

VII Congresso Nazionale della Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali

Roma, 30 giugno - 1 luglio 2023

Aula Magna – Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco Sapienza, Università di Roma

Piazzale Aldo Moro, 5 – 00185 Roma



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Chimica e Tecnologie del
Farmaco

Con il Patrocinio di:



Ente Nazionale di
Previdenza e Assistenza
a favore dei Biologi



Comitato Scientifico

- Bagetta Giacinto. Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione. Università della Calabria, Rende, Cosenza.
- Bellardi Maria Grazia. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Alma Mater Studiorum, Bologna.
- Benvenuti Stefania. Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena.
- Bouzari Hedayat. Dipartimento S.C. Chirurgia Generale e Oncologica dell'Ospedale Mauriziano Umberto I, Torino.
- Campagna Paolo. Vicepresidente SIROE, Roma, Master "One Health" Università Federico II di Napoli, Napoli.
- Corbo Filomena. Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università degli Studi Aldo Moro, Bari.
- Delfino Sebastiano. Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università degli Studi del Molise, Campobasso.
- Di Vito Maura. Dipartimento di Scienze e Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, Roma.
- Mondello Francesca. Presidente SIROE, già Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- Nostro Antonia. Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina.
- Paparella Antonello. Dipartimento di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Teramo.
- Ragno Rino. Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma.
- Romanazzi Gianfranco. Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Ancona.
- Scozzoli Maurizio. Centro Sperimentale APA-CT, Forlì.
- Stringaro Annarita. Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Pre-clinica e Clinica dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- Tullio Vivian. Dipartimento Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università degli Studi di Torino, Torino.



Monarda citriodora



Monarda didyma

Per il **VII Congresso Nazionale della Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali (S.I.R.O.E.)**

(30 giugno – 1 luglio 2023) è stata scelta come sede la Città di Roma, e precisamente il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco – Facoltà di Farmacia e Medicina, Sapienza Università di Roma.

Il Congresso rappresenta un'importante occasione di incontro per gli esperti, gli studiosi e per tutti gli appassionati e i 'curiosi' del settore per condividere le loro conoscenze e per apprendere le ultime innovazioni scientifiche sugli Oli Essenziali (OE), riconosciute sostanze naturali e parti integranti della fitoterapia, medicina complementare nota sia sul territorio italiano che internazionale.

Si tratta, infatti, di un evento dedicato alla promozione della diffusione delle ultime conoscenze scientifiche riguardo le proprietà biologiche multifunzionali degli OE e delle loro potenziali applicazioni in vari campi, quali quello medico, veterinario, alimentare, igienico sanitario, cosmetico e in altri diversi ambiti, fra cui quello agronomico. In questa settima edizione, il Congresso SIROE si articolerà in sei sessioni alle quali parteciperanno numerosi ricercatori e docenti, anche rappresentanti del direttivo scientifico SIROE, appartenenti a diverse Università italiane e straniere e a importanti centri di ricerca, fra cui l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), il Centro Nazionale delle Ricerche (CNR) ed il Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria (CREA). Gli argomenti verteranno nell'ambito della botanica, agronomia e patologia vegetale, in quello delle metodologie di estrazione e caratterizzazione chimica fino ad arrivare ad affrontare diversi aspetti importanti inerenti agli ambiti: microbiologico, alimentare, medico, veterinario e nanotecnologico.

Inoltre, è prevista una Tavola rotonda, che darà l'opportunità di approfondire alcune tematiche connesse con la qualità, la tecnologia, i requisiti regolatori, la fitovigilanza e la sicurezza degli OE con l'intervento di relatori di rinomata fama scientifica nazionale ed internaziona-

le. Come consuetudine, una commissione scientifica, appositamente nominata, conferirà il Premio SIROE Giovani Ricercatori 2023 alla presentazione orale più meritevole tra quelle esposte dai giovani partecipanti. Mediante un altro apposito premio, sarà anche valorizzata la migliore presentazione nella Sessione Poster.

Sicuramente, l'obiettivo principale di questo Congresso è quello di stimolare lo sviluppo della Ricerca scientifica sugli OE, stando contemporaneamente anche 'al passo' con i tempi per dare risposte agli attuali bisogni dell'uomo in qualsiasi settore, ma soprattutto di diffondere informazioni di evidenza scientifica riguardo la qualità, sicurezza ed efficacia di tali sostanze naturali. Solo attraverso l'osservazione e l'applicazione di questi tre requisiti si potrà fare in modo che gli OE siano sempre più accessibili e impiegati in modo consapevole e corretto in un approccio complementare o integrativo alle applicazioni mirate alla salute umana ed alla salvaguardia dell'ambiente.

Francesca Mondello (Presidente S.I.R.O.E.)

Rino Ragno (Sapienza Università di Roma)



Distillazione

*Giardino delle Erbe
Casola Valsenio (Ravenna)*

ABSTRACTS ORALI

A cura di:

Maura Di Vito¹, Francesca Mondello², Maria Grazia Bellardi³

¹ Dipartimento di Scienze Biotechologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

² Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali (S.I.R.O.E.), Roma

³ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Bologna

I Sessione: Oli Essenziali in Botanica, Agronomia e Patologia Vegetale

STUDIO FUNZIONALE DELL'ATTIVITÀ NEMATOCIDA DI OLI ESSENZIALI

E. Fanelli, F. De Luca, T. D'Addabbo

Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari, Italia
e.mail: trifone.daddabbo@lpsp.cnr.it

Introduzione. L'attività degli oli essenziali (OE) su nematodi fitoparassiti è riportata da numerosi studi (1), ma i relativi meccanismi sono ancora poco noti. Questo studio ha verificato l'effetto di due OE a differente attività nematocida sui livelli di espressione di geni coinvolti nella motilità e nei meccanismi di protezione del nematode galligeno *Meloidogyne incognita*.

Materiali e Metodi. Gruppi di 500 larve infettive di *M. incognita* sono stati esposti per 2 o 4 ore ad una concentrazione subletale (0,78 µg mL⁻¹) degli OE di *Cinnamomum zeylanicum* e *Citrus aurantium* o del nematocida di sintesi Oxamyl, includendo larve non trattate come testimone. Le larve trattate sono state sottoposte ad estrazione di RNA e Real-Time PCR, per determinare l'espressione dei geni *ace-1* ed *ace-2* (acetilcolinesterasi), *hsp90* ("heat-shock protein") e *far-1* (fatty acid- and retinol-binding protein").

Risultati e Discussione. L'espressione dei neurotrasmettitori *ace-1* e *ace-2*, siti target di alcuni nematocidi di sintesi (2), è aumentata dopo 2 ore di esposizione ai due OE, tornando ai valori base o ridursi dopo 4 ore. Il pattern di espressione di *ace-1* e *ace-2* indotto dai due OE è stato simile a quello del prodotto di sintesi, suggerendo un analogo meccanismo d'azione sul sistema nervoso. I livelli di *hsp90*, proteina localizzata a livello degli anfi di e responsabile della chemiorecezione (3), sono aumentati di 4 volte dopo due ore di esposizione all'OE di *C. zeylanicum*, indicando una pronta risposta all'azione di stress causata da tale OE, mentre variano di poco dopo il trattamento di 2 ore con l'OE di *C. aurantium*. L'espressione di *hsp90* torna a livelli base dopo l'espo-

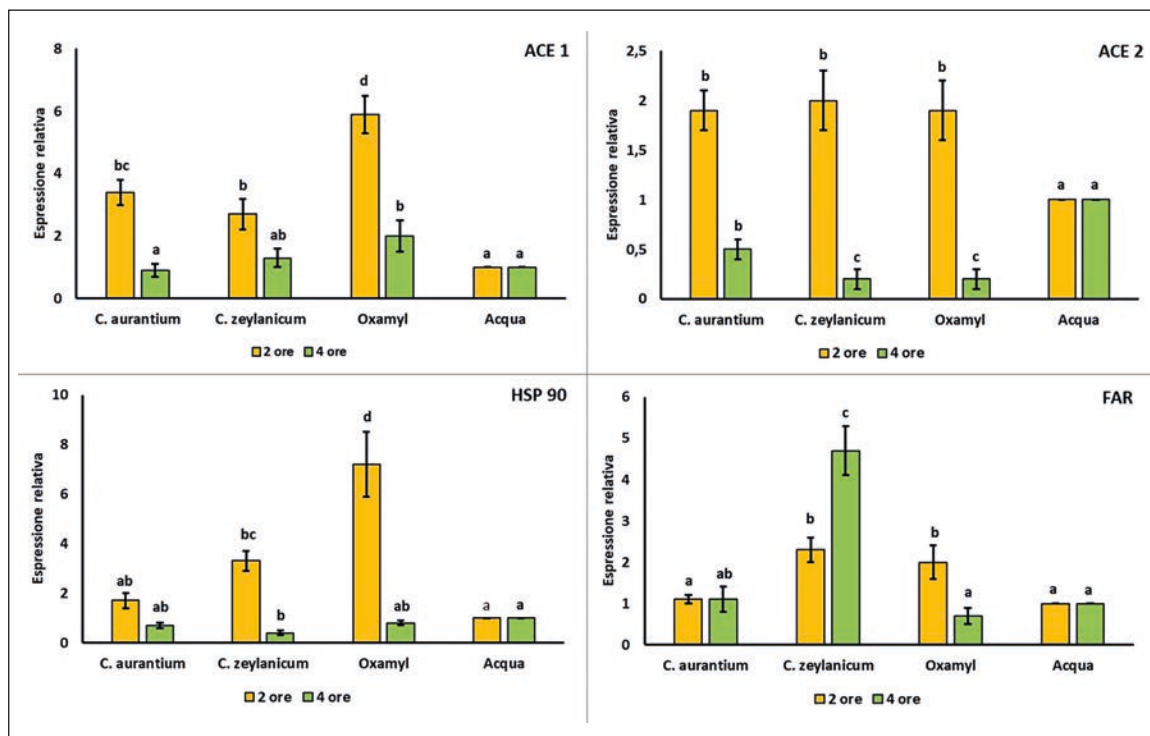


Figura 1. Espressione relativa dei geni *ace-1*, *ace-2*, *hsp90* e *far-1* del nematode galligeno *Meloidogyne incognita* dopo trattamento con gli oli essenziali di *Citrus aurantium* e *Cinnamomum zeylanicum* ed il nematocida di sintesi Oxamyl. A ciascun tempo di esposizione, le barre contraddistinte da lettere uguali non sono statisticamente differenti in base al test della minima differenza significativa.

sizione per 4 ore ad entrambi gli OE, suggerendo un adattamento del nematode ad una condizione di stress. Il gene *far-1* non varia in seguito a trattamento con l'OE di *C. aurantium*, mentre aumenta di 2,5 e quasi 5 volte dopo rispettivamente dopo 2 e 4 h di trattamento con l'OE di *C. zeylanicum* (Fig. 1). Gli elevati livelli di espressione di *far-1* nel tempo sembrano indicare un ruolo importante della cuticola, dove questo gene è espresso (4), nel contrastare l'azione di agenti tossici per il nematode, quali gli OE.

Bibliografia

- (1) D'Addabbo T., Avato P. (2021) - Chemical composition and nematocidal properties of thirteen essential oils-A review. *Plants*, 10: 1368.
- (2) Combes D., Fedon Y., Toutant J. P., Arpagaus M. (2001) - Acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. Rev. Cytol.*, 209: 207-239.
- (3) De Luca F., Di Vito M., Fanelli E., Reyes A., Greco N., De Giorgi C. (2009)- Characterization of the heat shock protein 90 gene in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia* and its expression as related to different developmental stages and temperature. *Gene*, 440: 16-22.
- (4) Phani V., Shivakumara T.N., Davies K.G., Rao U. (2017) - *Meloidogyne incognita* Fatty Acid- and Retinol- Binding Protein (Mi-FAR-1) Affects Nematode Infection of Plant Roots and the Attachment of *Pasteuria penetrans* Endospores. *Front Microbiol.*, 8: 2122.

Parole chiave. *Meloidogyne incognita*, Oli essenziali, Attività nematocida, Meccanismi

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI OLI ESSENZIALI E IDROLATI DA PIANTE OFFICINALI PER IL CONTROLLO DI FITOVIRUS E LORO INSETTI VETTORI

A. Taglienti¹, L. Donati¹, F. Araniti², F. Sapienza³, R. Ragno³, S. Bertin¹

¹Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Difesa e Certificazione, Roma, Italia

²Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali, Produzione, Territorio, Agroenergia, Milano, Italia

³Rome Center for Molecular Design, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: anna.taglienti@crea.gov.it

Introduzione. Nel settore della difesa delle piante, oli essenziali e idrolati sono testati per il controllo degli organismi nocivi, per l'attività antivirale, antimicotica e antiparassitaria (1). Rispetto agli agrofarmaci convenzionali, sono meno dannosi per l'ambiente e gli organismi non target; inoltre la loro produzione è più rapida ed economica (2). Nello studio qui presentato viene riportata la valutazione dell'attività antifitovirale e repellente di oli essenziali e idrolati ottenuti da *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha suaveolens* e *Foeniculum vulgare*. Gli agenti nocivi target sono i fitovirus *tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) e *zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), nonché l'afide vettore di quest'ultimo, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae); l'ospite utilizzato è lo zucchini (*Cucurbita pepo*).

Materiali e Metodi. Per la valutazione dell'attività antifitovirale, piante di zucchini sono state inoculate con il virus e trattate con olio essenziale o idrolato. Le foglie di nuova formazione sono state campionate settimanalmente per la misurazione del titolo virale, tramite RT-qPCR. Con la stessa tecnica è stata anche misurata l'espressione del gene fenilalanina amonio liasi, coinvolto nella risposta di difesa della pianta da stress biotici. Biosaggi di laboratorio sono stati effettuati per la valutazione dell'attività tossica (tramite conta di mortalità e progeinie) e repellente (tramite "choice test") degli oli essenziali e idrolati in esame. Gli estratti sono stati inoltre caratterizzati chimicamente tramite gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS).

Risultati. Gli estratti di *O. vulgare*, *T. vulgaris* e *R. officinalis* sono risultati in grado di ridurre significativamente il titolo virale di ToLCNDV (Fig. 1), mentre si sono dimostrati inefficaci nei confronti di ZYMV. Quest'ultimo è invece efficacemente controllato dagli oli essenziali e idrolati di *M. suaveolens* e *F. vulgare* (Fig. 2), che presentano anche un'ottima attività di repellenza nei confronti di *A. gossypii* (Fig. 3).

Discussione e Conclusioni. Nell'ambito di una gestione fitosanitaria integrata volta alla riduzione degli agrofarmaci di sintesi, gli oli essenziali e idrolati in esame rappresentano potenziali biopesticidi per il controllo di fitovirus; in particolare, per il patosistema *C. pepo*/ZYMV/*A. gossypii*, gli estratti di *M. suaveolens* e *F. vulgare* consentono

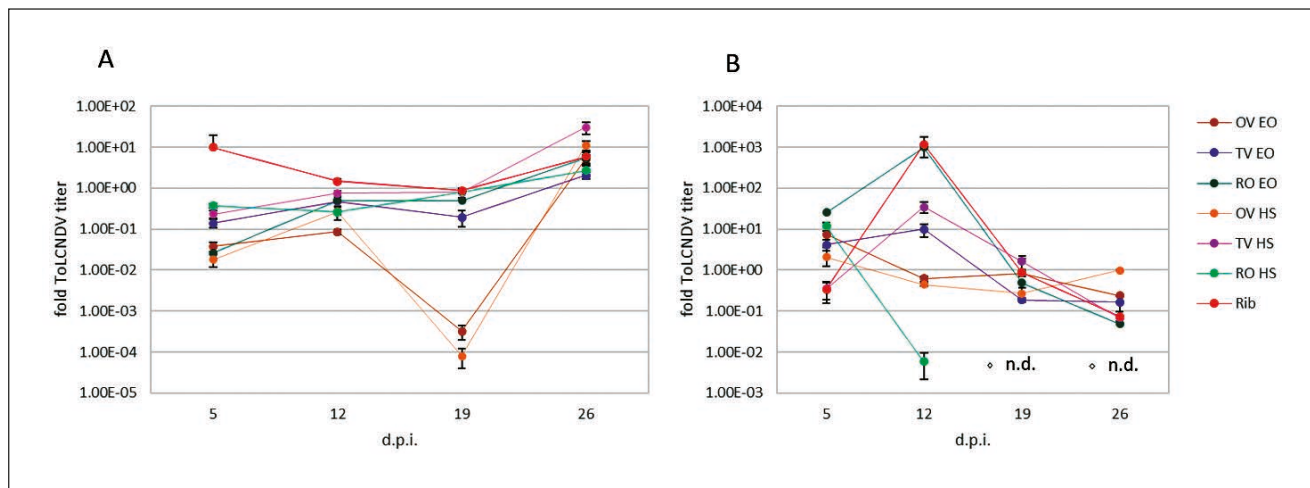


Figura 1. Titolo virale relativo di ToLCNDV in piante trattate simultaneamente all'inoculo (riquadro A) e post-inoculo (riquadro B). OV EO = olio essenziale di *Origanum vulgare*, TV EO = olio essenziale di *Thymus vulgaris*, RO EO = olio essenziale di *Rosmarinus officinalis*, OV HS = idrolato di *O. vulgare*, TV HS = idrolato di *T. vulgaris*, RO HS = idrolato di *R. officinalis*, Rib = ribavirina. Il titolo virale è espresso come media di due repliche tecniche su tre repliche biologiche in pool; le barre indicano l'errore standard.

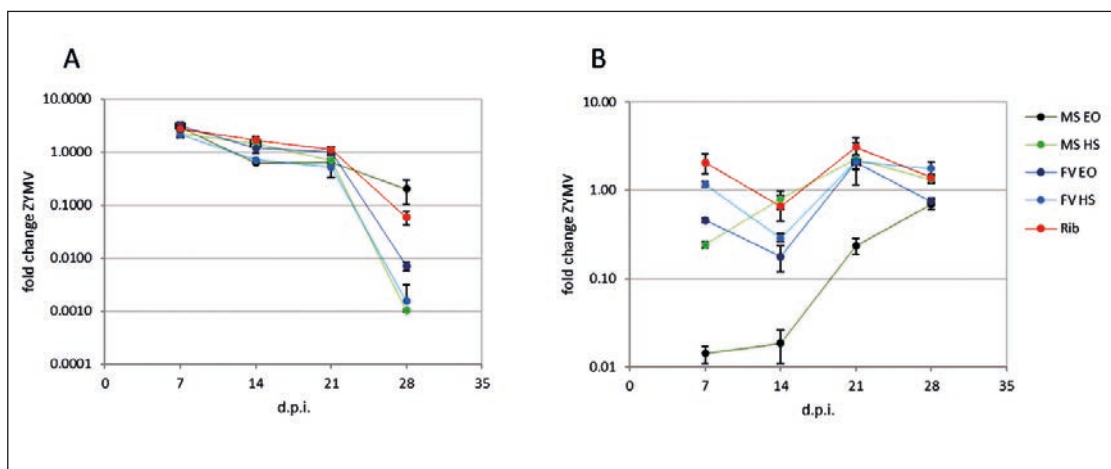


Figura 2. Titolo virale relativo di ZYMV in piante trattate simultaneamente all'inoculo (riquadro A) e post-inoculo (riquadro B). MS EO = olio essenziale di *Mentha suaveolens*, MS HS = idrolato di *M. suaveolens*, FV EO = olio essenziale di *Foeniculum vulgare*, FV HS = idrolato di *F. vulgare*, Rib = ribavirina. Il titolo virale è espresso come media di due repliche tecniche su tre repliche biologiche in pool; le barre indicano l'errore standard.

lo sviluppo di un sistema di controllo di virus e vettore con un unico trattamento.

Bibliografia

- (1) Zhao L., Feng C., Wu K., Chen W., Chen Y., Hao X., et al. (2017) - Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: a review. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 135: 15-26.
 (2) Barragán-Ocaña A, Silva-Borjas P, Olmos-Peña S. (2022) - Scientific and Technological Trajectories for Sustainable Agricultural Solutions. In *Biopesticides*; Elsevier, 93-105.

Parole chiave. Oli essenziali, Idrolati, Fitovirus, Afidi

OLI ESSENZIALI: L'INTERPLAY TRA PIANTE MEDICINALI ED IL MICROBIOTA ENDOFITICO

G. Semenzato¹, S. Del Duca², A. Vassallo³, R. Ascrizzi⁴, M. De Leo⁴, L. Pistelli⁵, N. Mucci⁶, C. Greco⁶, A. Padula⁵, A. Palumbo Piccionello⁶, A.M. Puglia⁸, G. Emiliani⁷, R. Fani¹

¹Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Sesto Fiorentino, Firenze, Italia

²Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Agricoltura e Ambiente (CREA-AA), Firenze, Italia

³Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Università di Camerino, Camerino, Italia

⁴Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italia

⁵Area per la Genetica della Conservazione (BIO-CGE), Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italia

⁶Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo, Palermo, Italia

⁷Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Sesto Fiorentino, Firenze, Italia
 e.mail: giulia.semenzato@unifi.it

Introduzione. La continua somministrazione di antibiotici che si verifica nel caso di infezioni di origine microbica sta contribuendo ad aggravare il sempre più crescente problema della resistenza ai più comuni farmaci antimicrobici. È quindi fondamentale dare priorità alla ricerca di nuovi antibiotici, di cui il mondo vegetale è un'ottima fonte. Le piante medicinali sono da tempo conosciute e utilizzate per la loro capacità di sintetizzare composti di interesse farmacologico. All'interno dei loro tessuti, una vasta gamma di microrganismi, definiti endofiti, contribuisce alla loro crescita, salute e metabolismo. In particolare, si ritiene che siano coinvolti nella stimolazione della pianta verso la produzione di metaboliti secondari e la sintesi diretta di composti con applicazioni terapeutiche e farmacologiche (1).

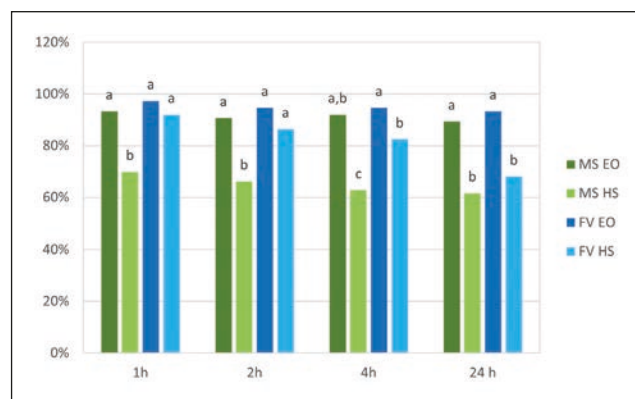


Figura 3. Repellenza di oli essenziali e idrolati contro *Aphis gossypii* tramite biosaggio "test choice". Saggio eseguito su 20 repliche da 10 individui ognuna (N=200). MS EO = olio essenziale di *Mentha suaveolens*, MS HS = idrolato di *M. suaveolens*, FV EO = olio essenziale di *Foeniculum vulgare*, FV HS = idrolato di *F. vulgare*. Le lettere indicano differenze significative (test Chi quadro) fra trattamenti allo stesso tempo di osservazione.

Lo scopo di questo studio è quello di esplorare il potenziale biotecnologico del microbiota endofitico delle piante medicinali, in particolare di piante appartenenti al genere *Origanum*, e di far luce sui meccanismi alla base dell'interazione pianta-microbiota, con l'obiettivo di identificare nuove molecole bioattive di origine batterica efficaci contro patogeni multiresistenti (MDR) e di verificare se la produzione degli oli essenziali (OE) da parte della pianta possa essere influenzata dalla presenza degli endofiti e/o se alcuni composti siano di origine batterica.

Materiali e Metodi. A questo scopo, sono stati isolati i batteri endofiti coltivabili associati alle diverse parti anatomiche di alcune specie e sottospecie di *Origanum*, dalle quali è stato idro-distillato l'OE. La composizione dell'OE è stata ottenuta mediante gas-cromatografia e spettrometria di massa. La struttura e la composizione delle comunità microbiche sono state valutate attraverso il sequenziamento dell'rDNA 16S e l'analisi *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Sono stati poi effettuati test fenotipici, quali la resistenza agli antibiotici e l'attività antagonista nei confronti di alcuni batteri patogeni MDR, mediante il metodo del *cross-streaking*.

Risultati. L'analisi dei profili RAPD e l'affiliazione tassonomica delle comunità endofitiche hanno rivelato un alto grado di biodiversità a livello di genere, specie e ceppo e un basso grado di condivisione di ceppi

tra piante diverse e tra i compartimenti della stessa pianta (2). È stato dimostrato come una buona parte degli isolati sia in grado di sintetizzare composti ad azione antibatterica, tra cui anche composti organici volatili (VOC). L'analisi gas-cromatografica ha rivelato che alcuni dei VOC sintetizzati dagli endofiti sono presenti anche nel profilo chimico dell'olio essenziale della pianta dai quali i batteri sono stati isolati (3).

Discussione e Conclusioni. I dati ottenuti suggeriscono l'esistenza di forze selettive in grado di determinare la struttura e la composizione della comunità microbica associata a piante diverse ma anche ai diversi compartimenti vegetali della stessa pianta. La capacità degli endofiti di produrre molecole, diffusibili e volatili, in grado di inibire la crescita di batteri MDR mette in luce l'enorme potenziale biotecnologico e farmacologico degli endofiti e suggerisce il loro coinvolgimento nella determinazione del profilo chimico dell'OE della pianta a cui sono associati. L'analisi dei genomi di alcuni di questi batteri permetterà di far luce sulle vie metaboliche coinvolte nella produzione delle molecole bioattive.

Bibliografia

- (1) Alvin A., Miller K.J., Neilan B.A. (2014) - Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol. Res.*, 169, 7-8: 483-495.
- (2) Semenzato G., Del Duca S., Vassallo A., et al. (2023) - Exploring the nexus between the composition of essential oil and the bacterial phytobiome associated with different compartments of the medicinal plants *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, *O. vulgare* ssp. *hirtum*, and *O. heracleoticum*. *Ind. Crops Prod.*, 191: 115997.
- (3) Polito G., Semenzato G., Del Duca S., et al. (2022) - Endophytic Bacteria and Essential Oil from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* Share Some VOCs with an Antibacterial Activity. *Microorganisms*, 10: 1424.

Parole chiave. Olio essenziale, Endofiti, Resistenza agli antibiotici, Composti organici volatili

OLI ESSENZIALI DI *ORIGANUM HERACLEOTICUM*: COMPOSIZIONE CHIMICA, ATTIVITÀ FITOTOSSICA E ANTI- α -AMILASI

G. Amato, L. Caputo, R. Francolino, M. Martino, V. De Feo, L. De Martino

Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano, Salerno, Italia
e.mail: gamato@unisa.it

Introduzione. Le specie infestanti causano notevoli riduzioni delle rese agricole. Tuttavia, sono ben noti i problemi per la salute umana e per l'ambiente causati dagli agrofarmaci di origine sintetica e molte specie infestanti stanno sviluppando resistenza a questi prodotti. Gli oli essenziali possiedono varie proprietà biologiche e possono costituire potenziali presidi utili in agricoltura come diserbanti. Essi, oltre ad essere facilmente estraibili ed eco-compatibili in quanto generalmente biodegradabili, non persistono a lungo nel suolo o nell'acqua. Sebbene diversi studi abbiano valutato il potenziale erbicida di alcuni oli essenziali e dei loro principali costituenti, pochi dati sono disponibili sulla possibile correlazione tra attività fitotossica e inibizione dell' α -amilasi, enzima chiave nella degradazione dei carboidrati di riserva in zuccheri solubili durante la germinazione. In questo lavoro sono presentati i risultati di uno studio sulla composizione di due oli essenziali di *Origanum heracleoticum* e sulla loro attività fitotossica e inibente l' α -amilasi.

Materiali e Metodi. Due ecotipi di *O. heracleoticum* sono stati raccolti ad Atena Lucana (Salerno): uno a fiori bianchi (OHW) e l'altro a fiori rossi (OHR). Le parti aeree sono state ridotte in frammenti e sottoposte a distillazione in corrente di vapore per 3 ore. Gli oli essenziali così ottenuti sono stati successivamente analizzati per GC e GC/MS. È stata poi valutata la loro attività fitotossica a diverse concentrazioni, valutando la germinazione e l'accrescimento radicale di due comuni infestanti (*Sinapis alba* e *Lolium multiflorum*) e della specie di interesse agrario *Raphanus sativus* (ravanello). La determinazione dell'attività inibente l' α -amilasi è stata effettuata quantificando lo zucchero riducente (maltosio equivalente) liberato dalle piantine trattate, attraverso il saggio dell'acido dinitrosalicilico.

Risultati. Negli oli essenziali sono stati identificati complessivamente 38 composti, 35 per OHW e 38 per OHR, che rappresentano rispettivamente il 98,3% e il 97,5% del totale, con una netta prevalenza di monoterpeni ossigenati (rispettivamente il 62,6% e il 61,3%).

In entrambi gli oli essenziali il carvacolo e il *p*-cimene rappresentano i composti maggioritari. Entrambi gli oli essenziali sono risultati fitotossici sulle tre specie testate, anche se con diversa potenza, ed hanno evidenziato notevole attività inibitoria l' α -amilasi a tutte le concentrazioni testate.

Discussione e Conclusioni. Questo studio ha analizzato il profilo chimico e l'attività fitotossica degli oli essenziali di due ecotipi di *O. heracleoticum*, mai analizzati prima, proponendo l'inibizione dell' α -amilasi come possibile meccanismo di azione. I risultati ottenuti possono costituire la base di future ricerche ed applicazioni di questi oli essenziali in campo agricolo.

Parole chiave. *Origanum heracleoticum*, Olio essenziale, Fitotossicità, α -amilasi

STUDIO SUGLI EFFETTI DI UN INNOVATIVO BIOSTIMOLANTE AL PROPOLI SULLA CRESCITA DEL ROSMARINO (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) E SULLA RESA IN OLIO ESSENZIALE

S. Masotti^{1,4}, S. Lullo¹, N. Contaldo^{2,4}, S. Biffi³, P. Conte⁴, M.G. Bellardi⁴

¹Libero Professionista ed Imprenditore agricolo, Fontanelice (Bologna), Italia

²CNR - Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Bari, Italia

³Giardino delle Erbe 'Augusto Rinaldi Ceroni', Casola Valsenio (Ravenna), Italia

⁴Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Italia
e.mail: sonia.masotti@studio.unibo.it

Introduzione. Il rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae) è una pianta aromatica utilizzata non solo in ambito culinario, ma anche ornamentale; il suo olio essenziale (OE) è un efficace antimicrobico impiegato nell'industria cosmetica in prodotti per la cute, lozioni, shampoo, ecc. Scopo della ricerca è stato quello di verificare gli effetti di un'innovativa soluzione acquosa a base di propoli (s.pr) sulla crescita del rosmarino e sulla resa in OE, valutando anche variazioni nella suscettibilità di germogli di vinca (*Catharanthus roseus* G. Don.) ad agenti patogeni infettivi, in particolare fitoplasmi (1).

Materiali e Metodi. La propoli (*propolis resina*) è una resina prodotta dalle piante per proteggere i tessuti embrionali delle gemme da agenti esterni di tipo biotico. Le api da miele (*Apis mellifera* L.) la raccolgono nel periodo primaverile/estivo, la arricchiscono prevalentemente con

cera e la utilizzano per proteggere l'alveare da agenti patogeni e mummificare animali intrusi. Dopo la complessa lavorazione da parte delle api, essa si presenta costituita dal 50% di resine vegetali, 30% di cera, 10% di composti terpenici, 5% di polline e dal 5% di altre componenti organiche. Per la sperimentazione su rosmarino, le sostanze attive della propoli (raccolta direttamente dagli alveari) sono state estratte applicando un metodo innovativo che non prevede l'uso di solventi chimici e quindi utilizzate per ottenere la s.pr somministrata come biostimolante a *R. officinalis* selezione 'Casola' presente nel Giardino delle Erbe di Casola Valsenio (Ravenna). 1. Nel mese di aprile 2022 è stato effettuato il taleggio di 200 rami semi-legnosi, messi a dimora in cassoni rialzati previa completa immersione di 100 di esse (le restanti 100 usate come 'controllo') in s.pr al 2% (2ml/L acqua), utilizzando poi la medesima s.pr per la loro irrigazione. Dopo numerosi sopralluoghi visivi, è stato eseguito (in luglio) il 1° prelievo per verificare la crescita di apparato epigeo ed ipogeo nel 15% delle talee (trattate e non); nel 2° prelievo (in settembre) sono stati contati nel 50% delle talee (trattate e non), il n° di germogli e la loro lunghezza. 2. In ottobre, è stato tagliato 1 kg di parte epigea (trattato e non) per la distillazione in corrente di vapore (durata 30 min.). 3. Per verificare l'effetto in piante infette da fitoplasmi, sono stati utilizzati germogli di vinca micropropagati ed infetti da "aster yellows" (AY) (proveniente dalla collezione dell'Università di Bologna): la sperimentazione è stata condotta su 30 germogli di cui 15 trattati con s.pr e 15 trattati con sola acqua deionizzata sterile. I trattamenti sono

stati effettuati per sommersione dei germogli in 3 tempi differenti ad intervalli di circa 10 giorni; sono state effettuate analisi PCR per verificare la presenza di AY nei 30 germogli.

Risultati. 1. I sopralluoghi in campo hanno consentito di notare, visivamente, la crescita maggiore delle piante di rosmarino trattate con s.pr rispetto a quelle non trattate; l'esame visivo è stato avvalorato dalle misurazioni sia dell'apparato epigeo che ipogeo effettuate nel mese di luglio, e dal numero maggiore di germogli contati a settembre (Fig. 1). 2. Per ottenere 1 kg di rosmarino fresco da distillare, è stato necessario tagliare 33 piante non trattate e sole 27 trattate con s.pr; la resa in OE da quest'ultime è stata maggiore del 21% (Fig. 2). 3. Visivamente, i germogli di vinca trattati con s.pr si sono sviluppati di più, con aumento dell'ampiezza della lamina fogliare e maggiore allungamento degli internodi (germogli 'normo-conformati'); inoltre, unicamente nel substrato dei germogli trattati con acqua deionizzata sterile (visivamente più disformi), si è formata una patina rosa, dovuta ad una probabile contaminazione (batterica e/o fungina). Le analisi PCR hanno confermato, dopo la sperimentazione, in tutti i 30 germogli di vinca (trattati con s.pr e non) la presenza di AY.

Discussione e Conclusioni. Da queste ricerche, seppure preliminari, risulta evidente come la soluzione acquosa a base di propoli (messa a punto e prodotta da uno degli Autori) si comporti da biostimolante

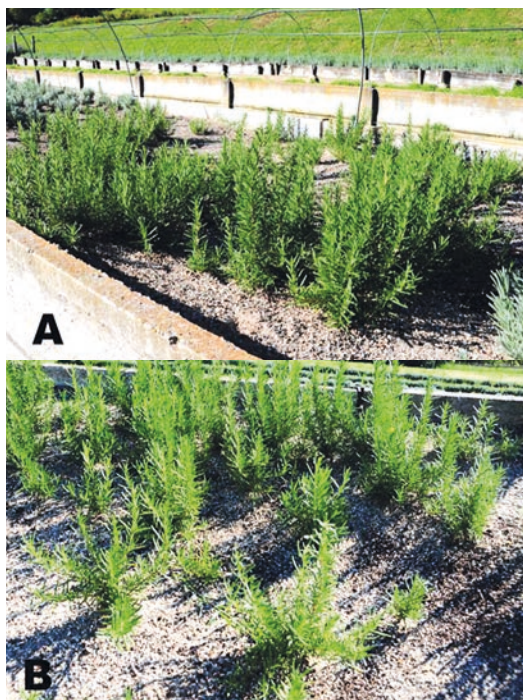
The advertisement features a central logo for GIZAMI, with the tagline "Tu pensi al CONTENUTO... Noi pensiamo al CONTENITORE!". Surrounding the logo are seven colored boxes, each containing an icon and a label for a different product category: FARMACEUTICA (blue, pills), COSMETICA (pink, perfume bottle), ERBORISTERIA (teal, mortar and pestle), BOTTIGLIE ALIMENTARI (light green, bottle), CASALINGHI (orange, pot), VASI-ALIMENTARI (red, jar), and LABORATORIO (purple, flasks). At the bottom, contact information is provided: Tel. 02 38100327 cell. 351 5416335, E-mail: info@gizami.it www.gizami.it, and Via Newton, 11 20016 Pero Sud (MI) - Zona industriale.

