



VARIABILITÀ NELLA COMPOSIZIONE TERPENICA DI OLI ESSENZIALI E IDROLATI *ottenuti da specie e selezioni di Monarda spp.*

Le industrie farmaceutiche, agro-alimentari ed erboristiche, i laboratori galenici, la grande distribuzione, esigono fitoderivati con caratteristiche e composizione chimica sempre più uniformate, nonché corredati di quelle informazioni che ne consentano un rapido indirizzo in funzione del settore finale di destinazione. Nell'articolo presentiamo la descrizione di due anni di sperimentazioni condotte su oli essenziali e idrolati di alcune specie di Monarda, per affrontare il tema della variabilità nella composizione chimica e, quindi, della standardizzazione.

* **Sara Turci,**
** **Marco Michelozzi,**
** **Gabriele Cencetti,**
*** **Sauro Biffi,**
* **Maria Grazia Bellardi**

Le piante aromatiche sono usate fin dai tempi antichi per le loro proprietà aromatizzanti, antimicrobiche e medicinali.

Grazie al progresso della biochimica e delle tecniche analitiche, sempre più precise nel determinare e quantificare anche i componenti traccia, oggi si sa che tali proprietà sono da attribuire, per gran parte, agli oli essenziali (OE) in esse contenute (1).

Alcune fonti storiche citano l'utilizzo degli OE già ai tempi della civiltà Egizia ed Ellenica, ma furono gli Arabi a pianificarne e migliorarne l'estrazione.

Negli ultimi anni, l'Aromaterapia scientifica, che prevede l'utilizzo razionale degli OE in tutti i settori della "salute" (non solo umana), ha avuto notevole sviluppo, sia grazie alle recenti sperimentazioni che evidenziano le potenzialità applicative di questi preziosi metaboliti secondari nei diversi settori di impiego, sia in risposta alla necessità di ricercare alternative più ecosostenibili per far fronte a questioni di importanza rilevante, prima fra tutti la farmacoresistenza.

Anche in ambito agrario, l'esigenza di proteggere le colture e le produzioni vegetali in genere con molecole a basso impatto ambientale, ha dato impulso a ricerche volte a individuare negli stessi prodotti del metabolismo secondario delle piante, molecole dall'attività biocida da utilizzare

nei programmi di protezione e disinfezione.

Gli OE sono infatti “un concentrato” (dalla complessa composizione chimica) di metaboliti secondari vegetali, principalmente a struttura terpenica, accumulati naturalmente dalle piante in diversi loro organi e solitamente estratti mediante distillazione in corrente di vapore.

Con questo metodo di estrazione si ottiene anche un sottoprodotto “nobile”, l'idrolato o acqua aromatica, la cui concentrazione di principi attivi è generalmente meno dell'1% v/v (2).

Recentemente, anche gli idrolati (Id), tradizionalmente considerati un prodotto di scarto, stanno acquistando sempre più interesse da parte della Comunità scientifica.

Anch'essi, infatti, possiedono una certa attività antimicrobica grazie al loro contenuto in terpeni ossigenati e altre molecole idrofili, seppur in concentrazione inferiore rispetto all'OE (2,3).

Inoltre, a differenza degli OE, proprio la natura idrofila ne facilita l'applicazione, senza la necessità di disperderli in un mezzo emulsionante, con possibilità di applicazione diretta sulle piante per prevenire infezioni parassitarie (per es. batteriche), oppure per contrastare infestazioni da insetti fitofagi (4).

L'importanza della standardizzazione

L'utilizzo degli OE (e degli Id) in qualsiasi ambito applicativo, dall'industria dei profumi ai settori agro-alimentari, dall'aromaterapia clinica alla zootecnia, fino alla conservazione dei Beni culturali, non può prescindere da una loro preventiva caratterizzazione chimica.

L'attività biologica (e di conseguenza la destinazione finale) di questi fitoderivati è infatti strettamente dipendente dalla loro composizione.

Ma, è ormai noto come la resa

quantitativa e qualitativa degli OE sia il risultato della sinergia di molteplici fattori che ne determinano l'enorme variabilità.

Si tratta di fattori endogeni ed esogeni alla pianta.

Tra quelli endogeni (o intrinseci), fondamentale importanza rivestono il genotipo, lo stadio di sviluppo (fenologia) e quello fitosanitario.

Notevoli differenze in termini di composizione quali-quantitativa si riscontrano infatti in OE ottenuti da specie diverse, ma anche, nell'ambito della stessa specie, tra cultivar e selezioni differenti.

Nel caso specifico del genere *Monarda* (pianta oggetto delle nostre sperimentazioni) (Fig. 1) caratterizzato da un'elevata complessità tassonomica, gli studi comparativi di composizione chimica degli OE estratti da differenti *taxa* (chemiotassonomia), si sono rivelati un importante strumento per la classificazione filogenetica del

genere (5).

Anche l'età della pianta e lo stadio di sviluppo, (fase vegetativa o riproduttiva), nonché la tipologia dell'organo sottoposto a distillazione (rapporto % tra fusti, foglie, fiori), sono parametri fondamentali nel determinare gli equilibri quali-quantitativi dei principali costituenti dell'OE.

Infine, nella gestione culturale delle essenze aromatiche, non può essere trascurato lo stato fitosanitario.

Il metabolismo secondario delle piante può essere infatti alterato in risposta a fattori biotici, compresa l'esposizione ad agenti patogeni infettivi (virus, fitoplasmi, ecc.) o insetti fitofagi (6,7), con conseguenti ripercussioni su resa e composizione dell'OE (8).

Tra i fattori esogeni, l'ambiente in senso lato, ovvero le condizioni pedo-climatiche (temperatura, disponibilità idrica, fotoperiodo, stato nutrizionale, ecc.) giocano



Figura 1 *Monarda* sp.

sicuramente un ruolo altrettanto importante (9, 10).

