sulla diversità biologica: "ogni tipo di variabilità tra organismi viventi, compresi, tra gli altri, gli ecosistemi terrestri, marini e altri acquatici e i complessi ecologici di cui essi sono parte; essa comprende la diversità entro specie, tra specie e tra ecosistemi". La Convenzione sulla diversità biologica (CBD, vedi sitografia) ratificata da 193 Paesi è espressione degli obiettivi generali che la comunità internazionale si prefigge di seguire, lascia a ciascuno stato il compito di individuare programmi e politiche nazionali che portino alla conservazione e all'uso sostenibile della biodiversità. Negli ultimi anni la conservazione della diversità biologica è una delle questioni più problematiche e dibattute, questo indica una presa di coscienza dell'importanza di un problema che non può essere trascurato ed è un buon punto di partenza per la messa in atto delle iniziative necessarie a limitare i pericoli e i danni che l'uomo stesso ha generato all'equilibrio degli ecosistemi del nostro pianeta. Il processo di ricerca e accordi internazionali iniziato nel 1992 ha portato al consolidarsi della relazione tra conservazione della natura e sviluppo locale sostenibile e all'utilizzo dell'approccio ecosistemico nella gestione delle risorse biologiche (Pappalardo, 2009) inteso come "una strategia per la gestione integrata della terra, dell'acqua e delle risorse viventi che promuove la conservazione e l'uso sostenibile in modo giusto ed equo" (COP 5 decision V/6) definizione che implica coinvolgimento diretto e sostanziale dei portatori d'interesse locali (stakeholders) nella gestione del territorio, che è vista come un processo che presenta due punti di vista fondamentali: quello ambientale e quello sociale (Padovani et al., 2003). Il concetto di approccio ecosistemico al problema ambientale

influirà largamente sul modo di impostare la gestione delle “risorse viventi”. Un altro aspetto da indagare è la motivazione profonda che ha portato al già descritto cambio di rotta della comunità internazionale, oltre al dato di fatto troppe volte dimenticato che la salute della natura che abitiamo dovrebbe essere preservata per il suo valore intrinseco senza bisogno di motivazioni utilitaristiche, negli ultimi anni siamo giunti a solide evidenze scientifiche che hanno reso indubbio che gli obiettivi economici e ambientali vadano di pari passo nel lungo periodo. La maggior parte delle attività umane nel sistema economico attuale richiedono una motivazione/sostenibilità economica per essere messe in atto ed è sensato affermare che le politiche di salvaguardia della biodiversità possono trovare una grande spinta nella quantificazione dei servizi che gli ecosistemi forniscono all'uomo. In questo ambito è importante citare un documento prodotto da UNCTAD (United Nations Conference on Trade and Development) intitolato “UNCTAD BioTrade Principles and Criteria” che espone, in continuità con quanto affermato nella Convenzione sulla diversità biologica (CBD), il concetto di Bio Trade come fattore di unione dei criteri di sostenibilità ambientale e sociale alla sostenibilità economica dei processi produttivi. I principi esposti possono essere applicati in diversi contesti al fine di guidare i processi di Biotrade alla promozione della biodiversità attraverso l'uso commerciale sostenibile. Volendo presentare gli elementi fondamentali di quanto esposto nel documento bisogna ricordare che al fine di sviluppare i principi e criteri caratterizzanti il Biotrade sono stati usati 2 approcci oltre a quello ecosistemico già esposto in precedenza chiamati “value chain approach” e “adaptive management approach”; il primo si riferisce a azioni coordinate instaurate tra attori coinvolti direttamente o indirettamente in un'attività produttiva avente lo scopo di mettere a disposizione un prodotto o un servizio al consumatore che permettano un'equa ripartizione dei benefici socio-economici tra i partecipanti alla “catena di valore”. Il secondo nasce al fine di permettere l'attuazione di misure correttive del processo produttivo in modo continuativo, è basato quindi su processi di monitoraggio continua volta alla creazione e miglioramento di processi produttivi sostenibili e alla stima dell'impatto su specie ed ecosistemi. I principi e criteri esposti sono pensati per essere applicati sia a livello istituzionale (nazionale o regionale) sia a livello degli enti che compongono la catena di distribuzione delle attività di Biotrade. In tabella 1 sono elencati principi e criteri Bio Trade definiti da UNCTAD (Buso, 2015).

PRINCIPI	CRITERI
<p>Conservazione della biodiversità</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimento delle caratteristiche degli ecosistemi e degli habitat naturali delle specie gestite • Mantenimento della variabilità genetica di flora, fauna e microbiologica • Mantenimento dei processi ecologici • L'attività dovrebbe essere sviluppata in accordo con i piani di gestione delle aree naturali e in accordo con le autorità e gli attori coinvolti
<p>Uso sostenibile della biodiversità</p>	<ul style="list-style-type: none"> • L'uso delle risorse naturali dovrebbe essere supportato da documenti di gestione che includano tassi di estrazione più bassi dei tassi di rigenerazione, sistemi di monitoraggio e indici di produttività. • In ambito agricolo la gestione della biodiversità deve includere pratiche agricole che contribuiscano alla conservazione della diversità biologica • Standard tecnici per iniziative di servizi ambientali dovrebbero essere soddisfatti • Le informazioni e esperienze che contribuiscono alla conoscenza e al mantenimento della biodiversità dovrebbero essere utilizzate dall'organizzazione
<p>Equa distribuzione dei benefici derivati dall'uso della biodisponibilità</p>	<ul style="list-style-type: none"> • L'organizzazione dovrebbe interagire e coinvolgere attori all'interno di tutta la catena di valore quando possibile • I ricavi dovrebbero essere generati a tutti i livelli della catena di valore con trasparenza, grazie al contributo degli attori coinvolti al posizionamento di value-added products nel mercato • Informazioni e conoscenza dei target markets dovrebbero essere rese disponibili tra gli attori coinvolti
<p>Sostenibilità socio-economica</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dovrebbero esistere potenziali mercati per i prodotti e servizi BioTrade sufficienti per assicurare sostenibilità economica • Il profitto finanziario dovrebbe essere ottenibile da parte di un'organizzazione BioTrade • Dovrebbe essere generata occupazione e migliorata la qualità della vita grazie all'attività dell'organizzazione

	<ul style="list-style-type: none"> • Gli effetti negativi su attività produttive e culturali locali dovrebbero essere evitati • L'organizzazione dovrebbe dimostrare di avere capacità organizzative e di management
Compatibilità con regole nazionali e internazionali	<ul style="list-style-type: none"> • L'organizzazione dovrebbe essere a conoscenza e adattarsi alla legislazione nazionale e locale legata all'uso sostenibile delle risorse naturali e al commercio di prodotti e servizi derivati dalla biodiversità • L'organizzazione dovrebbe essere a conoscenza e adattarsi alla legislazione internazionale e regionale legata all'uso sostenibile delle risorse naturali e al commercio di prodotti e servizi derivati dalla biodiversità
Rispetto dei diritti degli attori coinvolti nelle attività di Bio Trade	<ul style="list-style-type: none"> • Rispetto dei diritti umani e delle questioni di genere • Rispetto dei diritti di proprietà intellettuale • Rispetto dei diritti delle comunità locali e indigene (territorio, cultura, conoscenza) • Mantenimento della conoscenza tradizionale • L'organizzazione dovrebbe offrire sicurezza di occupazione e condizioni di lavoro appropriate
Chiarezza in materia di possesso della terra, uso e accesso alle risorse naturali e conoscenze	<ul style="list-style-type: none"> • L'organizzazione dovrebbe essere in grado di dimostrare di avere il diritto di utilizzo del territorio in accordo con i regolamenti in vigore • L'accesso a risorse biologiche e genetiche dovrebbe essere soggetto a consenso informato delle autorità nazionali competenti • L'accesso alla conoscenza tradizionale dovrebbe essere concesso solo previo consenso informato degli attori coinvolti

Tabella 1. Principi e criteri Bio Trade (UNCTAD, 2007)

Un esempio di servizio fornito dagli ecosistemi presenti nel nostro pianeta è la produzione, da parte dei più svariati organismi, di un enorme varietà di molecole, alcune delle quali si sono dimostrate utilizzabili a scopo salutistico; questo ha dato origine nella storia a svariate pratiche mediche tradizionali che, dopo l'ascesa e l'evoluzione della tradizione medica occidentale, hanno fornito e forniranno innumerevoli spunti per la

creazione di farmaci di origine naturale o hanno guidato i chimici farmaceutici alla sintesi di sostanze non presenti in natura utilizzabili come principi attivi nei farmaci di oggi. Per fare alcuni esempi tra i tanti è opportuno citare l'uso del chinino che è il fitocomplesso presente nella corteccia di piante del Genere *Cincona* originarie dell'America del sud. Il chinino è oggi il principale farmaco antimalarico per le popolazioni che non possono accedere ai moderni farmaci tecnologici e, storicamente, è stato l'unico antimalarico utilizzabile fino alla scoperta di altri principi attivi di sintesi. È stato utilizzato per secoli in America del sud dai guaritori tradizionali prima della sua esportazione in Europa e della scoperta dell'alcaloide chinina responsabile dell'attività antimalarica. Un altro esempio è la scoperta di Vincristina e Vinblastina, 2 molecole importanti perché utilizzate come antitumorali con attività antimitotica ottenute da una pianta (*Catharanthus roseus*) originaria del Madagascar, Paese caratterizzato da un'elevatissima biodiversità e da specie uniche al mondo. Purtroppo la fauna e la flora del Madagascar sono soggette a sistematica distruzione che mette a rischio la sopravvivenza di specie uniche e potenzialmente importanti dal punto di vista farmaceutico (Gatto et al., 2009). Inoltre, molte sostanze di origine naturale sono utilizzate come materie prime dal punto di vista cosmetico/cosmeceutico, dietistico e nutraceutico grazie alle loro particolari caratteristiche. È quindi sensato affermare che un flusso costante di informazioni e materie prime ha il suo punto di partenza nell'ambiente naturale e il suo punto di arrivo nella farmacia, basti pensare che la maggior parte dei farmaci impiegati nei Paesi industrializzati deriva da prodotti naturali, utilizzati come tali o derivati da essi. La biodiversità è fattore propulsivo verso la chemo-diversità vegetale e dunque verso quella variabilità chimica che ha permesso di avere oggi molecole farmaceuticamente importanti e che permetterà domani di ottenere nuove molecole per nuovi farmaci. Ecco perché la foresta, come elemento indicativo di biodiversità, può essere intesa come farmacia anche nell'accezione più moderna e non solo tradizionale del termine. È quindi indubbio che provocare una diminuzione della diversità biologica tramite operazioni di sfruttamento non sostenibile delle risorse naturali ha come conseguenza un forte ridimensionamento dei servizi che gli ecosistemi forniscono all'uomo; questo nell'ambito farmaceutico comporterebbe una diminuzione della quantità/qualità delle materie prime e del contributo fondamentale che la natura dà al progresso scientifico (Gatto et al., 2009; Buso, 2015).

L'area di studio: l'Ecuador amazzonico

L'Ecuador è stato riconosciuto dal World Conservation Monitoring Centre come uno dei Paesi con i più alti livelli di biodiversità al mondo ed è ai primi posti per numero di specie endemiche per Km² (Moreno Rueda, 2010). Rappresenta quindi un inesauribile oggetto di studio e in questo contesto sono nati progetti di cooperazione che vedono la collaborazione tra l'Università di Ferrara (UNIFE) e vari attori locali fra cui l'Universidad Politecnica Salesiana (UPS, Quito, Ecuador) e l'Universidad Estatal Amazonica (UEA, Puyo, Ecuador).

Dal punto di vista geografico il territorio ecuadoriano è divisibile in 3 regioni: la zona costiera nella parte occidentale del paese composta da territori alluvionali e da una modesta catena montuosa. La regione andina detta sierra nella parte centrale del Paese che presenta imponenti catene montuose e l'altopiano compreso tra di esse (vedi Fig. 1). L'oriente del Paese che si estende dalle pendici orientali delle Ande al confine con il Perù è composto dai bassopiani del bacino dell'amazzonia. L'oriente amazzonico comprende il 50% circa della superficie nazionale, può essere diviso in alto oriente e basso oriente, entrambe le subregioni presentano clima caldo umido tropicale (IGM Ecuador, 2007); la regione è divisa politicamente in sei province in cui vivono alcuni gruppi etnici che comprendono: Huaorani, Shuar, Cofán, Siona-Secoya, Shiwiar, Záparo, il popolo "intangibile" dei Tagaeri e gli Achuar. Il territorio amazzonico è stato considerato zona inospitale e improduttiva fino alla metà del secolo scorso, successivamente è stato progressivamente colonizzato dopo l'emanazione della legge di riforma agraria e di colonizzazione nel 1964 (Ley de Reforma Agraria y Colonizacion) che segnò l'inizio del disboscamento. Nonostante la istituzione di numerosi parchi nazionali e aree protette negli ultimi 40 anni la foresta umida tropicale presenta un tasso di deforestazione di circa 2 milioni di ha/anno (Pappalardo, 2009).

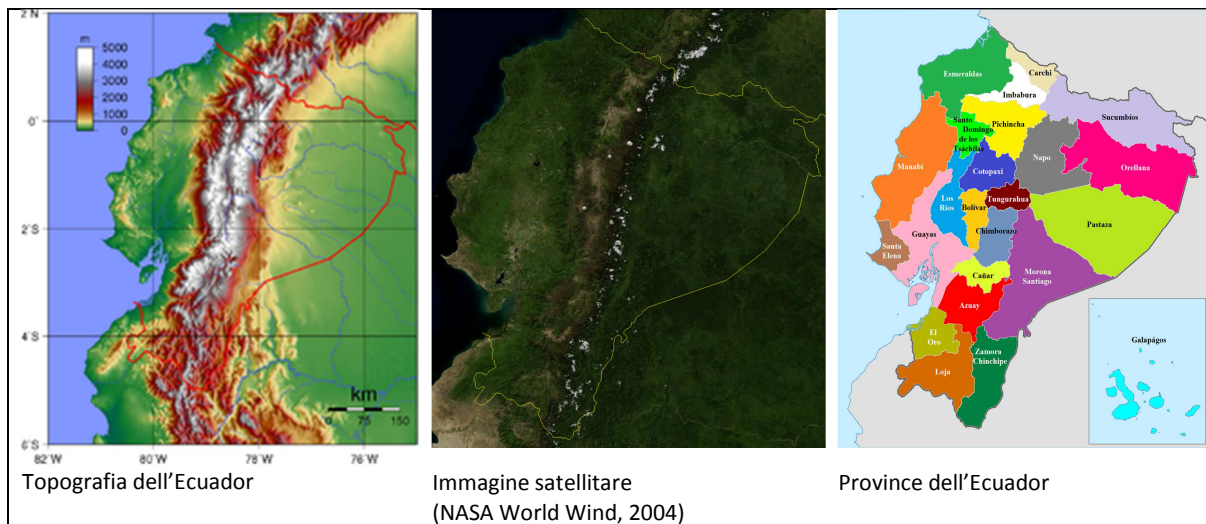


Figura 1. Immagini dell'area geografica dell'Ecuador

Come già accennato precedentemente nel luglio del 2000 il World Conservation Monitoring Centre ha riconosciuto 17 paesi “megadiversi”, questi ospitano più del 70% di tutte le specie presenti sulla Terra; L'Ecuador ne fa parte insieme a Brasile, Colombia e Perù (citando quelli che si dividono la regione amazzonica) occupando il terzo posto per densità di specie endemiche per Km²(Moreno Rueda, 2010). Considerando anche l'enorme varietà di ecosistemi diversi tra loro presenti nella regione, studi recenti ne contano 25 (Josse, 2003), diventa evidente che questo territorio relativamente piccolo se confrontato con l'intera regione amazzonica (150'000 Km² contro 7.8 milioni di Km²) è un inesauribile oggetto di studio in vari campi tra i quali è opportuno sottolineare quello farmaceutico/cosmetico di cui questa tesi si occupa; basti solo considerare la quantità di piante che ancora non sono state studiate per un loro eventuale uso salutistico. Questa grande diversità concentrata in un territorio limitato si ripercuote sulla vita macro e microbiologica con significative modificazioni del fenotipo o morfologiche sia fisiologiche che biochimiche (Moreno Rueda, 2010) indotte dalle diverse condizioni ambientali. Rispetto alla diversità microbiologica va sottolineata la presenza di organismi con caratteristiche peculiari e uniche, basti pensare che negli ultimi anni batteri e funghi amazzonici sono stati oggetto di diversi studi che hanno evidenziato la presenza di microorganismi fino a ora sconosciuti.

In questo contesto sono nati progetti di cooperazione attuati grazie alla collaborazione tra Università di Ferrara (UNIFE) e Universidad Politecnica Salesiana (UPS) ufficializzata nel 2007 con la stipula dell'Accordo Quadro di Collaborazione UNIFE-UPS, l'ONG VIS e alla partecipazione di attori locali, senza il cui coinvolgimento non potremmo parlare di

cooperazione internazionale, quali la ONG locale Fondazione Chankuap, Universidad Estatal Amazónica e popolazioni che vivono nell'area amazzonica del paese, in particolare le etnie Shuar e Achuar. L'etnia Shuar conta 120 mila persone (CODENPE, 2002), rappresenta il 45% della popolazione totale delle provincie Morona Santiago e Zamora Chincipe ed è presente anche in Perù. L'economia si basa essenzialmente su agricoltura itinerante abbinata a caccia e pesca e raccolta di frutta o insetti. Anticamente gli insediamenti erano molto dispersi e suddivisi in base a relazioni di parentela, al giorno d'oggi sono integrati alla struttura politico amministrativa chiamata Federación Shuare altre organizzazioni come FICSH, OSHE, FIPSE, CISAE. Gli Achuar sono uno dei gruppi che formano l'etnia Jibaroana, contano circa 4000 persone suddivise in 58 comunità a loro volta raggruppate in 8 associazioni che formano la Federación Interprovincial de la Nacionalidad Achuar del Ecuador (FINAE). Vivono di raccolta, caccia, pesca e agricoltura itinerante. Abitano un territorio di 708'000 ettari situato nel sud dell'Amazzonia ecuadoriana e nel nord del Perù che è per buona parte difficilmente raggiungibile via terra. Nel 1996 L'ONG VIS ha attivato un progetto di cooperazione e sviluppo in Ecuador con l'intento di rendere le etnie Shuar e Achuar attori diretti e consapevoli della valorizzazione del loro stesso patrimonio culturale e biologico con conseguente creazione di una fonte di reddito che non provochi l'alterazione di tale patrimonio. Nell'ambito di questo progetto UNIFE ha messo a disposizione competenze e strutture in collaborazione con UPS, UEA e, successivamente all'istituzione del Centro di Ateneo per la Cooperazione allo Sviluppo Internazionale, ha attivato 3 dottorati di ricerca che hanno dato un fattivo contributo tramite attività di ricerca e successive pubblicazioni alla valorizzazione e tutela della biodiversità amazzonica e allo sviluppo socio-economico della popolazione locale (Buso, 2015).

L'archetipo della presente ricerca: gli oli essenziali

L'organizzazione mondiale della sanità negli ultimi anni sta ponendo sempre più attenzione sull'importanza e sull'efficacia delle pratiche mediche tradizionali e questo processo è culminato nell'elaborazione di un documento intitolato WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 (in continuità con un lavoro precedente: WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005) che descrive una strategia atta a incrementare il

potenziale contributo delle medicine tradizionali alla salute, benessere della popolazione e a promuovere l'uso effettivo di queste pratiche tramite la regolarizzazione/integrazione dei trattamenti e la ricerca all'interno delle comunità rurali di pratiche che si dimostrino efficaci sicure e appropriate. Considerate le numerose pubblicazioni che dimostrano le molto promettenti attività biologiche di oli essenziali, la ricerca sul loro utilizzo terapeutico è da considerarsi compresa tra le attività incentivate dal documento programmatico della WHO. Il lavoro di ricerca sugli utilizzi a scopo salutistico di oli essenziali deve iniziare, come tutte le ricerche che riguardano medicine tradizionali, dalla raccolta di informazioni sulle tradizioni e pratiche mediche attuate, la pianta utilizzata, la modalità di preparazione del medicamento, sintomi trattati con il rimedio naturale considerato per l'analisi, la posologia o modalità d'uso. Il passaggio successivo consiste nella ricerca della conferma scientifica della validità del trattamento. Quando si parla di utilizzo/approvvigionamento di oli essenziali e piante aromatiche bisogna ricordare gli standard di utilizzo dei prodotti vegetali che sono stati emanati da vari organismi internazionali, le prime iniziative che portarono all'elaborazione di queste linee guida sono iniziate attorno al 1980 con successiva elaborazione dei primi documenti ufficiali nel 1998 (da parte di European Herb Growers Association EHGA/EUROPAM) che poi hanno portato nel 2003 all'emanazione da parte di WHO delle linee guida GACP (Guidelines on good agricultural and collection practices) (Franz, 2010), esistono inoltre standard da applicare in caso di raccolta di piante selvatiche che tutelano l'aspetto della sostenibilità della raccolta per non mettere a rischio la sopravvivenza a lungo termine delle specie vegetali. In particolare ISSC-MAP (international standard on sustainable wild collection of medicinal and aromatic plants) nasce da un'iniziativa congiunta di BfN, WWF TRAFFIC, IUCNe MPSG e stabilisce i principi di gestione e raccolta di piante medicinali e aromatiche spontanee considerando anche fattori sociali, culturali e economici dei territori interessati. Infine gli standard FairWild combinano i principi del FairTrade, international labor standards(ILO), e sostenibilità (ISSC-MAP) (Franz, 2010; Buso, 2015).

La chimica degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono miscele di sostanze basso bollenti derivate dal metabolismo secondario delle piante. Sono suddivisibili in categorie basate sul componente chimico

presente in maggior concentrazione: idrocarburi terpenici, alcoli, aldeidi, chetoni, fenoli, composti solforati, esteri e alcoli, aldeidi e fenoli, perossidi. Considerando le caratteristiche chimico-fisiche gli oli essenziali sono assimilabili agli idrocarburi a basso peso molecolare quindi presentano scarsa reattività, stato fisico liquido e volatilità. Si possono suddividere in 2 ulteriori categorie in base alla loro modalità di diffusione: la prima è composta da oli essenziali che vengono rilasciati da strutture specializzate all'esterno della pianta. La seconda comprende gli oli essenziali prodotti e accumulati in strutture specializzate generalmente di natura parenchimatica che permettono il rilascio verso l'esterno in seguito a sollecitazione meccanica. Analizzando più in particolare le strutture di secrezione preposte alla produzione delle essenze è possibile descrivere la loro importanza sia dal punto di vista biologico (loro ruolo nella pianta) che farmaceutico; ne esistono 3 tipologie: cellule singole che producono grandi quantità di essenza e la mantengono al loro interno (definite cellule ad essenza o idioblasti di secrezione), peli di secrezione, tasche e dotti che costituiscono una zona di stoccaggio extracellulare che possono essere di origine schizogena, schizolisigena o lisigena (vedi Fig. 2).

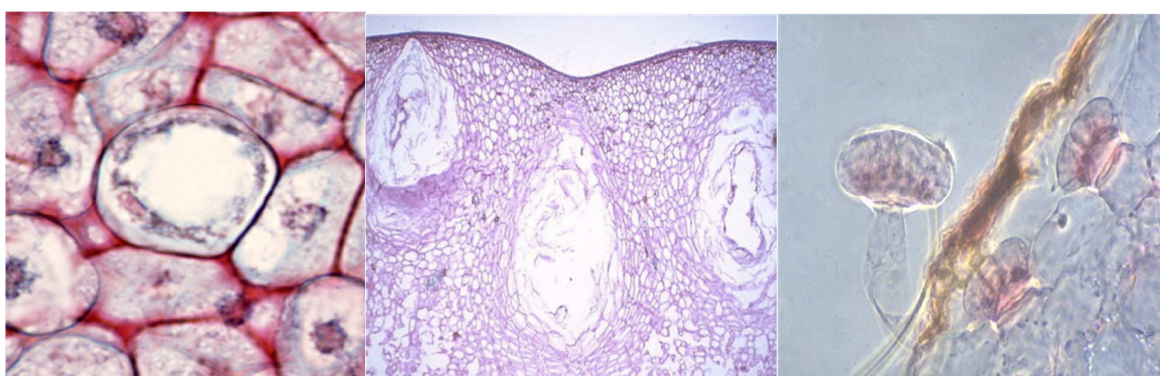


Figura 2. Cellule ad essenza; tasche lisigene e peli ghiandolari con testa secernente

Le funzioni degli oli essenziali/essenze nelle piante sono, in alcuni casi, ancora poco chiare ma possono essere distinte in due grandi gruppi: funzione ecologica di relazione tipica delle essenze a rilascio esterno e funzione protettiva tipica delle essenze a rilascio interno; per quanto riguarda il primo gruppo le essenze operano un controllo ambientale come ad esempio: competizione pianta-pianta (deterrenti contro la crescita di altre piante), attrazione degli impollinatori, mediatori di cicli nutritivi, azione come solvente/vettore di altri composti. Le essenze con funzione protettiva hanno 2 principali finalità: protezione contro i predatori erbivori e attività antibiotica contro i patogeni. È bene sottolineare che tutte le piante hanno la capacità di produrre composti volatili ma,

nella maggior parte dei casi, in piccole quantità; sono definite piante a oli essenziali quelle che producono un OE di interesse commerciale (Franz, 2010; Buso, 2015).

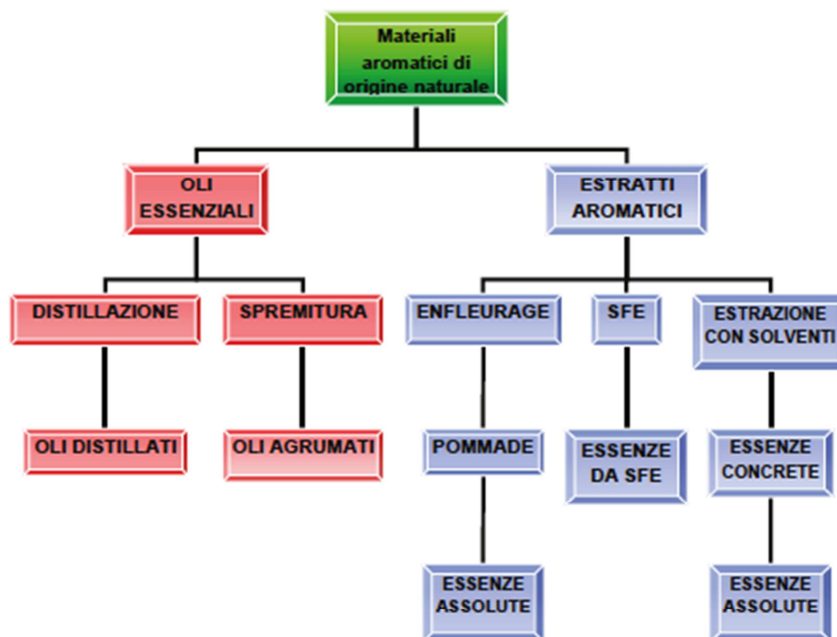
Variabili che incidono sulla qualità e resa degli oli essenziali

Le essenze possono presentare differenze sia dal punto di vista della composizione chimica, sia dal punto di vista della resa di prodotto dalla pianta fresca. Queste variazioni sono determinate da fattori che possono essere classificati come naturali (genetici, ecologici) e artificiali (raccolta, preparazione, conservazione, alterazioni). Si distinguono fattori naturali endogeni, ovvero ciclo ontogenetico della pianta, età, e tempo balsamico, e fattori genetici, quali ibridazione, poliploidia, selezione e mutazione. Tra gli altri numerosi fattori, troviamo naturalmente anche variabili naturali esogene, ovvero ad esempio i fattori climatici, il terreno (composizione, granulometria, ecc.), allelopatia (vicinanza con altre specie vegetali ad essenza), luce, temperatura, grado di piovosità, ecc. non vanno infine trascurati fattori artificiali legati alle scelte agronomiche da effettuare, in caso di coltivazione delle piante aromatiche, al fine di indirizzare la tecnica colturale verso l'ottenimento di buone produzioni sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (es. l'epoca e la densità di semina, la concimazione, l'irrigazione, i trattamenti di difesa, ecc.) (Noriega, 2014).

L'estrazione

La modalità estrattiva più idonea viene scelta in base alle caratteristiche del materiale vegetale, del tessuto che contiene gli oli essenziali, alle caratteristiche chimico fisiche dell'essenza e in base al prodotto che si vuole ottenere. Le rese di estrazione degli oli essenziali sono generalmente basse, dallo 0.05% al 2% in riferimento al peso della pianta essiccata; le rese inoltre dipendono da diverse variabili: periodo e condizioni climatiche alla raccolta, periodo che intercorre tra la raccolta della pianta e il momento dell'estrazione, assieme ad altri fattori diversi e spesso difficilmente prevedibili (ad esempio: perizia nella raccolta, presenza/assenza di fattori di patogenicità della pianta). Per gli oli essenziali propriamente detti destinati all'uso terapeutico le farmacopee ammettono solo due procedimenti: la distillazione in corrente di vapore e la spremitura

(o sfumatura) quest'ultimo caso riferito esclusivamente alle piante delle Rutacee (agrumi) (Noriega, 2014).



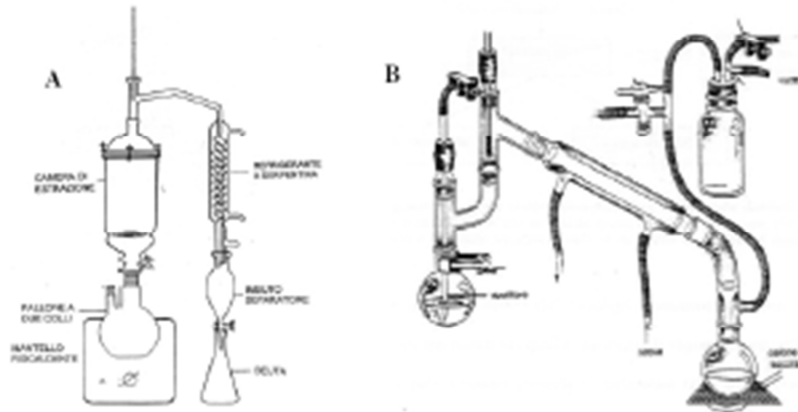
I diversi metodi per ottenere oli essenziali e sostanze aromatiche (miscele terpeniche)

In generale comunque, per quanto riguarda i metodi estrattivi delle sostanze volatili possono essere suddivisi in: distillazione in corrente di vapore, distillazione a secco, distillazione diretta di resine e oleoresine, spremitura, enfleurage. La loro conoscenza è fondamentale perché il metodo usato può influenzare la composizione chimica del prodotto finito (frazione volatile). Miscele terpeniche ottenute con metodi estrattivi diversi dalla distillazione in corrente di vapore o spremitura (per le droghe agrumarie) non possono essere considerate commercialmente oli essenziali anche se di uguale composizione (Noriega, 2014). Più precisamente la Farmacopea Europea VIII edizione definisce olio essenziale "Odorous product, usually of complex composition, obtained from a botanically defined plant raw material by steam distillation, dry distillation, or a suitable mechanical process without heating. Essential oils are usually separated from aqueous phase by a physical process that does not significantly affect their composition". Tuttavia anche miscele aromatiche volatili ottenute con metodiche non previste dalle Farmacopee (Enfleurage, Estrazione con solventi, estrazione con fluidi supercritici o SFE)

possono comunque ritrovare proiezioni applicative importanti in ambito salutistico purchè non vengano definite “oli essenziali”.

Riportiamo di seguito le metodiche che sono ufficialmente e normativamente considerate idonee a produrre oli essenziali propriamente detti: distillazione in corrente di vapore, distillazione a secco e, nel caso delle sole agrumarie, spremitura

La distillazione in corrente di vapore. La distillazione è una tecnica estrattiva che sfrutta un'importante caratteristica degli oli essenziali: la volatilità. Le essenze infatti sono sostanze con tensione di vapore relativamente bassa, eppure i componenti degli oli essenziali hanno temperature di ebollizione abbastanza alte: si trovano infatti tra 150 °C e 300 °C alla pressione atmosferica di 760 mmHg; dato che però non è possibile distillare ad una temperatura così elevata, a meno di degradare la fonte e i composti d'estrazione, si esegue la distillazione in presenza di acqua o di vapore sfruttando le proprietà descritte dalla legge di Dalton, e cioè che durante la distillazione a pressione atmosferica il punto di ebollizione sarà dato dalla temperatura alla quale la somma delle tensioni parziali di vapore eguaglia la pressione atmosferica. Tale temperatura sarà un po' al di sotto dei 100°C, cioè al di sotto della temperatura di ebollizione del componente più volatile (l'acqua), questo comporta il vantaggio di poter lavorare a temperature non troppo alte per gli oli essenziali, che contengono anche composti termolabili importanti nella caratterizzazione d'impiego del prodotto di estrazione. Per diminuire ulteriormente la temperatura di regime si può operare una distillazione sottovuoto lavorando quindi ad una pressione minore di quella atmosferica ma poiché in generale la tensione del vapore dell'acqua al diminuire della temperatura si abbassa molto più lentamente di quella dei componenti dell'olio essenziale, si avrà un distillato in cui la percentuale di olio sarà bassa. Si dovrà perciò usare molta più acqua per recuperare l'olio essenziale. Questo dato fa preferire, in genere, la distillazione a pressione ambiente. Si può anche realizzare la distillazione lavorando a pressioni superiori a 760 mmHg, la temperatura di operazione aumenta il rapporto acqua/olio trascinato, facendo aumentare nel distillato la quantità di olio essenziale e quindi la resa: questo comporta notevoli vantaggi economici, ma è una scelta da optare solamente quando i componenti dell'olio essenziale non sono molto sensibili al calore (Noriega, 2014).



Apparecchiature per distillazione

La distillazione in corrente di vapore è quindi senza dubbio la più utilizzata tra le tecniche di estrazione di oli essenziali dalle piante ed è quella prevista dalla farmacopea. Ne esistono molti tipi diversi che permettono di ottenere un prodotto ad uso commerciale, nei Paesi in via di sviluppo sono utilizzati metodi tradizionali e molto spesso antiquati che, però, in alcuni casi portano alla produzione di oli essenziali di elevata qualità. I paesi industrializzati dispongono invece di metodi tecnologicamente evoluti e complessi che permettono l'estrazione in quantità più elevate e l'analisi computerizzata del prodotto finale con conseguente accertamento della qualità. Il rilascio di oli essenziali contenuti nelle cellule/ghiandole oleifere avviene grazie al rigonfiamento delle strutture vegetali causato dal riscaldamento che porta alla rottura di membrane e pareti dovuta all'aumento di volume del contenuto cellulare. Il flusso di vapore d'acqua generato durante il processo di distillazione funge da trasportatore per le molecole che compongono l'olio essenziale. Questo metodo è il più diffuso perché efficace ed economico tuttavia non è applicabile in caso di oli essenziali con componenti termolabili (es. essenze contenute nei frutti del genere *Citrus*) o soggetti a processi idrolitici con alcune eccezioni, come ad esempio il caso in cui l'eliminazione di componenti indesiderate dell'olio essenziale sia resa possibile proprio perché termolabili o soggette a idrolisi (Noriega, 2014).

Distillazione a secco. L'olio essenziale viene prodotto nei distillatori sopra descritti riscaldando ad alta temperatura fusti e cortecce senza l'aggiunta di acqua o vapore (es. olio essenziale di canfora).

L'estrazione per spremitura. È il più antico, grazie alla sua semplicità era utilizzato molto prima dell'invenzione dei primi rudimentali utensili per la distillazione, è un metodo di estrazione meccanico che prevede l'uso di torchi manuali o meccanici, utilizzato principalmente per l'estrazione di oli essenziali contenuti nei frutti del genere *Citrus* che, nella maggior parte dei casi, non sopportano procedimenti a caldo (vedi Fig. 3). Oggi esistono 4 sistemi principali per la produzione industriale di questo tipo di oli essenziali: macchina sfumatrice, pellatrice, Brown oil extractors (BOEs), food machinery corporation (FMC)-in-Line; quest'ultimo permette la produzione di oli essenziali e succo in un solo passaggio senza che i 2 prodotti entrino in contatto tra di loro (Noriega, 2014).

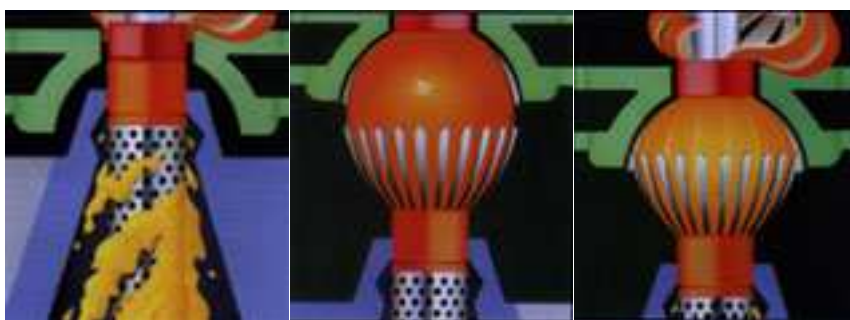


Figura 3. Fasi estrazione con sistema FMC In-line

Di seguito sono riportate le metodiche idonee ad ottenere miscele volatili che non possono essere considerate normativamente ed utilizzate in quanto oli essenziali, anche nel caso in cui la composizione risultante dovesse essere la stessa

Enfleurage. Questo è uno dei metodi più antichi per l'estrazione di essenze e sfrutta la solubilità in grasso o in oli fissi dei componenti terpenici che costituiscono l'olio. L'enfleurage consiste nella stesura su lastre di vetro o acciaio di uno strato di grasso su entrambi i lati; vengono scelti i grassi privi di odori sgradevoli e con scarsa o nulla predisposizione all'irrancidimento e ad alterazioni nel tempo (generalmente grassiminerali). Anticamente si usavano sego purificato e sugna, attualmente si utilizzano grassi sintetici, paraffine e glicerine. Al di sopra del grasso, a distanza di qualche

millimetro, viene posta una griglia ricoperta di fiori, che verranno sostituiti ogni 24-72 ore; in genere vengono fatte una trentina di sostituzioni di droga prima di saturare il grasso. Il prodotto che si ottiene è un grasso saturo della fragranza del fiore, in quanto le componenti volatili dell'olio essenziale sono state assorbite e concentrate nello stesso. Questo prodotto, chiamato pommade, è classificato in base alle cariche di fiori che ha estratto, quindi la "pommade n° 20" significa che è stata ottenuta sostituendo venti volte i fiori sul grasso: questo indice è detto valore fiorale. Per separare l'essenza dal grasso è necessaria un'estrazione con solventi (in genere esano o etere di petrolio), dopodiché si separa l'essenza dai solventi semplicemente facendo evaporare questi ultimi. Il prodotto ottenuto viene chiamato essenza concreta che deve poi essere trattata con alcool etilico puro per allontanare cere, resine e altri componenti indesiderati; una volta allontanato l'alcool etilico quello che si ottiene è un liquido viscoso altamente concentrato, detto "assoluta". Se l'alcool non viene allontanato, il prodotto viene generalmente utilizzato tal quale dall'industria dei profumi. La concreta subisce un'estrazione con etanolo ad alta gradazione (nel quale le sostanze indesiderate sono solo parzialmente solubili) e un raffreddamento fino a -20 °C. Le resine e le cere in questo modo precipitano e possono essere isolate tramite filtrazione o centrifugazione, mentre l'alcool viene eliminato con una distillazione a pressione ridotta, ottenendo così l'essenza "assoluta", una massa vischiosa di olio essenziale. L'assoluta può subire diversi trattamenti con alcool, ma una piccola percentuale di cera può sempre rimanere presente. Sebbene sia una metodica oggi in disuso, viene ancora conservata per particolari droghe, è infatti usata nel caso in cui l'olio essenziale sia contenuto in fiori molto delicati, che non sopportano un'eccessiva manipolazione o per estrarre essenze di grande finezza che, con altro sistema estrattivo, potrebbero alterarsi. L'enfleurage è ancora usato per Tuberosa (*Polianthes tuberosa*), Rosa pallida (*Rosa centifolia*), Eliotropio (*Heliotropium peruvianum*) (Noriega, 2014).

