

**Abstract Giornata Formativa  
ICB-CNR SIROE  
Catania, 30 Giugno 2017**

**La chimica degli oli essenziali**

Uno strumento per la tracciabilità, biodiversità e qualità di specie vegetali

**Giuseppe Ruberto\***

*Istituto del CNR di Chimica Biomolecolare, Via P. Gaifami, 18 – 95126 Catania*

Gli oli essenziali sono una delle matrici più complesse presenti in natura. Un olio essenziale è per definizione ottenuto mediante processi esclusivamente fisici da una matrice vegetale, cioè tramite una distillazione in corrente di vapore e della sua variante idrodistillazione; l'unica deroga concessa a questa procedura è quella adottata per l'ottenimento degli oli essenziali di agrumi per i quali è applicata una metodologia essenzialmente meccanica.

Chimicamente parlando un olio essenziale è una miscela di svariate sostanze, da poche unità a diverse decine, caratterizzate tutte da una elevata volatilità e con un peso molecolare che di norma non eccede le 400 unità di massa atomica. Da un punto di vista biosintetico fanno parte degli oli essenziali alcune particolari classi di sostanze naturali, prime fra tutte: terpeni, fenil-propani ed acetogenine; dal punto di vista delle funzionalità chimiche sono presenti quasi tutte le tipologie: idrocarburi e la maggior parte delle sostanze ossigenate; in misura minore risultano presenti anche sostanze solforate ed azotate.

I terpeni, una delle principali classi di sostanze naturali, sono i principali componenti degli oli essenziali (Fig. 1). Da un punto di vista biosintetico queste sostanze discendono principalmente dalla cosiddetta via dell'acido mevalonico che conduce alla formazione dell'isoprene, un composto a cinque atomi di carbonio, che rappresenta l'unità strutturale di tutti i terpeni. L'unione di due unità isopreniche porta alla formazione dei monoterpeni ( $C_{10}$ ), di tre unità ai sesquiterpeni ( $C_{15}$ ), di quattro ai diterpeni ( $C_{20}$ ), quindi ai triterpeni ( $C_{30}$ ) e tetraterpeni ( $C_{40}$ ); tuttavia, solo monoterpeni, sesquiterpeni ed, in misura molto limitata, diterpeni fanno parte degli oli essenziali per ovvie ragioni di volatilità associate al peso molecolare. I fenil-propani ( $C_6-C_3$ ) sono i membri di un'altra classe di sostanze naturali presenti in molti oli essenziali. Da un punto di vista biosintetico provengono dalla via dell'acido shikimico, una delle due strade in natura che conduce alla formazione di un anello benzenico. Non sono così diffusi come i terpeni, ritrovandosi solo in alcune particolari specie e famiglie vegetali, su alcune di queste sostanze grava il sospetto di essere tossici, anche se prove definitive non ne sono state prodotte. Ciò ha indotto le autorità di controllo a livello europeo a suggerirne un uso moderato in ambito alimentare. L'ultima classe di sostanze presenti negli oli essenziali è rappresentata dalle acetogenine che derivano dalla via dell'acetato. Sono sostanze meno diffuse delle due classi precedentemente descritte e spesso derivano dalla degradazione, il più delle volte ossidativa, di precursori non volatili quali acidi grassi insaturi.

---

\* giuseppe.ruberto@icb.cnr.it

L'analisi dei profili degli oli essenziali è stata recentemente applicata ad una valutazione della flora spontanea e coltivata di piante aromatiche ed officinali siciliane. Timo, rosmarino, salvia, finocchio ed origano sono state sottoposte a questo studio individuando e caratterizzando alcune tipicità territoriali di queste matrici, ed in particolare dell'origano che è risultato dotato di un particolare profilo aromatico che lo distingue da campioni provenienti da altre regioni europee e da quello commerciale (Fig. 2).

Come definito all'inizio, l'ottenimento di un olio essenziale avviene per distillazione, tuttavia l'alta temperatura utilizzata può causare qualche degradazione della matrice naturale portando alla formazione di artefatti. In questi casi si adottano procedure alternative che anche se non portano all'isolamento di un olio essenziale vero e proprio permettono di determinare il profilo dei componenti volatili della matrice vegetale. Estrazione con fluidi supercritici (SFE) e microestrazione in fase solida (SPME) sono due delle metodologie adottate in questi casi.

La richiesta di prodotti naturali, e di sostanze aromatiche in particolare, da utilizzare ad esempio nel settore alimentare ma non solo, è in continua crescita. Oggi sono disponibili tre metodologie per ottenerle: sintesi chimica, estrazione da fonti naturali, processi di biotrasformazione. Questi ultimi si stanno imponendo come strumenti leader nella produzione di sostanze naturali in quanto permettono di ottenere sostanze definibili naturali, a prezzi non molto elevati, e con la possibilità di applicare processi ecocompatibili e sostenibili.