A titolo di esempio, una prova sperimentale condotta nel 2013 dal Dipartimento di Agricoltura, Ambiente ed Alimenti dell'Università del Molise su *Matricaria chamomilla*, dimostrava come resa e composizione dell'OE fossero fortemente influenzate dall'ambiente pedo-climatico di coltivazione e dalle tecniche colturali adottate.

Più precisamente, le migliori rese in OE si registravano nei siti irrigui e con maggiore fertilità, indipendentemente dall'altitudine; mentre, dal punto di vista della composizione chimica, gli OE ottenuti nelle parcelle di camomilla non irrigue risultavano di maggiore qualità in quanto caratterizzati da una più alta concentrazione di sesquiterpeni idrocarburi e di dicicloeteri, e da un più basso contenuto di sesquiterpeni ossigenati (11).

Anche nell'OE di *Salvia officinalis* ottenuto da piante irrigate, rispetto a piante allevate in asciutta si assisteva, in sperimentazioni del 2013, alla riduzione dei monoterpeni idrocarburi e di quelli ossigenati e all'aumento dei sesquiterpeni idrocarburi (12). Dall'esperienza dei gruppi di ricerca che (soprattutto in Italia) si sono occupati di valutare l'effetto dei fattori ambientali su resa e composizione degli OE, e in riferimento agli esempi appena descritti per camomilla e salvia, si evince che, tra le tante variabili pedo-climatiche in gioco, variando l'apporto idrico alle colture officinali è possibile modificarne il profilo aromatico.

In generale, in condizioni di scarsa disponibilità di acqua le piante producono un OE qualitativamente e quantitativamente più ricco in composti bioattivi.

Infatti, in condizioni di carenza idrica, aumenta l'attività dell'enzima PAL (fenilalanina ammonio liasi) che, a partire dall'amminoacido

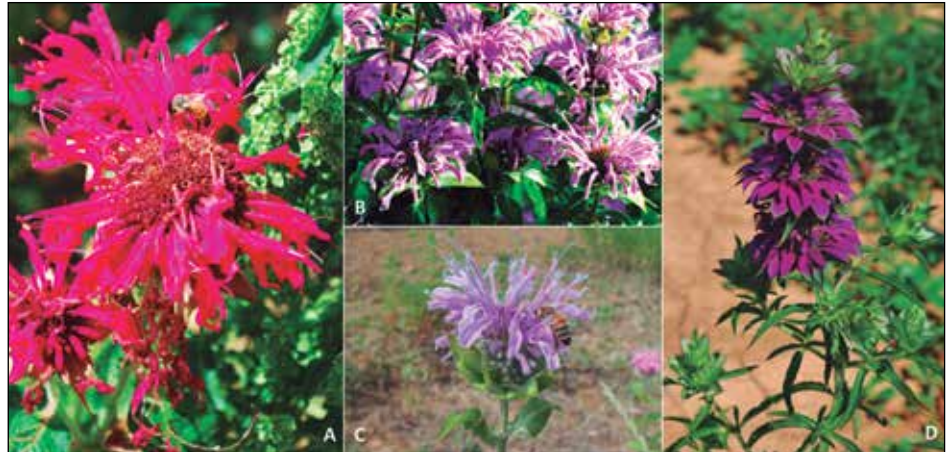


Figura 2 *M. didyma* (A), *M. fistulosa* (B e C) e *M. citriodora* (D) in fioritura.

cido fenilalanina, porta alla produzione di fenoli, una classe di composti molto presenti negli OE che contribuiscono a caratterizzarne il loro "aroma". Ne consegue che, teoricamente, se l'obiettivo di un produttore di specie officinali non è solo la produzione di biomassa, ma altresì che la quantità e la qualità dei principi attivi presenti in essa siano quelle attese, si potrebbe modulare opportunamente la strategia colturale per intervenire in maniera mirata e ottenere gli OE (e gli Id) ottimali.

È opportuno però sottolineare come in Letteratura le opinioni siano alquanto discordanti, come suggerito da ricerche eseguite in Toscana nel triennio 1996-1999 su pini del gruppo "halepensis" dalle quali è risultato che i profili terpenici (contenuti relativi tra mono- e sesquiterpeni) non sono influenzati dallo stato idrico della pianta (13).

Ovviamente, anche i tempi e le modalità di esecuzione della distillazione possono talvolta influenzare la composizione chimica di un OE in quanto, con il processo di estrazione, alcuni metaboliti vegetali possono subire idrolisi o ossidazione.

Da quanto finora illustrato, emerge chiaramente quanto sia difficile ottenere un OE dalla composizione stabile nel tempo, proprio perché la sua composizione chi-

mica è strettamente dipendente dal metabolismo secondario della pianta, influenzato a sua volta da innumerevoli fattori intrinseci ed estrinseci.

Nasce da qui l'esigenza di studiare e approfondire l'influenza che tali fattori esercitano sul metabolismo vegetale, nell'ottica di standardizzare, per quanto possibile, la composizione di questi preziosi estratti vegetali, requisito fondamentale per mantenere costante la loro efficacia nel tempo.

Monarda spp.

Già da alcuni anni, grazie all'attivazione di alcuni progetti di Ricerca, l'Area di patologia vegetale del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna sta conducendo studi volti ad approfondire importanti aspetti agronomico-colturali e fitoterapici di alcune specie di *Monarda* spp.

Si tratta di un genere di piante aromatiche originario del Nord America, appartenente alla famiglia botanica delle Lamiaceae. Le diverse specie del genere sono note per le loro proprietà ornamentali, mellifere e fitoterapiche ma, soprattutto, per la possibilità di estrarne un OE particolarmente ricco di composti bioattivi. Grazie a un'articolata rete di collaborazioni con numerosi Enti e Centri di Ricerca, e con il patrocinio della SIROE (Società



Monarda spp.

Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali), OE e Id di tre specie, *M. didyma*, *M. fistulosa* e *M. citriodora*, hanno trovato applicazione in diversi settori: Microbiologia, Fitopatologia, Entomologia, Nematologia, Medicina umana e Conservazione dei Beni Culturali. Si tratta di sperimentazioni che, in linea con la sempre più crescente esigenza di limitare l'utilizzo di prodotti fitosanitari di sintesi e antibiotici, hanno lo scopo di favorire lo sviluppo di metodi alternativi a basso impatto sulla salute umana e sull'ambiente. I diversi studi condotti negli ultimi sei anni (*alcuni dei quali pubblicati su Natural 1*) hanno messo in evidenza la "efficacia" di OE e Id estratti dalle tre specie del genere *Monarda* e l'importanza del chemotipo ai fini di una specifica applicazione.

Lo studio che andiamo a illustrare ha avuto lo scopo di delineare, in maniera approfondita, attraverso un biennio di sperimentazioni, un "quadro" della composizione terpenica (ovvero una quantificazione relativa espressa come percentuale dei terpeni) degli analiti presenti negli OE e Id di *M. didyma*, *M. fistulosa*, *M. citriodora* (ottenute da seme), mettendo a confronto tra loro queste tre specie (Fig. 2).

In aggiunta, all'interno della specie *M. didyma*, si è voluto per la prima volta verificare se vi sia una differenza nella composizione chimica degli OE e Id estratti da due selezioni clonali appositamente ottenute: "a fiore Rosso" e "a fiore Viola" (Fig. 3), anche nei riguardi di *M. didyma* da seme. L'utilizzo di piante omogenee dal punto di vista genetico consente infatti di limitare gli effetti della ricombinazione genetica che inevitabilmente si verifica nelle piante ottenute per via gamica.

Vista la multidisciplinarietà dei settori applicativi e considerando che le esigenze specifiche di ciascun ambito sono diverse, è di



Sono numerosi i fattori che influiscono sulla resa e sul profilo fitochimico degli oli essenziali

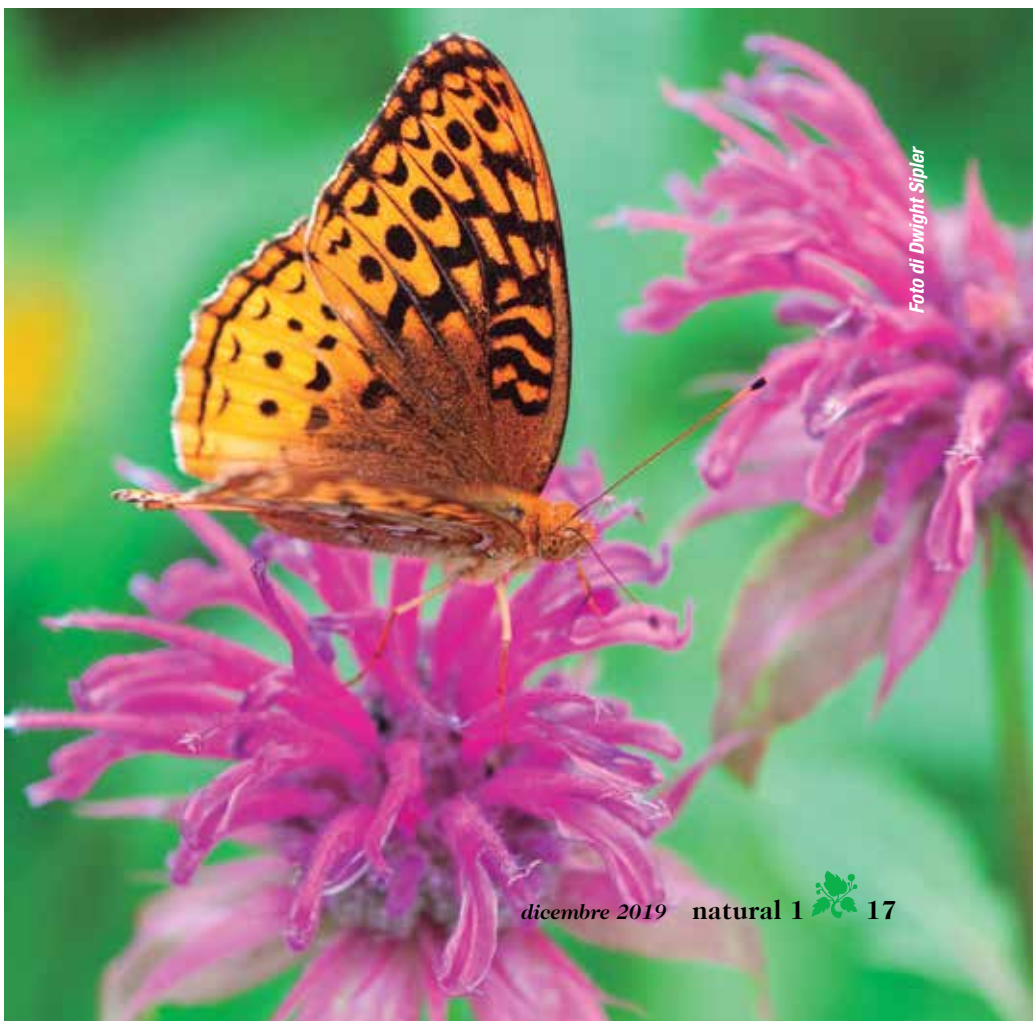


Foto di Dwight Sippler

Figura 3
M. didyma
selezioni "Viola"
(A) e "Rossa" (B).



fondamentale importanza conoscere gli "equilibri" esistenti tra i vari componenti che entrano a far parte della complessa miscela (fitocomplesso), delineandone una standardizzazione affidabile e quindi riproponibile.