L'estrazione con solventi organici. È utilizzata nel caso di vegetali contenenti piccole quantità di oli essenziali e nel caso che questi non sopportino alte temperature, la droga viene posta in un opportuno recipiente e fatta attraversare da un solvente adatto. È assai poco praticata perché ha il limite dell'utilizzo di solventi organici che, dopo l'estrazione, devono essere allontanati e spesso non sono compatibili con l'uso successivo dell'essenza. Come già sottolineato tali prodotti, sebbene anche omologhi chimicamente, non possono essere commercializzati con la dicitura "oli essenziali" (Buso, 2015). Si utilizza questo metodo per piante poco ricche di oli essenziali, o per quelle essenze

facilmente alterabili dal calore per le quali non si può utilizzare la distillazione in corrente di vapore. Alcuni esempi sono: Gelsomino (*Jasminum officinale*), Iris (*Iris* sp.), Mughetto (*Convallaria majalis*), Ylang-ylang (*Cananga odorata*), Caprifoglio (*Lonicera caprifolium*), Magnolia (*Magnolia grandiflora*), Vaniglia (*Vanilla planifolia*). Vengono generalmente utilizzati dei solventi organici bassobollenti, immiscibili con l'acqua, a bassa tossicità, inerti nei confronti degli oli essenziali, inodori, possibilmente poco costosi e facilmente smaltibili (es. esano, etere di petrolio, butano, benzene). L'alcool non viene più utilizzato perché risulta essere poco selettivo ed il suo impiego viene riservato per lavorazioni successive all'estrazione con gli altri solventi (Noriega, 2014).

Estrazione con fluidi supercritici (SFE). La caratteristica principale di questa tecnica estrattiva è quella di utilizzare fluidi supercritici, SFE (Supercritical Fluid Extraction) le cui proprietà sono intermedie tra quelle dello stato liquido e quelle dello stato aeriforme: la densità è simile a quella di un liquido, mentre la viscosità si avvicina a quella del gas. Per variare opportunamente la densità del fluido, è sufficiente agire sulla pressione e sulla temperatura. L'estrazione mediante fluidi supercritici presenta diversi vantaggi: innanzitutto è veloce, il processo può durare dai 10 ai 60 minuti, mentre con le tecniche tradizionali l'estrazione richiede tempi più lunghi. L'azione della fase mobile può essere facilmente controllata, le proprietà solvatanti del fluido supercritico possono essere infatti regolate modulando pressione e temperatura, e questo permette di regolare selettivamente l'estrazione. L'estrazione con fluidi supercritici offre inoltre i vantaggi di operare a temperature basse e senza residui di solvente, con effetti positivi sulla qualità del materiale estratto. Il fluido supercritico più utilizzato è l'anidride carbonica, che presenta un punto critico a 31.1 °C e 73.8 bar. L'utilizzo di questo solvente determina alcuni ulteriori vantaggi: non inquina, è economico, non è infiammabile, permette di lavorare a basse temperature (intorno ai 50 °C), inerte, a temperatura ambiente è un gas per cui al termine dell'estrazione il prodotto è privo di solvente (Noriega, 2014).

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

- Distillazione frazionata sotto vuoto: è un trattamento molto diffuso che consente di migliorare le caratteristiche organolettiche (colore, odore, sapore), oppure di eliminare composti con proprietà sconvenienti per l'uso terapeutico. La

distillazione frazionata consente di effettuare una separazione precisa delle sostanze specifiche sfruttando il diverso punto di ebollizione.

- Deterpenazione: consiste nell'eliminazione degli idrocarburi monoterpenici dai costituenti sesquiterpenici e dai composti ossigenati. Il prodotto ottenuto viene definito deterpenato. Taluni monoterpeni possono infatti risultare irritanti per la pelle, si ossidano facilmente e possono andare incontro a processi di polimerizzazione, dando luogo a modificazioni delle caratteristiche organolettiche, delle proprietà e della solubilità. Le miscele deterpenate, oli essenziali inclusi, sono in genere più stabili, hanno maggiore solubilità in acqua e alcool a basso titolo, sono privi di potere irritante, ed in più hanno maggiore potere battericida, grazie alla maggior concentrazione di composti ossigenati; per contro, si conservano con minore facilità. La deterpenazione può avvenire: a caldo, con una distillazione frazionata sotto vuoto; a freddo, mediante l'utilizzo di solventi; con metodi fisici, tramite cristallizzazione per raffreddamento; con metodi chimici, sfruttando la reattività dei terpeni con basi forti.
- Attivazione: si sviluppa prevalentemente su oli essenziali propriamente detti. Si ottiene modificando la costituzione originale dell'olio essenziale tramite perossidazione. Tale operazione ne esalta l'attività battericida, ottenendo oli essenziali più interessanti per l'uso antisettico. La perossidazione consiste nel far agire ozono o aria ozonizzata in determinate condizioni di temperatura e pressione direttamente sull'olio essenziale, così da determinare la formazione di perossidi in una percentuale che è direttamente proporzionale al tempo e all'intensità dell'azione perossidante. Gli oli essenziali attivati inoltre penetrano più facilmente attraverso la cute perché la loro tensione superficiale è maggiore delle essenze naturali, tuttavia è necessario tener conto del fatto che sono anche più irritanti di queste ultime, dunque si rende indispensabile emulsionare gli oli essenziali perossidati con veicoli adatti (Noriega, 2014).

La conservazione degli oli essenziali. I contenitori delle essenze devono essere di vetro scuro, di acciaio o di materiale smaltato, di metallo stagnato o zincato, in ogni caso di materiale inerte, non poroso e che oscuri alla luce. I contenitori devono essere sempre ben chiusi per evitare che l'aerazione provochi ossidazione cambiando le proprietà organolettiche dell'olio essenziale o provocando resinificazione. Per ovviare all'inconveniente può essere aggiunto un antiossidante liposolubile. I contenitori vanno

poi conservati ad una temperatura compresa tra i 5 ed i 15 °C; temperature più elevate possono provocare fenomeni di degradazione o comunque possono velocizzare tutte le possibili reazioni alterative (Noriega, 2014).

Caratteristiche chimico fisiche e composizione chimica degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono, nella maggior parte dei casi, liquidi a temperatura ordinaria, volatili, di consistenza oleosa, più o meno fluidi (la loro densità è molto spesso inferiore a quella dell'acqua e varia da 0.759 a 1.187), di odore aromatico, incolori o colorati (ad esempio l'essenza di *Chamomilla recutita* è di colore blu), destrogiri o levogiri ma raramente otticamente inattivi. Sono poco solubili in acqua, alla quale però trasmettono il loro aroma perché lievemente idrofili, mentre sono solubili in alcool, etere, cloroformio e nella maggior parte dei solventi organici. Risultano solubili anche negli oli fissi, dai quali si distinguono per la loro volatilità. In alcuni casi il costituente principale dell'olio essenziale è solido a temperatura ambiente come accade per il timolo (olio essenziale di *Thymus vulgaris*), il mentolo (*Mentha x piperita*), l'anelolo (*Pimpinella anisum*). Questi parametri, specifici per ogni essenza, sono usati per il riconoscimento e per il controllo qualitativo (Noriega, 2014).

Gli oli essenziali sono miscele complesse di sostanze appartenenti a due fonti biogenetiche distinte:

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

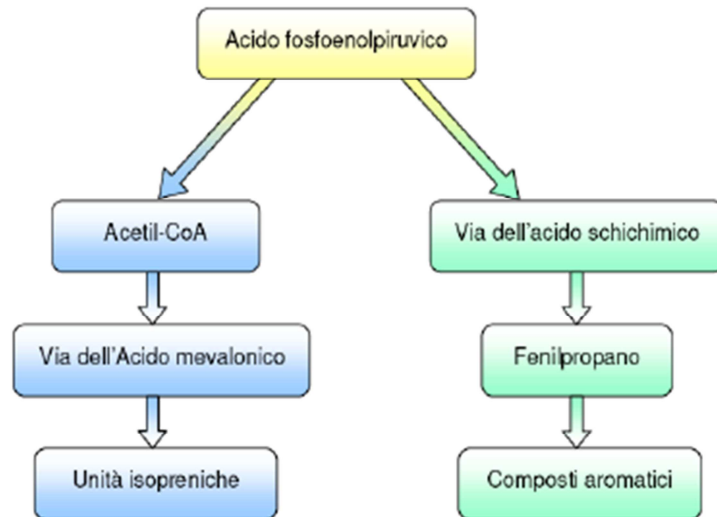
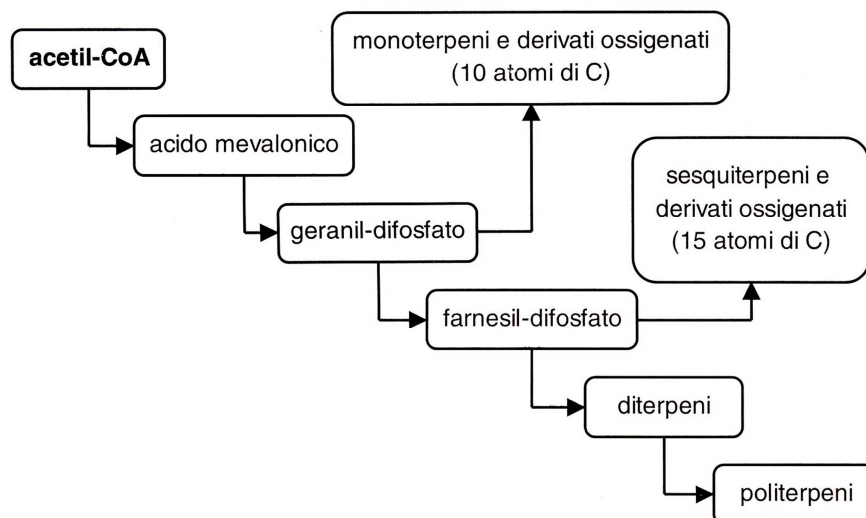
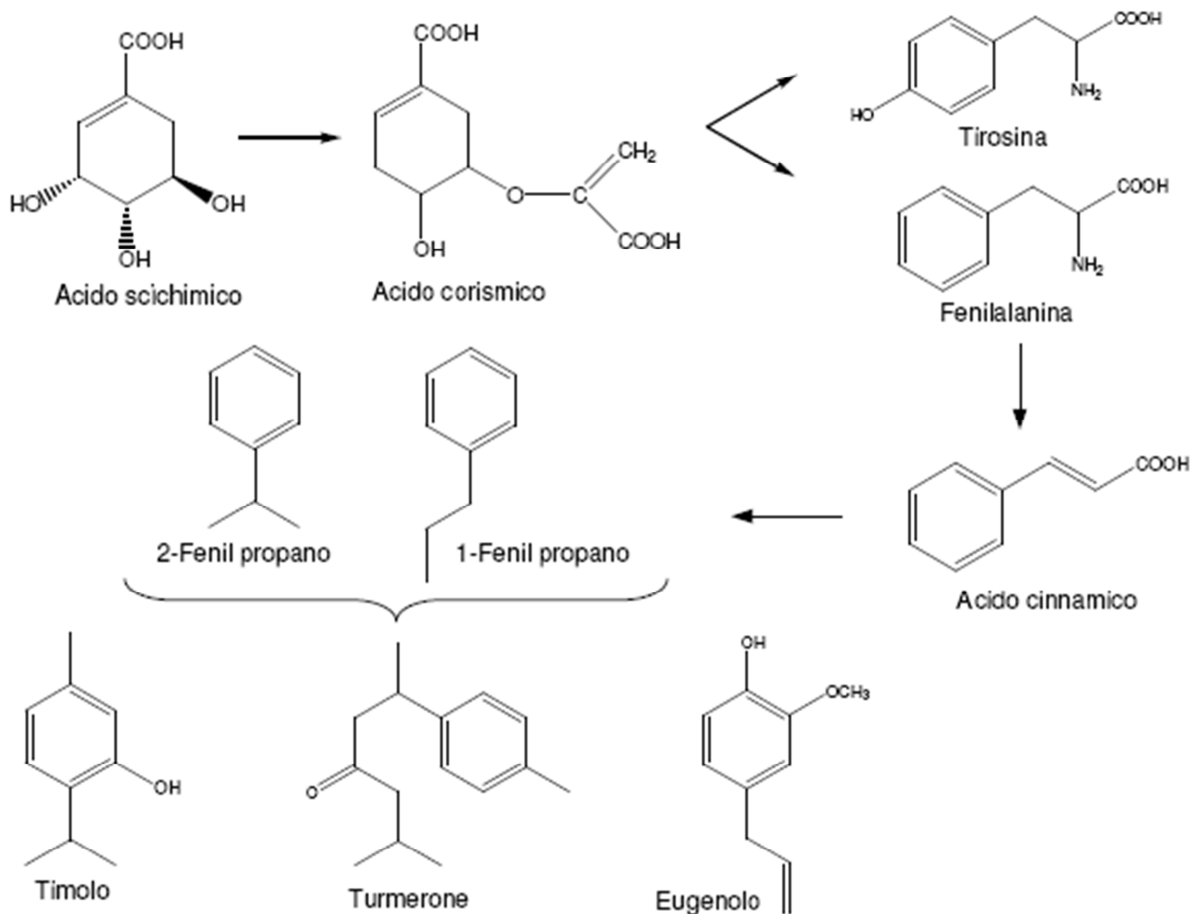


Figura 4. Fonti biogenetiche degli oli essenziali

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



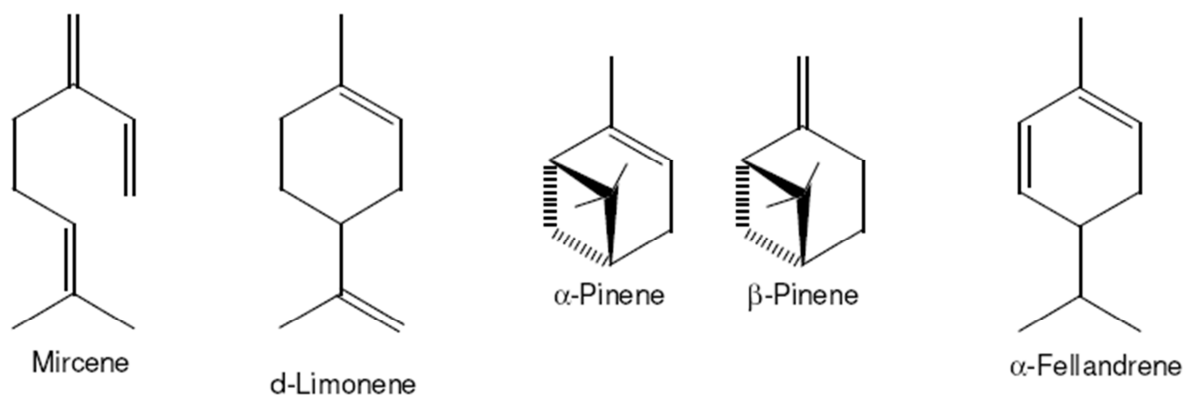
I prodotti aromatici derivanti dal fenilpropano costituiscono un gruppo particolarmente importante, solitamente responsabili dei caratteri organolettici degli oli essenziali. Questi composti aromatici si formano a partire dall'acido fosfoenolpiruvico, come i terpeni, ma la biosintesi poi prosegue seguendo la via dell'acido scichimico, fino al fenilpropano (vedi Fig. 4). Da questa molecola derivano composti aromatici di vario tipo, come l'eugenolo e l'anelolo.



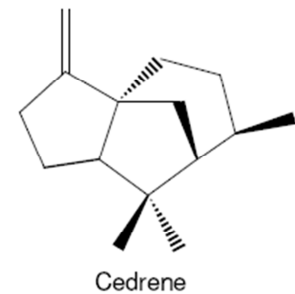
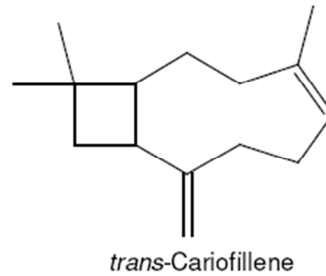
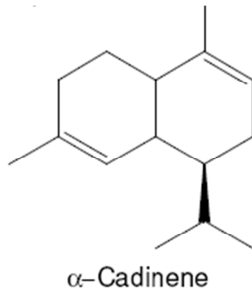
La composizione degli oli essenziali è molto complessa, ma è comunque possibile caratterizzare e classificare i costituenti sulla base degli elementi costitutivi:

a) idrocarburi (elementi caratterizzanti C e H):

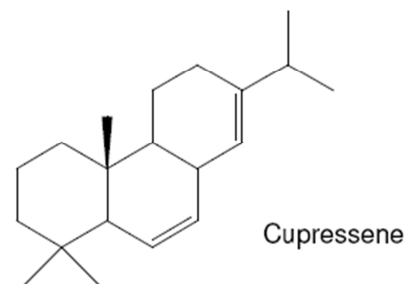
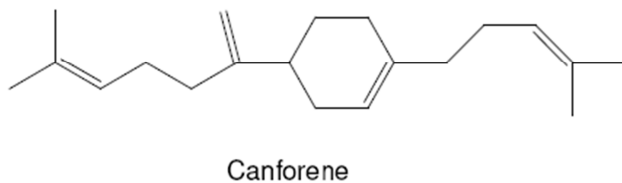
- Idrocarburi monoterpeneici (C₁₀) alifatici e aromatici insaturi mono e biciclici ad esempio: mircene, limonene, pinene, phellandrene.



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

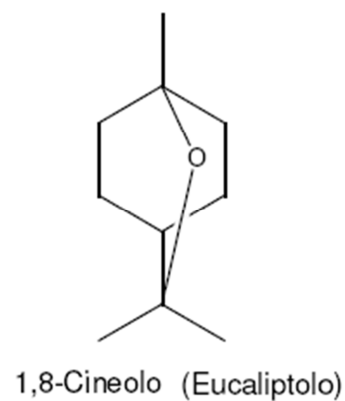
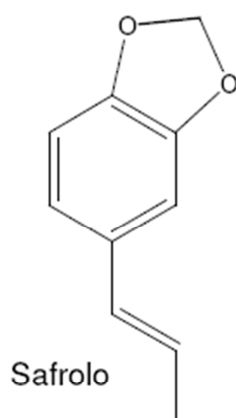
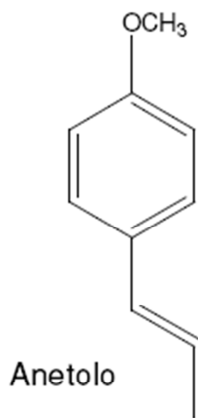


- Azuleni ad esempio: camazulene, eucazulene, guajazulene, vetivazulene.
- Idrocarburi diterpenici (C20) ad esempio: canforene e cupressene.



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

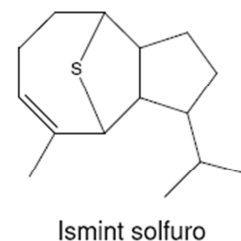
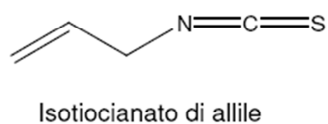
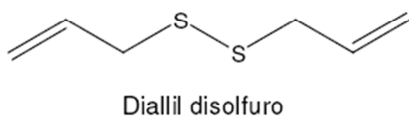
- Alcoli (gruppo funzionale -OH) ad esempio: linalolo, geraniolo, santalolo, mentolo, nerolo, borneolo.
- Aldeidi (gruppo funzionale HC=O) ad esempio: aldeide cinnamica, aldeide cuminica, citrale (geraniale + nerale), vanillina.
- Chetoni (gruppo funzionale C=O) ad esempio: carvone, tujone, canfora,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



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

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

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



Controllo di qualità degli oli essenziali

Solitamente nel controllo qualità di una sostanza, si fa riferimento alla sua purezza considerando la percentuale del componente principale o di quello più interessante dal

punto di vista applicativo. Nel campo degli oli essenziali, in quanto miscele complesse di origine naturale e di composizione variabile, il concetto di purezza è inteso in senso lato; infatti, più che alla percentuale dei singoli componenti si guarda al prodotto nel suo insieme. Sugli oli essenziali si possono svolgere diversi tipi di controlli, alcuni basati sulle tecniche classiche e dettati dalle Farmacopee, altri sviluppati più recentemente e applicati con successo anche agli oli essenziali (Noriega, 2014).

Determinazioni fisiche

- **Esame organolettico:** si controllano colore, odore, sapore. Questi ultimi due sono soggettivi, ed è necessaria una notevole esperienza. Per l'odore si deve tenere conto della nota percepita all'apertura del contenitore e sommarvi le impressioni percepite dall'evaporazione lenta su carta. A questo scopo si impiega una striscia di carta assorbente lunga circa 15 cm e larga 7/8 mm; l'estremità della striscia viene intinta nell'olio per circa 2 cm e si inizia ad odorare per percepire le note di testa. Si ripetono le odorazioni successive ad intervalli di quindici minuti, annotando le variazioni di odore per un periodo variabile da una a diverse ore. Il test va eseguito preferibilmente in parallelo con un campione di riferimento. La prova del sapore, invece, non può essere eseguita su qualsiasi olio essenziale, ma va riservata ad esempio, agli oli agrumari, di Menta, d'Anice, dopo opportuna diluizione (da 2000 a 5000 volte).
- **Densità relativa:** viene misurata sino alla terza o quarta cifra decimale, e va specificata la temperatura alla quale viene misurata.
- **Potere rotatorio:** molti oli essenziali contengono costituenti che hanno uno o più atomi di carbonio asimmetrici. Queste sostanze quando attraversate da luce polarizzata, sono in grado di ruotarne il piano o verso destra o verso sinistra.
- **Indice di rifrazione:** è il valore del rapporto tra i seni degli angoli di incidenza e di rifrazione di un raggio luminoso che passi dall'aria alla sostanza in esame (Noriega, 2014).

Determinazioni chimiche

- Determinazione dell'indice di esteri: l'indice di esteri è dato dal numero in milligrammi di KOH (idrossido di potassio) necessari per saponificare gli esteri contenuti in 1 grammo di sostanza in esame.
- Determinazione del residuo all'evaporazione delle essenze: costituisce la percentuale in peso dopo l'evaporazione a bagnomaria.
- Determinazione dell'acqua delle essenze: si mescolano 10 gocce di essenza con 1 mL di carbonio disolfuro. La soluzione che si ottiene deve rimanere limpida.
- Determinazione degli esteri estranei nelle essenze: si riscalda a bagnomaria per 2 minuti 1 mL di essenza con 3 mL di soluzione di potassio idrossido (100 g/L) in alcool, preparata al momento dell'uso. Non si devono formare cristalli nei 30 minuti successivi, anche dopo raffreddamento.
- Determinazione di oli grassi ed essenze resinificate nelle essenze: si lascia cadere 1 goccia di essenza su carta da filtro, la goccia deve evaporare completamente nel corso delle 24 ore senza lasciare alcuna macchia traslucida o grassa.
- Determinazione della solubilità delle essenze in alcool: serve per determinare la qualità delle essenze e dei propri componenti.
- Determinazione dell'1,8-cineolo nelle essenze: è basata sulla determinazione della temperatura di cristallizzazione che assume l'ortocresolo in presenza di una quantità maggiore o minore di eucaliptolo. I valori di 1,8-cineolo che si ottengono vanno confrontati con quelli della monografia dell'olio essenziale preso in esame. Se i valori ottenuti in relazione ai saggi rientrano in quelli della farmacopea, è possibile associare un'importanza di carattere officinale all'essenza (Noriega, 2014).

Tecniche analitiche di controllo

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

cromatografica impiegata a scopo analitico, essa si basa sulla diversa ripartizione di varie sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con la fase mobile, costituita da un gas inerte. La fase mobile è un gas permanente (detto carrier o gas di trasporto) che fluisce attraverso una colonna in cui è invece posta la fase stazionaria. All'uscita da questa colonna un rivelatore segnala il passaggio dei diversi componenti della miscela ad un sistema di elaborazione dei segnali. Quest'ultimo fornisce il gascromatogramma, in cui la quantità di sostanza fluita, ossia separata dal suo assorbente è diagrammata in funzione del tempo che la sostanza ha impiegato per attraversare la colonna. Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi, purché siano opportunamente solubilizzati e possano essere vaporizzati. Questa condizione è stata poi superata dalla HPLC, un'altra tecnica che fra l'altro consente di lavorare a temperatura ambiente e dunque evita il danneggiamento di eventuali sostanze termolabili. La gascromatografia può essere applicata in tutti i campi della tecnologia e della ricerca, viene usata soprattutto per l'analisi quantitativa, infatti l'altezza o l'area dei picchi possono essere correlate con la quantità dei diversi componenti della miscela analizzata. Importante sottolineare che ad ogni modo si possono usare i parametri gascromatografici per ricavare informazioni qualitative. Il gascromatografo con rilevazione di massa, ossia l'accoppiamento della gascromatografia con lo spettrometro di massa, consente di effettuare analisi qualitative e quantitative di qualsiasi specie chimica, con limiti di rilevabilità estremamente bassi. La spettroscopia di massa viene usata principalmente per determinare la massa molare; inoltre, poiché lo spettro rappresenta una sorta di "fingerprinting" delle molecole, è di fondamentale importanza per identificare sostanze incognite. Proprio per questo motivo lo spettrofotometro di massa viene spesso accoppiato al gascromatografo o al cromatografo HPLC. La GC-MS, in particolare permette di analizzare in tempo reale i singoli picchi di uscita dalla colonna, effettuando la determinazione qualitativa mediante il confronto dello spettro registrato con gli spettri memorizzati nella banca dati (Noriega, 2014).

OLI ESSENZIALI: USI TRADIZIONALI E MODERNI

Piante e oli aromatici vengono usati da migliaia di anni per le loro applicazioni salutistiche e culinarie oltre che come profumi. La terapia medica che sfrutta le essenze è la più antica forma di trattamento conosciuta e le sue origini sono da ricercare in tempi remoti, tanto che le prime tracce risalgono a oltre 5000 anni or sono. I primi rudimentali processi di distillazione risalgono al quarto millennio a.C., epoca in cui venivano già utilizzati altri metodi di estrazione come spremitura macerazione e enfleurage (Camporese, 1998). L'utilizzo di aromi fu inizialmente legato al culto sacrale e ogni popolazione utilizzava di preferenza le piante aromatiche che aveva a disposizione in loco. I Romani ereditarono e ampliarono conoscenze in merito a utilizzo di piante aromatiche e oli essenziali provenienti da Greci e Egizi utilizzandole per produrre oli per il corpo e per la profumazione di case e vestiti. Una diffusione consistente della pratica della distillazione e della produzione di profumi in Europa avvenne nel XII secolo e portò, nel XVI secolo, alla conoscenza e utilizzo di oltre 70 essenze; lavanda e rosmarino furono tra i primi oli a essere estratti. Successivamente la scoperta e l'affermarsi della sintesi chimica (XVIII secolo) portò alla produzione di nuove molecole utilizzabili in tecnica profumiera e cosmetica che affiancarono e talvolta sostituirono le essenze naturali. È definita aromaterapia la cura mediante l'uso di oli essenziali estratti in modo da mantenerne inalterate le caratteristiche chimico fisiche e da poter sfruttare le proprietà curative. Il termine è stato coniato dal chimico francese Gattefossè che lavorò con gli oli essenziali nel campo della cosmesi, pare che il suo interesse per le essenze sia iniziato nel 1928 dopo aver osservato per caso le potenzialità terapeutiche di alcuni oli essenziali. La pratica aromaterapica può essere considerata una parte della medicina erboristica che a sua volta attinge più della medicina occidentale moderna al bagaglio di conoscenze che derivano dalle medicine tradizionali e complementari che, negli ultimi anni stanno assumendo sempre più importanza e visibilità nella gestione dei servizi sanitari in molti stati (Noriega, 2014; Buso, 2015).

La rinascita della fama e dell'utilizzo degli oli essenziali in epoca moderna dopo i già citati fasti dell'antichità avviene negli anni 20 del secolo scorso con la nascita della pratica aromaterapica, quando nel 1928 il chimico Francese Gattefossè ebbe modo di osservare per puro caso le proprietà terapeutiche della lavanda utilizzata per curare una grave

ustione e conìò il termine “aromaterapia”. Quasi quarant'anni dopo nel 1964 un medico francese, il Dott. Jean Valnet, pubblica con il titolo “Aromatherapie” uno studio riguardante i buoni risultati ottenuti utilizzando alcuni oli essenziali nella terapia di svariati disturbi fisici e psichici. L'aromaterapia non va intesa come una forma di trattamento che ha a che fare solo con il senso dell'olfatto poiché ogni olio essenziale possiede determinati componenti che in alcuni casi sono in grado di interagire con il nostro organismo con un'attività sfruttabile dal punto di vista terapeutico (Lawless, 1992). Basti pensare al grande numero di pubblicazioni esistenti che, negli ultimi 20 anni, descrivono l'attività biologica di un grande numero di oli essenziali che li rende utilizzabili in campo cosmetico farmaceutico alimentare sebbene questi studi siano largamente limitati a valutazioni *in vitro*. È importante ricordare che accanto agli aspetti positivi dell'uso degli oli essenziali sono stati riscontrati anche potenziali rischi, legati a potenzialità allergizzanti o irritanti. Volendo riassumere le principali attività biologiche che sono state riscontrate e confermate a carico di alcuni oli essenziali con opportuni test *in vitro* e, più limitatamente, *in vivo*, bisogna citare: attività antiossidante attività anticancerogena, attività antinocicettiva, attività antivirale, attività antiflogistica, attività di promozione dell'assorbimento di principi attivi opportunamente veicolati attraverso membrane biologiche (Baser and Buchbauer, 2015). L'utilizzo alimentare degli oli essenziali è molto diffuso per conferire determinate caratteristiche organolettiche all'alimento ma le crescenti conoscenze riguardo alle proprietà antiossidanti e antimicrobiche di alcune essenze fanno pensare a un impiego alimentare che potrebbe assumere grande importanza nel caso permettesse di limitare l'uso di conservanti. Gli oli essenziali sono molto utilizzati nella formulazione di cosmetici e profumi, dato che questi sono prodotti di grande consumo si è venuto a creare il problema dell'approvvigionamento poiché i grandi produttori richiedono sempre maggiori quantità di materie prime e l'industria cosmetica punta sempre di più su prodotti naturali e biologici. Questo è determinato in primo luogo dalla relazione che si è creata negli ultimi anni tra cosmesi e prodotto vegetale che nasce di pari passo con la diffidenza del consumatore nei confronti di prodotti contenenti ingredienti di sintesi come derivati petrolchimici, derivati siliconici e profumi o coloranti di sintesi. Questo cambiamento della percezione della cosmesi da parte del consumatore ha portato a una modifica delle scelte del formulatore e a un incremento delle vendite di prodotti naturali o biologici. Si sono resi necessari pertanto enti certificatori della cosmesi biologica che classifichino il

prodotto come biologico o naturale in base alle sue caratteristiche. Ne esistono in grande numero sia a livello nazionale che internazionale come: gli italiani ICEA, CCBP, BIOAGRICERT, gli enti certificatori europei ECOCERT, COSMEBIO, BDIH, SOIL ASSOCIATION, gli enti certificatori internazionali ECO-LABEL e COSMOS STANDARD. In particolare gli standard COSMOS rappresentano la più recente indicazione in materia di cosmesi biologica e nascono dall'armonizzazione delle linee guida dei seguenti certificatori europei: BDIH (Germania), BIOFORUM (Belgio), COSMEBIO & ECOCERT (Francia), ICEA (Italia), SOIL ASSOCIATION (UK) (Radice, 2011; Noriega, 2014; Buso, 2015).



Loghi di alcuni enti certificatori

Negli ultimi anni è aumentata l'attenzione e il dibattito scientifico riguardo la sicurezza degli ingredienti utilizzati in tecnica profumaria e cosmetica e pertanto si è resa necessaria una regolamentazione europea che unificasse le eterogenee leggi degli stati membri. La Commissione Europea, assistita dal comitato scientifico per i prodotti cosmetici e i prodotti non alimentari destinati ai consumatori (SCCNFP), ha emanato la direttiva 2003/15/CE che modifica la direttiva 76/768/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai prodotti cosmetici. Sono state individuate in questo documento 26 sostanze aromatiche definite allergizzanti che devono essere segnalate in etichetta se la loro concentrazione supera lo 0.001% in prodotti leave-on o lo 0.01% in prodotti rinse-off. Sedici di queste sostanze sono di derivazione naturale, le ultime 2 sono materie prime vegetali aromatiche (estratto di *Ervenia prunastri* e *Ervenia furfuracea*), 8 sono di derivazione esclusivamente sintetica. L'obbligo di etichettatura per le 26 sostanze non tiene conto del modo in cui vengono inserite nel prodotto ovvero la loro presenza deve essere dichiarata indipendentemente

dal fatto che facciano parte di un “ingrediente complesso” o che vengano inserite come tali. I 16 allergeni naturali elencati nella direttiva sono presenti in circa 180 materie prime vegetali (come estratti e oli essenziali) (EFFA CoP, 2007). L’emanazione di una legislazione europea ha reso necessaria la formulazione di linee guida per lo scambio di informazioni tra produttori di cosmetici/industria profumaria e produttori di fragranze e materie prime; queste sono state elaborate da COLIPA (Associazione delle industrie cosmetiche europee), EFFA (European Flavour and Fragrance Association). Secondo queste linee guida il produttore di cosmetici deve ottenere dal fornitore di fragranze una dichiarazione con le seguenti informazioni: generalità del cliente, nome e indirizzo del fornitore, identità della miscela profumante con il suo nome (se esiste) e numero di codice, categoria del prodotto, modalità di impiego e concentrazione di utilizzo per la quale la miscela profumante è stata valutata, valutazione della sicurezza della miscela profumante per l’uso a cui è destinato, certificato di uniformità agli standard IFRA attualmente in corso, dichiarazione di conformità degli ingredienti della fragranza alla legislazione chimica EU, informazioni accurate sulla presenza e concentrazione di sostanze regolamentate negli allegati della Direttiva Cosmetica, altre informazioni se necessarie, data, nome qualifica e firma del valutatore della sicurezza. È necessaria inoltre una valutazione della sicurezza della materia prima aromatica nel prodotto cosmetico finito che deve tenere conto del livello di purezza degli ingredienti (Melato Unipro). Va ricordato che sono in corso ulteriori sviluppi e modifiche del regolamento europeo; in questo senso è stata pubblicata una opinione SCCS 1459/11 nel luglio 2012 in cui è presente una nuova lista di sostanze allergeniche che comprende 26 ingredienti allergeni, altre 30 molecole e 26 estratti naturali. Di queste 82 sostanze 12 sono state considerate allergeni da contatto che destano particolare preoccupazione a causa dell’alto rischio di sensibilizzazione (Noriega, 2014; Buso, 2015).

Elenco degli allergeni riconosciuti dalla Direttiva 2003/15/CE:

- Amylcinnamal (n. CAS 122-40-7)
- Alcole benzilico (n. CAS 100-51-6)
- Alcole cinnamilico (n. CAS 104-54-1)
- Citrale (n. CAS 5392-40-5)
- Eugenolo (n. CAS 97-53-0)
- Idrossicitronellale (n. CAS 107-75-5)
- Isoeugenolo (n. CAS 97-54-1)

- Alcole beta-pentilcinnamilico (n. CAS 101-85-9)
- Salicilato di benzile (n. CAS 118-58-1)
- Cinnamaldeide (n. CAS 104-55-2)
- Cumarina (n. CAS 91-64-5)
- Geraniolo (n. CAS 106-24-1)
- 4-(4-idrossi-4-metilpen-til)cicloes-3-encarbaldeide (n. CAS 31906-04-4)
- Alcole anisilico (n. CAS 105-13-5)
- Cinnamato di benzile (n. CAS 103-41-3)
- Farnesolo (n. CAS 4602-84-0)
- 2-(4-terz-butylbenzil)-propionaldeide (n. CAS 80-54-6, Liliale)
- Linalolo (n. CAS 78-70-6)
- Benzoato di benzile (n. CAS 120-51-4)
- Citronellolo (n. CAS 106-22-9)
- Alfa-esilcinnamaldeide (n. CAS 101-86-0)
- D'limonene (n. CAS 5989-27-5)
- Ott-2-inoato di metile (n. CAS 111-12-6)
- 3-metil-4-(2,6,6-trimetil-2-cicloesen-1-il)-3-buten-2-one (n. CAS 127-51-5)
- Estratto di evernia prunastri ed evernia furfuracea (n. CAS 90028-68-5)
- Evernia furfuracea, estratto (n. CAS 90028-67-4)

Le essenze hanno perciò da sempre accompagnato le culture delle civiltà, acquisendo via via, dalle più antiche alle contemporanee, poliedricità di usi e indicazioni, dall'usoritualistico-religioso, a quello condimentario, a quello cosmetico e terapeutico. In ogni caso, sono entrate a far parte delle culture di tutto il mondo. Considerare e descrivere l'importanza che oggi sta assumendo la medicina tradizionale è necessario per comprendere il potenziale incremento di importanza socio-economica della conoscenza e dell'utilizzo degli oli essenziali nell'ambito salutistico e alimentare (Buso, 2015).

Gli usi sempre più diversificati degli oli essenziali, nonché la sempre più diffusa richiesta di mercato, hanno stimolato l'industria degli aromi, già in forte crescita agli inizi del XIX secolo, a sviluppare la produzione di oli essenziali di sintesi. Questi, erano e sono costituiti generalmente dal solo costituente principale dell'olio in Natura caratterizzandosi dunque delle proprietà funzionali principali ma senza quegli aspetti che caratterizzano un'essenza come fitocomplesso. Grazie alla riscoperta di questo aspetto costitutivo, che è anche

espressione di una funzionalità complessa, oggi il mercato delle essenze naturali trova rinnovato vigore (Noriega, 2014).

