

Giornata formativa “Il mondo degli oli essenziali”



Imola, 10 novembre 2017, Aula Magna dell'Università di Bologna in Palazzo Vepignani
Si svolgerà ad Imola una “Giornata formativa” sugli Oli Essenziali co-organizzata dalla SIROE (Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali), unitamente all'Università di Bologna (Corsi di Laurea in: “Verde Ornamentale e Tutela del Paesaggio” e “Scienze Farmaceutiche applicate curriculum Tecniche Erboristiche”).

Referenti per l'Università di Bologna:

Prof.ssa Maria Grazia Bellardi (mariagrazia.bellardi@unibo.it) e Prof. Ferruccio Poli (ferruccio.poli@unibo.it)

Contatto SIROE: Dott.ssa Maura Di Vito (wdivit@gmail.com)

Si tratta di un momento di riflessione che la Ricerca Scientifica offre a tutti gli appassionati, i cultori e gli specialisti del vasto ed affascinante universo degli Oli essenziali e delle piante da cui si distillano, a tutti coloro che, già inseriti nel mondo del lavoro, desiderano conoscerne le innumerevoli potenzialità e, soprattutto, ai giovani studenti, sia universitari, sia degli Istituti agrari.

In mattinata saranno esaminati due **Progetti biennali di Ricerca dell'Università di Bologna** (finanziati dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Imola) dedicati al genere *Monarda* spp., in particolare alle specie *M. fistulosa* e *M. didyma* (Lamiaceae), terminati nel 2016. Dal 2012 queste due specie vengono coltivate nei campi sperimentali dell'**ITAS Ghini-Scarabelli di Imola** per essere valutate come ornamentali ed orticole e quindi sottoposte, nel ruolo di officinali, a distillazione presso il **Giardino delle Erbe di Casola Valsenio** (Ravenna). Gli oli essenziali e gli idrolati ottenuti in 5 anni di indagini sono stati oggetto di numerose ricerche in diversi settori scientifici (Entomologico, Microbiologico, Artistico-Culturale, Virologico, Fitopatologico, ecc.), da parte di studiosi afferenti anche ad altri Atenei e centri di ricerca italiani (**CNR, Istituto Superiore di Sanità, Sant'Orsola-Malpighi di Bologna, Università “G.D'Annunzio” di Chieti**, ecc.). Verranno quindi esposti i risultati conseguiti ed illustrate le prospettive future di impiego.

La seconda parte della Giornata sarà invece dedicata alla pianta, intesa come “sorgente” di olio essenziale, per cui si partirà dall'elemento vegetale per arrivare al prodotto finale ed alle sue molteplici attività biologiche.

Gli **obiettivi principali dell'evento** sono quindi quelli di:

1. approfondire la conoscenza della fitochimica degli oli essenziali ed idrolati di *Monarda* spp.;
2. descrivere i potenziali impieghi degli oli essenziali e degli idrolati focalizzando sulla loro efficacia e sicurezza d'uso;
3. valutare le possibili integrazioni degli oli essenziali in vari contesti disciplinari (Agronomico, Microbiologico, Artistico-Culturale, Medico, Fitopatologico, ecc...);
4. esaminare la filiera di produzione del prodotto finito olio essenziale / idrolato.

Al termine dell'evento, i partecipanti saranno in grado di individuare i criteri fondamentali per garantire qualità, sicurezza ed efficacia degli oli essenziali, le modalità di applicazione ma anche le eventuali controindicazioni degli stessi. Di seguito si riportano le sintesi delle dieci relazioni inserite nel programma.

ILLUSTRAZIONE DEL PROGETTO “MONARDA”: INTERAZIONI TRA RICERCA E DIDATTICA

Maria Grazia Bellardi

Dipartimento di Scienze Agrarie – Area Patologia Vegetale, Università di Bologna, Italia; mariagrazia.bellardi@unibo.it

Introduzione. Il genere *Monarda* spp. (Lamiaceae) comprende almeno 21 specie di piante erbacee annuali e perenni, rizomatose e cespitose. Il termine “Monarda” venne attribuito da Linneo in onore di Nicolas Monardes (1493-1588), medico e botanico spagnolo, fondatore della farmacognosia e autore di *Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales*: primo libro sulla flora medicinale del Nord America, scritto nel 1574.

Nel 2011 si è concretizzata una collaborazione tra l'Università di Bologna (DipSA-Area di Patologia Vegetale e Area di Microbiologia), l'Università di Chieti (Dipartimento del Farmaco), l'ITAS Scarabelli-Ghini di Imola e il Giardino delle Erbe di Casola Valsenio (Ravenna), con il Progetto di Ricerca biennale (2012-2013) “Valutazione Agronomico-Colturale e Fitoterapica di differenti specie di *Monarda* da utilizzare per scopi Ornamentali e Officinali in Emilia-Romagna” (finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Imola). A seguito dei risultati conseguiti, si è proseguito con il secondo Progetto biennale (2015-2016) “Esperienze di coltivazione e commercializzazione di *Monarda fistulosa* e *M. didyma* in Aziende agricole di cinque regioni italiane per l'inserimento nel Mercato ornamentale, orticolo e officinale; valutazione antimicrobica dell'olio essenziale in Agricoltura e in Medicina umana e veterinaria”.

Scopi. Il primo Progetto ha avuto come scopo quello di approfondire e valorizzare le proprietà della Monarda, pianta dotata di qualità ornamentali, orticole ed officinali. Infatti, oltre ad essere ricca di principi attivi, può essere impiegata in cucina (per salse, pietanze e bevande dissetanti) e in giardino per le gradevoli e colorate fioriture (Fig. 1). Il secondo Progetto ha avuto come scopo quello di approfondire alcuni aspetti concernenti la coltivazione delle due specie e le proprietà dell'olio essenziale (OE) e degli idrolati mediante applicazioni in Microbiologia Agraria, Agricoltura (Entomologia, Fitopatologia, Nematologia), Medicina umana e Conservazione dei beni culturali.