Lo studio è stato condotto in collaborazione con l'Istituto Agrario (ITAS) Scarabelli-Ghini di Imola (Bologna) per quanto riguarda l'allestimento delle coltivazioni, il Giardino delle Erbe Augusto Rinaldi-Ceroni di Casola Valsenio (Ravenna) presso il quale è avvenuta l'estrazione degli OE e Id e l'Istituto di Bioscienze e Biorisorse del CNR di Sesto Fiorentino (Firenze), presso cui è stata eseguita la caratterizzazione chimica dei campioni.

Sperimentazione

Ai fini dell'ottenimento del materiale vegetale da sottoporre a distillazione in corrente di vapore per l'ottenimento degli OE e Id sono stati predisposti, nel biennio di riferimento (2017-2018), 5 campetti sperimentali delle tre specie di *Monarda* nell'area dell'ITAS Scarabelli-Ghini di Imola, ove è ubicata anche la serra sperimentale di Agronomia e Patologia vegetale dell'Università di Bologna.

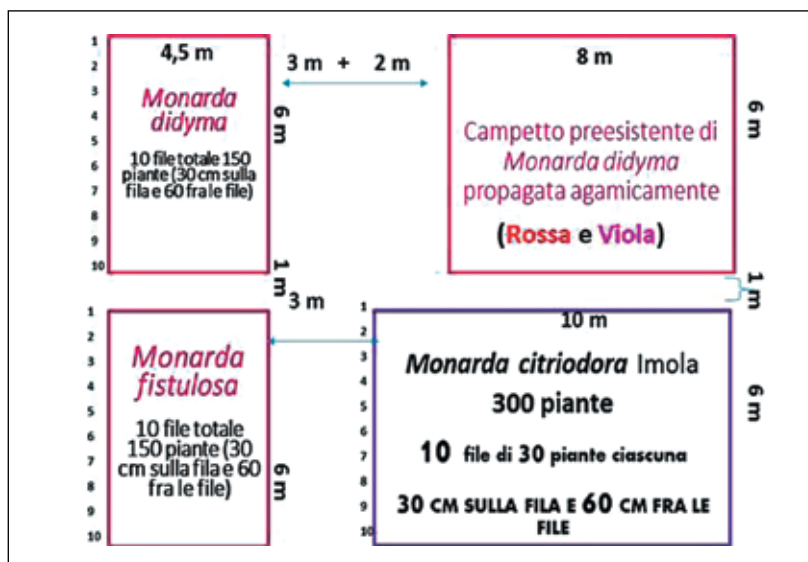
Le piante da cui sono stati ottenuti gli OE e gli Id sono state coltivate nel medesimo ambiente, adottando identiche operazioni agronomico-culturali. Come si evince dallo schema sperimentale (Fig. 4), nel 2017 sono state predisposte 3 parcelle (una per ciascuna

delle tre specie: *M. didyma*, *M. fistulosa* e *M. citriodora*) mettendo a dimora le piantine ottenute da seme. Il piano sperimentale prevedeva, inoltre, la presenza di un campetto "preesistente", realizzato nel corso della stagione precedente (2016) al biennio di riferimento (2017-2018). Tale campetto, suddiviso in 2 parcelle distinte, era stato allestito trapiantando due selezioni clonali di *M. didyma*, rispettivamente "a fiore Rosso" e "a fiore Viola" propagate agamicamente per talea radicale. Gli espianti radicali erano stati ottenuti da due piante-madri precocemente fiorite nel 2015, già nel corso del primo anno di impianto. Vista la peculiarità del fenomeno si era pensato di propagare le due piante-madri agamicamente, con la finalità di ottenere due selezioni clonali a diversa colorazione della corolla (Rossa e Viola).

Prima di analizzare brevemente le principali operazioni agronomico-culturali eseguite nei 5 campetti sperimentali, è opportuno fornire un'importante precisazione di carattere botanico. Tutte e tre le specie oggetto di studio sono essenze erbacee cespitose e rizomatose ma, mentre *M. didyma* e *M. fistulosa* fioriscono al secondo anno di impianto, *M. citriodora* differenzia gli steli fiorali durante la stessa stagione in cui è messa a dimora, garantendo fino a tre abbondanti fioriture.

Sulla base di questa osservazione,

Figura 4. Schema della disposizione delle piante di *Monarda* nelle diverse parcelle sperimentali (primavera 2017).



si è pensato di effettuare due distillazioni per ciascuna delle due specie (*M. didyma* e *M. fistulosa*) ottenute da seme: la prima durante lo stadio vegetativo (2017) e la seconda in fase di fioritura (2018) per verificare l'influenza dello stadio fenologico sulla resa e composizione di OE e Id. Per quanto riguarda *M. citriodora*, sono state effettuate tre distillazioni (una per ciascuna fioritura) nel corso del 2017 ma, per semplicità operativa, sono stati presi in considerazione soltanto gli OE e Id ottenuti dalla prima di esse. Infine, per quanto riguarda le due selezioni clonali "a fiore Rosso" e "a fiore Viola" di *M. didyma*, le piante sono state recise e distillate sia nel 2017 sia nel 2018 (sempre in fase di fioritura), per verificare eventuali variazioni di resa e/o di composizione nei due anni.