L'aromaterapia è un metodo terapeutico basato sull'utilizzazione di oli essenziali. Il termine "aromaterapia" fu coniato nel 1928 da Rene Gattefossé; nel 1964, col titolo di Aromatherapie, furono pubblicati i risultati degli studi clinici del dottor Jean Valnet, il quale impiegava gli oli essenziali nel suo trattamento di disturbi medici di varia natura, in particolare psichiatrici. Margherite Maury, una biochimica francese, si interessò all'aromaterapia nel periodo della seconda guerra mondiale, utilizzandola insieme ad altri rimedi e prodotti di bellezza naturali. Sviluppò in Francia una branca separata dell'aromaterapia che impiegava gli oli per uso esterno, piuttosto che interno, e li combinava con il massaggio per ottenere un risultato più completo. Paul Belaiche si occupò principalmente delle patologie infettive trattabili con le essenze e dei metodi per valutarne l'efficacia individuale mediante l'aromatogramma, metodo semplice in vitro per valutare il potere battericida degli oli essenziali (Noriega, 2014).

L'industria degli aromatizzanti sta conoscendo negli ultimi anni un grande sviluppo, soprattutto in campi quali quello farmaceutico, alimentare e cosmetico. Da sempre sono stati questi gli ambiti di applicazione, ma oggi l'aspetto della aromatizzazione si accompagna a quello nella naturalità, che dà un valore aggiunto al prodotto, e all'aspetto funzionale nel senso più ampio dell'olio essenziale. Il concetto di aromatizzazione è dato dalla necessità di rendere i prodotti più adatti alle richieste di mercato, quindi sia in campo farmaceutico che in campo alimentare, la motivazione è data dal bisogno di rendere, ad esempio, più appetibili i prodotti (Noriega, 2014).

Aromatizzazione in campo salutistico. L'aromatizzazione di un farmaco concorre alla sua accettazione. Un farmaco infatti dal gusto e dal profumo gradevoli risulta meglio accetto al paziente rispetto ad uno con un gusto sgradevole; questo costituisce uno stimolo per la psicologia del paziente che lo dispone in modo positivo alla guarigione. I prodotti disponibili per l'aromatizzazione dei farmaci possono essere di sintesi, di emisintesi o naturali; tra i prodotti aromatizzanti naturali, ovviamente, gli oli essenziali giocano un ruolo fondamentale. La scelta del composto aromatizzante deve tener conto della preparazione farmaceutica coinvolta, e, a seconda delle caratteristiche chimico fisiche, si renderà necessario scegliere aromatizzanti diversi (Noriega, 2014).

Aromatizzazione in campo alimentare. L'industria alimentare fa un largo uso di sostanze aromatizzanti nella formulazione di prodotti alimentari per vari motivi: conferire sapore e

odore a una miscela di ingredienti che, provenendo spesso da processi più o meno complessi di elaborazione, hanno perduto il gusto originale; standardizzare i prodotti alimentari anche dal punto di vista dei caratteri organolettici; venire incontro alle sempre più esigenti preferenze di mercato e, aspetto non secondario, favorire anche la conservabilità dei prodotti (Noriega, 2014).

In campo cosmetico gli oli essenziali trovano applicazioni in diversi ambiti, possono innanzitutto essere impiegati come componente profumata di un cosmetico, come aromatizzante di particolari cosmetici in cui è importante anche l'effetto gustativo (come nei dentifrici, collutori, sticks labiali), oppure possono trovare un'importante proiezione applicativa nell'ambito della cosmesi funzionale. Il settore dell'aromacosmesi, si interessa di trattamenti cosmetici a base di oli essenziali di piante aromatiche che li contengono. Le proprietà farmacoterapeutiche delle essenze stanno alla base del loro uso in aromaterapia e sono molto spesso le stesse che ne determinano l'impiego funzionale in cosmetologia; così essenze dalle proprietà antinfiammatorie, come ad esempio l'olio di Camomilla, trovano applicazione in cosmetici emollienti. Come nell'ambito della nutrizione, gli oli essenziali possono trovare applicazione nella cosmesi funzionale, come emollienti, reidratanti, antiossidanti, ecc. Quindi un cosmetico funzionalizzato ad uso topico od endogeno deve apportare sostanze al fine di compensare le carenze o le eventuali disfunzioni metaboliche, nel rispetto delle proprietà biologiche e fisico-chimiche della cute: i cosmetici devono perciò avere affinità per la natura e le proprietà del tessuto cutaneo (Noriega, 2014).

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

Note di testa - Il profumo esplode con le note di testa che devono attirare l'attenzione. Emanano un profumo leggero ed effimero. Sono spesso note agrumate (limone,

bergamotto, mandarino, arancio), o erbacee (salvia, rosmarino, lavanda). Si sviluppano e si arricchiscono gradualmente unendosi alle note di cuore che sono le note dominanti del profumo.

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

Note di fondo - Le note di fondo intensificano il carattere del profumo e gli danno tenuta. Queste note hanno bisogno di più tempo per svilupparsi, ma durano più a lungo delle altre. Si sentono quasi impercettibilmente attraverso le note di testa, sostengono e prolungano le note di cuore. Controllano le diverse velocità di evaporazione delle note di testa e delle note di cuore. Sono spesso note balsamiche (benzoino, galbano, mirra) o boisée (legno di cedro, patchouli, vétiver, sandalo) (Noriega, 2014).

SCOPO DELLA TESI

Gli oli essenziali sono il prodotto del metabolismo secondario delle piante e sono generalmente materiali volatili fragranti composti da una miscela complessa di idrocarburi mono- e sesquiterpenici, e di materiali ossigenati derivati biosinteticamente da questi. Altri costituenti comuni includono i fenilpropanoidi derivati dal percorso dell'acido shichimico e i loro prodotti di trasformazione, e altri composti provenienti dal metabolismo degli acidi grassi e degli amminoacidi. A parte questi gruppi di composti maggioritari, sono presenti molte altre molecole che includono composti azotati e solforati. Il nostro gruppo di ricerca svolge da molti anni attività di studio e di applicazione di oli essenziali, sia per la particolare via biosintetica da cui essi derivano, sia per le notevoli applicazioni in campo della salute (farmaceutico, cosmetico, alimentare) (Sacchetti et al., 2005).

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

Il lavoro di dottorato è stato incentrato sull'ottimizzazione dei processi di estrazione, lo studio dei componenti chimici (HPTLC, GC-MS, RMN) e valutazione dell'attività biologica (antiossidante, antimicrobica, antinfiammatoria e mutagenica) degli oli essenziali ottenuti dalle seguenti specie vegetali:

1. *Cymbopogon citratus* (Poaceae)
2. *Dacryodes peruviana* (Burseraceae)
3. *Chenopodium ambrosioides* (Amaranthaceae)
4. *Endlicheria klugii* (Lauraceae)
5. *Ocimum micranthum* (Lamiaceae)
6. *Ocotea cernua* (Lauraceae)

7. *Ocotea quixos* (Lauraceae)
8. *Piper carpunya* (Piperaceae)
9. *Schinus molle* (Anacardiaceae)
10. *Tagetes minuta* (Asteraceae)

La scelta delle specie è frutto di un lavoro di continuità di cui il presente dottorato rappresenta una parte del lungo percorso di ricerca che ha come finalità complessiva la mappatura della biodiversità vegetale dell'Ecuador amazzonico guidata dagli usi etnofarmaceutici – spesso anche molto frammentari – che caratterizzano la tradizione delle etnie native del luogo.

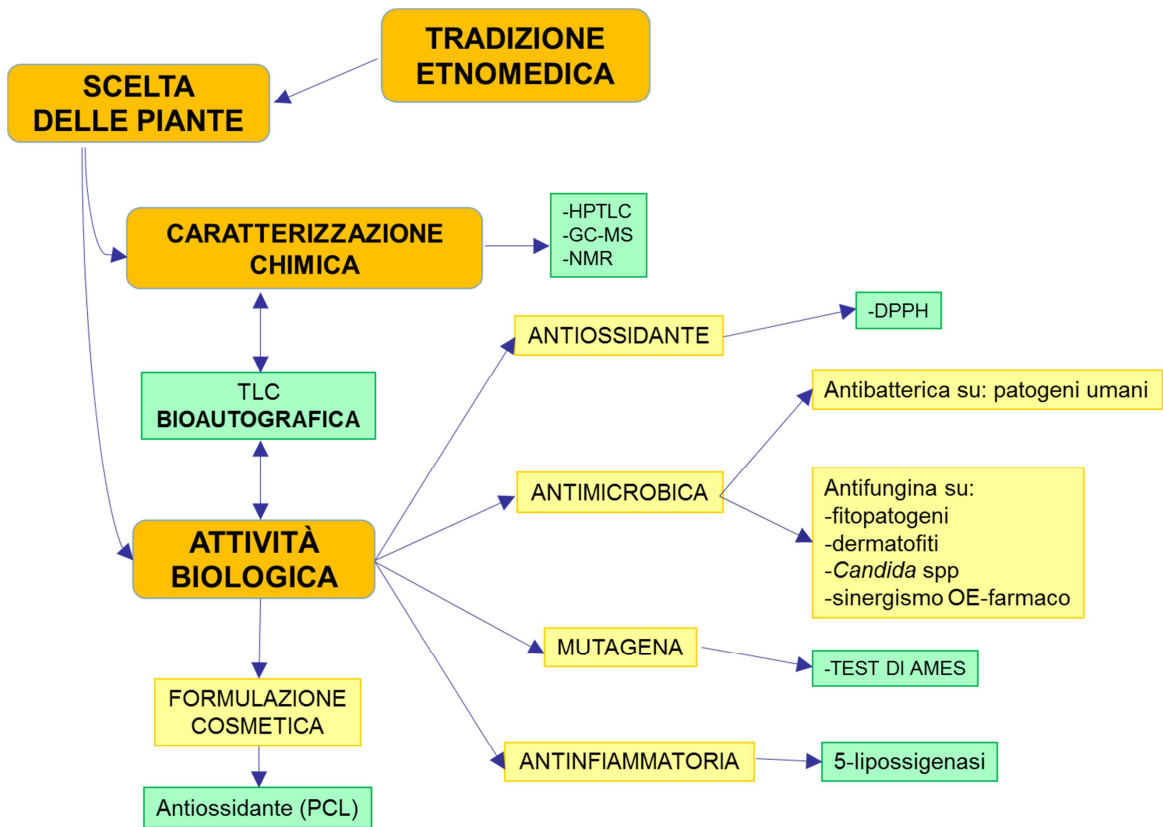
Il paradigma degli oli essenziali per lo studio di queste specie è dovuto al fatto che la aromaticità delle piante e delle parti usate nella tradizione risulta il primo elemento di scelta per gli impieghi salutistici e ha quindi presumibilmente un ruolo comunque centrale nell'efficacia e nella sicurezza delle preparazioni derivate.

Le caratteristiche chimiche degli oli essenziali infine li rendono uno strumento particolarmente efficace nel qualificare la biodiversità attraverso una impronta digitale chimica delle specie vegetali amazzoniche.

Lo studio viene di seguito riportato nelle seguenti modalità, suddividendo risultati e discussione in due grandi sezioni:

1. Per ciascuna specie vegetale investigata è riportata una scheda descrittiva botanico-farmacognostica con risultati e discussione relativi all'analisi chimica dell'olio essenziale
2. Risultati e discussione dell'attività biologica valutata *in vitro* di tutti gli oli essenziali messi a confronto

Lo schema di lavoro su ciascun olio essenziale ha rispecchiato sostanzialmente il draft sottostante:



Risultati e discussione

Sezione 1. Per ciascuna specie vegetale investigata è riportata una scheda descrittiva botanico-farmacognostica con risultati e discussione relativi all'analisi chimica dell'olio essenziale

Tutti gli oli essenziali presi in considerazione in questa tesi sono stati estratti tramite distillazione in corrente vapore con distillatori commerciali, in Ecuador, direttamente nei pressi di raccolta del materiale vegetale.

Per trovare le condizioni ottimali di estrazione in modo da avere la miglior resa possibile è stata scelta come modello la pianta di *Cymbopogon citratus*, che è stata utilizzata per settare tre principali parametri di distillazione: la quantità di materiale vegetale da introdurre nel distillatore, il carico di acqua da utilizzare per l'estrazione e l'entità della fiamma per il riscaldamento dell'acqua (°T) (vedi figura che segue). La selezione di questa pianta come modello si è basata sull'abbondanza di olio essenziale in essa contenuto, sulle sue interessanti attività biologiche già riscontrate in precedenti studi e sul giusto tempo balsamico e disponibilità di materia prima al momento della sua raccolta (agosto; anno 2016).



1. Riempimento con acqua del sebatoio



2. Aggiunta del materiale vegetale



3. Fase di distillazione



4. Raccolta dell'olio essenziale ogni 15 minuti



5. Separazione

Per trovare il settaggio ottimale di distillazione, oltre a variare singolarmente i tre parametri appena descritti è stato registrato il volume di olio essenziale prodotto in funzione del tempo per ottenere curve di distillazione da confrontare. Proprio su queste curve ci si è basati per l'estrazione degli oli essenziali di tutte le altre piante considerate. Le condizioni migliori, miglior resa e curva di distillazione con andamento gaussiano, sono state ottenute con il carico di materiale vegetale dimezzato, il serbatoio d'acqua completamente pieno e il riscaldamento al massimo (vedi tabella e grafico).

Una volta ottenuti tutti gli oli essenziali si è passati alla loro caratterizzazione chimica mediante gas cromatografia (GC) e gas cromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS), riuscendo ad identificare oltre il 90% del contenuto di ciascuno di essi. Successivamente sono state saggiate diverse attività biologiche tra cui la capacità antiossidante, attività antimicrobiche indirizzate su batteri e funghi sia patogeni per l'uomo che fitopatogeni di interesse agricolo, testando prima gli oli essenziali singolarmente e poi in associazione per rilevare eventuali effetti di sinergismo, l'attività antinfiammatoria ed infine l'attività mutagena per indagare eventuali rischi genotossici. A conclusione è stata preparata una formulazione cosmetica con gli oli risultati più attivi per ciò che riguarda l'attività antiossidante ed è stata saggiata l'attività antiossidante anche su di essa per verificare se si mantenevano tali proprietà.

Distill. (n.)	Peso materiale (Kg)	Vol. acqua (L)	Riscaldamento	Vol. OE ottenuto (mL)	Resa (%)
1	11.34	16	100%	40.9	0.33
2	11.34	16	50%	38.3	0.31
3	11.34	8	100%	39.7	0.32
4	11.34	8	50%	50.3	0.40
5	5.67	16	100%	27.8	0.45
6	5.67	16	50%	21.7	0.35
7	5.67	8	100%	24.4	0.40
8	5.67	8	50%	25.7	0.42

Tabella 2. In tabella viene mostrata la resa percentuale di olio essenziale facendo riferimento al peso in grammi di olio essenziale in rapporto al peso in grammi di materiale vegetale caricato nel distillatore.

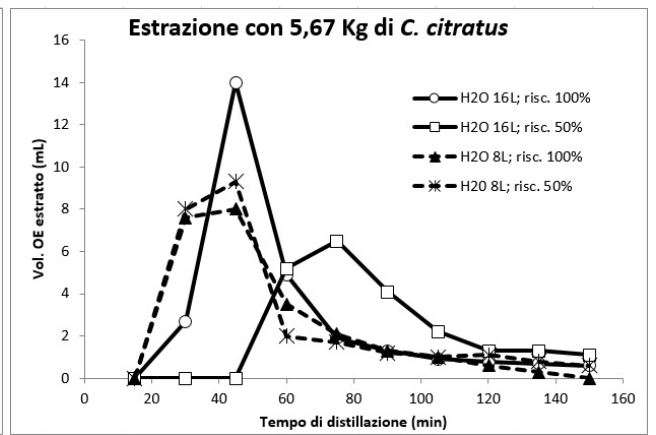
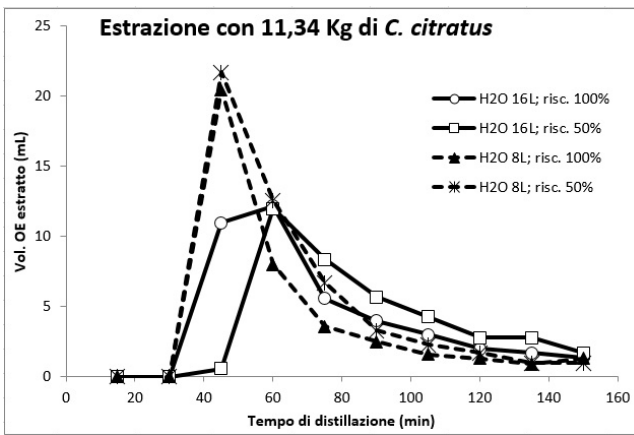


Grafico 1. In questo grafico sono mostrate le curve di distillazione monitorando la produzione di olio essenziale ad intervalli di 15 minuti per un totale di 2.5 ore

***Chenopodium ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Divisione: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sottoclasse: Caryophyllidae

Ordine: Caryophyllales

Famiglia: Amaranthaceae

Sottofamiglia: Chenopodioideae

Tribù: Dysphanieae

Genere: *Chenopodium*

Specie: *C. ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Sinonimi:

Dysphanya ambrosioides L.

Nomi comuni:

epazote, mastruz, Jerusalem-tea, American wormseed, erva de Santa Maria, erva do furmuigero, Mexican tea, goosefoot, paico



Immagini di Andrea Moro, Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste (http://dryades.units.it/euganei/index.php?procedure=taxon_page&id=455&num=1921)

C. ambrosioides è un arbusto erbaceo annuale o perenne che può raggiungere 1 m di altezza, caratterizzato da una forte fragranza aromatica (Trivellato Grassi et al., 2013). È una pianta nativa dell'America centrale e meridionale ed è in grado di adattarsi a svariate condizioni ambientali. È considerata una pianta infestante ed è diffusa anche in diversi Paesi dell'Africa e in alcune zone della Nuova Zelanda (Bieski et al., 2015; Trivellato Grassi et al., 2013).

Dal punto di vista sistematico *C. ambrosioides* appartiene alla famiglia delle Amaranthaceae, sottofamiglia Chenopodioideae. Il raggruppamento è noto per essere rappresentato da specie di interesse agro-alimentare, come *Beta vulgaris* che a seconda della varietà, viene utilizzata per scopi differenti, dalla produzione dello zucchero all'uso

alimentare delle bietole da coste, da radice (barbabietola rossa) e da foraggio per l'alimentazione del bestiame. Altra specie delle Chenopodioideae è *Spinacia oleracea*, nota comunemente come spinacio e *Chenopodium quinoa* (quinoa). Quest'ultima riveste un ruolo fondamentale per l'alimentazione delle popolazioni andine, coltivata nelle Ande da circa 7000 anni; a seguito della conquista spagnola, ne venne rinnegato il suo utilizzo alimentare, che fu poi comunque riscoperto nella seconda metà del XX° secolo e da allora venne esportato e coltivato anche in Paesi al di fuori del territorio andino (Bazile et al., 2016).

La parte usata di *C. ambrosioides* è costituita da fiori e sommità fiorite, particolarmente aromatiche e a cui sono associati usi etnomedici tradizionali che rendono ragione dell'interesse maturato con il presente studio.

GLI USI TRADIZIONALI

A differenza di specie con cui *C. ambrosioides* condivide la famiglia botanica, questa specie non vanta particolari usi alimentari ma è invece piuttosto nota per usi tradizionali a sfondo fitoterapico (etnomedicina). *C. ambrosioides* ha infatti un ampio utilizzo nel contesto etnomedico, è nota per essere utilizzata principalmente sottoforma di tè, impacchi ed infusi per la cura di disturbi infiammatori, contusioni, infezioni polmonari e come antielmintico ed antifungino (Trivellato Grassi et al., 2013). Altri usi riguardano la guarigione da bronchiti, tubercolosi e reumatismi (Kumar et al., 2007) ed infine è molto utilizzata anche come ausilio nella guarigione di lesioni, distorsioni, fratture ossee ed edemi, lenitivo per dolori localizzati, cura per gastriti e disordini allo stomaco, contro epatiti, contro infezioni intestinali (Bieski et al., 2015). Qualche utilizzo meno noto della pianta riguarda il trattamento di amenorrea, dismenorrea e punture di insetti o morsi di serpenti (Song et al., 2015).

Oltre agli usi tradizionali di *C. ambrosioides* esistono numerose evidenze scientifiche riguardanti diverse attività biologiche, particolarmente indicative per possibili utilizzi salutistici coerenti con moderni disturbi e patologie. Ad esempio, è stato studiato il potenziale effetto antimalarico dell'estratto idroalcolico delle foglie (Cysne et al., 2016) e l'attività contro *Helicobacter pylori* sia *in vitro* che *in vivo* (Ye et al., 2015). Da tempo sono note anche le attività dell'olio essenziale contro funghi dermatofiti quali *Trichophyton mentagrophytes* e *Micosporum audouinii* (Kishore et al., 1996) ed anche nei confronti di

altri funghi filamentosi come *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. (Jardim et al., 2008). Recentemente ha comunque rivestito forte interesse la bioattività dell'OE in grado di contrastare ceppi di *Candida* sp., anche farmaco-resistenti (Chekem et al., 2010; Lianet Monzote et al., 2014). In quest'ultimo campo è sempre più forte l'interesse ad associare prodotti naturali e farmaci classici in cerca di una loro interazione sinergica, in particolar modo verso ceppi di *Candida* sp. farmaco resistenti (Stringaro et al., 2014). Infine, sono stati osservati effetti immunomodulanti utilizzando colture cellulari di macrofagi (Cruz et al., 2007) e linfociti (Rossi-Bergamann et al., 1997) ed antitumorali, ad esempio studiato impiantando cellule di tumore di Ehrlich in topi (Nascimento et al., 2006).

ASPETTI FITOCHIMICI, FARMACOLOGICI, TOSSICOLOGICI CORRELATI ALLA SPECIE:

Studi tossicologici condotti su estratti idroalcolici di *C. ambrosioides* in modello murino hanno mostrato che a dosaggi normali (paragonabili a quelli assunti negli usi tradizionali della pianta) non si ha alcun effetto tossico tranne qualche lieve alterazione fisiologica puntuale (es. livelli di urea) ma soltanto a dosaggi molto alti (Pereira et al., 2010). Anche studi su estratti metanolici non hanno mostrato tossicità nè in ratti, nè in *Artemia salina* (un piccolo crostaceo di acqua salata molto sensibile agli inquinanti ambientali e alle sostanze tossiche) (García et al., 1997). Considerato invece l'olio essenziale come tipologia di estratto si osserva qualche effetto di potenziale tossicità probabilmente dovuta alla presenza del carvacrolo. Da analisi condotte utilizzando i tre composti maggioritari dell'olio essenziale, ovvero carvacrolo, ossido di cariofillene e ascaridolo è emerso un potenziale effetto tossico a livello dei mitocondri. Questa tossicità viene associata alle proprietà antielmintiche della pianta note nella medicina tradizionale (Monzote et al., 2009) o quelle dimostrate verso *Leishmania* sp. (Pastor et al., 2015).

Per ciò che riguarda l'identificazione di molecole attive presenti in *D. ambrosioides*, le più studiate sono sicuramente le sostanze volatili, quasi per nulla indagate sono invece le molecole non volatili. Recentemente sono state isolate 5 molecole non volatili che confermano l'attività antiossidante ed antinfiammatoria riscontrate negli infusi e decotti di questa pianta (Song et al., 2015).

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELL'OLIO ESSENZIALE

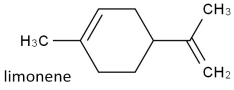

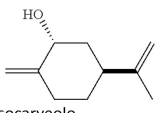
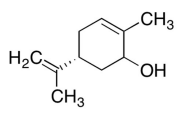
L'estrazione dell'olio essenziale di *C. ambrosioides* è avvenuta mediante distillazione in corrente di vapore, come previsto dalla farmacopea, dove i parametri di distillazione sono stati ottimizzati per ottenere la maggior resa possibile. Successivamente si è passati alla sua caratterizzazione chimica mediante gas cromatografia GC-FID e gas cromatografia-spettrometria di massa GC-MS. Sono stati identificati 28 diversi componenti che rappresentano il 95.15% sul totale dell'olio essenziale.

I composti maggiormente rappresentati sono il limonene (41.48%), il *trans-p*-menta-2,8-dien-1-olo (7.68%), il *trans*-isocarveolo (7.09%), il *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-olo (6.04%) ed il *p*-cimene (5.36%). Il limonene, che rappresenta il composto maggioritario, è un monoterpene ciclico molto rappresentato nel genere *Citrus* dove è abbondante nel pericarpo dei frutti e ne conferisce fragranza caratteristica degli agrumi.

La composizione chimica riscontrata nei nostri laboratori non è in linea con i dati di letteratura, dove il composto maggioritario è solitamente rappresentato dall'ascaridolo (Bossou et al., 2013; Harraz et al., 2015; Hu et al., 2015; L. Monzote et al., 2014; Pastor et al., 2015), non ritrovato nel nostro campione o talvolta α -terpinene (Chekem et al., 2010) che rappresenta il suo precursore biosintetico. Tuttavia alcuni studi evidenziano la presenza di limonene come composto maggioritario (Sagrero-Nieves and Bartley, 1995; Buer and Brasil, 1973). Il *p*-cimene e i mentano derivati *trans-p*-menta-2,8-dien-1-olo, *cis-p*-menta-2,8-dien-1-olo e *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-olo sono stati frequentemente rilevati come componenti minoritari nell'olio essenziale nella letteratura sopracitata, mentre meno frequente è la presenza dei composti correlati a carvone e carveolo.

Le motivazioni legate alla differente composizione del nostro campione di OE potrebbero essere sostanzialmente riconducibili all'habitat amazzonico, caratterizzato da una biodiversità tra le più ricche al mondo e che, in quanto tale, promuove una così forte pressione sui percorsi biosintetici del metabolismo secondario delle piante da determinare un'importante diversità chimica, specchio di quella ecologica. Rispetto a questo concetto di fatto ripetutamente contestualizzato in studi fitochimici che correlano fingerprinting chimico e fattori ambientali, gli oli essenziali rappresentano uno dei più eclatanti esempi di sensibilità biochimica. Questa espressione biologica che vede correlato il profilo fitochimico delle piante è tanto straordinaria quanto problematica se proiettata sul piano salutistico poiché rende difficile la standardizzazione dei prodotti eventualmente derivabili da specie di interesse, soprattutto se di derivazione spontanea (Guerrini et al., 2011; Rossi et al., 2013).

Composizione dell'olio essenziale di *C. ambrosioides*

Nome del composto	Area%	KI	
limonene	41.48	1023	
<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-olo	7.68	1118	
<i>trans</i> -isocarveolo	7.09	1183	
<i>cis-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-olo	6.04	1226	
<i>p</i> -cimene	5.36	1019	
α -terpinene	4.90	1011	
<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-olo	3.11	1131	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-olo
γ -muurolene	3.02	1474	
carvone	2.30	1238	
neoiso-diidrocarveolo	1.76	1232	
isoascaridolo	1.55	1298	<i>trans</i> -isocarveolo
α -pinene	1.46	926	
<i>trans</i> -carveolo	1.29	1215	
α -fellandrene	1.23	1002	
<i>cis</i> -diidrocarvone	1.20	1195	
γ -cadinene	0.87	1512	<i>cis-p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-olo
α -cadinolo	0.63	1656	
<i>cis</i> -limonene ossido	0.58	1127	
1,8-cineolo	0.49	1025	
canfene	0.44	941	
τ -cadinolo	0.41	1645	
<i>cis</i> -carveolo	0.37	1229	
β -cariofillene	0.33	1407	
ar-curcumene	0.31	1478	
β -pinene	0.29	969	
biciclogermacrene	0.16	1488	
santene	0.12	903	
pinocarvone	0.10	1155	
Totale identificati	94.65		

***Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Classe: Liliopsida

Sottoclasse: Commelinids

Ordine: Poales

Famiglia: Poaceae

Sottofamiglia: Panicoideae

Tribù: Andropogoneae

Sottotribù: Anthistiriinae

Genere: *Cymbopogon*

Specie: *C. citratus*

Sinonimi:

Andropogon shoenantus L.

Nomi comuni:

Lemon grass, yerba luisa, citronella



Fonte immagine di sinistra: http://www.eol.org/data_objects/1992959

Fonte immagine di destra: http://www.eol.org/data_objects/1992956

C. citratus, noto anche come citronella o lemongrass, è una pianta della famiglia delle Poaceae (o Gramineae), famiglia che comprende piante annuali ed erbe perenni, munite di rizoma con radici avventizie e fusto cavo ai cui nodi si attaccano foglie distiche, guainanti, generalmente ligulate. Producono infiorescenze protette ciascuna da due brattee e il frutto consiste in una cariosside. Le Poaceae sono diffuse in tutto il mondo e rivestono un ruolo importante dal punto di vista economico sia per le loro riserve di zuccheri (amido nelle cariossidi dei cereali, saccarosio nei fusti e nei rizomi della canna da zucchero e del sorgo), sia per rappresentare il principale foraggio per gli animali erbivori. Alcune Poaceae tropicali come *C. citratus*, contengono oli essenziali ampiamente

impiegati nell'industria dei profumi e dei cosmetici. Quelli più usati appartengono ai generi *Cymbopogon* e *Vetiveria* (Maugini et al., 2014).

C. citratus è un'erba perenne dalle foglie ruvide e dai bordi taglienti con un forte odore che ricorda quello del limone. Essa è ampiamente coltivata nelle regioni tropicali e subtropicali (Naik et al., 2010) sia per gli usi etnomedici, sia per l'utilizzo del suo olio essenziale presente in abbondanza, noto per la piacevole fragranza e per diverse attività biologiche che di seguito verranno descritte.

USI TRADIZIONALI

C. citratus è una pianta nota ormai da tempo e che ha svariati utilizzi soprattutto in campo etnomedico. Ad esempio in Brasile è una delle piante più utilizzate nella medicina tradizionale, come té o sottoforma di infuso fatto con le foglie fresche o essiccate che localmente viene chiamato "abafado". Tale bevanda è usata principalmente contro disturbi nervosi o gastrointestinali, mentre in diversi altri Paesi l'utilizzo principale di *C. citratus* riguarda la cura di stati febbrili. Viene utilizzato frequentemente anche come calmante ed ipotonico, ma anche come analgesico, antiemetico, antispasmodico e per il trattamento di diversi disturbi intestinali e gastrici. Ogni Paese ha poi i propri utilizzi legati a tradizioni e folklore, ad esempio in Nigeria è usato principalmente come antipiretico e per l'effetto stimolante ed antispasmodico; in Angola e India viene considerato un antitussivo, antiemetico, antisettico ed antireumatico; in Indonesia si utilizza come digestivo, diuretico e sudorifero (Carlini et al., 1986). A Cuba, infine, è usato come ipotensivo, anticatarrale ed antireumatico (Carbajal et al., 1989). Se consideriamo l'olio essenziale di *C. citratus*, in India viene usato in medicina per trattare disturbi gastrointestinali oppure in Cina si prescrive il geraniolo, uno dei costituenti principali dell'olio essenziale, come ansiolitico (Carlini et al., 1986).

Utilizzi di tradizionali *C. citratus* non necessariamente legati alla medicina riguardano le radici, utilizzate per la produzione di gomme da masticare oppure impiegate per la produzione di dentifrici.

FITOCHIMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

Una caratteristica molto importante di *C. citratus* riguarda la sua abbondanza di olio essenziale i cui composti principali generalmente sono il citrale, il mircene, il geraniolo, il nerale e il geraniale (Naik et al., 2010).

Essendo il *C. citratus* una pianta ampiamente diffusa nel mondo e con un ampio utilizzo in medicina tradizionale è piuttosto studiata anche in ambito scientifico; sono note infatti numerose attività biologiche correlate ad estratti di questa pianta, in particolare al suo olio essenziale. Talvolta però i dati scientifici sono discordanti tra loro, principalmente ciò è dovuto al fatto che esistono diversi chemotipi: ad esempio vi è una varietà dell'India orientale con una egual quantità di mircene e citrale, ed una varietà dell'India occidentale scarsa in mircene ma con elevato contenuto di citrale (Blanco et al., 2009). Molti studi sono partiti proprio dalle informazioni etnomediche per dimostrarne o smentirne la veridicità sull'efficacia. Ad esempio, come citato in precedenza, nella cultura cubana i decotti di foglie di *C. citratus* sono usati come ipotensivi o antireumatici e studi condotti su ratti in cui era monitorata pressione arteriosa, produzione di urina e sviluppo di edema indotto, il decotto ha mostrato effetti ipotensivi se somministrato per via intravenosa e blandi effetti diuretici ed antinfiammatori se somministrato per via orale (Carbajal et al., 1989). Altri studi condotti su topi hanno confermato gli effetti ansiolitico, sedativo ed anticonvulsante descritti dalla medicina tradizionale brasiliana, osservando sulle cavie il tempo di sonno, la rapidità di uscita da labirinti e il posizionamento in scatole con comparti illuminati o al buio oltre che agli effetti sinergici in associazione ad alcuni farmaci agenti sulla contrazione muscolare (Blanco et al., 2009). È stata mostrata anche un'attività di inibizione proliferativa nei confronti di *Leishmania amazonensis* dove si osservava un effetto dose dipendente sia da parte dell'olio essenziale di *C. citratus*, sia da parte del citrale, composto maggioritario dell'olio essenziale ma meno efficace se usato singolarmente rispetto all'olio essenziale in toto (Santin et al., 2009). A conferma alcuni utilizzi previsti dalla tradizione etnomedica, sono state studiate le capacità antibatteriche su diversi patogeni umani e l'olio essenziale si è mostrato efficace su *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas pneumoniae* (Naik et al., 2010). Oltre che un'efficacia contro i batteri l'olio essenziale di *C. citratus* ha mostrato una forte attività anche su ceppi di *Candida albicans* (Tyagi and Malik, 2010). Altro risultato interessante si è trovato nella lotta contro la contaminazione alimentare da

microrganismi produttori di micotossine (ad esempio le più pericolose aflatossine prodotte da *Aspergillus flavus*). Studi hanno mostrato come l'olio essenziale di *C. citratus* sia infatti in grado di inibire totalmente la produzione di aflatossine, e a dosi maggiori riesca anche ad esercitare un effetto fungostatico e fungicida. Quest'ultimo aspetto è dovuto principalmente alla presenza del citrale (Paranagama et al., 2003).

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

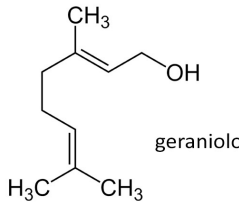
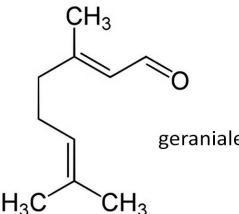
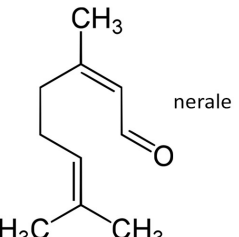
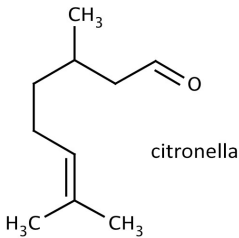
L'olio essenziale di *C. citratus* è stato ricavato dalle foglie fresche della pianta tramite distillazione in corrente di vapore, ottimizzando l'estrazione in ragione di precedenti curve di distillazione che hanno permesso di individuare la giusta strategia per ottenere massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC-FID) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS), individuando 28 diversi composti per un totale del 97.02% di campione. I composti principali sono rispettivamente il geraniolo (41.49%), il geraniale (15.68%), il nerale (14.71%) ed il citronellale (8.10%).

Studi condotti precedentemente sempre all'interno dei nostri laboratori ma su altri campioni di *C. citratus*, hanno messo in risalto una differente composizione, con un 41.3% di geraniale, un 32.3% di nerale e un 15.5% di mircene (Sacchetti et al., 2005). Altri dati di letteratura mostrano una composizione abbastanza simile a quest'ultima, con 40.8% di geraniale, 31.9% di nerale e 4.4% di limonene (Tzortzakis and Economakis, 2007), con geraniale e nerale rispettivamente al 36.2% e 26.5% e nerolo al 5.1% (Tyagi and Malik, 2010), o similmente al 40.8% e 32.0% e nerolo al 4.2% (Shah et al., 2011). Sebbene il geraniolo sia considerato uno dei marker di questo olio essenziale, è meno frequente che rappresenti il componente principale (Almeida Barbosa et al., 2008).

Come spesso accade per gli oli essenziali ricavati da una stessa specie in natura e da diverse aree geografiche, si può dunque notare una forte variabilità di composizione, che può tradursi in discordanti dati di attività biologica.

Nella tabella che segue sono elencati tutti i composti identificati nell'olio essenziale di *C. citratus*.

Composizione dell'olio essenziale di *C. citratus*

Nome del composto	Area%	KI	
geraniolo	41.49	1251	 <p>geraniolo</p>
geraniale	15.68	1266	
nerale	14.71	1235	
citronellale	8.10	1149	
β -cariofillene	4.06	1410	 <p>geraniale</p>
citronellolo	4.04	1226	
linalil isobutirrato	1.38	1385	
6-metil-5-epten-2-one	0.93	982	
<i>trans</i> -verbenolo	0.78	1159	 <p>nerale</p>
<i>cis</i> -ocimene	0.63	1033	
δ -cadinene	0.62	1514	
linalolo	0.59	1100	
α -cariofillene	0.54	1450	 <p>citronellale</p>
n-decanale	0.47	1205	
germacrene D	0.38	1476	
<i>trans</i> -ocimene	0.34	1041	
cariofillene ossido	0.29	1582	
γ -cadinene	0.28	1507	
2,2-dimetil-3,4-octadienale	0.24	1102	
α -cadinolo	0.24	1657	
nerolo	0.22	1222	
α -bisabololo	0.18	1686	
<i>trans</i> -nerolidolo	0.16	1561	
germacrene A	0.15	1499	
ottanale	0.14	1003	
citronellil acetato	0.14	1362	
α -muurolene	0.12	1494	
α -muurololo	0.12	1645	
Totale	97.02		

***Dacryodes peruviana* (Loes.) J.F. Macbr**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Divisione: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sottoclasse: Rosidae

Ordine: Sapindales

Famiglia: Burseraceae

Tribù: Canarieae

Genere: *Dacryodes*

Specie: *D. peruviana*(Loes.) J.F. Macbr

Sinonimi:

Pachylobus peruvianus Loes

Nomi comuni:

copal comestibile, guaná, tabonuco



Fonte immagine di sinistra: <https://it.pinterest.com/pin/344314333986394342/>

Fonte immagine di destra: <http://www.tropicos.org/Image/30273>

D. peruviana è un albero sempreverde che predilige ambienti ad alto tasso di umidità ed altitudini comprese tra 800 e 1000 m. Può crescere fino a 25 metri d'altezza ed il tronco può arrivare ad un diametro di mezzo metro. Possiede una corteccia bruno-rossastra e rami arrotondati. Le dimensioni delle foglie variano da 8 a 28 cm di lunghezza e da 4 a 10 cm di larghezza. A fioritura ultimata forma infiorescenze che possono raggiungere una lunghezza superiore ai 20 cm e presenta petali ovali con dimensioni di circa 1.7x2 mm. Infine, i frutti sono drupe ovoidali che a maturazione sono di colore bruno, hanno al loro interno un unico grosso seme e misurano in media 2.5 cm di lunghezza. I frutti sono commestibili e vengono consumati in abbondanza dalle popolazioni indigene (Grandtner and Chevrette, 2013). Il legno viene invece impiegato nella costruzione delle abitazioni. La pianta produce anche una resina aromatica che viene usata come collante, come incenso

profumato oppure come combustibile in torce per l'illuminazione e funge allo stesso tempo da repellente per insetti ("Copal resin - Life in the Rainforest," vedi sitografia).