Materiali e Metodi. Dal 2012 al 2016 sono stati allestiti impianti (da seme) a Imola e presso il Giardino delle Erbe; è stata eseguita una valutazione degli aspetti agronomico-colturali, ivi compresi quelli di tipo fitosanitario; sono state effettuate distillazioni del materiale vegetale raccolto (con e senza fiori); gli OE e gli idrolati, una volta analizzati (mediante GC-MS), sono stati impiegati nei diversi settori della Ricerca Scientifica prima nominati.

Risultati. Un importante risultato è stato quello di avere avvicinato gli studenti dell'ITAS Scarabelli-Ghini e universitari (tirocinanti e laureandi) al mondo della Ricerca scientifica e all'universo degli OE in particolare, scoprendone le innumerevoli potenzialità. I ragazzi hanno preparato tesine, preso parte alla stesura di articoli divulgativi sulla Monarda ed esposto essi

stessi i risultati conseguiti a convegni e manifestazione, come al “Fascinati days plant” (2013; Imola) e ad “Expo 2015” (Milano), ove un gruppo di studenti e laureati del Corso di Laurea in Verde Ornamentale e Tutela del Paesaggio ha presentato la relazione “Monarda: pianta dalle mille virtù”.

Conclusioni. Questi cinque anni dedicati alla Monarda dimostrano come una singola pianta possa destare l'interesse di studiosi appartenenti a settori diversi della Ricerca scientifica, coinvolgendo ed appassionando i giovani, rendendoli protagonisti di attività pratiche di campo (Fig. 2) e laboratorio.



Fig 1 - *Monarda didyma* (A) e *M. fistulosa* (B).



Fig 2 - Alle varie operazioni colturali (semine, trapianto, diserbo, ecc.) hanno partecipato gli studenti dell'ITAS Ghini-Scarabelli di Imola e dell'Università di Bologna (tirocinanti e laureandi).

IDROLATO ED OLIO ESSENZIALE DI *MONARDA FISTULOSA* E *MONARDA DIDYMA*: EVIDENZE PER UNA POTENZIALE APPLICAZIONE COME ANTIMICROBICI

Paola Mattarelli, Cristina Sansosti, Monica Modesto

Dipartimento di Scienze Agrarie – Area Microbiologia - Alma Mater Studiorum Università di Bologna; e-mail: paola.mattarelli@unibo.it

Introduzione. L'aumento dell'antibiotico resistenza dei microrganismi patogeni è sempre più evidente e drammatico: in questo scenario lo studio dell'attività antimicrobica degli oli essenziali (OE) è di grande rilievo per la possibilità di individuare nuove strategie a supporto delle terapie antimicrobiche. L'impiego degli OE in medicina, veterinaria, industria alimentare e agricoltura non ha evidenziato, infatti, la presenza di geni di resistenza nei microrganismi bersaglio: i patogeni non riescono a sviluppare resistenza verso i molteplici meccanismi molecolari messi in atto dai numerosi componenti bioattivi con attività sinergica presenti negli OE. La ricerca di nuovi OE, inoltre, può contribuire ad individuare molecole antimicrobiche attive per diversi scopi applicativi. **Scopo.** La presente attività di ricerca ha riguardato lo studio dell'attività antimicrobica di OE ed idrolati di *Monarda fistulosa* e *M. didyma*, appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae, che grazie all'elevata presenza di timolo possono rivelarsi molto promettenti contro microrganismi patogeni. In particolare sono stati messi a confronto gli OE derivati da piante coltivate in due anni consecutivi al fine di evidenziare possibili differenze di attività antimicrobica. **Materiali e Metodi.** Gli OE *M. fistulosa* e *M. didyma* sono stati ottenuti da coltivazioni delle relative piante officinali presso l'ITAS Ghini-Scarabelli di Imola e "Il Giardino delle Erbe" di Casola Valsenio (Ravenna). I microrganismi saggiati sono stati sia lieviti (*Candida albicans* ATCC 48274, *Candida pseudointermedia* CBS 6918, *Candida stellata* CBS 943, *Candida tropicalis* CBS 94, *Candida utilis* CBS 621), sia batteri patogeni per l'uomo e gli animali (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* M12, *Staphylococcus aureus*), sia batteri benefici (*Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* MB29, *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* T6). La MIC (Minimal Inhibitory Concentration) è stata valutata utilizzando il metodo validato secondo CLSI. Brevemente, i microrganismi sono stati coltivati nel substrato idoneo (YPD per i lieviti, Nutrient Broth per i patogeni e MRS addizionato di cisteina 0.05% per i bifidobatteri) ed incubati nelle condizioni appropriate (30°C per i lieviti e 37°C per tutti gli altri). Per quanto riguarda gli OE, è stato utilizzato il tween 80 (0.001%) come emulsionante per aumentarne la solubilità e sono state saggiate le concentrazioni da 0.0078 a 4%. Per quanto riguarda gli idrolati sono state saggiate le diluizioni 1:2, 1:4 e 1:8. Sono state inoculate 10⁵ cellule per pozzetto in piastre multiwell da 96 pozzetti e la crescita microbica è stata valutata a 24 e 48 ore mediante lettura spettrofotometrica

a 600 nm. La MLC (Minimal Lethal Concentration) è stata misurata inoculando in piastra 10µl prelevati dai 3 pozzetti adiacenti al pozzetto dove si osservava la crescita e incubando alle condizioni adatte ai vari microrganismi saggiati. **Risultati.** Nonostante la composizione degli OE sia diversa fra le due specie di *Monarda* e fra i diversi anni di coltivazione, gli OE hanno mostrato una simile attività antimicrobica verso i lieviti e i batteri saggiati. In generale, gli OE testati hanno rivelato bassi valori di MIC, cioè una più forte attività antimicrobica, verso i microrganismi patogeni come *E. coli* e *C. albicans*, rispetto alle MIC attive verso i microrganismi benefici come i bifidobatteri. Gli idrolati di *Monarda* mostrano anch'essi attività antimicrobica paragonabile a quella degli OE: gli idrolati, essendo già in un mezzo acquoso, potrebbero avere una maggiore facilità di impiego non richiedendo emulsionanti.