- **Coltivazione.** Le semine sono state effettuate presso le serre tunnel dell'ITAS Scarabelli-Ghini; le piantine (10-15 cm), trapiantate in vaso, sono state messe a dimora in campo utilizzando la seguente disposizione d'impianto: 60 cm di distanza tra le file e 30 cm di distanza sulla fila, la stessa utilizzata anche per le due selezioni clonali (Rossa e Viola). Durante l'accrescimento, sia in serra che in pieno campo, sono stati effettuati periodici monitoraggi per verificare la crescita delle piante e il loro stato fitosanitario (quelle con "avversità" sono state eliminate). Non sono state effettuate concimazioni né operazioni di diserbo chimico (per contrastare la crescita della vegetazione infe-

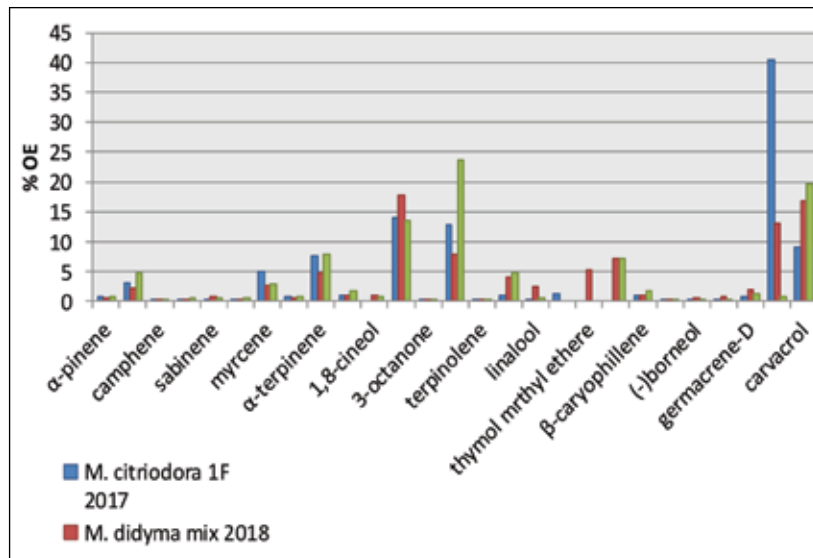


Grafico 1. Confronto della composizione chimica dell'OE delle 3 specie durante la fase di fioritura.

stante sono stati effettuati interventi di diserbo meccanico e, successivamente, una pacciamatura con paglia di frumento). Le parcelle sono state irrigate a intervalli regolari nel corso della stagione estiva, grazie all'ausilio di un impianto mobile (irrigazione per aspersione con microirrigatori).

- **Distillazione.** Il taglio del materiale vegetale da sottoporre a distillazione in corrente di vapore è stato eseguito sempre nelle prime ore del mattino, effettuando una selezione visiva *in loco* allo scopo di escludere tutte le piante con sintomi di infezione fungina e/o virale, eliminando anche la porzione basale (circa 10 cm dal colletto) degli steli, in quanto privi di foglie e, conseguentemente, di strutture secretorie. La distillazione è stata effettuata presso il Giardino delle Erbe di Casola Valsenio. Tutti gli OE e Id ottenuti sono stati conservati in frigorifero in flaconi di vetro ambrato. Nella tabella 1 si riporta un confronto delle rese in OE dei campioni nel biennio di riferimento.

Considerazioni. Analizzando la tabella 1 si osserva che:

✓ Delle tre specie oggetto di studio, la resa maggiore in OE fa riferimento, per entrambi gli anni, a

M. fistulosa; va inoltre evidenziato che distillando le infiorescenze piuttosto che solo i fusti e le foglie, la resa aumenta, fino a raddoppiare (0,55% nel 2017 contro 1,17% nel 2018).

✓ La stessa considerazione può essere estesa anche alla specie *M. didyma*: anche in questo caso la pianta fiorita garantisce una resa doppia in OE rispetto al primo anno di impianto.

Queste osservazioni sono in accordo con quanto riportato in Letteratura (14,15), secondo cui sia per *M. didyma* che per *M. fistulosa*, la resa aumenta passando dal primo al secondo anno di impianto.

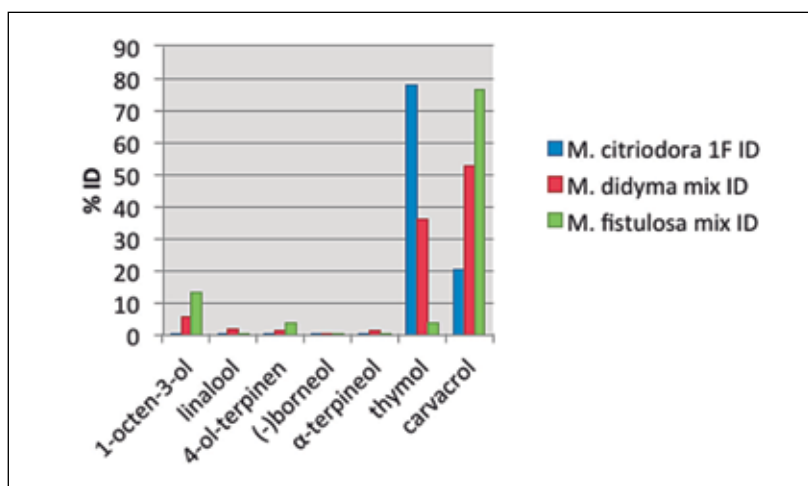
✓ Per quanto riguarda la resa delle due selezioni Rossa e Viola di *M. didyma*, essa si mostra pressoché simile nel 2017 (0,27% e 0,23% rispettivamente), mentre nel 2018 risulta nettamente superiore nel caso della selezione Viola (0,45% contro 0,18% della Rossa).

Considerando la maggiore incidenza di vegetazione infestante nella parcella in questione, se ne deduce che tale competizione potrebbe averne penalizzato la resa. - **Composizione chimica.** Gli OE e gli Id sono stati caratterizzati me-

Specie	Resa % (mL/100g)	
	2017	2018
M.c.	0,42	—
M.f.	0,55	1,17
M.d.	0,34	0,66
M.d.R	0,27	0,18
M.d.V	0,23	0,45

Tabella 1. Rese in OE nel biennio 2017-2018. (M.c.: *M. citriodora*; M.f.: *M. fistulosa*; M.d.: *M. didyma*; M.d.R e M.d.V: *M. didyma* selezioni Rossa e Viola)

Grafico 2.
Confronto
della com-
posizione
chimica
degli idrolati
delle 3 spe-
cie durante
la fase di
fioritura.