D. peruviana è distribuita in diverse zone del Sud America come al nord del Brasile, in Bolivia, Perù, Ecuador, Colombia e Venezuela, come si può vedere dalla cartina che segue ("Dacryodes peruviana - Useful Tropical Plants," vedi sitografia).



D. peruviana fa parte della famiglia delle Burseraceae che comprende 540 specie divise in 21 generi distribuiti nelle zone tropicali. La maggioranza di queste specie produce oleo-gommo-resine a seguito di lesioni della corteccia che possono avere uso medicinale oppure essere utilizzate per produrre incensi e profumi. Alcuni esempi sono il genere *Boswellia* Roxb. da cui si ricava incenso, il genere *Bursera* Jacq. e *Canarium* L. da cui si ricavano elemi (oleoresina), il genere *Commiphora* Jacq. da cui si ottengono mirra, bdellio (gommo-resina) e altre resine, infine *Protium heptaphyllum* Marchand che fornisce l'elemi brasiliano ("BURSERACEAE - InfoErbe," vedi sitografia).

Da una ricerca approfondita condotta su database e motori di ricerca a nostra disposizione è stato riscontrato che i dati scientifici di *D. peruviana* presenti in letteratura sono veramente esigui. Le informazioni reperite qui riportate derivano infatti principalmente da testi di cultura tradizionale dell'America Latina e da informazioni

riportate oralmente da autoctoni intervistati in loco relative agli usi e costumi popolari che si tramandano di generazione in generazione (Raffauf, 1990; Rawcliffe, 1999). Non è stato trovato nulla riguardante informazioni sugli aspetti di fitochimica, farmacologia e tossicologia o attività biologica in genere. Da qui la completa originalità di tutti i risultati da noi ottenuti in questo studio.

USI TRADIZIONALI

L'uso tradizionale principale di *D. peruviana* è sicuramente quello alimentare. Presenta infatti frutti dolci dal gusto molto gradevole. Le popolazioni amazzoniche dell'Ecuador, inoltre, bruciano la resina nota con il termine "copal" all'interno delle abitazioni anche per via della sua capacità di fungere da buon repellente contro gli insetti, oltre che per il gradevole profumo. Esiste anche una seconda tipologia di utilizzo della resina, che in un certo modo può essere associato ad un uso etnomedico, perché impiegato nella cura di svariati disordini. L'uso etnomedico parte da leggende popolari molto antiche in base alle quali alla resina sarebbero attribuiti poteri soprannaturali. Le popolazioni indigene degli Shuar e Kichwa hanno la credenza che gli "spiriti cattivi" possano essere trasmessi attraverso l'aria o il vento in certi luoghi e che essi possono portare una malattia chiamata comunemente "mal aire". Secondo questa credenza la combustione della resina avrebbe la capacità di proteggere dal "mal aire" ("Copal resin - Life in the Rainforest," vedi sitografia). Non esiste una definizione ben precisa che descriva il "mal aire" ma è un termine che è presente nelle credenze di tutta l'America Latina e può variare la sua concezione a seconda delle zone. Ad esempio in Messico lo si attribuisce principalmente a problemi respiratori che potrebbero essere legati a disordini muscolari, digestivi e nervosi. Viene talvolta paragonato ad una sorta di "possessione" che può colpire esseri umani, ma anche animali. Se si passa al territorio andino il "mal aire" viene associato a disturbi che vanno da nausea, affaticamento, dolori addominali e mal di testa a problemi come la depressione, mancanza di motivazione, tristezza, preoccupazione e pianto immotivato. Infine, nel resto del Sudamerica, al termine "mal aire" viene attribuita la causa di contratture, torcicollo, dolori al collo e altri problemi relativi alla schiena, soprattutto nella parte superiore ("¿Qué es el mal aire?," vedi sitografia).

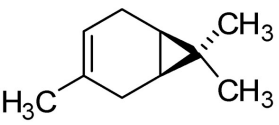
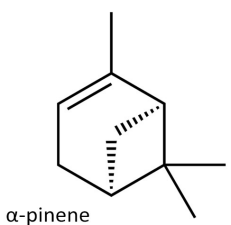
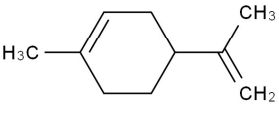
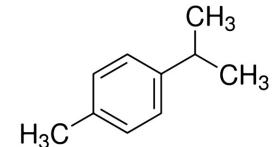
ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

Come per gli altri oli essenziali, l'estrazione di *D. peruviana* è avvenuta tramite distillazione in corrente di vapore utilizzando parametri ottimizzati per avere la massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC-FID) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). In questo modo si è resa possibile l'identificazione di 35 diversi composti riguardanti il 97.18% dell'intero fitocomplesso.

In letteratura non è presente alcun dato di caratterizzazione chimica dell'olio essenziale di *D. peruviana*. L'unico confronto che si può azzardare è quello con l'olio essenziale di un altro membro dello stesso genere, quale *D. edulis*, una pianta coltivata in africa nelle zone umide di montagna per i frutti commestibili e per la produzione di olio fisso. Anche in questo caso gli studi condotti non sono molti, ne sono stati ritrovati soltanto due. Di questi il primo articolo scientifico riporta come composti principali α -pinene (frutti/semi: 22.3/21.5%), β -pinene (13.7/19.7%), limonene (7.2/27.5%) e α -fellandrene (10.8/12.1%). Il secondo invece riporta sabinene (21.8%), terpinene-4-olo (19.8%), α -pinene (17.5%) e *p*-cimene (11.3%) estratto comunque dalla resina (Jirovetz et al., 2005; Obame et al., 2008). Dalle analisi condotte nei nostri laboratori il composto maggioritario è risultato essere il δ -3-carene, il quale risultava inferiore allo 0.3% negli studi su *D. edulis*. Discrepanze meno evidenti riguardano invece gli altri composti principali riscontrati, quali α -pinene (6.03%), limonene (3.13%) e *p*-cimene (3.03%).

Nella tabella che segue sono indicati i prodotti identificati.

Composizione chimica dell'olio essenziale di *D. peruviana*

Nome del composto	Area%	KI	
δ -3-carene	70.01	1006	 <p>δ-3-carene</p>
α -pinene	6.03	927	
Limonene	3.13	1023	 <p>α-pinene</p>
p-cimene	3.03	1019	
α -terpineolo	1.51	1191	 <p>limonene</p>
p-menta-2,4(8)-diene	1.25	1080	
β -pinene	0.97	971	 <p>p-cimene</p>
Sabinene	0.95	965	
p-menta-1-5-dien-1-olo	0.89	1168	
verbenene	0.83	964	
m-cimen-8-olo	0.79	1178	
Safranale	0.68	1205	
α -guriunene	0.60	1393	
p-menta-3,8-diene	0.59	1075	
1,8-cineolo	0.56	1024	
cariofillene ossido	0.49	1578	
p-cimen-8-olo	0.47	1184	
terpinen-4-olo	0.44	1174	
β -cariofillene	0.42	1408	
<i>trans</i> - α -bergamotene	0.41	1429	
α -terpinene	0.40	1012	
Canfene	0.32	941	
γ -terpinene	0.27	1052	
<i>cis</i> -limonene ossido	0.27	1127	
<i>allo</i> -aromadendrene	0.23	1468	
4-isopropeniltoluene	0.21	1087	
Borneolo	0.21	1164	
spatulenolo	0.19	1575	
4-isopropiltoluene	0.19	1015	
δ -2-carene	0.18	996	
α -cariofillene	0.16	1448	
α -tuiene	0.15	921	
α -copaene	0.13	1375	
<i>trans</i> -isocarveolo	0.12	1200	
Canfora	0.10	1140	
Totale	97.18		

***Endlicheria klugii* O. C. Schmidt**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Ordine: Laurales

Famiglia: Lauraceae

Genere: *Endlicheria*

Specie: *E. klugii* O. C. Schmidt



Fonte immagine: United States National Herbarium

E. klugii fa parte della Lauracee, si trova nell'area amazzonica dell'Ecuador e in genere in tutta la parte occidentale della foresta amazzonica, adiacente alle Ande orientali ad altitudini solitamente comprese tra i 150 e i 1300 m. Si presenta come un albero dall'altezza media di 15 m con ramoscelli piuttosto robusti caratterizzati da una superficie ricoperta di corti peli. Tale rivestimento è presente anche sulle foglie, caratterizzate inoltre da un lungo e sottile picciolo. La loro lamina, cartacea e piana, presenta una forma che è una via di mezzo tra ovata ed ellittica. La fioritura della pianta avviene da settembre a marzo, mentre i frutti sono disponibili tutto l'anno (Rohwer, 2005).

Il genere *Endlicheria* si diffonde in Sud America, prolungandosi da Costa Rica e isole Caraibiche fino al sud del Brasile estendendosi dal livello del mare fino a 2500 m di altitudine. Esso è caratterizzato da una notevole diversità e comprende 60 diverse specie tra alberi ed arbusti (Rohwer, 2005). Le foglie sono semplici, intere, alterne, spesso ovate o obovate e picciolate, ad eccezione di poche specie come *E. bracteata* che presenta le

foglie subsessili e la lamina solitamente appare piana, e di *E. bullata* che presenta numerose bolle caratteristiche. L'apice è solitamente acuminato e la base si presenta acuta, mentre i margini sono spesso ricurvi verso il basso ma possono anche essere piani. La nervatura è per lo più pinnata, con alcune eccezioni che presentano foglie triplinervie o quintuplinervie. Variazioni in colore, densità, orientamento, dimensione e forma dei peli di rivestimento procurano il giusto insieme di caratteristiche funzionali all'identificazione della specie. Tali strutture possono presentarsi diritte, ricurve o strettamente pieghettate. L'infiorescenza è solitamente a pannocchia e tipicamente presenta un rivestimento che riprende quello dei ramoscelli o delle altre superfici vegetative. I fiori sono organizzati nella maniera tipica delle Lauraceae ossia sono trimeri e unisessuali. Inoltre consistono in due verticilli di tepali uguali e tre verticilli di stami che circondano un semplice pistillo. Nella maggior parte delle specie i frutti maturano in una drupa nerastra sottesa da una cupola di color rossastro. Uno studio molecolare delle Lauraceae ha mostrato che il genere *Endlicheria* è difiletico poiché molte delle specie in esso contenute sono inglobate in altri due generi, *Rhodostemonodaphne* e *Ocotea* (Chanderbali et al., 2001). Infatti, ad esempio, la specie *E. punctulata* risulta essere più vicina alla specie *Ocotea cernua* che non ai suoi congeneri, sia dal punto di vista fitochimico che morfologico (Rohwer, 2005).

USI TRADIZIONALI

E. klugii è una pianta nota da tempo ma della quale mancano quasi completamente informazioni riguardanti agli usi tradizionali ed ancor più riguardo a studi di carattere scientifico. Dal punto di vista etnomedico sono tramandate oralmente proprietà astringenti, disinfettanti e cicatrizzanti (antiossidanti). Questo valorizza e rende originali gli esperimenti condotti su di essa presso i nostri laboratori.

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

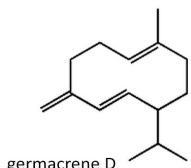
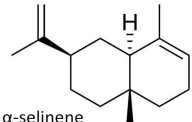
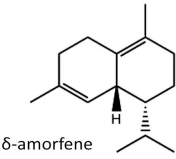
L'estrazione dell'olio essenziale di *E. klugii*, come per tutte le altre piante, è avvenuta per distillazione in corrente di vapore sempre in ragione di una strategia ottimizzata in funzione di diverse curve di distillazione. La successiva caratterizzazione chimica è stata eseguita mediante gas cromatografia (GC-FID) e gas cromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). Da questa è emersa la presenza di 52 composti pari al

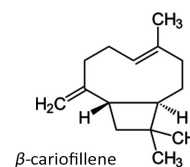
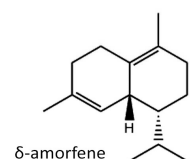
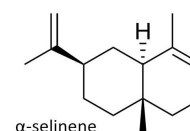
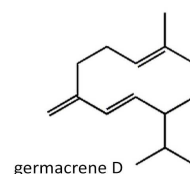
96.22% dell'intero fitocomplesso. Non è stato possibile eseguire un confronto tra la nostra caratterizzazione e la caratterizzazione di altre piante della stessa specie poiché in letteratura non è presente alcun dato a tale riguardo.

Dalla nostra analisi il composto maggioritario è risultato essere il germacrene D (24.81%). Gli altri principali composti sono a seguire α -selinene (7.77%), δ -amorfene (6.64%), β -cariofillene (6.44%), α -cadinolo (6.32%) e β -elemene (5.92%), come mostrato nella tabella che segue.

Il germacrene D è una molecola già nota da tempo, si tratta di un sesquiterpene presente in numerose piante, sia angiosperme che gimnosperme ma è stato riscontrato anche tra le briofite (Noge and Becerra, 2009). Spesso rappresenta il precursore di altri sesquiterpeni, come cadineni e selineni (Bülow and Konig, 2000; Telascrea et al., 2007). Esso ha un ruolo ecologico di difesa per la pianta, sia verso mammiferi erbivori (Langenheim, 1994) che verso insetti parassiti come afidi (Bruce et al., 2005) o zecche (Birkett et al., 2008), inoltre è stata riscontrata anche un'attività insetticida nei confronti di zanzare (Kiran and Devi, 2007). Allo stesso tempo il germacrene D funziona da feromone per altri insetti, come diverse specie di falena, esercitando su di loro sia un effetto di attrazione sia quello di stimolarne l'ovoposizione. È stata anche scoperta la presenza di recettori per questa molecola situati sulle antenne di queste falene (Røstelien et al., 2000; Strandén et al., 2002, 2003).

Composizione dell'olio essenziale di *E. klugii*

Nome del composto	Area%	KI	
germacrene D	24.81	1478	
α -selinene	7.77	1490	
δ -amorfene	6.64	1515	
β -cariofillene	6.44	1410	
α -cadinolo	6.32	1663	
β -elemene	5.92	1388	
β -selinene	4.44	1483	
α -copaene	3.10	1376	
germacrene B	2.96	1556	
α -muurololo	2.94	1655	
γ -muurolene	2.27	1473	
γ -cadinene	1.97	1508	
α -cariofillene	1.94	1450	
α -muurolene	1.37	1494	
β -pinene	1.25	972	
α -pinene	1.21	928	
δ -amorfene	1.19	1489	
τ -cadinolo	1.18	1645	
τ -muurololo	1.16	1647	
γ -elemene	0.98	1426	
1-epi-cubenolo	0.82	1629	
β -copaene	0.78	1423	
α -cadinene	0.69	1534	
γ -guriunene	0.67	1470	
δ -elemene	0.66	1338	
germacrene A	0.55	1500	
α -guaiene	0.53	1431	
β -bourbonene	0.52	1381	
<i>trans</i> -cadin-1(2),4-diene	0.50	1529	
globulolo	0.45	1585	
guaiolo	0.45	1596	
elemene isomero	0.38	1382	
<i>cis</i> -muurola-3,5-diene	0.37	1444	
α -cubebene	0.36	1351	
spatulenolo	0.36	1577	
limonene	0.34	1024	
isoaromadendrene epossido	0.30	1567	
cariofillene ossido	0.30	1581	
β -cubebene	0.29	1386	
<i>trans</i> -calamenene	0.26	1519	
cubenolo	0.26	1636	
α -ilangene	0.25	1370	
<i>cis</i> - β -elemenone	0.25	1588	
aristolene	0.24	1438	
<i>trans</i> -ocimene	0.20	1042	
elemolo	0.15	1549	
longiciclene	0.12	1369	
<i>cis</i> -dracunculifolo	0.11	1537	
α -calacorene	0.11	1538	
β -calacorene	0.11	1561	
canfene	0.10	944	
<i>allo</i> -aromadendrene	0.10	1454	
Totale	96.22		



***Ocimum micranthum* Willd.**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Sottoclasse: asterids

Ordine: Lamiales

Famiglia: Lamiaceae

Sottofamiglia: Nepetoideae

Tribù: Ocimeae

Genere: *Ocimum*

Specie: *O. micranthum* Willd.

Sinonimi:

Ocimum guatemalense Gand.

Ocimum campechianum Mill.

Ocimum guatemalense Gand.

Nomi comuni:

albahaca del monte, Amazonian basil, wild sweet basil, wild mosquito plant



Fonte immagine di sinistra: <http://www.tropicos.org/Image/100160381>

Fonte immagine di destra: <http://www.tropicos.org/Image/100129840>

O. micranthum è una pianta erbacea annuale caratterizzata da una forte aromaticità, nativa delle pianure del centro e sud America e delle Indie occidentali. La sua fragranza tipica è dovuta all'olio essenziale in essa contenuto, molto simile a quella di diverse specie del genere *Ocimum* (Charles et al., 1990). *O. micranthum* appartiene alla famiglia delle Labiatae, la quale riveste grande importanza in campo culinario per la presenza al suo interno di numerose spezie. Si conoscono inoltre numerosi estratti con forte attività antimicrobica ed antiossidante. Di questa famiglia, il genere *Ocimum* trova anch'esso largo impiego nel settore alimentare data l'aromaticità tipica delle specie che comprende; sono infatti spesso utilizzate come ingredienti per il miglioramento della fragranza e sapore del cibo. Trova anche un suo utilizzo in campo cosmetico, dove sovente lo si trova come additivo di vari prodotti. Le specie più conosciute ed utilizzate sono sicuramente *O.*

basilicum, il comune basilico presente nell'area mediterranea, *O. gratissimum* di origine africana e *O. sanctum*, proveniente dalle indie. *O. micranthum* è una specie molto meno nota ed ancora poco studiata. Un altro aspetto importante da tenere in considerazione è il fatto che la famiglia delle Labiatae è nota per possedere polimorfismi all'interno di una stessa specie che si riflettono con variazioni considerevoli della composizione degli oli essenziali, accentuando quindi la variabilità qualitativa e quantitativa che è già di per sé presente negli oli essenziali. Si conoscono infatti differenti chemotipi anche all'interno delle specie del genere *Ocimum* e verosimilmente questo fenomeno potrebbe interessare che *O. micranthum* ma attualmente non ci sono sufficienti dati a disposizione per poterlo affermare con certezza (Sacchetti et al., 2004).

USI TRADIZIONALI

A seguito della forte aromaticità che caratterizza *O. micranthum*, i principali usi tradizionali riguardano la preparazione di bevande aromatiche e zuppe saporite (Charles et al., 1990), nonché l'impiego come spezia per aggiungere sapore e migliorare la fragranza di piatti tipici. Per lo stesso motivo, *O. micranthum* trova un largo utilizzo anche nella medicina tradizionale. Viene impiegato per contrastare infezioni batteriche generiche, nonché per la cura di tosse e bronchiti (Di Stasi et al., 2002). Altri usi noti riguardano l'utilizzo in qualità di decotto per la cura di raffreddori, febbre, disturbi di stomaco o per combattere alcuni vermi parassiti. Trova anche impiego tradizionale nel trattamento di epilessia e problemi del sistema nervoso, per otiti, come rimedio per influenza, coliche e convulsioni nei bambini e per dolori mestruali (Charles et al., 1990). Per finire, estratti di foglie, rami e fusto vengono utilizzati per contrastare l'emorragia causata dall'effetto del veleno di alcuni serpenti. Evidenze scientifiche hanno confermato un suo effetto moderato in questo senso verso il veleno di *Bothrops atrox*, un viperide dell'America centro meridionale (Otero et al., 2000).

FITOCHEMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

Come accennato in precedenza, il genere *Ocimum* è rappresentato da specie vegetali con una forte aromaticità e considerate oltre che per il loro utilizzo in ambito alimentare anche per le loro numerose attività biologiche. Anche se *O. micranthum* è ancora poco

studiato, emerge comunque per diverse proprietà funzionali ad un uso salutistico. Da studi recenti risulta ad esempio un buon candidato come antinfiammatorio grazie alla sua azione antinocettiva ed antispasmodica riscontrata a livello delle vie respiratorie nei ratti. Si è riscontrata infatti una riduzione degli effetti conseguenti a stimolazioni proinfiammatorie se questo olio essenziale viene prima somministrato ai ratti per inalazione come aerosol. Questi effetti sono dovuti principalmente ai due isomeri (E e Z) di metil cinnammato presenti in abbondanza nell'olio essenziale (Pinho et al., 2012). Altri studi hanno ribadito l'azione antinocettiva ed analgesica dell'olio essenziale di *O. micranthum* anche se somministrato tramite iniezione (Lino et al., 2005). Ulteriori esperimenti hanno messo in luce attività antibatterica per diversi patogeni umani, attività antiprotozoica ed attività antiossidante sia di estratti metanolici che estratti acquosi di *O. micranthum* (Navarro et al., 2003). Estratti in diclorometano invece hanno mostrato attività contro alcuni funghi dermatofiti, come *Microsporum gypseum* e *Tricophyton mentagrophytes* (Freixa et al., 1998). Dalle tipologie di estratto utilizzate, di cui comunque la composizione chimica riportata è molto sommaria se non del tutto assente, è in ogni modo possibile ipotizzare che la loro attività biologica possa essere dovuta a composti di natura terpenica che comunque caratterizzano in modo specifico l'olio essenziale.

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

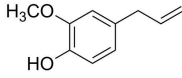
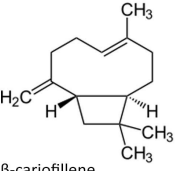
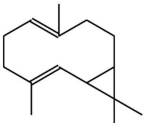
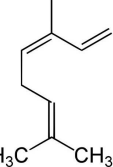
L'estrazione dell'olio essenziale di *O. micranthum* è stata fatta a partire dalle foglie fresche della pianta tramite distillazione in corrente di vapore, utilizzando parametri ottimizzati da una curva di distillazione per avere la massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti, è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC-FID) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS), individuando 24 diversi composti per un totale del 97.66% di campione.

Come si nota dalla tabella che segue, i composti presenti con maggior abbondanza sono l'eugenolo (27.74%), il β -cariofillene (17.18%), il biciclogermacrene (14.35%), il *cis*-ocimene (9.17%) e l'1,8-cineolo (6.51%). Da precedenti studi condotti sempre nei nostri laboratori su altri campioni di *O. micranthum* sempre provenienti dall'Ecuador la caratterizzazione chimica ha messo in luce alcune differenze, confermando la variabilità che si riscontra tra oli essenziali estratti alle medesime condizioni in campioni della stessa specie dove giocano un ruolo importante le condizioni climatiche e la variabilità genetica

intraspecifica. Nella precedente analisi il composto maggioritario è risultato essere sempre l'eugenolo ma con maggior abbondanza (46.55%), seguito anche in questo caso dal β -cariofillene (11.94%), poi dal β -elemene (9.06%), molto più rappresentato rispetto al campione preso in esame in questa tesi (1.22%). Confrontabile la presenza di 1,8-cineolo (5.35%) mentre più scarsi il biciclogermacrene ed il *cis*-ocimene, presenti rispettivamente al 2.90% e 2.69% (Sacchetti et al., 2004).

Da studi in letteratura emerge anche una forte presenza di γ -elemene isomero che non compare nell'olio essenziale da noi studiato. In questi studi si sono confrontati gli oli essenziali ottenuti da parti diverse della stessa pianta per evidenziare le differenze di composizione che ci sono. Elencando i composti presenti in quantità superiore al 10%, nelle foglie sono stati riscontrati eugenolo (20.50%); 1,8-cineolo (20.02%); β -cariofillene (19.26%) e γ -elemene isomero (14.44%), nei fiori γ -elemene isomero (36.83%); β -cariofillene (18.93%) e β -selinene (14.03%) ed infine, nel fusto γ -elemene isomero (28.16%); β -cariofillene (20.51%); β -selinene (11.89%) e 1,8-cineolo (10.89%). Questo mostra come la composizione possa variare considerevolmente a seconda della parte della pianta utilizzata (Charles et al., 1990).

Composizione dell'olio essenziale di *O. micranthum*

Nome del composto	Area%	KI	
eugenolo	27.74	1362	
β -cariofillene	17.18	1410	eugenolo
biciclogermacrene	14.35	1491	
<i>cis</i> -ocimene	9.17	1033	β -cariofillene
1,8-cineolo	6.51	1028	
germacrene A	4.55	1499	biciclogermacrene
α -cariofillene	3.51	1450	
germacrene B	2.63	1558	<i>cis</i> -ocimene
linalolo	2.42	1100	
<i>allo</i> -aromadendrene	1.41	1456	
β -selinene	1.33	1485	
spatulenolo	1.29	1577	
β -elemene	1.22	1389	
β -pinene	0.82	973	
germacrene D	0.67	1476	
<i>trans</i> -ocimene	0.61	1041	
α -pinene	0.40	929	
α -terpineolo	0.35	1192	
<i>trans</i> - α -bergamotene	0.32	1432	
β -mircene	0.30	987	
limonene	0.25	1025	
borneolo	0.25	1167	
sabinene	0.20	968	
δ -elemene	0.18	1340	
Totale	97.66		

***Ocotea cernua* (Nees) Mez.**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Ordine: Laurales

Famiglia: Lauraceae

Genere: *Ocotea*

Specie: *O. cernua* (Nees) Mez.

Sinonimi:

Oreodaphne marowynensis Miq.

Oreodaphne cernua Nees.

Ocotea bangii Mez & Rusby ex Rusby.

Ocotea caudata (Nees) Mez

Nomi comuni:

Cayenne Rosewood



Fonte immagine di sinistra: <http://www.tropicos.org/Image/100131486>

Fonte immagine di destra: <http://www.tropicos.org/Image/100461105>

Ocotea cernua fa parte delle Lauraceae, una famiglia distribuita nelle regioni tropicali – e quindi diffusa in Ecuador –, subtropicali e temperate e comprende quasi esclusivamente alberi o arbusti sempreverdi e aromatici. I fiori, piuttosto piccoli, generalmente sono riuniti in infiorescenze ascellari che possono essere unisessuali ed hanno colorazione verdastra, giallastra o bianca. Il frutto è solitamente una bacca monosperma o una drupa (Maugini et al., 2014). La specie *O. cernua* ha una distribuzione piuttosto ampia che va dal Messico alla Bolivia e sud del Brasile (van der Werff, 2001) e vive ad altitudini che vanno da pochi metri sopra il livello del mare fino a 1500 metri. Si tratta di un grande arbusto sempreverde o piccolo albero, con un'altezza che generalmente varia dai 5 ai 10 metri con campioni sporadici che possono arrivare fino a 20 metri. Si tratta di una specie dioica. Infatti, per la produzione di semi sono richieste sia la pianta maschile che quella femminile. Solitamente è glabra ma talvolta presenta peluria nei giovani steli. Ha piccioli

della lunghezza di 8-20 mm con foglie ellittiche e oblungho-ellittiche. I fiori sono di colore bianco crema, unisessuali, dalla fragranza di pesca e fioriscono generalmente tra febbraio e marzo, mentre i frutti maturano principalmente in agosto e settembre (“*Ocotea cernua* - Useful Tropical Plants”, “*Ocotea cernua*, flora of Barro Colorado Island” 2016).

USI TRADIZIONALI

L’uso tradizionale principale di *O. cernua* riguarda è legato alla sua forte aromaticità per la presenza nell’olio essenziale di composti quali miristaldeide, cineale, terpinolo e diversi altri sesquiterpeni (“*Ocotea cernua* - Useful Tropical Plants”). Gli usi etnomedici si riferiscono all’impiego dei semi macinati usati tal quali o in decotto per trattare problemi gastrici o disturbi gastrointestinali in genere. Trova impieghi più recenti e meno tradizionali in prodotti cosmetici anti età, per la presenza di canfora e safrolo, o in alcune bevande aromatizzate ad uso estemporaneo (“GREEN PARADISE”, vedi sitografia).

FITOCHIMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

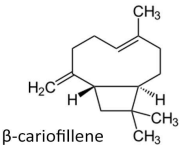
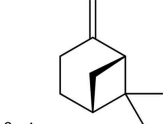
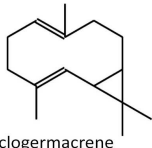
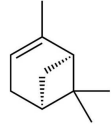
O. cernua è una pianta ancora poco studiata. In letteratura non si trovano dati esaurienti di caratterizzazione chimica di suoi estratti, ma soltanto alcuni limitati cenni riguardanti la presenza di miristaldeide, terpinolo, canfora e safrolo. Per ciò che riguarda la miristaldeide, è una sostanza che trova diverse applicazioni prevalentemente con finalità di aromatizzazione, ad esempio in campo alimentare in prodotti surgelati caseari, bevande, prodotti da forno e gelatine; viene utilizzata anche come additivo del tabacco nelle sigarette per conferire un aroma caratteristico (“Myristaldehyde - Tobacco Products”). Il terpineolo viene invece usato per le sue proprietà espettoranti, ed in profumeria per il suo caratteristico profumo di giacinto.

La canfora è usata in profumeria per la sua fragranza caratteristica che conferisce maggiore incisività al bouquet, come ingrediente in cucina; in India è usata nelle cerimonie religiose; in generale tra gli usi più frequenti vi è quello topico poiché viene assorbita velocemente attraverso la pelle e produce una sensazione di raffreddamento simile a quella del mentolo, determinando una leggera attività anestetica locale. Infine, il safrolo, presente in diverse spezie, tra cui il pepe nero, che ad alti dosaggi risulta tossico e cancerogeno per l’uomo (National Toxicology Program, 2011).

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

L'estrazione dell'olio essenziale di *O. cernua* è avvenuta mediante distillazione in corrente di vapore, come previsto dalla farmacopea, dove i parametri di distillazione sono stati ottimizzati per ottenere la miglior resa quantitativa e qualitativa possibile. Successivamente si è passati alla sua caratterizzazione chimica mediante gas cromatografia (GC-FID) e gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Sono stati rivelati 49 composti pari al 97.93% dell'olio. Come elencato nella tabella che segue, tra questi composti quelli presenti in quantità più significativa risultano essere: β -cariofillene (29.99%), β -pinene (12.03%), biciclogermacrene (11.52%) e germacrene D (4.82%). Dai risultati ottenuti e dal confronto con quanto – seppur limitatamente – è riportato in letteratura appare curioso il fatto che nel nostro campione non siano stati rilevati i composti terpenici miristaldeide, terpinolo, canfora e safrolo, nonostante la distillazione in corrente di vapore risulti tra le metodiche elettive per la loro estrazione. Le spiegazioni a questa evidente disparità dei nostri risultati rispetto alla letteratura possono essere legate da un lato alla limitata caratterizzazione chimica al momento nota, dall'altro alla notevole chemodiversità che caratterizza gli oli essenziali, in ragione sia della famiglia botanica che si distingue per questa particolarità, sia più in generale in ragione della differente collocazione geografica delle specie studiate (Guerrini et al. 2011). In ogni caso, attualmente non esistono altri studi con una caratterizzazione chimica puntuale di questo olio essenziale paragonabili a quello qui presentato. Questo se da un lato non rende possibile il confronto più approfondito con altre fonti bibliografiche, dall'altro valorizza lo studio condotto su questa pianta per la sua originalità.

Composizione dell'olio essenziale di *O. cernua*

Nome del composto	Area%	KI	
β -cariofillene	29.99	1410	 <p>β-cariofillene</p>
β -pinene	12.03	973	
biciclogermacrene	11.52	1490	
α -pinene	6.82	929	
germacrene D	4.82	1476	 <p>β-pinene</p>
spatulenolo	3.84	1576	
α -cariofillene	3.69	1450	 <p>biciclogermacrene</p>
δ -cadinene	2.53	1514	
cariofillene ossido	2.14	1580	
δ -elemene	1.87	1332	
β -elemene	1.71	1388	 <p>α-pinene</p>
α -copaene	1.38	1376	
globulolo	1.1	1584	
β -cubebene	1.07	1386	
limonene	0.94	1024	
α -cubebene	0.86	1351	
β -bourbonene	0.86	1381	
γ -amorfene	0.77	1485	
cubebolo	0.72	1511	
guaiolo	0.56	1596	
<i>trans</i> -calamenene	0.51	1518	
1-epi-cubenolo	0.51	1629	
cubenolo	0.46	1645	
α -cadinolo	0.46	1658	
aromadendrene	0.45	1431	
γ -muurolene	0.43	1472	
<i>allo</i> -aromadendrene	0.37	1454	
cariofilla-4(14),8(15)-dien-5.a-olo	0.37	1640	
γ -cadinene	0.36	1507	
viridiflorolo	0.35	1593	
sabinene	0.34	968	
<i>cis</i> -muurola-3,5-diene	0.33	1444	
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-diene	0.32	1468	
α -muurolene	0.32	1494	
mircene	0.31	987	
<i>allo</i> -aromadendrene epossido	0.30	1635	
<i>trans</i> -cadina-1(2),4-diene	0.27	1529	
germacrene B	0.26	1556	
β -copaene	0.24	1423	
γ -elemene	0.21	1426	
α -muurololo	0.18	1650	
elemolo	0.17	1548	
τ -cadinolo	0.17	1646	
α -bisabololo	0.17	1690	
canfene	0.16	944	
valencene	0.14	1483	
β -fellandrene	0.13	1025	
elemene isomero	0.13	1382	
Totale	97.93		

***Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Ordine: Laurales

Famiglia: Lauraceae

Genere: *Ocotea*

Specie: *O. quixos* (Lam.) Kosterm

Sinonimi: *Laurus quixos* Lam.

Nectandra cinnamomoides (Kunth) Nees.

Nomi comuni: ishpingo, flor de canela, ecuadorian cinnamon



Fonte immagine di sinistra: http://lgr.ups.edu.ec/documents/1317427/1369624/01aceite_foliar7.pdf

Fonte immagine di destra: foto di Alessandro Grandini

O. quixos è una pianta arborea sempreverde di medie dimensioni della famiglia delle Lauracee, originaria dell'Ecuador e della Colombia. Ha la corteccia di colore generalmente biancastro o giallo, mentre le foglie sono semplici ed alternate, alcune sono opposte, con margine intero o in occasione lobato, con apice acuminato e base a cuneo. Fiorisce ogni due anni e presenta infiorescenze che possono essere racemose, ombrellate o a racemo composto e di petali sono generalmente 6 con colori che variano dal verde al giallo fino al bianco. Caratteristico di queste infiorescenze è il calice lignificato, di grandi dimensioni, chiamato localmente "Ishpingo", che rimarrà poi anche nel frutto.

Il nome scientifico *Ocotea quixos* Lam. ed il suo sinonimo *Nectandra cinnamomoides* Nees fanno riferimento rispettivamente a Quijos, una valle situata nei pressi della capitale equadoregna di Quito ed al caratteristico odore che ricorda quello della cannella (Naranjo et al., 1981). Questa fragranza caratteristica è dovuta principalmente alla forte presenza

di cinnamaldeide e, in maniera più marginale, alla presenza di *o*-metossicinnamaldeide, acido cinnamico e metil cinnammato presenti nel calice dei frutti. Questo in contrasto con l'1-nitro-2-feniletano responsabile dell'odore di cannella della corteccia e foglie di *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez ed *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez; da notare che tutte tre queste specie fanno parte della famiglia delle Lauracee (Naranjo et al., 1981).

Il genere *Ocotea* è distribuito principalmente nelle regioni tropicali e subtropicali. Alcune specie di questo genere come *O. puberula* e *O. quixos* sono state descritte in letteratura per le loro attività antibatteriche. *O. macrophylla* ha mostrato attività antinfiammatoria inibendo COX-1, COX-2 e LOX-5 (Costa et al., 2015).

USI TRADIZIONALI

O. quixos ha proprietà aromatiche note già in epoca incaica, dai quali era considerato sia medicinale che spezia (Naranjo, 1969). Il calice delle infiorescenze, Ishpingo, è utilizzato tradizionalmente dalla popolazione indigena amazzonica come spezia, fresco o essiccato, intero o tritato. Lo troviamo in bevande e infusioni e alimenti come aromatizzante ed è apprezzato come eupeptico, disinfettante ed anestetico locale. Utilizzato anche nella preparazione di alcune bevande alcoliche tradizionali come la *alajua* e la *mazamorra morada* (Naranjo et al., 1981) oppure come ingrediente essenziale per altre bevande quali la *colada morada* che da tradizione si consuma durante in Giorno dei Morti (Ulloa, 2006).

FITOCHIMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

O. quixos è stata di recente studiata per diverse proprietà biologiche che possiede, una fra queste è l'attività antinfiammatoria. È stato dimostrato infatti sia *in vitro* che *in vivo* che l'olio essenziale di *O. quixos* ottenuto dai calici floreali induce rilascio di ossido nitrico in macrofagi LPS-indotti J774 a concentrazioni non tossiche, inibisce l'espressione di COX-2 e fa aumentare la produzione di cAMP in cellule forskolin-indotte. In modello murino, inoltre, si è dimostrato in grado di ridurre la presenza di edema senza danneggiare la mucosa gastrica. Dall'analisi dei singoli composti maggiormente presenti nell'olio essenziale si è dimostrato che l'attività antinfiammatoria deriva quasi completamente dalla *trans*-cinnamaldeide, già nota in letteratura per questa sua attività. Si è escluso invece un effetto dovuto al metilcinnammato (Ballabeni et al., 2010). Altri studi hanno

mostrato una capacità antiaggregante e antitrombotica dell'olio essenziale di *O. quixos*. *In vitro* si è dimostrata la capacità di inibire l'aggregazione piastrinica in seguito a stimolazione con acido arachidonico, collagene ed altri fattori pro-aggreganti ed anche di ridurre la formazione di trombi in plasma umano e murino. Da test *in vivo* su topi la somministrazione orale di questo olio essenziale ha mostrato la capacità di prevenire trombosi a seguito di induzione per iniezione intravenosa di collagene-epinefrina. Quest'azione antitrombotica, inoltre, non è accompagnata da effetti pro-emorragici (Ballabeni et al., 2007).

Da studi di attività antibatterica eseguiti sull'olio essenziale estratto dalle foglie è emersa una forte attività contro due ceppi di *Streptococcus* sp, con una minima concentrazione inibente (MIC) < 500 µg/mL (Noriega e Dacarro, 2008).

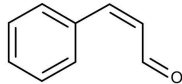
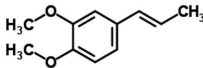
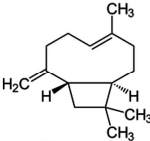
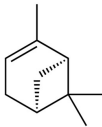
ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

Come per gli altri oli essenziali, l'estrazione dell'olio essenziale di *O. quixos* è avvenuta tramite distillazione in corrente di vapore utilizzando parametri ottimizzati per avere la massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS).