Prelevi	Valutazioni	Rosmarino controllo	Rosmarino trattato con s.pr
1° Luglio 2022	media altezze germogli in cm	5.9	11.2
	media lunghezza radici in cm	16.4	23.9
2° Settembre 2022	media altezze germogli in cm	13.7	18.7
	media n° germogli per pianta	8	11



Figura 1. Valutazioni agronomiche relative alla crescita delle talee di rosmarino trattate con soluzione al propoli (s.pr) e non trattate (controllo). Nelle figure a destra, relative al 2° prelievo, appare evidente la differenza di crescita fra le piante delle due tesi (vedi anche figura 3).

Figura 3. Settembre 2022. Le piante trattate con soluzione acquosa al propoli sono visivamente molto più robuste e vigorose (A) rispetto a quelle non trattate (B).



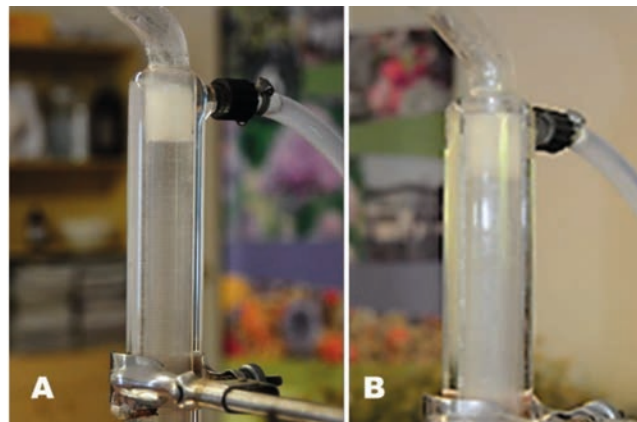
in grado di favorire una maggiore crescita del rosmarino (Fig. 3) e dei germogli di vinca (che, seppur infetti da AY, appaiono asintomatici) (2), favorendo la resa in OE e riducendo anche il numero di piante necessarie per la distillazione. Altri studi sono in corso per comparare la composizione degli OE dal rosmarino trattato e non, e la loro specifica attività antimicrobica.

Bibliografia

- (1) Rao G.P, Bertaccini A., Fiore N., Lieftng L.W. (2018) - Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria, (Springer Nature Singapore ed.), 345 pp. doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3
- (2) Contaldo N., Bertaccini A., Bozzano G., Cavicchi L., Bellardi M.G. (2012) - Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting *Rosmarinus officinalis*. Journal of Plant Pathology, 94, S4.60.

Parole chiave. Rosmarino, Coltivazione, Olio essenziale, Propoli, Fitoplasmi

Figura 2. Olio essenziale da rosmarino non trattato (A) (5 ml/kg) e trattato con soluzione al propoli (B) (7ml/kg).



Il Sessione: Caratterizzazione degli Oli Essenziali

APPROCCI MULTI-METODOLOGICI PER LA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DI *ROSMARINUS OFFICINALIS* L., DEI SUOI PRODOTTI DI ESTRAZIONE BIOLOGICAMENTE ATTIVI (OLIO ESSENZIALE E IDROLATO), PRIMA E DOPO TRATTAMENTO CON PROPOLI

S. Garzoli¹, S. Masotti², G. Lombardini³, F. Bugli^{3,4}, M. Di Vito³

¹Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Bologna, Italia

³Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

⁴Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

e.mail: stefania.garzoli@uniroma1.it

Introduzione. In Italia, le coltivazioni di piante aromatiche si presentano spesso frammentarie ed assolutamente inadeguate a far fronte alle richieste delle industrie utilizzatrici che hanno grandi difficoltà nell'approvvigionamento di quantità di prodotto con caratteristiche omogenee e a prezzi competitivi rispetto a quelli delle forniture estere. Per aiutare i produttori italiani a inserirsi più attivamente nel mercato, è necessario adottare tecniche colturali che migliorino le rese in materia prima (massa vegetale raccolta), ma senza influire su quella che è la composizione dei prodotti di estrazione: olio essenziale (OE) e idrolato (Id). È in quest'ottica che si è effettuato un primo studio somministrando la propoli (biostimolante) al rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.), pianta aromatica fra le più note ed apprezzate, ma dalla crescita molto lenta e ritenuta poco remunerativa (1). I risultati ottenuti, ossia il maggiore sviluppo delle piante 'trattate' con propoli e l'aumento della resa in OE (mL/kg), hanno imposto la necessità di effettuare analisi specifiche al fine di comparare i profili chimici e valutare eventuali cambiamenti del fitocomplesso e quindi nella produzione dei metaboliti secondari. Scopo di questa ricerca: caratterizzazione della propoli; descrizione della frazione chimica volatile del rosmarino tal quale, dell'OE e dell'Id, prima e dopo il trattamento, mediante approcci multi-metodologici; valutazione dell'attività antimicrobica e dell'azione prebiotica.

PLANT-PART CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF *CRITHMUM MARITIMUM* L. FROM MONTENEGRO

D. Vuković¹, M. Božović¹, D. Caković¹, D. Petrović¹, V. Živković²

¹University of Montenegro, Faculty of Science and Mathematics, Podgorica, Montenegro

²Center for Eco-Toxicological Research, Podgorica, Montenegro
e.mail: mijatboz@ucg.ac.me

Materiali e Metodi. La tecnica della microestrazione in fase solida (SPME) (2,3) seguita dall'analisi mediante gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), è stata applicata per la caratterizzazione dei rametti di rosmarino e della propoli. Mediante la tecnica dello spazio di testa strumentale (HS-Headspace Autosampler Turbomatrix) (4,5) accoppiato alla GC-MS, sono stati invece caratterizzati gli Id mentre gli OE sono stati investigati per iniezione diretta nel GC.

Sia gli oli essenziali che gli idrolati sono stati testati sia per l'azione antimicrobica nei confronti di 3 ceppi ATCC fungini appartenenti al genere *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*) e 5 batterici (*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), che per l'azione prebiotica nei confronti di due ceppi di riferimento di *Lactobacillus casei* e *L. helveticus*. L'azione antimicrobica è stata testata mediante il test di microbrodo diluizione in linea con le linee guida EUCAST individuando i valori di Minima Concentrazione Inibente (MIC) e Minima Concentrazione Citocida (MCC), mentre l'azione prebiotica è stata valutata analizzando le curve di crescita dei ceppi probiotici coltivati, per 24h, in presenza e assenza di diluizioni scalari degli idrolati.

Risultati. L'analisi chimica condotta sui rametti di rosmarino ha evidenziato delle differenze quantitative, per molti dei componenti rilevati, tra il campione (controllo) e quello trattato con propoli. Nel caso dell'EO e dell'Id, anche se con un trend diverso, specifici andamenti erano ancora più marcati a carico dei composti principali. Da un punto di vista qualitativo per tutte le matrici analizzate, i profili chimici rimanevano gli stessi tra il controllo ed il trattato. Molto interessante l'indagine condotta sulla propoli grezza che ha messo in luce la presenza di un elevato numero di molecole appartenenti a diverse classi chimiche.

Entrambe le tipologie di oli essenziali presentano una maggiore azione antimicrobica nei confronti dei ceppi di *E. faecalis* e *E. coli*. Al contrario, i due idrolati non presentano attività antimicrobica ma mostrano un'interessante azione prebiotica stimolando in egual misura, per concentrazioni minori o uguale al 12.5% v/v, la crescita dei ceppi probiotici analizzati.

Discussione e Conclusioni. Paragonando le due tipologie di oli essenziali e idrolati (controllo e trattato), differenze nei profili chimici sono state individuate mentre non sono state rilevate variazioni significative dei valori di MIC e MCC, né variazioni significative delle curve di crescita. Alla luce dei risultati ottenuti, ulteriori investigazioni sono necessarie per meglio comprendere gli effetti del trattamento con propoli nel tempo.

Bibliografia

- (1) Masotti S., Lullo S., Biffi S., Bellardi M.G. (2023) - Studio sugli effetti di un innovativo biostimolante al propoli sulla crescita del rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.) e sulla resa in olio essenziale. In atti dell'VII Congresso Nazionale S.I.R.O.E. Natural 1, (in stampa).
- (2) Nezi P., Cicaloni V., Garzoli S. (2022) - Metabolomic and Proteomic Profile of Dried Hop Inflorescences (*Humulus lupulus* L. cv. Chinook and cv. Cascade) by SPME-GC-MS and UPLC-MS-MS. Separations, 9: 204.
- (3) Vitalini S., Iriti M., Garzoli S. (2021) - A Comparative Study of the Chemical Composition by SPME-GC/MS and Antiradical Activity of Less Common *Citrus* Species. Molecules, 26: 5378.
- (4) Ovidi E., Laghezza Masci V., Zambelli M., Tiezzi A., Vitalini S., Garzoli S. (2021) - *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities. Plants, 10: 707.
- (5) Garzoli S., Laghezza Masci V., Franceschi S., Tiezzi A., Giacomello P., Ovidi E. (2021) - Headspace/GC-MS Analysis and Investigation of Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Essential Oils and Hydrolates from *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Miller. Foods, 10: 1768.

Parole chiave. SPME, HS-GC-MS, *Rosmarinus officinalis*, Propoli, Oli essenziali, Idrolati

Introduction. The chemical constituents of essential oil samples from different organs of *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) collected at three different localities in Montenegro (Bar, Budva and Herceg-Novi) are presented herein.

Materials and Methods. A total of twelve essential oils were isolated by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry method.

Results and Discussion. As a result, variations in the yield and chemical composition have been reported. The highest yield was observed in fruits (3.15–3.50%), while rhizomes contained the lowest amount of essential oil (0.01%). The essential oils from leaves were characterized by high proportions of limonene (21.52–30.15%), terpinene-4-ol (6.19–8.58%) and γ -terpinene (4.02–6.06%), with the exception of the sample from Budva distinguished by a predominance of sabinene (6.34%) and dillapiole (22.05%). The main components of the essential oils obtained from flowers were limonene (53.96–58.90%), γ -terpinene (7.82–8.10%) and sabinene (6.43–7.72%), while the samples from ripe fruits were characterized by a predominance of limonene (50.92–60.20%), γ -terpinene (10.68–17.91%), and α -pinene (8.47–9.23%). The main constituent of the essential oils obtained from rhizomes was dillapiole (15.78–49.92%). Additionally, the essential oil samples from Bar and Herceg-Novi were characterized by the high amounts of elemicin (14.43% and 38.13%, respectively) and butyl hydroxytoluene (10.13% and 18.68%, respectively), whereas the sample from Budva was particularly abundant in falcarinol (20.33%) and fatty acids (linoleic acid (17.65%), palmitic acid (16.35%) and oleic acid (11.55%)).

Conclusions. This is the very first report on essential oils of *C. maritimum* L. leaves, flowers, and fruits collected in Montenegro.

Keywords. *Crithmum maritimum* L., Essential oil, Hydrodistillation, Gas chromatography-mass spectrometry

APPLICAZIONE DI ALGORITMI MACHINE LEARNING AD UNA SERIE DI OLI ESSENZIALI PER SVILUPPARE MODELLI DI CLASSIFICAZIONE DI RELAZIONE COMPOSIZIONE-ATTIVITÀ DI TIPO QUANTITATIVO (QCAR)

R. Astolfi¹, A. Oliva², F.U. Sapienza¹, R. Ragno¹

¹Rome Center for Molecular Design, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: astolfi.1766291@studenti.uniroma1.it

Tabella 1. Valori MIC e MBC ottenuti dalle analisi effettuate sugli 11 oli essenziali nei confronti di isolati di *Acinetobacter baumannii carbapenem-resistente*.

Oli Essenziali	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
<i>Anethum graveolens</i> – Aneto	>5%	n.e ¹
<i>Thymus vulgaris</i> – Timo	>5%	n.e
<i>Mentha</i> spp. – Menta	>5%	n.e
<i>Rosmarinus officinalis</i> – Rosmarino	>5%	n.e
<i>Thymus vulgaris</i> – Timo ct. Thujanolo	1,25%	1,25%
<i>Laurus nobilis</i> – Alloro	>5%	n.e
<i>Cupressus</i> spp. – Cipresso	>5%	n.e
<i>Helichrysum</i> spp. – Elicriso	>5%	n.e
<i>Lavandula angustifolia</i> – Lavanda	5%	5%
<i>Origanum majorana</i> – Origano	5%	5%
<i>Foeniculum vulgare</i> – Finocchio	2,5%	2,5%

¹n.e: Analisi MBC non effettuata

Introduzione. In questo studio è stato analizzato il rapporto che c'è fra composizione chimica degli oli essenziali e attività antibatterica nei confronti di *Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi (CRAB), sfruttando le capacità di algoritmi *machine learning* (ML) per individuare i componenti chimici maggiormente responsabili del profilo biologico sperimentalmente osservato. Sono stati generati quattro modelli ML, utilizzati per predire l'attività antibatterica di 11 oli essenziali estratti sperimentalmente di cui sono state valutate le attività antibatteriche.

Materiali e Metodi. Sono stati compilati due diversi *training set* e per ogni *dataset* sono stati eseguiti due calcoli distinti, uno per la Minima Concentrazione Inibente (MIC) e l'altro per i valori di Minima Concentrazione Battericida (MBC). I dati sono stati estrapolati dal database PyEO (eo.3d-qsar.com), poi processati sulla piattaforma Jupyter Notebook. I *dataset* sono stati sottoposti ad ottimizzazione mediante un approccio di tipo "Monte Carlo". I modelli finali sono stati analizzati attraverso la libreria Skater, determinando prima le *Features Importance* (FI) per ogni componente e quindi le *Partial Dependence* (PD). Quest'ultima sottolinea l'influenza positiva o negativa di ogni componente all'interno dell'olio essenziale nei riguardi dell'attività biologica associata. I quattro modelli generati sono stati validati sperimentalmente utilizzando un test set esterno di 11 oli essenziali.

Risultati. Per entrambi i *dataset*, i modelli con una maggiore accuratezza sono stati ottenuti separando gli oli essenziali in attivi e inattivi con un valore di cutoff di 0,03% v/v (MIC o MBC). L'analisi della FI ha permesso di definire che il carvacrolo, l'eugenolo, il timolo, il limonene e l'eucaliptolo sono risultati in assoluto quelli più influenti sull'attività antibatterica, mentre per l'analisi della PD il carvacrolo, l'eugenolo e il timolo hanno rivelato un'influenza positiva in base alla loro concentrazione all'interno degli oli essenziali. Il limonene e l'eucaliptolo, invece, sono stati valutati influenzare negativamente l'attività antibatterica. Un risultato misto è stato osservato nel caso dell' α -pinene, probabilmente legato ad un effetto sinergico o anti-sinergico in funzione della percentuale presente. La validazione esterna di questi quattro modelli ottimizzati sugli 11 oli essenziali con attività incognita nei confronti di CRAB, ha portato ad una predizione dell'attività inferiore allo 0,03% v/v solo dell'olio essenziale estratto da un campione di *Thymus vulgaris*. Le prove microbiologiche hanno permesso di determinare i valori di MIC in un range che va dal 1,25% v/v a >5% v/v (Tab. 1). Mediante l'analisi della PD una serie di componenti chimici è stata selezionata, e ne è stata verificata sperimentalmente l'attività antibatterica. In accordo con i dati della PD i dati hanno confermato un ottimo valore di MIC e MBC per il timolo (0,015% v/v) e valori più elevati per composti come eucaliptolo e α -pinene, rispettivamente di 0,6% v/v e 5% v/v.

Conclusioni. Degli undici oli essenziali sperimentalmente testati, i modelli hanno correttamente predetto che dieci campioni (91%) non presentassero valori di MIC inferiori a 0,03%. Inoltre, l'analisi PD è stata confermata da dati sperimentalmente ottenuti su alcuni componenti chimici. Alla luce dei risultati ulteriori studi sono in corso per sviluppare modelli sempre più robusti e predittivi che possano in futuro essere usati per progettare delle miscele di oli essenziali "ad hoc" contenenti principalmente i componenti principali indicati dai modelli ML.

Parole chiave. Machine Learning, QCAR, Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, Progettazione di oli essenziali

SPAZIO DI TESTA VS FASE CONDENSATA. STUDIO COMPARATIVO GC-MS DEI COSTITUENTI DI DIVERSI OLI ESSENZIALI

C. Fraschetti, F. Sapienza, R. Ragno, A. Filippi

Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: caterina.fraschetti@uniroma1.it

Introduzione. Gli oli essenziali (OE) sono matrici idrofobiche complesse ottenute dalla distillazione in corrente di vapore di piante aromatiche. Le proprietà biologiche degli OE, ampiamente documentate, includono l'attività analgesica, antinfiammatoria, immunomodulatoria, antitumorale ed antimicrobica. Quest'ultima è stata evidenziata nella capacità di controllare la crescita di una grande varietà di patogeni riscontrati in matrici di origine alimentare. I componenti degli OE caratterizzati da una spiccata attività antibatterica sono: fenoli (e.g., carvacrolo, timolo, ed eugenolo), alcoli (e.g., geraniolo, linalolo, e mentolo), aldeidi (geraniolo e cuminalo), chetoni (e.g. carvone, mentone, piperitone) ed eteri (estragolo, ed anetolo). La ricerca sugli OE necessita di un approccio interdisciplinare che contemperi la sinergia tra competenze botaniche (ottimizzazione delle condizioni di coltivazione e/o raccolta), chimiche (estrazione e analisi), microbiologiche e statistiche (correlazione tra la composizione chimica e l'attività biologica). Nel presente studio è stata comparata la composizione fitochimica di cinque OE determinata sia nella fase condensata che nei rispettivi vapori, allo scopo di valutare l'attività antimicrobica della frazione volatile (1) rilasciata da tamponi opportunamente imbevuti di OE.

Materiali e Metodi. Il focus di questa presentazione è rivolto alla determinazione della composizione di cinque OE (*Mentha piperita*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula stoechas*, *Origanum vulgare*, *Eucalyptus cinerea*) attraverso tre diverse applicazioni della gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS): analisi di 1. Soluzioni dell'OE in cicloesano, 2. Spazio di testa dell'OE (HS), 3. Spazio di testa preceduto da una pre-concentrazione selettiva con microestrazione in fase solida (SPME). Nell'esperimento 1. è stata determinata la composizione della matrice in fase liquida. Nell'esperimento 2. i vapori in equilibrio con la fase liquida sono stati campionati per determinare esclusivamente la frazione volatile. Infine, nell'approccio 3. è stato evidenziato l'effetto di pre-concentrazione selettiva di una fibra SPME di largo utilizzo (DVB-CAR-PDMS), per rivelare componenti volatili al di sotto del limite di rilevabilità con l'approccio HS.

Risultati, Discussione e Conclusioni. Lo studio comparativo condotto sui cinque OE ha rivelato significative differenze nella composizione della fase condensata e dei relativi vapori, evidenziando in alcuni casi

una marcata alterazione del profilo gascromatografico indotta dall'utilizzo della fibra SPME. In generale, le analisi HS-SPME costituiscono l'approccio ottimale per un'analisi *untargeted*, rivelando in tutti i casi esaminati la miglior sensibilità in termini di composti rivelati. Negli OE in cui il componente maggioritario ha un elevato punto di ebollizione (>230 °C, i.e. carvone e timolo nell'OE di menta e timo, rispettivamente), il disaccordo tra i dati raccolti in fase liquida e vapore aumenta.

Bibliografia

(1) Wu K., Lin Y., Chai X., Duan X., Zhao X., Chun C. (2019) - Mechanisms of vapor-phase antibacterial action of essential oil from *Cinnamomum camphora* var. *linalofera* Fujita against *Escherichia coli*. Food Science & Nutrition, 7(8): 2546-2555.

Parole chiave. GC-MS, HS-SPME, Spazio di testa

DEFINITION OF QUANTITATIVE COMPOSITION-ANTIOXIDATIVE ACTIVITY PROFILES OF COMMERCIAL ESSENTIAL OILS BY MEANS OF MACHINE LEARNING

M. Mladenović¹, A. Ragno², F.U. Sapienza³, R. Astolfi³,
R. Capobianco², R. Ragno³

¹Kragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Department of Computer, Control and Management Engineering "Antonio Ruberti", Sapienza University of Rome, Rome, Italy

³Rome Center for Molecular Design, Department of Drug Chemistry and Technology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy
e.mail: milan.mladenovic@pmf.kg.ac.rs

Introduction. The antioxidative activity of essential oils (EOs) is an important but often neglected property, given that EOs are mostly evaluated as antimicrobial agents. Herein, a series of 61 commercial EOs were evaluated as antioxidants either *in vitro* or *in vivo*.

Materials and Methods. EOs were assessed for their total antioxidant capacity (TAC), ability to neutralize the DPPH• radicals, ABTS•+ cation radicals, lipid peroxide radicals (LOO•) in oil/water emulsion systems, as well as hydroxyl radicals (OH•) generated in the Fenton reaction. Additionally, their salmon DNA protective features were elaborated against AAPH-induced alkoxy radicals (ROO•), or OH• emerging upon FeSO₄-catalyzed cleavage of H₂O₂. The most potent EOs were administered *in vivo* to the adult Wistar rats with CCl₄-induced oxidative stress, and evaluated through the redox markers like SOD, TBARS, CAT, and GSH, as well as by conducting the comet assay. Machine learning (ML) algorithms were applied to correlate EOs' chemical compositions with the associated activities (1).

Results. Having good TAC, eighteen EOs samples neutralized DPPH• and ABTS•+ with EC₅₀s in the ng/mL to µg/mL range, retained the level of potency against LOO• while inhibiting lipid peroxidation, and counteracted OH• while protecting the 2-deoxy-D-ribose (for instance Cade EO with EC₅₀ = 0.007, 0.017, 0.023, and 0.001 µg/mL, respectively). EOs further exerted exceptional DNA protective activity against ROO• and OH•. The most potent samples likewise prevented CCl₄-provoked peroxidation of hepatocytes membrane and DNA-lesions formation *in vivo* and showed significant antigenotoxicity (2). Statistically robust ML models indicated chemical components were mainly responsible for antioxidative potential, in terms of feature importance and partial

dependence plots.

Discussion and Conclusions. As antioxidants, herein EOs are applicable as remedies for treating damage caused by mitochondrial DNA oxidative stress inducers. Moreover, herein EOs could prevent the autooxidation of lipids in food and be used as supplements during chemotherapy to counteract the genotoxicity of alkylating agents.

Bibliography

(1) Patsilinakos A., Artini M., Papa R., Sabatino M., Božović M., Garzoli S., Vrenna G., Buzzi R., Manfredini S., Selan L., Ragno R. (2019) - Machine Learning Analyses on Data including Essential Oil Chemical Composition and *in vitro* Experimental Antibiofilm Activities against *Staphylococcus* Species. Molecules, 24: 890.

(2) Vukić M.D., Vuković N.L., Mladenović M., Tomašević N., Matic S., Stanić S., Sapienza F., Ragno R., Božović M., Kačanić M. (2022) - Chemical Composition of Various *Nepeta cataria* Plant Organs' Methanol Extracts Associated with *in vivo* Hepatoprotective and Antigenotoxic Features as well as Molecular Modeling Investigations. Plants, 11: 2114.

Keywords. Essential oils, Antioxidant activity, Machine learning

CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO CHIMICO DI OLI ESSENZIALI PROVENIENTI DA PIANTE AROMATICHE E VALUTAZIONE DEL POTENZIALE ANTIOSSIDANTE TRAMITE TECNICA ELETTROCHIMICA

F. Sapienza¹, D. Dini², R. Ragno¹

¹Rome Center for Molecular Design, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: filippo.sapienza@uniroma1.it

Introduzione. La tecnica elettrochimica a cui si fa riferimento è stata sviluppata per contrastare e limitare le frodi dell'olio d'oliva che si verifica con la sostituzione totale o parziale dell'olio d'oliva extra vergine di oliva (EVO) con diversi oli di semi (girasole, nocciola, ecc.) oppure con la miscelazione con oli di oliva di inferiore qualità. Pertanto una nuova opportunità per rilevare tali frodi è mediante l'applicazione di piattaforme innovative di rilevamento e "biosensing" (1). In questo studio, per la prima volta, viene utilizzata in via sperimentale una tecnica voltammetrica per valutare il potenziale antiossidante degli oli essenziali.

Materiali e Metodi. Per questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati elettrodi commerciali depositati per *screen-printing*, con un core in carbonio e pin d'argento (2), (Fig. 1), che sono stati modificati con nanotubi di carbonio, biossido di titanio nella forma anatasio ed idrossido di colina. Per quanto riguarda gli analiti, sono stati impiegati una serie di oli essenziali (OE) commerciali ed estratti ottenuti mediante distillazione in corrente di vapore e idrodistillazione, inoltre sono stati testati anche idrolati ottenuti direttamente durante la preparazione degli OE sperimentali.

Risultati. L'approccio della metodica è stato quello di capire quale fosse il potenziale antiossidante dei diversi OE e idrolati per poi confrontarli con altre soluzioni standard e poter fare un confronto tra di esse. Sono stati utilizzati sia campioni di OE commerciali che estratti mediante separazione in un secondo momento sono state fatte analisi anche su campioni di idrolati che hanno mostrato essere meno "ag-

Figura 1. Elettrodo con modifica utilizzato per la valutazione del potere antiossidante.



Figura 2. Nel grafico sono riportati i valori dei potenziali di ossido-riduzione, rilevati con software PalmSens (analisi SquareWave) di idrolato di *Mentha suaveolens*.

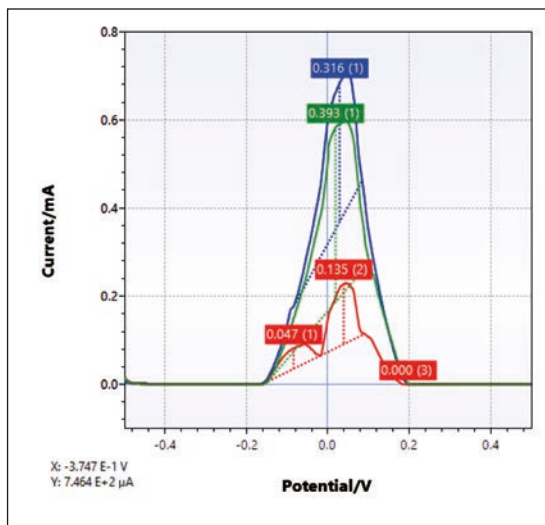
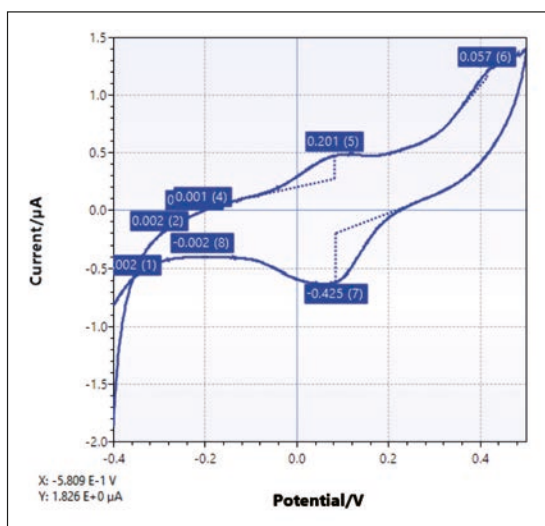


Figura 3. Nel grafico sono riportati i valori dei potenziali di ossido-riduzione, rilevati con software PalmSens di idrolato di *Mentha suaveolens*.



gressivi” nei confronti dell’elettrodo, restituendo ottime letture, con picchi più chiari e con minore rumore di fondo e soprattutto mostrando una più alta riproducibilità (Figg. 2 e 3).

Discussione e Conclusioni. Le modifiche effettuate all’elettrodo standard consentono di effettuare le analisi rapidamente senza uso di solventi organici. Per questo, l’approccio impiegato rappresenta un metodo di basso impatto ambientale per valutare il potenziale antiossidante

associato agli OE. La strumentazione e il software associato sono stati sottoposti a test di validazione dimostrandosi un valido strumento analitico, rapido e facile da usare, in grado di effettuare una prima e veloce valutazione sul potere antiossidante.

Grazie a un ulteriore collaudo e l’ottimizzazione di nuovi biosensori amperometrici monouso si potranno analizzare sostanze con proprietà antiossidanti in diversi campi di applicazione; agroalimentare, chimico-clinico e di protezione dell’ambiente.

Bibliografia

- (1) Zappi D., Sadun C., Gontrani L., Dini D., Antonelli M.L. (2020) - A new electrochemical sensor for extra-virgin olive oils classification. *Food Control*, 109: 106903.
 (2) Zappi D., Caminiti R., Ingoc G.M., Sadun C., Tortolini C., Antonelli M.L. (2017) - Biologically friendly room temperature ionic liquids and nanomaterials for the development of innovative enzymatic biosensors. *Talanta*, 175: 566-572.

Parole chiave. Potenziale antiossidante, Voltammetria, PalmSens, Idrolati, Oli Essenziali

CARATTERIZZAZIONE QUANTITATIVA DI OLI ESSENZIALI MEDIANTE TECNICHE DI MACHINE LEARNING APPLICATE A DATI ATR-FTIR E NMR

E. Truzzi¹, B. Catellani¹, D. Bertelli¹, S. Benvenuti¹, A. Ragno², R. Capobianco², R. Ragno³

¹Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

²Dipartimento di Ingegneria informatica automatica e gestionale “Antonio Ruberti”, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

³Rome Center for Molecular Design, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
 e.mail: eleonora.truzzi@unimore.it

Introduzione. Gli oli essenziali (OE), comunemente utilizzati nelle industrie alimentare, profumiera, farmaceutica, e cosmetica, sono miscele ad alto valore economico la cui composizione chimica è estremamente variabile e legata a diversi fattori. La conformità di un OE a specifici standard analitici è fondamentale al fine di garantire un prodotto finito di qualità riproducibile e sicuro per i consumatori. La metodica convenzionale per la caratterizzazione quantitativa di OE è la gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS), una tecnica costosa, lenta, e che richiede infrastrutture adeguate. Lo scopo del presente progetto è lo sviluppo di un metodo alternativo di caratterizzazione quali/quantitativa degli OE basato su spettroscopia infrarossa in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) accoppiata a metodi di apprendimento automatico (*machine learning* – ML). L’approccio ATR-FTIR ha già mostrato ottime capacità di identificazione e discriminazione di OE (1). Il metodo proposto potrebbe consentire la caratterizzazione quali/quantitativa degli OE in tempi rapidi, con costi contenuti e strumentazioni diffuse nei laboratori chimici e facili da utilizzare. Dati estratti da spettri ottenuti in spettroscopia a risonanza magnetica nucleare (NMR) saranno ulteriormente impiegati per lo sviluppo dei modelli di ML al fine di ottimizzare le loro capacità predittive.

Materiali e Metodi. Modelli preliminari di ML sono stati sviluppati su dati spettrali ottenuti in ATR-FTIR e ¹H-NMR su standard puri di mono- e sesquiterpeni e su miscele ternarie degli standard (confermate mediante GC/MS). I modelli sono stati validati con dati ATR-FTIR e ¹H-NMR di OE appartenenti ai generi *Mentha*, *Cymbopogon* e *Lavandula*, e alle specie *Salvia rosmarinus* e *Thymus vulgaris*.

Risultati e Discussione. Lo studio è oggetto di un deposito brevettuale e pertanto per motivi di proprietà intellettuale i dettagli sui risultati non possono essere divulgati.

Conclusioni. Dai dati preliminari la tecnica si presenta molto promettente e nel breve futuro potrebbe rappresentare una svolta tecnica nell'analisi di oli essenziali ed espandibile a qualsiasi miscela complessa.

Bibliografia

(1) Truzzi E., Durante C., Bertelli D., Catellani B., Pellacani S., Benvenuti S. (2022) - Rapid Classification and Recognition Method of the Species and Chemotypes of Essential Oils by ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics. *Molecules*, 27: 5618.

Parole chiave. Machine learning, ATR-FTIR, ¹H-NMR, Oli essenziali

III Sessione: Oli Essenziali nel Settore Alimentare ed in Medicina Veterinaria

SISTEMI COLLOIDALI AVANZATI PER LA VEICOLAZIONE ED IL RILASCIO CONTROLLATO DI OLI ESSENZIALI IN APPLICAZIONI ALIMENTARI

F. Donsi^{1,2}

¹Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università degli Studi di Salerno, Fisciano, Salerno, Italia

²ProdAl scarl, c.o. Università degli Studi di Salerno, Fisciano, Salerno, Italia
e.mail: fdonsi@unisa.it

Introduzione. La crescente ricerca di stili di vita sani sta spingendo i consumatori verso prodotti alimentari sempre più naturali, con un cre-

scente interesse verso i prodotti fortificati attraverso l'incorporazione di composti bioattivi ad elevata techno-funzionalità e/o benefici per la salute (1). Recentemente, l'industria alimentare ha sviluppato un interesse tangibile verso l'uso degli oli essenziali (OE) come conservanti naturali (2). Tuttavia, a causa della reattività e dell'idrofobicità degli OE, la loro incorporazione in alimenti e bevande a base acquosa richiede la stabilizzazione degli OE da parte di un sistema di veicolazione adatto (3,4). L'incapsulamento degli OE rappresenta un approccio necessario a garantire la stabilità fisica degli OE, e consentire il loro rilascio controllato. Questo lavoro descrive i principali sistemi di incapsulamento per gli OE di interesse industriale, con particolare riferimento ai sistemi colloidali fabbricati con ingredienti naturali e di grado alimentare, utilizzando tecnologie che siano scalabili a livello industriale.

Materiali e Metodi. Questo lavoro è stato basato sulla revisione della letteratura scientifica riguardante: a) il rilascio di composti bioattivi naturali ed OE da sistemi colloidali, b) l'incapsulamento di OE, c) l'incapsulamento di composti bioattivi naturali e d) vettori nanometrici a base di lipidi o biopolimeri. I database per la ricerca hanno incluso: Scopus, Web of Science, PubMed, ScienceDirect e Google Scholar. La sequenza temporale è stata fissata agli ultimi 10 anni, dal 2012 ad oggi.

Risultati. I sistemi colloidali comprendono un'ampia gamma di vettori finemente dispersi, con la fase dispersa che varia da pochi a centinaia di nanometri (5). Per essere utilizzati nei sistemi alimentari, i sistemi particellari colloidali devono soddisfare gli standard di qualità alimentare, sia nella formulazione che nei metodi di produzione. I principali sistemi colloidali per l'incapsulamento e la veicolazione di composti bioattivi di origine naturale, come gli OE, sono schematicamente rappresentati in Figura 1.

Discussione e Conclusioni. Tra i sistemi colloidali di grado alimentare per la veicolazione di OE, le nanoemulsioni, i liposomi e le particelle biopolimeriche sono caratterizzati da processi di produzione facilmente scalabili, elevata capacità di caricamento con OE, nonché sostenibilità

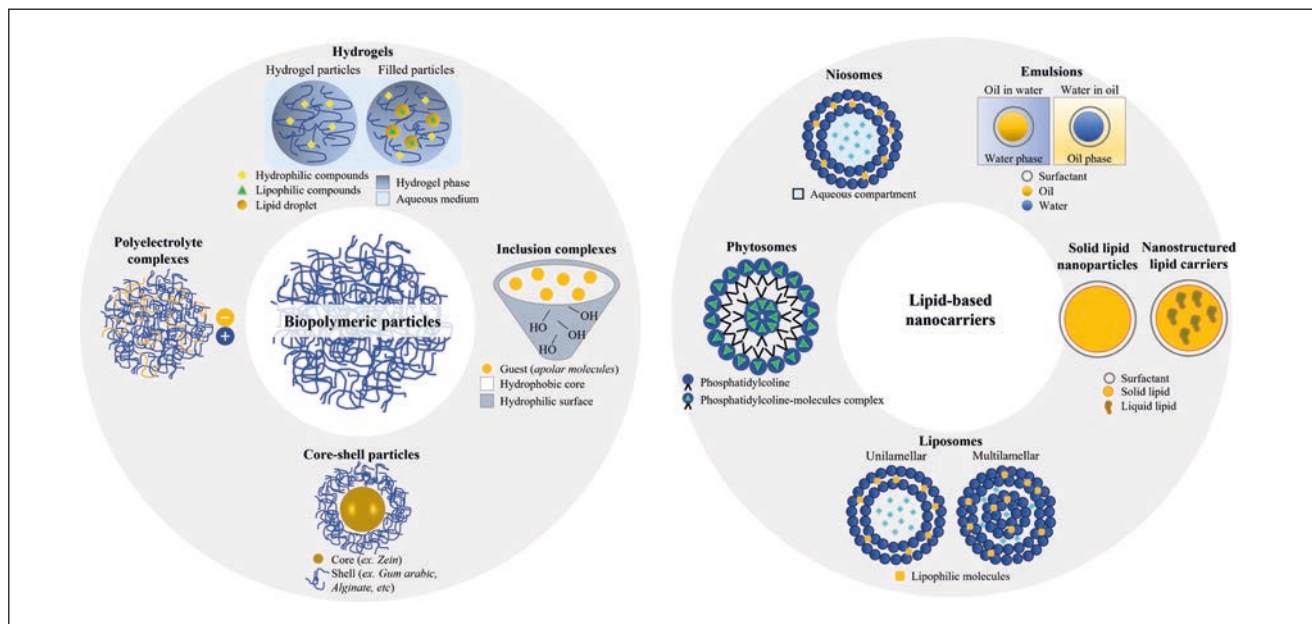


Figura 1. Principali sistemi colloidali per l'incapsulamento e la veicolazione di composti bioattivi.