Conclusioni: La maggiore sensibilità dei microrganismi patogeni supporta un potenziale utilizzo degli OE di *Monarda* come agenti antimicrobici grazie al loro vantaggioso profilo di selettività. Possibili applicazioni potrebbero essere in campo medico-veterinario, alimentare e agronomico. Tuttavia saranno necessari studi *in vivo* per confermare i dati ottenuti *in vitro*.

GLI OLI ESSENZIALI COME AGENTI DI CONTROLLO BIOLOGICO DELLE BATTERIOSI VEGETALI: IL CANCRO BATTERICO DELL'ACTINIDIA

Paola Minardi

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - DIMEVET, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (Bologna), Italia; paola.minardi@unibo.it

Introduzione. L'efficacia antimicrobica degli oli essenziali (OE), nota fin dal XVI sec., è stata evidenziata anche nei confronti di microrganismi fitopatogeni. In agricoltura la crescente necessità di limitare l'impiego di sostanze sintetiche per il controllo delle malattie delle piante ha reso tali sostanze naturali sempre più interessanti dal punto di vista applicativo per il minore impatto sull'ambientale e sulla sicurezza alimentare riscuotendo una maggiore attenzione anche da parte dei consumatori. Per quanto riguarda le batteriosi vegetali, ancora oggi il loro controllo è affidato all'impiego di antibiotici, nei Paesi dove è permesso, o di prodotti rameici che però sono del tutto inefficaci nei confronti dei batteri endofiti in piante asintomatiche. La necessità di strategie alternative per il controllo e la gestione delle batteriosi, da adottare specialmente nelle coltivazioni biologiche, è sempre più impellente. Recenti studi sull'attività antimicrobica degli OE prodotti in piante aromatiche hanno evidenziato il ruolo cruciale svolto dalla comunità microbica endofita biologicamente attiva nel controllo di batteri fitopatogeni. Infatti, la composizione di tale microbioma varierebbe con l'età della pianta aromatica e sarebbe connessa alla composizione (in particolare timolo e/o carvacrolo) degli OE che eserciterebbero

un'elevata pressione selettiva proprio sui gruppi batterici endofiti componenti il microbioma delle piante officinali capaci a loro volta di influenzarne le capacità antimicrobiche. Pertanto, l'ipotesi di somministrare alle piante OE o loro idrolati (Id) per interferire e bloccare la crescita di batteri fitopatogeni potrebbe costituire un importante strumento di controllo biologico. **Scopi.** L'attività antimicrobica *in vitro* ed *in planta* di OE e Id ottenuti da piante di *Monarda didyma* e *M. fistulosa* è stata valutata nei confronti di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Takikawa et al. (Psa), batterio da quarantena che causa il cancro batterico dell'actinidia. Infatti, gli OE ottenuti da *Monarda* spp. sono caratterizzati da un elevato contenuto di monoterpeni, come ad esempio il timolo (30 ÷ 60 %), il carvacrolo (> 4%) ed il loro precursore *p*-cimene (10 ÷ 14 %), usati nell'industria alimentare come additivi per preservare gli alimenti proprio grazie ai loro effetti antimicrobici.

Materiali e Metodi. Piantine di *A. deliciosa* cv. Tomouri (7-8 foglie) sono state suddivise in tesi (40 piante/tesi) corrispondenti a trattamenti con acqua distillata sterile (ADS, controllo), con Id (14,7, 20, 25 %), OE (0,3 %), streptomina (100 mg/L) o Poltiglia Disperss (2,5 gr/L). 24 ore dopo i trattamenti (Fig. 1a), 20 piante/tesi sono state inoculate con Psa ($\sim 10^7$ CFU/mL) mentre le altre 20 piante/tesi sono state trattate con ADS. Lo stato fitosanitario delle piante è stato controllato sia per la comparsa di danni dovuti a ciascun trattamento sia delle maculature fogliari indotte da Psa.

Risultati. Gli Id ed OE sono stati in grado di ridurre l'intensità dei sintomi nelle piante inoculate con Psa rispetto a quelle che non hanno subito alcun trattamento pre-infezionale (Fig. 1b). L'efficacia degli Id ed OE è stata messa in relazione con le rispettive composizioni chimiche determinate mediante cromatografia GC/MS ad alto contenuto dei monoterpeni sopracitati.

Conclusioni. L'efficacia antimicrobica indotta dai trattamenti pre-infezionali con gli Id è molto incoraggiante per l'eventuale applicazione in campo finalizzato al controllo del cancro batterico dell'actinidia. Infatti, la composizione chimica degli Id è molto diluita rispetto ai corrispondenti OE rappresentando spesso "prodotti di scarto" nel processo di distillazione e quindi l'azione protettiva nei confronti di Psa, senza causare effetti tossici indesiderati osservati in alcuni casi con gli OE, svolge un ruolo critico nella messa a punto di formulati a base di antimicrobici naturali. Le piante officinali, considerate quindi come sorgenti di nuovi agenti antimicrobici mediante l'impiego sia dei loro OE/Id sia dei loro batteri endofiti, offrono approcci promettenti ed alternativi nel controllo biologico delle malattie batteriche delle piante degni di essere più studiati in modo più approfondito.



Fig 1 - a) Trattamenti pre-infezionali di piantine di *A. deliciosa* cv. Tomouri e b) maculature fogliari necrotiche circondate da alone clorotico indotte dal ceppo virulento di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 6 giorni dopo l'inoculazione in piante pretrattate solo con acqua sterile.