L'olio essenziale di *O. quixos* è studiato nei nostri laboratori già da prima dell'inizio del mio periodo di dottorato. Inizialmente è stato considerato l'olio essenziale estratto dai calici floreali, essendo essa la parte più comunemente utilizzata negli usi tradizionali. I prodotti principali rilevati dalla sua caratterizzazione sono la *trans*-cinnamaldeide (27.91%), l'acido cinnammico metil estere (21.65%), l'1,8-cineolo e il limonene (8.09%) su un totale di 44 prodotti identificati (Bruni et al., 2004). Più recentemente si è deciso di studiare anche l'olio essenziale estratto dalle foglie, mostratosi un efficace antibatterico. Dalle prime analisi condotte i principali composti sono risultati essere il β -cariofillene (15.1%), il cinnamil acetato (11.4%) e il sabinene (7.6%). Da citare anche un 5.1% di cinnamaldeide che, assieme al cinnamil acetato, è principale responsabile della fragranza caratteristica di questo fitocomplesso (Sacchetti et al., 2006). Vista l'efficacia antibatterica mostrata verso ceppi patogeni per l'uomo (Sacchetti et al., 2006; Noriega e Dacarro, 2008), in questo studio di dottorato è stato considerato l'olio essenziale proveniente da un campione di foglie di *O. quixos*. A sottolineare ancora una volta la variabilità che si può riscontrare all'interno di campioni diversi di una stessa specie si può osservare dalla

tabella che segue come sia differente la composizione chimica riscontrata rispetto a quella precedentemente citata. Sono stati identificati 50 diversi composti per un ammontare del 96.41% sul totale. Il composto maggioritario è la *trans*-cinnamaldeide (16.62%), presente solo al 5.1% nel campione precedentemente studiato. Seguono il *trans*-metil isoeugenolo (11.94%), non rilevato invece nel precedente campione, il β -cariofillene (10.59%), composto maggioritario nell'olio essenziale citato in precedenza. Non rilevato il cinnamil acetato e presente solo al 2.10% il sabinene.

Composizione dell'olio essenziale di *O. quixos*

Nome del composto	Area%	KI	
<i>trans</i> -cinnamaldeide	16.62	1270	 <i>trans</i> -cinnamaldeide
<i>trans</i> -metil isoeugenolo	11.94	1498	
β -cariofillene	10.59	1410	 <i>trans</i> -metil isoeugenolo
α -pinene	9.39	929	
cariofillene ossido	7.10	1582	 β -cariofillene
β -pinene	6.06	973	
α -copaene	3.22	1376	 α -pinene
metil cinnamato	3.18	1387	
biciclogermacrene	2.14	1491	
sabinene	2.10	968	
cariofilla-4(14),8(15)-dien-5- α olo	1.84	1640	
α -cariofillene	1.76	1450	
<i>trans</i> -cinnamil acetato	1.69	1449	
δ -cadinene	1.59	1514	
limonene	1.40	1025	
guaiolo	1.33	1597	
benzil benzoato	1.25	1774	
benzaldeide	1.05	959	
valerianolo	1.03	1659	
4-terpineolo	0.70	1175	
1-epi-cubenolo	0.63	1630	
<i>trans</i> - γ -bisabolene	0.57	1526	
α -calacorene	0.56	1540	
umulene 1,2-epossido	0.54	1610	
γ -terpinene	0.53	1053	
canfene	0.51	945	
spatulenolo	0.49	1577	
1,8-cineolo	0.44	1028	
δ -cubebene	0.44	1352	
<i>trans</i> -calamenene	0.43	1520	
linalolo	0.40	1100	
β -mircene	0.36	987	
germacrene D	0.36	1476	
cubenolo	0.34	1645	
α -terpinene	0.33	1014	
α -terpineolo	0.32	1192	
cis-cadina-1(6),4-diene	0.32	1470	
α -tuiene	0.30	922	
benzenepropanale	0.28	1159	
<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-diene	0.27	1487	
<i>trans</i> - β -farnesene	0.26	1455	
<i>trans</i> -cadina-1(2)-4-diene	0.24	1531	
α -bisabololo	0.23	1686	
p-cimene	0.22	1021	
cis- α -bisabolene	0.22	1506	
cis-cinnamaldeide	0.18	1215	
γ -muurolene	0.17	1473	
γ -cadinene	0.17	1507	
terpinolene	0.16	1082	
α -muurololo	0.16	1645	
Totale	96.41		

***Piper carpunya* Ruiz & Pav.**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Ordine: Piperales

Famiglia: Piperaceae

Genere: *Piper*

Specie: *P. carpunya* Ruiz & Pav.

Sinonimi:

Schilleria carpunya (R. & P.) Kunth

Piper subdurum Trel.

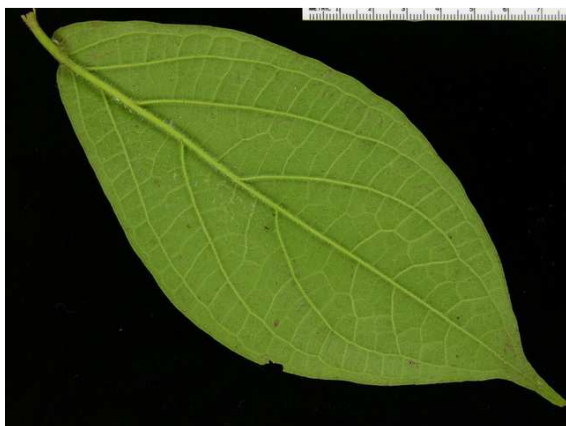
Ottonia carpunya (R. & P.) Miq.

Carpupica odorata Rafin.

Carpunya peruviana Presl

Nomi comuni:

guaviduca



Fonte immagine di sinistra: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Piper&mobile=1>

Fonte immagine di destra: <http://caterpillars.myspecies.info/taxonomy/term/18035/media>

P. carpunya, noto comunemente in Ecuador col nome di “guaviduca”, fa parte della famiglia delle Piperaceae, una famiglia distribuita nelle regioni tropicali di entrambi gli emisferi che comprende piante erbacee e piante legnose. Il fusto presenta i fasci vascolari organizzati in più anelli o distribuiti come nelle Monocotiledoni. Le foglie sono semplici ed in genere alterne. I fiori, nudi, sono riuniti in dense spighe ascellari. Il frutto è rappresentato da una bacca o una drupa. La famiglia delle piperaceae comprende 13 generi, tra cui il più noto è il genere *Piper*, dove la specie *Piper nigrum* rappresenta una delle più antiche droghe utilizzate in India, dai Greci e dai Romani in Europa. La droga è normalmente costituita dai frutti e, a seconda della preparazione, si possono ottenere 3

diverse specie di grande importanza commerciale: il pepe nero, il pepe bianco ed il pepe verde (Maugini et al., 2014).

P. carpunya è distribuito in varie zone dell'America Latina e lo si trova a maggior densità in Perù, Ecuador, Colombia e Costa Rica ("Tropicos | Piper carpunya Ruiz & Pav."). Predilige suoli argilloso-sabbiosi e altitudini tra i 1000 e 2000 m. È una pianta arborea dell'altezza media di due o tre metri, dal fusto nodoso del diametro di circa tre centimetri. La corteccia del tronco è verdastra, dello stesso colore dei rami giovani mentre, se sezionata, all'interno si presenta marrone e rilascia un forte odore dolciastro molto gradevole. Le foglie sono semplici, alterne, dall'apice acuminate e la base acuta di colore verde scuro. I fiori si presentano in infiorescenze di colore che va dal bianco al verde della lunghezza di 7-11 cm e dal diametro di 3 mm. A differenza delle altre specie di *Piper*, *P. carpunya* è utilizzato oltre che per i frutti anche per le sue foglie – prevalentemente in decotto e in infuso, o tal quali - sulle quali si è appunto concentrata la nostra attenzione per lo studio dell'olio essenziale.

USI TRADIZIONALI

Le foglie di *P. carpunya* sono ampiamente utilizzate nella medicina tradizionale dei Paesi del Sud America come antinfiammatorio, rimedio antiulcera, antidiarroico, antiparassitario e per alleviare irritazioni cutanee (Diaz and Dorado, 1986). L'infuso preparato con le foglie è anche usato come bevanda aromatica e per trattare disturbi gastrointestinali.

FITOCHIMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

P. carpunya è una pianta studiata già da tempo ed esistono diversi dati di letteratura che ne riportano la caratterizzazione chimica sia dell'olio essenziale che di estratti con vari solventi organici (Calle and Ferreira, 1973; Diaz and Dorado, 1986; Quílez et al., 2010; Vargas et al., 2004).

Diversi studi di attività biologica sono stati condotti a partire dalle conoscenze della medicina tradizionale per verificarne l'effettiva efficacia. Ad esempio le proprietà antinfiammatorie sono state confermate su modello animale da esperimenti condotti su ratti in cui si è mostrato come gli estratti di *P. carpunya* – idroalcolici e olio essenziale –

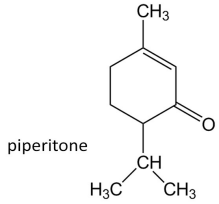
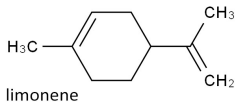
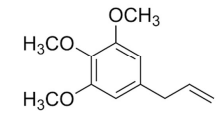
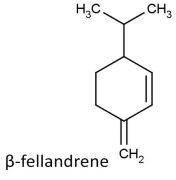
fossero in grado di ridurre la comparsa di edema nelle zampe indotto da carragenina (de las Heras et al., 1998). Anche l'attività gastroprotettiva è stata dimostrata in esperimenti su ratti, contrastando l'insorgenza di ulcere dovute alla somministrazione di antiinfiammatori non steroidei (Trabadela et al., 2008). Altri studi recenti hanno verificato, col tentativo di chiarire il meccanismo d'azione, sia l'attività antinfiammatoria che quella gastroprotettiva su diverse frazioni di estratti etanolici di *P. carpunya*, nonché l'attività antibatterica contro *Helicobacter pylori* (Quílez et al., 2010).

Studi di caratterizzazione fitochimica dell'olio essenziale hanno identificato il safrolo come composto maggioritario, presente al 14.9% nelle foglie e al 32.0% nelle sommità (Vargas et al., 2004). Questa sostanza si trova in piccole quantità anche in altre piante ad uso alimentare, ad esempio sempre nel genere *Piper* la si ritrova in *P. nigrum* nella preparazione del pepe nero. A quantità elevate è però considerata tossica per l'uomo e ne è stato dimostrato anche un potenziale effetto cancerogeno (National Toxicology Program, 2011).

ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

L'estrazione dell'olio essenziale di *P. carpunya* è avvenuta tramite distillazione in corrente di vapore delle foglie, utilizzando parametri ottimizzati per avere la massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). Sono stati identificati 42 composti per un totale del 95.62% sul totale del fitocomplesso. Come mostrato nella tabella che segue, i composti maggiormente presenti sono risultati essere rispettivamente il piperitone (26.22%), il limonene (9.48%), l'elemicina (7.22%) ed il β -fellandrene (5.62%). Nella caratterizzazione chimica dell'olio essenziale derivato da foglie eseguita dal gruppo di ricerca di Vargas (2004) è stata riscontrata una composizione totalmente differente, dove i composti presenti ad una percentuale superiore al 5% sono nell'ordine: safrolo (14.9%), 1,8-cineolo (13.0%), α -terpinene (12.1%), *p*-cimene (10.9%), spatulenolo (9.8%) e biciclogermacrene (6.7%). Nella caratterizzazione eseguita nei nostri laboratori il safrolo era presente soltanto al 2.19%. Le differenze riscontrate derivano molto probabilmente dalle condizioni ambientali che differentemente hanno influenzato la qualità dei due oli essenziali esaminati e in parte probabilmente a variabilità genetica intraspecifica.

Composizione dell'olio essenziale di *P. carpunya*

Nome del composto	Area	KI	
piperitone	26.22	1250	 <p>piperitone</p>
limonene	9.48	1023	
elemicina	7.22	1551	 <p>limonene</p>
β -felandrene	5.62	1024	
metileugenolo	4.52	1401	 <p>elemicina</p>
1,8-cineolo	3.99	1026	
α -terpinene	3.90	1012	 <p>β-felandrene</p>
<i>p</i> -cimene	3.38	1019	
α -pinene	3.37	927	
γ -terpinene	3.00	1051	
3-tuien-2-olo	2.40	1168	
safrolo	2.19	1283	
<i>p</i> -cimene-7-ol acetato	1.53	1422	
linalolo	1.47	1099	
mircene	1.44	985	
germacrene D	1.36	1474	
sabinene	1.34	965	
α -terpinil acetato	1.33	1354	
α -terpinen-7-ale	1.28	1279	
biciclogermacrene	1.18	1488	
β -pinene	1.14	970	
α -felandrene	1.05	1003	
timolo	0.90	1293	
eugenolo	0.85	1361	
carvacrolo	0.65	1300	
spatulenolo	0.65	1574	
neoisodiidrocarveolo	0.59	1233	
globulolo	0.48	1583	
α -copaene	0.38	1374	
cumin aldeide	0.29	1237	
1,3,8- <i>p</i> -mentatriene	0.26	1109	
β -cariofillene	0.26	1408	
δ -3-carene	0.25	1004	
terpinen-4-olo	0.25	1174	
δ -2-carene	0.24	995	
<i>trans</i> -ocimene	0.24	1041	
<i>trans</i> -nerolidolo	0.19	1561	
<i>cis</i> -sabinene idrato	0.18	1065	
α -tuiene	0.17	920	
β -elemene	0.15	1387	
β -longipinene	0.15	1397	
viridiflorolo	0.11	1592	
Totale	95.62		

***Schinus molle* L.**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Sottoclasse: rosids

Ordine: Sapindales

Famiglia: Anacardiaceae

Genere: *Schinus*

Specie: *S. molle* L.

Sinonimi:

Schinus huygan Molina.

Nomi comuni:

falso pepe, pepe Peruviano, American pepper, escobilla, molle del Perù



Fonte immagine di sinistra: https://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=scmo_004_ahp.tif

Fonte immagine di destra: http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=schin_001_ahp.tif

Schinus molle appartiene alla famiglia delle Anacardiaceae. È un genere distribuito prevalentemente nelle regioni tropicali – e quindi diffuso largamente in Ecuador –, ma di esso alcune specie raggiungono anche i climi temperati. Comprende piante legnose con foglie usualmente alterne, generalmente pennato-composte o trifogliate. Esse presentano canali resiniferi che contengono composti fenolici e sono ricchi di tannini. Possiedono fiori attinomorfi ermafroditi o unisessuali riuniti in infiorescenze, mentre i frutti sono generalmente drupacei (Maugini et al., 2014).

S. molle è un albero sempreverde dioico di media taglia che raggiunge all'incirca 8 m di altezza. È originario degli altopiani del Cile, Ecuador sud orientale, Perù e Bolivia ma ora è diffuso in gran parte del pianeta data la sua elevata capacità di adattamento. Il tronco può raggiungere un diametro di 40 cm e la corteccia, quando fessurata, lascia fuoriuscire un lattice colloso. Possiede foglie e rami penduli e le foglie composte hanno lunghezza di circa 25 cm, costituite da numerose foglioline lineari-lanceolate con margine seghettato. A fioritura si sviluppano piccoli fiori organizzati in infiorescenze a pannocchia molto

ramificate. I frutti, infine, hanno un diametro di 7-10 mm (“Schinus Molle,” Encyclopedia of Life).

USI TRADIZIONALI

S. molle è largamente impiegato dalla medicina tradizionale. Viene ad esempio usato come antibatterico, antivirale, antisettico a livello topico, astringente, digestivo, lassativo, diuretico, antireumatico, contro i dolori ai denti, per la cura di ferite, come rimedio a disordini mestruali, stimolante ed antidepressivo e contro infezioni polmonari e alle vie urinarie (Ferrero et al., 2007). Altri utilizzi etnomedici prevedono l’impiego di *S. molle* come antiemorragico, stimolante per il ciclo mestruale, cardiotonico, antidepressivo, tonico e stimolante (Machado et al., 2007). Esso trova anche un utilizzo in cucina, usato come spezia, le sue bacche hanno infatti un aroma molto simile a quello del pepe. Anche per questo, oltre che per la forma, viene chiamato comunemente “pepe rosa” (o falso pepe). In campo alimentare può essere consumate solo in modica quantità poiché contiene sostanze che se ingerite in grosse quantità hanno un effetto tossico. Grazie alla gradevole fragranza, il frutto è usato anche per preparare sciroppi o bevande aromatiche (Taylor, 2005). Una specialità culinaria in cui viene utilizzato è la creola, una miscela di pepe bianco, pepe nero, pepe verde, pepe rosa e pimento. Infine, *S. molle* viene anche utilizzato come pianta ornamentale, come arredo urbano e lungo i viali e nei parchi.

FITOCHEMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

S. molle è una pianta piuttosto studiata, visto il suo ampio utilizzo in campo etnomedico e culinario e vista la sua larga diffusione. Sono stati studiati fitocomplessi ottenuti da differenti parti della pianta, come foglie, frutti, corteccia, fiori, mediante diverse metodologie estrattive, dall’utilizzo di diversi solventi organici, a quello di fluidi supercritici e alla distillazione in corrente di vapore per ottenere oli essenziali.

Partendo proprio dalle informazioni etnomediche, recenti studi hanno dimostrato in modello murino un effetto antidepressivo di estratti in esano delle foglie di *S. molle* tramite test di sospensione della coda. Questi estratti avevano effetti comuni a quelli dei farmaci utilizzati come controlli e si è dimostrato un possibile meccanismo d’azione che

prevede interazioni col sistema serotonergico, noradrenergico e dopaminergico (Machado et al., 2007).

Estratti etanolici del frutto di *S. molle* si sono dimostrati ottimi per la lotta contro numerosi insetti parassiti delle le piante, quindi sono stati investiti diversi studi per saggiarne anche la sicurezza per i mammiferi erbivori e per l'uomo. Ad esempio studi condotti su ratti hanno analizzato potenziali effetti tossici sia in fase acuta (somministrandone 2 g/Kg di peso corporeo), sia in fase subacuta (1 g/Kg di peso corporeo) osservando sia cambiamenti comportamentali che modifiche fisiologiche: gli esiti di questi studi hanno mostrato soltanto un effetto stimolante, aumentando l'eccitazione, sia in fase acuta che subacuta e qualche alterazione deambulatoria solo tra gli effetti acuti. Non sono stati riscontrati cambiamenti morfologici a livello istologico. Allo stato attuale delle conoscenze, gli estratti di *S. molle* studiati per una loro possibile applicazione in agricoltura come sostanze fitoiatriche sono risultati sostanzialmente sicuri rispetto al possibile impatto ambientale e sull'uomo (Ferrero et al., 2007).

Altre ricerche hanno mostrato una moderata o forte attività antiossidante di alcune sostanze presenti negli estratti metanolici delle foglie, l'iperina, la 2- α -L-ramnopiranosil-iperina e l'iperin 6'-O-gallato (Marzouk et al., 2006). Sempre estratti metanolici hanno confermato anche l'effetto antimicrobico previsto dalla medicina tradizionale. Estratti di foglie, fiori e corteccia di *S. molle* si sono mostrati efficaci su ceppi clinici e commerciali di *Staphylococcus aureus* e diverse specie di *Candidasp.*, oltre che riconfermare l'attività antiossidante (Salazar-Aranda et al., 2011). L'olio essenziale ottenuto dalle foglie si è mostrato efficace anche sui funghi filamentosi, ad esempio mostra una forte attività contro funghi responsabili di dermatomicosi negli animali (*Cladiosporum* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Fonsecaea pedrosi*, *Geotrichum candidum*, *Histoplasma capsulatum*, *Micosporum* sp., *Nocardia* sp., *Phialophora jeanselmei*, *Sporotrichum schenckii* e *Trichophyton* sp.) o funghi che intaccano piante ed alimenti (*Cladiosporum* sp., *Curvularia lunata* e *Fusarium moniliforme*) (Dikshit et al., 1986).

Ricerche condotte su linee cellulari tumorali hanno evidenziato un effetto citotossico dell'olio essenziale di *S. molle*, che induce apoptosi cellulare, indicandolo come un possibile candidato per un'azione antitumorale (Diaz and Dorado, 1986). A conferma di ciò, altri studi più recenti ne hanno mostrato l'efficacia su diverse linee cellulari tumorali, in particolare quelle di carcinoma mammario e linee leucemiche dove si aveva un effetto citotossico legato ad un meccanismo apoptotico (Díaz et al., 2008).

Studi tossicologici condotti su ratti hanno mostrato che un prolungato contatto con estratti in etanolo ed esano causa irritazione cutanea reversibile, che scompare dopo 48 ore, oltre a causare un effetto eccitatorio transitorio (Bras et al., 2011). Se gli estratti venivano invece somministrati con la dieta (1 g/Kg di peso corporeo) per 90 giorni, si osservava un calo della conta dei linfociti e dei livelli di colesterolo totale, mentre non si avevano modificazioni morfologiche nei vari organi; questo suggeriva promettenti prospettive d'uso di questi estratti nel trattamento di dislipidemie (Bras et al., 2010). Ulteriori studi hanno mostrato una forte tossicità per gli estratti acquosi ed alcolici su un insetto parassita delle piante quale *Xanthogaleruca luteola*, dato che sottolinea ulteriormente le importanti potenzialità d'uso di questa specie anche nel contesto dei trattamenti in agricoltura, oggi più che mai alla ricerca di sostanze eco-compatibili, eco-sostenibili e allo stesso tempo efficaci (Huerta et al., 2010).

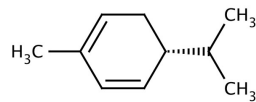
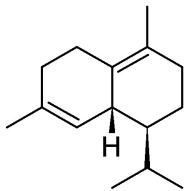
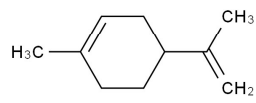
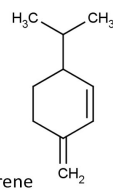
ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

L'estrazione dell'olio essenziale di *S. molle* è avvenuta tramite distillazione in corrente di vapore utilizzando parametri ottimizzati per avere la massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC-FID) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). Sono stati identificati 53 composti per un totale del 92.47% sul totale del fitocomplesso. Come mostrato nella tabella che segue, i composti maggiormente presenti sono risultati essere rispettivamente l' α -fellandrene (13.62%), il δ -cadinene (9.95%), il limonene (6.51%), il β -fellandrene (5.90%) e l' α -cadinolo (5.62%).

In letteratura si trovano molti dati di caratterizzazione chimica dell'olio essenziale di foglie di *S. molle*, in alcuni casi abbastanza sovrapponibili, in altri casi completamente differenti. Spesso in questo olio essenziale è stato riscontrato un alto contenuto di mircene, α - e β -fellandrene e limonene (Baser et al., 1997; Bendaoud et al., 2010; Bernhard et al., 1983; Díaz et al., 2008; Hayouni et al., 2008; Huaman et al., 2004; Maffei and Chialva, 1990). In controtendenza uno studio in cui il composto maggioritario risulta essere il *p*-cimene, presente per ben il 69,39% sul totale (Abdel-Sattar et al., 2010). Infine, da uno studio condotto su 11 diversi campioni di *S. molle*, provenienti da altrettante regioni del Brasile, i composti principali sono risultati α - e β -pinene, limonene, β -cariofillene, germacrene D e biciclogermacrene. Molto scarsa la presenza di β -fellandrene ed non rilevato l' α -

fellandrene (Gomes et al., 2013). La composizione dell'olio essenziale da noi studiato risulta in linea con quanto riportato dalla maggior parte della letteratura in merito per quanto riguarda il contenuto in α - e β -fellandrene e limonene, mentre il mircene risulta presente in quantità più ridotte (1.95%).

Composizione dell'olio essenziale di *S. molle*

Nome del composto	Area%	KI	
α -felandrene	13.62	1005	
δ -cadinene	9.95	1515	
limonene	6.51	1025	
β -felandrene	5.90	1026	
α -cadinolo	5.62	1659	
biciclogermacrene	3.78	1490	
elemolo	3.47	1548	
τ -muurololo	3.13	1647	
canfene	2.97	944	
germacrene D	2.83	1476	
eudesm-7(11)-en-4-olo	2.77	1697	
β -cariofillene	2.67	1410	
<i>p</i> -cimene	2.49	1021	
α -pinene	2.40	929	
α -muurolene	2.33	1494	
τ -cadinolo	2.33	1645	
γ -cadinene	2.02	1507	
mircene	1.95	987	
γ -eudesmolo	1.77	1634	
germacrene D-4-olo	1.58	1576	
γ -amorfene	1.00	1485	
Viridiflorolo	0.97	1593	
β -elemene	0.89	1388	
α -cariofillene	0.83	1450	
γ -muurolene	0.78	1472	
δ -elemene	0.70	1333	
Longifolene	0.60	1398	
α -cadinene	0.51	1534	
ledolo	0.50	1568	
<i>trans</i> -cadin-1(6),4-diene	0.47	1469	
α -tuiene	0.44	920	
1-epi-cubenolo	0.38	1629	
bornilacetato	0.36	1279	
β -pinene	0.34	973	
<i>cis</i> -muurola-4(14),5-diene	0.33	1457	
globulolo	0.33	1585	
<i>allo</i> -aromadendrene	0.32	1454	
<i>cis</i> -muurola-3,5-diene	0.30	1444	
<i>trans</i> -cadin-1(2),4-diene	0.29	1530	
<i>cis</i> - β -guaiene	0.21	1483	
α -muurololo	0.21	1650	
zonarene	0.20	1519	
1,10- δ -epi-cubenolo	0.20	1615	
α -copaene	0.15	1376	
aromadendrene	0.14	1431	
cubebolo	0.14	1511	
β -calacorene	0.14	1562	
α -calacorene	0.13	1539	
γ -eudesmolacetato	0.12	1774	
terpinolene	0.11	1081	
cariofillene ossido	0.11	1581	
gleenolo	0.11	1586	
α -terpinene	0.10	1014	
Totale	92.47		

***Tagetes minuta* L.**

DESCRIZIONE BOTANICO-FARMACOGNOSTICA:

Collocazione sistematica:

Phylum: Streptophyta

Sottoclasse: asterids

Ordine: Asterales

Famiglia: Asteraceae

Sottofamiglia: Asteroideae

Tribù: Tageteae

Genere: *Tagetes*

Specie: *T. minuta* L.

Sinonimi:

Tagetes bonariensis Pers.

Tagetes glandulifera Schrank

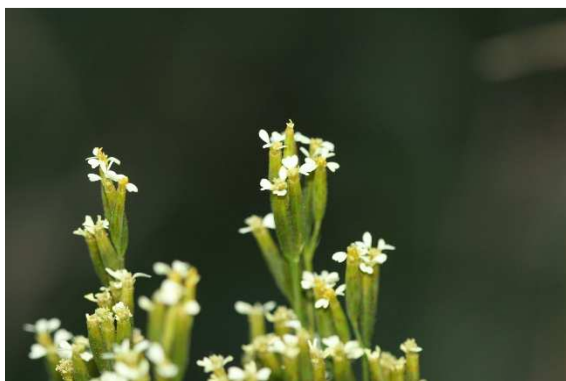
Tagetes glandulosa Schrank ex Link

Tagetes porophylla Vell.

Tagetes riojana M. Ferraro

Nomi comuni:

Huacatay, wild marigold



Fonte immagine di sinistra: http://www.eol.org/data_objects/25797512

Fonte immagine di destra: http://www.eol.org/data_objects/32643934

Tagetes minuta è una pianta erbacea annuale appartenente alle Asteraceae (o Compositae), la famiglia più ricca tra le Angiosperme come numero di generi (circa 1600) e di specie (circa 23000) distribuite in tutto il mondo. Questa famiglia è composta da piante erbacee ed arbustive, molto raramente arboree. Le foglie, in genere alterne, sono semplici, intere o dentate o spesso pennatosette. I fiori sono tipicamente riuniti in capolini terminali o ascellari e possono essere tra loro molto differenti oppure molto simili. In molte specie i fiori periferici, detti fiori del raggio, sono femminili o sterili, mentre i fiori centrali, detti fiori del disco, sono ermafroditi. Il frutto è un achenio, spesso sormontato da un organo di volo (pappo). La famiglia delle Asteraceae si suddivide in due sottofamiglie, quella delle Asteroideae e quella delle Cichorioideae. Della prima uno dei rappresentati più noto a livello commerciale è la camomilla, distribuita in tutta Europa, la

cui droga è rappresentata dai capolini, utilizzata principalmente in infusi come blando sedativo (Maugini et al., 2014).

T. minuta, specie appartenente alla sottofamiglia delle Asteroideae, è originaria delle praterie e zone montuose delle regioni meridionali del sud America (McVaugh, 1943, pp. 1853–1855), compresi Ecuador, Argentina, Cile, Bolivia, Perù, Paraguai e regione del Chaco (Ariza Espinar, 1967; Herrera, 1948; Perkins, 1912; Reiche, 1903). Dopo la conquista spagnola è stata introdotta in Europa (Jordano and Ocana, 1955), Asia (Cherepanov, 1981), Africa (Hilliard, 1977), Madagascar (Humbert and others, 1923), India (Raghavendra Rao, 1988), Australia (Webb and others, 1948) e Hawaii (Hosaka et al., 1954). È una pianta erbacea di medie dimensioni, solitamente comprese tra 1 e 2 metri di altezza. Ha foglie di un verde leggermente lucido, pennate. Sono inoltre lanceolate e finemente dentate. Presenta poi piccoli fiori giallo-arancione e proprio da questi deriva il termine “minuta”, date le loro minuscole dimensioni. I fiori sono riuniti in infiorescenze avvolte in brattee (Meshkatsadat et al., 2010). In fine, *T. minuta* è caratterizzata da una forte fragranza dovuta alla presenza dell’olio essenziale.

USI TRADIZIONALI

T. minuta trova diversi utilizzi nella medicina tradizionale. A seconda del Paese i suoi usi possono variare. In Argentina ed Ecuador ed esempio con le foglie viene preparato un decotto per trattare disturbi gastrici ed intestinali (Zardini, 1984). *T. minuta* viene usata anche come condimento soprattutto in Cile ed Argentina molto tipica in insalate di riso e stufati, oppure è utilizzata nella preparazione di bevande rinfrescanti (Parodi, 1959). Sono piuttosto diffuse anche coltivazioni ad uso commerciale, soprattutto per la preparazione di profumi e per l’estrazione dell’olio essenziale, il “Tagete oil”, di cui il Brasile è il primo produttore mondiale (Meshkatsadat et al., 2010).

FITOCHEMICA, FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA

T. minuta è una pianta studiata da tempo ed apprezzata per la sua gradevole fragranza. Proprio per questo il tipo di estratto che solitamente viene preso in esame è l’olio essenziale. Dai vari studi che sono stati condotti si nota che la sua composizione varia molto a seconda delle condizioni climatiche, del periodo ontogenetico in cui viene

prelevato il campione e dal chemotipo, ma la cosa che rimane comune è la massiccia presenza di molecole odorose dalla piacevole fragranza, molto apprezzate dalle industrie di profumi (Meshkatsadat et al., 2010). L'olio essenziale presenta numerosi metaboliti secondari, come monoterpeni aciclici, monociclici e biciclici, sesquiterpeni, flavonoidi, tiofeni e molecole aromatiche, di cui sono state dimostrate attività biologiche. Ad esempio inibiscono lo sviluppo di numerosi microrganismi tra cui funghi filamentosi e batteri patogeni per l'uomo, trematodi, nematodi e vermi cilindrici in generale. Funziona da deterrente per numerosi insetti infestanti con diversi meccanismi d'azione (Meshkatsadat et al., 2010). L'olio essenziale è molto efficace come larvicida verso *Aedes aegypti* (Green et al., 1991; Perich et al., 1995).

Non esistono studi medici dell'olio essenziale di *T. minuta* sull'uomo ma ne sono stati condotti alcuni con altre piante del genere *Tagetes*, mostrando efficacia e risultando sicuri per la salute (Meshkatsadat et al., 2010). Di recente però, da normative introdotte dal Scientific Committee on Consumer safety, è stato imposto l'utilizzo di olio essenziale di *T. minuta* in quantità inferiori allo 0.01% nei prodotti cosmetici e profumi, eccezion fatta per prodotti a risciacquo come shampo e bagno schiuma, a causa della fototossicità riscontrata. È invece totalmente escluso il suo utilizzo in prodotti solari ((SCCS) and Coenraads, 2016).

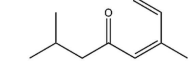
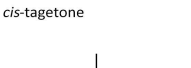
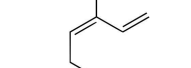
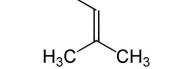
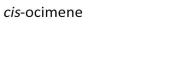
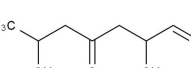
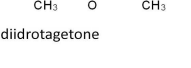
ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

L'estrazione dell'olio essenziale di *T. minuta* è avvenuta tramite distillazione in corrente di vapore utilizzando parametri ottimizzati per avere la massima resa quantitativa e qualitativa. Per ciò che riguarda poi la caratterizzazione chimica dei singoli componenti è stata sviluppata tramite gas cromatografia (GC-FID) e gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). Sono stati identificati 17 composti per un totale del 98.43% sul totale del fitocomplesso. Come mostrato nella tabella che segue, il composto presente con netta abbondanza è il *cis*-tagetone, presente ben al 62.19%, seguono il *cis*-ocimene (20.70%) e il diidrotagetone (8.05%) che assieme al *trans*-tagetone (3.64%) costituiscono quasi il 95% dell'intero fitocomplesso.

Come accennato in precedenza l'olio essenziale di *T. minuta* può variare drasticamente in composizione a seconda delle condizioni ambientali in cui si sviluppa la pianta, oltre che per il periodo di sviluppo della pianta e per i fattori genetici. Da studi in cui sono stati

paragonati campioni provenienti da diverse regioni del mondo sono stati identificati alcuni composti che possono prevalere in concentrazione rispetto ad altri. In diversi casi il composto maggioritario è il *cis*- β -ocimene soprattutto se si considerano i fiori come fonte di estrazione, per quanto riguarda le foglie invece spesso prevale la presenza di diidrotagetone. I vari tagetoni e tagetenoni si trovano in grande percentuale e possono coesistere all'interno dello stesso olio essenziale. Il limonene è un altro composto che può presentarsi in maniera importante come anche il piperitone (Chalchat et al., 1995; Héthélyi et al., 1986; Scrivanti et al., 2003; Zygadlo et al., 1994). Alcuni dei composti maggiormente presenti appena descritti trovano un loro impiego industriale, in particolare nella profumeria e in campo alimentare. Il limonene è usato per la sua fragranza in prodotti artigianali e per la produzione di oli essenziali artificiali, il piperitone è utile per la sintesi di altre fragranze come ad esempio il mentolo e il timolo, i vari tagetoni migliorano l'aroma di alimenti e bevande (Meshkatsadat et al., 2010). Rispetto alla caratterizzazione chimica, il nostro campione di olio essenziale risulta sostanzialmente in linea con le descrizioni presenti in letteratura.

Composizione dell'olio essenziale di *T. minuta*

Nome del composto	Area	KI	
<i>cis</i> -tagetone	62.19	1150	
<i>cis</i> -ocimene	20.70	1032	
Diidrotagetone	8.05	1047	
<i>trans</i> -tagetone	3.64	1143	
β -cariofillene	0.95	1409	
<i>allo</i> -ocimene	0.68	1125	
acido butanoico, 2-metil-, etil estere	0.37	843	
etil isovalerato	0.35	848	
α -bisabolene	0.23	1503	
Biclogermacrene	0.21	1489	
<i>trans</i> -ocimene	0.19	1042	
Epossiocimene	0.18	1128	
α -cariofillene	0.17	1449	
α -felandrene	0.17	1004	
borneolo	0.13	1167	
β -maaliene	0.11	1378	
<i>cis</i> -ocimenone	0.10	1231	
<i>trans</i> -tagetone			
Totale	98.43		

Sezione 2. Risultati e discussione dell'attività biologica valutata in vitro di tutti gli oli essenziali messi a confronto

Attività antiossidante

L'attività antiossidante è la capacità di contrastare il processo di ossidazione generato dai radicali liberi, composti con uno più elettroni spaiati, conosciuti per essere causa di numerose malattie degenerative dovute a processi di mutagenesi, carcinogenesi, disturbi cardiovascolari e invecchiamento (Singh and Singh, 2008). L'azione distruttiva dei radicali liberi è indirizzata soprattutto verso le cellule, in particolare sui lipidi che formano le membrane cellulari, sugli zuccheri e sui fosfati, sulle proteine, sugli enzimi e sul DNA dove alterano le informazioni genetiche. I radicali liberi dell'ossigeno (ROS), come anche le specie reattive dell'azoto (RNS), sono prodotti del normale metabolismo cellulare, ma possono anche essere introdotti per via esogena. ROS e RNS giocano un duplice ruolo, possono essere specie deleterie oppure avere un effetto benefico (Valko et al., 2006). Gli effetti benefici dei radicali liberi dell'ossigeno si manifestano a basse concentrazioni e coinvolgono ruoli fisiologici nella risposta cellulare, per esempio nella difesa contro agenti infettivi, nella funzione di sistemi segnale e nell'induzione della risposta mutagenica. L'effetto dannoso dei radicali liberi, responsabile di un potenziale danno biologico definito stress ossidativo e stress nitrosattivo (Ridnour et al., 2005), si verifica quando da un lato c'è una sovrapproduzione di ROS/RNS e dall'altro una deficienza di antiossidanti enzimatici e non-enzimatici. Il bilancio tra gli effetti benefici e dannosi dei radicali liberi è ottenuto mediante un processo chiamato "regolazione redox", il quale è volto a mantenere l'omeostasi redox (Dröge, 2002). Gli antiossidanti sono composti che agiscono neutralizzando i radicali liberi agendo su uno dei tre step del processo ossidativo, ossia iniziazione, propagazione o terminazione (Cui et al., 2004). Gli antiossidanti sono importanti anche dal punto di vista alimentare poiché si presentano naturalmente in molti cibi, preservando o proteggendo dal danno ossidativo, evitando cambiamenti deleteri e perdita del valore commerciale e nutrizionale. Esistono molti oli essenziali che presentano un'attività antiossidante, come l'olio essenziale di timo, origano, rosmarino, basilico, bergamotto, cannella, chiodi di garofano, tea tree, melissa, menta, salvia e cumino nero. Tale azione protettiva è esercitata da alcuni loro costituenti, tra cui timolo,

carvacrolo, 1,8-cineolo, citrale, citronellale, terpinene, timochinone, agenti molto efficaci nel neutralizzare i radicali liberi.

Gli antiossidanti possono essere classificati in base al loro meccanismo d'azione. Si distinguono antiossidanti preventivi, in grado di inibire o contrastare la formazione dei radicali anticipando il fenomeno ossidativo nella fase di "iniziazione", e antiossidanti "chain-breaking", in grado di impedire la propagazione ad uno o più livelli intrappolando i radicali liberi che si formano durante la reazione di ossidazione. Gli antiossidanti preventivi hanno il vantaggio di avere una velocità di reazione maggiore rispetto ai radicali propagatori di catena con il loro substrato; originare dei radicali stabili e agire per trasferimento di idrogeno oppure elettronico (Giovannini et al., 2006).