Tabella 1. Evoluzione del pH e dell'*a_w* di rucola (*Eruca sativa*) in aria sottoposta a dipping con soluzione contenente 500 QL/mL di idrolato *Origanum vulgare subsp. hirtum* (OHY) o di *Thymbra capitata* (L.) Cav. (THY), a tempo 0 e dopo 24 e 48 ore a 4°C in aria. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) rispetto al campione controllo.

Tempo (ore)	pH		
	Ctrl	OHY	THY
0	6,7±0,22	6,12±0,22*	6,32±0,06*
24	6,7±0,12	6,13±0,04*	7,0±0,19*
48	7,14±0,10	6,16±0,05*	7,10±0,10
Tempo (ore)	<i>a_w</i>		
	Ctrl	OHY	THY
0	0,99±0,01	0,98±0,01	0,98±0,01
24	0,99±0,01	0,98±0,01	0,99±0,01
48	0,99±0,01	0,98±0,01	0,99±0,01

economica e rappresentano quindi le opzioni più praticabili per le applicazioni alimentari, in particolare per il controllo della crescita microbica e l'estensione della durata di conservazione dei prodotti alimentari. Tuttavia, molti altri sistemi di veicolazione di scala colloidale sono adatti per l'incapsulamento degli OE e meritano studi più approfonditi, rivolti in particolare a superare i limiti legati alla produzione su larga scala, tipicamente di interesse per l'industria alimentare.

Bibliografia

- (1) Martins Z.E., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O. (2017) - Food Industry By-Products Used as Functional Ingredients of Bakery Products. Trends Food Sci. Technol., 67: 106-128.
- (2) Asbahani A.E., et al. (2015) - Essential Oils: From Extraction to Encapsulation. Int. J. Pharmaceutics, 483(1-2): 220-243.
- (3) Vinceković M., et al. (2017) - Innovative Technologies for Encapsulation of Mediterranean Plants Extracts. Trends Food Sci. Technol., 69: 1-12.
- (4) Donsi F., Ferrari G. (2016) - Essential Oil Nanoemulsions as Antimicrobial Agents in Food. J. Biotechnol., 233: 106-120.
- (5) Patel A.R., Velikov K.P. (2011) - Colloidal Delivery Systems in Foods: A General Comparison with Oral Drug Delivery. LWT - Food Sci. Technol., 44(9): 1958-1964.

Parole chiave. Incapsulamento, Sistemi colloidali, Nanoparticelle, Nanoemulsioni

APPLICAZIONE DI IDROLATI DI *ORIGANUM VULGARE* SUBSP. *HIRTUM* E *THYMBRA CAPITATA* (L.) CAV. PER IL CONTROLLO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEL LAVAGGIO DELLA RUCOLA (*ERUCA SATIVA*)

F. Maggio, C. Purgatorio, F. Buccioni, A. Serio, C. Rossi, A. Paparella

Dipartimento di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italia
e.mail: fmaggio@unite.it

Introduzione. *Listeria monocytogenes* è l'agente eziologico della listeriosi, un'infezione veicolata da prodotti alimentari. Sempre più spesso, tra i prodotti coinvolti vi sono alimenti di origine vegetale, tra cui i prodotti ortofruttili freschi e/o di quarta gamma, che non subiscono trattamenti volti alla riduzione della carica microbica, ad eccezione del lavaggio in acqua. L'aggiunta di idrolati (HY) alle acque di lavaggio rappresenta

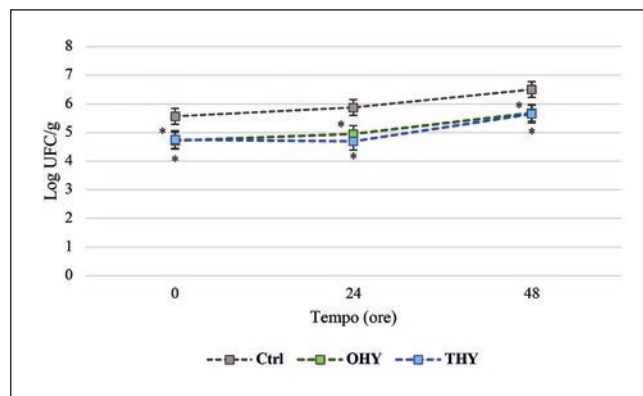


Figura 1. Dinamica di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 inocolata su rucola (*Eruca sativa*) e successivamente sottoposta a dipping in una soluzione contenente 500 QL/mL di idrolato di *Origanum vulgare subsp. hirtum* (OHY) o di *Thymbra capitata* (L.) Cav. (THY), a tempo 0 e dopo 24 e 48 ore a 4°C in aria. I risultati sono espressi come Log UFC/g. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) rispetto al campione non trattato.

un'ipotesi meritevole di indagine, in relazione alla possibilità di ridurre il rischio di listeriosi.

Materiali e Metodi. In questo studio è stata valutata la riduzione di *L. monocytogenes* ATCC 7644 inocolata su rucola (*Eruca sativa*) e successivamente sottoposta a dipping in una soluzione contenente 500 µl/ml di HY di *Origanum vulgare subsp. hirtum* (OHY) o *Thymbra capitata* (L.) Cav. (THY). Contestualmente, sono stati monitorati i parametri fisico-chimici (a_w , colore Hunter L*a*b* e scala L*C*h*, pH) ed è stata determinata la percezione del prodotto da parte del consumatore, attraverso un test triangolare associato a un test di accettabilità complessiva.

Risultati. I risultati sono stati acquisiti immediatamente dopo il trattamento, dopo 24 e dopo 48 ore di stoccaggio del campione in refrigerazione (4°C). La valutazione del prodotto non confezionato mira a fornire informazioni sia sugli effetti di una potenziale applicazione durante il processo di produzione della quarta gamma, sia sull'eventuale efficacia in ambiente domestico. Il trattamento con 500 µl/ml di OHY o di THY ha determinato dopo 24 e 48 ore una significativa ($p < 0.05$) riduzione logaritmica della carica di *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Fig. 1), raggiungendo dopo 24 ore riduzioni di carica pari a 0,93 e 1,19 Log UFC/g, rispettivamente. Il trattamento non ha determinato alcuna variazione nei valori di a_w del prodotto, mentre il pH è diminuito subito dopo il trattamento, in particolar modo in presenza dell'OHY (Tab. 1). Sono state altresì identificate differenze nella definizione del colore, determinate da un leggero imbrunimento del campione trattato con gli HY (dati non mostrati). Relativamente al test triangolare, subito dopo il trattamento un numero significativo di panelisti è riuscito a identificare il campione trattato. Ciononostante, dalle 24 ore seguenti il dipping con gli HY non sono state rilevate differenze rispetto al controllo.

Discussione. I risultati di questo studio *in-situ* hanno evidenziato l'efficacia degli HY nel ridurre la carica di *L. monocytogenes* ATCC 7644 su rucola refrigerata non confezionata, come conseguenza dei composti bioattivi che residuano dalla distillazione degli oli essenziali corrispondenti (1).

Conclusioni. La minima variazione nelle caratteristiche fisico-chimiche della rucola, unitamente ai risultati del test sensoriale, lascia supporre la possibilità di impiegare gli HY nelle acque di lavaggio dei prodotti ortofruttili, senza incidere sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finito.

Bibliografia

- (1) D'Amato S., Serio A., Chaves-López C., Paparella A. (2018) - Hydrosols: biological activity and potential as antimicrobials for food applications. Food Control, 86: 126-137.

Parole chiave. Bioconservazione, Idrolati, *Eruca sativa*, *Listeria monocytogenes*

UTILIZZO DI OLI ESSENZIALI NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI DI CONIGLI PER RIDURRE L'USO DI ANTIBIOTICI

M. Di Mercurio¹, F. Bugli^{1,2}, M. Sanguinetti^{1,2}, P. Mattarelli³,
M. Scozzoli⁴, M. Di Vito¹

¹Dipartimento di Scienze Biotechnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

²Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia

³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Italia

⁴Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali (SIROE), Roma, Italia

APA-CT s.r.l., Forlì, Italia

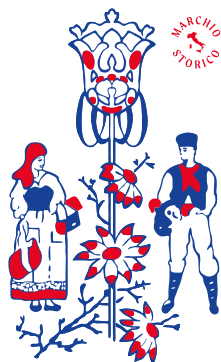
e.mail: mattia.dimercurio@unicatt.it

Introduzione. Lo studio dell'azione antimicrobica degli oli essenziali in ambito veterinario ha subito negli ultimi anni un'importante crescita raggiungendo interessanti risultati sia per la prevenzione che per la cura delle infezioni batteriche e fungine. La diffusione di tali infezioni negli allevamenti di animali porta con sé un importante problema per la salute degli operatori poiché i microrganismi in questione sono spesso anche responsabili di zoonosi. Nello specifico, le dermatofitosi (malattie causate da funghi dermatofiti) sono un problema estremamente rilevante negli allevamenti commerciali di conigli dove causano una notevole

morbilità e perdite economiche in termini di capi. Inoltre, i conigli infetti rappresentano un'importante fonte di infezione che può essere trasmessa all'uomo generando dermatofitosi del tipo *tinea corporis*, *tinea capitis* o *tinea barbae* causate da funghi quali *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. In questi allevamenti, la diffusione delle spore da animale ad animale o da animale a uomo è favorita dagli impianti di ventilazione.

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare l'efficacia della nebulizzazione di oli essenziali (OE) per il controllo della carica fungina negli allevamenti di conigli al fine di contrastare la diffusione di dermatofitosi.

Materiali e Metodi. Attraverso test di micro-brodo diluizione, è stata testata l'efficacia di un *mix* commerciale di oli essenziali (OE), e dei singoli OE che caratterizzavano il *mix*, contro tre funghi responsabili delle dermatofitosi in allevamenti di conigli (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton interdigitale*). Dai test sono stati estrapolati i valori di minima concentrazione inibente (MIC) e fungicida (MFC). L'efficacia citocida delle componenti volatili del *mix* è stata valutata mediante esperimenti di nebulizzazione in ambienti confinati. Quadrati (1x1 cm) di carta sterile sono stati inoculati al momento e 10 gg prima dell'esperimento con 50 µL di una sospensione di 5x10⁵ cfu/mL. Sono stati testati due tempi di nebulizzazione (20 e 80 min). Dopo il trattamento la crescita dei dermatofiti è stata osservata dopo 3, 6 e 10 gg. (Fig.1 e Fig. 2).



A. MINARDI & FIGLI
S.R.L.



Via Boncellino 32 - 48012 Bagnacavallo (Ra)

**90 anni di esperienza
nella lavorazione e nel commercio all'ingrosso
delle piante officinali**

Tel. (0545) 61460 – Fax (0545) 60686 – <http://www.minardierbe.it> – e-mail: info@minardierbe.it

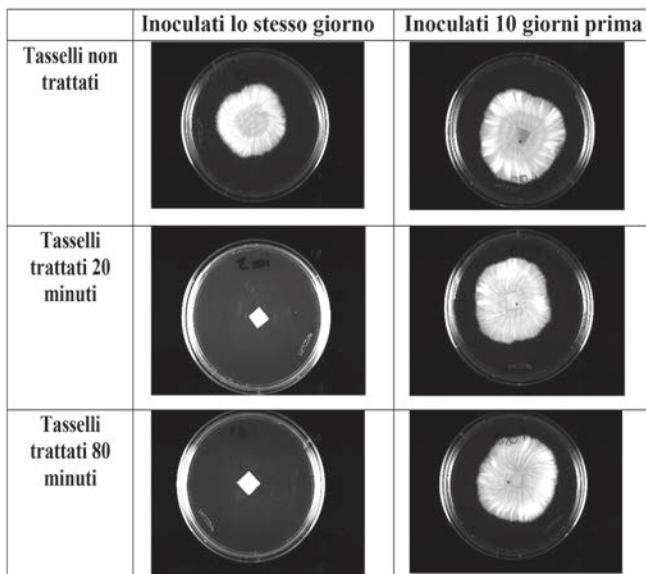


Figura 1. Tasselli inoculati con *Microsporium canis* dopo 10 giorni dal trattamento.

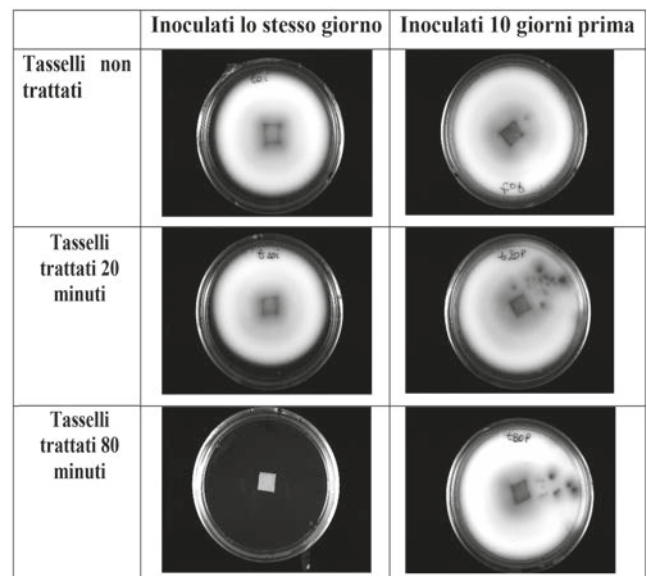


Figura 2. Tasselli inoculati con *Trichophyton interdigitale* dopo 10 giorni dal trattamento.

Risultati. I risultati mostrano come sia gli oli essenziali in piastre che le loro componenti volatili esercitano un'azione citocida nei confronti dei dermatofiti testati rispetto al controllo non trattato. Dopo un solo trattamento l'azione citocida si esplica solo a carico dei campioni inoculati al momento (Fig. 1) già a partire dai 20 minuti di trattamento.

Discussione e Conclusioni. I dati preliminari suggeriscono che la nebulizzazione degli OE somministrati può essere un valido trattamento per il controllo della carica fungina negli allevamenti di conigli al fine di evitare sia le infezioni degli animali che degli operatori.

Parole chiave: Oli essenziali, Dermatofitosi, Allevamento di conigli, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton interdigitale*

IV Sessione: Oli Essenziali in Medicina Umana

AROMATERAPIA E ASTENIA NEI PAZIENTI IN TRATTAMENTO EMODIALITICO CRONICO: UNA REVISIONE SISTEMATICA

Maurizio Bossola

Servizio Emodialisi, Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia
e.mail: maurizio.bossola@gmail.com

Introduzione. I pazienti in trattamento emodialitico cronico hanno una qualità di vita significativamente inferiore a quella della popolazione generale. Ciò dipende dalle numerose comorbidità e dai molteplici sintomi psico-fisici, il più invalidante dei quali è l'astenia. È stata condotta una *review* sistematica per definire gli effetti della aromaterapia sull'astenia nei pazienti in trattamento emodialitico cronico.

Materiali e Metodi. Una ricerca sistematica è stata condotta su 'Cochrane Library, Pubmed, Scopus, Science Direct, Springer Link' nel periodo 1960 – 2022. Dieci studi prospettici, randomizzati e controllati comprendenti 764 pazienti sono stati inclusi nella presente *review* sistematica. L'aromaterapia è stata condotta per inalazione indiretta, per inalazione diretta, o tramite massaggio con olii essenziali, prima o durante o dopo la sessione dialitica, ogni giorno o due/tre volte alla settimana, per una durata varia (range: 2-30 minuti).

Risultati. In tutti gli studi è stata documentata una significativa riduzione dell'astenia nel gruppo di trattamento rispetto al gruppo di controllo.

Discussione. L'astenia altera significativamente la qualità di vita dei pazienti in trattamento emodialitico cronico. I trattamenti farmacologici si sono dimostrati inefficaci così come l'uso di trattamenti emodialitici ad alta efficienza (emodiafiltrazione) (1). D'altra parte, la presente e altre due revisioni sistematiche, dimostrano che l'aromaterapia con olii essenziali riduce significativamente l'astenia in questi pazienti (2-4). È stato ipotizzato che l'aromaterapia stimoli, attraverso il sistema olfattivo, l'ipotalamo e attivi il sistema parasimpatico promuovendo rilassamento e riduzione dell'astenia.

Conclusioni. L'aromaterapia è efficace nel ridurre l'astenia nei pazienti emodializzati cronici. Rimane da definire la sua applicabilità nella pratica clinica quotidiana.

Bibliografia

- (1) Bossola M., Monteburini T., Parodi E., Santarelli S., Sirolli V., Cenerelli S., Bonomini M., de Ninno G., di Stasio E. (2023) - Post-dialysis fatigue: Comparison of bicarbonate hemodialysis and online hemodiafiltration. *Hemodial. Int.*, 27: 55-61.
- (2) Bayülgen M.Y., Gün M. (2022) - Effect of complementary and integrative treatments on fatigue symptoms in hemodialysis patients: A Systematic Review. *Holist Nurs Pract.*, 36: 17-27.
- (3) Bossola M., Di Stasio E. (2023) - Effect of aromatherapy on fatigue symptoms in hemodialysis patients: A systematic review. In press
- (4) Yangöz Ş.T., Turan Kavradım S., Özer Z. (2021) - The effect of aromatherapy on fatigue in adults receiving haemodialysis treatment: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *J. Adv. Nurs.*, 77: 4371-4386.

Parole chiave. Emodialisi, Astenia, Fatigue, Aromaterapia

EFFETTO DEL TTO E DEL TERPINEN-4-OLO SULLA CRESCITA E L'INVASIONE DELLE CELLULE DI MELANOMA UMANO

G. Bozzuto¹, A. Calcabrini¹, M. Colone¹, L. Toccaceli¹, I. Costa²,
A. Molinari¹, A. Stringaro¹

¹Centro per la Ricerca e la Valutazione Pre-Clinica e Clinica dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma, Italia

²Leica Microsystems S.r.l., Buccinasco, Milano, Italia
e.mail: giuseppina.bozzuto@iss.it

Introduzione. Il melanoma è il tumore della pelle più aggressivo che origina dalla trasformazione maligna dei melanociti. È un tumore altamente invasivo, metastatico e refrattario alla chemioterapia. Uno dei meccanismi alla base della resistenza del melanoma è l'incapacità di subire l'apoptosi in risposta alla chemioterapia e ad altri stimoli esterni. Tuttavia, anche altri processi come detossificazione, trasporto di farmaci e riparazione del DNA possono giocare un ruolo fondamentale (1). Uno degli obiettivi della ricerca oncologica è l'individuazione di nuove strategie terapeutiche combinate in grado di superare il fenomeno della farmacoresistenza e ridurre il potenziale metastatico e invasivo delle cellule tumorali.

Nell'ambito di tale ricerca è stato valutato l'effetto dell'olio essenziale estratto da *Melaleuca alternifolia*, [tea tree oil (TTO)] e del suo componente attivo, il terpinen-4-olo, su un modello di melanoma umano sensibile e farmaco-resistente.

Materiali e Metodi. Come modello cellulare è stata utilizzata una linea di melanoma umano sensibile (M14 WT) e la sua variante farmacoresistente (M14 ADR) caratterizzata da un'aumentata espressione della P-glicoproteina.

Per studiare gli effetti e il meccanismo di azione del TTO e del terpinen-4-olo sono stati utilizzati test MTT, microscopia a scansione, citometria a flusso, test del ciclo cellulare, microscopia confocale a scansione laser (LSCM), 'transwell chamber invasion assay', analisi morfometrica, 'western blotting', modelli di membrana (film di Langmuir-Blodgett) e 'freeze-fracturing'.

Risultati. Gli studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il TTO e il suo componente attivo, il terpinen-4-olo, hanno una potente attività citotossica e inibitoria dei processi di invasione tumorale delle cellule di melanoma. In particolare, abbiamo dimostrato che il TTO è in grado di superare la resistenza all'apoptosi, mediata dalla P-glicoproteina, inducendo apoptosi caspasi-dipendente (2). Inoltre, inibisce la migrazione e l'invasione soprattutto nelle cellule farmacoresistenti, inducendo gravi danni della membrana plasmatica con conseguente inibizione della fosforilazione delle proteine ERM e delle MAP Kinasi (3). Studi biofisici ultrastrutturali hanno permesso di dimostrare che il TTO esplica la sua attività citotossica, chemiosensibilizzante e inibitoria dei meccanismi di invasione delle cellule tumorali farmacoresistenti mediante l'interazione preferenziale con lo strato fosfolipidico delle membrane cellulari (4). Infine, l'analisi del citoscheletro mediante LSCM ha evidenziato una chiara azione, sia dell'olio essenziale che del suo principale componente attivo, sull'organizzazione dei tre elementi citoscheletrici, actina, tubulina e vimentina (5).

Discussione e Conclusioni. I risultati qui riportati dimostrano che TTO e terpinen-4-olo, oltre a superare la resistenza all'apoptosi delle cellule M14 ADR, sono in grado di influenzare il comportamento aggressivo del-

le cellule di melanoma resistenti ai farmaci. Come dimostrato dagli studi biofisici ultrastrutturali, tale effetto viene mediato dall'interazione del TTO con la membrana plasmatica delle cellule di melanoma, causando un'alterazione dell'ambiente fosfolipidico che porterebbe alla disattivazione dei segnali (ERK1/2 e p38 MAPK) e delle proteine ezrina, radixina e miosina, regolanti l'invasione e la sopravvivenza delle cellule di melanoma. Lo studio mediante LSCM ha indicato chiaramente il citoscheletro come ulteriore bersaglio del TTO e del terpinen-4-olo. Sorprendentemente, le alterazioni citoscheletriche osservate su actina, microtubuli e vimentina sono apparse localizzate in precise strutture della rete citoscheletrica, ovvero fibre di stress di actina, gabbia perinucleare di tubulina e l'architettura dei filamenti intermedi di vimentina. Nelle nostre condizioni sperimentali, i filamenti intermedi di vimentina sembrano essere l'elemento citoscheletrico maggiormente influenzato dai trattamenti. Le proteine reticolanti (che collegano i filamenti intermedi ad alle altre reti di proteine citoscheletriche) potrebbero svolgere un ruolo nel meccanismo d'azione del TTO, ma ulteriori studi sono necessari per approfondire meglio questo argomento.

Bibliografia

- (1) Kalal B.S., Upadhyaya D., Pai V.R. (2017) - "Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer. *Oncol. Rev.*, 24: 11. "https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28382191/"
- (2) Calcabrini A., Stringaro A., Toccaceli L., Meschini S., Marra M., Colone M., et al (2004) - Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.*, 122: 349-60.
- (3) Bozzuto G., Colone M., Toccaceli L., Stringaro A., Molinari A. (2011) - Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Med.*, 77: 54-6.
- (4) Giordani C., Molinari A., Toccaceli L., Calcabrini A., Stringaro A., Chistolini P., et al. (2006) - Interaction of tea tree oil with model and cellular membranes. *J. Med. Chem.*, 49: 4581-8.
- (5) Bozzuto G., Mariano F., Costa I., Calcabrini A., Molinari A. (2021) - Tea tree oil and terpinen-4-ol induce cytoskeletal reorganization of human melanoma cells. *Planta Med. Int. Open*, 8: e34-e53.

Parole chiave. Melanoma, Invasione, Tea tree oil, Terpinen-4-olo

BASI RAZIONALI PER IL TRASFERIMENTO IN CLINICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO

D. Scuteri^{1,2}, G. Bagetta¹

¹Unità di Documentazione e Trasferimento Farmacotecnologico, Farmacologia Preclinica e Translazionale, Dipartimento di Farmacia, Scienze della Salute e della Nutrizione, Università della Calabria, Rende, Cosenza, Italia

²Centro di Riferimento Regionale per le gravi cerebrolesioni, Istituto S. Anna, Crotona, Italia
e.mail: damiana.scuteri@unicat.it

Introduzione. Circa 55 milioni di persone al mondo soffrono di demenza, spesso accompagnata da agitazione. Uno dei principali *trigger* di questo sintomo neuropsichiatrico particolarmente severo è il dolore, non diagnosticato e trattato a causa della ridotta capacità di *self-report*. La terapia prevede l'uso di neurolettici che raddoppiano il rischio di morte (1). Poiché l'olio essenziale di bergamotto (*Citrus bergamia*, Risso & et Poiteau; BEO) ha dimostrato forte evidenza preclinica di efficacia analgesica, l'obiettivo del presente studio è fornire il razionale per la traslazione clinica della sua forma ingegnerizzata (NanoBEO) nel trattamento dell'agitazione.

Materiali e Metodi. NanoBEO è ottenuto mediante incapsulazione del BEO in nanoparticelle solide lipidiche per il *delivery* dell'olio essen-

le, privato delle furocumarine responsabili di fototossicità, nella forma farmaceutica di una crema per somministrazione transdermica erogata mediante *dispenser airless*.

Risultati. Il NanoBEO consente di: 1) somministrare una dose certa e stabile nel tempo del fitocomplesso titolato nei componenti principali; 2) proteggere l'olio essenziale dall'instabilità chimico-fisica; 3) assicurare un'elevata *shelf-life*; 3) intrappolare l'odore, rendendo la formulazione indistinguibile dal placebo e garantendo il doppio cieco per la prima volta. NanoBEO è risultato efficace in modelli sperimentali rilevanti per il setting clinico (2).

Discussione e Conclusioni. L'efficacia clinica del NanoBEO, brevettato in Italia ed in fase Regionale Europea, è in studio nel *trial* clinico BRAINAIID (NCT04321889), privo dei *bias* metodologici dell'aromaterapia (3). Lo sviluppo del NanoBEO come primo trattamento *needs-oriented*, sicuro ed efficace per lungo periodo rappresenta uno *step-by-step pre-clinical-to-clinical pathway* per lo studio traslazionale e clinico degli oli essenziali (4).

Bibliografia

- (1) Schneider L.S., Dagerman K.S., Insel P. (2005) - Risk of Death With Atypical Antipsychotic Drug Treatment for Dementia: Meta-analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. *Jama*, 294(15): 1934-43.
- (2) Scuteri D., Cassano R., Trombino S., Russo R., Mizoguchi H., Watanabe C., et al. (2021) - Development and Translation of NanoBEO, a Nanotechnology-Based Delivery System of Bergamot Essential Oil Deprived of Furocumarins, in the Control of Agitation in Severe Dementia. *Pharmaceutics*, 13(3): 379.
- (3) Scuteri D., Sandrini G., Tamburini S., Corasaniti M.T., Nicotera P., Tonin P., et al. (2021) - Bergamot rehabilitation AgalNst agitation in dementia (BRAINAIID): Study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess the efficacy of furocoumarin-free bergamot loaded in a nanotechnology-based delivery system of the essential oil in the treatment of agitation in elderly affected by severe dementia. *Phytotherapy research: PTR* 35, 10: 5333-8.
- (4) Scuteri D., Watanabe C., Sakurada S., Hamamura K., Sakurada T., Tonin P., et al. (2022) - Pharmaceutotechnological Advances for Clinical Translation of Essential Oils for the Treatment of Pain and Agitation in Severe Dementia. *Processes*, 10(7): 1340.

Parole chiave. Olio essenziale di bergamotto (BEO), NanoBEO, BRAINAIID, Demenza severa, Agitazione, Traslazione clinica

V Sessione:

Oli Essenziali e Metodi di Veicolazione

APPLICAZIONI FARMACEUTICHE E STRATEGIE DI INCAPSULAZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI IN SISTEMI LIPIDICI DI "DRUG DELIVERY"

C. Carbone

Dipartimento di Scienze del Farmaco e della Salute, Università di Catania, Catania, Italia
CERNUT, Centro interdisciplinare di Ricerca in Nutraceutica e Prodotti Salutistici
NANOMED, Centro di ricerca in Nanomedicina e Nanotecnologia Farmaceutica
e.mail: claudia.carbone@unicat.it

Introduzione. Il crescente interesse per i composti naturali, con particolare attenzione agli oli essenziali (OE) per le loro proprietà

terapeutiche (attività antiossidanti, antinfiammatorie, antimicrobiche, cicatrizzanti e ansiolitiche) (1) ha stimolato lo sviluppo di strategie che ne consentano l'utilizzo in campo farmaceutico superando inconvenienti quali: idrofobicità, instabilità, elevata volatilità e tossicità. I sistemi di "drug delivery" consentono di incapsulare l'OE aumentandone la biodisponibilità e la stabilità, riducendone al contempo volatilità e tossicità (1). Una delle strategie più promettenti è rappresentata dall'uso di carrier lipidici nanostrutturati (NLC), in cui l'OE può essere utilizzato come olio liquido in miscela con il lipide solido selezionato per ottenere una sospensione colloidale (2,3). Nell'ambito di questo studio sono state progettate, preparate e caratterizzate NLC per la somministrazione intranasale di OE come agenti ansiolitici e antidepressivi nel trattamento di malattie neurodegenerative.

Materiali e Metodi. Le NLC caricate con OE (*Lavandula x intermedia* "Sumian", *Rosmarinus officinalis* L. e *Mentha piperita*) sono state preparate sfruttando la temperatura di inversione di fase (1). Il Tegosoft CT è stato utilizzato per ottenere il controllo positivo CT-NLC, l'olio di Neem è stato scelto come controllo negativo negli studi di vitalità cellulare (N-NLC). Tutte le NLC sono state caratterizzate per determinare la dimensione media delle particelle, l'indice di polidispersione, il potenziale zeta, l'efficienza di incapsulazione dell'OE, la morfologia mediante Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM), raggi x e la biocompatibilità mediante studi *in vitro* (test MTT, CLSM, *Western Blot*) su fibroblasti umani e murini.

Risultati e Discussione. Le NLC di controllo (CT-NLC e N-NLC) avevano una dimensione media delle particelle compresa nell'intervallo 250-350 nm con bassa omogeneità (Fig. 1). La presenza di uno dei tre OE selezionati ha permesso di ottenere particelle di dimensioni più piccole (~150 nm) con un unico picco di distribuzione dimensionale (Fig. 1). Tutte le NLC hanno mostrato valori ZP negativi, che favorirebbero le repulsioni elettrostatiche e quindi la stabilità a lungo termine. Le sospensioni colloidali presentavano una buona EE% di OE incapsulato (65-75%) che diminuiva nel seguente ordine: L-NLC > M-NLC > R-NLC. Al fine di approfondire le diverse caratteristiche delle NLC preparate rispetto alla natura dell'olio incorporato, sono stati eseguiti ulteriori studi chimico-fisici sfruttando la diffrazione di raggi X e la TEM. I valori di cristallinità ottenuti hanno mostrato la presenza di un sistema disordinato quando veniva utilizzato il Tegosoft CT. Tra tutte le formulazioni, quelle preparate con OE di *Lavandula* e *Rosmarinus* mostravano una struttura più ordinata, così come confermato dalla maggiore percentuale di cristallinità. È interessante notare che le immagini TEM hanno mostrato un diverso comportamento di ciascun OE all'interno della formulazione, determinando così la formazione di diverse strutture. La Figura 2 riporta le immagini TEM di CT-NLC, N-NLC e L-NLC. In particolare, CT-NLC (Fig. 2 a,b) mostra una disposizione molto irregolare di nanoparticelle, con un nucleo oleoso centrale e un guscio spesso. N-NLC (Fig. 2 c,d) e M-NLC (dato non riportato) mostrano la presenza di un debole nucleo oleoso centrale circondato dagli strati solidi di lipidi e tensioattivi. D'altra parte, L-NLC (Fig. 2 e,f) e R-NLC (dato non riportato) mostrano una struttura caratterizzata dalla presenza di goccioline oleose disperse nella matrice lipidica solida. È possibile che la capacità di *Lavandula* e *Rosmarinus* di creare imperfezioni nella matrice delle NLC influisca anche sulla struttura delle nanoparticelle, migliorandone l'ordine e, di conseguenza, la stabilità durante la conservazione, probabilmente a causa della loro composizione caratterizzata da un'elevata quantità di linalolo. Come riportato in Figura 3a e 3b, la formulazione di controllo CT-NLC, non determinava citotossicità a tutte le concentrazioni testate,

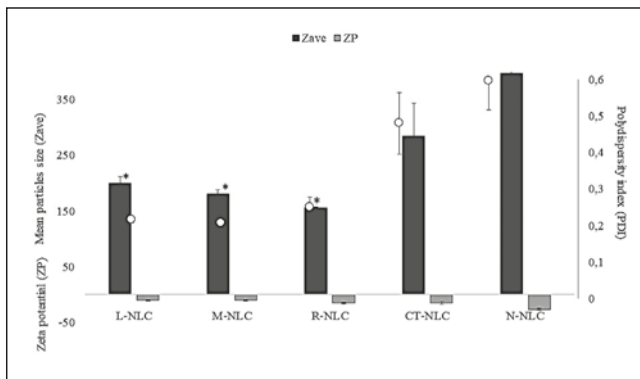


Figura 1. Diametro medio delle particelle (Zave), indice di polidispersione (PDI) e potenziale zeta (ZP) delle NLC analizzate 24 ore dopo la preparazione.

mentre come atteso il sistema N-NLC mostrava un significativo effetto citotossico sui fibroblasti umani alla concentrazione più elevata (500 µg/mL) (Fig. 3b). È interessante osservare che L-NLC e R-NLC, caratterizzati da una struttura di tipo I, presentavano una buona citocompatibilità a tutte le concentrazioni testate (Fig. 3), confermando così l'aumentata biocompatibilità dell'OE incapsulato rispetto a quello libero, come descritto in precedenza (1).

Conclusioni. Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile considerare le formulazioni NLC preparate con OE di *Lavandula* e *Rosmarinus* come potenziale valida strategia coadiuvante nel trattamento delle patologie neurodegenerative.

Bibliografia

- (1) Carbone C., Martins-Gomes C., Caddeo C., Silva A.M., Musumeci T., Pignatello R., Puglisi G., Souto E.B. (2018) - Mediterranean Essential Oils as Precious Matrix Components and Active Ingredients of Lipid Nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 548: 217-226.
- (2) Bilia A.R., Guccione C., Isacchi B., Righeschi C., Firenzuoli F., Bergonzi M.C. (2014) - Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evid Based Complement Alternat. Med.*, 2014: 651593.
- (3) Carbone C., Teixeira M.D., Sousa M.D., Martins-Gomes C., Silva A.M., Souto E.M.B., Musumeci T. (2019) - Clotrimazole-Loaded Mediterranean Essential Oils Nlc: A Synergic Treatment of Candida Skin Infections. *Pharmaceutics*, 11(5): 231.

Parole chiave. NLC, Veicolazione intranasale, Patologie neurodegenerative, Oli essenziali del Mediterraneo

SVILUPPO DI NANOSISTEMI SOSTENIBILI PER L'INCAPSULAMENTO DI OLI ESSENZIALI E DEI LORO PRINCIPI ATTIVI PER LA CONSERVAZIONE DEI BENI CULTURALI DI ORIGINE LIGNEA

C. Genova¹, M. Beccaccioli², F. Sapienza³, R. Ragno³, M. Reverberi², G. Favero², A. Masi²

¹Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

³Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

e.mail: chiara.genova@uniroma1.it

Introduzione. La conservazione e il restauro dei Beni Culturali (BC) comporta la potenziale esposizione a fattori di rischio per la salute dei lavoratori e per l'ambiente. Il lavoro proposto affronta questa problematica, ponendo le basi per un trattamento sostenibile basato sui principi della Chimica Verde per la conservazione dei BC di origine lignea colpiti dal biodeterioramento. L'impianto metodologico proposto, incentrato su una "conservazione sostenibile", ha lo scopo di presentare i seguenti temi: i biocidi di origine naturale ed i nanomateriali.