IDROLATI DI *MONARDA* SPP. COME ANTIMICROBICI IN SUBSTRATI ARTIFICIALI PER L'ALLEVAMENTO *IN VITRO* DELL'INSETTO PARASSITOIDE *EXORISTA LARVARUM*

Maria Luisa Dindo

Dipartimento di Scienze Agrarie – Area Entomologia - Alma Mater Studiorum Università di Bologna; e-mail: marialuisa.dindo@unibo.it

Introduzione. Un obiettivo dell'agricoltura sostenibile è la riduzione dell'uso di prodotti di sintesi per la protezione della colture da insetti dannosi, attraverso la lotta biologica, che è basata sull'impiego di insetti antagonisti delle specie nocive. Tali antagonisti possono essere predatori o "parassitoidi": le femmine di questi ultimi cercano i loro insetti ospiti per deporre le proprie uova sopra, o dentro, il loro corpo. Le larve fuoriuscite dalle uova si sviluppano a spese dell'insetto ospite e lo uccidono. Un esempio di parassitoide è il dittero *Exorista larvarum*, che in natura attacca bruchi di varie specie di farfalle dannose a piante di interesse agrario o forestale. Contro tali bruchi, si può pensare di "lanciare" *E. larvarum* in gran numero, in alternativa ad altri tipi di trattamenti, ma, per questo, occorre allevare il parassitoide in quantitativi elevati, a costi possibilmente contenuti. In ricerche precedenti, è stata messa a punto una tecnica di allevamento "*in vitro*" per *E. larvarum*, grazie a cui il parassitoide non viene allevato a spese di un insetto ospite. Le sue uova vengono, infatti, poste direttamente su un substrato "artificiale" di semplice preparazione e composto da materiali grezzi come latte scremato, tuorlo d'uovo e lievito. Con tale procedura, più snella dell'allevamento tradizionale, si possono, comunque, ottenere buone rese in adulti fertili. Per evitare la contaminazione del substrato da parte di batteri e altri microrganismi, il substrato stesso viene normalmente addizionato con un antibiotico ad ampio spettro, la gentamicina, il cui uso prolungato potrebbe, però, indurre, nei microrganismi, fenomeni di resistenza. Pertanto è giustificata la ricerca di valide alternative, più naturali.

Scopi. Scopo del lavoro, svolto in collaborazione con colleghi del Dipartimento, è stato quello di saggiare le proprietà antimicrobiche di idrolato di *Monarda fistulosa*, in sostituzione della soluzione di gentamicina, abitualmente utilizzata nei substrati artificiali per l'allevamento *in vitro* di *E. larvarum*. La scelta è caduta su *M. fistulosa* perché, in uno studio precedente, si era dimostrata non nociva nei confronti degli adulti del parassitoide. Si è scelto di utilizzare l'idrolato, piuttosto che l'olio essenziale, perché si temeva che quest'ultimo, più attivo, potesse avere effetti negativi sullo sviluppo del parassitoide (Fig. 1).

Materiali e Metodi. Sono state condotte due sperimentazioni. In entrambe, l'allevamento *in vitro* è stato effettuato utilizzando piastre in plastica a 24 pozzetti, in ciascuno dei quali venivano posti il substrato artificiale e un uovo di *E. larvarum*. Nella prima sperimentazione, la preparazione del substrato è avvenuta secondo la metodologia già collaudata, ma la soluzione di gentamicina è stata sostituita con una soluzione di idrolato di

M. fistulosa. Nella seconda, l'idrolato è stato somministrato in aerosol, ponendolo in uno dei pozzetti della piastra, poi sigillata. In entrambe le sperimentazioni, i substrati con idrolato sono stati posti a confronto con un controllo positivo (substrato con gentamicina) e uno negativo (privo di antimicrobici). Nei vari substrati, lo sviluppo del parassitoide è stato seguito fino alla formazione degli adulti. Delle femmine è stata verificata la capacità di deporre uova fertili.

Risultati. Nelle prove in cui l'idrolato è stato incorporato al substrato, il parassitoide si è sviluppato a livelli paragonabili al controllo positivo (substrato con gentamicina) e le femmine ottenute hanno dimostrato di essere in grado di deporre uova fertili. Nella seconda sperimentazione, in cui l'idrolato è stato somministrato come aerosol, lo sviluppo del parassitoide è stato in parte compromesso e le femmine hanno deposto meno uova rispetto al controllo positivo. In entrambe le sperimentazioni, il parassitoide si è sviluppato a scarsi livelli sul controllo negativo (substrato privo di antimicrobici).

Conclusioni. L'idrolato ha dimostrato di avere buone proprietà antimicrobiche e non esagerate conseguenze sulla produzione del parassitoide e sulla fecondità delle femmine quando è stato incorporato al substrato, mentre la somministrazione in aerosol si è dimostrata meno idonea. Va quindi privilegiata la prima tecnica. Sono in corso analisi microbiologiche di substrati analoghi a quelli qui impiegati, al fine di meglio chiarire le potenzialità dell'idrolato di *M. fistulosa* come sostitutivo "naturale" della gentamicina per l'allevamento *in vitro* di *E. larvarum*.



Fig 1 - La distillazione in corrente di vapore consente di separare l'olio essenziale (in alto) dall'idrolato (o acqua aromatica) (in basso).

ATTIVITÀ BIOCIDA DEGLI OLI ESSENZIALI DI MONARDA SU NEMATODI FITOPARASSITI DI INTERESSE AGRARIO

Trifone D'Addabbo¹, Sebastiano Laquale¹, Mariapia Argentieri², Maria Grazia Bellard³, Pinarosa Avato²

¹Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante - CNR; trifone.daddabbo@ipspp.cnr.it

²Dipartimento Farmaco-Chimico-UNIBA

³Dipartimento di Scienze Agrarie-Università di Bologna

Introduzione. I nematodi fitoparassiti sono tra le più pericolose avversità delle piante agrarie a causa delle forti perdite di produzione causate ad un gran numero di colture di interesse economico. La scomparsa dal mercato di gran parte dei più efficaci nematocidi di sintesi ha incentivato la ricerca di mezzi di lotta più sostenibili, tra cui prodotti biocidi di origine vegetale quali gli oli essenziali (OE). L'attività nematocida degli OE e dei loro principali componenti è ampiamente documentata in letteratura e tali sostanze potrebbero costituire delle potenziali materie prime per la formulazione di nuovi nematocidi a maggiore sostenibilità ambientale. Gli OE di specie di *Monarda* potrebbero costituire degli ottimi candidati per la formulazione di tali prodotti, visto che per i principali costituenti monoterpeneici di tali OE è già stata documentata un'elevata tossicità nei confronti di nematodi galligeni del genere *Meloidogyne*.