dante GC-MS presso i laboratori dell'Istituto di Bioscienze e Biorisorse del CNR di Sesto Fiorentino. I campioni di OE sono stati iniettati direttamente in GC previa diluizione 1:1000 in eptano addizionato di standard interno (tridecano 20 ppm). I campioni di Id, preventivamente diluiti 1:2 in eptano, hanno invece subito un processo di estrazione realizzato attraverso fasi successive di sonicazione, agitazione e centrifugazione. Al termine del processo estrattivo nelle vials si osserva una netta separazione tra la fase acquosa sottostante e quella epatica sovrastante, nella quale si trovano disciolti la maggior parte degli analiti contenuti nell'Id di partenza. Un'aliquota di fase epatica è stata quindi prelevata e successivamente iniettata in GC. L'identificazione dei VOCs (Volatile Organic Compounds) contenuti nei campioni di OE e Id è stata facilitata dal confronto dei loro tempi di ritenzione e spettri di massa con quelli degli standards puri posseduti. Fondamentale è stata anche la consultazione della libreria di spettri contenuta nel database NIST. I risultati sono stati espressi come percentuale di ciascun composto sul totale delle aree dei composti identificati. Come già accennato, dal punto di vista qualitativo gli Id presentano un profilo in componenti volatili meno complesso (contenendo disciolti solo gli analiti più idrosolubili) rispetto a quello dei rispettivi OE e, pertanto, il numero

dei composti identificati è sempre inferiore.

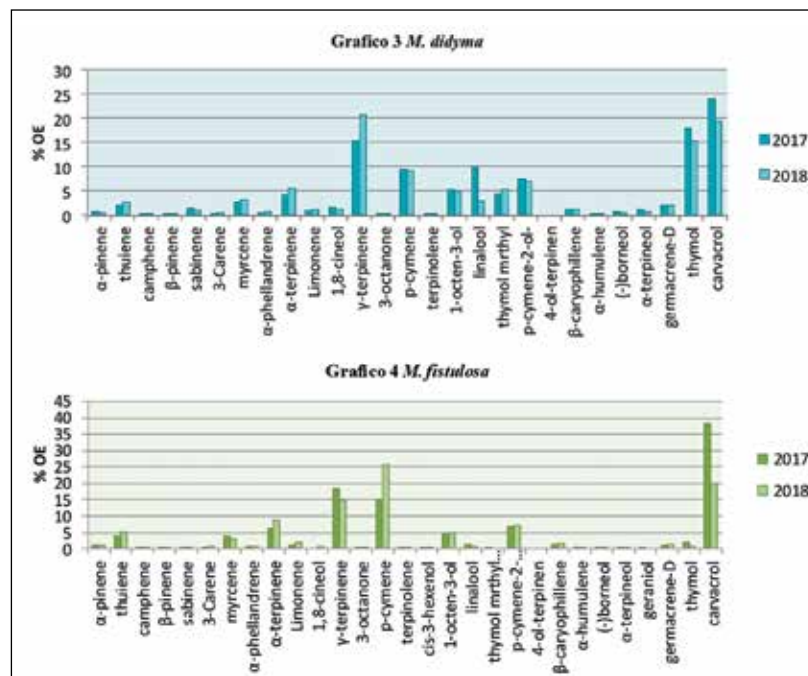
Cosiderazioni. Dal Grafico 1 è possibile osservare che:

- ✓ Oltre il 95% dei composti identificati negli OE (e l'85% nel caso degli Id) ha struttura terpenica.
- ✓ Gli OE estratti dalle tre specie di *Monarda* differiscono nella loro composizione chimica sia in termini qualitativi (numero di composti identificati) che quantitativi (concentrazione di ciascun composto).
- ✓ Alcuni composti infatti si ritrovano esclusivamente in una specie

e non nelle altre: per esempio il timol metil etere è presente esclusivamente nell'OE di *M. didyma*, mentre *p*-cimene-2-ol-metil etere si trova in concentrazione pressoché analoga sia in *M. didyma* che in *M. fistulosa*, ma è presente solo in tracce nell'OE di *M. citriodora*.

✓ Per quanto riguarda i monoterpeni, le differenze più importanti si osservano a carico di timolo e carvacrolo (molecole a struttura fenolica la cui attività antimicrobica è stata dimostrata da numerose prove sperimentali). Delle tre specie, quella che presenta il più alto contenuto di timolo è *M. citriodora* (circa il 40%); la sua abbondanza è invece pari al 13% nell'OE di *M. didyma* ed è inferiore all'1% nell'OE di *M. fistulosa*. Quest'ultimo presenta tuttavia la più alta concentrazione di carvacrolo (intorno al 20%).

✓ Analizzando il contenuto di γ -terpinene e *p*-cimene (precursori di timolo e carvacrolo) si nota che il più alto contenuto di γ -terpinene si ritrova in *M. didyma* (concentrazione prossima al 17%) ed è pressoché simile nelle



Grafici 3,4. Confronto della composizione dell'OE di *M. didyma* (grafico 3) e *M. fistulosa* (grafico 4) nei due anni: stadio vegetativo (2017) e fioritura (2018).

altre due specie (13%). Al contrario, *p*-cimene è presente in concentrazione più alta nell'OE di *M. fistulosa* (circa 23%).

Osservando il Grafico 2, che mette a confronto la composizione chimica degli Id delle tre specie, è possibile notare che, come già accennato, questi presentano un profilo in VOCs meno complesso (meno composti identificati) rispetto agli OE.