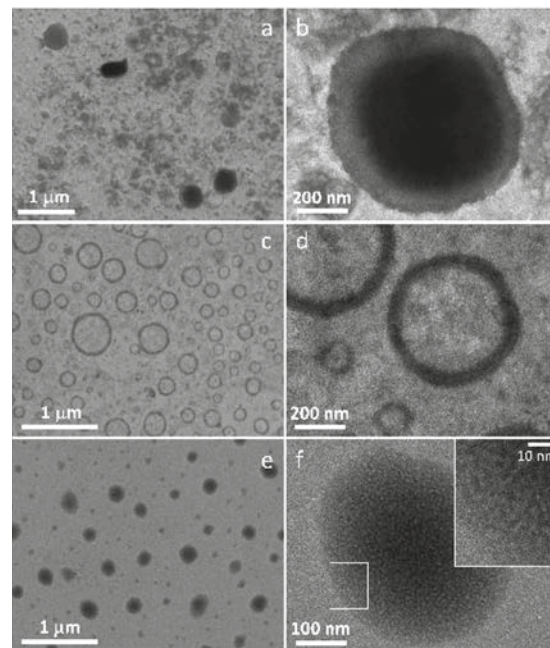


Figura 2. Immagini TEM (Microscopio Elettronico a Trasmissione) di: CT-NLC (a,b); N-NLC (c,d); L-NLC (e,f).

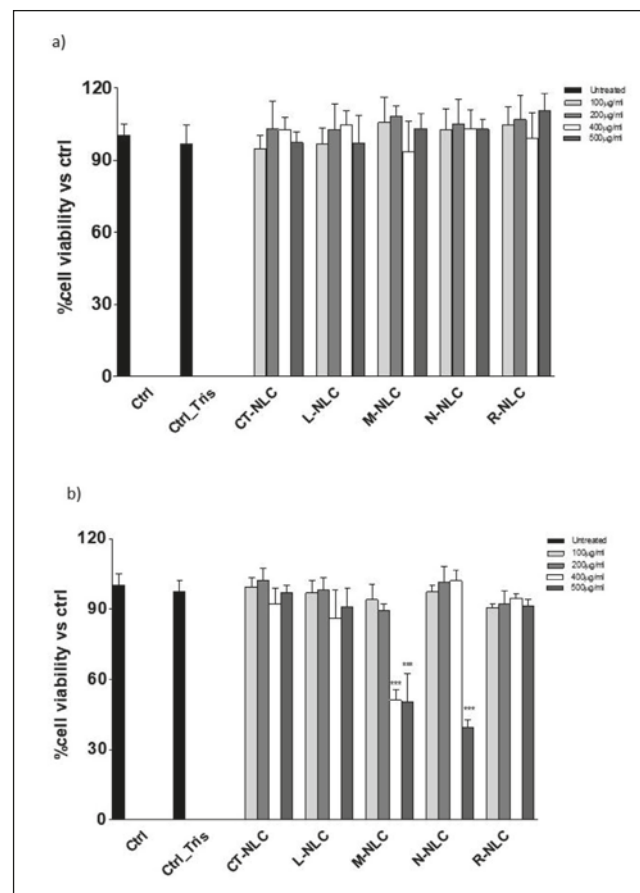


Figura 3 (a,b). Percentuale di vitalità cellulare dei fibroblasti murini (a) e umani (b) trattati per 24 ore con NLC caricate con OE di lavanda (L-NLC), menta (M-NLC) e rosmarino (R-NLC), rispetto alle NLC non caricate (CT-NLC) e N-NLC, utilizzate rispettivamente come controllo positivo e negativo.

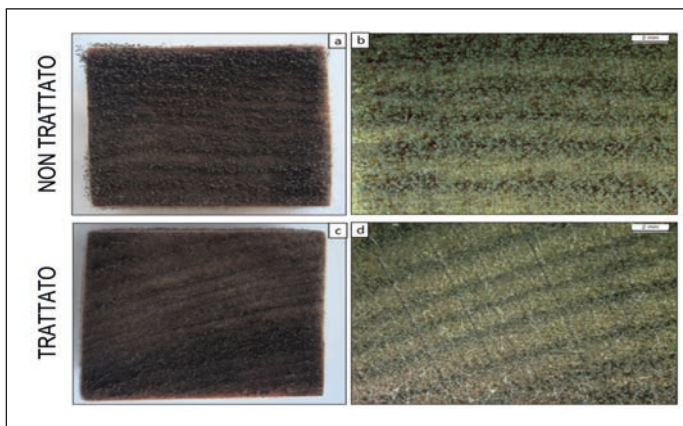


Figura 1. Provini di legno (*Fagus sylvatica*) artificialmente colonizzati con *Aspergillus niger*. (a) *Provino non trattato con nanoparticelle*, (b) *dettaglio del provino non trattato con nanoparticelle*, (c) *provino trattato con nanoparticelle ChNPs-Pu*, (d) *dettaglio del provino trattato con nanoparticelle di ChNPs-Pu*.

Materiali e Metodi. Tra i biocidi di origine naturale gli oli essenziali (OE), e le loro componenti maggioritarie (o principi attivi), stanno attirando l'attenzione dei ricercatori in virtù delle loro ben note proprietà antimicrobiche e della loro ridotta tossicità, paragonata a quella dei biocidi comunemente utilizzati. Tra questi, sono stati selezionati l'OE di *Calamintha nepeta* (L.) Savi ed il suo componente maggioritario, l'R-(+)-pulegone (Pu), i quali hanno già dimostrato proprietà biocide nei confronti di numerosi microrganismi (1), alcuni dei quali responsabili del biodeterioramento del legno. Per la veicolazione di tali sostanze sulle superfici lignee, è stata adottata una procedura di incapsulamento che prevede l'utilizzo del chitosano (Ch), un polisaccaride naturale atossico, biocompatibile e biodegradabile, derivante dalla deacetilazione della chitina, in grado di formare delle nanoparticelle e dei nano-carriers tramite gelificazione ionica, un processo di sintesi che non prevede l'impiego di reticolanti o altri reagenti tossici. Inoltre, il chitosano, è stato già considerato come prodotto consolidante per la conservazione del legno archeologico (2). In questo caso, è stato utilizzato del chitosano a basso peso molecolare (PM: 50 – 190 kDa, grado di deacetilazione $\geq 75\%$). La procedura sperimentale ha previsto, inizialmente, la sintesi delle nanoparticelle caricate con pulogone (ChNPs-Pu) a diversi rapporti Ch:Pu (1:0; 1:0.25; 1:0.5; 1:1) e la loro caratterizzazione morfologica tramite diverse tecniche analitiche (DLS, spettroscopia FTIR, microscopia SEM). L'attività biocida delle singole sostanze (Pu, Ch, ChNPs-Pu) è stata valutata tramite *Multiwell Assay* (MA, 96 well plate, spettrofotometro 620 nm) in presenza del fungo filamentoso *Aspergillus niger*, uno tra i maggiori responsabili del fenomeno della carie soffice del legno e del suo degrado.

Risultati, Discussione e Conclusioni. Il MA ha mostrato l'attività biocida dei diversi trattamenti (Pu, Ch, ChNPs-Pu) a diverse concentrazioni (da 3 a 0,093 mg/mL) evidenziando il trattamento con ChNPs-Pu a basse concentrazioni risulta più efficace rispetto alle singole sostanze. Le nanoparticelle di ChNPs-Pu sono state applicate su provini lignei (Fig. 1) mostrando la capacità antimicrobica. La sperimentazione prevede il trattamento con nanoparticelle di campioni lignei con diverso grado e tipologia di colonizzazione biologica.

L'effetto antimicrobico delle nanoparticelle sarà valutato mediante diverse metodologie, come saggi colorimetrici, misurazioni della colonizzazione di *A. niger* e relativa vitalità. Inoltre, le stesse applicazioni e valutazioni verranno fatte utilizzando l'OE di *C. nepeta*, per valutare se la presenza del Pu influenza le proprietà biocide dell'olio essenziale e se la composizione chimica eterogenea di quest'ultimo produce effetti positivi o negativi nei confronti del microrganismo studiato.

Bibliografia

- (1) Božović M., Ragno R. (2017) - *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its main essential oil constituent Pulegone: biological activities and chemistry. *Molecules*, 22, 2: 290.
- (2) Christensen et al. (2015) - Treatment of waterlogged archaeological wood using Chitosan-and modified Chitosan solutions. Part I: Chemical compatibility and microstructure. *Journal of the American Institute for Conservation*, 54(1): 3-13.

Parole chiave. Nanoparticelle, Chitosano, Biocidi naturali, Biodeterioramento del legno

OLI ESSENZIALI IN NANOEMULSIONI: UN SISTEMA PROMETTENTE PER DIFFERENTI APPLICAZIONI

M.G. Fabiano, J. Forte, F. Rinaldi, S. Garzoli, C. Marianecchi, M. Carafa

Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

e.mail: mariagioia.fabiano@uniroma1.it

Introduzione. Gli oli essenziali (OE) sono costituiti da un'ampia selezione di molecole che ne consentono l'applicazione in molteplici settori: in quello farmaceutico, alimentare, cosmetico e agricolo. L'obiettivo di questo lavoro è quello di utilizzare OE ad attività antimicrobica al fine di "biostabilizzare" le numerose popolazioni microbiche, anche antibiotico resistenti, presenti nel compost, le quali possono essere causa sia di cattivo odore che di patogenicità (1).

È necessario quindi rendere il compost microbiologicamente sicuro attraverso un trattamento con additivi di origine naturale, biocompatibili, sicuri ed efficaci come gli OE. Questi però, sono particolarmente sensibili all'ossigeno, alla luce, al pH, all'umidità ed inoltre contengono molecole volatili anche a temperatura ambiente e ciò ne limita l'uso (2). Per questi motivi molte ricerche si sono concentrate sulla veicolazione di OE, ad esempio in Nanoemulsioni (NE) anche per agevolare l'assorbimento da matrici acquose e per ottenere un rilascio prolungato e costante dell'OE nel tempo. In questo lavoro, sono state preparate e caratterizzate NE da nebulizzare sul compost, formate da OE di *Thymus vulgaris* (TEO), scelto per la sua significativa azione antiossidante, antisettica, antimicrobica e antifungina e per il suo caratteristico odore (3).

Materiali e Metodi. Sono stati costruiti differenti diagrammi di fase ternari (Fig. 1) per individuare i migliori rapporti tra OE, tensioattivo e acqua al fine di formulare NE stabili nel tempo, idonee per l'applicazione proposta e che avessero il minor quantitativo di tensioattivo possibile. Le formulazioni selezionate (Tab. 1) sono state poi caratterizzate in termini di diametro idrodinamico, potenziale ζ e indice di polidispersione (PDI) utilizzando il Malvern ZetaSizerNano 90S (Tab. 2). Sono stati effettuati studi di stabilità a differenti temperature, pH e percentuali di umidità per simulare le condizioni delle camere di compostaggio. È stata valutata la resistenza alla nebulizzazione. Infine, per indagare come le 3 diverse composizioni selezionate potessero influenzare il rilascio dei componenti dell'OE, è stato valutato il rilascio sia della frazione non volatile in una matrice acquosa, sia di quella volatile tramite SPME-GC-MS.

Risultati e Discussione. Sono state quindi selezionate 3 formulazioni (Tab. 1), che risultano essere stabili nel tempo (Fig. 2) e resistenti al processo di nebulizzazione. Infine, è stato confermato il rilascio nel tempo dei componenti dell'OE.

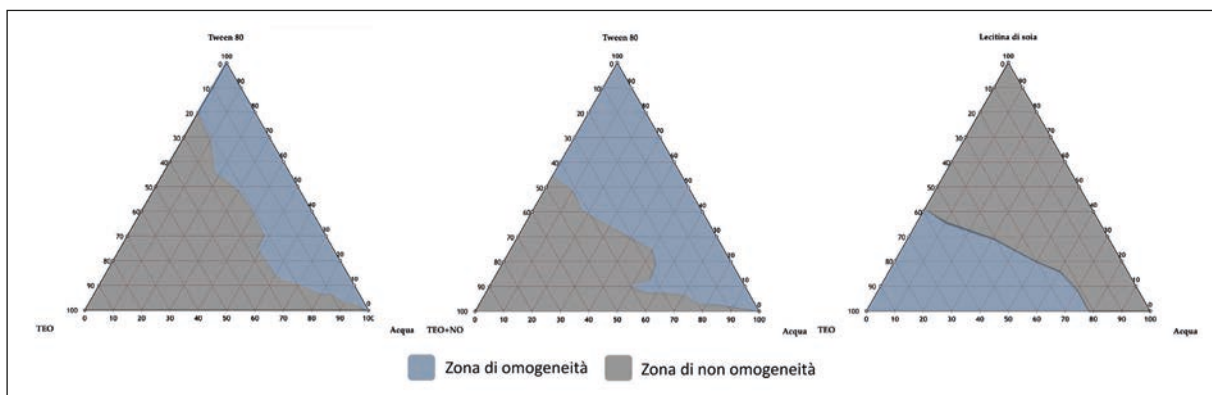


Figura 1. Diagrammi ternari di fase: zona di omogeneità (area blu), zona di non omogeneità (area grigia)

Conclusioni. La caratterizzazione di questi campioni ha confermato che le NE sono uno strumento efficiente ed ecologico da nebulizzare sul compost per testarne l'impiego nella biostabilizzazione del compost.

Bibliografia

- (1) Sadeghi S., Nikaeen M. (2022) - Microbial characteristics of municipal solid waste compost: Occupational and public health risks from surface applied compost. *Waste Management*, 144: 98-105.
- (2) Donsi F., Cuomo A. (2014) - Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22: 212-220.
- (3) Kowalczyk A., Przychodna M. (2020) - Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, 25: 412.

Parole chiave. Olio essenziale di *Thymus vulgaris*, Nanoemulsione, Compost, Biostabilizzazione

Campione	Olio essenziale di Timo (TEO) (%)	Olio di Neem (NO) (%)	Tween 80 (%)	Lecitina di Soia (%)	Acqua (%)
TT80	25	-	25	-	50
TNT80	12,5	12,5	15	-	60

Tabella 1. Composizione quali-quantitativa dei campioni selezionati. TT80 (olio essenziale di Timo + Tween80 + acqua), TNT80 (olio essenziale di Timo + olio di Neem + Tween80 + acqua), TL (olio essenziale di Timo + Lecitina di Soia + acqua)

Campione	Diametro idrodinamico (nm) ± DS	PDI ± DS	Potenziale ζ ± DS
TT80	213 ± 3,98	0,15 ± 0,03	-14,9 ± 0,06
TNT80	256 ± 4,01	0,21 ± 0,01	-21,4 ± 0,35
TL	186 ± 2,60	0,19 ± 0,02	-48,6 ± 1,07

Tabella 2. Risultati ottenuti tramite Dynamic Light Scattering. TT80 (olio essenziale di Timo + Tween80 + acqua), TNT80 (olio essenziale di Timo + olio di Neem + Tween80 + acqua), TL (olio essenziale di Timo + Lecitina di Soia + acqua)

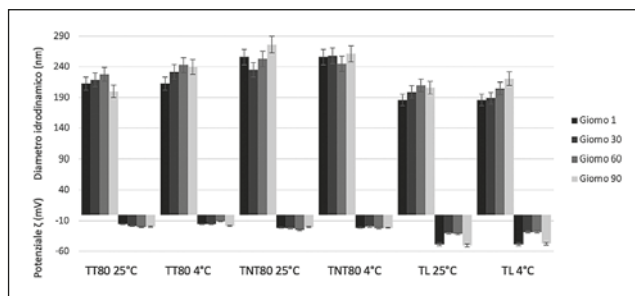


Figura 2. Studi di stabilità condotti a 4 e 25 °C per 3 mesi, valutando le variazioni di dimensione e potenziale z dei campioni.

VI Sessione: Oli Essenziali: dalla Microbiologia fino alla Salute Umana

OLII ESSENZIALI AD ATTIVITÀ ANTIVIRALE: UNA REVISIONE SISTEMATICA DEI DATI FINO AL 2020

M. Valussi

European Herbal & Traditional Medicine Practitioners Association (EHTPA), 6 Barnfield, Epping CM16 6RL
e.mail:babi.marco@gmail.com

Introduzione. La crisi pandemica ha suscitato grande interesse per i farmaci antivirali, e gli olii essenziali sono apparsi subito come promettenti, dato che i dati esistenti suggeriscono effetti virucidi e negli ultimi anni il numero di studi a loro dedicati è aumentato molto. Al momento della nostra indagine mancava ancora un'analisi stringente di questi studi. Questo ci ha convinti della necessità di valutare la loro efficacia ed i loro meccanismi d'azione.

Materiali e Metodi. Per arrivare a questo obiettivo abbiamo effettuato una revisione sistematica dei dati di grande apertura dei dati negli studi umani, su modelli animali e di tipo meccanicistico, fornendo una sintesi qualitativa completa dell'attuale corpo di conoscenze. Abbiamo seguito le linee guida dello "Handbook for Conducting Systematic Reviews for Health Effects Evaluations" (1) per identificare gli studi, applicare criteri di inclusione ed esclusione, estrarre i dati dagli studi pertinenti, valutare il rischio di bias dei singoli studi e sintetizzare i risultati. Abbiamo utilizzato 7 banche dati (ISI Web of Science, PubMed, EMBASE, Scopus, Google Scholar, CINHAL, Cochrane Library) per estrarre dati fino al 5 maggio 2020 usando i parametri PECO (2), senza restrizioni sulla data di pubblicazione o sugli idiomi, escludendo studi su composti isolati o su miscele.

Risultati preliminari. Sono stati testati poco più di 100 olii essenziali, su 27 virus, con maggior efficacia sui virus con pericapside rispetto a quelli senza. I dati preliminari sugli Herpes Simplex Virus indicano che *Leptospermum scoparium*, *Santolina insularis*, *Matricaria recutita* hanno elevata efficacia [0,3-0,96 µg/ml] e Specificity Index [100-160] su HSV-1, e che *Leptospermum scoparium*, *Melissa officinalis* e *Zingiber officinale* hanno efficacia elevata [0,59-1,00 µg/ml] e Specificity Index medio [20] su HSV-2. Per quanto riguarda i virus vegetali, gli olii essenziali più interessanti sono quelli di *Mentha x piperita* e *Zingiber officinale* (su *Tobacco necrosis virus*), e *Thymus* spp. e *Foeniculum vulgare* (su *Cucumber mosaic virus*).

Bibliografia

- (1) OHAT (Office of Health Assessment and Translation) (2019) - Handbook for Conducting a Literature-Based Health Assessment Using OHAT Approach for Systematic Review and Evidence Integration. Available from <https://ntp.niehs.nih.gov/go/ohathandbook>. Date of access: 23/03/2023.
- (2) Morgan R.L., Thayer K.A., Bero L., Bruce N., Falck-Ytter Y., Ghersi D., Guyatt G., Hooijmans C., Langendam M., Mandrioli D. et al. (2016) - "GRADE: Assessing the quality of evidence in environmental and occupational health". *Environ. Int.*, 92-93: 611-616.

Parole chiave. Essential oils, Virus, Systematic Review

EFFETTI BENEFICI DI COLTURE DI *LACTOBACILLUS HELVETICUS* ARRICCHITE DI POLIFENOLI (OTTENUTI DA SCARTI DELL'IDRODISTILLAZIONE) SULLA CRESCITA INTESTINALE DI *CANDIDA ALBICANS*

S. Rizzo^{1*}, M. Di Vito^{1*}, P. Mattarelli², V. Greco^{3,4}, R. Rosato¹, M. Sanguinetti^{1,5}, E. Napoli^{6*}, F. Bugli^{1,5*}

¹Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari-DIST, Università di Bologna, Bologna, Italia

³Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

⁴Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Unità di Chimica, Biochimica e Biologia molecolare clinica, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma, Italia

⁵Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma, Italia

⁶Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Catania, Italia

*Stesso contributo

e.mail: silvia.rizzo@unicatt.it

Introduzione. *Candida albicans* (CA) è un patogeno opportunistico, membro commensale del microbiota intestinale. Tuttavia, specifiche condizioni fisiopatologiche possono predisporre a infezioni da CA invasive, per lo più nosocomiali (1). I probiotici, come il *Lactobacillus helveticus* (LH), sono noti per i loro continui effetti benefici sul sistema gastrointestinale umano (2). I polifenoli (PP) sono molecole del metabolismo vegetale secondario individuate anche nell'acqua residua (RW, diversa dagli idrolati) presente nel serbatoio del distillatore al termine del processo di idrodistillazione usata per la produzione di oli essenziali (OE). Essi, oltre ad avere proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, interagiscono con il metabolismo microbico, esercitando effetti sulla salute attraverso i relativi derivati metabolici (3). Questo studio mira ad indagare l'effetto interferente esercitato da LH e/o PP nella modulazione della crescita di CA.

Materiali e Metodi. Il contenuto principale di PP nel RW liofilizzato ottenuto dall'idrodistillazione di *Origanum vulgare* è stato valutato mediante HPLC. Sono state ottenute le curve di crescita di 24 ore di LH e CA in presenza o in assenza di PP (0,25 - 4 mg/ml). La CA è stata co-coltivata con diluizioni LH e PP o con il surnatante di LH coltivato in presenza di PP e sono state valutate le relative ufc/ml. Il contenuto di secretoma di LH in presenza e in assenza di PP è stato studiato attraverso analisi biochimiche. Infine, la tossicità dei PP è stata testata sia *in vitro* su cellule Caco-2 mediante saggio MTT che *in vivo* su larve di lepidottero *Galleria mellonella*.

Risultati. Il 20% del peso secco del RW liofilizzato è costituito da PP, tra cui l'acido rosmarinico è quello più rappresentato. Dalle curve di crescita emerge che in seguito a trattamento con PP a concentrazioni pari a 0,25-0,5 mg/ml la crescita di LH, nella fase stazionaria, è stimolata di circa il 30% rispetto al controllo di crescita di LH non trattato. Lo stesso effetto non si osserva su CA, la cui crescita non è influenzata dal trattamento

con PP. Dalla conta delle ufc/ml dalla co-coltura di CA con LH e PP e CA con surnatante di LH e PP emerge che la crescita di CA risulta essere dimezzata in entrambe le condizioni, rispetto al controllo di CA senza alcun trattamento. Sia *in vitro* che *in vivo* i PP non presentano tossicità alle concentrazioni testate.

Discussione e Conclusioni. Sebbene gli antifungini convenzionali siano spesso efficaci contro la candidosi, non sono privi di effetti collaterali e il loro uso reiterato sta generando resistenze (4). I dati ottenuti indicano che LH potrebbe rappresentare una risorsa nel trattamento e nella prevenzione di infezioni e disbiosi. Infatti, il trattamento con PP e LH inibisce in maniera significativa la crescita di CA sia mediante inibizione da contatto che con l'azione del secretoma.

Bibliografia

- (1) Edmond M.B., Wallace S.E., McClish D.K., Pfaller M.A., Jones R.N., Wenzel R.P. (1999) - Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 29(2): 239-244. <https://doi.org/10.1086/520192>
- (2) Messaoudi M., Violle N., Bisson J.F., Desor D., Javelot H., Rougeot C. (2011) - Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut microbes*, 2(4): 256-261. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>
- (3) Li M., Zheng Y., Zhao J., Liu M., Shu X., Li Q., Wang Y., Zhou Y. (2022) - Polyphenol Mechanisms against Gastric Cancer and Their Interactions with Gut Microbiota: A Review. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 29(8): 5247-5261. <https://doi.org/10.3390/currenol29080417>
- (4) Shapiro R.S., Robbins N., Cowen L.E. (2011) - Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR)*, 75(2): 213-267. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00045-10>

Parole chiave. *Lactobacillus helveticus*, Polifenoli, *Candida albicans*, Candidosi

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI DIFFERENTI OLI ESSENZIALI NEI CONFRONTI DI BATTERI E FUNGHI MULTI-RESISTENTI

D. Al Ismail^{1*}, M.C. Miele¹, M. De Angelis¹, E. D'Aliesio¹, C. Luceri¹, C.M. Mastroianni¹, R. Ragno², A. Oliva¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

*e.mail: dania.alismail@uniroma1.it

Introduzione. L'olio essenziale è una miscela di composti aromatici volatili estratti dalle piante. Molte piante producono oli essenziali con proprietà antimicrobiche, ovvero la capacità di uccidere o inibire la crescita di microrganismi patogeni come batteri, funghi e virus. Il recente aumento dei batteri multi-resistenti ai farmaci a livello globale richiede più opzioni preventive e terapeutiche rispetto ai farmaci convenzionali. Numerosi studi hanno analizzato l'attività antimicrobica degli oli essenziali (OE) e il loro potenziale utilizzo come terapie alternative o complementari agli agenti antimicrobici convenzionali. Gli oli essenziali sono risultati efficaci contro vari microrganismi, compresi i ceppi resistenti agli antibiotici, e possono essere utili nella prevenzione e nel trattamento delle infezioni. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'attività antimicrobica *in vitro* di diversi oli essenziali nei confronti di diversi microrganismi.

Materiali e Metodi. Diversi oli essenziali tra cui *Citrus limon*, *Canapa sativa*, *Verbenone*, *Eugenia caryophyllata*, *Salvia officinalis*, *Gaultheria procumbens*, *Eucalyptus globulus*, *Basilicum* spp. *Alpha-pinene*, *Citrus bergamia*, *Syzygium aromaticum*, *Thymus serpyllum albus*, *Cymbopogon martinii* e *Linalool* sono stati testati per la determinazione dell'attività antimicrobica,

in cui sono stati selezionati i seguenti microrganismi: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi (CR-Ab), *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CR-Kp), *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai carbapenemi (CR-Pa), *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina (MSSA) e *Candida albicans* (*C. albicans*). Gli OE sono stati inizialmente disciolti in acqua per ottenere una completa solubilizzazione. L'attività antimicrobica è stata valutata in termini di Concentrazione Minime Inibente (MIC) e Concentrazione Minime Battericida (MBC), mediante il metodo della macro-diluzione in brodo. La MIC è stata definita come la concentrazione più bassa di OE che ha inibito completamente la crescita visibile, mentre l'attività battericida è stata definita come riduzione $\geq 3\text{-log}_{10}$ CFU/mL della conta batterica iniziale dopo 24 ore di incubazione. L'inoculo finale utilizzato era $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL. Le concentrazioni sono state dal 5% allo 0,03% per gli OE.

Risultati. I valori di MIC e MBC sono riportati nella tabella 1, in cui 6/15 (40%) degli OE hanno mostrato inibire la crescita con un valore di MIC $\leq 0,03\%$ v/v contro CR-Ab, 6/15 (40%) contro *E. coli*, 4/15 (26,6%) contro CR-Kp, 1/15 (6,6%) contro CR-Pa, 3/15 (20%) contro MRSA, 7/15 (46,6%) contro *C. albicans*, 4/15 (26,6%) contro MSSA. L'olio essenziale di *Canapa sativa* ha dimostrato un'inibizione della crescita con un valore di MIC $> 5\%$ v/v contro tutti i microrganismi.

Discussione e Conclusioni. I nostri risultati mostrano che gli OE sono altamente efficaci e potrebbero svolgere un ruolo importante nel contrastare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza grazie alle sue proprietà antimicrobiche. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere completamente il loro potenziale come agenti antimicrobici e per valutare la loro efficacia in diversi contesti.

Parole chiave. Oli essenziali, Antimicrobico resistenza, Attività antibatterica, *Candida albicans*

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DEL “NON-ANTIBIOTICO” SERTRALINA IN SINERGIA CON OLI ESSENZIALI

A. Barbarossa¹, S. Sblano¹, A. Rosato¹, F. Corbo¹, M.L. Clodoveo², G. Fracchiolla¹, A. Carocci¹

¹Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Università di Bari “Aldo Moro”, Bari, Italia

²Dipartimento Interdisciplinare di Medicina, Scuola di Medicina, Università di Bari “Aldo Moro”, Bari, Italia
e.mail: alexia.barbarossa@uniba.it

Introduzione. Gli oli essenziali (OE) sono sostanze volatili e profumate, di consistenza oleosa, prodotte tipicamente dalle piante (1). Nel corso degli anni, essi sono stati ampiamente studiati per le loro proprietà farmacologiche, tra cui emergono quelle antimicotiche, antibatteriche ed antivirali. A causa dello scenario globale della resistenza agli antibiotici, negli ultimi anni la ricerca si è concentrata sull'esplorazione di nuovi approcci economici e specifici contro le patologie infettive. Sulla base di queste evidenze,

OE	MIC, MBC (% v/v olio essenziale)													
	<i>E. coli</i>		CR-Ab		CR-Kp		CR-Pa		MRSA		<i>C. albicans</i>		MSSA	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
CLOE	0.6	0.6	2.5	2.5	5	5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.7	2.5	1.25	2.5
CSOE	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
VOE	0.3	0.7	0.3	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	0.6	1.25	0.6	0.6	0.6	1.25
ECOE	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	≤ 0.03	0.07	≤ 0.03	0.1	≤ 0.03	0.07
SOOE	0.03	0.6	0.3	0.3	2.5	2.5	>5	>5	0.3	>2.5	0.3	2.5	0.3	2.5
GPOE	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	1.25	0.6	1.25	1.25	2.5	0.3	0.6	2.5	5
BOE	0.1	0.1	0.6	0.6	0.6	0.6	5	5	2.5	>5	0.1	0.3	5	>5
EGOE	0.6	0.6	0.1	0.1	1.25	2.5	0.6	1.25	0.6	1.25	0.07	0.1	0.6	1.25
APOE	0.3	0.6	0.1	0.3	1.25	1.25	>5	>5	1.25	2.5	≤ 0.03	≤ 0.03	1.25	2.5
CBOE	0.1	0.1	0.6	2.5	0.6	1.25	>5	>5	0.6	2.5	≤ 0.03	0.07	0.6	2.5
SAOE	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.3	0.3	0.1	0.3	≤ 0.03	0.1	0.1	0.3
TSAOE	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.03	≤ 0.03	0.07	≤ 0.03	0.03
SAOE	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.07	≤ 0.03	≤ 0.03	0.07	0.07	≤ 0.03	0.1	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.07
CMOE	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.07	≤ 0.03	≤ 0.03	0.07	0.07	0.07	0.1	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.1
LOE	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	1.25	0.07	0.07	0.1	0.3

OE: oli essenziali; MIC: Concentrazione Minime Inibente; MBC: Concentrazione Minime Battericida; *Citrus limon*: CLOE, *Canapa sativa*: CSOE, Verbenone: VOE, *Eugenia caryophyllata*: ECOE, *Salvia officinalis*: SOOE, *Gaultheria procumbens*: GPOE, *Eucalyptus globulus*: EGOE, *Basilicum*: BOE, Alpha-pinene: APOE, *Citrus bergamia*: CBOE, *Syzygium aromaticum*: SAOE, *Thymus serpyllum albus*: TSAOE, *Cymbopogon martinii*: CMOE, Linalool: LOE; *E. coli*: *Escherichia coli*; CR-Ab: *Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi; CR-Kp: *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi; CR-Pa: *Pseudomonas aeruginosa* resistente ai carbapenemi; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina; *C. albicans*: *Candida albicans* MSSA: *Staphylococcus aureus* sensibile alla meticillina.

Tabella 1. Attività antimicrobica [MIC/MBC (% v/v)] degli oli essenziali contro vari microrganismi

continuando il lavoro svolto in passato dal gruppo di ricerca, (2) lo scopo del presente studio è stato l'esplorazione degli effetti antimicrobici derivanti dalla sinergia tra alcuni oli essenziali (tra cui *Cinnamomum verum* L., *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*) e la sertralina, noto inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina, i cui effetti antibatterici ed antifungini sono stati esplorati con risultati incoraggianti. Inoltre, abbiamo valutato l'attività anti-biofilm di tali combinazioni sinergiche.

Materiali e Metodi. La composizione chimica degli oli essenziali è stata determinata mediante analisi GC/MS. Gli effetti *in vitro* delle summenzionate combinazioni sinergiche sono stati valutati attraverso la metodica del “checkerboard assay” nei confronti di un panel di ceppi fungini e batterici (sia gram-positivi che gram-negativi). La capacità delle combinazioni sinergiche di ridurre la formazione del biofilm è stata invece valutata mediante la metodica dell’“XTT”.

Risultati. I valori di *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) per l'associazione sono compresi nell'intervallo 0.08-0.43. Inoltre, il valore di MIC per la sertralina, quando usata in associazione, è diminuita anche di 30 volte rispetto al suo valore quando impiegata da sola.

Discussione. Gli interessanti risultati preliminari ottenuti hanno suggerito un effetto sinergico (valore di FICI < 0.5) della sertralina in combinazione con gli oli essenziali impiegati. In effetti, è evidente una riduzione significativa della concentrazione di sertralina quando utilizzata in combinazione con gli oli essenziali per tutti i ceppi testati. Il meccanismo d'azione è plausibilmente multifattoriale, derivando dalla presenza di composti attivi fondamentali negli oli essenziali che agiscono in associazione con la sertralina.

Conclusioni. Gli incoraggianti risultati ottenuti potrebbero rappresentare la base per una nuova e promettente strategia per il riposizionamento del noto farmaco antidepressivo e per lo sviluppo di combinazioni di farmaci e prodotti naturali sicuri per la cura delle infezioni causate da patogeni ormai resistenti alle convenzionali terapie.

Bibliografia

- (1) Bassolé I.H.N., Juliani H.R. (2012) - Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 2, 17(4): 3989-4006.
- (2) Rosato A., Catalano A., Carocci A., Carone A., Caggiano G., Franchini C., Corbo F., Montagna M.T. (2016) - *In vitro* interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. *Bioorganic Med. Chem.*, 24: 1002-1005.

Parole chiave. Oli essenziali, Antimicrobici, Sinergia, Sertralina, Drug repositioning, Biofilm

ABSTRACTS

“Premio SIROE Giovani Ricercatori”

SINERGIA TRA FLUCONAZOLO E OLI ESSENZIALI DI CINNAMOMUM ZEYLANICUM E DI CINNAMOMUM CASSIA VERSO ISOLATI DI CANDIDA AURIS.

R. Rosato¹, S. Garzoli², M. Mariotti¹, E. Napoli³, J. Gervasoni⁴, E. Ovidi⁵, G. Granata³, C. Geraci³, R. Torelli⁶, M. Cacaci¹, S. Rizzo¹, A. Urbani⁴, M. Sanguinetti^{1,6}, F. Bugli^{1,6}, M. Di Vito¹

¹Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

²Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

³Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Catania, Italia

⁴UOC Chimica, Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Fondazione Policlinico Universitario “A. Gemelli” IRCCS, Roma, Italia

⁵Università Della Tuscia, Viterbo, Italia

⁶Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario “A. Gemelli” IRCCS, Roma, Italia

e.mail: roberto.rosato@unicatt.it

Introduzione. *Candida auris* è un patogeno emergente particolarmente attenzionato a livello mondiale in quanto resistente ai principali farmaci antifungini. Viene spesso identificato dalle analisi di routine in maniera erronea, genera focolai tra pazienti ospedalizzati ed è resistente ai disinfettanti di utilizzo comune (1). In questo lavoro sono state messe a confronto le proprietà antifungine dell'olio essenziale (OE) di *Cinnamomum zeylanicum* (OE-CZ) e di *Cinnamomum cassia* (OE-CC) (2-3) verso *C. auris*.

Materiali e Metodi. Mediante la tecnica di micro-brodo diluizione sono state valutate le minime concentrazioni inibenti (MIC) degli oli essenziali di OE-CZ, OE-CC e di tre frazioni (FR1-2-3) ottenute a partire da OE-CZ nei confronti di 10 ceppi clinici di *C. auris* derivanti da emocolture. Mediante GC-MS associata a spazio di testa è stata valutata la qualità chimica dei due OE. La tossicità e l'efficacia di OE-CZ ed OE-CC sono state testate *in vivo* sul modello larvale di *Galleria mellonella*. Il metodo di titolazione a scacchiera è stato usato per valutare la sinergia tra OE-CZ o OE-CC con il fluconazolo.