In seguito all'elevata importanza degli antiossidanti, risulta necessaria la presenza di metodi atti alla loro rilevazione. Uno dei metodi più utilizzati è il "DPPH assay", messo a punto da Blois (1958), con lo scopo di determinare l'attività antiossidante considerando il radicale libero stabile 1,1-difenil-2-picril-idrazile (DPPH). Il saggio si basa sulla rilevazione della capacità di neutralizzare il radicale DPPH da parte di eventuali composti antiossidanti. Tale metodo è rapido, semplice, economico e ampiamente usato per misurare l'abilità dei composti di agire come radicali liberi o donatori di idrogeno e si presta all'esame sia di sostanze idrofile che lipofile (Prior et al., 2005). Per la valutazione dell'attività antiossidante degli oli essenziali presi in considerazione in questa tesi è stata utilizzata una variante del metodo classico del "DPPH assay" che prevede l'utilizzo di micropiastre da 96 pozzetti per un'analisi ancora più rapida e più precisa (Cheng et al., 2006; Kedare and Singh, 2011).

Nella tabella che segue sono riportati i dati di attività antiossidante degli oli essenziali sia in termini di IC_{50} (quantità di campione necessaria ad eliminare il 50% di DPPH radicale) che in termini di millimoli equivalenti di trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) per grammo di campione (TEAC).

Olio essenziale	IC ₅₀ (µg/mL)	mmol TE/g
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	2663.6	4.31
<i>Dacryodes peruviana</i>	3348.8	3.43
<i>Piper carpunya</i>	159.8	71.88
<i>Schinus molle</i>	34641.4	0.34
<i>Tagetes minuta</i>	908.7	12.86
<i>Cymbopogon citratus</i>	4469.0	4.61
<i>Ocimum micranthum</i>	10.8	1386.01
<i>Ocotea quixos</i>	2373	4.80
<i>Endlicheria klugii</i>	56178.7	0.17
<i>Ocotea cernua</i>	37552.1	0.30
<i>Thymus vulgaris</i>	450.4	110.88
Timolo	3348.8	3.43
Trolox	11.5	

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

Sono stati utilizzati tre diversi controlli positivi, il trolox, un forte antiossidante di sintesi, l'olio essenziale di *Thymus vulgaris* (chemotipo timolo), noto in letteratura per la sua forte attività antiossidante, ed il timolo, componente maggioritario dell'olio essenziale di timo. L'olio essenziale di *O. micranthum* è risultato il più attivo in assoluto, evidenziando un'attività paragonabile a quella del trolox confermando altri studi condotti precedentemente all'interno dei nostri laboratori (Sacchetti et al., 2004). Anche *P. carpunya* ha mostrato una buona capacità antiossidante, oltre il doppio rispetto al controllo di *T. vulgaris*, dato mai riportato in letteratura. Degno di nota è anche *T. minuta*, il cui risultato è in linea con gli studi di Ruiz (2011), mentre risulta molto meno attivo rispetto agli esperimenti condotti da Ali (2014) dove però la composizione chimica dell'olio essenziale è sensibilmente differente. Risultano molto interessanti i dati ottenuti per *O. micranthum*, perché questa sua capacità di eliminare con tanta efficienza forme di radicali liberi potrebbe essere utile ed efficiente anche per la protezione nell'uomo nei confronti di danni da stress ossidativo, rendendolo particolarmente interessante sia in campo cosmetico che fitoterapico che nutraceutico.

Attività antimicrobica

Attività antibatterica

L'attività antimicrobica, valutata *in vitro*, varia da un microrganismo all'altro e da un olio essenziale all'altro, ma è sempre dose-dipendente. L'efficacia degli oli essenziali nel contrastare la proliferazione di microrganismi è direttamente proporzionale all'eventuale tossicità (basso indice terapeutico) per cui è necessario avere una minima concentrazione inibente (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) che sia più bassa possibile per evitare effetti collaterali. Il meccanismo d'azione degli oli essenziali nei riguardi dei microrganismi è complesso e ancora non è stato ben chiarito perché dipende da vari fattori, primo fra tutti è ovviamente la composizione chimica e la eventuale sinergia d'azione tra i diversi composti, poi dal tipo di microrganismi considerato, principalmente legato alla struttura della loro parete cellulare.

A causa dell'elevato numero di componenti presenti negli oli essenziali (maggioritari o anche presenti in piccole quantità), è molto probabile che la loro attività antimicrobica non sia dovuta ad un unico meccanismo, ma a diverse modalità di azione a livello cellulare. L'idrofobicità consente agli oli essenziali di ripartirsi tra i lipidi della membrana cellulare batterica o fungina, alterando le strutture cellulari e rendendole così più permeabili. Le perdite eccessive di ioni e molecole dalla cellula microbica condurranno poi inevitabilmente alla morte. I batteri Gram positivi generalmente risultano essere più sensibili rispetto ai batteri Gram negativi, questo trova conferma anche nei nostri dati, come mostrato nella tabella seguente.

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC, µg/mL)									
	EC	EF	LG	ML	KO	PA	PV	SE	SM
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	> 2000	1000	> 2000	1000	2000	2000	2000	> 2000	> 2000
<i>Dacryodes peruviana</i>	> 2000	500	2000	500	2000	2000	1000	> 2000	> 2000
<i>Piper carpunya</i>	> 2000	2000	> 2000	2000	2000	2000	2000	> 2000	> 2000
<i>Schinus molle</i>	> 2000	500	1000	250	500	250	500	2000	2000
<i>Tagetes minuta</i>	> 2000	2000	> 2000	2000	>2000	500	2000	> 2000	> 2000
<i>Cymbopogon citratus</i>	2000	1000	> 2000	1000	2000	> 2000	500	1000	1000
<i>Ocimum micranthum</i>	> 2000	125	> 2000	250	500	> 2000	125	2000	1000
<i>Ocotea quixos</i>	> 2000	125	> 2000	250	500	> 2000	125	2000	1000
<i>Endlicheria klugii</i>	> 2000	2000	> 2000	2000	2000	> 2000	1000	> 2000	> 2000
<i>Ocotea cernua</i>	> 2000	1000	> 2000	2000	1000	> 2000	2000	> 2000	> 2000

EC = *Escherichia coli*; EF = *Enterococcus faecalis*; LG = *Listeria grayi*; mL = *Micrococcus luteus*; KO = *Klebsiella oxytoca*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; PV = *Proteus vulgaris*; SE = *Staphylococcus epidermidis*; SM = *Streptococcus mutans*

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

Considerando come “forte attività” antifungina i valori di MIC \leq 500 µg/mL (Baser and Buchbauer, 2015) i due oli essenziali risultati più efficaci sono stati quelli di *O. micranthum* e *O. quixos*, mostrando attività tra loro sovrapponibili. Le MIC migliori si sono ottenute per *E. faecalis* e *P. vulgaris* (MIC = 125 µg/mL), due batteri che in condizioni normali sono commensali del tratto intestinale ma possono trasformarsi in parassiti infestando vari distretti del corpo umano con particolare predilezione per le vie urinarie. Una buona attività è stata riscontrata anche su *M. luteus* (MIC = 250 µg/mL), batterio Gram positivo ubiquitario, presente anche nella flora cutanea dell'uomo, che in condizioni di immunodeficienza può dar luogo ad infezioni delle vie respiratorie. Infine, questi due oli essenziali hanno mostrato un'attività interessante anche su *K. oxytoca* (MIC = 500 µg/mL), presente normalmente nella flora intestinale ma è causa frequente di pericolose infezioni nosocomiali come polmoniti, batteriemia o infezioni dell'apparato urinario. L'efficacia di questi due oli essenziali è probabilmente dovuta in buona misura alla presenza di eugenolo e cinnamaldeide e derivati, già noti per le loro proprietà antibatteriche (Ali et al., 2005). Un altro olio essenziale dimostratosi efficace su diversi dei batteri considerati è stato quello di *S. molle*, dove ha avuto forte attività su *E. faecalis*, *M. luteus*, *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* e *P. vulgaris*. Infine, da citare anche l'olio essenziale di *D. peruviana* nei confronti di *E. faecalis* e *M. luteus* e l'olio essenziale di *T. minuta* verso *P. aeruginosa*.

Attività antifungina

Come per i batteri, gli oli essenziali sono spesso efficaci anche nella lotta contro i funghi, come lieviti patogeni, dermatofiti e funghi fitopatogeni. Segni visibili della loro azione possono essere osservati con cambiamenti morfologici e funzionali micro e macroscopici. La maggior parte degli studi sul meccanismo di azione antifungina degli oli essenziali sono stati condotti su *Candida albicans*, patogeno fungino umano, responsabile di patologie mucocutanee e, in alcuni casi, di gravi infezioni sistemiche, soprattutto in pazienti immunocompromessi nosocomiali. Gli oli essenziali, data la natura principalmente lipofila dei costituenti, sembrano agire prevalentemente con cambiamenti strutturali e funzionali delle membrane fungine, distruggendone la forte impermeabilità a protoni e grossi ioni e conseguente dispersione del citoplasma e alterazione degli enzimi cellulari, fino ad arrivare alla morte cellulare (Stringaro et al., 2014). Si assiste sovente ad un blocco della sintesi delle membrane, inibizione della germinazione, della riproduzione e della respirazione cellulare. Di notevole interesse sono anche gli studi condotti sui funghi dermatofiti, dove oli essenziali in grado di inibirne la crescita potrebbero essere utilizzati in prodotti ad uso topico. In campo agrario, infine, lo studio di oli essenziali efficaci sui funghi fitopatogeni trova la sua utilità nello sviluppo di fitofarmaci con minore impatto ambientale, è infatti sempre più ricercato l'utilizzo di sostanze naturali per la lotta contro i parassiti a beneficio di trattamenti integrati, se non totalmente organici.

In questo studio è stata infatti testata l'attività degli oli essenziali anche su tre ceppi di funghi fitopatogeni di notevole interesse per il nostro territorio, quali *Botrytis cinerea* (responsabile del marciume grigio del pero, della vite e di numerose altre piante da frutto), *Fusarium oxysporum* (responsabile del marciume radicale del pomodoro) e *Pythium ultimum* (causa di marciume radicale ed avvizzimento di numerose coltivazioni, tra cui cavolo, carota, cetriolo, melone, ecc.) e due ceppi di funghi dermatofiti, *Trichophyton mentagrophytes* (causa dermatiti preferenzialmente in viso e sugli arti, onicomicosi, oppure può portare alla comparsa di ulcere profonde se trascurato) e *Nannizzia gypsea* (nell'uomo è causa di *tinea corporis*, *tinea capitis* ed onicomicosi).

I risultati migliori sono stati ottenuti nei dermatofiti, mostratisi molto più sensibili rispetto ai fitopatogeni. Alle concentrazioni utilizzate nel test, abbondantemente inferiori al limite consentito per le normali formulazioni, in diversi casi si è osservata un'inibizione totale di crescita. Gli oli essenziali di *C. citratus* e *O. quixos* hanno mostrato il 100% di inibizione di

crescita su entrambi i dermatofiti, mentre quelli di *C. ambrosioides*, *P. carpunya*, *T. minuta* e *O. micranthum* hanno inibito totalmente la crescita soltanto di *N. gypsea* (vedi tabella che segue). Questo a sottolineare la diversa specificità di azione che presentano gli oli essenziali in relazione ad una differente specie di microrganismo. Tra i fitopatogeni il risultato migliore l'ha dato l'olio essenziale di *O. quixos* nei confronti di *B. cinerea*, con un'inibizione di crescita dell'83.6%.

PERCENTUALE DI INIBIZIONE DI CRESCITA DIAMETRALE(%)					
Olio essenziale	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Nannizzia gypsea</i>
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	34.5 ± 2.8	20.4 ± 2.4	43.9 ± 2.5	58.4 ± 2.8	100.0 ± 0.0
<i>Dacryodes peruviana</i>	0.9 ± 4.1	17.3 ± 3.2	10.1 ± 4.6	0.0 ± 5.1	0.0 ± 3.6
<i>Piper carpunya</i>	52.6 ± 3.0	28.6 ± 3.0	56.1 ± 2.9	14.3 ± 0.7	100.0 ± 0.0
<i>Schinus molle</i>	0.9 ± 5.2	14.3 ± 3.9	22.3 ± 3.0	7.8 ± 4.2	18.2 ± 2.9
<i>Tagetes minuta</i>	37.1 ± 2.0	19.4 ± 3.2	18.0 ± 3.1	7.8 ± 4.4	100.0 ± 0.0
<i>Cymbopogon citratus</i>	30.2 ± 3.2	62.2 ± 2.3	81.3 ± 1.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>Ocimum micranthum</i>	73.3 ± 1.8	74.5 ± 1.5	87.1 ± 1.8	87.0 ± 1.6	100.0 ± 0.0
<i>Ocotea quixos</i>	83.6 ± 1.1	35.7 ± 2.5	39.6 ± 2.6	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
<i>Endlicheria klugii</i>	15.8 ± 4.6	28.1 ± 3.5	44.3 ± 2.4	6.5 ± 3.3	43.4 ± 3.2
<i>Ocotea cernua</i>	20.7 ± 3.9	31.0 ± 3.1	18.9 ± 3.7	10.0 ± 3.4	32.4 ± 2.8

Dati espressi in percentuale di inibizione di crescita diametrale rispetto al controllo negativo e relativa deviazione standard.

Attività anticandida ed espressioni sinergiche di bioattività

In seguito all'uso indiscriminato degli antibiotici in ambito clinico, veterinario e agricolo, è emerso sempre più evidente il fenomeno della farmaco-resistenza. Ciò ha portato allo sviluppo di microrganismi patogeni resistenti alla gran parte degli antibiotici disponibili. Tale grave problematica ha evidenziato la necessità di trovare nuovi agenti antimicrobici che abbiano fondamentalmente diverse modalità di azione rispetto a quella degli antibiotici tradizionali. Tra i candidati promettenti nella prevenzione e nel trattamento di diverse malattie infettive vi sono i prodotti di origine naturale, per la loro esigua tossicità, biodegradabilità e il loro ampio spettro d'azione rispetto alle sostanze antimicrobiche di sintesi. Numerosi studi sperimentali condotti *in vitro* hanno dimostrato l'efficacia di un gran numero di oli essenziali in questo senso. L'uso degli oli essenziali e dei loro componenti in combinazione con antibiotici di sintesi sono risultati promettenti per poter limitare l'uso di questi ultimi, con conseguenti minori effetti indesiderati per il paziente oppure potrebbero rappresentare una nuova frontiera per combattere i ceppi

multiresistenti ai farmaci. Dunque essi potrebbero costituire una possibile integrazione e, in alcuni casi estremi, un'alternativa all'antibiotico-terapia, in particolare nei casi refrattari alla terapia convenzionale (Palaniappan and Holley, 2010; Yap et al., 2013). Presumibilmente, infatti, sarà più difficile per i batteri sviluppare resistenza verso le miscele terpeniche degli oli essenziali, piuttosto che rispetto ai singoli antibiotici generalmente costituiti da una singola molecola. Ulteriori studi si concentrano anche sul ruolo sinergico tra oli essenziali e farmaci poichè potrebbero anche essere utili per migliorare l'indice terapeutico di alcuni farmaci. Un campo di ricerca molto battuto riguarda le infezioni di vari ceppi di *Candida* nell'uomo; questo microrganismo è infatti una delle principali minacce per l'uomo in caso di abbassamento delle difese immunitarie, da semplice commensale si trasforma in patogeno; una casistica molto diffusa la si riscontra ad esempio nei pazienti affetti da HIV. Durante il corso di questo dottorato ci si è interessati di studiare possibili effetti sinergici tra gli oli essenziali e il fluconazolo, uno dei principali farmaci utilizzato per la cura di candidosi, testando l'efficacia di miscele olio essenziale + farmaco e diversi dosaggi a differenti rapporti reciproci. Sono stati considerati tre diversi ceppi di candida: un ceppo commerciale di *Candida albicans* (ATCC 24433) sensibile al fluconazolo, un isolato clinico di *Candida glabrata*, reso resistente al fluconazolo (FLU 43976) ed un ceppo di *Candida albicans* isolato da un paziente affetto da AIDS, anch'esso sensibile al farmaco (AIDS 6). Come parametro di valutazione del sinergismo è stato utilizzato l'indice di concentrazione inibitoria frazionata (FIC_{index}) e sono stati considerati sinergici i valori inferiori o uguali a 0.5 (Meletiadis et al., 2010). Nelle due tabelle che seguono sono riassunti rispettivamente i risultati ottenuti dall'attività antifungina degli oli essenziali e fluconazolo testati singolarmente e dalle loro attività testate in associazione.

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION e MINIMUM FUNGICIDAL CONCENTRATION (MIC E MFC, µg/mL)						
	AIDS 6		FLU 43976		ATCC 24433	
Olio essenziale	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	391	391	391	391	98	195
<i>Dacryodes peruviana</i>	3135	3135	3135	3135	> 6250	> 6250
<i>Piper carpubya</i>	1563	1563	1563	1563	781	1563
<i>Schinus molle</i>	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250
<i>Tagetes minuta</i>	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250
<i>Cymbopogon citratus</i>	1563	1563	1563	1563	3135	3135
<i>Ocimum micranthum</i>	195	195	195	195	195	195
<i>Ocotea quixos</i>	195	195	195	195	195	391
<i>Endlicheria klugii</i>	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250
<i>Ocotea cernua</i>	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250	> 6250
Fluconazolo	64	64	> 64	> 64	16	16

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION INDEX (FIC _{index})			
Olio essenziale	AIDS 6	FLU 43976	ATCC 24433
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	1.031	1.016	2.001
<i>Dacryodes peruviana</i>	1.016	1.063	0.563
<i>Piper carpubya</i>	0.281	0.375	1.063
<i>Schinus molle</i>	0.141	0.516	-
<i>Tagetes minuta</i>	-	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	1.031	0.562	1.004
<i>Ocotea quixos</i>	2.003	1.125	2.004
<i>Cymbopogon citratus</i>	0.750	0.750	1.063
<i>Endlicheria klugii</i>	-	-	-
<i>Ocotea cernua</i>	-	-	-

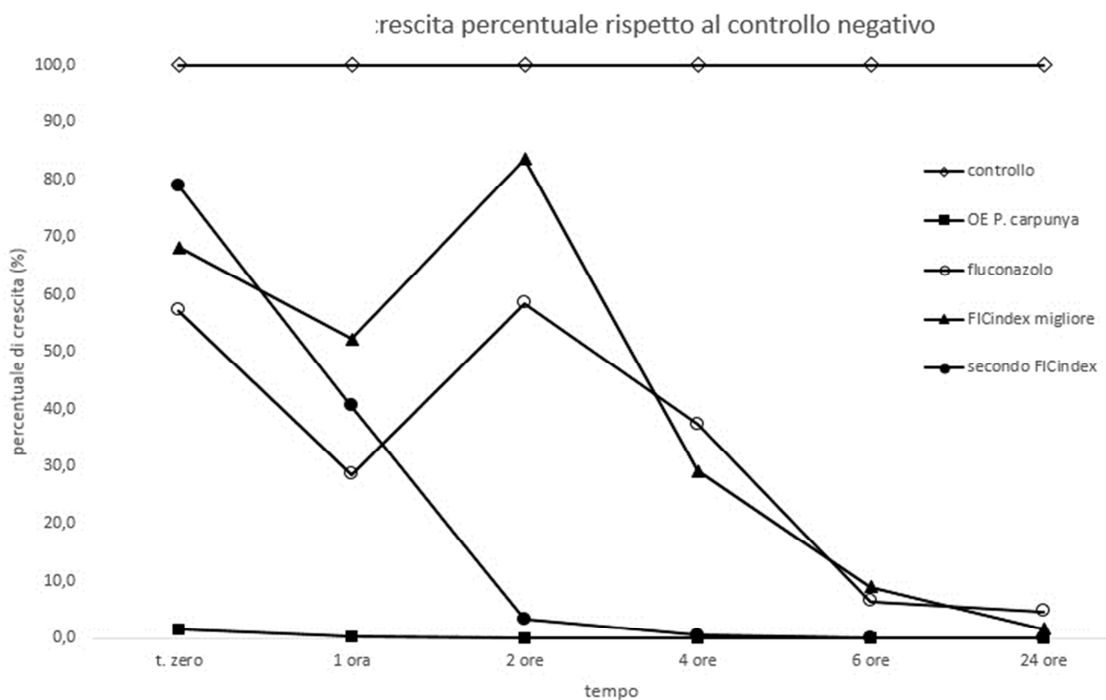
*NOTA: alcuni dati non sono riportati perché non c'è stata inibizione di crescita per nessuna delle combinazioni di olio essenziale e farmaco testate

**NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

Gli oli essenziali di *O. micranthum* e *O. quixos*, come si era verificato nell'attività antibatterica, si sono confermati i più attivi con risultati quasi sovrapponibili. Hanno mostrato una forte attività antifungina per tutti e tre i ceppi di candida studiati, con un valore di MIC pari a 195 µg/mL. Sebbene dello stesso genere, *O. cernua* non ha mostrato alcuna attività alle concentrazioni testate come pure *S. molle*, *T. minuta* ed *E. klugii*. Una forte attività si è riscontrata anche in *C. ambrosioides* (MIC = 391µg/mL nei ceppi clinici e

MIC = 98 µg/mL nel ceppo commerciale). Considerando ora i dati di attività in associazione sono state trovate tre combinazioni che hanno mostrato sinergismo, la migliore riguarda *S. molle* verso AIDS 6, il ceppo clinico sensibile al fluconazolo, con un FIC_{index} di 1.141 (data da 2 µg/mL di fluconazolo e 1563 µg/mL di olio essenziale). Le altre due combinazioni sinergiche riguardano entrambi *P. carpunya*, la prima sul ceppo AIDS 6 con un FIC_{index} di 0.281 e la seconda sul ceppo resistente FLU 43976 con un FIC_{index} di 0.375. In questo ultimo caso la miscela sinergica era composta da 391 µg/mL di olio essenziale (un quarto rispetto al valore di MIC) e 4 µg/mL di fluconazolo, come se l'effetto dell'olio essenziale avesse reso nuovamente sensibile il microorganismo nei confronti dell'antibiotico.

Particolarmente interessante è sembrata l'attività sinergica di *P. carpunya*, quindi è stato deciso di approfondire e confermare il dato con migliore FIC_{index}, ottenuto sul ceppo clinico AIDS 6, seguendo l'inibizione di crescita nel tempo mediante un esperimento di time killing. Nell'arco di 24 ore è stata monitorata la crescita di quattro campioni di *C. albicans*, il primo messo a contatto con il solo olio essenziale alla concentrazione di MIC, il secondo con il solo fluconazolo alla concentrazione di MIC e gli altri due con una miscela di entrambe le sostanze rispettivamente alle concentrazioni che avevano dato i due risultati migliori di FIC_{index}. Tutti i dati di crescita cellulare sono stati rapportati al controllo negativo in cui non era presente nessuna sostanza a contatto con *C. albicans* (Vedi l'andamento nel grafico che segue).



Dati di

percentuale di crescita in relazione al controllo negativo (considerato come 100%).

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

Trascorse le 24 ore del test, nei campioni con le sostanze alle concentrazioni del migliore FIC_{index} , così come per tutti gli altri campioni, si è osservata la quasi totale inibizione di crescita di *C. albicans*. Questo conferma il sinergismo e l'efficacia della miscela olio essenziale/farmaco selezionata dal precedente test.

Sebbene gli oli essenziali di *P. carpunya* e *S. molle* non avessero mostrato forti attività se testati singolarmente, sono stati rivalutati quando esaminati in associazione con il fluconazolo, mostrando sinergia con questo farmaco e, nel caso di *P. carpunya*, mostrandosi in grado di restituire efficacia al fluconazolo anche nel ceppo resistente. Questo fattore potrebbe avere spiegazione in una possibile alterazione della permeabilità delle membrane di candida facilitando l'ingresso e l'azione del fluconazolo. Si conferma quindi quanto potrebbe essere interessante l'utilizzo degli oli essenziali in abbinamento ai farmaci di sintesi nelle terapie antibiotiche.

Attività antinfiammatoria

La ricerca di sostanze naturali in grado di controllare la risposta infiammatoria sta acquisendo sempre maggiore interesse. Un esempio si trova nel campo dell'aromaterapia, dove vengono utilizzati gli oli essenziali per la cura di alcuni disturbi di carattere infiammatorio. Gli oli essenziali sono costituiti prevalentemente da molecole lipofile a basso peso molecolare in grado quindi di oltrepassare la barriera epidermica e raggiungere eventuali tessuti infiammati sottostanti su cui svolgere la propria azione.

La risposta infiammatoria a meccanismi a cascata piuttosto complessi, un ruolo chiave è giocato dall'acido arachidonico e dagli enzimi che lo vedono come substrato a monte di tutto il processo, ossia le ciclossigenasi (COX), enzimi che portano alla produzione di prostaglandine (PG), prostacicline (PC), trombossani (TX) e le lipossigenasi (LOX), enzimi che portano alla produzione dei leucotrieni (LT). In questo studio ci si è concentrati su una delle reazioni enzimatiche che vedono coinvolta la catalisi dell'acido arachidonico, precisamente quella attuata dall'enzima 5-lipossigenasi (5-LOX). Questo è un enzima dal ruolo chiave, noto per catalizzare l'ossidazione di acidi grassi insaturi contenenti struttura di 1-4 pentadiene. Il substrato naturale di questo enzima è l'acido arachidonico ma viene accettato senza problemi anche l'acido linoleico, molto più facile da monitorare. Nei test presentati infatti si è osservata la scomparsa di acido linoleico tramite letture

spettrofotometriche (Baylac and Racine, 2003). La 5-LOX umana è stata sostituita da una analoga ricavata dalla soia perché reperibile molto più facilmente ed è stato dimostrato sperimentalmente avere un'azione del tutto simile a quella dell'uomo (Baylac and Racine, 2003).

Di ciascun olio essenziale è stata calcolata l'IC₅₀ seguendo la cinetica di reazione per assicurare la linearità dell'andamento e testando diverse concentrazioni. Come controllo positivo è stato scelto l'acido nordiidroguaietico (NDGA) come previsto da letteratura (Baylac and Racine, 2003). Nella tabella che segue sono mostrati i valori ottenuti.

VALORI DI IC ₅₀ (µg/mL)	
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	14.5
<i>Dacryodes peruviana</i>	88.3
<i>Piper carpunya</i>	62.5
<i>Schinus molle</i>	> 100.0
<i>Tagetes minuta</i>	> 100.0
<i>Ocimum micranthum</i>	> 100.0
<i>Ocotea quixos</i>	92.4
<i>Cymbopogon citratus</i>	> 100.0
<i>Endlicheria klugii</i>	> 100.0
<i>Ocotea cernua</i>	> 100.0
NDGA	11.8

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

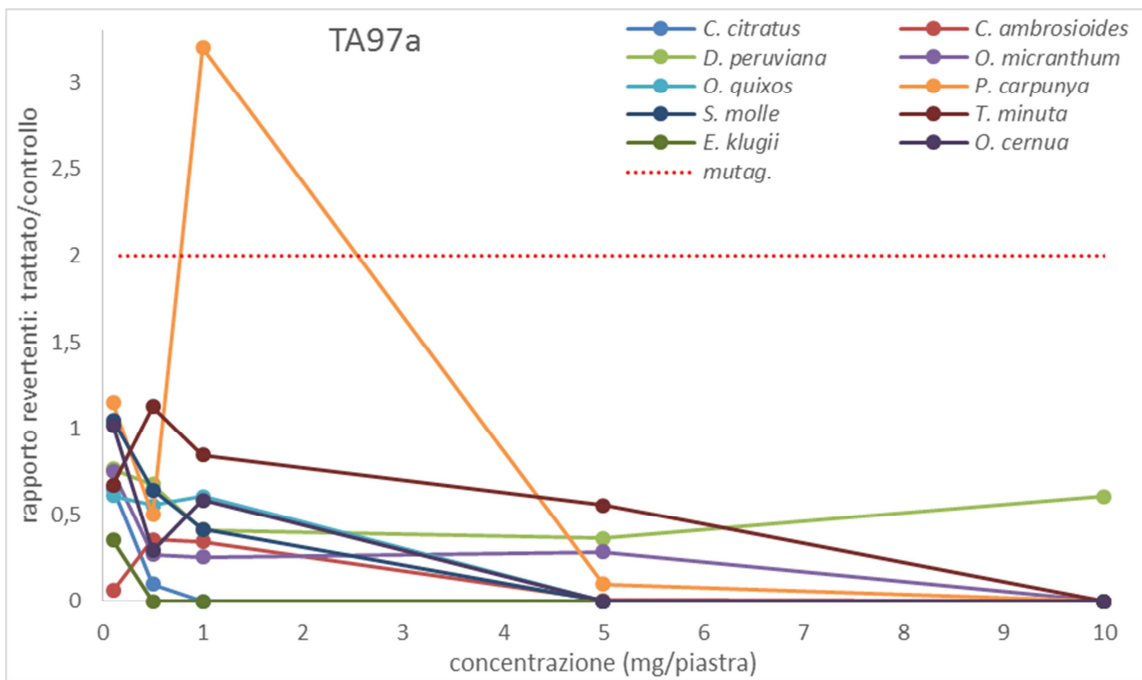
La maggior parte degli oli essenziali ha mostrato un'attività blanda o nulla, l'unico degno di nota è *C. ambrosioides* che si avvicina al controllo positivo. Per valori superiori a 100 µg/mL l'olio essenziale viene considerato non attivo (Baylac and Racine, 2003). Il metodo utilizzato non è l'unico per saggiare l'attività antinfiammatoria ed è stato utilizzato come screening indicativo con eventualità di approfondimento dei dati più interessanti.

Attività mutagena

Tutte le attività viste fino ad ora riguardavano l'efficacia degli oli essenziali, con l'attività mutagena si è voluta verificare la loro sicurezza genotossica. È stato utilizzato un test molto diffuso ed ampiamente consolidato, il test di Ames. Esso prevede l'utilizzo di ceppi

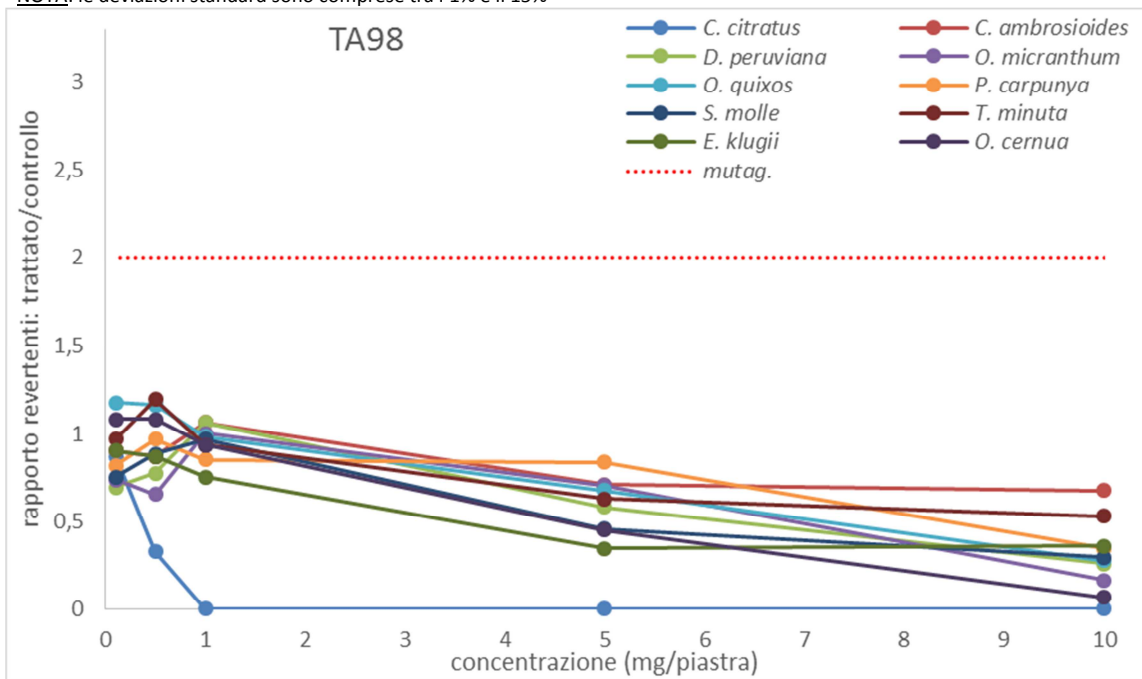
di *Salmonella typhimurium* ingegnerizzata, resa auxotrofa per istidina e biotina e molto suscettibile a potenziali sostanze mutagene. Il sistema di interpretazione dei risultati è piuttosto semplice, si basa sul fatto che per ogni ceppo si verifica la reversione della mutazione che lo rende auxotrofo per l'istidina e la biotina ripristinando lo stato *wild type* con una frequenza caratteristica. Ponendo questi batteri a contatto con la sostanza da saggiare e facendoli crescere su un terreno solido privo di istidina e biotina si assisterà allo sviluppo di colonie derivanti esclusivamente dai batteri revertenti. Viene assunto che se il numero di revertenti che si contano resta in un range che non supera almeno del doppio quello dei revertenti riscontrati nel controllo negativo (in cui si aggiunge soltanto il solvente utilizzato per dissolvere le sostanze da testare) la sostanza è considerata sicura, se invece il numero di revertenti è superiore la sostanza viene considerata un potenziale mutageno (Maron and Ames, 1983). È importante osservare anche un andamento dose dipendente per escludere falsi positivi, come ad esempio dei picchi isolati di revertenti, denominati dallo stesso Ames "spikes". Esistono numerosi ceppi di salmonella realizzati per i test di attività mutagena, ciascuno con meccanismo e sensibilità differenti. Noi abbiamo deciso di testare gli oli essenziali su 4 diversi ceppi, in grado di rilevare la quasi totalità di potenziali mutageni, sono quelli più stabili e maggiormente utilizzati in questo tipo di test: TA97a, TA98, TA100 e TA1535. Per ciò che riguarda TA97a e TA98 sono in grado di rilevare principalmente le mutazioni che causano frameshift, quindi delezioni o inserzioni a livello del genoma, cambia solo il sito di mutazione, il che li rende complementari per la maggior sensibilità ad alcune sostanze piuttosto che altre; mentre TA1535 e TA100 rilevano principalmente le sostanze in grado di causare una sostituzione di paia di basi ed hanno tra loro un diverso sistema di riparazione del genoma, quello di TA1535 è meno efficiente, quindi più suscettibile alle mutazioni (Thorne et al., 2015).

Di seguito i grafici con i risultati ottenuti per ciascun olio essenziale, suddivisi per diversi ceppi di *S. typhimurium*.



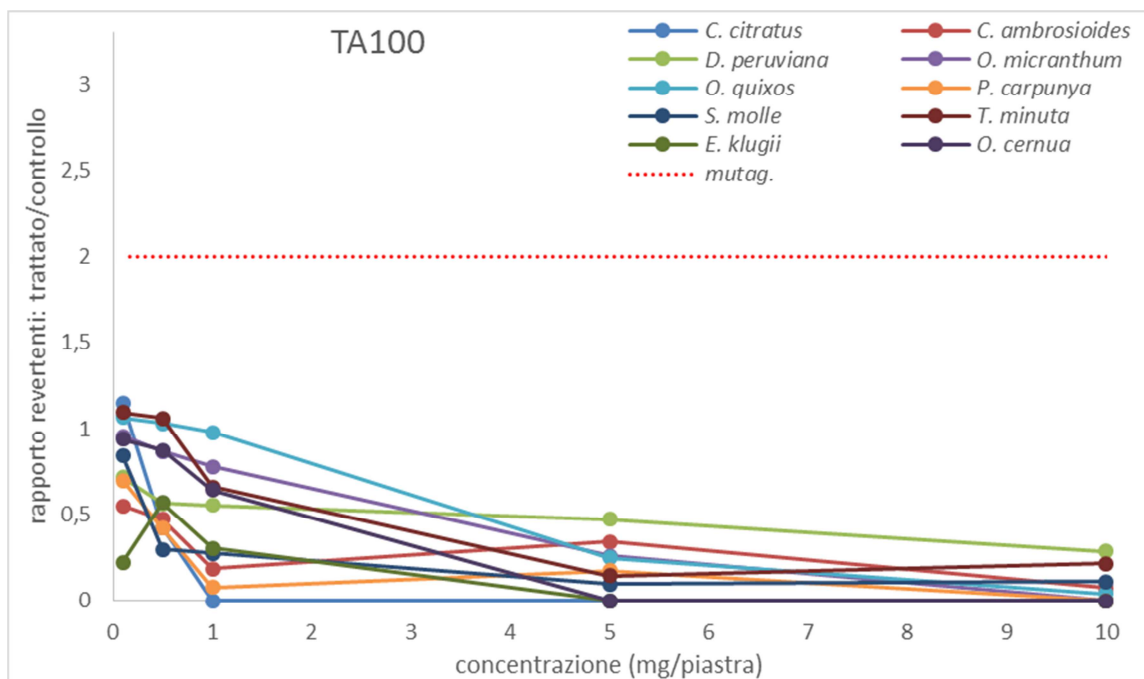
Andamento del numero di colonie di revertenti in relazione al controllo negativo. La linea rossa tratteggiata rappresenta la soglia per la valutazione dei potenziali mutageni.

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%



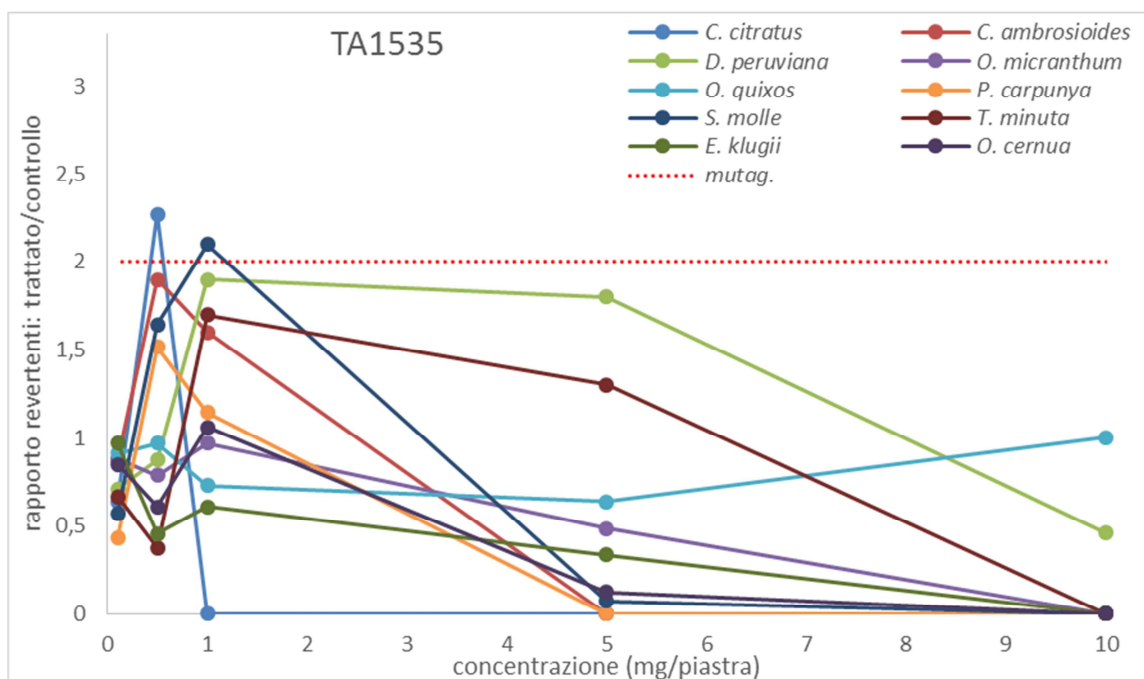
Andamento del numero di colonie di revertenti in relazione al controllo negativo. La linea rossa tratteggiata rappresenta la soglia per la valutazione dei potenziali mutageni.