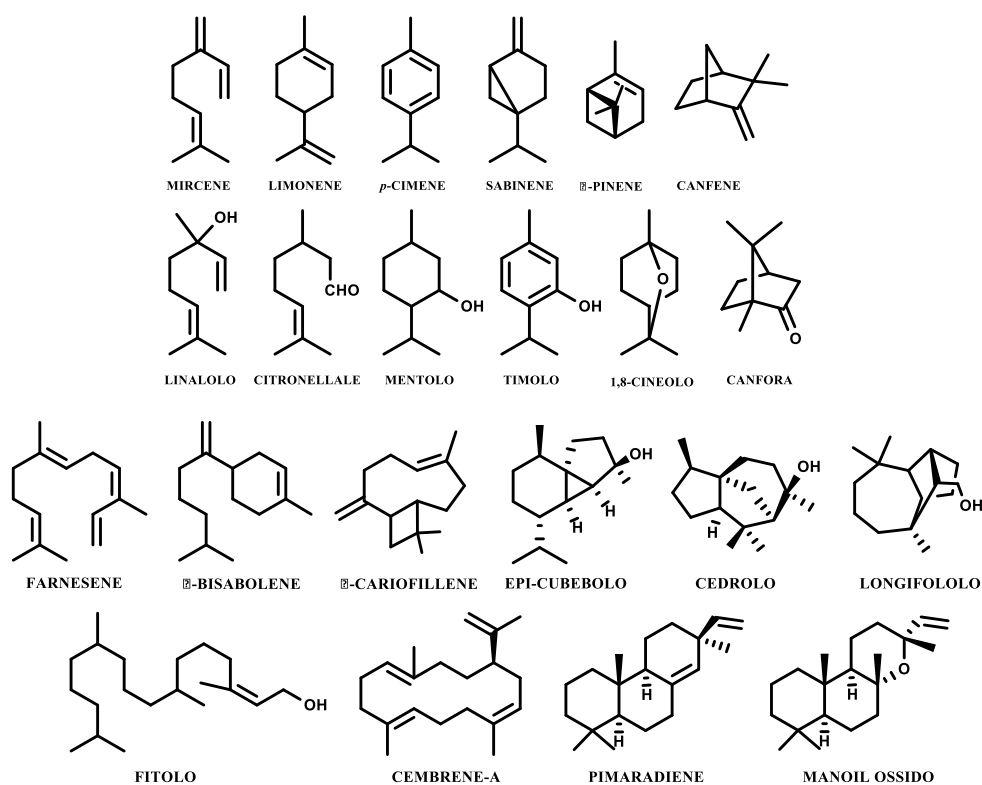
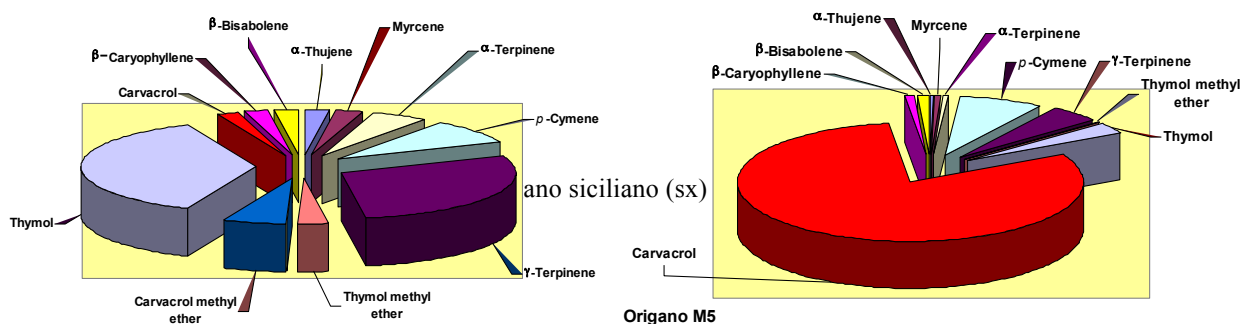


Figura 1. Mono, sesqui e diterpeni individuati negli oli essenziali



Origano M1-M4

Origano M5

# Essential oil profile of new *Citrus* hybrids, a tool for genetic *Citrus* improvement

S. Fabroni<sup>1</sup>, G. Ruberto<sup>2</sup>, P. Rapisarda<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), C.so Savoia, 190, 95024, Acireale (CT), Italy

<sup>2</sup> Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Chimica Biomolecolare (CNR-ICB), Via Paolo Gaifami 18, Catania, Italy

**Introduction.** The worldwide production of citrus essential oils is estimated to be approximately 100,000 tons based on total fruit production and the percentage processed. Today, most of the research studies on citrus crops addresses the production of new fruit selections to both meet consumer expectations and processing demands. Application of this knowledge in the field ensures that citrus fruits will continue to be economically valuable crops and a source of important health and nutritional benefits to people. Since 1951, the CREA-OFA has been working on genetic improvement programs for extant *Citrus* cultivars to develop new hybrids that are easy to peel, with a optimal fruit size and possessing new original sensory characteristics.

**Aims.** The chemical characterization of the volatile components of peel essential oils from several new *Citrus* hybrids obtained at CRA-OFA is herein reviewed and was aimed at identifying their new valuable flavour components. In addition, some useful information on inheritance of certain traits was obtained.

**Materials and Methods.** Different triploid hybrids were investigated: Clementine × grapefruit (P1-P7), Clementine × orange ('A146' and 'C1867'), Clementine × lemon, Clementine × mandarin ('Cami'); Clementine × orange ('OMO 6', 'OMO 12', 'OMO 15' and 'OMO 31'), Mandarin × orange ('Amoa 8'). Analyses of the essential oils were performed in triplicate by gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS).

**Results.** Our study demonstrated that the biosynthetic pathways of new hybrid essential oils were co-regulated by the genome of the two parents. However, in some cases, there was a dominance of one of the parental characteristics, such as lemon for Clementine × lemon hybrid, mandarin traits for 'Cami' and 'Moro' orange for 'Amoa-8' hybrid. Finally, an important characteristic found in some hybrids was a higher production of some essential oil components with respect to their parents, such as oxygenated monoterpenes and nootkatone in the 'A146' hybrid, linalool in the 'C1867', methyl-N-methylanthranilate in the 'Cami', and oxygenated compounds in 'OMO 31'.

**Conclusions.** These studies illustrate the difficulty in predicting the possible accumulation of secondary metabolites, such as peel essential oils, in fruit produced from various breeding methodologies with different *Citrus* species. This difficulty is likely related to the genetic complexity and changeability of this genus. Future research on the qualitative and quantitative composition of the essential oils of *Citrus* hybrids should be integrated with genomic studies in order to understand how the interactions of two genomes can produce combined effects on gene expression and phenotypes.

---

† E-mail: paolo.rapisarda@crea.gov.it

# Revisione tassonomica del genere *Helichrysum* siciliano tramite PCA della composizione degli oli essenziali

A. Maggio<sup>1‡</sup>, M. Bruno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Antonella Maggio, Dipartimento STEBICEF, Università di Palermo, Palermo, Italia,

<sup>2</sup>Maurizio Bruno, Dipartimento STEBICEF, Università di Palermo, Palermo, Italia

**Introduzione.** Il genere *Helichrysum* Miller (Asteraceae, Gnaphaleae) è rappresentato nella regione mediterranea da 65 taxa, di cui 58 distinti al rango specifico. Circa 30 taxa sono limitati al bacino orientale e mediterraneo e oltre 20 si trovano nella zona centrale e occidentale del Mediterraneo, con la Sicilia che ospita una quota rilevante di tale ricchezza biologica. Il numero di taxa e il grado tassonomico delle popolazioni di *Helichrysum* è ancora ampiamente discusso, a causa dell'elevata variabilità morfologica e della distribuzione frammentaria, pertanto molteplici interpretazioni e proposte nomenclaturali sono disponibili in letteratura. In questo senso, la Sicilia offre un caso di studio particolarmente interessante, in quanto le popolazioni di *Helichrysum* siciliane possono essere ben definite sulla base dei requisiti ecologici e della distribuzione geografica. Purtroppo il loro trattamento tassonomico risulta molto eterogeneo: alcuni autori riconoscono alcuni complessi di specie (Compl.) o aggregati (aggr.), ulteriormente suddivisi in diverse varietà o sottospecie; secondo altri, la maggior parte di queste entità merita il rango di specie mentre, dall'altro, Galbany - Casals et al. sostengono la presenza di solo due specie sull'Isola, senza ulteriori distinzioni all'interno di esse.