Risultati. L'OE-CZ, la relativa frazione FR2 e l'OE-CC sono risultati efficaci (MIC₉₀^{OE-CZ/FR2}=0,06% v/v; MFC₉₀^{OE-CZ/FR2}=0,06% v/v e MIC₉₀^{OE-CC}=0,01% v/v; MFC₉₀^{OE-CC}=0,01% v/v). Tutti i ceppi di *C. auris* mostrano resistenza al fluconazolo (MIC>1024 µg/ml). Diversamente da CC-EO, solo OE-CZ e FR2 mostrano sinergia con il fluconazolo (FIC = 0,26 ± 0,14). Un confronto della composizione chimica tra OE-CZ, FR2 e OE-CC è stato utilizzato per indagare i potenziali principi attivi coinvolti nella sinergia individuando nei primi due la presenza aggiuntiva di cinnamil-acetato (5,5%). *In vivo*, nessuna concentrazione di OE-CZ o OE-CC testata è risultata tossica e l'efficacia migliore era data dalla sinergia individuata *in vitro* (fluconazolo 2,5 µg/mL + OE-CZ 0,002% v/v). **Discussione e Conclusioni.** I dati *in vitro* indicano l'efficacia antifungina di entrambi gli OE e della FR2 nei confronti di *C. auris*, ma individuano come sinergici con il fluconazolo il solo OE-CZ e FR2. I dati *in vivo* indicano la sicurezza d'uso delle concentrazioni testate e confermano l'azione

sinergica tra OE-CZ e fluconazolo. Lo studio del fitocomplesso dei due OE e di FR2 indica che la sinergia è probabilmente dovuta alla presenza di componenti come il cinnamil-acetato, che risulta assente nell'OE-CC. Se i futuri studi confermeranno quanto osservato, il principale componente del fitocomplesso (cinnamaldehyde) e il minore componente (cinnamil-acetato) sono responsabili rispettivamente dell'azione antimicotica e del comportamento sinergico con il fluconazolo e potranno essere sfruttati, da soli o nel fitocomplesso, per la lotta contro *C. auris*.

Bibliografia

(1) Pfaller M.A. (1995) - Epidemiology of candidiasis. *J. Hosp Infect.*, Suppl 30: 329-338.
(2) Du H., Bing J., Hu T., Ennis C.L., Nobile C.J., Huang G. (2020) - *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.*, 16(10):e1008921.

(3) Rosato R., Napoli E., Granata G., Di Vito M., Garzoli S., Geraci C., Rizzo S., Torelli R., Sanguinetti M., Bugli F. (2023) - Study of the chemical profile and anti-fungal activity against *Candida auris* of *Cinnamomum cassia* essential oil and of its nano-formulations based on polycaprolactone. *Plants*, 12(2): 358.

Parole chiave. *Candida auris*, *C. zeylanicum*, *C. cassia*, *Fluconazolo*

FORMULAZIONE A BASE DI OLI ESSENZIALI PER IL CONTROLLO MICROBICO AMBIENTALE

G. Lombardini^{1*}, M. Di Vito^{1*}, S. Garzoli², T. Spanu^{1,3}, M. Di Mercurio¹, M. Sanguinetti^{1,3}, F. Bugli^{1,3}

¹Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

²Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma Sapienza, Italia

³Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia

*Stesso contributo

e.mail: giulia.lombardini@unicatt.it

Introduzione. I microrganismi patogeni ambientali resistenti sono una delle maggiori minacce per la salute umana. L'efficacia antimicrobica degli oli essenziali (OEs) e delle loro componenti volatili risultano importanti per combattere l'antibiotico resistenza e migliorare il controllo microbico ambientale. L'obiettivo dello studio è quello di valutare l'efficacia di singoli OE e di un *mix* di questi per il controllo della crescita batterica, fungina e virale di ceppi ambientali nosocomiali.

Materiali e Metodi. 15 OEs sono stati testati contro tre ceppi batterici resistenti agli antibiotici (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), 6 ceppi fungini (*Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Candida auris*) e una tipologia di virus respiratorio presenti nell'aerosol (*Influenza virus*). Le Minime Concentrazioni Inibenti (MIC) e le Minime Concentrazioni Battericide (MBC) dei ceppi batterici e fungini sono state ottenute mediante test di micro-brodo diluizione in accordo con le linee guida EUCAST. Gli OEs più attivi sono stati utilizzati per formulare un *mix*, la cui efficacia antimicrobica delle componenti volatili è stata valutata utilizzando il

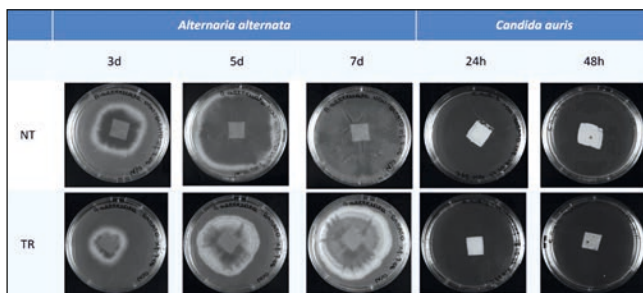


Figura 1. Modello di nebulizzazione confinata contro *Alternaria alternata* e *Candida auris*. NT: Campione non trattato, TR: Campione trattato. La figura mostra la crescita microbica dopo 3,5,7 (d) giorni, e 24, 48 (h) ore.

test di nebulizzazione in modelli di ambienti confinati. Partendo da una sospensione batterica (10^8 cfu/mL) e fungina (5×10^5 cfu/mL), la variazione di carica è stata valutata a seguito di due nebulizzazioni al minuto per 10 o 20 minuti in un ambiente confinato di $0,8 \text{ m}^3$. La qualità dell'aria è stata valutata mediante campionamento su tubi assorbenti, seguito da desorbimento termico e analisi GC-MS.

Risultati. Dopo una singola nebulizzazione i dati mostrano una riduzione batterica statisticamente significativa (tra 50% e 80%) dipendente dalla specie batterica, e un'inibizione tempo dipendente della crescita fungina (tra 77% e 95%) (Fig. 1). L'efficacia antivirale è in corso di valutazione con analisi di diminuzione di carica mediante test di micro-atmosfera. Le analisi non identificano concentrazioni di composti volatili dannosi per la salute umana.

Discussione e Conclusioni. I risultati indicano che il trattamento dell'aria mediante nebulizzazione del mix di OE è un possibile approccio green, in linea con l'approccio one health, generalmente sicuro per la salute, utile per il controllo della crescita di ceppi virali, funghi e batterici anche antibiotico resistenti.

Parole chiave. Oli essenziali, Antibiotico resistenza, Controllo microbico ambientale, Nebulizzazione

ANALISI DELLA RISPOSTA FISIOLÓGICA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* A CONCENTRAZIONI INCREMENTALI DI IDROLATO DI *THYMBRA CAPITATA* (L.) CAV. TRAMITE MICROARRAY FENOTIPICO E MICROSCOPIA CONFOCALE

F. Buccioni¹, C. Purgatorio¹, F. Maggio¹, S. Garzoli², C. Rossi¹, L. Valbonetti¹, A. Paparella¹, A. Serio¹

¹Dipartimento di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italia

²Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: fbuccioni@unite.it

Introduzione. L'incremento della resistenza microbica nei confronti di composti di sintesi ha rinnovato l'interesse della comunità scientifica nei confronti degli antimicrobici di origine naturale. Tra questi, gli idrolati (HY), composti secondari della produzione degli oli essenziali (OE), hanno dimostrato attività antimicrobica grazie al loro contenuto di composti bioattivi residui dal processo di distillazione.

Materiali e Metodi. Il presente studio (1) si pone dunque come obiettivo quello di investigare tale attività, tramite la pre-esposizione a 37°C per 1 ora di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a concentrazioni incrementali (250, 300, 350, 400, e 500 $\mu\text{l/ml}$) di idrolato di *Thymbra capitata* (L.) Cav. (THY). Per valutare la risposta fisiologica di *L. monocytogenes* ATCC 7644, sono state combinate la tecnica del 'microarray' fenotipico

(OmniLog[®], Biolog, Hayward, CA, USA) e la 'confocal laser scanning microscopy' (CLSM). I dati ottenuti tramite microarray fenotipico sono stati successivamente modellati attraverso l'equazione di Baranyi e Roberts (2).

Risultati. Grazie all'impiego della tecnica del microarray fenotipico sono state evidenziate differenze nelle dinamiche di sviluppo di *L. monocytogenes* ATCC 7644 in relazione alla tipologia di substrato presente e al trattamento con THY. La pre-esposizione delle cellule a 400 $\mu\text{l/ml}$ di THY ha causato un'estensione della fase lag (fino a 31,43 h) in presenza di 80,0 mg/ml di NaCl e una riduzione del valore massimo di UFC/ml (fino a $-76,67$ Unità OmniLog) dopo esposizione a 250 $\mu\text{l/ml}$ di THY a pH 6,0. La crescita cellulare risultava completamente inibita alla concentrazione di 500 $\mu\text{l/ml}$ di THY (Tab. 1). Risultati interessanti sono stati osservati tramite CLSM, dove l'acquisizione delle immagini ha mostrato l'aggregazione delle cellule di *L. monocytogenes* ATCC 7644 in risposta allo stress causato dal THY (Fig. 1).

Discussione. I risultati ottenuti in questo studio *in vitro* suggeriscono una buona attività inibente del THY nei confronti di *L. monocytogenes*, con una condizione di stress persistente anche dopo la rimozione dello stesso.

Conclusioni. È possibile ipotizzare l'applicazione di THY per il controllo di *L. monocytogenes* sia negli ambienti di lavorazione degli alimenti, sia negli alimenti stessi.

Bibliografia

- (1) Buccioni F., Purgatorio C., Maggio F., Garzoli S., Rossi C., Valbonetti L., Paparella A., Serio A. (2022) - Unraveling the antimicrobial effectiveness of *Coridothymus capitatus* hydrolyte against *Listeria monocytogenes* in environmental conditions encountered in foods: an *in vitro* study. *Microorganisms*, 10(5): 920.
(2) Baranyi J., Roberts T.A. (1994) - A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 277-294.

Parole chiave. *Listeria monocytogenes*, Idrolato, Microarray fenotipico, CLSM

Substrato	THY ($\mu\text{l/ml}$)	Fase lag (ore)	μ_{max} (Unità OmniLog)	R ²	Errore Standard
80 mg/ml NaCl	0	2,03±0,20	19,03±0,59	0,998	2,62
80 mg/ml NaCl	250	-	11,26±0,39	0,991	4,90
80 mg/ml NaCl	300	11,77±0,77	11,62±1,07	0,940	11,11
80 mg/ml NaCl	350	30,72±0,47	16,25±1,73	0,980	8,17
80 mg/ml NaCl	400	33,46±0,20	16,50±0,80	0,995	3,55
80 mg/ml NaCl	500	-	-	-	-
pH 6,0	0	4,78±0,21	56,60±6,56	0,990	7,23
pH 6,0	250	8,24±0,29	44,58±6,58	0,983	9,08
pH 6,0	300	17,16±0,24	45,93±5,84	0,982	7,97
pH 6,0	350	22,69±0,18	81,56±13,86	0,981	8,76
pH 6,0	400	35,45±1,18	4,98±0,48	0,876	9,71
pH 6,0	500	-	-	-	-

Tabella 1. Parametri di crescita di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 esposta a un pre-trattamento a 37°C di 1 ora a concentrazioni crescenti di idrolato di *Thymbra capitata* (L.) Cav. (THY), in presenza di NaCl 80 mg/ml o pH 6,0. I risultati sono stati ottenuti tramite modellazione con l'equazione di Baranyi e Roberts. La tabella indica: substrato, estensione della fase lag (ore), valore massimo di crescita raggiunto (Unità Omni-Log), R², ed Errore Standard.

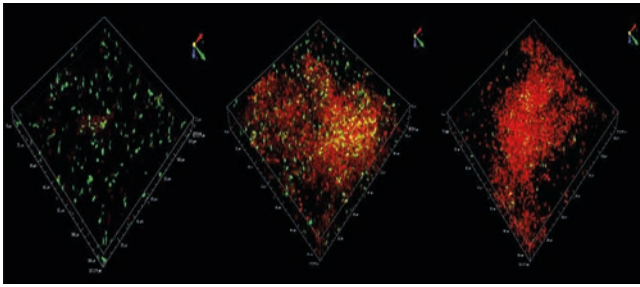


Figura 1. Aggregazione cellulare di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 esposta a un pretrattamento a 37 °C per 1 ora con 250 µl/ml, 350 µl/ml, e 500 µl/ml di idrolato di *Thymbra capitata* (L.) Cav. (THY).

EFFICACIA E MECCANISMI D'AZIONE DEI VAPORI DI OLI ESSENZIALI CONTRO LA MUFFA BLU CAUSATA DA *PENICILLIUM EXPANSUM* SULLE MELE IN CONSERVAZIONE

F. Buonsenso, G. Remolif, G. Schiavon, D. Spadaro

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari – DISAFA e AGROINNOVA – Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agro-ambientale, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (Torino), Italia
e.mail: fabio.buonsenso@unito.it

Introduzione. Le malattie post-raccolta delle mele, come il marciume verde-azzurro causato da *Penicillium expansum*, rappresentano un notevole ostacolo al consumo sicuro di questi alimenti, con conseguenti danni economici e rischi per la salute umana (1). Di rilevante interesse è lo sviluppo di mezzi di lotta alternativi all'uso di prodotti di sintesi come gli agrofarmaci. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia di sei oli essenziali (OE) (*Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Satureja montana*, *Thymus vulgaris*, *Citrus limon* e *Foeniculum vulgare dulce*), applicati mediante biofumigazione, nella lotta al marciume verde-azzurro su mele 'Opal' in post-raccolta (2). Un ulteriore obiettivo è stato quello di analizzare i principali componenti degli OE attraverso il campionamento dei composti organici volatili (VOCs) durante due mesi di conservazione in *cabinet*, in condizioni controllate, utilizzando la microestrazione in fase solida e un sistema di gascromatografia accoppiato a spettrometria di massa (SPME-GC-MS).

Materiali e Metodi. Per verificare la potenziale attività antifungina degli OE, è stata inizialmente allestita una prova *in vitro*. Gli OE sono stati saggiati alle concentrazioni di 1,0%, 0,5% and 0,1%, attraverso la metodica del *sandwich plate*, per verificare la capacità di inibizione della crescita di due differenti ceppi di *P. expansum* (PEN2 e PEN3) isolati da mela. Successivamente sono state allestite prove *in vivo* in cui mele 'Opal' sono state inoculate con la sospensione conidica dei due ceppi di *P. expansum* e trattate con i diversi OE tramite biofumigazione, utilizzando diffusori a lento rilascio. L'incidenza della malattia è stata valutata utilizzando gli OE all'1,0% di concentrazione. I rilievi fitopatologici sono stati eseguiti dopo 60 giorni di conservazione all'interno di *cabinet* in celle refrigerate a 1±1 °C e 95% di umidità relativa e dopo 14 giorni di shelf-life a 15±1 °C. Sono state effettuate le analisi qualitative (durezza, solidi solubili totali e acidità titolabile) alla raccolta, al termine della conservazione e della shelf-life. La gravità della malattia è stata valutata utilizzando gli OE alle concentrazioni dell'1,0% e dello 0,5%. Sulle mele è stata praticata una ferita di circa 2 mm in cui è stata inoculata la sospensione conidica di *P. expansum*. Il diametro dei marciumi sviluppati è stato misurato dopo 28 e 43 giorni di conservazione a 1 ± 1 °C e dopo 7 giorni di shelf-life a 15 ± 1 °C. Gli OE utilizzati sono stati caratterizzati tramite GC-MS per analizzarne le composizioni. È stata eseguita la caratterizzazione dei VOCs rilasciati dagli OE all'interno dei cabinet utilizzando la tecnica SPME-GC-MS, al fine di correlare l'attività antifungina a specifiche molecole volatili.

Risultati. Gli OE di timo, santoreggia e origano a tutte le concentrazioni saggiate, e basilico, all'1,0% e allo 0,5%, si sono dimostrati efficaci nell'inibire la crescita di *P. expansum in vitro*. Negli esperimenti *in vivo* la massima efficacia nella riduzione della muffa blu è stata osservata con OE di limone e origano all'1,0% dopo 60 giorni di conservazione a 1±1 °C (incidenza del marciume, 3 e 1% rispettivamente) e dopo ulteriori 14 giorni di shelf-life a 15±1 °C (15 e 17%). Durante il periodo di conservazione non sono stati osservati effetti fitotossici. I vapori di OE di santoreggia, origano, timo e basilico hanno dimostrato *in vitro* un'elevata attività antimicotica nei confronti di *P. expansum* anche a basse concentrazioni. Su mele inoculate con *P. expansum*, l'OE di santoreggia si è rivelato il più efficace nel ridurre la gravità del marciume indotto dal fungo. L'OE di basilico, invece, ha fornito i risultati meno soddisfacenti, nonostante la capacità di inibizione dimostrata *in vitro*.

Discussione. Questi risultati evidenziano che l'azione antiossidante dei componenti degli OE gioca un ruolo centrale nel determinarne l'efficacia. È possibile ipotizzare che l'attività antimicotica degli OE non sia legata all'attività di una singola molecola ma all'azione sinergica di due o più composti. Diverse molecole possono agire sia attraverso l'inibizione diretta della crescita fungina sia attraverso un'azione antiossidante indiretta.

Conclusioni. Poiché i vapori di OE non hanno influito sulla qualità del frutto, ovvero durezza, acidità titolabile e solidi solubili totali, in un contesto di riduzione dell'uso di agrofarmaci, il loro utilizzo può rappresentare una valida alternativa per la lotta alle malattie post-raccolta dei prodotti ortofrutticoli.

Bibliografia

- (1) Schiavon G., Garelo M., Prence S., Meloni G.R., Buonsenso F., Spadaro D. (2023) - Essential oils reduce grey mould rot of apples and modify the fruit microbiome during postharvest storage. *J. Fungi*, 9: 22.
- (2) Buonsenso F., Schiavon G., Spadaro D. (2023) - Efficacy and mechanisms of action of essential oils' vapours against blue mould on apples caused by *Penicillium expansum*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24: 2900.

Parole chiave. Biofumigazione, Composti antifungini naturali, Malattie post-raccolta, Agricoltura sostenibile

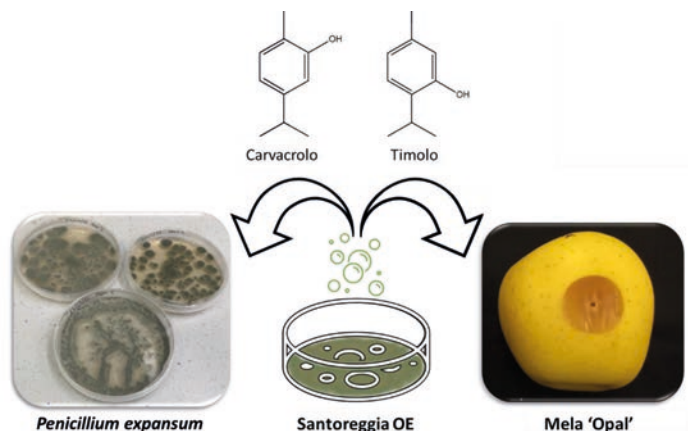


Figura 1. Azione degli oli essenziali mediante biofumigazione.

STUDIO DEL POTENZIALE ERBICIDA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *SERIPHIDIUM CAERULESCENS* SUBSP. *GALLICUM* (WILLD.) SOJÁK

N. Torres-Pagán^{1,2}, N. Melero¹, A. Blázquez³, H. Boira¹,
A. Sánchez-Moreiras⁴, A. Carrubba², M. Verdeguer¹

¹Universitat Politècnica de València, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Valencia, Spagna

²Università degli Studi di Palermo, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Palermo, Italia

³Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, València, Spagna

⁴Departamento de Biología vegetal e ciencias do solo, Universidad de Vigo, Vigo, Spagna
e.mail: natorpa@upv.es

Introduzione. *Seriphidium caerulescens* subsp. *gallicum* (Willd.) Soják (sinonimo *Artemisia gallica* Willd.) è una specie mediterranea originaria della Francia (1) ed endemica dell'Europa meridionale (2). *A. gallica* è una specie alofila tipica degli ambienti caratterizzati da praterie saline e terreni soggetti ad inondazioni. In questo lavoro si è studiato, *in vitro*, il potenziale erbicida dell'olio essenziale di *S. caerulescens* sulla germinazione di cinque specie infestanti di rilevanza tra le culture mediterranee.

Materiali e Metodi. L'olio essenziale (OE) di *S. caerulescens* subsp. *gallicum* (Willd.) Soják è stato ottenuto per idrodistillazione delle parti aeree di piante raccolte tra gennaio 2007 e giugno 2009 nelle paludi di Puzol e Torreblanca (provincia di València e Castellón, rispettivamente, Spagna). La composizione dell'OE è stata ottenuta mediante gascromatografia e gascromatografia-spettrometria di massa. Il potenziale erbicida dell'OE di *A. gallica* è stato provato sui semi di *Amaranthus hybridus* L., *Portulaca oleracea* L., *Chenopodium album* L., *Erigeron canadensis* L. e *Parietaria judaica* L. Per i test, 20 semi di ogni specie sono stati messi in piastre Petri di 9 cm di diametro (5 piastre per trattamento) e trattati con 4 mL di acqua distillata (controllo) o con le corrispondenti dosi dell'OE: 0,125; 0,25; 0,5 e 1 µL/mL, rispettivamente. Per valutare la germinazione dei semi, sono stati fatti i conti 3,5,7,10 e 14 giorni dopo il trattamento. Ai risultati ottenuti è stata applicata un'analisi della varianza ANOVA, utilizzando il test di confronto multiplo di Fisher (LSD, *Least Significant Difference*) per la separazione delle medie, con un livello di confidenza del 95% ($P \leq 0,05$).

Risultati. *A. gallica* produce un OE ricco di monoterpeni ossigenati (24 composti, 79,38% della sua composizione), compresi i componenti principali: crisantenone (40,03%), fillofolone (18,11%) e canfora (14,23%). I sesquiterpeni ossigenati costituiscono la seconda frazione più abbondante (3 composti identificati, 4,51%), seguiti dai monoterpeni idrocarburici (8 composti individuati, 3,65%). L'OE di *A. gallica* ha dimostrato una grande attività erbicida su *A. hybridus* e *P. judaica*, in quanto ha inibito completamente la germinazione di entrambe le specie a tutte le concentrazioni applicate (Tab. 1). In *E. canadensis* l'OE ha limitato fortemente la germinazione a tutte le concentrazioni testate, bloccando completamente la germinazione alla dose di 0,250 µL/mL. In *P. oleracea* ha ridotto significativamente la germinazione solo alle due concentrazioni più alte, raggiungendo una riduzione massima del 57,6% alla concentrazione di 1 µL/mL. Infine, non ha mostrato alcun effetto significativo sulla germinazione di *C. album*.

Discussione e Conclusioni. Gli effetti fitotossici dell'OE di *A. gallica*

sono stati maggiori rispetto a quelli del suo estratto acquoso (3). L'OE di *A. gallica* ha mostrato una attività erbicida selettiva, essendo completamente inibente per alcune specie e non avendo alcun effetto su altre.

Bibliografia

- (1) Viehoveer A., Copen R.G. (1923) - New sources of Santonin. Journal of the American Chemical Society, 45: 1941-1944.
- (2) Ladero M., Navarro F., Valle C.J. (1984) - Contribución al conocimiento de la flora halófila de la depresión del Duero. Studia Botanica, 3: 263-266.
- (3) Verdeguer Sancho M.M., Blázquez M.A., Boira Tortajada H. (2018) - Phytotoxic potential of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eriocephalus africanus*, *Cistus ladanifer* and *Artemisia gallica* aqueous extracts to control weeds. Journal of Allelochemical Interactions, 4(2): 17-26.

Parole chiave. Oli essenziali, *Artemisia gallica*, *Bioerbicida*, *Prodotti naturali*

Concentrazione (µL/mL)	Germinazione (%) ± e.s.				
	<i>Amaranthus hybridus</i>	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Chenopodium album</i>	<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Parietaria judaica</i>
0 (controllo)	96,0 ± 2,9 a	99,0 ± 1,00 a	42,0 ± 6,0 a	95,0 ± 3,2 a	27,0 ± 4,1 a
0,125	0,0 ± 0,0 b	88,0 ± 3,4 ab	27,0 ± 4,9 a	3,0 ± 2,0 b	0,0 ± 0,0 b
0,250	0,0 ± 0,0 b	84,0 ± 5,3 ab	36,0 ± 3,3 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
0,5	0,0 ± 0,0 b	74,0 ± 3,7 b	28,8 ± 5,5 a	1,0 ± 1,0 b	0,0 ± 0,0 b
1	0,0 ± 0,0 b	42,0 ± 16,9 c	26,0 ± 4,0 a	1,0 ± 1,0 b	0,0 ± 0,0 b

Lettere diverse nella stessa colonna indicano differenze significative fra i trattamenti

Tabella 1. Germinazione di semi di *Amaranthus hybridus*, *Portulaca oleracea*, *Chenopodium album*, *Erigeron canadensis* e *Parietaria judaica* trattati con olio essenziale di *Artemisia gallica*.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL VOLATILES AGAINST *BOTRYTIS CINEREA* AND *MONILINIA* SPP.

S. Álvarez-García^{1,2}, M. Mounni², G. Romanazzi²

¹Engineering and Agricultural Sciences Department, Universidad de León, León, Spain

²Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Marche Polytechnic University, Ancona, Italy
e.mail: salvg@unileon.es

Introduction. Gray mold and brown rot are important postharvest fungal diseases that generate significant losses during the storage of vegetables and fruits. They are caused respectively by *Botrytis cinerea*, a ubiquitous phytopathogen with a wide range of host plants, and *Monilinia* spp., one of the most common fungal pathogens affecting stone and pome fruits. These plant diseases result in significant yield losses, postharvest product waste, and reduced shelf life (1). Currently, there is a shift towards more sustainable strategies for the control of postharvest diseases, such as the use of secondary metabolites and plant extracts (2), including the application of volatile organic compounds (VOCs).

Materials and Methods. The present study analyzes the antifungal activity produced on *B. cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, and *Monilinia laxa* by VOCs emitted from essential oils (EOs) of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula officinalis*, *Lavandula hybrida*, *Citrus bergamia*, *Rosmarinus officinalis*, and *Cinnamomum zeylanicum*. The experiments were performed using non-vented VOC Chambers (3) (Fig. 1), where the EOs were placed on a glass slide in the lower dish and the fungal colonies were inoculated on PDA (potato dextrose agar) in the upper dish. Several

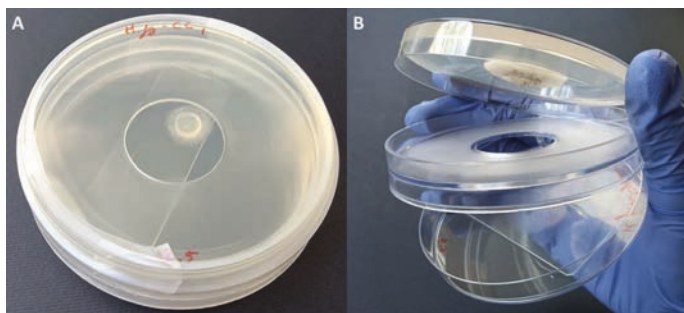


Figure 1. A) Closed and sealed VOC chamber with EO on a glass slide in the lower plate, central piece holding both plates together, and fungal colony on the upper plate. B) Open VOC chamber with EO in the lower plate, central piece, and *Monilinia fructigena* growing on PDA in the upper one.

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI OLI ESSENZIALI CONTRO CEPPI DI *BACILLUS* SPP. E MODIFICA DELL'ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI NELLA RISPOSTA ALLO STRESS

C. Purgatorio¹, F. Anniballi², C. Scalfaro², A. Serio¹, A. Paparella¹

¹Dipartimento di Bioscienze e Tecnologie Agro-alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italia

²Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia
e.mail: cpurgatorio@unite.it

EO doses were tested and the minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated as the lower concentration (in $\mu\text{L/L}$ of air) by which a given EO produced complete growth inhibition on each fungal strain.

Results. Results demonstrate that the tested EOs produce a dose-dependent inhibitory activity on fungal growth. *O. vulgare*, *T. vulgaris*, and *T. serpyllum* EOs presented the lowest MICs (5.64 to 45.45 $\mu\text{L/L}$ of air), while *C. bergamia* and *R. officinalis* EOs presented the highest ones, with MICs from 181.82 to 363.64 $\mu\text{L/L}$. Regarding the fungal pathogens, *B. cinerea* was overall less sensitive to EO VOCs than the *Monilinia* spp., usually presenting higher MICs. Only *C. zeylanicum* EO presented higher MIC on *M. fructicola* and *M. laxa* than on *B. cinerea*.

Discussion. These results are in accordance with previous studies that reported lower sensitivity of *B. cinerea* to volatile Eos than *M. fructicola* (4) and *M. laxa* (5). The high antifungal activity of *O. vulgare*, *T. vulgaris*, and *T. serpyllum* Eos has been largely reported and it is related to their significant levels of carvacrol and thymol (5,6). To the best of our knowledge, there are no previous reports on the antifungal activity of EO VOCs on *M. fructigena*.

Conclusions. The present study corroborates that EOs in volatile phase produce dose-dependent antifungal activity on *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa*. *O. vulgare*, *T. vulgaris*, and *T. serpyllum* EOs, which presented lower MICs, could be potentially useful for the postharvest control of gray mold and brown rot. *C. zeylanicum* EO could be of use for the specific control of *B. cinerea*. Additional assays, including phytotoxicity assessment, should be conducted to validate these results *in vivo*.

Bibliography

- (1) Romanazzi G., Smilanick J.L., Feliziani E., Droby S. (2016) - Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technol.*, 113: 69-76.
- (2) Romanazzi G., Orçonneau Y., Moumni M., Davillerd Y., Marchand P.A. (2022) - Basic substances, a sustainable tool to complement and eventually replace synthetic pesticides in the management of pre and postharvest diseases: reviewed instructions for users. *Molecules*, 27(11): 3484.
- (3) Álvarez-García S., Mayo-Prieto S., Carro-Huerta G., Rodríguez-González Á., González-López Ó., Gutiérrez S., Casquero P.A. (2021) - Volatile organic compound chamber: a novel technology for microbiological volatile interaction assays. *Journal of Fungi*, 7(4): 248.
- (4) Santoro K., Maghenzani M., Chiabrando V., Bosio P., Gullino M.L., Spadaro D., Giacalone G. (2018) - Thyme and savory essential oil vapor treatments control brown rot and improve the storage quality of peaches and nectarines but could favor gray mold. *Foods*, 7: 1-17.
- (5) Pinto L., Bonifacio M.A., De Gigli E., Cometa S., Logrieco A.F., Baruzzi F. (2020) - Unravelling the antifungal effect of red thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) compounds in vapor phase. *Molecules*, 25: 1-16.
- (6) Buonsenso F., Schiavon G., Spadaro D. (2023) - Efficacy and mechanisms of action of essential oils' vapours against blue mould on apples caused by *Penicillium expansum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3): 2900.

Keywords. Brown rot, Cinnamon, Fumigation, Gray mold, Lavender, Oregano, Rosemary, Tea tree, Thyme, VOC Chamber

Introduzione. *Bacillus* spp. comprende specie alteranti e patogene, che possono costituire un pericolo per la qualità e per la sicurezza degli alimenti. Questo lavoro mira a valutare gli effetti del trattamento con oli essenziali (OE) in ceppi di *Bacillus* spp. isolati da gnocchi "ambient", stabili a temperatura ambiente. Tale trattamento rappresenta un evento stressante per la cellula che, a seconda della concentrazione e del tipo di OE applicato, può andare incontro a morte o subire danni, modificando l'espressione di specifici geni.

Materiali e Metodi. Sei OE (*Thymus vulgaris* chemiotipo timolo, *Thymus vulgaris* chemiotipo *p*-cimene e timolo, *Thymbra capitata* chemiotipo carvacrolo, *Origanum vulgare* chemiotipo carvacrolo, *Syzygium aromaticum* chemiotipo eugenolo e *Ocimum basilicum* chemiotipo linalolo) sono stati saggiati contro 25 ceppi di *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. paranthracis*) isolati da gnocchi "ambient". La ricerca delle Minime Concentrazioni Inibenti (MIC) e Battericide (MBC) (1) e della Concentrazione Inibitoria Frazionaria (FIC) attraverso il metodo *Checkerboard* sono stati utilizzati per valutarne l'attività in singolo o combinata. L'espressione genica è stata valutata attraverso Real-time RT-PCR quantitativa.

Risultati. Gli OE di *T. vulgaris* (timolo), *T. capitata* e *O. vulgare* sono risultati i più attivi, con MIC a 48 ore e MBC tra 0,31-1,25 $\mu\text{L/mL}$ (Fig. 1), e hanno mostrato azione commutativa se combinati a OE di *S. aromaticum*. I ceppi di *B. subtilis* sono stati leggermente più sensibili rispetto alle altre specie. L'esposizione di ceppi di *B. subtilis* e *B. cereus* a concentrazioni subletali di OE di *T. vulgaris* (timolo), uno tra i più attivi, ha aumentato l'espressione di geni coinvolti nell'integrità di membrana e nel *quorum sensing* a partire da 6-12 ore di esposizione. I geni maggiormente sovra-espressi sono stati diversi per le due specie (*pbpF* per *B. subtilis* e *plcR* per *B. cereus*).

Discussione e Conclusioni. In generale, gli OE con chemiotipo timolo e carvacrolo sono risultati i più attivi, anche in combinazione con OE di *S. aromaticum* ma non con OE di *O. basilicum*. L'esposizione a OE di timo ha prodotto un evento stressante con aumento della fase lag dei microrganismi, che in questo modo tentano di riparare i danni alla membrana e di restaurare i meccanismi di comunicazione fondamentali per la sopravvivenza. In conclusione, gli OE di *T. vulgaris* (timolo), *T. capitata* e *O. vulgare* potrebbero essere utili per applicazioni alimentari contro *Bacillus* spp., anche in combinazione con OE meno attivi.

Bibliografia

- (1) CLSI (2016) - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th Edn, Wayne, PA: CLSI.

Parole chiave. Oli essenziali, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Espressione genica*

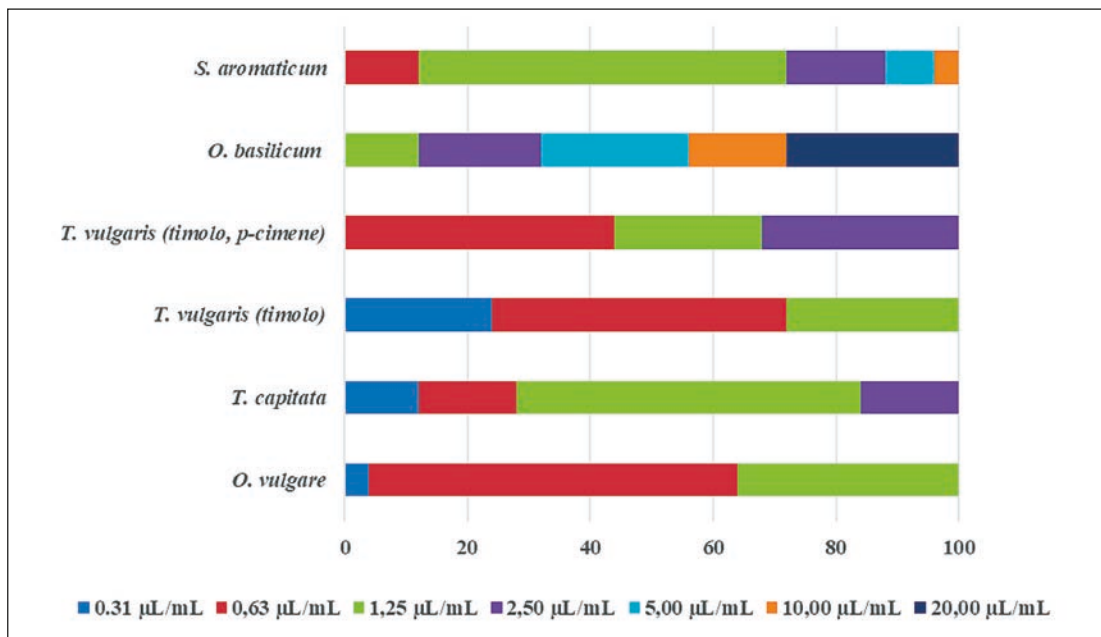


Figura 1. Valori di MIC a 48 ore per i sei oli essenziali saggiati, in termini percentuali.