Scopi. Obiettivo principale del programma di studi *in vitro* ed *in vivo* oggetto della presentazione è stato quello di caratterizzare l'attività nematocida degli OE di due specie di *Monarda*, *M. didyma* e *M. fistulosa*, sul nematode galligeno *Meloidogyne incognita*.

Materiali e Metodi. Nelle prove *in vitro* larve infettive o masse d'uova di *M. incognita* sono state esposte per differenti tempi ad un range di concentrazioni degli OE di *M. didyma* e *M. fistulosa* e dei loro principali componenti. L'effetto dei trattamenti sulla mobilità e vitalità delle larve è stato determinato mediante osservazione microscopica, mentre la potenziale attività ovicida dei due OE è stata valutata sottoponendo le masse d'uova trattate ad un test di schiusura.

L'attività *in vivo* è stata determinata mediante trattamento con differenti concentrazioni degli OE di *M. didyma* e *M. fistulosa* di un terreno fortemente infestato da *M. incognita*, in cui è stato successivamente eseguito un saggio su pomodoro in vaso.

Risultati. Entrambi gli OE sono risultati altamente tossici verso le larve di *M. incognita* anche a concentrazioni molto ridotte, così come hanno determinato una significativa riduzione delle percentuale di schiusura delle uova. Tutti i trattamenti al terreno con le soluzioni acquose dei due OE in prova hanno determinato una significativa riduzione della infestazione di *M. incognita* sulle radici di pomodoro.

Conclusioni. Gli OE di *M. didyma* e *M. fistulosa* hanno evidenziato un'elevata attività nei confronti di *M. incognita* e, pertanto, sono da considerare degli interessanti materiali per la formulazione di nuovi prodotti per una gestione sostenibile degli attacchi di nematodi fitoparassiti.

OLI ESSENZIALI: UN POSSIBILE AIUTO PER PRESERVARE LE NOSTRE OPERE D'ARTE

M. Di Vito¹, M.G. Bellardi¹, P. Colaizzi², D. Ruggiero², Claudia Mazzuca³, Laura Micheli⁴, S. Sotgiu⁵, S. Jannuccelli⁵, M. Michelozzi⁵, F. Mondello⁵, M.C. Sclocchi² & P. Mattarelli¹

¹Dip. di Scienze Agrarie, Università di Bologna, Italia, ²Istituto Centrale Restauro e Conservazione Patrimonio Archivistico e Librario (ICRCPAL), MIBACT, Roma, Italia, ³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di "Tor Vergata", Roma, Italia, ⁴Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBBR), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Firenze, Italia, ⁵Dip. di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate (MIP), Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma, Italia e-mail: wdivit@gmail.com

Introduzione. Da diversi anni il nostro gruppo di ricerca indaga le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali e degli idrolati di diverse piante aromatiche tra cui specie appartenenti al genere *Monarda* spp. Ultimamente, alcuni studi sono stati condotti nell'ambito dei beni culturali al fine di indagare possibili applicazioni degli oli essenziali nel prevenire o bloccare l'attacco biocida su opere di grande interesse. In collaborazione con specialisti afferenti all'ICRCPAL, all'Università di Roma Tor Vergata e al CNR di Firenze, il nostro gruppo di ricerca ha indagato l'azione antifungina di diversi idrolati quando combinati con un idrogel di Gellano che dal 2003 è stato usato come agente pulente per le opere cartacee. Negli anni diverse modifiche ne hanno incrementato questa forza pulente, senza però conferirgli anche un'azione citocida o citostatica che lo rendesse stabile agli attacchi microbici.

Scopo. Per quanto specificato, il primo scopo della ricerca è stato quello di conferire al Gellano una resistenza agli attacchi microbici attraverso l'uso di sostanze naturali, quali gli idrolati, a nota azione citostatica/citocida, rendendo eventuali residui sull'opera resistenti all'attacco dei biodeteriogeni. In secondo luogo, si è cercato di conferire al gel di Gellano un'azione citocida verso i biodeteriogeni fungini della carta senza essere dannoso per l'operatore e per l'opera.

Materiali e metodi. Analisi di micro brodo-diluizione (M-BD) sono state effettuate al fine di individuare l'azione fungicida di 15 idrolati vs 3 ceppi fungini celluloso-litici e contestualmente patogeni per l'uomo. Una concentrazione di $2.5 \cdot 10^5$ CFU/mL è stata incubata in piastre da 96 pozzetti per 48h in presenza di 3 diluizioni di idrolati. La Concentrazione Minima Fungicida (MFC) è stata individuata seminando su agar il contenuto dei pozzetti privi di crescita fungina. Sono stati preparati gel di Gellano (1%, 2%, 4%) contenenti il 50% v/v di idrolato (GELYD). Analisi SEM, FTIR, colorimetriche e di pH sono state eseguite su campioni di carta whatman (W) invecchiata e no, precedentemente messi a contatto con GELYD. Infine, campioni di W idoneamente seminati con concentrazioni note di ceppi fungini e campioni di carta del XVIII sec, sono stati trattati con GELYD e quindi posizionati su idonei terreni di coltura per verificarne l'azione citocida.