**Scopo.** Per contribuire alla soluzione del problema tassonomico, insieme al semplice, seppur accurato, confronto delle strutture micro e macromorfologiche, è stato deciso di raccogliere un numero rappresentativo di esemplari delle popolazioni di *Helichrysum* presenti nei loci classici dei tipi nomenclaturali di taxa siciliani, al fine di verificare eventuali correlazioni tra il trattamento tassonomico e il profilo chimico.

**Materiali e Metodi.** La composizione degli oli essenziali di 10 popolazioni del genere *Helichrysum* Miller (Asteraceae), raccolte nei loci classici dei taxa endemici alla Sicilia, è stata determinata.

Le parti aeree, raccolte a piena fioritura fra Maggio e Settembre 2013, sono state macinate e sottoposte ad idrodistillazione per 3 ore usando n-pentano come solvente. Gli estratti sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e poi immagazzinati in flaconi sigillati sotto N<sub>2</sub> a -20 °C, pronti per le analisi GC-MS. I campioni hanno prodotto una percentuale di olio fra lo 0,003% e lo 0,442% di odore gradevole. L'analisi GC-MS è stata eseguita su un Agilent 6850 Ser. II, dotato di una colonna capillare HP-5 (30 m x 0,25 mm i.d.; 0,33 µm). I composti sono stati identificati per confronto dei loro tempi di ritenzione con quelli di letteratura o attraverso il confronto con campioni noti.

**Risultati.** Le nostre analisi hanno confermato la collocazione di Gussone delle popolazioni indagate in tre gruppi principali, riferiti agli aggregati di *H. stoechas*, *H. rupestre*, *H. lineatum*, tutti appartenenti alla sezione *Stoechadina* (DC.) Gren. & Godr.

Un interessante risultato della nostra indagine chimica è l'autonomia del *H. litoreum* eolico dagli altri due rappresentanti siciliani di *H. italicum* Aggr., che potrebbero essere correlati

---

<sup>‡</sup> E-mail: [antonella.maggio@unipa.it](mailto:antonella.maggio@unipa.it)

all'origine tirrenica della popolazione eolica. Di conseguenza, mentre in altre parti d'Italia la differenza tra *H. litoreum* e *H. italicum* può essere difficile, ciò non accade in Sicilia, dove le due specie sono chiaramente distinguibili per le loro caratteristiche morfologiche e geografiche.

Un altro risultato interessante è la relativa affinità tra *H. litoreum* e *H. hyblaeum*. Quest'ultima specie, per le sue caratteristiche morfologiche piuttosto ambigue, è stata attribuita da alcuni autori all'Aggr. di *H. rupestre*. Secondo i nostri risultati, appartiene invece all'Aggr. di *H. italicum*. Si spera che futuri studi filogenetici valutino, sulla base di marcatori molecolari, la distanza genetica e i tempi di divergenza tra le popolazioni in questione, la cui storia filogeografica potrebbe essere legata a quella di *Anthemis pignattiorum*, una specie della Sezione. *Haortia* recentemente scoperta in SE-Sicilia, avendo i suoi parenti più vicini in NW-Sicilia.

Un terzo risultato interessante è la relativa autonomia della popolazione di Capo Zafferano all'interno del gruppo di *H. panormitanum*. Benché non siano state effettuate analisi su altre popolazioni distribuite lungo la costa tra Termini Imerese e Monte Catalano, è probabile che le aree periferiche della piattaforma di carbonato panormide rappresentino un'efficace barriera fitogeografica, isolando le popolazioni presenti nel Dominio Imerese e che i pochi esemplari che si trovano immediatamente a est di questa caesura (come quelli di San Martino e Monte Gallo) hanno una origine relativamente recente. Una simile situazione è stata evidenziata studiando la distribuzione di piante endemiche lungo altre importanti divisioni geo-petrografiche e strutturali della Sicilia.

**Conclusioni.** In questo lavoro l'analisi della composizione degli oli essenziali è stata usata per identificare le popolazioni selvatiche di *Helichrysum*. Tali analisi, insieme a studi filogenetici e filogeografici basati su marcatori molecolari, rappresentano un complemento utile nella ricerca tassonomica e potrebbero contribuire a comprendere l'origine e la diversificazione del genere *Helichrysum*. Infatti, i nostri risultati supportano la nuova composizione tassonomica di due taxa: *Helichrysum preslianum* subsp. *compactum* e *Helichrysum panormitanum* subsp. *latifolium*.

**Keywords:** *Helichrysum*, Sicilia, oli essenziali, chemotassonomia

# Effects of cropping techniques on yields and quality of essential oils

A. Carrubba<sup>§</sup>

*D/SAAF, Università di Palermo, Italy*

**Introduction.** In the investigations about plants' essential oil (EO) production, two different aspects must be taken into account: EOs yields (in kg ha<sup>-1</sup> or in % on plant dry matter) and EOs chemical profile, i.e. the relative amount of each single volatile compound inside the EO itself. Both topics keep a deep importance in assessing pharmaceutical/industrial reliability and economical value of EO crops. By inducing modifications of the growth environment of plants, cropping techniques may cause wide modifications in both aspects of EO production. Hence, to choose the most proper set of cropping operations is a crucial issue. In this work, an attempt is made to collect information from the available literature about the effects exerted by several cropping operations on yields and quality of EOs.

**EOs production and storage in plants.** Plants' ability to produce and accumulate EOs depends upon two series of factors. The first are collectively termed "endogenous" factors, and encompass all traits linked to the intrinsic characteristics of plant (age, development, and genetic makeup) that variously rule its secondary metabolic pathways. Factors of the second group are termed "exogenous" and include all environmental features in which such metabolic pathways are expressed by the plant.

**Effects of cropping techniques on plant secondary metabolism.** Cropping techniques are able to modify the conditions in which plants perform their metabolic activity, by exerting two forms of influence:

- limiting, or favouring, in plants the expressions of all "inner" (endogenous) factors;
- causing modifications of all "outer" (exogenous) factors.