COMPOSIZIONE CHIMICA E ATTIVITÀ ANTIBIOFILM DELL'OLIO ESSENZIALE DI ALCUNE ACCESSIONI DI *ALLIUM SATIVUM* E *A. AMPELOPRASUM*

F. Polito¹, V. De Feo^{1,2}, F. Nazzaro², F. Fratianni², V. Candido³

¹Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano, Salerno, Italia

²Istituto di Scienze dell'Alimentazione, CNR-ISA, Avellino, Italia

³Dipartimento delle Culture Europee e del Mediterraneo: Architettura, Ambiente e Patrimoni Culturali, Matera, Italia
e.mail: fpolito@unisa.it

Introduzione. Batteri patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* sono capaci di organizzarsi in biofilms, sistemi complessi, organizzati ed evoluti di cellule che si adattano a condizioni ambientali avverse e sopravvivono in ambienti ostili. Si manifestano spesso in fenotipi mostranti resistenza multipla ai farmaci (MDR) e si rivelano difficilmente eradicabili con le convenzionali terapie antibiotiche. Sono coinvolti in un'ampia gamma di patologie e costituiscono un grave problema per l'industria alimentare in quanto possono contaminare tutte le fasi della produzione. A molte specie del genere *Allium* sono state riconosciute da secoli proprietà antibatteriche e l'utilizzo di oli essenziali (OE) ottenuti da piante di questo genere può quindi rivelarsi utile nel trattamento dei casi più problematici.

Materiali e Metodi. Sono stati ottenuti OE tramite idrodistillazione di parti aeree e bulbi di due accessioni di *Allium ampeloprasum* e quattro di *A. sativum* coltivate in territorio campano.

La loro composizione è stata determinata tramite metodiche di gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). Si è valutata l'attività battericida su biofilm già formato tramite test al bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e la capacità di inibire la formazione di nuovo biofilm tramite saggio al cristalvioletto (CV).

Risultati. Gli OE presentano composizione differente, confermando tuttavia la presenza di allicina e composti solforati come composti

AQUAMARIS

elixir

...naturale
effetto
detossificante

Con Tarassaco, Betulla e Gramigna
che favoriscono il drenaggio
dei liquidi corporei
e le funzioni depurative dell'organismo.

SARANDREA
FITOTERAPIA

Sarandrea,
da 100 anni
una storia
naturale.

www.sarandrea.it

COLLEPARDO (FR)
Via D'Alatri, 3/b
Tel. 0775.47012
Fax 0775.47351

<i>Allium ampeloprasum</i> OE	Composti principali	%	Composti principali letteratura
'Irsina' (parti aeree)	Allicina	57,3	Allicina
	Diallil disolfuro	15,2	Diallil disolfuro
	Diallil disolfuro	42,5	Dipropil disolfuro
	Allicina	29,8	Diallil trisolfuro
'Freda' (parti aeree)	Allicina	53,1	Dipropil trisolfuro
	Propil allil disolfuro	34,4	
'Freda' (bulbi)	Propil allil disolfuro	14,7	
	Allicina	8,6	
<i>Allium sativum</i> OE	Composti principali	%	Composti principali letteratura
'Veneto bianco' (parti aeree)	Allicina	17,5	Allicina
	Propil allil disolfuro	11,2	Dimetil disolfuro
'Veneto bianco' (bulbi)	Allicina	50,9	Diallil disolfuro
	Diallil disolfuro	27,8	Allil metil disolfuro
'Rosso di Sulmona' (parti aeree)	Allicina	36,8	Propil allil disolfuro
	Propil allil disolfuro	30,6	Metil propenil disolfuro
'Rosso di Sulmona' (bulbi)	Allicina	61,8	Diallil trisolfuro
	Diallil disolfuro	34,5	
'Rosso Spagna' (parti aeree)	Diallil disolfuro	48,5	
	Allicina	21,1	
'Rosso Spagna' (bulbi)	Allicina	52,9	
	Diallil disolfuro	12,6	
'Staravec' (parti aeree)	Diallil tetrasolfuro	11,4	
	Propil allil disolfuro	10,1	
'Staravec' (bulbi)	Allicina	62,2	
	Diallil disolfuro	16,4	

Tabella 1. Componenti maggioritari degli oli essenziali di *Allium sativum* e di *Allium ampeloprasum* e confronto con la letteratura.

Oli essenziali	A. b.	E. c.	L. m.	S. a.
Aa 'Irsina', pa10 µl/ml	47.18 ± 1.59	0 ± 0	1.23 ± 0.179	0 ± 0
Aa 'Irsina', pa 20 µl/ml	72.68 ± 1.42	22.58 ± 0.93	79.85 ± 1.05	57.97 ± 1.11
Aa 'Irsina', b 10 µl/ml	7.35 ± 1.73	18.82 ± 3.08	52.58 ± 1.25	41.96 ± 1.15
Aa 'Irsina', b 20 µl/ml	52.83 ± 1.14	45.95 ± 0.81	63.24 ± 1.72	50.17 ± 0.82
Aa 'Freda', pa 10 µl/ml	0 ± 0	47.55 ± 3.51	0 ± 0	50.54 ± 0.71
Aa 'Freda', pa 20 µl/ml	45.86 ± 1.31	81.88 ± 1.21	0 ± 0	73.47 ± 1.91
Aa 'Freda', b 10 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	20.65 ± 3.2	11.11 ± 1.8
Aa 'Freda', b 20 µl/ml	0 ± 0	25.39 ± 1.28	40.69 ± 1.57	61.41 ± 1.61
As 'Veneto bianco' pa 10 µl/ml	0 ± 0	17.63 ± 1.77	47.23 ± 0.84	0 ± 0
As 'Veneto bianco' pa 20 µl/ml	25.18 ± 3.79	50.52 ± 1.61	60.55 ± 1.30	16.70 ± 1.14
As 'Veneto bianco' b 10 µl/ml	18.59 ± 2.50	40.31 ± 1.46	59.18 ± 0.54	49.69 ± 1.19
As 'Veneto bianco' b 20 µl/ml	57.34 ± 1.34	48.90 ± 1.97	64.29 ± 1.77	63.18 ± 1.15
As 'Rosso di Sulmona' pa 10 µl/ml	0 ± 0	12.21 ± 1.91	46.06 ± 1.83	25.52 ± 1.59
As 'Rosso di Sulmona' pa 20 µl/ml	61.76 ± 3.17	36.31 ± 1.47	64.11 ± 0.74	33.48 ± 2.16
As 'Rosso di Sulmona' b 10 µl/ml	12.25 ± 2.35	24.73 ± 1.76	37.60 ± 1.40	0 ± 0
As 'Rosso di Sulmona' b 20 µl/ml	48.55 ± 1.52	41.20 ± 3.37	42.03 ± 0.54	1.12 ± 0.13
As 'Rosso di Spagna' pa 10 µl/ml	46.08 ± 2.56	41.56 ± 3.34	40.98 ± 4.32	9.47 ± 0.67
As 'Rosso di Spagna' pa 20 µl/ml	49.91 ± 2.75	54.09 ± 1.77	46.88 ± 0.71	44.39 ± 1.44
As 'Rosso di Spagna' b 10 µl/ml	26.62 ± 3.02	0 ± 0	44.84 ± 4.64	15.25 ± 0.38
As 'Rosso di Spagna' b 20 µl/ml	56.97 ± 1.73	27.16 ± 1.66	61.22 ± 2.09	70.29 ± 0.14
As 'Staravec' pa 10 µl/ml	18.09 ± 0.34	5.06 ± 0.16	0 ± 0	11.25 ± 1.4
As 'Staravec' pa 20 µl/ml	45.61 ± 0.16	27.56 ± 0.12	0 ± 0	26.31 ± (0.9)
As 'Staravec' b 10 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
As 'Staravec' b 20 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

La percentuale di inibizione è stata calcolata rispetto al controllo, assumendo per questo una inibizione = 0. Aa = *Allium ampeloprasum*; As = *Allium sativum*; pa = parti aeree; b = bulbo. A. b. = *Acinobacter baumannii*; E. c. = *Escherichia coli*; L. m. = *Listeria monocytogenes*; S. a. = *Staphylococcus aureus*.

Tabella 3. Inibizione percentuale 3 SD degli OE di *Allium sativum* e di *Allium ampeloprasum* sulla formazione di nuovo biofilm batterico, valutata tramite test CV.

principali e più caratteristici (Tab. 1). Gli OE da *A. sativum* hanno mostrato un maggior numero di componenti rispetto agli OE di *A. ampeloprasum* che hanno presentato differenze nella composizione tra bulbi e foglie della stessa accessione. Gli OE, testati a due concentrazioni e seppur con intensità differenti, hanno mostrato attività sia contro biofilm già formato sia contro formazione di un nuovo biofilm. Le attività più rilevanti sono state mostrate dagli oli essenziali ottenuti da *A. ampeloprasum* 'Freda' e da quelli ottenuti dalle parti aeree di *A. ampeloprasum* 'Irsina' e *A. sativum* 'Rosso di Sulmona' e 'Rosso di Spagna' con percentuali di inibizione che in molti casi hanno superato il 70% in entrambi i saggi utilizzati (Tab. 2 e 3).

Oli essenziali	A. b.	E. c.	L. m.	S. a.
Aa 'Irsina', pa10 µl/ml	0 ± 0	18.26 ± 1.52	0 ± 0	0 ± 0
Aa 'Irsina', pa 20 µl/ml	30.13 ± 0.28	71.08 ± 2.47	31.43 ± 0.31	55.99 ± 1.10
Aa 'Irsina', b 10 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	39.17 ± 1.15
Aa 'Irsina', b 20 µl/ml	14.48 ± 0.13	0 ± 0	30.25 ± 0.68	47.81 ± 0.82
Aa 'Freda', pa 10 µl/ml	76.15 ± 0.91	63.86 ± 2.13	8.65 ± 0.68	6.55 ± 0.23
Aa 'Freda', pa 20 µl/ml	89.47 ± 0.86	76.71 ± 0.97	24.58 ± 1.37	36.07 ± 2.32
Aa 'Freda', b 10 µl/ml	69.28 ± 1.37	65.08 ± 0.99	8.46 ± 0.55	7.97 ± 0.94
Aa 'Freda', b 20 µl/ml	81.14 ± 0.27	79.15 ± 0.43	25.28 ± 0.88	36.19 ± 2.18
As 'Veneto bianco' pa 10 µl/ml	19.73 ± 0.17	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
As 'Veneto bianco' pa 20 µl/ml	45.19 ± 0.84	0 ± 0	0 ± 0	12.77 ± 1.14
As 'Veneto bianco' b 10 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	47.32 ± 1.19
As 'Veneto bianco' b 20 µl/ml	24.10 ± 1.66	0 ± 0	0 ± 0	61.44 ± 1.15
As 'Rosso di Sulmona' pa 10 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	20.67 ± 1.67	22.07 ± 1.59
As 'Rosso di Sulmona' pa 20 µl/ml	16.94 ± 1.13	0 ± 0	68.57 ± 0.89	30.34 ± 2.16
As 'Rosso di Sulmona' b 10 µl/ml	36.46 ± 0.68	0 ± 0	8.19 ± 1.43	0 ± 0
As 'Rosso di Sulmona' b 20 µl/ml	65.16 ± 0.85	0 ± 0	11.13 ± 1.65	0 ± 0
As 'Rosso di Spagna' pa 10 µl/ml	6.11 ± 0.67	0 ± 0	6.58 ± 2.14	5.19 ± 0.67
As 'Rosso di Spagna' pa 20 µl/ml	25.75 ± 0.69	18.27 ± 0.66	60.20 ± 2.06	41.77 ± 1.44
As 'Rosso di Spagna' b 10 µl/ml	0 ± 0	0 ± 0	7.09 ± 1.33	11.26 ± 0.38
As 'Rosso di Spagna' b 20 µl/ml	45.88 ± 1.50	4.27 ± 0.69	13.61 ± 1.65	68.89 ± 1.45
As 'Staravec' pa 10 µl/ml	46.86 ± 1.46	62.44 ± 1.34	0 ± 0	3.91 ± 0.13
As 'Staravec' pa 20 µl/ml	54.13 ± 2.96	65.71 ± 1.70	10.38 ± 1.51	52.71 ± 1.17
As 'Staravec' b 10 µl/ml	0 ± 0	45.74 ± 1.81	0 ± 0	51.52 ± 1.73
As 'Staravec' b 20 µl/ml	59.79 ± 1.12	62.64 ± 0.83	0 ± 0	55.55 ± 1.27

La percentuale di inibizione è stata calcolata rispetto al controllo, assumendo per questo una inibizione = 0. Aa = *Allium ampeloprasum*; As = *Allium sativum*; pa = parti aeree; b = bulbo. A. b. = *Acinobacter baumannii*; E. c. = *Escherichia coli*; L. m. = *Listeria monocytogenes*; S. a. = *Staphylococcus aureus*.

Tabella 2. Inibizione percentuale 3 SD degli OE di *Allium sativum* e di *Allium ampeloprasum* sul metabolismo delle cellule batteriche presenti all'interno dei biofilm, valutata tramite test MTT.

Discussione. L'analisi della composizione chimica degli OE risulta in accordo con la letteratura (1-3), che evidenzia come composti maggioritari i composti solforati. L'attività antibiofilm, in accordo con quanto riportato nella scarsa letteratura disponibile, è attribuita ai composti solforati che interferiscono con gruppi tiolici soprattutto enzimatici causando inibizione della sintesi della parete cellulare e della biosintesi di composti come purine, pirimidine e proteine, provocando così blocco di crescita e proliferazione batterica. La capacità dell'allicina di attraversare rapidamente le membrane inoltre va ad aumentarne la capacità di interazione con enzimi contenenti zolfo (4-5).

Conclusioni. Gli OE ottenuti hanno dimostrato di poter agire sia contro un biofilm già formato sia contro la formazione di un nuovo biofilm. Emerge quindi la necessità di continuare gli studi sul genere *Allium* che potrebbero aprire la strada per il loro sfruttamento nel campo delle tecnologie alimentari e di quello clinico.

Bibliografia

- Jirovetz L., Jäger W., Koch H.P., Remberg G. (1992) - Investigations of volatile constituents of the essential oil of Egyptian garlic (*Allium sativum* L.) by means of GC-MS and GC-FTIR. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 194: 363-365.
- Satyral P., Craft J.D., Dosoky N.S., Setzer W.N. (2017) - The chemical compositions of the volatile oils of garlic (*Allium sativum*) and wild garlic (*Allium vineale*). Foods, 6: 63.
- Ascrizzi R., Flamini G. (2020) - Leek or Garlic? A Chemical Evaluation of Elephant Garlic Volatiles. Molecules, 25: 2082.
- Yoshida H., Iwata N., Katsuzaki H., Naganawa R., Ishikawa K., Fukuda H., Fujino T., Suzuki A. (1998) - Antimicrobial activity of a compound isolated from an oil-macerated garlic extract. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62: 1014-1017.
- Anki S., Mirelman D. (1999) - Antimicrobial properties of alliin from garlic. Microbes and Infection, 1: 125-129.

Parole chiave. *Allium sativum*, *Allium ampeloprasum*, Oli essenziali, Biofilm, Patogeni alimentari

MONITORAGGIO DELLA NEMATOFUNA DEL SUOLO DOPO L'APPLICAZIONE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *OCIMUM BASILICUM*

L. Catani¹, E. Grassi¹, B. Conti², C. Tani², L. Guidi¹, B. Manachini³, F. Semprucci¹

¹Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli Studi di Urbino, Urbino, Italia

²Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa, Pisa, Italia

³Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Forestali, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

e.mail: l.catani3@campus.uniurb.it

Introduzione. Gli ecosistemi terrestri sono fortemente compromessi dal continuo sovrassfruttamento del suolo e dall'adozione di prodotti di sintesi che ne hanno alterato non solo la loro biodiversità ma anche il loro funzionamento. Per agire in maniera più sostenibile, specialmente in ambito agrario, la Commissione Europea ha varato il programma New Green Deal, in cui si ambisce a ridurre del 50% l'uso di prodotti di sintesi e a ripristinare la biodiversità limitando il più possibile l'impatto antropico. Tra i composti più sostenibili e bioattivi, si annoverano quelli prodotti da piante aromatiche e officinali tra i quali: gli oli essenziali (OE).

Sebbene siano stati evidenziati i numerosi effetti tossici e repellenti *in vitro* nei confronti di innumerevoli patogeni e parassiti che affliggono le colture e le derrate conservate (1,2, 3,4,5), i loro effetti sulla fauna benefica del suolo sono ancora poco studiati. In particolare, la fauna edafica comprende i nematodi a vita libera, i quali sono ottimi bioindicatori presentando numerose caratteristiche utili per la valutazione della qualità ecologica del suolo e del suo stato di salute, il cui studio è stato fortemente proposto dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare proprio per la registrazione dei fitofarmaci (6).

Materiali e Metodi. Per questo, è stato intrapreso uno studio volto a valutare l'effetto sulla nematofauna terrestre degli OE inglobati in matrici stabilizzanti la loro volatilità come il chitosano. In particolare, l'OE di *Ocimum basilicum* è riportato in letteratura come OE efficace contro *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* una malattia crittogamica che affligge le colture di cece e che si trasmette attraverso i semi. A tal fine è stato valutato l'effetto sulla nematofauna dei trattamenti di semi di *Cicer arietinum* con chitosano e chitosano addizionato con l'OE al 25%. Le parcelle di terreno con i semi trattati sono state confrontate con i relativi controlli non trattati ed è stato monitorato l'andamento temporale della nematofauna a 7, 14, 28, e 56 giorni dalla semina dei ceci seguendo un approccio BACI (*Before-after-control-impact*). La struttura di comunità della nematofauna è stata analizzata con l'indice di Bray-Curtis, così è stato verificato l'andamento della diversità alpha attraverso gli indici di Shannon e Pielou.

Risultati. Il confronto tra trattati e controlli e la serie temporale analizzata sembrano evidenziare un maggiore effetto del tempo sulla nematofauna piuttosto che del chitosano addizionato con l'OE. Infatti, al passare del tempo e con l'aumentare delle temperature sia l'abbondanza della nematofauna, che la sua ricchezza e diversità sono aumentate nell'appezzamento seminato con ceci trattati con chitosano addizionato con OE.

Discussione e Conclusioni. In definitiva quindi il trattamento con OE al 25% combinato con il chitosano non sembra aver evidenziato nessun effetto negativo neppure sulla composizione tassonomica, risultati che cor-

roborano il possibile uso sostenibile del miscuglio in campo agricolo e in particolare per la concia dei semi.

Bibliografia

- (1) Digilio M.C., Mancini E., Voto E., De Feo V. (2008) - Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *J. Plant Interact.*, 3(1): 17-23. <https://doi.org/10.1080/17429140701843741>
- (2) Conti B., Bocchino R., Cosci F., Ascrizzi R., Flamini G., Bedini. S. (2020) - Essential Oils against Varroa destructor: A Soft Way to Fight the Parasitic Mite of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, no. Bee management: Pages 774-782.
- (3) Sivakumar D., Romanazzi G. (2019) - Use of Essential Oils to Improve Postharvest Quality and Control Postharvest Decay of Tropical, Subtropical, and Temperate Fruits, *Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce*, 1st edition pp. 18, ISBN9781315209180. DOI: 10.1201/9781315209180-20
- (4) D'Addabbo T., Pinarosa A. (2021) - Chemical Composition and Nematicidal Properties of Sixteen Essential Oils-A Review. *Plants*, 10(7): 1368. DOI: 10.3390/plants10071368
- (5) Catani L., Grassi E., di Montanara A.C., Guidi L., Sandulli R., Manachini B., Semprucci F. (2022) - Essential oils and their applications in agriculture and agricultural products: A literature analysis through VOSviewer. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45: 102502. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102502
- (6) Ockleford C., Adriaanse P., Berny P., Brock T., Duquesne S., Grilli S., Hernandez-Jerez A.F., Bennekou SH., Klein M., Kuhl T., Laskowski R., Machera K., Pelkonen O., Pieper S., Stemmer M., Sundh I., Teodorovic I., Tiktak A., Topping C.J., Wolterink G., Craig P., de Jong F., Manachini B., Sousa P., Swarowsky K., Auteri D., Arena M., Rob S., EFSA Panel Plant Protection Prod. (2017) - Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. *EFSA Journal*, 15, 2:4690. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4690

Parole chiave. Oli essenziali, Agricoltura sostenibile, Nematodi a vita libera, Concia dei semi

ANALISI DELL'ATTIVITÀ DI SESSANTA OLII ESSENZIALI DURANTE LA TRASMISSIONE DEL PARASSITA MALARICO AL VETTORE ANOFELINO

E. Deligianni¹, E. Pizzi², I. Kavelaki¹, I. Siden-Kiamos¹, FU. Sapienza³, R. Fioravanti², S. Garzoli³, T. Pace⁴, M. Ponzì⁴, R. Ragno³, C. Currà¹

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology - Hellas, Heraklion, Grecia

²Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

³Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

⁴Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia
e.mail: curra@imbb.fort

Introduzione. La malaria è una malattia infettiva causata dal parassita *Plasmodium* e trasmessa dalla zanzara *Anopheles* nelle aree sub-tropicali del mondo, causando circa 241 milioni di casi nel mondo e 627000 morti nel 2020 (1). Il parassita viene trasmesso da persona infetta a zanzara durante un pasto di sangue. In questo studio abbiamo analizzato l'attività antimalarica di 60 olii essenziali durante la formazione dell'ookinete, lo stadio mobile che si forma nell'intestino della zanzara infetta.

Materiali e Metodi. Il parassita murino *Plasmodium berghei* è stato utilizzato in questo studio, in particolare il ceppo PbCTRP-GFP (2), che esprime la proteina fluorescente allo stadio di zigote e ookinete. L'efficacia degli olii è stata testata *in vitro* su colture di sangue infetto e la formazione dell'ookinete è stata verificata attraverso la conta delle cellule fluorescenti (Fig. 1). I dati sono stati analizzati sia statisticamente che attraverso modelli ottenuti con algoritmi *machine learning* (ML).

Componenti Chimici	SMILES	Importanza Media Pesata	Frequenza trovata dai modelli ML
Eugenol	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)CC=C)O</chem>	8,33	11
eucalyptol	<chem>CC1(C2CCC(O1)(CC2)C)C</chem>	8,23	12
Limonene	<chem>CC1=CCC(CC1)C(=C)C</chem>	7,66	11
α -citral	<chem>CC(=CCC/C(=C/C=O)/C)C</chem>	6,90	13
Pulegone	<chem>C[C@@H]1CCC(=C(C)C)C(=O)C1</chem>	5,56	9
Linalool	<chem>CC(=CCCC(C)C(=O)O)C</chem>	5,17	10
α -pinene	<chem>CC1=CCC2CC1C2(C)C</chem>	4,25	17
δ -cadinene	<chem>CC1=C[C@H]2[C@@H](CCC(=C2CC1)C)C(C)C</chem>	3,08	10
chrysanthone	<chem>CC1C2CC2(CC1=O)C(C)C</chem>	2,39	9
o-cymene	<chem>CC1=CC=CC=C1C(C)C</chem>	1,97	9

Tabella 1. Componenti chimici identificati attraverso i modelli Machine Learning (ML). Componenti chimici discriminanti per gli olii essenziali identificati come attivi nell'inibire la formazione degli ookineti.

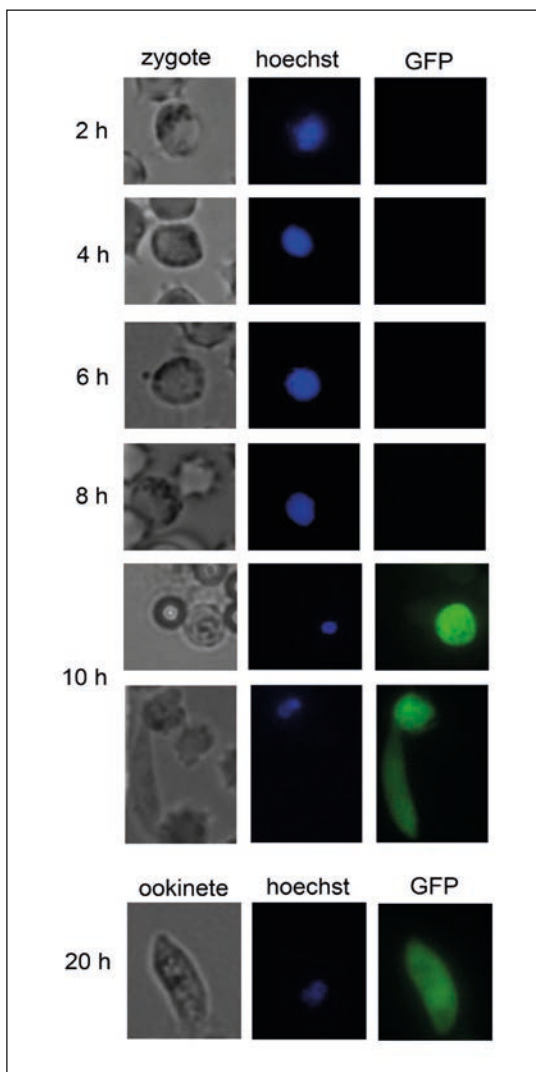


Figura 1. Tempo di espressione della GFP (Green Fluorescent Protein) nel ceppo CTRP-GFP Plasmodium berghei. Gametociti del ceppo CTRP-GFP sono stati messi in coltura per ookineti per definire il tempo di espressione della GFP. I prelievi e l'analisi al microscopio sono stati fatti ogni 2 ore. La fluorescenza è identificata dopo 10 ore di coltura, durante la formazione dello zygote/ookinete. Barra indica 50 μ m.

Risultati. Sorprendentemente, alcuni olii hanno mostrato essere efficaci a basse concentrazioni (0,0025%) bloccando totalmente la formazione dell'ookinete e quindi potenzialmente la trasmissione della malaria. Algoritmi ML applicati ai dati biologici hanno permesso l'individuazione di componenti discriminanti per l'attività antimalarica degli olii essenziali (Tab. 1).

Discussione e Conclusioni. Il ricorso al trattamento della malaria basato sull'attività antiparasitica di piante e erbe aromatiche è noto dall'antichità. Composti derivati dall'artemisinina sono infatti usati come trattamento d'eccellenza. L'identificazione di potenziali composti attivi contro le zanzare infette supporta un approccio del tutto "verde", distribuendo per esempio esche impregnate di olii essenziali, potenzialmente ambizioso e di enorme impatto nella lotta contro la malaria.

Bibliografia

- (1) World malaria report 2022 World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>
- (2) Vlachou D., Zimmermann T., Cantera, R., Janse C.J., Waters A.P.; Kafatos F.C. (2004) - Real-time, *in vivo* analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. Cell. Microbiol., 6: 671-685. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00394.x.

Parole chiave. Malaria, Olii essenziali, Machine learning, Anopheles

EFFETTI DELLE TECNICHE AGRONOMICHE SULLA RESA E COMPOSIZIONE DELL'OLIO ESSENZIALE DI MELISSA (*MELISSA OFFICINALIS* L.)

L. D'Andrea

CREA – Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente, Bari, Italia
e.mail: laura.dandrea@crea.gov.it

Introduzione. La melissa (*Melissa officinalis* L.) è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Lamiaceae (Labiatae). La droga è costituita dalle foglie essiccate, che raccolte poco prima della fioritura, hanno una resa in olio essenziale molto bassa con un range tra 0,05% e 0,20%. L'olio essenziale ha un colore verdognolo e odora di limone. I costituenti principali sono geraniolo (citrale a con circa 35-40%) e nerale (citrale b con circa 30-35%), mentre in piccole quantità sono presenti cariofillene, geraniolo, citronellolo, linalolo, geraniolo e nerolo. Le foglie e l'olio essenziale sono impiegati nel settore alimentare, cosmetico, erboristico e farmaceutico. La ricerca aveva lo scopo di valutare gli effetti delle tecniche agronomiche (irrigazione, concimazione, epoca di raccolta, ecc.) sulla resa e composizione dell'olio essenziale di melissa.

Materiali e Metodi. Lo studio si è basato su una revisione delle pubblicazioni scientifiche internazionali e nazionali al fine di ottenere più informazioni possibili sull'argomento. Differenti motori di ricerca sono stati utilizzati. Le parole chiave della ricerca sono state: *Melissa officinalis*, lemon balm, essential oil, irrigation, fertilization, ecc.

Risultati. La tecnica irrigua è stata studiata da ricercatori turchi (1), che hanno osservato che all'aumentare del deficit idrico si ha un incremento di resa in olio essenziale e la percentuale di olio essenziale è aumentata da 0,12% a 0,16%. Altri autori (2) hanno eseguito una ricerca basata su differenti livelli di irrigazione e hanno osservato che la massima resa e la percentuale di olio essenziale sono al 60% e al 20% della capacità di campo (CC), rispettivamente. L'effetto della concimazione azotata è stato

STUDIO ANALITICO-COMPARATIVO DELL'OLIO ESSENZIALE E DELL'IDROLATO DA PIANTE DI *MELISSA OFFICINALIS* L. SANE ED INFETTE DAL VIRUS DEL MOSAICO DEL CETRIOLO (CMV)

S. Garzoli¹, S. Biffi², F. Pederzoli³, M.G. Bellardi³

¹Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Giardino delle Erbe 'Augusto Rinaldi Ceroni', Casola-Valsenio, Ravenna, Italia

³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Bologna, Italia

e.mail: stefania.garzoli@uniroma1.it

studiato da ricercatori turchi (3), che hanno osservato un aumento sia in percentuale (0,258%) e sia nel contenuto di olio essenziale (16,05 kg ha⁻¹) con un'applicazione ottimale (60 kg N ha⁻¹), mentre i valori di entrambi i parametri si riducono con una dose eccessiva (Fig. 1). L'età delle singole foglie sulla stessa pianta può influenzare la composizione quantitativa degli oli volatili prodotti e quindi di conseguenza è importante l'altezza della barra falciante quando si esegue la raccolta. La percentuale di olio essenziale è pari a 0,14% se si raccoglie la pianta intera e aumenta a 0,39% se si raccoglie solo la parte superiore (4). Altri autori (5,6) hanno dimostrato che le foglie apicali hanno circa 30% in più di olio essenziale rispetto alle foglie basali. Inoltre, prove sperimentali (7,8) riportano che le foglie apicali presentano alte concentrazioni dei citrali (90%), mentre le foglie basali mostrano una diminuzione di questi composti a favore del citronellolo e del cariofillene. La composizione varia anche in base al momento della raccolta, infatti in una prova eseguita in Iran si ha una percentuale alta di geraniolo prima della fioritura (25,03%) e in piena fioritura (24,97%) rispetto alla fine fioritura (4,58%) (9).

Discussione e Conclusioni. Molti sono gli studi scientifici sulle tecniche agronomiche che influenzano la resa e la composizione dell'olio essenziale di melissa. In questa *review* sono riportate solo alcuni esempi, ma già si può comprendere la quantità di cambiamenti che si possono avere al variare della scelta della tecnica agronomica. Differenze che l'agricoltore deve conoscere al fine di ottenere una produzione idonea al settore industriale a cui si rivolge.

Bibliografia

- (1) Ozturk A., Unlukara A., Ipek A., Gurbuz B. (2004) - Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). Pak. J. Bot., 36(4): 787-792.
- (2) Aliabadi F.H., Valadabadi S.A., Daneshian J., Khalvati M.A. (2009) - Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. Journal of Medicinal Plants Research, 3(5): 329-333.
- (3) Abbaszadeh B., Aliabadi F.H., Valadabadi S.A., Darvishi H.H. (2009) - Nitrogenous fertilizer influence on quantity and quality values of balm (*Melissa officinalis* L.). J. Agric. Ext. Rural Dev., 1(1): 031-033.
- (4) Turhan M. (2006) - Hand book of herbal plants, chapter 4. *Melissa officinalis*, 3: 184-245.
- (5) Lawrence B.M. (1986) - Essential Oil Production. A Discussion of Influencing Factors. In: Biogenesis of Aromas. Am. Chem. Soc., 27: 363-369.
- (6) Franz Ch. (1993) - Genetics. In Hay, R.K.M. and Waterman, P.G. (eds). Volatile Oil Crops: London: Longman Group UK Limited.
- (7) Hefendehl (1970) - Zusammensetzung des Aetherischen Oels von *Melissa officinalis* L. sekundäre and changes of decomposition. Arch. Pharm., 303: 345- 357.
- (8) Hose M., Erman F. (1997) - Ontogenic variation of the essential leaf oil of *Melissa officinalis* L. Pharmazie, 52: 247-253.
- (9) Saeb K., Gholamrezaee S. (2012) - Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2: S547-S549.

Parole chiave. *Melissa*, Irrigazione, Concimazione, Olio essenziale, Resa, Composizione

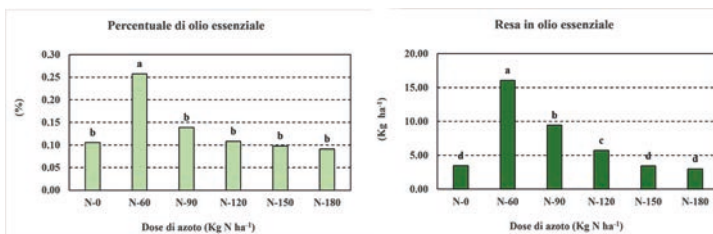


Figura 1. Percentuale e contenuto di olio essenziale di melissa coltivata a diverse dose di azoto [modificato da Abbaszadeh et al. (2009)].

Introduzione. La melissa (*Melissa officinalis* L., famiglia Lamiaceae) è utilizzata da oltre 2000 anni per la cura delle malattie mentali, cardiovascolari e respiratorie. È coltivata per la produzione delle infiorescenze, ma soprattutto delle foglie da cui si estrae un olio essenziale (OE) la cui quantità è fortemente influenzata dai parametri ambientali, in particolare dallo stress idrico che ne determina un sensibile aumento (1). È ormai noto come anche lo stato fitosanitario (in particolare un'infezione virale), possa determinare cambiamenti non solo nella resa, ma anche nella composizione degli OE in alcune lamiaceae fra cui *Salvia sclarea* L., *Salvia officinalis* L. "Maxifolia", *Lavandula angustifolia* Miller ed i suoi ibridi, *Ocimum basilicum* L., ecc. (2). Nel maggio 2022, in un campo sperimentale di melissa, allestito (partendo dal seme) nell'area dell'ITA-Scarabelli (Imola, Bologna), sono state individuate piante con sintomi fogliari consistenti in 'spot' clorotici, di probabile eziologia virale (Fig. 1, A, B). Lo scopo della ricerca è stato quello di identificare il virus coinvolto nella malattia e di verificare l'eventuale influenza sul metabolismo secondario, ossia sulla resa e composizione dell'OE ottenuto da *M. officinalis* Sana (MOS) ed Infetta (MOI) da virus, ed anche dei rispettivi Idrolati (Id).

Materiali e Metodi. In Letteratura sono riportati due virus che infettano la melissa: il virus del 'rattle' del tabacco (TRV) e quello del mosaico dell'erba medica (AMV) (3). Le prime analisi virologiche (saggi immuno-enzimatici PAS-ELISA) utilizzando sieri specifici anti-TRV ed anti-AMV hanno dato esito negativo. Sono state quindi applicate tecniche di biologia molecolare (RT-PCR) per verificare la presenza del virus del mosaico del cetriolo (CMV), attualmente molto diffuso nell'area dell'ITA-Scarabelli su orticole e floricole. È stata utilizzata una prima coppia di primer che amplifica parte del gene della proteina capsidica (CMV1: 5'-GCCGTAA-GCTGGATGGACAA-3', reverse primer; CMV2: 5'-TATGATAAG AACTTGT-TCGCG-3', forward primer) ed una seconda coppia di primer che amplifica l'intero gene della proteina di movimento (MP) (CMVMP1: 5'-ATGGCTT TCCAAG GTACCA-3', forward primer; CMVMP2 5'-CTAAGACCGTTAAC-CACC-3', reverse primer) procedendo poi con il sequenziamento dei prodotti amplificati. Le piante selezionate, con e senza sintomi, sono state tagliate il 3/5/22 (Fig. 1 C,D) (10 Kg di MOI e 10 Kg di MOS, eliminando 15 cm della parte basale del fusto) e distillate, per poi procedere con l'analisi dei due OE mediante gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Per quanto riguarda i due Id raccolti, essendo matrici acquose e quindi non iniettabili direttamente nel GC, è stata applicata la tecnica dello spazio di testa tramite l'utilizzo di un *Headspace* (HS) *Autosampler* come autocampionatore accoppiato alla GC-MS (4,5): ogni Id è stato posto all'interno di una *headspace vial*, che posizionata sul carosello dell'autocampionatore, è stata prima condizionata ad una temperatura opportuna e poi flussata con gas iperpuro (He) consentendo così l'estrazione dei componenti volatili successivamente inviati, tramite una *transfer-line*, direttamente nella colonna del GC.