Risultati. M-BD ha mostrato che 8/15 degli idrolati testati sono capaci di inibire fortemente la crescita fungina, ma solo 2 (*Monarda fistulosa*, *Citrus aurantium* var amara) di questi sono

stati selezionati per la produzione del GELYD poiché mostravano azione fungicida verso tutti i ceppi testati se usati alla diluizione di 1/2 v/v. Sui campioni W trattati con GELYD non sono state osservate variazioni significative di colore o pH. Inoltre, sia i campioni di W seminati con ceppi fungini che quelli del XVII sec. mostravano chiaramente l'azione azione citocida del trattamento con GELYD (Fig.1).

Conclusioni. I nostri dati mostrano un nuovo ed interessante uso degli idrolati (prodotto di scarto degli oli essenziali), individuando per la prima volta un gel di Gellano capace non solo di pulire le opere cartacee, ma anche di uccidere le cellule fungine eventualmente presenti sulla carta e potenzialmente nocive per questa e per gli operatori.

Parole chiave. Gel di Gellano, idrolati, azione fungicida

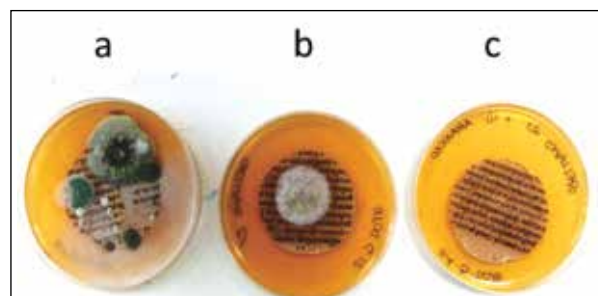


Fig. 1 - Carta del XVIII sec trattata con idrogel di Gellano al 2% (b), con GELYD (2% di Gellano e una diluizione 1:2 di idrolato di *C. aurantium*) (c) e non trattata (a). I campioni (b) e (c) sono stati posizionati su terreno nutritivo MEA agar dopo essere stati trattati con GELYD. Nessuna crescita è osservabile sul campione (c).

ASPETTI DI COLTIVAZIONE DI *MONARDA* SPP.

Lorenzo Barbanti

Dipartimento di Scienze Agrarie – Area di Agronomia e Coltivazioni erbacee; Alma Mater Studiorum Università di Bologna; e-mail: lorenzo.barbanti@unibo.it

Introduzione. Il genere *Monarda*, originario del nord America, appartiene alla famiglia delle Lamiaceae e comprende una ventina di specie. Ha una lunga storia di uso in medicina tradizionale nel trattamento di disturbi digestivi, come antielmintico, carminativo, diuretico, espettorante, febbrifugo, rubefacente e stimolante. Gli oli essenziali (OE) di monarda sono già stati oggetto di studi volti a indagarne le proprietà biologiche, ma il livello delle conoscenze è ancora modesto.

Scopi. Alla luce del crescente interesse per prodotti naturali ad attività biologica per impiego in diversi settori (medicina, fitopatologia ed entomologia agraria, microbiologia in genere), il lavoro si è focalizzato su due delle specie di maggior interesse, *M. fistulosa*, dalla caratteristica cavità del fusto, e *M. didyma*, dagli stami in coppia.

Materiali e Metodi. Nel triennio 2013-2015 le due specie di monarda sono state allevate presso l'Istituto Tecnico Agrario e

Chimico "Scarabelli - Ghini" di Imola (BO) e il Giardino delle Erbe "Augusto Rinaldi Ceroni" di Casola Valsenio (RA). A Imola sono state realizzate quattro parcelle, una con somministrazione di compost vegetale (1,7 kg/m²) ed una senza per ciascuna delle due specie; a Casola Valsenio le due specie sono state allevate senza aggiunta di compost. Nel marzo 2013, semi delle due specie sono stati posti in germinazione sotto tunnel non riscaldato (Fig. 1A); il trapianto è avvenuto in aprile con sesto 50 x 50 cm tra e sulle file. Il controllo delle infestanti è stato effettuato tramite fresature e interventi manuali; l'irrigazione è stata assicurata da un impianto fisso (mini-sprinkler).

Lo sfalcio della porzione verde seguito da distillazione in corrente di vapore, effettuata a Casola Valsenio anche per i campioni di Imola, è avvenuto a ottobre 2013, su piante prive di fiori. La composizione degli OE è stata effettuata tramite GC e GC/MS. Nel 2014 è proseguita la coltivazione delle parcelle impiantate nelle due località, senza aggiunta di compost a Imola. La fioritura seguita dallo sfalcio e successiva distillazione sono avvenuti a giugno per *M. didyma* e a luglio per *M. fistulosa* (Fig. 1B,C). Nel 2015 il lavoro è proseguito come nel 2014, ma solo a Imola, senza irrigazione e senza analisi dell'OE. Nel corso delle tre annate è stata monitorata la crescita e lo stato fitosanitario: le piante che denotavano sintomi fitopatologici di varia natura sono state escluse dalle raccolte.

Risultati. In assenza di compost Imola ha fornito una resa in OE sempre superiore a Casola Valsenio (0,47% vs. 0,31% nella media delle due specie e delle annate 2013-2014). A Imola, l'aggiunta di compost all'inizio della prova (2013) non ha determinato né maggior vigore vegetativo, né maggior resa in OE (0,46% vs 0,54% in assenza di compost). La resa in OE è aumentata sensibilmente fra primo e secondo anno nella media delle due località (da 0,27% a 0,51%), rimanendo pressoché costante nell'unica località del terzo anno (Imola). L'aumento fra primo e secondo anno ha a che fare con l'abbondante fioritura osservata in piante mature al secondo e terzo anno (fiori, circa 70% della massa fresca sfalciata), rispetto a piante in fase giovanile al primo anno, prive di fiori. Tra le due specie, la resa in OE è risultata molto simile (0,44% per *M. didyma*, 0,46% per *M. fistulosa*) nella media delle due località e delle tre annate.