Many studies have been carried out worldwide about this topic, and rather all agronomic practices (sowing, fertilization, irrigation, pest management, and harvest) were demonstrated to exert specific influence on one or more factors, both endogenous and exogenous. Modifications in sowing management, for example, may deeply influence plant growth conditions; in species such as coriander, fennel, cumin or chamomile, an earlier sowing time causes a prolonged vegetative stage of plants, that is generally positively correlated to seeds yield, and to EO storage inside seeds. Similarly, sowing density may affect the amount and quality of light interception by plants; since secondary metabolites are a side-product of plant photosynthetic activity, all variations of light duration, intensity and quality are claimed to influence the biochemical response of plants in terms of production of secondary metabolites. This field of study is huge, and many other examples may be found as concerns, e.g., fertilization or irrigation (i.e. variations of nutritional and water plant status). Experimental results are varying, and often contrasting, according to the plant species and, sometimes, to the special metabolite (or mixture of metabolites) of interest. In several cases, the same factors that exert a positive effect on biomass yields, were found to have a different, and sometimes adverse, influence on some quality aspects. Hence, all aspects of cropping management must be accurately tuned according to the expected outcome of cultivation.

**Keywords:** *plant secondary metabolism, cultivation, essential oil yields, essential oil storage*

<sup>§</sup>

E-mail: [alessandra.carrubba@unipa.it](mailto:alessandra.carrubba@unipa.it)

# Gli oli essenziali nel controllo di insetti infestanti: stato dell'arte e prospettive

L. Zappalà<sup>1\*\*</sup>, A. Biondi<sup>1</sup>, M. Ricupero<sup>1</sup>, O. Campolo<sup>2</sup>, V. Palmeri<sup>2††</sup>

<sup>1</sup>Università di Catania, Dip. di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, Italia

<sup>2</sup>Università "Mediterranea" di Reggio Calabria, Dip. di Agricoltura, Italia

**Introduzione.** La scoperta e l'implementazione di nuove sostanze insetticide a ridotto impatto ambientale è cruciale per la messa a punto di strategie ecosostenibili per il controllo di artropodi infestanti. Recentemente, una crescente importanza è stata data alle sostanze di origine naturale e in particolare vegetale. Tra queste gli oli essenziali (OE) hanno mostrato un buon potenziale di controllo nei confronti di diversi insetti nocivi e la letteratura scientifica sull'argomento è in costante crescita.

**Scopo.** In tale contesto, sono in corso diversi progetti di ricerca, aventi come obiettivo la valutazione della tossicità target e non-target di OE di agrumi e di piante aromatico-condimentarie nei confronti di insetti dannosi in ambito urbano, merceologico e agricolo.

**Materiali e metodi.** Sono stati saggiati OE di arancio dolce, arancio amaro, limone, mandarino, bergamotto, sia in emulsione che nanoincapsulati in PEG (OE-PEG), su insetti infestanti le derrate alimentari [*Tribolium confusum* DuVal, *Rhyzopertha dominica* (F.)], su larve della zanzara *Aedes albopictus* (Skuse) e sull'insetto invasivo, *Tuta absoluta* (Meyrick), dannoso al pomodoro. Gli estratti utilizzati nei vari test sono stati caratterizzati chimicamente (GC/MS), evidenziando l'abbondante presenza di limonene, che è stato oggetto di ulteriori saggi in entrambe le sue forme enantiomeriche. In alcuni casi, l'azione insetticida degli OE è stata saggiata anche in applicazioni congiunte con polveri inerti (caolino e terre di diatomee). Sono stati altresì valutati i potenziali effetti indesiderati su insetti utili e sulle piante.

**Risultati.** Tra gli OE testati, quello estratto dai frutti di arancio dolce, è risultato il più promettente, sia in virtù della sua efficacia insetticida, nonché della sua facile reperibilità sul mercato a prezzi compatibili con l'impiego come insetticida su larga scala. La combinazione OE di arancio dolce-caolino ha evidenziato un effetto sinergico sulla mortalità di *R. dominica*. La tossicità sull'insetto fitofago è variata in funzione dello stadio saggiato, della via di esposizione e della formulazione. Nel caso di *T. absoluta*, le uova sono risultate lo stadio meno suscettibile e l'OE-PEG di arancio dolce è stata la sostanza più efficace nel controllare questo stadio. Gli OE-PEG di arancio dolce e mandarino sono risultati i più tossici nei confronti delle larve, per contatto e per ingestione, rispettivamente. La nano formulazione ha ridotto la fitotossicità delle applicazioni di OE sulle foglie di pomodoro. I predatori esposti a residui freschi di OE-PEG sono sopravvissuti significativamente meno rispetto al testimone non trattato, ma significativamente più a lungo rispetto agli esemplari esposti a due insetticidi commerciali (indoxacarb e spinosad). Tuttavia, è stata registrata una significativa riduzione della fertilità degli insetti esposti anche dopo 7 giorni dal trattamento.

**Conclusioni.** Nel complesso, i dati raccolti suggeriscono che gli oli essenziali di agrumi e il processo di nanoincapsulazione potrebbero incrementare la sostenibilità dei programmi di controllo biologico e integrato attualmente impiegato su insetti dannosi in diversi ambiti applicativi.

**Keywords:** Agrumi, fitofagi, zanzare, insetti delle derrate

---

\*\* E-mail: lzappala@unict.it;

†† E-mail: vpalmeri@unirc.it

# Sol-gel encapsulation of essential oils

R. Ciriminna<sup>††</sup>, A. Scurria, M. Pagliaro

*ISMN-CNR, Palermo, Italy*

**Introduction.** The efficient encapsulation of essential oils (EOs) is a topic of relevant interest in academy and industry. Indeed, a full exploitation of their plethora of properties and applications is still hampered by their poor chemical and physical stability. Amongst the new technologies introduced in the last decade, the sol-gel encapsulation of scented and aromatic organics in nanostructured porous silica is a promising alternative to encapsulation in organic polymers. Sol-gel glasses do not swell, show low degree of chemical interaction with the encapsulated active, high protection against oxidation and high mechanical resistance. Moreover, silica obtained by the sol-gel process is non-toxic and biocompatible (in the US it has the GRAS status and is approved as a flavour carrier with up to 2% in weight in the final food). Finally, sol-gel derived silica is resistant to microbial attacks and can be used to encapsulate both hydrophilic and hydrophobic liquids.