Risultati. Nella piante con 'spot' clorotici (MOI) è stata diagnosticata la presenza di CMV (prima segnalazione in melissa); la sequenza CMV1/CMV2 è risultata per il 99.8% identica all'isolato CMV-*Canna* spp. individuato nel 2016 in Russia; la sequenza CMVMP1/CMVMP2 è risultata identica per il 99.8% all'isolato CMV-*Syringa vulgaris* riscontrato nel 2019 nell'area ITA Scarabelli (sottogruppo IA degli isolati di CMV) (6). La resa in OE è risultata per MOI di 1,5 mL (0,15%) e per MOS di 1,00 mL (0.1%); quindi, un aumento del 50% nella melissa infetta.

Discussione e Conclusioni. È nota la trasmissione di CMV per seme ma, nel caso esaminato, è verosimile che l'origine dell'infezione sia da mettere in relazione alla sua elevata presenza nelle specie spontanee, orticole e floricole limitrofe (il virus è trasmesso in natura da afidi durante l'attività trofica). Per quanto riguarda la composizione chimica non sono state riscontrate differenze significative fra i campioni sani e quelli infetti sia per quanto riguarda gli OE che gli Id. Da notare come nel mese di giugno sulle altre piante di melissa rimaste in campo (non sottoposte a distillazione) la sintomatologia si sia notevolmente attenuata ('recovery'), non consentendo più, visivamente, di distinguere le piante sane da quelle infette. Il caso della melissa infetta da CMV merita ulteriori approfondimenti anche per rispondere alla domanda: *è verosimile che la pianta non modifichi il proprio metabolismo secondario a seguito dell'infezione non avendo la necessità di 'difendersi' da un virus 'innocuo'?*

Bibliografia

- (1) Gordanic S., Radanovic D., Lukic M., Mrdan S., Mikic S., Prijic Z., Markovic T. (2021) - Influence of water stress prior to harvest on yield and essential oil content of pot grown lemon balm. *Natural Medicinal Materials*, 54-57. Published on-line <http://dx.doi.org/10.5937/leksir2141054G>
- (2) Parrella G., Bruni R., Bellardi M.G. (2007) - Effects of Alfalfa mosaic virus on the chemical composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Proceedings XIII Intern. Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (21-27.7.2007)*, Sorrento, Italy. Abstract PS 12-595: 293.
- (3) Dikona B., Rabenstein F. (2008) - First report on the occurrence of Tobacco rattle virus and Alfalfa mosaic virus on *Melissa officinalis* L. in Bulgaria. *Proceedings and Abstracts of 'Second Congress of Virology'* (Sofia, Bulgaria, 28-31 Maggio, 2008): 341-346.
- (4) Ovidi E., Laghezza Masci V., Zambelli M., Tiezzi A., Vitalini, S., Garzoli S. (2021) - Laurus nobilis, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities". *Plants*, 10: 707.
- (5) Garzoli S., Laghezza Masci V., Franceschi S., Tiezzi A., Giacomello P., Ovidi E. (2021) - Headspace/GC-MS Analysis and Investigation of Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Essential Oils and Hydrolates from *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Miller. *Foods*, 10: 1768.
- (6) Troiano E., Bellardi M.G., Parrella G. (2019) - *Syringa vulgaris* is a new host for cucumber mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, 58(2): 385-389. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-10625

Parole chiave. *Melissa, CMV, Sintomatologia, Oli essenziali, Idrolati*



Figura 1. A) Campo di melissa. B) Melissa con 'spot' clorotici sulle foglie. C) Taglio delle piante. D) I sacchi con le porzioni recise sono trasferiti al Giardino delle Erbe di Casola Valsenio.

L'USO DEGLI OLI ESSENZIALI COME NEMATOCIDI IN AGRICOLTURA: QUALE OLIO ESSENZIALE PER QUALE NEMATODE

L. Catani¹, B. Manachini², E. Grassi¹, L. Guidi¹, F. Semprucci¹

¹Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino (PU), Italia

²Università di Palermo, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Palermo (PA), Italia

e.mail: e.grassi5@campus.uniurb.it

Introduzione. La Commissione Europea, entro il 2030, intende dimezzare l'uso dei pesticidi chimici e di conseguenza i rischi, connessi al loro utilizzo, sia per la salute umana che per l'ambiente. Tra i pesticidi, i nematocidi sono agenti chimici utilizzati per controllare i nematodi parassiti delle piante in agricoltura. Diversi principi attivi impiegati per il controllo dei nematodi fitofagi non sono più disponibili sul mercato ed attualmente pochi sono i principi attivi anche di sintesi registrati. Per tutti questi motivi negli ultimi decenni, i ricercatori si sono prodigati per la ricerca di alternative più sostenibili che presentino la stessa efficacia, ma che abbiano un impatto limitato sull'ambiente e sugli ecosistemi. Gli oli essenziali (OE) possono essere composti bioattivi simili e potenziali sostituti dei fitofarmaci di sintesi (1, 2). Nel database Scopus® sono disponibili numerosi studi sull'uso degli OE come nematocidi. Questi lavori hanno evidenziato come la maggior parte della ricerca si sia focalizzata sull'esplorazione degli effetti degli OE *in vitro* rispetto a quelli *in vivo* su diverse popolazioni di nematodi fitoparassiti. Ad oggi, non è ancora disponibile una guida per far comprendere ad un neofita che intende approcciarsi all'utilizzo di OE contro i nematodi in agricoltura, quali OE siano più efficaci sui vari nematodi considerati. L'obiettivo di questo studio è quello di esplorare fino a che punto gli OE sono stati testati sui nematodi, capire quali OE hanno evidenziato notevoli effetti nematocidi (ad esempio, mortalità, effetti sulla motilità, inibizione della produzione di uova) e a quali concentrazioni.

Materiali e Metodi. Questo studio ha riportato una panoramica delle relazioni e dei dati, disponibili fino ad ora scaricati da Scopus®, attraverso: a) mappe di rete create con il software VOSviewer (3); b) analisi sistematica di tutti gli articoli scientifici presi in esame.

Risultati e Discussione. VOSviewer crea mappe con parole chiave derivate dall'analisi di *co-occurrence*, per comprendere le principali parole chiave utilizzate, i Paesi e le riviste che pubblicano maggiormente sull'argomento, mentre l'analisi sistematica è volta ad analizzare tutti i documenti scaricati. Partendo da una completa comprensione della letteratura ad oggi disponibile sull'uso degli OE in agricoltura contro i nematodi, è stata creata una lista che ambisce ad offrire informazioni immediate su quali OE hanno mostrato i più importanti effetti nematocidi e a quali concentrazioni. La tabella si pone come obiettivo quello di fornire uno strumento utile a chi è interessato a trovare alternative sostenibili alle sostanze chimiche convenzionalmente usate in agricoltura.

Conclusioni. La tematica di utilizzo di OE contro i nematodi sembra essere un tema con notevoli prospettive di ricerca per un futuro più *green*.

Bibliografia

- (1) Isman M.B. (2016) - Pesticides based on plant essential oils: phytochemical and practical considerations. *ACS (Am. Chem. Soc.) Symposium Series*, vol. 1218, Chapter 2, pp. 13-26. DOI: 10.1021/bk-2016-1218.ch002
- (2) Catani L., Grassi E., di Montanara A.C., Guidi L., Sandulli R., Manachini B., Semprucci F. (2022) - Essential oils and their applications in agriculture and agricultural products: A literature analysis through VOSviewer. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45: 102502. DOI:10.1016/j.bcab.2022.102502

(3) van Eck N.J., Waltman L. (2010) - Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84: 523-538.

Parole chiave. Oli essenziali, Attività nematocida, Agricoltura sostenibile, VOSviewer

PRODUZIONE E IMPIEGO DI OLI ESSENZIALI NELLA PROTEZIONE DA FITOFAGI E MALATTIE E SU NEMATODI BIOINDICATORI TERRICOLI IN ORTICOLTURA BIOLOGICA

E. Grassi¹, M.A. Abulebda Abdalhad², M.C. Battistelli², L. Catani¹, F. Foglietta⁶, D. Fraternali¹, M. Gasparini⁴, L. Guidi¹, L. Papi³, P. Riolo², G. Romanazzi², G. Sperandio², F. Semprucci¹, S. Simonetti⁵

¹Università degli Studi di Urbino, Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Urbino (PU), Italia

²Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Ancona (AN), Italia

³Undicesimaora Società Cooperativa Sociale Onlus, Senigallia (AN), Italia

⁴Azienda Agricola di Gasparini Matteo, Trecastelli (AN), Italia

⁵Azienda Agricola Verde Naturale di Sara Simonetti, Corinaldo (AN), Italia

⁶Perito Agrario studio di consulenza libero professionale, Urbino (PU), Italia
e.mail: e.grassi5@campus.uniurb.it

Introduzione. L'uso intensivo di fitofarmaci chimici in agricoltura potrebbe causare alterazioni del suolo, con un conseguente depauperamento delle risorse ambientali ad esso connesso e squilibri nel funzionamento ecosistemico. Per porre rimedio alle conseguenze del sovrasfruttamento del suolo e tutelare le produzioni agricole devono essere perseguite sia la riduzione dell'impatto umano, sia la tutela della biodiversità, usando in modo efficace le risorse all'interno di un'economia circolare.

Una possibile strategia può risiedere nell'uso degli oli essenziali (OE), metaboliti secondari delle piante, in particolare monoterpeni e sesquiterpeni, che in natura provvedono a difendere la pianta dagli attacchi di virus, batteri, funghi, acari e insetti. È per questo motivo che nasce il gruppo operativo OLI ESSENZIALI MARCHE che vede in collaborazione 5 partner tra aziende marchigiane e atenei: l'azienda capofila Undicesimaora, Società Cooperativa Sociale Onlus, a cui si aggiungono l'Azienda Agricola Verde Naturale di Sara Simonetti, l'Azienda Agricola di Gasparini Matteo, l'Università degli Studi di Urbino e l'Università Politecnica delle Marche.

Lo scopo del progetto OliEssBio (Finanziato nell'ambito del PSR MARCHE 2014/2022 - Sottomisura 16.1 Azione 2 - ID. 59670) è quello di utilizzare alcuni OE prodotti dai partner di progetto e dimostrare che il loro impiego, in aziende che operano in agricoltura biologica e/o integrata, possa rappresentare una valida alternativa ai prodotti chimici di sintesi nella protezione delle colture ortive da parassiti e da malattie crittogamiche.

Materiali e Metodi. Gli esperimenti in azienda prevedono trattamenti con OE ad azione fungicida e/o insetticida, per contrastare la comparsa di malattie ed attacchi di fitofagi che impattano maggiormente le colture orticole, nel tentativo di ridurre le possibili ripercussioni economiche per le aziende. Inoltre, sarà parallelamente effettuata la valutazione degli effetti dei trattamenti su nematodi terricoli bioindicatori, al fine di valutare in ogni fase il possibile effetto degli OE sulla biodiversità della nematofauna terrestre.

Conclusioni. Le ricadute socio-economiche del progetto rispondono all'esigenza delle aziende di avere a disposizione prodotti più sostenibili, senza residui di prodotti chimici, che al contempo garantiscano una produzione di buona quantità e qualità.

Parole chiave. Oli essenziali, Controllo di malattie e parassiti, Orticoltura, Conservazione della biodiversità, Nematodi bioindicatori

ATTIVITÀ *IN VITRO* DI ALCUNI OLI ESSENZIALI NEI CONFRONTI DI CEPPI CLINICI DI *ASPERGILLUS FUMIGATUS* E *CANDIDA KRUSEI* RESISTENTI AI PIÙ COMUNI FARMACI ANTIFUNGINI

N. Mandras, L. Cavallo, J. Roana, V. Tullio

Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatrica, Università di Torino, Torino, Italia

e.mail: narcisa.mandras@unito.it; vivian.tullio@unito.it

Introduzione. Tra le infezioni ad eziologia microbica, le infezioni fungine contribuiscono in modo sostanziale alla morbilità e alla mortalità umana, diventando una grave problema di salute pubblica, poiché possono a volte risultare difficili da trattare. Gli agenti fungini predominanti includono specie di *Aspergillus* e *Candida*, in particolare *Aspergillus fumigatus* (micete filamentoso) e *Candida krusei* (lievito) che risultano resistenti ai più comuni farmaci antifungini usati. Nonostante i costanti progressi nella terapia, la crescente minaccia di resistenza ai farmaci antimicrobici ha stimolato la ricerca di nuove alternative terapeutiche, inclusi gli oli essenziali (OE) ormai riconosciuti per il loro ruolo antimicrobico nei confronti di batteri, funghi e virus. In questo studio, abbiamo valutato l'attività antifungina di cinque OE commerciali (Flora, Italia) nei confronti di ceppi di *Aspergillus fumigatus* e *Candida krusei* di isolamento clinico, paragonandola con quella di itraconazolo (ITZ), voriconazolo (VRC) e amfotericina B (AMB), tra i più comuni farmaci antifungini usati in terapia delle aspergillosi e candidosi.

Materiali e Metodi. Sono stati valutati gli OE di chiodi di garofano (*Eugenia caryophyllata*), geranio (*Pelargonium graveolens*), lavanda vera (*Lavandula officinalis*), origano (*Origanum vulgare*) e timo rosso a timolo (26,52%; *Thymus vulgaris*). Gli OE e i farmaci sono stati saggiati nei confronti di sei ceppi di *A. fumigatus* e sei ceppi di *C. krusei* di isolamento clinico. L'attività antifungina è stata determinata mediante microdiluzione in brodo e, per i ceppi di *A. fumigatus*, anche mediante aromagramma. Abbiamo valutato la Minima Concentrazione Inibente (MIC) e la Minima Concentrazione Fungicida (MFC) degli OE e farmaci secondo le linee guida del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), con alcune modifiche per gli OE. Le concentrazioni finali degli OE andavano dall'1% allo 0,0078% (v/v).

Risultati. Tutti i ceppi di aspergillo saggiati sono risultati resistenti a ITZ e/o AMB (*breakpoint* $R > 2 \mu\text{g/ml}$), mentre i ceppi di *C. krusei* sono risultati resistenti al VRC. Per quanto riguarda gli OE, il geranio e i chiodi di garofano sono stati gli OE con la migliore attività contro tutti i funghi saggiati. Infatti, il valore di MIC dell'OE di geranio è stato dello 0,06-0,125% (v/v) contro *A. fumigatus* e *C. krusei*, mentre la MIC dell'OE di chiodi di garofano è stata dello 0,125% (v/v) sia per *A. fumigatus* (Tab.1) che per *C. krusei*. La MFC è risultata di 1-2 volte superiore alla MIC, indicando un'azione fungistatica degli OE saggiati in particolare per i ceppi di *A. fumigatus*. L'aromagramma

<i>Aspergillus fumigatus</i>	MIC $\mu\text{g/ml}$		MIC OE % (v/v)				
	ITZ	AMB	<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>	<i>Lavandula officinalis</i>	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
Ads 5582	16	8	0,125	0,06	>1	0,25	0,5
MOL 4470	16	8	0,125	0,125	>1	0,25	>1
MOL 151720	8	8	0,125	0,125	>1	0,25	1
MOL 3628	2	4	0,25	0,125	>1	0,25	>1
MOL 113549/b	4	4	0,25	0,125	>1	0,5	>1
BEN.17-70.45	8	8	0,125	0,06	>1	0,25	1

Tabella 1. Minima Concentrazione Inibente (MIC) di itraconazolo (ITZ), amfotericina B (AMB) (Qg/ml) e di oli essenziali (OE) di *Eugenia caryophyllata*, *Pelargonium graveolens*, *Lavandula officinalis*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* a timolo (26,52%) nei confronti di *Aspergillus fumigatus*.

Figura 1. Sperimentazione in apiario degli oli essenziali.

ma ha confermato l'attività antifungina di questi due OE, mostrando inibizione significativa della crescita.

Discussione e Conclusioni. I dati ottenuti indicano una buona attività antifungina di alcuni OE nei confronti di aspergilli e candide resistenti ai farmaci convenzionali. I risultati di questo lavoro supportano la ricerca di terapie alternative o complementari basate sugli oli essenziali.

Parole chiave. *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei*, Oli essenziali, Attività antifungina



VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ ACARICIDE E ANTIMICROBICHE DEGLI OLI ESSENZIALI DI CANNELLA (*CINNAMOMUM ZEYLANICUM*) E ORIGANO (*ORIGANUM VULGARIS*) IN APIARIO

C. Marianelli, M. Topini, S. Ferraiuolo, L. Narciso

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia
e.mail: cinzia.marianelli@iss.it

Introduzione. In Europa negli ultimi decenni le api da miele (*Apis mellifera*) sono diminuite del 70% e anche la loro aspettativa di vita si è ridotta notevolmente. Il cambiamento dell'habitat, l'inquinamento ambientale, l'agricoltura intensiva e l'uso diffuso di pesticidi sono le cause dell'indebolimento, collasso e morte di intere colonie. Anche le malattie delle api contribuiscono al decremento della popolazione. Tra queste, la varroasi causata dall'acaro *Varroa destructor* e la peste europea causata da *Melissococcus plutonius* rappresentano le più grandi minacce per gli apicoltori. La varroa agisce anche come vettore di numerosi virus che causano gravi malattie. Scopo della presente ricerca è quello di valutare in apiario l'efficacia degli oli essenziali di cannella e origano come acaricidi e antimicrobici naturali.

Materiali e Metodi. Un totale di 24 arnie, collocate all'interno del Parco della Maremma a Grosseto, sono state suddivise in modo casuale in sei gruppi di uguale numerosità (Fig. 1). Quattro gruppi sono stati alimentati con sciroppo di glucosio e fruttosio addizionato con olio essenziale di cannella (*Cinnamomum zeylanicum*) (gruppo CAN), con olio essenziale di origano (*Origanum vulgare*) (gruppo ORI), con una miscela di entrambi gli oli (gruppo CAN+ORI), o con succhi di frutta multivitaminici (gruppo FRU). Gli ultimi due gruppi (controlli) sono stati alimentati con lo sciroppo non addizionato e sottoposti al trattamento con acido ossalico (metodo tradizionale, gruppo OSS) o lasciate non trattate (gruppo UNT). Gli sciroppi (addizionati e non) sono stati somministrati per un totale di tre volte, con intervalli di 10 giorni. Durante il corso della sperimentazione sono stati valutati periodicamente i livelli di infestazione da acaro e lo stato di salute delle famiglie attraverso la ricerca, mediante saggi PCR, del genoma (RNA o DNA) dei principali patogeni delle api: i virus delle ali deformate (DWV), della paralisi acuta (APV) e cronica (CPV), della covata a sacco (SBV), della cella reale nera (BQCV), il fungo *Nosema* e i batteri responsabili della peste europea (*M. plutonius*) e della peste americana (*Paenibacillus larvae*).

Risultati. L'infestazione da acaro è stata trovata in tutte le famiglie e durante tutta la sperimentazione. I gruppi CAN e FRU presentavano comunque i livelli di infestazione più bassi sia al termine del terzo trattamento, sia a distanza di due mesi dall'ultimo trattamento. Il genoma dei virus DWV, APC, CPV e BQCV è stato evidenziato in quasi tutte le famiglie. Il genoma della peste europea è stato trovato nelle sole api campionate dai gruppi di

controllo (OSS e UNT). Il genoma del fungo *Nosema* e quello della peste americana non sono stati invece mai rilevati. Le famiglie più produttive di miele al termine dei tre trattamenti risultavano quelle trattate con gli oli essenziali (gruppi CAN, ORI e CAN+ORI). A distanza di due mesi dall'ultima somministrazione, le arnie trattate con gli oli essenziali si confermavano le più produttive, insieme al gruppo FRU.

Discussione e Conclusioni. Negli ultimi anni è stata osservata una crescente diminuzione di efficacia degli acaricidi (per es. flumetrina, cumafos, acido ossalico...). Inoltre, gli acaricidi sono sostanze chimiche che possono accumularsi come residui nel miele e nelle altre matrici apistiche. Pertanto, lo sviluppo di strategie naturali per combattere le malattie in apiario è diventato urgente. I risultati preliminari del nostro studio suggeriscono l'efficacia degli oli essenziali di cannella e origano nei confronti della varroa, senza compromettere la produttività delle famiglie.

Progetto ISS-Associazione Apicoltori ASGA 2022-2024: "Sviluppo di strategie naturali per combattere il parassita *Varroa destructor* e potenziare la risposta immunitaria dell'ape mellifera"

Parole chiave. *Apis mellifera*, oli essenziali, *Varroa destructor*, Peste, Virus

L'OLIO ESSENZIALE DI *PINUS MUGO* MODULA L'ATTIVAZIONE DI STAT3 MEDIANTE STRESS OSSIDATIVO E INDUCE APOPTOSI IN LINEE CELLULARI DI TUMORE ALLA PROSTATA

E. Butturini¹, M.A. Thalappil¹, A. Carcereri de Prati¹, L. Antonini², F.U. Sapienza², S. Garzoli², R. Ragno^{2,3}, S. Mariotto¹

¹Dipartimento di Neuroscienze Biomedicina e Movimento, Sezione di Chimica Biologica, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

²Dipartimento di Chimica e tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: elena.butturini@univr.it; sofia.mariotto@univr.it

Introduzione. Le proprietà farmacologiche attribuite agli oli essenziali sono principalmente l'azione antisettica, antibatterica, antivirale e quella antifungina. Tuttavia, recentemente è stato riportato che alcuni di essi possiedono proprietà antitumorali e sono in grado di aumentare la sensibilità delle cellule neoplastiche alla chemioterapia. Questa loro caratteristica ha riconquistato l'attenzione dei ricercatori e la loro possibile applicazione nella terapia antitumorale rappresenta ora un'area di ricerca in forte crescita. STAT3 è un fattore di trascrizione nucleare che regola l'espressione dei

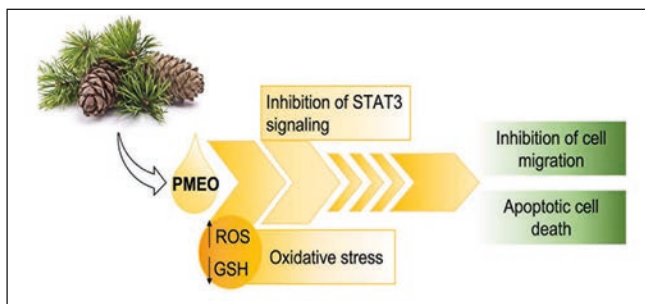


Figura 1. Olio essenziale di *Pinus mugo* (PMEO) induce stress ossidativo intracellulare modulando negativamente l'attivazione costitutiva di STAT3 con conseguente morte apoptotica e inibizione della migrazione delle cellule tumorali.

geni coinvolti nel ciclo cellulare, nella sopravvivenza cellulare e nella risposta immunitaria. Negli ultimi anni, l'attivazione alterata della via di segnale è stata individuata come una delle cause dell'insorgenza e dello sviluppo di tumori, identificando STAT3 come un nuovo target terapeutico per lo sviluppo di strategie coadiuvanti alla terapia classica.

Materiali e Metodi. In questo lavoro è stata valutata l'attività anti-STAT3 dell'olio essenziale di *Pinus mugo* (PMEO). La linea cellulare di tumore alla prostata DU145, caratterizzata dalla presenza di STAT3 costitutivamente attivato, è stata trattata con 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di PMEO. L'analisi della modulazione delle modifiche post-traduzionali di STAT3 e dell'espressione delle proteine regolate da STAT3 è stata effettuata con *Western Blot* mentre l'analisi dell'espressione genica con *Real Time PCR*. Inoltre, la variazione dello stato redox intracellulare indotta da PMEO è stata valutata mediante saggi spettrofotometrici. Infine, i markers apoptotici sono stati valutati con FACS e *Western Blot*.

Risultati e Discussione. I dati ottenuti dimostrano che PMEO inibisce l'attivazione di STAT3 con $\text{IC}_{50} = 25\mu\text{g}/\text{mL}$ in entrambe le linee cellulari utilizzate portando alla diminuzione dell'espressione di proteine anti-apoptotiche ed anti-proliferative ad esso legate. Il meccanismo molecolare dell'attività anti-STAT3 è legato alla capacità pro-ossidante dell'olio essenziale e alla natura redox sensibile di STAT3. Infatti, il trattamento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di PMEO induce un aumento della concentrazione dei ROS intracellulari e un rapido calo del livello di GSH citosolico. Il conseguente effetto biologico dell'inattivazione di STAT3 è la morte cellulare ($\text{IC}_{50} = 70\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 24 e 48 ore rispettivamente).

Conclusioni. Questo lavoro evidenzia l'importanza della via di segnale di STAT3 nell'azione citotossica del PMEO e costituisce un punto di partenza per lo sviluppo di una terapia adiuvante alla chemioterapia ad oggi in uso, permettendo di limitarne gli effetti tossici collaterali. Una rappresentazione grafica dell'attività biologica di PMEO è riportata in Figura 1.

Parole chiave. *Pinus mugo*, Olio essenziale, STAT3

EFFETTI DELL'IDROLATO DI *CITRUS AURANTIUM* L. SUI BATTERI SIMBIONTI DELLE OVATURE DI *HALYOMORPHA HALYS* STÅL

P. Mattarelli¹, S. Francati¹, D. Fortini¹, M. Modesto¹, D. Scarafile¹, M. Di Vito², M.L. Dindo¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Università di Bologna, Bologna, Italia

²Dipartimento di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia
e.mail: paola.mattarelli@unibo.it

Introduzione. La cimice marmorata, *Halyomorpha halys* Stål, è originaria dell'Asia orientale, ma si è ampiamente diffusa in Europa e Nord Ameri-

ca. *Halyomorpha halys* è una specie polifaga, che si nutre di numerose piante causando ingenti danni a importanti prodotti agricoli come mele, pere, ciliegie, fagioli, mais e soia. È noto che le interazioni simbiotiche fra microrganismi e insetti sono di grande rilievo per la normale crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza degli insetti ospiti, spesso fornendo nutrienti non disponibili nella loro dieta (1). In *H. halys* i microrganismi simbiotici sono stati evidenziati nell'intestino medio, ma anche in associazione con le uova, suggerendo una modalità di trasmissione dei simbionti attraverso eredità materna verticale (2). I simbionti delle uova sembrano in stretto rapporto con la *fitness* delle cimici. Lo scopo del presente lavoro è stato lo studio dell'efficacia dell'idrolato di fiori di *Citrus aurantium* L. var. *amara*, che ha proprietà antimicrobiche (3), per contrastare lo sviluppo di *H. halys* analizzando sia l'effetto sui simbionti delle uova sia sui vari stadi di sviluppo dopo esposizione all'idrolato.

Materiali e Metodi. Sono state saggiate ovature di *H. halys* esposte al GELYD (4) [gellano al 2% addizionato di 50 o 75% di idrolato di *C. aurantium amara* (Erboristeria Magentina®, Poirino, TO)]. Per l'allevamento sono stati utilizzati contenitori in polimetilmetacrilato da 30x45x45 cm, aventi due aperture coperte da una rete metallica. È stata monitorata la crescita degli insetti fino al II stadio di neanidi. Per il saggio microbiologico sono state eseguite conte vitali delle ovature in Luria Bertani medium con incubazione a 27°C in aerobiosi.

Risultati. La formulazione GELYD ha permesso il lento e costante rilascio in atmosfera di vapori di idrolato (effetto fumigante). Dal punto di vista microbiologico non ci sono stati risultati significativi sul numero di simbionti presenti nelle uova trattate rispetto a quelle di controllo anche se è stato rilevato un *trend* di diminuzione del numero di microrganismi nelle uova esposte all'idrolato di arancio. È stato osservato che il GELYD non ha avuto effetto sul numero di uova schiuse mentre ha provocato una riduzione significativa del tempo di sviluppo da uovo ad adulto (analisi della varianza semplice; p value = 0,047). Non sono stati rilevati effetti significativi sulla fecondità delle femmine sia di prima che di seconda generazione.

Discussione e Conclusioni. Questo studio, anche se ha evidenziato solo effetti limitati dell'idrolato di arancio come possibile insetticida contro la cimice asiatica, è tuttavia importante per la messa a punto di un protocollo di fumigazione per il saggio di sostanze naturali sugli insetti che potrà avere futuri sviluppi per studi con altre sostanze naturali. Questo studio apre prospettive interessanti per l'incremento della sostenibilità dei programmi di controllo biologico e integrato attualmente impiegato su insetti dannosi.

Studio condotto nell'ambito del Centro Nazionale Agritech, finanziato dall'Unione Europea – NextGenerationEU (PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR) – MISSIONE 4 COMPONENTE 2, INVESTIMENTO 1.4 - D.D. 1032 17/06/2022, CN00000022). I punti di vista e le opinioni espresse sono tuttavia solo quelli degli autori e non riflettono necessariamente quelli dell'Unione europea o della Commissione europea. Né l'Unione Europea né la Commissione Europea possono essere ritenute responsabili per essi.

Bibliografia

- (1) Bansal R., Michel A.P., Sabree, Z.L. (2014) - The crypt-dwelling primary bacterial symbiont of the polyphagous pentatomid pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, 43: 617-625.
- (2) Feldharr H. (2011) - Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. (2011) *Ecological Entomology*, 36: 533-543.

Tabella 1. Percentuali di germinazione dei semi di *Araujia sericifera* trattati con oli di *Citrus sinensis*, *Laurus nobilis*, *Myrtus communis* e *Citrus limon*.

Treatment	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Myrtus communis</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus limon</i>
CONTROLLO	96,0 ± 2,2a	99,0 ± 1,0a	99,0 ± 1,0a	99,0 ± 1,0a
0,125 µL/mL	93,0 ± 3,0a	45,0 ± 11,2b	25,0 ± 7,8b	7,0 ± 3,3b
0,25 µL/mL	54,0 ± 11,3b	50,0 ± 10,6b	9,0 ± 2,8c	0,0 ± 0,0c
0,5 µL/mL	59,0 ± 11,5b	18,0 ± 8,1c	11,0 ± 3,5c	0,0 ± 0,0c
1 µL/mL	54,0 ± 8,2b	15,0 ± 9,3c	7,0 ± 3,0c	0,0 ± 0,0c

(3) Di Vito M., Vergari L., Mariotti, M., Proto, M.R., Barbanti, L., Garzoli, S., Sanguinetti M.; Sabatini L., Peduzzi A., Bellardi M.G., Mattarelli, P., Bugli F., De Luca D. (2022) - Anti-Mold effectiveness of a green emulsion based on *Citrus aurantium* hydrolate and *Cinnamomum zeylanicum* essential oil for the modern paintings restoration. *Microorganisms*, 10, 205. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020205>
 (4) Di Vito M., Bellardi M.G., Colaizzi P., Ruggiero D., Mazzuca C., Micheli M., Paolesse R., Stefanelli M., Capuano R., Mondello F., Mattarelli P., Sclocchi M. C. (2018) - Potenziale uso di idrolati in forma "GELYD" come prevenzione per biodeteriogeni in ambienti confinati. *Natural* 1, 176: 87.

Parole chiave: Gellano, Arancio amaro, Effetto fumigante, Sviluppo insetti

CONTROLLO DELLA GERMINAZIONE IN VITRO DI *ARAUJIA SERICIFERA* CON OLI ESSENZIALI DI *LAURUS NOBILIS*, *MYRTUS COMMUNIS*, *CITRUS SINENSIS* E *CITRUS LIMON*

N. Melero¹, M. Calle¹, N. Torres^{1,2}, S. Bellitti^{1,2}, M. Mezzano^{1,2}, D. Gómez de Barreda³, M.A. Blázquez⁴, H. Boira¹, M. Verdeguer¹

¹Universitat Politècnica de València, Instituto Agroforestal Mediterráneo, Valencia, Spagna

²Università degli Studi di Palermo, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Palermo, Italia

³Universitat Politècnica de València, Departamento de Producción Vegetal, Valencia, Spagna

⁴Universitat de València, Facultat de Farmàcia, Departament de Farmacologia, Valencia, Spagna

e.mail: [HYPERLINK "mailto:niemecar@upv.es"](mailto:HYPERLINK)niemecar@upv.es

Introduzione. *Araujia sericifera* Brot è una infestante dicotiledone di origine sudamericana (1). La sua elevata capacità di adattamento, soprattutto nelle aree vicine al mare (2) la rende una infestante molto aggressiva, capace di insediarsi tanto in ambienti alterati (campi coltivati) come in ambienti naturali, ed è particolarmente pericolosa negli allevamenti di agrumi, dove colonizza completamente l'albero (2). Nel presente lavoro, si è studiata l'attività erbicida *in vitro* degli oli essenziali (OE) di *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Citrus limon* (L.) Osbeck per il controllo di *A. sericifera*.

Materiali e Metodi. Per l'estrazione degli OE, foglie di *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck varietà *Navelina* sono state raccolte nei giardini e nei campi di Moncada (provincia di Valencia, Spagna), e foglie di *Citrus limon* (L.) Osbeck varietà *Eureka* dall'agrumeto dell'Universitat Politècnica di València, all'inizio di marzo 2010. Gli OE sono stati analizzati con gascromatografia-spettrometria di massa. Dieci semi di *A. sericifera* sono stati seminati in piastre Petri (9 cm diametro), e trattati con 4 mL di acqua distillata (controllo) e le corrispondenti soluzioni degli OE testati: 0,125, 0,25, 0,5 e 1 µL/mL (10 ripetizioni sono state eseguite per ogni trattamento). I semi sono stati incubati in camera di germinazione a 30,0 ± 0,1 °C 16 ore di luce e 20,0 ± 0,1 °C 8 ore di oscurità. Per valutare l'attività erbicida degli OE la germinazione dei semi è stata rilevata 3, 5, 7, 10 e 14 giorni dopo i trattamenti. I dati sono stati analizzati applicando un'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test di confronto multiplo di Fisher (LSD, Least Significant Difference) per la separazione delle medie, con un livello di confidenza del 95% (P≤0,05).

Risultati. La massima efficienza nel ridurre la germinazione di *A. sericifera* è stata raggiunta con l'OE di limone (Tab. 1), che ha permesso di ottenere un'inibizione del 100% a partire dalla dose di 0,25 µL/mL. L'OE di arancia ha raggiunto un'inibizione del 93% con la massima dose testata (1 µL/mL). L'OE di mirto ha conseguito un'inibizione dell'85% con la dose di 1 µL/mL, senza differenze significative con la dose di 0,5 µL/

mL. L'OE di alloro è stato il più inefficace, ottenendo una riduzione del 44% con la dose di 1 µL/mL.

Discussione. Questi OE sono stati testati su altre specie e hanno dimostrato la sua attività erbicida: l'OE di alloro ha inibito completamente la germinazione di *Amaranthus retroflexus* (3); l'OE di mirto ha ridotto la germinazione e la crescita delle piantine di diverse infestanti (4); l'OE di arancio ha inibito la germinazione di *Euphorbia heterophylla* (5) e l'OE di limone ha ridotto significativamente la germinazione di *Raphanus sativus* (6).

Conclusioni. Tutti gli OE testati hanno dimostrato un'ottima capacità di inibire la germinazione di *A. sericifera*, in particolare gli OE degli agrumi. I risultati conseguiti dimostrano che gli OE sono uno strumento efficace per il controllo delle infestanti, anche quelle invasive.

Bibliografia

- (1) Bellache M., Moltó N., Benfekih L.A., Torres-Pagan N., Mir R., Verdeguer M., Boscaiu M., Vicente O. (2022) - Physiological and Biochemical Responses to Water Stress and Salinity of the Invasive Moth Plant, *Araujia sericifera* Brot., during Seed Germination and Vegetative Growth. *Agronomy*, 12: 361.
- (2) Sanz Elorza M., Dana Sánchez E.D., Sobrino Vesperinas E. (2004) - Atlas de las Plantas Alóctonas Invasoras en España. Dirección General para la Biodiversidad. Madrid, 80-81.
- (3) Hazrati H., Saharkhiz M.J., Moein M., Khoshghalb H. (2018) - Phytotoxic effects of several essential oils on two weed species and Tomato, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13: 204-212.
- (4) Kordali S., Usanmaz A., Cakir A., Komaki A., Ercisli S. (2016) - Antifungal and herbicidal effects of fruit essential oils of four *Myrtus communis* genotypes. *Chemistry & Biodiversity*, 13(1): 77-84.
- (5) Ribeiro J.P.N., Lima M.I.S. (2012) - Allelopathic effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel essential oil. *Acta Botanica Brasiliica*, 26: 256-259.
- (6) Caputo L., Cornara L., Bazzicalupo M., De Francesco C., De Feo V., Trombetta D., Smeriglio A. (2020) - Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Peels of Three *Citrus* Species. *Molecules*, 25: 1890.