Variazioni di rilievo sono emerse relativamente alla composizione degli OE fra le due specie e tra la prima e la seconda annata: α - e β -phellandrene sono risultati più abbondanti in *M. fistulosa* (rispettivamente 13,87% e 17,44%) rispetto a *M. didyma* (1,57% e 0,60%). Viceversa il timolo è risultato circa doppio nella seconda specie (61,86%) rispetto alla prima (30,90%). Un aumento di timolo (+11%) è stato osservato in media fra il primo e il secondo anno di coltivazione, sempre in relazione alla presenza dei fiori nella raccolta della seconda annata.

Conclusioni. Le due specie di monarda si sono dimostrate adatte all'ambiente di coltivazione, pur richiedendo cure colturali (diserbo e irrigazione) di un certo impegno. Gli oli essenziali hanno composizione tale da poter esprimere una significativa attività biologica.



Fig 1 - A) Seminiere; B) *M. fistulosa* fiorita; C) Fiori di *M. didyma*.

L'OLIO ESSENZIALE DI *MONARDA FISTULOSA* E *M. DIDYMA* INIBISCE L'INFETTIVITÀ DEI VIRUS HERPES SIMPLEX I E II *IN VITRO*

Alessandro Ripalti e Regina Muthusamy

U.O. di Microbiologia, Dipartimento della medicina diagnostica e della prevenzione, A.O.-U. di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi; alessandro.ripalti@unibo.it

Introduzione. La famiglia degli Herpesviridae comprende otto membri capaci di provocare patologie di varia gravità negli esseri umani. Tutti stabiliscono un rapporto permanente con l'ospite che, successivamente all'infezione acuta primaria, si traduce in uno stato di latenza. Alcuni membri della famiglia come Herpes *simplex* (HSV) 1 e 2, meglio noti come Herpes labiale e genitale, possono riattivarsi occasionalmente, provocando lesioni dolorose e ricorrenti con un forte impatto negativo sulla vita di relazione dei pazienti. I pochi farmaci antivirali disponibili sono basati su formulazioni mono-composto e possono pertanto favorire l'insorgenza di ceppi resistenti, il che avviene con elevata frequenza in pazienti immunocompromessi (4-7%). È dunque importante trovare approcci terapeutici e/o preventivi efficaci, in grado di agire sul virus con un insieme di principi attivi che agiscano sinergicamente, come se ne possono trovare nel mondo vegetale.

Scopi. Oli essenziali (OE) estratti da piante diverse hanno dimostrato efficacia contro microrganismi patogeni, tra i quali anche virus. Ci siamo proposti di valutare la capacità degli OE estratti da Monarda di contrastare il ciclo vitale dei virus HSV-1 e HSV-2.

Materiali e Metodi. Cellule: abbiamo utilizzato la linea cellulare di astrocytoma umano U-373 MG per tutti gli esperimenti di infettività, mentre le linee Vero (per HSV-1) e BHK (per HSV-2) sono state impiegate per la titolazione dei virus. I virus utilizzati sono stati un isolato clinico di HSV-1, il mutante replicazione competente K26GFP, che esprime la proteina fluorescente GFP e il ceppo di laboratorio HSV-2 (G). Infine sono stati impiegati

OE di *Monarda fistulosa*, *M. didyma* e *Melaleuca alternifolia*. Abbiamo implementato saggi di citotossicità per determinare le concentrazioni ottimali di OE da utilizzare negli esperimenti di attività antivirale. Questi ultimi sono stati effettuati nelle seguenti condizioni: (a) preincubazione virus/OE, (b) preincubazione monostrati cellulari con /OE, (c) aggiunta degli OE successive all'adsorbimento virale su cellule preincubate con gli oli, (d) aggiunta degli OE dopo adsorbimento con virus preincubato con gli oli, (e) aggiunta degli OE subito dopo l'adsorbimento di virus. Le cellule venivano fissate ai tempi 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 48 ore *post infectionem*. Il grado di replicazione virale veniva giudicato in confronto a cellule non trattate infettate con virus non trattato, osservando la comparsa di proteine precoci e tardive o contando le placche da effetto citopatico.

Risultati. Abbiamo osservato un potente effetto virucida degli OE di *Monarda* su HSV-1 e 2, più potente di quello noto per *M. alternifolia*. Gli OE non sono invece in grado di contrastare la replicazione virale una volta che i virus siano penetrati nelle cellule.

Conclusioni. Il potere virucida di questi OE si pone come un ottimo presidio per contenere lo spargimento virale. Adatto dunque per applicazioni topiche volte a bloccare la trasmissione del virus a livello della superficie delle mucose e della pelle, considerando il buon grado di penetrabilità di questa da parte degli OE. I vantaggi derivanti dall'uso di OE come agenti antivirali consistono nel costo contenuto, nella bassa probabilità di insorgenza di resistenze, nell'assenza di effetti avversi. L'associazione con molecole antivirali interferenti con la replicazione dei virus è promettente per individui soggetti a frequenti infezioni ricorrenti.



Fig 1 - Tappeti cellulari di astrocitoma umano infettati con HSV-1 K26GFP esprimente una proteina strutturale in fusione con eGFP, pretrattato con OE di *M. fistulosa* per un'ora a 37 °C (riga superiore), o non trattato (riga inferiore), 24 ore *post infectionem*. È evidente l'assenza di effetto citopatico nelle cellule infettate con virus pretrattato, e la drastica riduzione di cellule esprimenti proteine virali.

OLI ESSENZIALI DEFINIZIONI, PREPARAZIONE E CONTROLLO

Carlo Bicchi,

Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino

Questo intervento ha lo scopo di illustrare gli aspetti tecnici ed analitici legati alla produzione ed al controllo di qualità di un olio essenziale. La prima parte mira introdurre e definire il concetto di olio essenziale al fine di evitare possibili confusioni con altri prodotti di origine vegetale ottenuti con altri metodi (estrazione o macerazione). Seguirà la descrizione dei principi con cui si ottengono gli oli essenziali e delle apparecchiature che vengono impiegate per il loro ottenimento sia in laboratorio che a livello industriale.