**Aims.** The encapsulation of EOs in solid silica-based materials is intended to increase their stability making them easier to handle and deliver. Thanks to their characteristics and biocompatibility, these materials are ideal for use in different sectors comprising agrochemistry, for large scale, open field application.

**Materials and methods.** In a typical procedure, an emulsion of the EO in water is prepared using a suitable surfactant, and subsequently it is mixed with the selected silica precursors. The addition of aqueous NaOH or NH<sub>3</sub> promotes the polycondensation of the silicon monomers resulting in the formation of a solid material encapsulating the EO. The versatility of sol-gel method allows to tailor the material properties by carefully controlling reaction conditions and components, thus full or core/shell spherical microparticles can be obtained with different degrees of encapsulation of the functional active compounds.

**Results.** Once encapsulated in the sol-gel material the different components of the EO are protected and slowly released in the environment. Spherical particles with diameter around 500 nm containing bergamot oil have been synthesized and characterized. Other materials, have been recently prepared entrapping sweet orange oil, and their characterization is currently underway.

**Conclusions.** Sol-gel encapsulation in silica and organically modified silica of environmentally benign but unstable EOs offers unprecedented long-term stability, which is a crucial requirement for any economically viable product. The formulation of hydrophobic fragrant molecules in water becomes possible thanks to the encapsulation in hydrophilic silica. The sol-gel approach to encapsulate fragrance and aroma chemicals in porous silica-based materials, and particularly in silica-based microcapsules or microspheres, allows the fragrance to be released with enhanced precision and effectiveness of action, while being largely chemically and physically stabilized making it possible to have new applications from cosmetics to agrochemistry.

**Keywords:** *silica, hybrid materials, sol-gel encapsulation, essential oils*

---

<sup>††</sup> E-mail: rosaria.ciriminna@cnr.it



## Nuove applicazioni degli oli essenziali in sistemi polimerici elettrofilati con attività antimicrobica ed antibiofilm

A. Nostro<sup>1§§</sup>, F. Lopresti<sup>2</sup>, M. D'Arrigo<sup>1</sup>, A. Marino<sup>1</sup>, R. Scaffaro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Università degli Studi di Messina,

<sup>2</sup>Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali, Università di Palermo

**Introduzione.** In tempi recenti, gli oli essenziali ed i loro componenti emergono come nuovi e promettenti antimicrobici. La loro applicazione, tuttavia, presenta alcune limitazioni dovute alla scarsa solubilità ed elevata volatilità. Le attuali tecnologie sono finalizzate all'incorporazione degli oli essenziali in matrici polimeriche al fine di sviluppare sistemi in grado di migliorarne la stabilità e prolungarne l'attività biologica. Il progresso scientifico-tecnologico del settore mostra oggi un rinnovato interesse verso l'inclusione di composti attivi in fibre ultrafini prodotte mediante “*electrospinning*”. Le peculiari proprietà delle nanofibre quali alta flessibilità, porosità, elevato rapporto superficie/volume ed affinità con la matrice extracellulare ne consentono l'applicazione nel settore biomedico.

**Obiettivo.** Sviluppare nanofibre di acido polilattico (PLA) contenenti carvacrolo (CRV) e valutarne le proprietà morfologiche, meccaniche e l'efficacia antimicrobica. Il rilascio del CRV e l'attività antimicrobica ed antibiofilm sono stati studiati nei confronti di *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* sia in coltura singola che mista.

**Materiali e metodi.** Le fibre sono state preparate mediante “*electrospinning*”. La soluzione di PLA (10 wt% in una miscela di cloroformio ed acetone 2:1 vol) è stata caricata con il 28 wt% di CRV rispetto al polimero. Le proprietà meccaniche delle membrane sono state valutate con un dinamometro da laboratorio. La morfologia dei materiali è stata osservata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM); il rilascio di CRV è stato condotto in PBS a 37 °C fino a 144 h ed analizzato tramite misure spettroscopiche (UV-Vis). I campioni di nanofibre (1, 2, 3 mg in peso) sono stati posti a contatto con colture di *S. aureus* ATCC 6538 e *C. albicans* ATCC 10231, sia in coltura singola che mista, e incubati per 24, 48, 72 e 144 h. Gli effetti sulla crescita microbica e sul biofilm sono stati valutati mediante conta delle cellule vitali, misurazioni spettrofotometriche della biomassa e valutazioni dell'attività metabolica.

**Risultati.** Le immagini SEM hanno documentato un aumento del diametro medio delle fibre da  $1.02 \pm 0.51 \mu\text{m}$  a  $1.42 \pm 0.53 \mu\text{m}$  nei sistemi caricati con CRV. La presenza del CRV ha causato un incremento del modulo elastico da 57 MPa a 98 MPa ed un aumento della deformazione dal 7.8 % al 115 %. Il rilascio in PBS è caratterizzato da un *burst* nelle prime 6 ore e da una cinetica più lenta fino a 144 h, in cui circa l'85 % del CRV è stato rilasciato nel mezzo. Le nanofibre contenenti CRV sono risultate efficaci nell'inibire la crescita microbica ed il biofilm di *S. aureus* e *C. albicans* sia in coltura singola che mista. Dopo 24 h di incubazione e fino alla fine dell'esperimento, la riduzione delle cellule vitali (circa  $4 \log_{10}$  CFU/ml), della biomassa e dell'attività metabolica (80-90%) è risultata concentrazione-dipendente.

**Conclusioni.** L'incorporazione di CRV in nanofibre di PLA apre prospettive interessanti in ambiti di applicazioni precedentemente limitati.

**Keywords:** Oli essenziali, attività antimicrobica, biofilm, delivery system, electrospinning

---

§§ E-mail: [anostro@unime.it](mailto:anostro@unime.it)

# L'utilizzo degli oli essenziali nei prodotti alimentari: miglioramento qualitativo ed effetti sulla *shelf life*

V.Rizzo<sup>\*\*\*</sup>, L.Amoroso, F.Licciardello, A.Mazzaglia, C.Restuccia, G.Muratore

*Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A)  
Università degli Studi di Catania, via Santa Sofia 100, 95123 Catania, Italia*

**Introduzione.** Come risposta alle sempre più numerose richieste da parte dei consumatori di ridurre o eliminare gli additivi di sintesi chimica, numerosi sforzi sono stati condotti per trovare alternative naturali in grado di prevenire la crescita di batteri e funghi nei prodotti alimentari. Tra le alternative più interessanti per il miglioramento della *shelf life* di tali prodotti, vi è l'uso di oli essenziali, indicati con l'acronimo EOs (essential oils), spesso impiegati attraverso tecniche di *dipping*, *spraying* o, più recentemente, direttamente incorporati all'interno delle matrici plastiche (Abadias et al., 2011, Gutierrez et al., 2009). Il potere antimicrobico di tali sostanze è noto; in particolare gli oli essenziali di *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* venivano ampiamente utilizzati come agenti terapeutici per il trattamento di infezioni batteriche e micotiche (Van Vuuren et al., 2007).