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%



Andamento del numero di colonie di revertenti in relazione al controllo negativo. La linea rossa tratteggiata rappresenta la soglia per la valutazione dei potenziali mutageni.

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%



Andamento del numero di colonie di revertenti in relazione al controllo negativo. La linea rossa tratteggiata rappresenta la soglia per la valutazione dei potenziali mutageni.

*NOTA: le deviazioni standard sono comprese tra l'1% e il 15%

Dai valori ottenuti si può affermare che nessuno degli oli essenziali testati ha mostrato potenziale attività mutagenica. Si sono osservati solamente tre "spikes" in *P. carpunya* per TA97a e in *O. quixos* e *S. molle* per TA1535, ma visto il loro carattere isolato, come esplicitato dal protocollo, se ne esclude l'ipotesi di mutagenicità, sono da considerarsi falsi positivi. Si osserva talvolta un effetto citotossico alle concentrazioni più alte, in

particolare nel ceppo TA1535, questo da attribuirsi ad un'attività antibatterica esercitata dagli oli essenziali, in accordo con i dati visti nei test di attività antimicrobica e in linea con quelli di letteratura.

Formulazione cosmetica

A conclusione del lavoro svolto durante questo periodo di dottorato, cercando di finalizzare a livello applicativo i risultati almeno in un contesto preliminare, dal momento che gli oli essenziali hanno da sempre rilevanza d'uso in un contesto cosmetico e mettendo a frutto l'opportunità dell'esperienza e della collaborazione con la fondazione Chankuap, si è deciso di realizzare una formulazione per una crema includendovi l'olio essenziale che ha dato i risultati migliori in termini di bioattività. È stato selezionato per questa applicazione pilota l'olio essenziale di *O. micranthum* data la rilevante attività antiossidante ed antimicrobica dimostrata *in vitro* (vedi sezioni dedicate).

Per la realizzazione della crema si è partiti da una base caratterizzata da componenti utilizzati ormai comunemente dalla fondazione Chankuap per i propri prodotti, frutto anche della collaborazione prolungata con l'Università di Ferrara, in particolare grazie alle attività coordinate dal Centro di Cooperazione allo Sviluppo a cui il laboratorio di Biologia farmaceutica ha sempre attivamente fornito le proprie competenze. Relativamente a questa fase di preparazione, è stato gentilmente reso disponibile il protocollo che però per ragioni di riservatezza non può essere esposto in questa tesi. A questa base è stato aggiunto l'olio essenziale di *O. micranthum* allo 0.2%, concentrazione comunemente utilizzata per analoghi prodotti. In ragione di valutazioni preliminari e soggettive, la consistenza e la stabilità della crema si sono mantenute. La fragranza dovuta all'olio essenziale, seppure delicata, non è risultata però gradevole e sufficientemente adeguata per un prodotto destinato alla cura della persona. Per correggere il profumo e renderlo più gradevole, dallo stesso lotto sono state create altre analoghe creme alle quali, oltre all'olio essenziale di *O. micranthum* come componente funzionale, si sono aggiunti ulteriori oli essenziali secondo lo schema seguente, con il preciso obiettivo di migliorare la gradevolezza cosmetica del prodotto:

- A. OE *O. micranthum* 0.2%
- B. OE *O. micranthum* 0.2% + OE *C. citratus* 0.2%
- C. OE *O. micranthum* 0.2% + OE *C. citratus* 0.4%
- D. OE *O. micranthum* 0.2% + OE di mandarino 0.2%
- E. OE *O. micranthum* 0.2% + OE di arancio 0.2%

Successivamente, un gruppo di volontari (10 persone) è stato sottoposto ad un “panel test” per verificare l’indice di gradimento dei prodotti e per stabilire quale tra questi fosse il più adeguato dal punto di vista della fragranza, dal punto di vista tattile e della spalmabilità, nonché dalla sensazione che lasciava sulla pelle. Il questionario sottoposto ai volontari presentava domande standardizzate (protocollo fondazione Fondazione Chankuap) con lo scopo di avere un’indicazione preliminare in vista della realizzazione di un prodotto con certificazione Ecocert (la base di partenza per le formulazioni ne rispetta già gli standard richiesti). Ecocert è un organismo di certificazione per lo sviluppo sostenibile, fondato in Francia nel 1991 da un gruppo di ingegneri agronomi con l’obiettivo di sviluppare un’agricoltura rispettosa dell’ambiente e che apporti un riconoscimento a chi si compromette in questo tipo di produzione. Ecocert è riconosciuta a livello mondiale e specializzata in nella certificazione di prodotti provenienti da agricoltura ecologica.

Gli standard tecnici Ecocert permettono di certificare:

- cosmetici naturali ed ecologici
- detersivi naturali
- profumi per ambiente naturali ed ecologici
- prodotti del commercio equo e solidale
- Eve (spazi verdi naturali)
- prodotti utilizzabili in agricoltura ecologica
- produzione e trasformazione di piante acquatiche

A conclusione dei panel test, la formulazione che ha riscosso maggior successo è stata quella con l’aggiunta dell’olio essenziale di *C. citratus* allo 0.2%, perché mitigava molto il profumo poco gradevole e poco adeguato al contesto cosmetico di *O. micranthum*, conferendo alla crema una nota agrumata che complessivamente è stata giudicata molto gradevole.

A conclusione del lavoro si è ritenuto opportuno saggiare la capacità antiossidante della crema stessa, per valutare se questa caratteristica venisse mantenuta rispetto a quanto già verificato per l'olio essenziale puro. È stato effettuato un test di fotochemoluminescenza (PCL) con il sistema Photochem® sulle tre creme che hanno riscosso maggior gradimento tra gli intervistati (A, B, C). Questo sistema è stato progettato per la determinazione della capacità antiossidante totale sia di sostanze solubili in acqua (ACW) che in matrici lipidiche (ACL). Esso si basa sulla chemiluminescenza fotoindotta dai radicali liberi che reagiscono con la sostanza chemiluminescente (luminol). I radicali liberi vengono quantificati in maniera indiretta mediante la misura della lunghezza d'onda della luce prodotta. In presenza di sostanze che agiscono come trappole di radicali, l'intensità della fotochemiluminescenza è attenuata in funzione della loro concentrazione. In questo modo, le proprietà antiradicaliche della sostanza analizzata possono essere realmente quantificate.

I risultati del test sono riportati nella tabella che segue:

Crema	TEAC (mM/g)
A. OE <i>O. micranthum</i> 0.2%	3.28 ± 0.29
B. OE <i>O. micranthum</i> 0.2% + OE <i>C. citratus</i> 0.2%	3.76 ± 0.19
C. OE <i>O. micranthum</i> 0.2% + OE <i>C. citratus</i> 0.4%	3.67 ± 0.15

Risultati espressi in mmol equivalenti in Trolox per grammo di sostanza

Sebbene le tre creme abbiano una capacità antiossidante molto simile tra loro, è da mettere in evidenza che la formulazione con *C. citratus* allo 0.2%, già individuata come migliore al panel test, rivela anche un valore di attività antiossidante lievemente superiore alle altre, molto probabilmente grazie ad una attività sinergicamente additiva con l'olio essenziale di *O. micranthum*.

CONCLUSIONI

L'intento di questo lavoro di dottorato è stato quello di valorizzare la fortissima biodiversità che caratterizza la foresta pluviale amazzonica mediante studio con finalità applicative di droghe e derivati vegetali di piante aromatiche poco conosciute. Il profilo della ricerca è volutamente ad ampio raggio, sviluppando la ricerca in contesti coerenti con una proiezione salutistica - farmaceutica, cosmetica ed alimentazione funzionale – e con una proiezione sulle nuove strategie di difesa delle piante (trattamenti integrati e/o *organic* in agricoltura). Il criterio di selezione delle specie vegetali da considerare è innanzitutto basato sull'eredità di ricerca pregressa sugli oli essenziali del laboratorio di Biologia farmaceutica in atto ormai da oltre 10 anni, con uno sguardo sempre attento alle tradizioni etnobotaniche reperibili bibliograficamente o in loco per tradizione orale.

Le piante aromatiche sono le più note alla medicina tradizionale poichè la loro aromaticità ha da sempre catturato l'attenzione delle popolazioni indigene. Questa loro caratteristica è dovuta all'accumulo di importanti quantità di oli essenziali, ossia fitocomplessi derivanti dal metabolismo secondario, costituiti da una complessa miscela di molecole altamente volatili a prevalenza di idrocarburi mono- e sesquiterpenici e di materiali ossigenati da essi derivati. La composizione degli oli essenziali oltre a dipendere da fattori genetici risente particolarmente dei fattori ambientali, estremizzando ancor più la diversità biologica e mettendo a disposizione un patrimonio di molecole ad elevato potenziale applicativo.

Grazie alla collaborazione con l'Universidad Politecnica Salesiana di Quito e dell'Universidad Estatal Amazonica di Puyo (Ecuador) è stato possibile raccogliere il materiale vegetale di 10 piante selezionate e distillarne gli oli essenziali in loco. Nei nostri laboratori sono poi stati caratterizzati chimicamente in maniera puntuale ed analizzati dal punto di vista dell'efficacia biologica.

Rispetto al contesto delle bioattività proiettate verso l'indagine sulle possibili potenzialità applicative, è stata valutata innanzitutto la capacità antiossidante dove l'olio essenziale di *O. micranthum* si è distinto per un'attività paragonabile a quella del controllo di sintesi. Sono seguiti diversi test di carattere antimicrobico, in cui *O. micranthum* e *O. quixos* hanno dato i risultati migliori mostrando una forte attività contro batteri patogeni per l'uomo quali *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *M. luteus* e *K. oxytoca*. Buona parte degli oli essenziali

considerati si sono mostrati efficaci anche su funghi filamentosi fitopatogeni e patogeni dell'uomo, in particolare verso il dermatofita *N. gypsea*. Degna di nota è stata l'attività anti-candida dove ancora *O. micranthum* e *O. quixos* sono stati i più attivi. Ancora più interessanti, sui medesimi ceppi, sono stati i risultati di valutazione del sinergismo tra olio essenziale e fluconazolo, uno dei farmaci più utilizzati per curare candidosi. Gli oli essenziali di *P. carpunya* e *S. molle* hanno mostrato un buon indice di sinergismo col farmaco. Inoltre, *P. carpunya* è stato in grado di ripristinare la sensibilità di un ceppo resistente al farmaco. Questo apre nuove prospettive sull'utilizzo di sostanze naturali a supporto di terapie con farmaci. Dai test di attività mutagenica nessuno degli oli essenziali si è mostrato positivo, garantendo la loro sicurezza per l'uomo.

A conclusione di tutto, per iniziare a dare concretamente valore applicativo alla cospicua mole di lavoro profusa nel triennio, è stata in via preliminare formulata una crema cosmetica contenente due degli oli essenziali studiati in collaborazione con la Fondazione Chankuap (Macas, Quito) con cui da anni collaboriamo per una valorizzazione cosmetica delle risorse biodiverse della foresta amazzonica ecuadoriana. A questo fine sono stati utilizzati quegli oli essenziali che potevano conferire al prodotto pilota una qualità funzionale e una fragranza adeguate al contesto cosmetico. Nello specifico sono stati utilizzati gli oli essenziali di *O. micranthum*, per l'espressione di bioattività, e di *C. citratus* per le caratteristiche aromatiche. Il prodotto pilota ha riscontrato gradimento su un primo campione di volontari a cui è stato preliminarmente sottoposto.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Tutti i reagenti utilizzati in questa ricerca sono di qualità coerente con l'approccio di volta in volta estrattivo, cromatografico e biologico.

Distillazione in corrente di vapore

Le piante utilizzate per l'estrazione degli oli essenziali sono state raccolte in Ecuador, nella provincia di Morona-Santiago, nelle vicinanze della città di Macas. Per ogni pianta sono stati raccolti tre diversi campioni in aree differenti.

Per l'estrazione degli oli essenziali è stato utilizzato il metodo della distillazione in corrente di vapore (Sharapin, 2000) mediante distillatori commerciali messi gentilmente a disposizione dalla Fondazione Chankuap di Macas. I distillatori sono dotati di un contenitore che raccoglie l'acqua che fungerà da solvente per l'estrazione. Questa, viene portata ad ebollizione da una fiamma sottostante producendo vapore acqueo. Il vapore arriva a contatto con la droga, posta su di una grata che evita il contatto diretto con l'acqua in ebollizione, e per effetto della temperatura causa la fuoriuscita dell'olio essenziale. Contemporaneamente il vapore abbassa il punto di ebollizione delle sostanze, permettendone la separazione per distillazione. Il vantaggio di questo metodo è il poter estrarre sostanze termolabili ad una temperatura inferiore a quella del loro punto di ebollizione, preservandole dal degrado.

Il distillatore utilizzato supporta un volume massimo di 16 litri. Con questo sono state eseguite prove preliminari per trovare i parametri ottimali di distillazione da applicare poi a tutte le successive estrazioni. Sono stati variati singolarmente il volume di acqua caricata nel serbatoio (8 o 16 L), la quantità di materiale vegetale introdotto nel distillatore (5.67 o 11.34 Kg, ossia 12.5 o 25 libbre) e l'entità della fiamma (metà o massima potenza). Per ogni distillazione è stata monitorata la produzione di olio essenziale ad intervalli regolari di 15 minuti per la realizzazione di una curva di distillazione. In totale sono state eseguite otto curve di distillazione, come riassunto nella tabella che segue.

Distill. (n.)	Peso (Kg)	materiale	Vol. acqua (L)	Riscaldamento
1	11.34		16	100%
2	11.34		16	50%
3	11.34		8	100%
4	11.34		8	50%
5	5.67		16	100%
6	5.67		16	50%
7	5.67		8	100%
8	5.67		8	50%

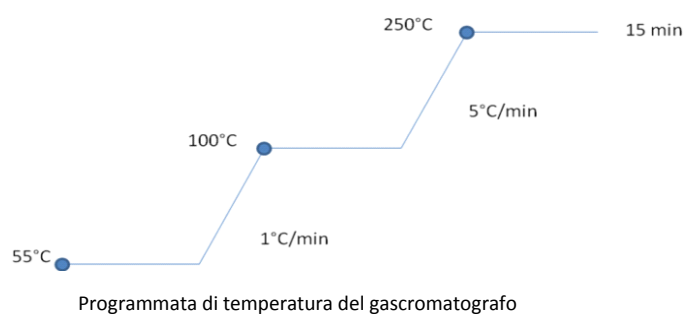
Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa

La caratterizzazione chimica degli oli essenziali è stata effettuata tramite la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa mediante un gascromatografo *Varian CP-3800* provvisto di una colonna capillare *Varian FactorFour VF-5ms* (5% -fenil-95% -dimetil-polisilossano; lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm e spessore di film 0.25 µm) avvolta a spirale su un supporto metallico, accoppiato ad uno spettrometro di massa *Varian MS-4000* con ionizzatore ad impatto elettronico, analizzatore a trappola ionica e software provvisto del database NIST (*National Institute of Standards and Technology*) per l'identificazione dei componenti.

Le condizioni sperimentali erano le seguenti: gas carrier elio (1 mL/min), voltaggio ionizzatore 70 eV, corrente di emissione 10 µA, velocità di campionamento 1 scan/sec, intervallo di analisi del rapporto m/z 40-400 Da, temperatura della trappola 150 °C, temperatura della transfer-line 300 °C.

I campioni sono stati preparati prelevando 10 µL di olio essenziale e sciogliendolo in 1 mL di solvente, CH₃OH o CH₂Cl₂. 1 µL di ciascuna soluzione è stato iniettato nella camera di iniezione, mantenuta a 250 °C.

La programmata utilizzata parte da una temperatura di 55°C, sale fino a 100 °C con incrementi di 1 grado al minuto, raggiunta la temperatura di 100 °C, tramite una seconda rampa arriva a 250 °C ad intervalli di 5 gradi al minuto: a quest'ultima temperatura si mantiene costante per 15 minuti (Rossi et al., 2011) (vedi schema seguente).



Verranno prima eluite, e quindi rivelate come picchi, le sostanze più bassobollenti e meno affini con la fase stazionaria. Il risultato dell'analisi GC/MS è un cromatogramma che presenta in ordinata la conta degli ioni generati durante la frammentazione, e in ascissa il tempo di ritenzione espresso in minuti. Integrando i picchi corrispondenti agli ioni di ogni analita identificato si ottiene un valore percentuale di area rispetto all'area totale dei picchi, che viene utilizzato come espressione semiquantitativa. L'analisi quantitativa è stata effettuata con analisi gas-cromatografica con detector a ionizzazione di fiamma (FID, mantenuto a temperatura di 300 °C), perché si ottiene una proporzionalità migliore tra area e concentrazione. L'identificazione dei composti è avvenuta sia confrontando i loro tempi di ritenzione relativi ad n-alcani contenenti 8-32 atomi di carbonio con quelli dei composti di riferimento, sia comparando gli spettri prodotti dalla frammentazione delle molecole con spettri noti presenti in letteratura e/o contenuti in appositi database pubblicati dal NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Per il calcolo del tempo di ritenzione relativo (Kovats index) si è presacome riferimento una miscela di idrocarburi da C₈ a C₃₂ (Sigma-Aldrich), precedentemente iniettata nel sistema con lo stesso metodo usato per analizzare l'olio essenziale, e si utilizza la specifica equazione proposta per eluizioni con programmata di temperatura:

$$I_t = 100 \left(\frac{t_{R_i}^T - t_{R_z}^T}{t_{R_{(z+1)}}^T - t_{R_z}^T} \right) + Z$$

Dove R_i è il tempo di ritenzione del picco di interesse, R_z è il tempo di ritenzione dell'idrocarburo che eluisce immediatamente prima del composto che ha dato il picco considerato, R_(z+1) è il tempo di ritenzione dell'idrocarburo che eluisce subito dopo il composto che ha dato il picco considerato e Z equivale al numero di carboni dell'idrocarburo relativo al picco d'interesse.

Saggio del DPPH

Per la valutazione dell'attività antiossidante degli oli essenziali è stato utilizzato un saggio che si basa sul radicale 1,1-difenil-2-picril-idrazile (DPPH) per via spettrofotometrica (Kedare and Singh, 2011), utilizzando una variante al metodo classico. L'esperimento è stato condotto in micropiastre a 96 pozzetti ed è stato utilizzato un lettore di micropiastre per l'acquisizione dei dati (Microplate Reader 680 XR, Biorad), impostato ad una lunghezza d'onda di 515 nm, la più prossima al picco di assorbimento della forma radicalica (Cheng et al., 2006).

In ogni pozzetto è stata versata una soluzione di etanolo al 50%. Successivamente sono stati aggiunti gli oli essenziali e diluiti serialmente (con fattore 1:1) fino ad ottenere 7 differenti concentrazioni in un range di 15.63 – 1000 µg/mL. Allo stesso modo è stato allestito il Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) come controllo positivo, in un range di 1.25 – 79.9 mmol/L. Infine, ad ogni pozzetto è stata aggiunta una soluzione di DPPH (0.104 mM finale) in etanolo al 50%. Come controllo negativo è stato utilizzato il solo DPPH e come bianco strumentale la soluzione di etanolo al 50%.

Le micropiastre sono state poste in incubazione a temperatura ambiente in agitazione per 30 minuti e poi analizzate al lettore di micropiastre. Con valori ottenuti sono state calcolate le mmoli equivalenti in trolox per grammo di olio essenziale e l'IC₅₀ (concentrazione di olio essenziale in grado di eliminare il 50% del DPPH radicale) tramite determinazione della percentuale di eliminazione di DPPH radicale secondo la seguente formula:

$$\% \text{ DPPH eliminato} = \left(1 - \frac{\text{AOE} - \text{Abianco}}{\text{Acontrollo} - \text{Abianco}} \right) \times 100$$

Dove AOE è l'assorbanza del pozzetto con il campione, Acontrollo è l'assorbanza dei pozzetti con il solo DPPH e Abianco è l'assorbanza dei pozzetti con l'etanolo al 50%.

Batteri utilizzati

Nei diversi esperimenti volti a saggiare l'attività antibatterica sono stati utilizzati 9 ceppi patogeni per l'uomo elencati nella seguente tabella.

Gram-positivi	Gram-negativi
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 4350)
<i>Listeria grayi</i> (ATCC 19120)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC 29516)
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9622)	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 6361)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 14990)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 17934)
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	

Metodo delle microdiluzioni su patogeni umani

L'attività antibatterica è stata analizzata utilizzando il metodo delle microdiluzioni in piastre da 96 pozzetti su cinque ceppi di batteri Gram-positivi e quattro Gram-negativi come riportato nella tabella precedente. Partendo da una soluzione madre in brodo di coltura (Tryptone Sota Broth – TSB – Oxoid LTD, Basinstoke, Hampshire, England), sono state eseguite diluizioni seriali con fattore di diluizione 1:1 degli oli essenziali ottenendo sette diverse concentrazioni comprese tra 31.25 -2000 µg/mL (Fouotsa et al., 2013). Per agevolare la solubilizzazione degli oli essenziali in ambiente acquoso è stato aggiunto dimetisolfossido (DMSO, Fluka, Sigma-Aldrich). Come controllo positivo è stato utilizzato l'olio essenziale di *Thymus vulgaris* (Sacchetti et al., 2005), mentre come controllo negativo è stato utilizzato il DMSO. I batteri sono stati inoculati ad una concentrazione finale di 1×10^7 UFC/mL in volume finale di 200 µL/pozzetto e incubati per 8 ore a 37 °C in costante agitazione (110 rpm). Successivamente è stato aggiunto il colorante 2,3,5-trifenil-tetrazol cloruro (TTC, Sigma-Aldrich) ad una concentrazione finale di 0.3 mg/mL. Dopo un'ora le colture sono state analizzate per verificare la crescita batterica (pozzetti rossi) o l'inibizione (pozzetti gialli o trasparenti) e determinare la minima concentrazione inibente (minimal inhibitory concentration - MIC). La MIC è stata definita come la più bassa concentrazione di olio essenziale che causa l'inibizione della crescita (Rolli et al., 2016) e le attività inibenti sono state suddivise in forte, moderata e debole in base al suo valore, come riportato qui sotto (Baser and Buchbauer, 2015).

Attività	MIC
Forte	$\leq 500 \mu\text{g/mL}$
Moderata	$500 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} < 5000 \mu\text{g/mL}$
Debole	$5000 \mu\text{g/mL} < \text{MIC} < 20000 \mu\text{g/mL}$
Assente	$> 20000 \mu\text{g/mL}$

Test della componente volatile dell'olio essenziale su funghi cresciuti in agar

Per analizzare l'attività antifungina è stata utilizzata l'analisi in esposizione di vapori dell'olio essenziali su funghi cresciuti in terreno agarizzato. Sono state considerate tre specie fitopatogene (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*) e due specie dermatofite (*Trichophyton mentagrophytes* e *Nannizzia gypsea*). Le colture fungine sono state ottenute a partire da dischi miceliari prelevati da una coltura madre in fase di crescita stazionaria, trasferiti poi in piastre Petri dal diametro da 90 mm con terreno agarizzato a base di destroso e estratto di patata (PDA, Difco, Dittroit, MI, USA) per i fitopatogeni e sabouraud destroso per i dermatofiti (SDA, Oxoid LTD, Basinstoke, Hampshire, England). Al centro del coperchio della piastra è stato posizionato un dischetto sterile di cellulosa (diametro 6 mm) impregnato con 10 μL dell'olio essenziale (soluzione madre 1 mg/mL in DMSO). Le piastre sono poi state sigillate ermeticamente in maniera capovolta e incubate per un tempo di 7-10 giorni al buio alla temperatura di 26 °C (Kumar et al., 2014; Romagnoli et al., 2016). Come controllo negativo è stata usata una piastra contenente un dischetto impregnato con DMSO. La percentuale di inibizione della crescita è stata valutata misurando il diametro del micelio e comparandolo con il controllo negativo (considerato come 100% di crescita). Tutti i campioni sono stati testati in triplicato.

Metodo delle microdiluizioni su *Candida albicans*

L'attività biologica degli oli essenziali nei confronti di *Candida* spp. è stata eseguita in collaborazione con la prof.ssa Letizia Angiolella, del Dipartimento delle scienze della salute pubblica "G. Sanarelli" dell'Università "La Sapienza" di Roma.

Sono stati selezionati tre diversi ceppi di *Candida* che presentavano una differente sensibilità al trattamento col farmaco fluconazolo: *Candida albicans* (ATCC 24433) acquistata presso "American Type Collection Culture" sensibile al farmaco; *Candida albicans* isolata da un paziente infetto da HIV anch'essa sensibile al fluconazolo (AIDS 6) e *Candida glabrata* isolata da un paziente e resa resistente al fluconazolo (FLU 43976). Per determinare la minima concentrazione inibente (MIC) è stato utilizzato il metodo delle microdiluizioni in accordo con "Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards" (CLSI/NCCLS). Gli oli essenziali e il fluconazolo sono stati diluiti in maniera seriale in pozzetti di piastre da 96. Tutti i campioni erano coltivati in RPMI-1640 supplementato con acido 3-(N-morfolino)propanesulfonico (MOPS) a pH 7.0 e aggiungendo Tween® 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per migliorare la solubilità. Gli oli essenziali sono stati diluiti in un range di 48.8 – 6250 µg/mL e il fluconazolo in un range di 0.5 – 64 µg/mL. In ogni micro pozzetto la candida è stata inoculata ad una concentrazione finale di 2.5×10^3 UFC/mL e incubata per 48 ore a 30 °C (Pietrella et al., 2011).

La MIC è stata determinata tramite osservazione diretta della torbidità del mezzo di coltura. I valori di MIC erano rappresentati dalla più bassa concentrazione a cui non si manifestava torbidità del mezzo. In seguito, è stata determinata anche la minima concentrazione ad attività fungicida (MCF) trasferendo 10 µL del mezzo di coltura di ciascun pozzetto in un nuovo pozzetto con saboraaud destroso agar e incubando a 30 °C per 48 ore. La MFC era considerata come la più bassa concentrazione a cui non si osservava crescita cellulare.

Checkerboard test

Utilizzando le stesse condizioni sperimentali e gli stessi ceppi fungini visti nella valutazione dell'attività anti candida, è stato condotto il checkerboard test per

determinare eventuali effetti di sinergismo tra olio essenziale e fluconazolo (Stringaro et al., 2014). Sono state allestite otto diluizioni seriali (fattore 1:1) per gli oli essenziali e altrettante per il fluconazolo, poi sono state opportunamente miscelate in micropiastre a 96 pozzetti in modo da formare un matrice quadrata 8x8 con 64 differenti combinazioni di concentrazioni olio essenziale e farmaco. La matrice è stata creata a due dimensioni, lungo l'asse x è stato creato un gradiente di concentrazione degli oli essenziali (in un range di 48.8 – 6250 µg/mL) e lungo l'asse y un gradiente di fluconazolo (in un range di 0.5 – 64 µg/mL). Questo schema è stato creato per il calcolo dell'indice di concentrazione inibitoria frazionata (FIC_{index} , fractional inhibitory concentration index) degli oli essenziali in combinazione con il fluconazolo. (Turgis et al., 2012). Il FIC_{index} è stato calcolato sommando il valore di FIC dell'olio essenziale al valore di FIC del fluconazolo, come indicato nella formula che segue:

$$FIC_{index} = FIC_{OE} + FIC_{fluconazole}$$

Dove:

$$FIC_{OE} = MIC_{EO \text{ in combinazione}} / MIC_{EO \text{ da solo}}$$

$$FIC_{fluconazole} = MIC_{fluconazole \text{ in combinazione}} / MIC_{fluconazole \text{ da solo}}$$

In base al valore di FIC_{index} che si ottiene si parla di effetto sinergico se esso è ≤ 0.5 , di effetto additivo o indifferenza se è > 0.5 e ≤ 2 , e di effetto antagonistico quando è > 2 (Carradori et al., 2016).

Con le stesse modalità utilizzate per la valutazione della MFC è stata condotta una prova di vitalità anche per le combinazioni del checkerboard test.

Time killing

Per confermare l'attività sinergica è stata eseguita una curva fungicida (time killing) in funzione del tempo (Klepser et al., 1998). Sulla base dei risultati dell'attività sinergica è stato deciso di utilizzare olio essenziale di *Piper carpunyain* in combinazione con fluconazolo sul ceppo di *Candida albicans* AIDS 6. Cellule coltivate in brodo contenente sabouraud destroso (SDB, Oxoid LTD, Basingstoke, Ampshire, England) per 24 ore a 28 °C sono state centrifugate, lavate e risospese alla concentrazione di 2.5×10^5 UFC/mL in RPMI-1640

tamponato con MOPS a pH 7.0 ed incubate a 28 °C. I quattro seguenti campioni sono stati testati in duplicato: il solo olio essenziale di *P. carpunya* alla concentrazione di MIC; il solo fluconazolo alla concentrazione di MIC; olio essenziale e fluconazolo in associazione alle rispettive concentrazioni che hanno dato il miglior risultato di FIC_{index} ed infine le stesse sostanze in associazione alle concentrazioni di FIC_{index} immediatamente più alto. È stato aggiunto Tween 20 per aumentare la solubilità degli oli essenziali. Lo stesso è stato utilizzato per allestire il controllo negativo in cui non c'erano altre sostanze a contatto con la *Candida*. Ciascun campione è stato messo ad incubare in agitazione a 30 °C e ad intervalli prestabiliti di tempo (0, 1, 2, 4, 6 e 24 ore) venivano prelevati 100 µL di brodo. I prelievi sono stati poi diluiti in maniera seriale con fattore 1:9 per 5 volte e 100 µL di ciascuna diluizione sono stati seminati in piastre Petri (diametro 90 mm) contenenti SDA, quindi lasciate in incubazione 48 ore a 30 °C al buio. Trascorsa l'incubazione si sono contate le colonie cresciute in ogni piastra per determinare la concentrazione di partenza (CFU/mL) (Pietrella et al., 2011).

Test di inibizione della 5-lipossigenasi

Per dimostrare l'attività anti-infiammatoria degli oli essenziali è stato utilizzato il test di inibizione della 5-lipossigenasi (5-LOX, Sigma-Aldrich). Per tale test si è usato un enzima ricavato dalla soia ma del tutto analogo a quello umano (Sud'ina et al., 1993). Il test enzimatico è stato eseguito mediante analisi allo spettrofotometro (ThermoSpectronic, Helios λ) utilizzando cuvette di quarzo e leggendo alla lunghezza d'onda di 234 nm. Gli oli essenziali sono stati diluiti a cinque diverse concentrazioni (da 5 a 100 µg/mL) in etanolo. In ogni cuvetta è stata preparata la mix di reazione in buffer borato (0.1 mg/mL) a pH 9.0 a cui sono stati aggiunti 7.9 U/mL di enzima e 20 µL della diluizione di olio essenziale in un volume finale di 1 mL. La miscela è stata quindi incubata 7 minuti in ghiaccio e 3 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata innescata tramite l'aggiunta di acido linoleico (concentrazione finale 1.56 µM) e monitorata in cinetica continua per 10 minuti per assicurarsi della linearità della velocità di reazione. Il controllo negativo era rappresentato dall'etanolo mentre il controllo positivo era dato da acido noriidroguaretico (NDGA). Il tasso di inibizione è stato calcolato comparando la pendenza della cinetica del campione con la pendenza del controllo negativo (El-Readi et al., 2013). È stata considerata forte attività con $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$; discreta con $10 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$; moderata con 31

$\mu\text{g/mL} < \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$; debole con $51 \mu\text{g/mL} < \text{IC}_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$; inattiva con IC_{50} fino a $100 \mu\text{g/mL}$ (Baylac and Racine, 2003).

Test di Ames

Per indagare sulla possibile attività mutagenica degli oli essenziali è stato utilizzato un test di inclusione in agar noto con il nome di test di Ames (dal suo ideatore, Maron and Ames, 1983). A tale scopo sono stati utilizzati 4 diversi ceppi di *Salmonella typhimurium* (TA97a, TA98, TA100 e TA1535) ingegnerizzati appositamente per questo tipo di analisi, ciascuno con diversa sensibilità nei confronti di potenziali mutageni e contenenti una mutazione che li rende auxotrofi per istidina e biotina. Tutti i campioni sono stati saggiati in piastre Petri (diametro di 90 mm) contenenti una base di agar e basse concentrazioni di istidina e biotina, sufficienti a tenere in vita i batteri ma non a permetterne la replicazione. In ogni piastra sono stati inclusi 100 mL di coltura batterica fresca cresciuta overnight in terreno liquido, 100 mL di olio essenziale diluito in DMSO (5 diluizioni in un range di 0.1 – 10 μg /piastra) e 0.5 mL di tampone fosfato a pH 7.4 contenente o meno un attivatore metabolico. L'attivatore metabolico, aggiunto in metà delle piastre totali, consiste in un sistema metabolico esogeno rappresentato da un lisato microsomiale di fegato di ratto maschio, denominato S9, disciolto in una soluzione di KCl 0.154 mM con aggiunta di NADPH e glucosio-6-fosfato. Questa S9 mix è comunemente usata per l'attivazione di metaboliti pro-mutageni a mutageni, (acquistato dalla Molecular Toxicology, Inc. Boone, NC, USA). Prima del suo utilizzo la S9 mix è stata filtrata con un filtro dalla porosità di 0.45 μm della Millipore (Guerrini et al., 2009). Come controllo negativo sono stati utilizzati 100 μL di DMSO, con o senza S9 mix; come controllo positivo, per piastre senza attivazione da S9 mix sono stati utilizzati 2 μg /piastra di 2-nitrofluorene per i ceppi TA97a, TA98 e TA 1535 e 1 μg /piastra di sodio azide per il ceppo TA100 mentre per piastre con attivazione da S9 sono stati utilizzati 2 μg /piastra di 2-aminoantracene per tutte le specie.

Le piastre sono state incubate per tre giorni a 37 °C e le colonie sono state contate manualmente (Colony Counter 560 Suntext, Antibioticos, Italy). I risultati sono stati considerati positivi quando il numero di colonie di revertenti erano almeno il doppio rispetto a quelle del controllo negativo (Maron and Ames, 1983).

Formulazione cosmetica

Per realizzare creme contenenti l'olio essenziale di *O. micranthum* ed altri oli essenziali, atti a correggere la fragranza e a conferire maggior appetibilità al prodotto, è stata preparata una base comune. Il protocollo di tale base è stato gentilmente messo a disposizione dalla fondazione Chankuap, ma per ragioni di riservatezza non verrà riportato in questa tesi. Una volta ultimata la base è stato aggiunto l'olio essenziale di *O. micranthum* allo 0.2% ed è stato corretto il pH portandolo a 5.0 ± 0.3 con acido citrico (0.5 mg/mL). La crema così ottenuta è stata suddivisa in 5 aliquote a cui aggiungere altri oli essenziali per migliorarne la fragranza secondo lo schema seguente.

Crema	OE aggiuntivo
A	-
B	<i>C. citratus</i> 0.2%
C	<i>C. citratus</i> 0.4%
D	mandarino 0.2%
E	arancio 0.2%

Panel test

Al fine di raccogliere informazioni preliminari di gradimento relative alla spalmabilità e all'aroma è stato sottoposto un questionario (panel test) ad un gruppo di volontari che hanno provato la crema (10 persone). Di seguito le domande effettuate:

PRODOTTO: Crema nutritiva organica con oli essenziali

1. Come si presenta a livello generale il prodotto?
 - a) Gradevole
 - b) Provocativo
 - c) Poco attraente

2. Come appare il colore del prodotto?
 - a) Forte
 - b) In linea col prodotto
 - c) Pallido

3. Come valuti l'aroma del prodotto?
 - a) Gradevole
 - b) Sgradevole
 - c) Normale

4. Come valuti la consistenza del prodotto?
 - a) Soffice
 - b) Cremoso
 - c) Liquido
 - d) Altro: _____

5. Riconosci l'aroma del prodotto?
 - a) Sì quale? _____
 - b) No

6. In base al campione consegnato (50 mL) quanto saresti disposto a spendere per una crema organica come questa, certificata Ecocert?
 - a) Meno di US\$ 3.50
 - b) Meno di US\$ 5.00
 - c) Meno di US\$ 7.00

7. Ti sembra un prodotto innovativo?
 - a) Sì
 - b) No

8. Utilizzeresti regolarmente questo tipo di prodotto?
 - a) Sì
 - b) No Perché? _____

9. Dopo aver provato il prodotto ti sono comparse irritazioni cutanee?
No
Sì Descrivile _____

Saggio di fotochemoluminescenza (PLC)

Per valutare la capacità antiossidante delle creme contenenti gli oli essenziali è stato allestito un saggio di fotochemoluminescenza basato sul sistema Photochem®, in collaborazione con il dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche dell'Università di Ferrara. È stato impiegato il kit ottimizzato per le sostanze di carattere lipofilo (ACL) (Popov and Lewin, 1996). Nella tabella sottostante è riportata la composizione della miscela di reazione.

Reagente	1	2	3-WS	4-WS	Campione
Bianco	2300	200	25	0	0
Calibrazione	2300-X	200	25	X	0
Misure	2300-Y	200	25	0	Y

Composizione della miscela di reazione in μL per analisi in ACL. X rappresenta le diverse quantità di standard per la retta di taratura (5, 10, 20, 25 μL). Y invece la quantità di campione da analizzare.

I reagenti 1, 2, 3 e 4 sono stati forniti tal quali dalla ditta Analytic Jena (Germania). Il Reagente 3-WS (Luminol Work Solution) è stato preparato aggiungendo 750 μL di reagente 2 al reagente 3. Il reagente 4-WS (Trolox Work Solution) è stato preparato aggiungendo 500 μL di reagente 1 al reagente 4. La soluzione è stata poi diluita 1:100. In 10 μL di 4-WS è contenuta 1 nmole dello standard di calibrazione (Trolox). I campioni sono stati così preparati: 0.2 g di crema circa, esattamente pesati, sono stati posti in 10 mL di miscela metanolo, etere etilico, esano in rapporto 1:1:1 e sonicati per 10 minuti. A questo punto è stata fatta partire la reazione e monitorata per una durata di 180 secondi. La capacità antiossidante è stata misurata dall'integrale al di sotto della curva ed è espressa in mmoli di Trolox equivalenti per grammo di crema (Baldisserotto et al., 2015; Vertuani et al., 2011).