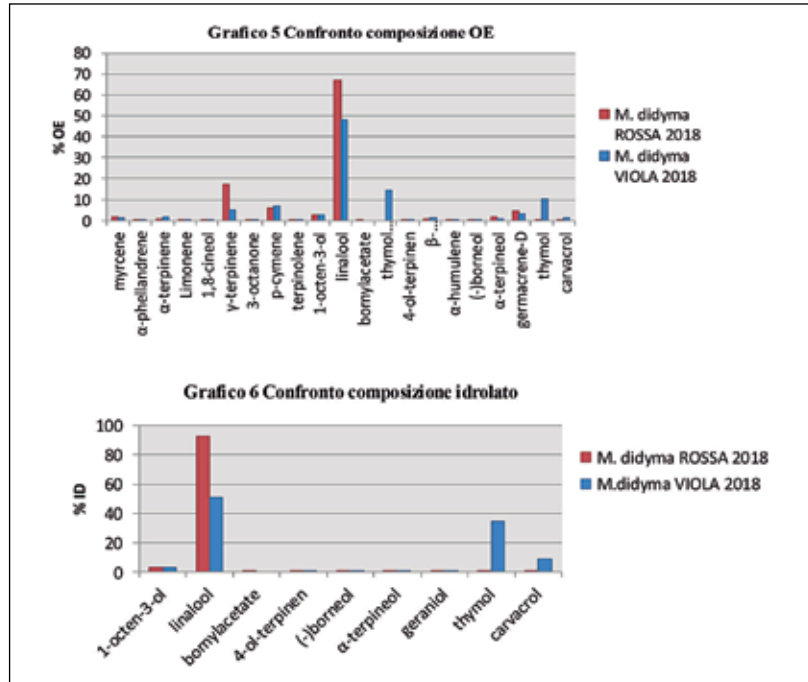
✓ Le molecole presenti in concentrazione più elevata nell'Id sono monoterpeni ossigenati (carvacrolo, timolo, α -terpineolo, borneolo, terpineolo, linalolo) e molecole ossigenate a struttura non terpenica (1-octen-3-olo).

✓ Come per gli OE, anche in questo caso si osservano differenze notevoli nella concentrazione dei due composti preponderanti (timolo e carvacrolo) tra le tre specie. In particolare il timolo, molecola più abbondante nell'OE di *M. citriodora*, è anche il composto più presente nell'Id di questa specie; la stessa considerazione vale per il carvacrolo in *M. fistulosa*. Infine, così come il rispettivo OE, anche l'Id di *M. didyma* presenta un più equilibrato rapporto tra i due monoterpeni a struttura fenolica appena citati.

✓ Dai Grafici 3 e 4 si osserva che per entrambe le specie la composizione varia in termini quantitativi nei due anni; ciò suggerisce che lo stadio fenologico della pianta influenza oltre alla resa anche la composizione chimica dell'OE. Questa osservazione è in accordo con la Letteratura.

✓ Sia per *M. didyma* che per *M. fistulosa*, le concentrazioni di timolo e carvacrolo sono maggiori nell'OE estratto da piante distillate al primo anno di impianto (quindi durante lo stadio vegetativo) piuttosto che durante la fase di fioritura.

✓ Per quanto riguarda invece gli altri due composti più abbondanti: γ -terpinene e *p*-cimene, le due specie mostrano un comporta-



Grafici 5,6. Confronto della composizione chimica dell'OE e Id estratti dalle due selezioni clonali a fiore Rosso e Viola in riferimento all'anno 2018 (fioritura).

mento opposto. Ovvero, γ -terpinene nel caso di *M. didyma* è più abbondante nell'OE estratto durante la fioritura, mentre per *M. fistulosa* è più abbondante nell'OE estratto durante lo stadio vegetativo, viceversa per quanto riguarda il *p*-cimene.

✓ Dai Grafici 5 e 6 è possibile osservare che il composto presente in concentrazione più alta sia nell'OE sia nell'Id di entrambe le selezioni è il linalolo (un alcol terpenico), anche se la sua concentrazione è più alta nel caso della selezione Rossa.

✓ Il secondo composto quantitativamente più presente è il γ -terpinene, nel caso della selezione Rossa, e il timol metil etere nel caso della selezione Viola.

✓ È interessante sottolineare che timolo e carvacrolo, presenti in concentrazione elevata nell'OE di *M. didyma* da seme in miscuglio, risultano in concentrazione sensibilmente più bassa nelle 2 selezioni clonali e, in particolare, la loro concentrazione è inferiore all'1% in quella Rossa.

Discussione

Al temine di due anni di speri-

mentazione, dal punto di vista agronomico-culturale le tre specie e le due selezioni di *M. didyma* non hanno mostrato differenze in termini di resistenza al freddo o alla siccità, fabbisogno idrico e competizione della flora infestante. Un'osservazione importante riguarda invece gli aspetti fitosanitari. In particolare, la specie *M. citriodora* si è mostrata complessivamente più rustica e meno soggetta sia a infestazioni di fitofagi (come afidi e cicaline), sia ad attacchi di agenti patogeni infettivi (funghi e virus).

Alla luce della caratterizzazione chimica, questa osservazione "di campo" potrebbe essere spiegata con il fatto che le parti aeree di *M. citriodora* presentano un maggior contenuto di timolo rispetto alle altre due specie. Il timolo è infatti una molecola nota per le sue proprietà antimicrobiche ma anche repellenti e insetticide (16), come dimostrano i numerosi studi in Letteratura.

Per quanto riguarda invece la resa e composizione chimica degli OE, la sperimentazione dimostra che gli OE e gli Id delle tre specie di *Monarda* presentano un diffe-

rente profilo della frazione volatile. Interessanti differenze sono state osservate anche per quanto riguarda le due selezioni clonali di *M. didyma*: nei due casi (Rossa e Viola) si ottiene pertanto un OE con chemotipo differente. La composizione degli OE e Id delle due selezioni ottenute da talea radicale, infatti, differisce sensibilmente da quella del “miscuglio fiorito” della stessa specie. Queste osservazioni trovano conferma con quanto riportato in Letteratura: infatti specie, selezioni o ibridi diversi danno un OE con composizione chimica differente. Un'altra considerazione di rilievo fa riferimento all'influenza che lo stadio fenologico della pianta ha sulla resa e composizione chimica dell'OE. Infatti, anche all'interno della stessa specie (come osservato nel caso di *M. didyma* e *M. fistulosa*), la resa è maggiore se si distillano le infiorescenze piuttosto che fusti e foglie. Anche i rapporti tra i principali costituenti dell'OE variano in funzione dello stadio fenologico.