**Scopo.** I cambiamenti dello stile di vita hanno visto affermarsi sul mercato il prodotti di IV e V gamma, sempre più graditi dai consumatori, per l'elevato contenuto di servizio che ne facilita l'utilizzo e il consumo. L'orientamento della ricerca è pertanto garantire la *shelf life* e la qualità dei prodotti confezionati mediante la combinazione di più fattori di stabilità o più interventi tecnologici. Lo scopo di questa indagine preliminare è valutare l'efficacia degli EOs dei frutti di *Foeniculum vulgare* Miller e di *Rosmarinus officinalis* L. nella conservazione di alcuni alimenti in combinazione con particolari metodologie impiegate nel confezionamento alimentare.

**Materiali e metodi. 1° caso:** patate fresche tagliate a fette, EO di rosmarino (*R. officinalis* L.), buste polimeriche idonee al *sous vide*, frigoconservazione a 4°C.

**2° caso:** cuori di carciofo tagliati a fette, *active packaging* con un emettitore di EO di frutti di *F. vulgare* Miller, vaschette in polietilentereftalato (PET), sacchetti di polipropilene (PP), frigoconservazione a 4°C. **Analisi qualitative eseguite:** variazione del peso; colore (CIELab); analisi di immagine; consistenza; carica microbica, analisi sensoriale.

**Risultati.** I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'utilizzo sinergico di sostanze naturali con note attività antiossidanti e antimicrobiche e metodologie di *packaging* consentono di conservare entrambi i prodotti di IV gamma, mantenendo la qualità fino a 12 giorni di frigoconservazione. L'EO di *R. officinalis* L. ha esercitato un impatto relativo maggiore sulla texture delle patate, facendo registrare valori di resistenza al taglio mediamente più elevati rispetto al controllo. I livelli di contaminazione microbica si sono mantenuti al di sotto dei valori suggeriti per i prodotti di IV gamma. Anche la valutazione sensoriale ha confermato il ruolo positivo del trattamento con EO.

**Conclusioni.** Le varietà valutate hanno dimostrato che esiste una naturale attitudine alle diverse tecnologie di trasformazione (taglio in fette). È stato confermato il ruolo positivo del

---

\*\*\* E-mail: vrizzo@unict.it

trattamento con EO, che ha conservato la texture ed inibito la formazione di odori e aromi sgradevoli.

**Keywords:** *shelf life, qualità, sicurezza, microbiologia.*

## **La qualità degli oli essenziali: primo elemento indispensabile per la certezza dell'efficacia.**

*di Mario Rosario Rizzi<sup>†††</sup> - FLORA srl, Lorenzana, Pisa*

In Aromaterapia, per gli istituti di ricerca, per gli operatori e per il vasto pubblico utilizzatore, il bisogno principale e fondamentale è quello di riuscire a reperire e utilizzare esclusivamente gli oli essenziali (OE) al 100% puri (ovvero provenienti da una sola fonte botanica), naturali (senza molecole di sintesi) e totali (ovvero senza essere stata tolta nessuna molecola). Per mantenere l'integrità fisico-chimica degli OE è bene anche evidenziare che quest'ultimi devono essere sempre ben conservati in flaconi sicuri, ben chiusi, riparati dalla luce e in luoghi freschi e asciutti.

Per capire quanto siano preziosi gli OE, basti pensare che per ottenere 1 litro di OE puro al 100% sono necessari, per esempio: 200-300 Kg di bucce di agrumi, 15-20 Kg di resina d'incenso, 500-1000 Kg di basilico, 30 Kg di legno di cedro, 50 Kg di semi di finocchio, 1 milione di fiori di gelsomino. Un esempio ulteriore potrebbe essere la Melissa: per 1 kg di OE di Melissa puro 100% naturale occorrono 70 quintali di foglie (7.000 kg), che si producono con circa 15.000 mq di terreno. Il valore di costo al pubblico per 1 ml di OE di Melissa è di € 30 circa, ma sul mercato vengono invece spacciati da molte aziende OE di Melissa falsi, con un prezzo al pubblico anche di € 12 per 10 ml. Fondamentali per un'ottimale coltivazione delle piante sono il luogo specifico, la tecnica di produzione agricola (biodinamica o biologica) e il tempo balsamico di raccolta. L'impegno del produttore, per la trasparenza del proprio lavoro e per il rispetto del consumatore, è quello di fornire un'etichetta di prodotto in cui siano specificate tutte le caratteristiche qualitative dell'OE. Gli OE possono essere utilizzati come aromi alimentari, integratori alimentari, cosmetici, profumi per ambienti. Ognuna di queste categorie è regolata da specifiche normative e regolamenti, per garantire la tracciabilità e qualità. Le garanzie di qualità di un OE puro al 100% e proveniente da agricoltura biologica e biodinamica controllata sono: controllo dei metodi ecologici di coltivazione; sviluppo naturale della forza della pianta; verifica e certificazione dei metodi e delle rese di estrazione; riduzione notevole dei rischi di sofisticazione e adulterazioni.

Gli OE da noi prodotti sono certificati Demeter, Codex e hanno il Marchio di riconoscimento Europeo per i prodotti biologici. Vengono inoltre sottoposti a ulteriori controlli e monitoraggi per la garanzia della qualità, quali: prove olfattive e organolettiche: profumo, colore e consistenza; gascromatografie di composizione chimica; gascromatografie multiresiduali: per identificare eventuali residui di fitofarmaci e pesticidi. Il fito-complesso, l'intera miscela dei componenti dell'OE che viene determinata mediante la gascromatografia, rappresenta una sorta di carta di identità dell'OE. Il chemotipo invece, che in maniera molto semplicistica possiamo indicare come il maggiore o i due maggiori componenti di tale OE, rappresenta l'impronta digitale quindi la caratteristica distintiva di quell'olio rispetto a tutti gli altri.