La terza parte riguarderà il controllo di qualità degli oli essenziali. Verranno dapprima descritti i parametri fisici e chimici con cui si definiscono la qualità e l'autenticità di un olio essenziale. In questo ambito verrà descritto soprattutto il ruolo che la gas cromatografia e la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa possono svolgere nel controllo di qualità degli oli essenziali e dei risultati che queste tecniche possono fornire. Tutti questi aspetti verranno illustrati con esempi tratti dalla esperienza pluriennale di laboratorio su temi inerenti soggetti specifici e singoli campioni di interesse per il settore.

CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E ATTIVITÀ BIOLOGICA DI OLI ESSENZIALI DALL'ECUADOR AMAZZONICO

Gianni Sacchetti

Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie – UR7 lab. Tecnopolo Terra&Acqua Tech, Università degli Studi di Ferrara; gianni.sacchetti@unife.it

Introduzione. L'attività di ricerca è incentrata sullo studio delle piante aromatiche dell'Ecuador come paradigma di indagine sulla biodiversità amazzonica. Tali piante sono particolarmente ricche di oli essenziali (OE), metaboliti secondari costituiti principalmente da molecole volatili odorose, note per essere spesso biologicamente attive. Proprio per via della loro fragranza, queste piante fanno sovente parte delle tradizioni d'uso etnomedicinale delle popolazioni indigene.

Scopi. Investigare piante poco conosciute appartenenti a un contesto altamente biodiverso potenzialmente interessanti per la salute dell'uomo. Sono state studiate le seguenti piante: *Chenopodium ambrosioides*, *Dacryodes peruviana*, *Piper carpunya*, *Schinus molle*, *Tagetes minuta*, *Endlicheria klugii*, *Ocotea cernua*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum micranthum* e *Ocotea quixos*.

Materiali e Metodi. Gli OE sono stati ottenuti per distillazione in corrente di vapore d'acqua e caratterizzati mediante analisi GC-MS e NMR. Ciascun OE è stato saggiato per l'attività antiossidante (DPPH test), per l'attività antibatterica su diversi ceppi patogeni umani, per l'attività antifungina (agar vapour test), per l'attività antinfiammatoria (5-lipossigenasi test), per l'attività genotossica (Ames test). L'attività anticandida è stata poi sviluppata valutando anche aspetti sinergici con fluconazolo (checkboxboard test, time killing test). Per una indicazione sugli aspetti applicativi, con particolare riferimento al contesto cosmetico, è stata preparata una formulazione sulla quale sono stati effettuati un test di attività antiossidante (PCL test) e una

valutazione di gradevolezza (Panel test).

Risultati. Per la caratterizzazione chimica (composti maggioritari): *C. ambrosioides*: 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%) e il *p*-cimene (5.36%); *C. citratus*: geraniolo (41.49%), geraniale (15.68%), il nerale (14.71%) e il citronellale (8.10%); *D. peruviana*: δ -3-carene (70%), α -pinene (6.03%), limonene (3.13%) e *p*-cimene (3.03%); *E. klugii*: germacrene D (24.81%), α -selinene (7.77%), δ -amorfene (6.64%), β -cariofillene (6.44%), α -cadinolo (6.32%) e β -elemene (5.92%); *O. micranthum*: eugenolo (27.74%), β -cariofillene (17.18%), biciclogermacrene (14.35%), *cis*-ocimene (9.17%), 1,8-cineolo (6.51%); *O. cernua*: β -cariofillene (29.99%), β -pinene (12.03%), biciclogermacrene (11.52%) e germacrene D (4.82%); *Ocotea quixos*: β -cariofillene (15.1%), cinnamil acetato (11.4%), sabinene (7.6%); *P. carpunya*: piperitone (26.22%), limonene (9.48%), elemicina (7.22%), β -fellandrene (5.62%); *S. molle*: α -fellandrene (13.62%), δ -cadinene (9.95%), limonene (6.51%), β -fellandrene (5.90%), α -cadinolo (5.62%); *T. minuta*: *cis*-tagetone (62.19%), *cis*-ocimene (20.70%), diidrotagetone (8.05%), *trans*-tagetone (3.64%). L'OE di *O. micranthum* ha mostrato eccellenti risultati come antiossidante. Particolarmente interessante si è rilevata l'attività su funghi dermatofiti dove molti dei campioni sono

risultati efficaci, e il sinergismo con il fluconazolo degli OE di *P. carpunya* e *S. molle* nei vs. vari ceppi di *Candida* spp. L'OE di *C. ambrosioides* è risultato il più attivo rispetto ad attività antinfiammatoria. Rispetto alla genotossicità, tutti gli OE sono risultati sicuri. Le formulazioni cosmetiche sono state preparate partendo dall'OE di *O. micranthum*. La formulazione più gradita è stata quella con l'aggiunta dell'OE di *C. citratus* allo 0.2%. Questa formulazione ha rivelato anche un valore di attività antiossidante lievemente superiore alle altre, molto probabilmente grazie a una attività sinergicamente additiva con l'olio essenziale di *O. micranthum*.

Conclusioni. Lo studio degli OE è materia affascinante e paradigmatica rispetto a diverse proiezioni, dallo studio della biodiversità vegetale, alle diverse possibili applicazioni industriali come il contesto salustico per l'uomo, la veterinaria, l'agro-food e l'agro-farmaceutica. Lo studio degli OE infatti risulta oltremodo complesso e necessariamente articolato non solo per quanto attiene alla composizione chimica, soggetta a sensibili variazioni intraspecifiche in relazione all'ambiente, ma anche alla valutazione dell'attività biologica che deve essere ben strutturata e finalizzata a differenti contesti e applicazioni industriali diversamente normati e che richiedono quindi differenti vincoli rispetto al soggetto complesso quale appunto l'OE.

A. MINARDI & FIGLI S.R.L.

Via Boncellino 32 - 48012 Bagnacavallo (Ra) - Tel. 0545 61460 - Fax 0545 60686

DAL 1930 LAVORAZIONE E COMMERCIO PIANTE OFFICINALI



www.minardierbe.it

info@minardierbe.it