Le differenze esistenti nei profili terpenici di specie e selezioni diverse suggeriscono quindi un loro impiego diversificato in funzione delle esigenze specifiche di ciascun settore applicativo, compreso quello Agronomico, ove la richiesta di fitofarmaci naturali è sempre più urgente. Studi successivi, volti ad accertare l'attività biologica dei diversi chemotipi (estratti da ciascuna specie e selezione), saranno indispensabili per pianificare quindi un impiego mirato.

Le ricerche illustrate sottolineano ancora una volta la difficoltà, ma al contempo la necessità, della standardizzazione di complessi naturali dalle mille potenzialità, ma al tempo stesso mutabili e strettamente condizionabili da infinite variabili. Ne consegue che l'approccio della Ricerca nei confronti delle piante aromatiche deve essere necessariamente interdisciplinare, mediante uno

sforzo integrato e coordinato di competenze di tipo agronomico, botanico, genetico, molecolare, chimico e fitopatologico.

*** UNIVERSITÀ DI BOLOGNA, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari**

****Istituto di Bioscienze e Biorisorse, CNR, Sesto Fiorentino (Firenze)**

*****Giardino delle Erbe Augusto Rinaldi-Ceroni, Casola Valsenio (Ravenna)**

La ricerca illustrata è stata presentata al VI Congresso Nazionale SIROE (Bologna, 18-19 ottobre 2019) ed è stata eseguita nell'ambito del Progetto “Monarda” finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Imola.

Si ringrazia l'ITAS Scarabelli-Ghini di Imola, Bologna, per avere messo a disposizione l'area destinata alla coltivazione delle tre specie di Monarda.

Bibliografia

- 1 - Pérez-Rosés R., Risco E., Vila R., Peñalver P., Cañigüeral S. (2016). Biological and Nonbiological Antioxidant Activity of Some Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 4716-4724.
- 2 - Di Vito M., Bellardi M.G., Mondello F., Girolamo A., Modesto M., Michelozzi M., Sanguinetti M., Barbanti L., Bugli F., Mattarelli P. (2018). Potenziale utilizzo di idrolati per il controllo delle infezioni microbiche. Convegno Nazionale “Sostanze Naturali e Terapie Integrate: dalla ricerca di base all'applicazione clinica” Roma, 7 novembre 2018.
- 3 - Di Vito M., Bellardi M.G., Mondello F., Modesto M., Michelozzi M., Bugli F., Sanguinetti M., Sclocchi M.C., Sebastiani M.L., Biffi S., Barbanti L., Mattarelli P. (2019). *Monarda citriodora* hydrolate vs essential oil comparison in several antimicrobial applications. *Industrial Crops & Products*, 128, 206-212.
- 4 - Mariani V., Turei S., Michelozzi M., Pollini A., Bellardi M.G. (2019). Idrolati di *Monarda didyma* per la difesa delle piante dalle infestazioni di *Trialeurodes vaporariorum*. Atti del VI Congresso Nazionale SIROE, *Natural 1*, n. 186 ottobre 2019.
- 5 - Scora R.W. (1967). Study of the essential leaf oils of the genus *Monarda* (Labiatae). *Amer. J. Bot.*, 54 (4), 446-452.
- 6 - Bruni R., Pellati F., Bellardi M.G., Benvenuti S., Paltrinieri S., Bertaccini A.,

Bianchi A. (2005). Herbal Drug Quality and Phytochemical Composition of *Hypericum perforatum* L. Affected by Ash Yellows Phytoplasma Infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 964-968.

- 7 - Bruni R., Bianchi A., Bellardi M.G. (2007). Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by cucumber mosaic virus (CMV). *Flavour Fragr. J.*, 22, 66-70.
- 8 - Bellardi M.G. (2016). Influenza degli aspetti fitosanitari delle piante aromatiche su resa e composizione dell'olio essenziale. Atti del Convegno: *Gli Oli Essenziali in Medicina Veterinaria e Agronomia*. 8 giugno 2016, Ozzano dell'Emilia (Bologna).
- 9 - Carrubba A., Catalano C. (2009). Essential Oil Crops for Sustainable Agriculture - A Review. E. Lichtfouse (ed.), *Sustainable Agriculture Reviews: Climate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms*, Sustainable Agriculture Reviews 2, Springer Science Business Media B.V.
- 10 - Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Delfine S., Cardile V., Rosselli S., Bruno M. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42-47.
- 11 - Delfine S. (2019). Relazione tra ambiente di coltivazione e resa in Olio essenziale delle piante officinali VI Congresso SIROE (18-19 Ottobre 2019, Bologna). *Natural 1*, ottobre.
- 12 - Russo A., Formisano C., Delfine S. et al. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem. Toxicol.*, 55, 42-47.
- 13 - Michelozzi M., Tognetti R., Maggino F., Radicati M. (2004). Seasonal variations in monoterpenic profiles and ecophysiological traits in Mediterranean pine species of group “halepensis”. *Forest*, 1(1), 37-50.
- 14 - Mattarelli P., Epifano F., Minardi P., Di Vito M., Modesto M., Barbanti L., Bellardi M.G. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from aerial parts of *Monarda didyma* and *Monarda fistulosa* cultivated in Italy. *TEOP* 20 (1), 76-86.
- 15 - Fraternale D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D., Epifano F., Burini G., Curini M. (2006). Chemical Composition, Antifungal and In Vitro Antioxidant Properties of *Monarda didyma* L. Essential Oil. *J. Essent. Oil Res.*, 18, 581-585.
- 16 - Koul O., Walia S., Dhaliwal G. S. (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints” *Biopestic. Int.*, 4(1), 63-84.