Se pensiamo ad esempio al Timo, il "nome e cognome" sarà sempre lo stesso (*Thymus vulgaris*). Il chemotipo però, ci permette di dire che l'OE a timolo avrà una spiccata azione antibatterica, mentre quello a linalolo, pur avendo una azione inferiore, risulta maggiormente indicato nel trattamento delle mucose. Per cui se desidero sanificare un ambiente mediante diffusione ambientale, utilizzerò il prodotto più potente, ovvero l'OE a timolo; mentre invece, se dovrò fare dei trattamenti a livello della mucosa oro-buccale, tenderò a scegliere quello a linalolo, presentando un profilo di maggiore sicurezza.

Concludendo, è importante utilizzare esclusivamente oli essenziali di alta qualità, sia ai fini di una ricerca rigorosa, sia per un utilizzo sicuro ed efficace da parte dei consumatori.

**Keywords:** Aromaterapia, oli essenziali, qualità biologica e qualità biodinamica.

## ESSENTIAL OILS DELIVERY BY LIPID NANOPARTICLES

C. Carbone<sup>1,2,3,†</sup>, E.B. Souto<sup>2,3</sup>, G. Puglisi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Drug Sciences, University of Catania, Catania, Italy, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra (FFUC), Coimbra, Portugal, <sup>3</sup>REQUIMTE/LAQV, Group of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

**Introduction.** Essential oils (EOs) are worldwide considered as one of the most important field for the evaluation of traditional products. Numerous essential oils present in the Mediterranean area, such as *Origanum* spp., *Thymus* spp. and *Rosmarinum* spp., commonly used in the food industry, have been reported to be effective against several microorganisms. Different drawbacks, such as hydrophobicity and insolubility in water, high volatility and instability due to oxidation and hydrolysis, still limit the practical use of EOs in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Thus, in order to overcome these drawbacks, the nanoencapsulation strategy through innovative delivery systems could represent a potential valid solution.

**Aims.** The aim of the present work was to exploit the use of the EOs extracted from Mediterranean plants both as intrinsic compounds and active ingredients of nanostructured lipid carriers (NLC).

**Materials and methods.** *Rosmarinus officinalis*, *Lavanda sumian*, *Origanum hirtum* and *Thymus capitatus* were kindly provided by Exentiae s.r.l. (Catania, Italy). NLC were prepared by phase inversion temperature (PIT) and high pressure homogenization (HPH) methods. All systems were characterized to evaluate mean particle size and polydispersity (Zetasizer, Malvern Instrument), chemical structures by FT-IR spectrophotometer (Perkin Elmer Spectrum RX I, USA), stability (Tubiscan<sup>®</sup> AGS, Formulaction, France and multisample analytical centrifuge LUMiSizer<sup>®</sup>, LUM GmbH, Germany) and *in vitro* cell viability (MTT assay) on spontaneously transformed keratinocytes from histologically normal skin (HaCaT).

**Results.** The preliminary screening of two different surfactant mixtures using the PIT method allowed us to exclude the use of Tween 80/Glyceryl oleate, since this combination did not allow the formation of well-structured small homogeneous nanoparticles with the selected EO.

---

††† E-mail: ccarbone@unict.it

Nanosuspensions prepared by the PIT procedure and by the scalable HPH method using the second mixtures of surfactants showed the presence of nanoparticles of small mean size ( $Z_{ave} < 200$  nm) and homogeneously dispersed ( $PDI < 0.15$ ), with no significant difference between the two preparation procedures ( $p$ -value  $> 0.05$ ). FT-IR spectra showed that the lipid mixture arranged in the nanoparticles with a similar structure to that of the original components only in *Rosmarinum* and *Lavanda* loaded-NLC, without the occurrence of chemical reactions. NLC prepared with *Rosmarinum* and *Lavanda* showed a greater stability compared to *Origanum*, since only slight migration phenomena could be revealed. LUMiSizer confirmed experimental creaming values were very close to the predicted ones calculated by Stoke's law, thus confirming that the instability phenomena could be used to extrapolate the creaming at regular gravity. Cell viability studies confirmed that EO-NLC safety is related to a dose-dependent effect.

## **Modelli di cheratite sperimentale in *ex vivo* per la valutazione dell'efficacia di prodotti di origine vegetale**

**A. Marino<sup>1\*</sup>, A. Nostro<sup>1</sup>, D. Scalas<sup>2</sup>, V. D'Angelo<sup>1</sup>, M. D'Arrigo<sup>1</sup>, N. Mandras<sup>2</sup>, V. Tullio<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Università di Messina.*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università di Torino.*

**Introduzione.** Il problema sempre più diffuso della resistenza agli antimicrobici e la crescente richiesta di “prodotti di origine naturale”, ha portato la comunità scientifica a rivalutare e riconsiderare l'approccio fitoterapico al trattamento delle infezioni microbiche. Numerosi sono, infatti, gli studi *in vitro* sull'attività antimicrobica di sostanze naturali, quali oli essenziali (EO) e idrolati. Pochi sono invece gli studi sperimentali *in vivo* poiché risentono, oltre ad una normativa molto restrittiva, di problemi etici ed economici. Utilizzare soluzioni alternative alla sperimentazione *in vivo* è quindi indispensabile per eseguire screening di attività antimicrobica che diano risultati predittivi di una potenziale attività *in vivo*. Nostri studi precedenti hanno dimostrato che l'idrolato di *Coridothymus capitatus* (L.) Richb.f. (0.6% OE) (Exentiae S.r.l. CT), valutato singolarmente ed in associazione con agenti antimicotici, mostrava una buona attività *vs* numerosi ceppi di *Candida* spp. e non era citotossico.

**Obiettivo.** Saggiare l'attività antimicotica dell'associazione idrolato/amfotericina B su cheratiti sperimentali in *ex vivo* indotte da *Candida albicans*.

**Materiali e metodi.** Per l'allestimento delle colture corneali sono stati utilizzati occhi enucleati da conigli albini per uso alimentare. Le colture allestite sono state divise in 3 gruppi in base al target del modello sperimentale: I° gruppo-tollerabilità dell'epitelio corneale all'idrolato; II° gruppo-infezione indotta da *C. albicans* ATCC 10231 mediante abrasione corneale; III° gruppo-infezione da *C. albicans* ATCC 10231 mediante iniezione intrastromale. Il I° gruppo è stato trattato con l'idrolato ogni 30' per 7 h, successivamente le cornee sottoposte a colorazione con una soluzione di ioduro di propidio (PI) sono state osservate al microscopio a fluorescenza; il II° e il III° gruppo, dopo 3 ore dall'infezione, sono stati suddivisi in quattro sottogruppi. Ognuno di questi sottogruppi è stato trattato per 24 h, rispettivamente con 10 instillazioni di idrolato, amfotericina B (AMB), associazione

idrolato/AMB e soluzione salina. Le cornee di entrambi i gruppi sono poi state analizzate per valutare la carica fungina.