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Sattar, E., Zaitoun, A.A., Farag, M.A., Gayed, S.H.E., Harraz, F.M.H., 2010. Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Natural Product Research* 24, 226–235. doi:10.1080/14786410802346223
- Ali, S.M., Khan, A.A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K.S., Polasa, H., Rao, L.V., Habibullah, C.M., Sechi, L.A., Ahmed, N., 2005. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 4, 20. doi:10.1186/1476-0711-4-20
- Ariza Espinar, L.A., 1967. Las especias de Tagetes (Compositae) de la región central Argentina. *Kurtziana* 4, 51–71.
- Baldisserotto, A., Vertuani, S., Bino, A., De Lucia, D., Lampronti, I., Milani, R., Gambari, R., Manfredini, S., 2015. Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23, 264–271. doi:10.1016/j.bmc.2014.10.023
- Ballabeni, V., Tognolini, M., Bertoni, S., Bruni, R., Guerrini, A., Rueda, G.M., Barocelli, E., 2007. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research* 55, 23–30. doi:10.1016/j.phrs.2006.09.009
- Ballabeni, V., Tognolini, M., Giorgio, C., Bertoni, S., Bruni, R., Barocelli, E., 2010. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia* 81, 289–295. doi:10.1016/j.fitote.2009.10.002
- Baser, K.H.C., Buchbauer, G., 2015. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, Second Edition. CRC Press.
- Baser, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Demirçakmak, B., Uülker, N., Beis, S.H., 1997. Composition of the Essential Oil of *Schinus molle* L. Grown in Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 9, 693–696. doi:10.1080/10412905.1997.9700813
- Baylac, S., Racine, P., 2003. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy* 13, 138–142. doi:10.1016/S0962-4562(03)00083-3
- Bazile, D., Jacobsen, S.-E., Verniau, A., 2016. The Global Expansion of Quinoa: Trends and Limits. *Front Plant Sci* 7. doi:10.3389/fpls.2016.00622
- Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J.P., Cazaux, S., Bouajila, J., 2010. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. *Journal of Food Science* 75, C466–C472. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01711.x
- Bernhard, R.A., Shibamoto, T., Yamaguchi, K., White, E., 1983. The volatile constituents of *Schinus molle* L. *J. Agric. Food Chem.* 31, 463–466. doi:10.1021/jf00116a075
- Bieski, I.G.C., Leonti, M., Arnason, J.T., Ferrier, J., Rapinski, M., Violante, I.M.P., Balogun, S.O., Pereira, J.F.C.A., Figueiredo, R. de C.F., Lopes, C.R.A.S., da Silva, D.R., Pacini, A., Albuquerque, U.P., Martins, D.T. de O., 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol* 173, 383–423. doi:10.1016/j.jep.2015.07.025
- Birkett, M.A., Abassi, S.A., Kröber, T., Chamberlain, K., Hooper, A.M., Guerin, P.M., Pettersson, J., Pickett, J.A., Slade, R., Wadhams, L.J., 2008. Antiectoparasitic

- activity of the gum resin, gum haggard, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemistry* 69, 1710–1715. doi:10.1016/j.phytochem.2008.02.017
- Blanco, M.M., Costa, C.A.R.A., Freire, A.O., Santos Jr., J.G., Costa, M., 2009. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine* 16, 265–270. doi:10.1016/j.phymed.2007.04.007
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1199–1200. doi:10.1038/1811199a0
- Bossou, A.D., Mangelinckx, S., Yedomonhan, H., Boko, P.M., Akogbeto, M.C., De Kimpe, N., Avlessi, F., Sohounhloue, D.C.K., 2013. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasit Vectors* 6, 337. doi:10.1186/1756-3305-6-337
- Bras, C., Domínguez, S., Codón, S., Minetti, A., Ferrero, A., 2010. Consequences of subchronic exposure to ethanolic extract from fruits and leaves of *Schinus molle* var. *areira* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 132, 321–327. doi:10.1016/j.jep.2010.08.035
- Bras, C., Gumilar, F., Gandini, N., Minetti, A., Ferrero, A., 2011. Evaluation of the acute dermal exposure of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of *Schinus molle* var. *areira* L. in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1450–1456. doi:10.1016/j.jep.2011.08.036
- Bruce, T.J., Birkett, M.A., Blande, J., Hooper, A.M., Martin, J.L., Khambay, B., Prosser, I., Smart, L.E., Wadhams, L.J., 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest. Manag. Sci.* 61, 1115–1121. doi:10.1002/ps.1102
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C., Sacchetti, G., 2004. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* 85, 415–421. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.019
- Bülow, N., König, W.A., 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55, 141–168.
- Buso P. 2015. Tesi di laurea in Farmacia: Aspetti salutistici di oli essenziali amazzonici, un'esperienza tra cooperazione e ricerca. Relatori: proff. Gianni Sacchetti, Alessandro Medici (Università di Ferrara), Matteo Radice (Universidad Estatal Amazonica, Puyo, Ecuador)
- Calle, J., Ferreira, S., 1973. Estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper lenticellosum*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 2, 81–125.
- Camporese, A., 1998. Oli essenziali e malattie infettive. *Terapia antimicrobica ragionata con gli oli essenziali. Tecniche Nuove.*
- Carbajal, D., Casaco, A., Arruzazabala, L., Gonzalez, R., Tolon, Z., 1989. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 25, 103–107. doi:10.1016/0378-8741(89)90049-4
- Carlini, E.A., De D.P. Contar, J., Silva-Filho, A.R., Da Silveira-Filho, N.G., Frochtengarten, M.L., Bueno, O.F.A., 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology* 17, 37–64. doi:10.1016/0378-8741(86)90072-3
- Carradori, S., Chimenti, P., Fazzari, M., Granese, A., Angiolella, L., 2016. Antimicrobial activity, synergism and inhibition of germ tube formation by *Crocus sativus*-

- derived compounds against *Candida* spp. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 0, 1–5. doi:10.1080/14756366.2016.1180596
- Chalchat, J.-C., Garry, R.-P., Muhayimana, A., 1995. Essential Oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: Chemical Composition According to Harvesting Location, Growth Stage and Part of Plant Extracted. *Journal of Essential Oil Research* 7, 375–386. doi:10.1080/10412905.1995.9698544
- Chanderbali, A.S., van der Werff, H., Renner, S.S., 2001. Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88, 104–134. doi:10.2307/2666133
- Charles, D.J., Simon, J.E., Wood, K.V., 1990. Essential oil constituents of *Ocimum micranthum* Willd. *J. Agric. Food Chem.* 38, 120–122. doi:10.1021/jf00091a025
- Chekem, M.S.G., Lunga, P.K., Tamokou, J.D.D., Kuate, J.R., Tane, P., Vilarem, G., Cerny, M., 2010. Antifungal Properties of *Chenopodium ambrosioides* Essential Oil Against *Candida* Species. *Pharmaceuticals* 3, 2900–2909. doi:10.3390/ph3092900
- Cheng, Z., Moore, J., Yu, L. (Lucy), 2006. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7429–7436. doi:10.1021/jf0611668
- Cherepanov, S.K., 1981. *Sosudistye rasteniya SSSR. (Plantae vasculares URSS.)*. Leningrad: Nauka 509p.-. Rus Names and synonyms of plants growing, wild or cultivated in the USSR. Geog.
- Convenzione sulla diversità biologica art. 2 (1992)
- Costa, I.F.B., Calixto, S.D., Heggdorne de Araujo, M., Konno, T.U.P., Tinoco, L.W., Guimarães, Es, D.O., Lasunskiaia, E.B., Leal, I.R.C., Muzitano, M.F., o, 2015. Antimycobacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Ocotea notata* from Brazilian Restinga. *The Scientific World Journal* 2015, e947248. doi:10.1155/2015/947248
- Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Patrício, F.J., Costa, G.C., Sousa, S.M., Frazão, J.B., Aragão-Filho, W.C., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Amaral, F.M.M., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., Nascimento, F.R.F., 2007. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 148–154. doi:10.1016/j.jep.2006.11.006
- Cysne, D.N., Fortes, T.S., Reis, A.S., de Paulo Ribeiro, B., Dos Santos Ferreira, A., do Amaral, F.M.M., Guerra, R.N.M., Marinho, C.R.F., Nicolete, R., Nascimento, F.R.F., 2016. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. *Parasitol. Res.* 115, 4327–4334. doi:10.1007/s00436-016-5216-x
- De las Heras, B., Slowing, K., Benedí, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., Bermejo, P., Iglesias, I., Abad, M.J., Gómez-Serranillos, P., Liso, P.A., Villar, A., Chiriboga, X., 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 161–166. doi:10.1016/S0378-8741(98)00029-4
- Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73, 69–91. doi:10.1016/S0367-326X(01)00362-8
- Díaz, C., Quesada, S., Brenes, O., Aguilar, G., Cicció, J.F., 2008. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. *Natural Product Research* 22, 1521–1534. doi:10.1080/14786410701848154
- Diaz, P.P., Dorado, V., 1986. Constituyentes quimicos de las hojas de *Piper lenticellosum*. *CDC Revista Latinoamericana de Quimica* 17, 58–60.

- Dikshit, A., Naqvi, A.A., Husain, A., 1986. Schinus molle: a new source of natural fungitoxicant. *Appl Environ Microbiol* 51, 1085–1088.
- Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Elena Maugini, Laura Maleci Bini, Marta Mariotti Lippi, 2014. *Botanica farmaceutica-AA.VV.*
- El-Readi, M.Z., Eid, H.H., Ashour, M.L., Eid, S.Y., Labib, R.M., Sporer, F., Wink, M., 2013. Variations of the chemical composition and bioactivity of essential oils from leaves and stems of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae). *J Pharm Pharmacol* 65, 1653–1663. doi:10.1111/jphp.12142
- Ferrero, A., Minetti, A., Bras, C., Zanetti, N., 2007. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of *Schinus molle* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 441–447. doi:10.1016/j.jep.2007.06.019
- Fouotsa, H., Mbaveng, A.T., Mbazona, C.D., Nkengfack, A.E., Farzana, S., Iqbal, C.M., Marion Meyer, J.J., Lall, N., Kuete, V., 2013. Antibacterial constituents of three Cameroonian medicinal plants: *Garcinia nobilis*, *Oricia suaveolens* and *Balsamocitrus camerunensis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13, 81. doi:10.1186/1472-6882-13-81
- Franz, C.M., 2010. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragr. J.* 25, 112–113. doi:10.1002/ffj.1983
- Freixa, B., Vila, R., Vargas, L., Lozano, N., Adzet, T., Cañigueral, S., 1998. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. *Phytother. Res.* 12, 427–430. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199809)12:6<427::AID-PTR338>3.0.CO;2-X
- García, R., Lemus, I., Rivera, P., Erazo, S., 1997. Biological and chemical study of paico (*Chenopodium chilense*, Chenopodiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 57, 85–88. doi:10.1016/S0378-8741(97)00049-4
- Gatto, M., Zingone, A., Fiorese, G., De Leo, G.A., 2009. *La biodiversità nell'era dei cambiamenti climatici: un'eredità da salvaguardare. 2009). I cambiamenti climatici in Italia: evidenze, vulnerabilità e impatti. Bononia University Press, Bologna. ISBN 978-88.*
- Giovannini, C., Filesi, C., D'Archivio, M., Scazzocchio, B., Santangelo, C., Masella, R., 2006. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati. *ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA* 42, 336.
- Gomes, V., Agostini, G., Agostini, F., Atti dos Santos, A.C., Rossato, M., 2013. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 48, 222–227. doi:10.1016/j.bse.2013.01.003
- Grandtner, M.M., Chevrette, J., 2013. *Dictionary of Trees, Volume 2: South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology. Academic Press.*
- Green, M.M., Singer, J.M., Sutherland, D.J., Hibben, C.R., 1991. Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (marigold) toward *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7, 282–286.
- Guerrini, A., Rossi, D., Paganetto, G., Tognolini, M., Muzzoli, M., Romagnoli, C., Antognoni, F., Vertuani, S., Medici, A., Bruni, A., Useli, C., Tamburini, E., Bruni, R., Sacchetti, G., 2011. Chemical Characterization (GC/MS and NMR Fingerprinting) and Bioactivities of South-African *Pelargonium capitatum* (L.) L'Her. (Geraniaceae) Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity* 8, 624–642. doi:10.1002/cbdv.201000045
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M.E., Bruni, R., 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper*

- obliquum Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27, 39–48. doi:10.1016/j.etap.2008.08.002
- Harraz, F.M., Hammouda, H.M., El Ghazouly, M.G., Farag, M.A., El-Aswad, A.F., Bassam, S.M., 2015. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. *Nat. Prod. Res.* 29, 879–882. doi:10.1080/14786419.2014.988714
- Hayouni, E.A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., Hamdi, M., 2008. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242–251. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.005
- Herrera, C., 1948. Addenda a “Sinopsis de la Flora del Cuzco”, de FL Herrera, 1941. *Revista Universitaria* 94, 1–36.
- Héthélyi, E., Dános, B., Tétényi, P., Koczka, I., 1986. GC-MS analysis of the essential oils of four tagetes species and the anti-microbial activity of *Tagetes minuta*. *Flavour Fragr. J.* 1, 169–173. doi:10.1002/ffj.2730010408
- Hilliard, O.M. (Olive M., 1977. *Compositae in Natal*. University of Natal Press.
- Hosaka, E.Y., Thistle, A., others, 1954. Noxious plants in the Hawaiian ranges. *Hawaii Agricultural Experimental Station Bulletin*.
- Hu, X., Chu, Y., Ma, G., Li, W., Wang, X., Mo, H., Yin, Q., Guo, J., Ma, X., Zhou, S., 2015. Simultaneous determination of ascaridole, p-cymene and α -terpinene in rat plasma after oral administration of *Chenopodium ambrosioides* L. by GC-MS. *Biomed. Chromatogr.* 29, 1682–1686. doi:10.1002/bmc.3479
- Huaman, Y., Cruz, O.A. de la, Bosilcov, A., Batiu, I., 2004. Essential oil from the fruits of *Schinus molle* L. from Peru. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 7, 223–227. doi:10.1080/0972-060X.2004.10643396
- Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azúa, F., Araya, J.E., 2010. Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protection* 29, 1118–1123. doi:10.1016/j.cropro.2010.04.010
- Humbert, H., others, 1923. *composées de Madagascar*. IGM Ecuador (2007)
- Jardim, C.M., Jham, G.N., Dhingra, O.D., Freire, M.M., 2008. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *J Chem Ecol* 34, 1213–1218. doi:10.1007/s10886-008-9526-z
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M.B., Parmentier, M., 2005. Chemical composition and olfactory characterization of essential oils of fruits and seeds of African pear (*Dacryodes edulis* (G. Don) H. J. Lam) from Cameroon. *Flavour Fragr. J.* 20, 215–218. doi:10.1002/ffj.1324
- Jordano, D., Ocana, M., 1955. *Catalogo del herbario de los botanicos cordobeses Rafael de Leon y Galvez, Fr. Jose de Jesus Munoz Capilla, Rafael Entrenas, y Antonio Cabrera*, in: *Anales Inst. Bot. Cavanilles*. pp. 597–720.
- Josse, C., 2003. *Ecological systems of Latin America and the Caribbean: a working classification of terrestrial systems*. NatureServe.
- Kedare, S.B., Singh, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 48, 412–422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1

- Kiran, S.R., Devi, P.S., 2007. Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitol Res* 101, 413–418. doi:10.1007/s00436-007-0485-z
- Kishore, N., Chansouria, J.P.N., Dubey, N.K., 1996. Antidermatophytic Action of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* and an Ointment Prepared from it. *Phytother. Res.* 10, 453–455. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199608)10:5<453::AID-PTR874>3.0.CO;2-A
- Klepser, M.E., Ernst, E.J., Lewis, R.E., Ernst, M.E., Pfaller, M.A., 1998. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1207–1212.
- Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K., Tripathi, Y.B., 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology* 115, 159–164. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.017
- Kumar, V., Mathela, C.S., Tewari, A.K., Bisht, K.S., 2014. In vitro inhibition activity of essential oils from some Lamiaceae species against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 114, 67–71. doi:10.1016/j.pestbp.2014.07.001
- Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20, 1223–1280. doi:10.1007/BF02059809
- Lawless, J., 1992. *Enciclopedia degli olii essenziali*. Tecniche Nuove.
- Lino, C.S., Gomes, P.B., Lucetti, D.L., Diógenes, J.P.L., Sousa, F.C.F., Silva, M.G.V., Viana, G.S.B., 2005. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory activities of the essential oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. from Northeastern Brazil. *Phytother. Res.* 19, 708–712. doi:10.1002/ptr.1737
- Machado, D.G., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Dias, M., Santos, A.R.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., Rodrigues, A.L.S., 2007. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31, 421–428. doi:10.1016/j.pnpbp.2006.11.004
- Maffei, M., Chialva, F., 1990. Essential oils from *Schinus molle* L. berries and leaves. *Flavour Fragr. J.* 5, 49–52. doi:10.1002/ffj.2730050109
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 113, 173–215. doi:10.1016/0165-1161(83)90010-9
- Marzouk, M.S., Moharram, F.A., Haggag, E.G., Ibrahim, M.T., Badary, O.A., 2006. Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. *Phytother. Res.* 20, 200–205. doi:10.1002/ptr.1834
- McVaugh, R., 1943. Botanical Collections of the La Plata Expedition of 1853-1855. *Brittonia* 5, 64–79. doi:10.2307/2804877
- Meletiadi, J., Pournaras, S., Roilides, E., Walsh, T.J., 2010. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and In Vitro-In Vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 602–609. doi:10.1128/AAC.00999-09
- Monzote, L., García, M., Pastor, J., Gil, L., Scull, R., Maes, L., Cos, P., Gille, L., 2014. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Exp. Parasitol.* 136, 20–26. doi:10.1016/j.exppara.2013.10.007

- Monzote, L., Pastor, J., Scull, R., Gille, L., 2014. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Phytomedicine* 21, 1048–1052. doi:10.1016/j.phymed.2014.03.002
- Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K., Gille, L., 2009. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240, 337–347. doi:10.1016/j.taap.2009.08.001
- Moreno Rueda, M.G., 2010. Biotrasformazioni di terpeni e oli essenziali con batteri e funghi isolati da frutti del genere *Citrus* della foresta amazzonica (Ecuador). (phd). Università degli Studi di Ferrara.
- Na, A., Fs, S., Ag, A.-K., Gm, H., N, A., Ss, A.-S., Wn, S., L, W., 2014. Composition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Commun* 9, 265–268.
- Naik, M.I., Fomda, B.A., Jaykumar, E., Bhat, J.A., 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3, 535–538. doi:10.1016/S1995-7645(10)60129-0
- Naranjo, P., 1969. *Etnofarmacología de las plantas psicotrópicas de América*. Graf. Life.
- Naranjo, P., Kijjoa, A., Giesbrecht, A.M., Gottlieb, O.R., 1981. *Ocotea quixos*, American cinnamon. *J Ethnopharmacol* 4, 233–236.
- Nascimento, F.R.F., Cruz, G.V.B., Pereira, P.V.S., Maciel, M.C.G., Silva, L.A., Azevedo, A.P.S., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sciences* 78, 2650–2653. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.006
- National Toxicology Program, 2011. *Safrole*. *Rep Carcinog* 12, 374–375.
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Cabo, M.M., Galisteo, M., Cáceres, A., Morales, C., Berger, I., 2003. Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytother Res* 17, 325–329. doi:10.1002/ptr.1134
- Noriega P. 2014 Tesi di dottorato in Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Ferrara. Titolo: Studi di composizione chimica ed attività biologica di oli essenziali provenienti della regione amazzonica dell'Ecuador del Sud. Tutor prof. Stefano Manfredini; Cotutori: proff. Gianni Sacchetti e Alessandra Guerrini.
- Obame, L.C., Edou, P., Bassole, I.H.N., Koudou, J., Agnani, H., Eba, F., Traore, A.S., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil of *Dacryodes edulis* (G. Don) H. J. Lam from Gabon. *AJMR* 2, 148–152.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Fonnegra, R., Jiménez, S.L., Osorio, R.G., Saldarriaga, M., Díaz, A., 2000. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol* 73, 233–241.
- Padovani, L., Carrabba, P., Mauro, F., 2003. L'approccio ecosistemico: una proposta innovativa per la gestione della biodiversità e del territorio. *Energia, ambiente e innovazione* 49, 23–32.
- Palaniappan, K., Holley, R.A., 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 140, 164–168. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.001
- Pappalardo, S.E., 2009. Conservazione della biodiversità e conflitti ambientali nell'Amazzonia ecuadoriana: il caso della Riserva della Biosfera Yasunì. Tesis de Maestría en Ciencias Naturales. Università degli Studi di Padova.

- Paranagama, P. a., Abeysekera, K. h. t., Abeywickrama, K., Nugaliyadde, L., 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology* 37, 86–90. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01351.x
- Parodi, L.R., 1959. *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*. Editorial Acme.
- Pastor, J., García, M., Steinbauer, S., Setzer, W.N., Scull, R., Gille, L., Monzote, L., 2015. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. *Acta Tropica* 145, 31–38. doi:10.1016/j.actatropica.2015.02.002
- Pereira, W.S., Ribeiro, B.P., Sousa, A.I.P., Serra, I.C.P.B., Mattar, N.S., Fortes, T.S., Reis, A.S., Silva, L.A., Barroqueiro, E.S.B., Guerra, R.N.M., Nascimento, F.R.F., 2010. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 602–605. doi:10.1016/j.jep.2009.12.018
- Perich, M.J. (Walter R.A.I. of R., Wells, C., Bertsch, W., Tredway, K.E., 1995. Isolation of the insecticidal components of *Tagetes minuta* (Compositae) against mosquito larvae and adults. *Journal of the American Mosquito Control Association (USA)*.
- Perkins, J., n.d. 1912-1913. *Beitrage zur Flora von Bolivia*. *Bot. Jahrb. Syst* 49, 170–233.
- Pietrella, D., Angiolella, L., Vavala, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., Bistoni, F., Vecchiarelli, A., 2011. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11, 18. doi:10.1186/1472-6882-11-18
- Pinho, J.P.M. de, Silva, A.S.B., Pinheiro, B.G., Sombra, I., Bayma, J. de C., Lahlou, S., Sousa, P.J. da C., Magalhães, P.J.C., 2012. Antinociceptive and Antispasmodic Effects of the Essential Oil of *Ocimum micranthum*: Potential Anti-inflammatory Properties. *Planta Medica* 78, 681–685. doi:10.1055/s-0031-1298372
- Popov, I.N., Lewin, G., 1996. Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 31, 1–8. doi:10.1016/0165-022X(95)00021-I
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Quílez, A., Berenguer, B., Gilardoni, G., Souccar, C., de Mendonça, S., Oliveira, L.F.S., Martín-Calero, M.J., Vidari, G., 2010. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 583–589. doi:10.1016/j.jep.2010.01.060
- Radice, M., 2011. *Studi di attivita' biologica cosmeceutica di derivati di specie della zona sud orientale amazzonica ecuadoriana* (phd). Università degli Studi di Ferrara.
- Raffauf, R.F., 1990. *The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*. Dioscorides Press.
- Raghavendra Rao, R., 1988. *Florae indicae enumeratio-Asteraceae*.
- Rawcliffe, C., 1999. *Medicine and Society In Later Medieval England*. Tx Bookman Remainers, London.
- Reiche, K., 1903. *Estudios críticos sobre la Flora de Chile*. *Anales de la Universidad de Chile* 0, Pág. 97-179. doi:10.5354/0717-8883.1903.23990

- Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., Wink, D.A., 2005. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *PNAS* 102, 13147–13152. doi:10.1073/pnas.0502979102
- Rohwer, J.G., 2005. *Endlicheria* (Lauraceae).—André S. Chanderbali. 2004. New York Botanical Garden Press, New York. 141 pp. ISBN 0-89327-454-2. *Flora Neotropica Monograph* 91; *Rhodostemonodaphne* (Lauraceae).—Santiago Madriñán. 2004. New York Botanical Garden Press, New York. 102 pp. ISBN 0-89327-455-0. *Flora Neotropica Monograph* 92. These two monographs have been bound together into one volume. \$52 (cloth). *Syst Biol* 54, 860–860. doi:10.1080/10635150500234708
- Rolli, E., Marieschi, M., Maietti, S., Guerrini, A., Grandini, A., Sacchetti, G., Bruni, R., 2016. Phytotoxic Effects and Phytochemical Fingerprinting of Hydrodistilled Oil, Enriched Fractions, and Isolated Compounds Obtained from *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm. *Bark. Chemistry & Biodiversity* 13, 66–76. doi:10.1002/cbdv.201500010
- Romagnoli, C., Baldisserotto, A., Vicentini, C.B., Mares, D., Andreotti, E., Vertuani, S., Manfredini, S., 2016. Antidermatophytic Action of Resorcinol Derivatives: Ultrastructural Evidence of the Activity of Phenylethyl Resorcinol against *Microsporum gypseum*. *Molecules* 21, 1306. doi:10.3390/molecules21101306
- Rossi, D., Guerrini, A., Maietti, S., Bruni, R., Paganetto, G., Poli, F., Scalvenzi, L., Radice, M., Saro, K., Sacchetti, G., 2011. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chemistry* 126, 837–848. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.042
- Rossi, D., Guerrini, A., Paganetto, G., Bernacchia, G., Conforti, F., Statti, G., Maietti, S., Poppi, I., Tacchini, M., Sacchetti, G., 2013. *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. *Food Chemistry* 139, 439–447. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.076
- Rossi-Bergamann, B., Costa, S.S., Moraes, V.L.G. de, 1997. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Ciênc. cult. (São Paulo)* 49, 395–401.
- Røstelién, T., Borg-Karlson, A.K., Fäldt, J., Jacobsson, U., Mustaparta, H., 2000. The plant sesquiterpene germacrene D specifically activates a major type of antennal receptor neuron of the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*. *Chem. Senses* 25, 141–148.
- Ruiz, C., Cachay, M., Domínguez, M., Velásquez, C., Espinoza, G., Ventosilla, P., Rojas, R., 2011. Chemical composition, Antioxidant and Mosquito larvicidal activities of essential oils from *Tagetes filifolia*, *Tagetes minuta* and *Tagetes elliptica* from Perú. *Planta Medica* 77, PE30. doi:10.1055/s-0031-1282361
- Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A., Bruni, R., 2006. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour Fragr. J.* 21, 674–676. doi:10.1002/ffj.1648
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91, 621–632. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.031
- Sacchetti, G., Medici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Braccioli, E., Bruni, R., 2004. Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with

- Commercial Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3486–3491. doi:10.1021/jf035145e
- Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L.A., López-Arroyo, J., Alanís-Garza, B.A., Waksman de Torres, N., 2011. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011. doi:10.1093/ecam/nep127
- Santin, M.R., Santos, A.O. dos, Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., Ferreira, I.C.P., Ueda-Nakamura, T., 2009. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 105, 1489. doi:10.1007/s00436-009-1578-7
- (SCCS), S.C. on C.S., Coenraads, P.-J., 2016. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Opinion on the fragrance ingredients *Tagetes minuta* and *Tagetes patula* extracts and essential oils (phototoxicity only) in cosmetic products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 76, 213–214. doi:10.1016/j.yrtph.2015.11.006
- Scrivanti, L.R., Zunino, M.P., Zygodlo, J.A., 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 563–572. doi:10.1016/S0305-1978(02)00202-8
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., Mann, A.S., 2011. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2, 3. doi:10.4103/2231-4040.79796
- Sharapin, N., 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello.
- Singh, S., Singh, R.P., 2008. In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview. *Food Reviews International* 24, 392–415. doi:10.1080/87559120802304269
- Song, K., Zhang, J., Zhang, P., Wang, H.-Q., Liu, C., Li, B.-M., Kang, J., Chen, R.-Y., 2015. Five new bioactive compounds from *Chenopodium ambrosioides*. *J Asian Nat Prod Res* 17, 482–490. doi:10.1080/10286020.2015.1042872
- Stranden, M., Borg-Karlson, A.-K., Mustaparta, H., 2002. Receptor neuron discrimination of the germacrene D enantiomers in the moth *Helicoverpa armigera*. *Chem. Senses* 27, 143–152.
- Stranden, M., Liblikas, I., König, W.A., Almaas, T.J., Borg-Karlson, A.-K., Mustaparta, H., 2003. (-)-Germacrene D receptor neurones in three species of heliothine moths: structure-activity relationships. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 189, 563–577. doi:10.1007/s00359-003-0434-y
- Stringaro, A., Vavala, E., Colone, M., Pepi, F., Mignogna, G., Garzoli, S., Cecchetti, S., Ragno, R., Angiolella, L., 2014. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil Alone or in Combination with Other Drugs in *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, e125904. doi:10.1155/2014/125904
- Sud'ina, G. f., Mirzoeva, O. k., Pushkareva, M. a., Korshunova, G. a., Sumbatyan, N. v., Varfolomeev, S. d., 1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Letters* 329, 21–24. doi:10.1016/0014-5793(93)80184-V
- Telascrea, M., de Araújo, C.C., Marques, M.O.M., Facanali, R., de Moraes, P.L.R., Cavalheiro, A.J., 2007. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 222–232. doi:10.1016/j.bse.2006.09.015

- Thorne, D., Kilford, J., Hollings, M., Dalrymple, A., Ballantyne, M., Meredith, C., Dillon, D., 2015. The mutagenic assessment of mainstream cigarette smoke using the Ames assay: A multi-strain approach. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 782, 9–17. doi:10.1016/j.mrgentox.2015.03.006
- Trabadela, C., Sánchez-Fidalgo, S., Miño, P., Berenguer, B., Quilez, A., Puerta, R. de la, Martín, M.J., 2008. Gastroprotective Effects of Piper carpunya Against Diclofenac-Induced Gastric Lesions in Rats. *Pharmaceutical Biology* 46, 829–837. doi:10.1080/13880200802366686
- TrivellatoGrassi, L., Malheiros, A., Meyre-Silva, C., da Silva Buss, Z., Monguilhott, E.D., Fröde, T.S., da Silva, K.A.B.S., de Souza, M.M., 2013. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 145, 127–138. doi:10.1016/j.jep.2012.10.040
- Turgis, M., Vu, K.D., Dupont, C., Lacroix, M., 2012. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International* 48, 696–702. doi:10.1016/j.foodres.2012.06.016
- Tyagi, A.K., Malik, A., 2010. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against candida albicans: microscopic observations and chemical characterization of cymbopogon citratus. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10, 65. doi:10.1186/1472-6882-10-65
- Tzortzakis, N.G., Economakis, C.D., 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 253–258. doi:10.1016/j.ifset.2007.01.002
- UNCTAD BioTrade Initiative, BioTrade Principles and Criteria (2007) (UNCTAD/DITC/TED/2007/4)
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- van der Werff, H., 2001. New Taxa and Combinations in *Ocotea* (Lauraceae) from Central America. *Novon* 11, 501–511. doi:10.2307/3393168
- Vargas, L., Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Palá-Paúl, J., Vallejo, M.C.G., 2004. Essential Oil Composition of the Leaves and Spikes of *Piper carpunya* Ruiz et Pavón (Piperaceae) from Peru. *Journal of Essential Oil Research* 16, 122–123. doi:10.1080/10412905.2004.9698669
- Vertuani, S., Beghelli, E., Scalambra, E., Malisardi, G., Copetti, S., Toso, R.D., Baldisserotto, A., Manfredini, S., 2011. Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. *Molecules* 16, 7068–7080. doi:10.3390/molecules16087068
- Webb, L.J., others, 1948. Guide to the medicinal and poisonous plants of Queensland. Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia.
- Yap, P.S.X., Lim, S.H.E., Hu, C.P., Yiap, B.C., 2013. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine* 20, 710–713. doi:10.1016/j.phymed.2013.02.013
- Ye, H., Liu, Y., Li, N., Yu, J., Cheng, H., Li, J., Zhang, X.-Z., 2015. Anti-*Helicobacter pylori* activities of *Chenopodium ambrosioides* L. in vitro and in vivo. *World J. Gastroenterol.* 21, 4178–4183. doi:10.3748/wjg.v21.i14.4178
- Zardini, E.M., 1984. Ethnobotanic of Argentine Compositae with special reference to pharmacological use. *Acta Farm Bonaerense* 3, 169–94.

Zygadlo, J.A., Guzman, C.A., Grosso, N.R., 1994. Antifungal Properties of the Leaf Oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research* 6, 617–621. doi:10.1080/10412905.1994.9699353

SITOGRAFIA

BURSERACEAE - InfoErbe, n.d. URL (accessed 10.27.16).

http://www.infoerbe.it/index.php?option=com_infoerbe&task=termine&idg=676

Copal resin - Life in the Rainforest, n.d. URL

<http://www.lifeintherainforest.org/copal-resin> (accessed 10.27.16).

Dacryodes peruviana - Useful Tropical Plants, n.d. URL

<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Dacryodes+peruviana> (accessed 10.27.16).

GREEN PARADISE, n.d. URL

<http://www.greenparadisecolombia.com/wp-content/uploads/flipbook/2/book.html#p=10> (accessed 12.12.16).

Myristaldehyde - Tobacco Products, n.d. URL

<http://tobaccoproducts.org/index.php/Myristaldehyde> (accessed 12.12.16).

Ocotea cernua, n.d. URL

<http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/croat/specie/Ocotea%20cernua,e,n> (accessed 12.12.16).

Ocotea cernua - Useful Tropical Plants, n.d. URL

<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Ocotea+cernua> (accessed 12.12.16).

¿Qué es el mal aire?, n.d. URL

<http://esoterismo.innatia.com/c-rituales-proteccion/a-que-es-el-mal-aire-6430.html> (accessed 10.27.16).

Schinus Molle, n.d. . Encyclopedia of Life. URL

http://www.eol.org/data_objects/30291117 (accessed 12.13.16).

Taylor, n.d. The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals: Leslie Taylor: 9780757001444: Amazon.com: Books. URL

https://www.amazon.com/gp/product/0757001440/ref=as_li_qf_sp_asin_il_tl?ie=UTF8&camp=1789&creative=9325&creativeASIN=0757001440&linkCode=as2&tag=rainfodataba-20 (accessed 12.14.16).

Tropicos | Name - Piper carpunya Ruiz & Pav. [WWW Document], n.d. URL

<http://www.tropicos.org/Name/25000502> (accessed 12.12.16).

<http://www.cbd.int/decision/cop/default.shtml?id=7148>

www.ambiente.gob.ec

<http://mapic.federchimica.it>

<http://www.cosmeticaitalia.it>

<http://chankuap.org>

<http://olmo.elet.polimi.it/ecologia/dispensa/node69.html>

http://www.syform.com/wp-content/uploads/2013/06/CURCUMA_monografia.pdf

APPENDICE

Di seguito sono riportate le pubblicazioni su rivista e le partecipazioni a congresso a cui ho contribuito durante il periodo di dottorato.

Come emerge dall'elenco, oggetto del lavoro di dottorato è stato anche l'olio essenziale di una pianta amazzonica, *Hediosmum sprucei*, che non compare però nella tesi. La motivazione di questa esclusione, nonostante il lavoro prodotto abbia condotto alla pubblicazione, è stata dettata esclusivamente da limitazioni tecniche legate al poco quantitativo di olio essenziale a disposizione che ci ha permesso di verificarne la composizione chimica e la bioattività, ma in relazione a quest'ultima solamente per un ristretto panel di saggi sviluppato per una più pragmatica esigenza pubblicativa. Nell'ottica quindi di produrre una tesi che esponesse il più possibile una ricerca condotta con linearità ed omogeneità di presupposti, di risultati e di finalità si è preferito non considerare l'olio essenziale di *Hediosmum sprucei* nella composizione dell'elaborato, ma di riportarne comunque le evidenze che attestassero il lavoro svolto in questa appendice. In questi tre anni di dottorato ho avuto l'opportunità di applicare i metodi e le strategie di ricerca riportati in questa tesi anche in altri contesti (per le stesse ragioni qui documentati solo in appendice), che tuttavia riguardavano sempre la caratterizzazione chimica e biologica di metaboliti secondari di origine vegetale e le loro possibili applicazioni. Tutto questo ha complessivamente contribuito ad aumentare e migliorare le competenze tecniche che via via andavo ad acquisire nel mio percorso formativo di dottorato in Scienze Biomediche e Biotecnologiche.

ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTA:

1. Rolli E, Marieschi M, Maietti S, Guerrini A, **Grandini A**, Sacchetti G and Bruni R. Phytotoxic Effects and Phytochemical Fingerprinting of Hydrodistilled Oil, Enriched Fractions, and Isolated Compounds Obtained from *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm. Bark. *Chemistry and Biodiversity*, 2016; 13 (1): 66-76
2. Guerrini A, Sacchetti G, **Grandini A**, Spagnoletti A, Asanza M and Scalvenzi L. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian

Hedyosmum sprucei Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016.

3. Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, **Grandini A**, Akin M, Cellini L, Bisignano G and Saraçoğlu H T. *In vitro* activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. International Journal of Food Microbiology, 2016; 238: 33-39

4. Tardugno R, Spagnoletti A, **Grandini A**, Maresca I, Sacchetti G, Pellati F and Benvenuti S. Chemical profile and biological activities of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon bark essential oil, Plant Biosystems, 2016; 1-10.

5. Rita Cortesi, Giuseppe Valacchi, Ximena M. Muresan, Markus Drechsler, Catia Contado, Elisabetta Esposito, **Alessandro Grandini**, Alessandra Guerrini, Giuseppe Forlani, Gianni Sacchetti. Nanostructured lipid carriers (NLC) for the delivery of natural molecules with antimicrobial activity: production, characterization and in vitro studies. Journal of Microencapsulation 2017; 34(1):63-72.

PRESENTAZIONI A CONGRESSI:

A. Guerrini A, Tacchini M, **Grandini A**, Spagnoletti A, Maresca I, Rossi D, Maietti S, Sacchetti G. HP-TLC bioautographic assay as a preliminary research tool to match chemical and biological properties of officinal plant. In: 109° Congresso della Società Botanica Italiana. Firenze, 02/09/2014 – 05/09/2014. p XXIV

B. Spagnoletti A, **Grandini A**, Tacchini M, Rossi D, Maresca I, Maietti S, Guerrini A, Sacchetti G. Chemical composition and biological activities of *Zingiber officinale* Roscoe essential oil from Amazonian and Chinese plants. . In: 109° Congresso della Società Botanica Italiana. Firenze, 02/09/2014 – 05/09/2014. p 143

C. Tacchini M, Spagnoletti A, **Grandini A**, Maresca I, Efferth T, Guerrini A, Sacchetti G. *Convolvulus pluricaulis*, an ayurvedic herbal tool for human and plant well being. In 110° Congresso della Società Botanica Italiana. Pavia, 14/09/2015 – 17/09/2015. p XXX

D. **Grandini A**, Tacchini M, Ballesteros Lara JL, Spagnoletti A, Maresca I, Sacchetti G, Guerrini A. Chemical composition and synergistic bioactivities of amazonian essential oils. In 111° Congresso della Società Botanica Italiana. Roma, 21/09/2016 – 23/09/2016. p 104