**Risultati.** Le immagini al microscopio del I° gruppo hanno mostrato una colorazione negativa del PI dimostrando l'integrità della membrana delle cellule epiteliali e quindi la mancanza di citotossicità dell'idrolato. I gruppi trattati hanno mostrato una riduzione significativa della carica rispetto al gruppo controllo ( $p < 0.01$ ). I risultati del II° gruppo hanno evidenziato una maggiore attività antimicotica dell'associazione idrolato/AMB rispetto a quella dei singoli campioni. I risultati del III° gruppo hanno dimostrato un'attività equivalente dei sottogruppi trattati con AMB e idrolato/AMB.

**Conclusioni.** I dati nel loro insieme hanno dimostrato che l'idrolato di *C. capitatus* non ha attività citotossica sull'epitelio corneale e ha un maggiore effetto antimicotico in associazione con AMB quando l'infezione è conseguenza di un danno epiteliale. Probabilmente l'infezione, indotta dopo abrasione, ha consentito all'idrolato di bypassare l'epitelio e raggiungere lo stroma, strato idrofilo sottostante. Nessun incremento dell'attività è stato invece rilevato con l'infezione indotta mediante iniezione intrastromale, probabilmente perché l'epitelio, strato lipofilo, ha rappresentato una barriera all'assorbimento dell'idrolato all'interno della cornea.

*Keywords:* cheratiti in *ex vivo*, idrolato, *Coridothymus capitatus*, *Candida albicans*

E-mail: [anmarino@unime.it](mailto:anmarino@unime.it)

## **Idrolati: Nuove possibili applicazioni nel campo dei beni culturali**

**M. Di Vito<sup>1-2§§§</sup>, M.G. Bellardi<sup>3</sup>, P. Colaizzi<sup>1</sup>, D. Ruggiero<sup>1</sup>, S. Sotgiu<sup>1</sup>, S. Jannuccelli<sup>1</sup>, M. Michelozzi<sup>4</sup>, F. Mondello<sup>2</sup>, P. Mattarelli<sup>3</sup> & M.C. Sclocchi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Istituto Centrale Restauro e Conservazione Patrimonio Archivistico e Librario (ICRCPAL), MIBACT, Roma, Italia.* <sup>2</sup>*Dip. di Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate (MIPI), Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma, Italia.* <sup>3</sup>*Dip. di Scienze Agrarie (DipSA), Università di Bologna, Italia.* <sup>4</sup>*Istituto di Bioscienze e Biorisorse (IBB), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Firenze, Italia*

### **Introduzione.**

I biodeteriogeni fungini e batterici della carta, in condizioni termoigrometriche non adatte alla conservazione, sono in grado di provocare l'indebolimento della struttura molecolare della cellulosa mediante enzimi specifici che portano alla frammentazione delle molecole con perdita della resistenza della struttura della carta (Reese e Downing, 1951; Lynd et al, 2002; Zhang e Lynd; 2004). Inoltre, con la loro attività metabolica sono in grado di rilasciare acidi deboli o pigmenti provocando alterazioni cromatiche molto resistenti alle pratiche di pulizia note come foxing (Nyuksha, 1983; Montemartini Corte et al, 2003; Zotti et al, 2011). Dal 2003, il gel di Gellano è stato usato come agente pulente per le opere cartacee. Negli anni, questo gel è stato modificato per incrementarne la forza pulente senza mai conferirgli, però, anche un'azione citocida o citostatica e, com'è noto, nessun gel è stabile agli attacchi microbici. Per queste ragioni, nell'interesse dell'opera e degli operatori, è importante sia la

---

§§§ E-mail: [wdivit@gmail.com](mailto:wdivit@gmail.com)

conservazione dei gel per brevi periodi, nonché evitare che dei loro residui restino sulla superficie dell'opera cartacea.

**Scopo.** Lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare se l'aggiunta di sostanze naturali, come idrolati (prodotti ritenuti generalmente di scarto del processo di distillazione degli oli essenziali, anche noti come "acque aromatiche"), siano in grado conferire al gel di Gellano anche un'azione microbica senza danneggiare le opere di carta e la salute umana.

Lo scopo è stato perseguito cercando in primo luogo di conferire al gel di Gellano una resistenza agli attacchi microbici al fine di evitare la crescita microbica sul gel usato dal restauratore o sui residui eventualmente presenti sull'opera cartacea dopo il restauro. 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.

**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 (GellanID). Analisi al SEM, colorimetriche e di pH sono state eseguite su campioni di carta whatman (W) invecchiata e no, precedentemente messi a contatto con GellanID. Infine, campioni di W, dopo essere stati inoculati con una concentrazione nota di ceppi fungini, sono stati trattati con GellanID e quindi posizionati su idonei terreni di coltura per verificare la presenza di cellule vitali.

**Risultati.** M-BD ha mostrato che 8/16 degli idrolati testati sono capaci di inibire fortemente la crescita fungina, ma solo 2 (*Monarda fistulosa* e *Citrus aurantium* var. amara) (Fig. 1) di questi sono stati selezionati per la produzione del GellanID poiché mostravano azione fungicida *in situ* verso tutti i ceppi testati se usati alla diluizione di  $\frac{1}{2}$  v/v. Sui campioni W trattati con GellanID non sono state osservate variazioni significative di colore o pH, così come quelli inoculati con ceppi fungini mostravano azione citocida dopo il trattamento se paragonati al controllo e ai trattati con solo gellano.

**Conclusioni.** Se i nostri dati venissero ulteriormente confermati con approfondimenti chimici e fisici, si identificerebbe un prodotto utilizzabile quando si necessita di un'azione che possa contestualmente pulire e abbattere la carica microbica presente sull'opera d'arte cartacea.

Questo tipo di prodotto e la relativa metodica di pulitura potrebbero quindi contribuire non solo a proteggere i materiali del patrimonio culturale e ad evitarne il biodeterioramento, ma anche a prevenire le patologie, degli operatori e dei fruitori causate dalla presenza fungina negli ambienti confinati.

**Parole chiave.** Gel di Gellano, idrolati, azione fungicida



**Fig. 1. *Monarda fistulosa* in fioritura. L'idrolato si ottiene al termine del processo di distillazione in corrente di vapore.**