Parole chiave. Oli essenziali, *Araujia sericifera*, Germinazione, Bioerbicida

PROPRIETÀ ANTIBATTERICA DEGLI OLI ESSENZIALI NEI CONFRONTI DI PATOGENI GRAM-POSITIVI E GRAM-NEGATIVI

L. Narciso, S. Ferraiuolo, M. Topini, C. Marianelli

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia
 e.mail: laura.narciso@iss.it

Introduzione. La resistenza dei batteri agli antibiotici è un'emergenza globale perché minaccia la vita di milioni di persone. L'uso prolungato, eccessivo e non regolamentato per decenni dei farmaci antibiotici ha provocato la selezione di ceppi resistenti e multiresistenti agli antibiotici usati in medicina, rendendo così inefficaci i trattamenti terapeutici. Molti ricercatori stanno studiando il modo per fermare questa emergenza mediante la ricerca di nuovi agenti antibatterici. In questo studio abbiamo valutato le proprietà antibatteriche di alcuni degli oli essenziali più utilizzati nei confronti di diversi patogeni batterici Gram-positivi e Gram-negativi di interesse clinico.



Figura 1. Test dello spot degli oli essenziali su terreno solido.

Materiali e Metodi. Sono stati inclusi nello studio un totale di 14 patogeni batterici che comprendevano sia ceppi di referenza (n=9), sia ceppi di campo isolati da animali infetti (n=5). Di questi patogeni, nove erano Gram-positivi – *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e ATCC 16805, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. agalactiae* LMG 14838 e *S. uberis* LMG 7930 - e cinque Gram-negativi – *Enterococcus faecalis* ATCC 2912, *Salmonella Thyphimurium* 1420 e 1344, *Escherichia coli* e *E. coli* ATCC 25922). Mediante il metodo dello spot su agar (1) è stata testata la sensibilità dei batteri a 18 diversi oli essenziali tal quali su due differenti terreni di coltura solidi: *Brain Heart Infusion* (BHI) e *Mueller-Hinton* (MH). Gli oli essenziali includevano: cannella (*Cinnamomum verum*), bergamotto (*Citrus bergamia*), limone (*Citrus limon*), cumino (*Cuminum cyminum*), ginepro (*Juniperus*), lavanda (*Lavandula officinalis*), alloro (*Laurus nobilis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), menta (*Mentha piperita*), mirto (*Myrtus communis*), basilico (*Ocimum basilicum*), origano (*Origanum vulgare*), pepe nero (*Piper nigrum*), rosmarino (*Salvia rosmarinus*), salvia (*Salvia officinalis*), chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*), timo (*Thymus vulgaris*) e zenzero (*Zingiber officinale*). Le proprietà antibatteriche sono state valutate misurando l'alone di inibizione formatosi dopo 24 ore, 48 ore e 7 giorni di incubazione a 37 °C.

Risultati. I risultati ottenuti sui due diversi terreni di coltura sono stati molto simili fra loro, con poche eccezioni. Il terreno BHI ha consentito di evidenziare un maggior numero di oli essenziali efficaci nei confronti di *L. monocytogenes*, *S. epidermidis*, *S. dysgalactiae*, *S. Thyphimurium* 1344 e *E. coli* ATCC 25922; il terreno MH invece lo è stato nei confronti di *E. faecalis* e di entrambi i ceppi di *S. aureus*. In generale, i batteri Gram-positivi sono risultati sensibili ad un maggior numero di oli essenziali, rispetto ai Gram-negativi. Gli oli essenziali di origano, timo e melaleuca sono risultati i più efficaci, su entrambi i terreni utilizzati (Fig. 1). Infine, l'attività antibatterica si è dimostrata, per la maggior parte degli oli, stabile nel tempo.

Discussione e Conclusioni. Non esistono metodi ufficiali per la valutazione *in vitro* delle proprietà antibatteriche degli oli essenziali. Sono descritti una grande varietà di metodi, sia in terreno liquido sia in terreno solido. In questo studio gli oli essenziali hanno mostrato proprietà antibatteriche su entrambi i terreni BHI e MH solidi, sebbene con piccole variazioni. Inoltre, gli oli essenziali di cannella, timo e melaleuca sono risultati i più efficaci e con il più ampio spettro di azione.

Bibliografia

(1) Gheorghita D., et al. (2022) - *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils against four different microbial strains. *Appl. Sci.*, 12, 9482.

Parole chiave. Batteri Gram-positivi e Gram-negativi, Oli essenziali, Agar spot test, Attività antibatterica

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DEL CARVACROLO IN ASSOCIAZIONE CON OFLOXACINA O GENTAMICINA NEI CONFRONTI DI BATTERI GRAM-NEGATIVI ANTIBIOTICO-RESISTENTI

G. Ginestra¹, A. Marino¹, L. Ferrer², G. Granata², G.M.L. Consoli², A. Nostro¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Messina, Italia

²Istituto di Chimica Biomolecolare - C.N.R. Catania, Italia
e.mail: antonia.nostro@unime.it

Introduzione. L'emergenza globale dell'antimicrobico-resistenza, unitamente al ridotto sviluppo di nuove molecole antibiotiche, rappresenta un grave problema di salute pubblica che richiede urgenti strategie di intervento. Una prospettiva promettente è rappresentata dalla possibilità di combinare oli essenziali o loro componenti con gli antibiotici. Tra i componenti di molti oli essenziali, il carvacrolo emerge per le sue proprietà biologiche, tra le quali l'attività antimicrobica nei confronti di microrganismi sia in fase planctonica che sotto forma di biofilm. Scopo di questo studio è ampliare le conoscenze e valutare i possibili effetti sinergici o additivi del carvacrolo in associazione con ofloxacina o gentamicina.

Materiali e Metodi. I microorganismi usati in questo studio sono stati i seguenti: *Escherichia coli* ATCC 10536, *E. coli* DSM 105388 produttore di ESBL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* DSM 102273 produttore di VIM-2 e *Acinetobacter baumannii* DSM 106838 multiresistente. La MIC del carvacrolo, ofloxacina e gentamicina sono state determinate mediante il metodo delle microdiluzioni in brodo secondo le procedure standard stabilite dal CLSI (2018). L'attività del carvacrolo in associazione con ofloxacina o gentamicina è stata determinata mediante il metodo del *checkerboard*. La combinazione è stata valutata attraverso la determinazione della FICI interpretato in accordo con le seguenti linee guida EUCAST (2000): effetto sinergico FICI ≤ 0.5; effetto additivo FICI >0.5 - ≤ 1; indifferenza FICI >1 - < 2; antagonismo FICI ≥ 2.

Risultati. I valori di MIC sono risultati compresi nei seguenti range: 0,015 - 0,5% per il carvacrolo, 0,03 - 128 µg/mL per l'ofloxacina e 0,5 - 128 µg/mL per la gentamicina. *E. coli* DSM 105388, *P. aeruginosa* DSM 102273 e *A. baumannii* DSM 106838 sono risultati resistenti ad entrambi gli antibiotici. La combinazione carvacrolo-ofloxacina ha mostrato sinergia nei confronti di *P. aeruginosa* DSM 102273 e *A. baumannii* (FICI = 0.5) ed un effetto additivo (FICI = 0.75-1) nei confronti di *P. aeruginosa* ATCC 9027 ed *E. coli*. Un effetto sinergico è stato individuato anche per la combinazione carvacrolo-gentamicina nei confronti di *E. coli* ATCC 10536 e di entrambi i ceppi di *P. aeruginosa* (FICI = 0.37 - 0.50), con una riduzione dei valori di MIC dell'antibiotico di 4 - 8 volte. La stessa associazione è risultata additiva (FICI = 0.75) nei confronti di *E. coli* DSM 105388. Il fenomeno dell'antagonismo non è stato osservato per alcun ceppo.

Discussione e Conclusioni. La sinergia rilevata nell'associazione carvacrolo-ofloxacina e carvacrolo-gentamicina consente di ridurre la dose

minima efficace di antibiotico e moderarne gli effetti negativi. I risultati di questo studio sono promettenti per future opzioni di trattamento combinato nei confronti delle infezioni causate da batteri Gram negativi antibiotico-resistenti. Le combinazioni più efficaci saranno intrappolate in sistemi nanostrutturati per una maggiore stabilità e rilascio controllato dei principi attivi.

Parole chiave. Antimicrobico-resistenza, Batteri Gram-negativi, Carvacrolo, Ofloxacina, Gentamicina, Sinergia

LE PROPRIETÀ ANTI-VIRULENZA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *CORIDOTHYMUS CAPITATUS* CONTRO ISOLATI CLINICI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DA PAZIENTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA

R. Papa, M. Trecca, I. Paris, F. Geremicca, M. Artini, L. Selan

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: rosanna.papa@uniroma1.it

Introduzione. *Pseudomonas aeruginosa* è un patogeno opportunista responsabile di infezioni nosocomiali, spesso coinvolto nelle infezioni delle vie aeree dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) (1). La virulenza di *P. aeruginosa* è correlata alla sua capacità di formare biofilm, alla sua motilità, esplicata attraverso diverse strategie, e alla produzione di tossine (2). L'espressione di questi fattori di virulenza è finemente controllata dal *quorum sensing* (QS) (3). L'inibizione del sistema QS è considerata una nuova strategia per lo sviluppo di composti anti-virulenza che agiscono su specifici programmi di patogenicità batterica senza influire sulla vitalità batterica. In questo scenario, gli oli essenziali (OE) hanno acquisito notorietà per il loro ruolo nella modulazione del fenotipo, inclusa la modulazione della virulenza (4,5).

Materiali e Metodi. In questo studio è stata analizzata l'attività dell'olio essenziale estratto da *Coridothymus capitatus* (CCOE) contro specifici fattori di virulenza prodotti da *P. aeruginosa* isolati da pazienti affetti da FC. L'effetto del CCOE è stato studiato sia nel test di pre-adesione (formazione del biofilm) che sul biofilm maturo. Inoltre, è stato valutato l'effetto del CCOE anche su altri fattori di virulenza come la produzione di piocianina e la motilità *swarming* e *swimming*.

Risultati. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il CCOE è in grado di inibire sia la formazione *de novo* del biofilm che di ridurre il biofilm maturo. Su ceppi selezionati è stata condotta un'analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) che ci ha fornito interessanti informazioni sull'azione del CCOE. Il trattamento con il CCOE ha mostrato una drastica modifica della struttura della matrice extracellulare (ECM) del biofilm, indipendentemente dalle peculiarità strutturali di ciascun isolato clinico. I nostri risultati hanno mostrato una drastica riduzione della produzione del fattore di virulenza piocianina per tutti i ceppi analizzati in presenza del CCOE. Inoltre, il CCOE ha mostrato la capacità di influenzare fortemente la motilità *swarming* e *swimming* di *P. aeruginosa*, riducendola drasticamente.

Discussione e Conclusioni. Una spiegazione plausibile di questi risultati può essere trovata nella composizione chimica del CCOE, particolarmente ricco in carvacrolo (61%); esso è, infatti, noto in letteratura

per la sua capacità di ridurre la virulenza inibendo la cascata del QS. In considerazione dei risultati ottenuti sui ceppi clinici isolati da pazienti affetti da FC, il CCOE potrebbe essere considerato un potenziale candidato per limitare la virulenza di *P. aeruginosa* in questa tipologia di infezioni.

Bibliografia

- (1) O'Sullivan B.P., Freedman S.D. (2009) - Cystic fibrosis. *Lancet*, 373: 1891-1904.
- (2) Castillo-Juarez I., Lopez-Jacome L.E., Soberon-Chavez G., Tomas M., Lee J., Castaneda-Tamez P., et al. (2017) - Exploiting quorum sensing inhibition for the control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* biofilms. *Curr. Top. Med. Chem.*, 17: 1915-1927.
- (3) Rosales-Reyes R., Vargas-Roldán S.Y., Lezana-Fernández J.L., Santos-Preciado J.I. (2020) - *Pseudomonas aeruginosa*: genetic adaptation, a strategy for its persistence in cystic fibrosis. *Arch. Med. Res.*, S0188-4409: 32245-32251.
- (4) Ouyang J., Sun F., Feng W., Sun Y., Qiu X., Xiong L., et al. (2016) - Quercetin is an effective inhibitor of *quorum sensing*, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.*, 120: 966-974.
- (5) Artini M., Patsilinakos A., Papa R., Božović M., Sabatino M., Garzoli S. et al. (2018) - Antimicrobial and antibiofilm activity and machine learning classification analysis of essential oils from different Mediterranean plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 23: 482.

Parole chiave. *Pseudomonas aeruginosa*, Fibrosi cistica, Antivirulenza, Motilità, Biofilm, Piocianina

COMPOSIZIONE E ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E ANTINFIAMMATORIA DELL'OLIO ESSENZIALE E ANALISI MICROMORFOLOGICHE DELLE FOGLIE DI CINQUE EUCALIPTI TUNISINI

F. Polito¹, F. Nazzaro², F. Fratianni², L. Cornara³, P. Malaspina³, G. Ercolano⁴, V. De Feo^{1,2}

¹DIFARMA, Università di Salerno, Salerno, Italia

²Istituto di Scienze dell'Alimentazione, CNR-ISA, Avellino, Italia;

³DISTAV, Università di Genova, Genova, Italia

⁴DIFARMA, Università di Napoli, Napoli, Italia

e.mail: fpolito@unisa.it

Introduzione. Molte specie del genere *Eucalyptus* si sono diffuse ampiamente dal loro areale originario e sono oggi coltivate in tutto il mondo, soprattutto a scopo di rimboschimento e ripristino ambientale, come è avvenuto ad esempio in Tunisia. La crescente consapevolezza della presenza di molecole bioattive, soprattutto nelle loro frazioni volatili, rende le piante di questo genere un solido punto di partenza per ottenere prodotti utili a molti settori, in primis quello sanitario e quello agricolo.

Materiali e Metodi. Foglie raccolte da cinque specie di eucalipto coltivate in Tunisia (*E. alba*, *E. eugenioides*, *E. fasciculosa*, *E. robusta* e *E. stoatei*), sono state osservate allo stereomicroscopio per valutare le caratteristiche macro-morfologiche e tramite microscopia ottica (LM) ed elettronica a scansione (SEM) per valutare quelle micro-morfologiche. Gli oli essenziali sono stati ottenuti tramite idrodistillazione e la loro composizione è stata determinata tramite metodiche di gascromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS). L'attività antiossidante è stata determinata utilizzando i saggi al 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH), saggio con acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS), test di vitalità cellulare, misurazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quantificazione di nitriti.

Risultati. L'analisi macro-morfologica ha evidenziato come le cinque specie presentano foglie adulte con forme e caratteristiche diverse. L'analisi micro-morfologica ha evidenziato invece elementi comuni a livello strutturale (Fig. 1). Sono stati identificati 31 componenti degli oli essenziali: in tutti i campioni, ad eccezione di *E. alba*, predominano i monoterpene con l'eucaliptolo come maggiore costituente, mentre in *E. alba* il componente principale è l' α -pinene. I saggi biologici hanno evidenziato una forte attività antiossidante di tutti i campioni che, d'altro canto non hanno influenzato in modo significativo la vitalità cellulare. Inoltre, il pretrattamento delle cellule con gli oli essenziali ha soppresso la produzione cellulare di ROS in modo marcato come pure la produzione di ossido nitrico cellulare, dimostrandone l'effetto antiossidante.

Discussione. Le osservazioni macro e micro-morfologiche confermano i dati di letteratura per quanto riguarda la struttura fogliare, mentre evidenziano differenze rispetto alla localizzazione delle cavità secretorie. Escludendo *E. alba*, la composizione degli oli essenziali studiati differisce da quelle riportate in letteratura, peraltro abbastanza scarsa. Pochi sono anche gli studi sull'attività antiossidante degli oli essenziali. La loro marcata attività antiossidante potrebbe essere ascritta all'elevato contenuto percentuale in monoterpene e alla loro azione sinergica (1). In letteratura non sono disponibili studi di valutazione di attività antiossidante a livello cellulare effettuati sulle specie in esame. Sono presenti però altri studi (2-4) che evidenziano attività antinfiammatoria, attraverso differenti meccanismi cellulari, di oli essenziali di diverse specie di eucalipto.

Conclusioni. Le proprietà antiossidanti e l'attività antinfiammatoria *in vitro* dimostrate nel presente studio, suggeriscono che questi oli essenziali di eucalipto possono essere considerati una promettente strada per il disegno di strategie terapeutiche per alcune patologie infiammatorie.

Bibliografia

(1) Ben-Marzoug H.N., Bouajila J., Ennajar M., Lebrichi A., Romdhane M. (2010) - *Eucalyptus (gracilis, oleosa, salubris, and salmophloia)* essential

oils: Their chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Food*, 13: 1005-1012.

(2) Tsai M.L., Lin C.C., Lin W.C., Yang C.H. (2011) - Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75: 1977-1983.

(3) Gbenou J.D., Ahounou J.F., Akakpo H.B., Laleye A., Yayi E., Gbaguidi F., Baba-Moussa L., Darboux R., Dansou P., Moudachirou M., Kotchoni S.O. (2013) - Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular Biology Reports*, 40: 1127-1134.

(4) Ho C.L., Li L.H., Weng Y.C., Hua K.F., Ju T.C. (2020) - *Eucalyptus* essential oils inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through reducing MAPK and NF- κ B pathways. *BMC Complementary Medicines and Therapies*, 20: 200.

Parole chiave. Eucalipto, Anatomia fogliare, Olio essenziale, Composizione, Attività antiossidante, Attività antinfiammatoria

PROGETTAZIONE DI MISCELE DI OLI ESSENZIALI E LORO COMPONENTI PURI PER APPLICAZIONI IN AMBITO COSMETICO

S. Manfredini^{1,2}, C. Rossi^{1,2}, G. Bellonzi^{1,2}, E. Baldini¹, A. Baldisserotto¹, S. Vertuani^{1,2}, R. Astolfi³, F.U. Sapienza³, R. Ragno³

¹Master in Scienza e Tecnologia Cosmetiche COSMAST, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia

²Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia

³Rome Center for Molecular Design, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

e.mail: smanfred@unife.it

CICLISTA QUOTIDIANO?



VIENI A SCOPRIRE BC
 LA RIVISTA PER TE CHE AMI E VIVI LA BICI
 COLLEGATI A WWW.RIVISTABC.COM
 E SCARICA SUBITO LA TUA COPIA OMAGGIO

PARAMETRI		COEFFICIENTI	
Algoritmo ML	KNN	MCC _{pred}	0,69
Valore Soglia	0,0119 % v/v	MCC _{cv}	0,67
OE Attivi	53	MCC _{fit}	1,00
OE Non attivi	211	ACC _{pred}	0,83

Tabella 1. Parametri di addestramento del dataset e coefficienti statistici del modello di classificazione finale. ML: machine learning; KNN: k-nearest neighbors; Valore Soglia: valore soglia di MIC anti *Aspergillus niger* per separare attivi e non attivi; OE Attivi: numero degli oli essenziali definiti attivi; OE Non attivi: numero di oli essenziali definiti non attivi; MCC_{pred}: coefficiente di correlazione di Matthews in predizione; MCC_{cv}: coefficiente di correlazione di Matthews in cross-validazione; MCC_{fit}: coefficiente di correlazione di Matthews in ricalcolo; ACC_{pred}: accuratezza in predizione.

Introduzione. La sicurezza microbiologica del prodotto cosmetico è un importante adempimento normativo che si applica alla produzione e vendita dei prodotti cosmetici in forza del Regolamento (CE) n. 1223/2009. Questo, oltre al rispetto delle norme di buona fabbricazione e al controllo microbiologico del prodotto cosmetico immesso nel mercato, prevede la verifica dell'efficacia del sistema conservante mediante Challenge Test, un test che simula lo scenario di un possibile inquinamento del cosmetico durante il suo utilizzo da parte del consumatore e che sfida la capacità conservante del prodotto mediante inoculo di 5 microorganismi: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ed *Aspergillus brasiliensis*. In questo studio sono stati selezionati una serie di dati relativi alla composizione quali-quantitativa di oli essenziali (OE) provenienti da diverse specie botaniche e saggiati nei confronti di *Aspergillus niger*, un fungo che ai fini di questo studio, sia per somiglianza genetica che per sensibilità antimicrobica è equiparato ad *A. brasiliensis*. I dati sono stati raccolti da letteratura scientifica (2010–2020), caricati nel database PyEO (eo.3d-qsar.com) e impiegati per definire un modello predittivo volto alla realizzazione di miscele di OE o componenti puri dotati di una maggiore potenza nei confronti di *A. niger*, per potenziali applicazioni funzionali alla stabilità microbiologica del prodotto cosmetico.

Materiali e Metodi. Da PyEO è stato compilato un dataset di 264 oli essenziali con associati i dati di MIC contro *A. niger*, per un totale di 3118 componenti chimiche. Mediante la piattaforma Jupyter Notebook e utilizzando il linguaggio Python, il dataset è stato utilizzato per generare una serie di modelli con algoritmi machine learning (ML), valutando la riproducibilità, la predittività e la robustezza con il coefficiente di correlazione di Matthews (MCC), utilizzando la tecnica della doppia cross-validazione.

Risultati e Discussione. Il modello finale è stato ottenuto mediante l'algoritmo KNN ed è stato selezionato per il valore massimo di predittività utilizzando un valore di threshold di 0,0119% v/v (MIC) per binarizzare il dataset in OE attivi (1) e non attivi (0). Il modello ha dimostrato di classificare i dati del test set con un'accuratezza di oltre l'83% e con un valore di MCC, in predizione, di circa 0,7 (Tab. 1). Il modello finale è risultato inoltre capace di riclassificare perfettamente i dati del training set (MCC_{fit} = 1,0) con un ottimo livello di robustezza (MCC_{cv} = 0,68). Le prove di efficacia antimicrobica, espressa come MIC, di miscele progettate con il modello finale sono in corso e saranno presentate durante il congresso.

Conclusioni. In questo studio si riporta un'applicazione di tecniche ML volte alla progettazione di oli essenziali o di miscele di essi o di miscele di componenti puri. L'approccio si propone di utilizzare l'enorme mole di dati sperimentali già disponibili in letteratura, ma attualmente difficilmente confrontabili per l'eterogeneità dei metodi analitici e delle unità di misura utilizzate, per lo studio razionale delle attività di singoli oli essenziali in funzione della loro composizione e per la predizione di attività di miscele appositamente allestite. I dati preliminari indicano inoltre che

con questa tecnica sarà possibile affrontare in parte anche il problema dell'impiego degli oli essenziali relativamente alla loro standardizzazione. Si auspica infatti che modelli sempre più rifiniti permetteranno la "correzione" di OE. In sostanza, anziché standardizzare la composizione chimica, il metodo propone la standardizzazione delle caratteristiche biologiche degli OE.

Parole chiave. *Aspergillus niger*, Machine Learning, Progettazione di oli essenziali, Cosmetici

CHEMICAL COMPOSITION INVESTIGATION AND ANTI-CANDIDA ACTIVITY OF MENTHA SUAVEOLENS EHRH. ESSENTIAL OILS OBTAINED BY CONTINUOUS AND FRACTIONATED HYDRODISTILLATION AND STEAM DISTILLATION

V. Tadić¹, M. Božović², M. Sabatino³, F. Sapienza³, M.F. Zaka⁴, F. Del Bove⁴, F. Borzacchi⁵, C. Rossi⁶, S. Vertuani⁶, A. Baldisserotto⁶, S. Manfredini⁶, R. Ragno³

¹Institute of Medicinal Plants Research Dr. Josif Pančić, Belgrade, Serbia

²Faculty of Natural Science and Mathematics, University of Montenegro, Podgorica, Montenegro

³Rome Center for Molecular Design, Department of Drug Chemistry and Technology, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

⁴Department of Drug Chemistry and Technology, Bachelor Course in Applied Pharmaceutical Sciences, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

⁵Garden Center "98.3 piante mediterranee", Tarquinia, Viterbo, Italy

⁶Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy
e.mail: vtadic@mocbilja.rs

Introduction. As a continuation of a previous study and a part of the long-running investigation on *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae), a comparative study on essential oils extracted from the plant material harvested in Tarquinia (Viterbo, Italy) is reported herein.

Materials and Methods. Two extraction procedures were investigated: hydrodistillation and steam distillation, carried out as continuous and fractionated. Both fresh and dried plant materials from two harvests were used. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used for the chemical composition analysis. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the micro-broth dilution method.

Results and Discussion. The hydrodistillation method yielded a higher amount of essential oil, while as expected dried plant furnished a significantly increased content of essential oil per kg of starting plant material. The GC-MS analysis confirmed essential oils of *M. suaveolens* Ehrh. from Tarquinia to belong to the piperitenone oxide-rich chemotype. The analysis of 112 essential oils revealed that in addition to piperitenone oxide, piperitenone, *p*-cymen-8-ol and limonene were among the most present compounds through the various samples with relative amounts over 30% (Tab. 1). A greater amount of piperitenone oxide was obtained through hydrodistillation, while the steam distillation method led to a higher percentage of piperitenone and limonene. The essential oils were characterized for their anti-*Candida albicans* efficacy; higher potency was observed for the piperitenone oxide abundant samples with MIC values ranging from 0.39 to 0.78 mg·mL⁻¹ (0.039% and 0.078% p/v). Nevertheless, as piperitenone oxide MIC was found ranging from 6.24 to 12.48 mg mL⁻¹ it is conceivable the existence of some synergistic and/or antagonistic actions among the contained compounds that are likely involved in exerting related antifungal activities.

Conclusions. The findings of this paper provide a deeper insight into the

essential oil extraction methodology and related chemical variability of *M. suaveolens* Ehrh. Some of the essential oils are very potent against *C. albicans* and can be considered for possible application in therapy.

Keywords. *Mentha suaveolens* Ehrh., Hydrodistillation, Steam distillation, Anti-Candida activity

Acknowledgments: Authors are thankful for financial support, Serbian Ministry of Science, Technological Development, and Innovation: Projects number EUREKA E! 17236 and E! 1363

RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI ANTIINFIAMMATORI: VALUTAZIONE DELLA SINERGIA DELL'ASSOCIAZIONE DICLOFENAC-OLI ESSENZIALI A POTENZIALE ATTIVITÀ ANTI-BIOFILM FUNGINO DI *CANDIDA* SPP.

A. Barbarossa¹, S. Sblano¹, R. Tardugno¹, A. Rosato¹, A. Carocci¹, L. Fumarola², M.L. Clodoveo³, F. Corbo¹, G. Fracchiolla¹

¹Dipartimento di Farmacia - Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Bari 'Aldo Moro', Bari, Italia

²Dipartimento di Medicina Interdisciplinare, Università degli Studi di Bari 'Aldo Moro', Bari, Italia

³Dipartimento di Scienze Territoriali e Agro-Ambientali, Università degli Studi di Bari 'Aldo Moro', Bari, Italia

e.mail: roberta.tardugno@uniba.it; giuseppe.fracchiolla@uniba.it

Introduzione. Le infezioni fungine da *Candida* spp. sono molto comuni ma difficili da eradicare e spesso determinano recidiva. Queste infezioni possono diffondersi e colonizzare vari distretti tissutali, compromettendo la funzionalità di diversi organi. I trattamenti farmacologici attualmente in uso prevedono una terapia convenzionale con farmaci antimicotici che spesso determinano fenomeni di resistenza. Studi recenti hanno messo in evidenza come il diclofenac ed altri farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) posseggano un'azione inibente verso molte specie fungine del genere *Candida*, soprattutto durante la formazione del biofilm. Recentemente è stata riportata l'attività antifungina di alcuni oli essenziali (OE). L'associazione FANS-OE potrebbe rappresentare una valida alternativa per il trattamento delle infezioni causate da ceppi di *Candida*.

Alla luce dei risultati preliminari da noi precedentemente riportati sull'impiego di combinazioni diclofenac-OE sulle cellule sessili di varie specie di *Candida*, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare *in vitro* l'attività sul biofilm fungino delle stesse combinazioni sinergiche diclofenac-OE (OE: *Mentha x piperita* L., *Pelargonium graveolens* L'Hér e *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betché) Cheel. (1).

Materiali e Metodi. La determinazione della composizione chimica degli OE è stata effettuata mediante l'utilizzo di gascromatografia accoppiata con spettroscopia di massa (GC-MS). L'efficacia dell'attività anti-biofilm *in vitro* è stata determinata su diversi ceppi di *Candida*. I test di suscettibilità e sinergia diclofenac-OE sono stati eseguiti utilizzando il saggio di microdiluzione.

Risultati. Le concentrazioni inibitorie minime (MIC₅₀) del diclofenac hanno riportato un valore di 2,05 mg/mL per tutti i ceppi di *Candida* considerati.

Discussione e Conclusioni. I risultati degli indici di concentrazione frazionata inibitoria (FICI) in combinazione diclofenac-OE di *P. graveolens* (FICI= 0.23-0.35) e diclofenac-OE di *M. piperita* (FICI= 0.22-0.30) hanno mostrato un'interessante attività sinergica anti-biofilm.

Questi risultati mostrano che la combinazione diclofenac-OE migliora l'attività antifungina su tutti i ceppi di *Candida* testati. Ulteriori studi *in vitro*

Compound	Frequencies	HoMean	STD	Min	Percentage					Max
					25%	50%	75%	90%	95%	
piperitenone oxide	100.0	37.6	19.7	1.2	24.3	36.4	55.6	60.6	66.0	71.7
Nepetalactone	94.6	8.2	11.0	0.0	0.5	5.5	12.4	22.2	27.1	79.8
<i>p</i> -cymene-8-ol	100.0	6.5	7.9	0.2	1.5	2.8	8.7	17.1	21.5	47.8
Piperitenone	100.0	5.1	5.8	0.1	1.2	2.9	6.5	13.1	18.6	32.9
Limonene	69.6	3.5	6.5	0.0	0.0	1.0	3.3	11.5	17.6	30.8
<i>cis</i> -piperitone epoxide	75.0	3.0	0.0	0.0	0.1	1.1	4.3	9.8	10.8	17.7
Thymol	88.4	1.9	2.3	0.0	0.2	1.0	3.2	4.9	6.4	11.4
<i>trans</i> -caryophyllene	77.7	1.6	1.5	0.0	0.2	1.3	2.3	3.5	4.4	5.9

Table 1. The most frequent chemical components across all the 112 *Mentha suaveolens* Ehrh. essential oil samples with details on their frequencies (%), average abundance (HoMean), and variance (STD). Data on percentages are also included with minimum and maximum values.

potranno approfondire e chiarire altri aspetti dell'interazione tra anti-infiammatori e OE.

Bibliografia

(1) Rosato A., Altini E., Sblano S., Salvagno L., Maggi F., de Michele G., Carocci A., Clodoveo M.L., Corbo F., Fracchiolla G. (2021) - Synergistic Activity of New Diclofenac and Essential Oils Combinations against Different *Candida* spp. *Antibiotics* (Basel), 10(6): 688.

Parole chiave. Diclofenac, Oli Essenziali, *Candida*, Biofilm

CARATTERIZZAZIONE DELL'OLIO ESSENZIALE DI SPECIE SPONTANEE DEL GENERE *THYMUS* RACCOLTE IN VALLE D'AOSTA

L. Thedy, F. Madormo, S. Ghirardi, M. Bassignana

Institut Agricole Régional, Aosta, Italia
e.mail: l.thedy@iaraosta.it

Introduzione. In Valle d'Aosta crescono diverse specie del genere *Thymus* allo stato spontaneo, tra cui *Thymus vulgaris*, *Thymus praecox* subsp. *polytrichus* e *Thymus pulegioides*. Nell'ambito del progetto *OpThymus*, finanziato dalla Fondazione CRT, volto alla valorizzazione dei timi autoctoni dell'arco alpino occidentale, è stata studiata la composizione dell'olio essenziale, allo scopo di contribuire all'innovazione di prodotto e di processo delle piante officinali in Valle d'Aosta e di fornire informazioni tecniche alle aziende di trasformazione locali.

Materiali e Metodi. Nell'anno 2019 sono state selezionate due popolazioni di *T. vulgaris*, individuate sulla base di attività sperimentali condotte in precedenza (1) nei comuni di Quart e Saint-Denis e tre popolazioni di *T. praecox* subsp. *polytrichus* e di *T. pulegioides*, provenienti da altrettanti comuni valdostani (Bionaz, Cogne e La Thuile). Per ogni specie e popolazione è stato campionato ed essiccato a temperatura ambiente il materiale vegetale destinato all'ottenimento dell'olio essenziale. Quest'ultimo è stato estratto in triplo, per ciascuna accessione in esame, mediante un'apparecchiatura di tipo Clevenger ed analizzato quali e quantitativamente mediante le tecniche GC/MS e GC/FID.

Risultati. Le rese in olio essenziale sono risultate statisticamente differenti tra le tre specie studiate: *T. vulgaris* risulta la specie con maggior resa (2,24%), seguono *T. pulegioides* con l'1,34% e *T. praecox* con lo 0,59%. Le analisi GC/MS hanno permesso di identificare 66 composti organici volatili (VOCs) suddivisibili in monoterpeni, monoterpeni ossigenati, sesquiterpeni, sesquiterpeni ossigenati ed altri composti. Dai risultati dell'analisi quantitativa (Tab. 1) emerge che le tre specie studiate presentano poche analogie per quanto riguarda le principali classi di composti individuate.

Classi di composti	<i>T. praecox</i> (rel area %)	<i>T. pulegioides</i> (rel area %)	<i>T. vulgaris</i> (rel area %)
Monoterpeni	22,55 ^b	25,15 ^b	41,69 ^a
Monoterpeni ossigenati	28,96 ^c	66,21 ^a	54,89 ^b
di cui: Composti fenolici	11,17 ^c	30,10 ^b	47,63 ^a
Sesquiterpeni	24,80 ^a	5,38 ^b	1,82 ^c
Sesquiterpeni ossigenati	26,55 ^a	0,75 ^b	0,69 ^b
Altri composti	1,59 ^b	2,75 ^a	0,98 ^c

Il confronto tra le tre popolazioni di *T. praecox* evidenzia la presenza di due biotipi differenti, tuttavia non è presente un composto chimico predominante tale da permettere l'individuazione del chemiotipo. Nel caso del *T. pulegioides*, invece, si individuano due popolazioni a chemiotipo timolo ed una a chemiotipo alfa-terpinyl acetato (45,8%) (Fig. 1). Per quanto riguarda le popolazioni di *T. vulgaris* il composto predominante, in concentrazioni superiori al 45%, risulta essere per entrambe il timolo, indice del chemiotipo presente.

Discussione e Conclusioni. La composizione degli oli essenziali è fortemente influenzata da fattori genetici, colturali, di lavorazione e di estrazione. Questo si è evidenziato soprattutto per *T. pulegioides* confermando quanto già riportato in letteratura per questa specie (2) ed evidenziando una popolazione a chemiotipo alfa-terpinyl acetato, per la prima volta in Italia; considerato l'impiego di tale composto in differenti ambiti, fra cui quello medico per lo studio delle terapie contro la malattia di Alzheimer, tale popolazione merita ulteriori approfondimenti. Nel caso di *T. praecox* invece non è stato possibile fare una identificazione su base chimica, come in altri habitat montani europei (3). Infine, nel caso di *T. vulgaris*, i dati ottenuti confermano la presenza in Valle d'Aosta del solo chemiotipo a timolo (1), con una concentrazione in principio attivo notevolmente superiore a quella di timo raccolto in altre regioni italiane (4). In futuro si prevede di osservare il comportamento delle diverse accessioni, propagate in vivaio e coltivate a parità di condizioni ambientali e colturali.

Bibliografia

- (1) Thedy L., Perruquet D., Sado A., Valentini S., Bassignana M., Barmaz A. (2015) - Caratterizzazione di olio essenziale di *Thymus vulgaris* L. da diverse accessioni provenienti da colonie spontanee in Valle d'Aosta. In atti Congresso (III Congresso Nazionale della Società Italiana per la ricerca sugli Oli Essenziali, Roma, 6-8 novembre).
- (2) De Martino L., Bruno M., Formisano C., De Feo V., Napolitano F., Rosselli S., Senatore F. (2009) - Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules*, 14: 4614-4624.
- (3) Vidic D., Cavar S., Solic M.E., Maksimovic M. (2010) - Volatile constituents of two rare subspecies of *Thymus praecox*. *Natural Product Communication*, 5(7): 1123-1126.
- (4) Piccaglia R., Marotti M. (1991) - Composition of essential oil of an Italian *Thymus vulgaris* L. ecotype. *Flavor and Fragrance Journal*, 6: 241-244.

Parole chiave. *Thymus vulgaris*, *Thymus praecox*, *Thymus pulegioides*, Olio essenziale, Valle d'Aosta

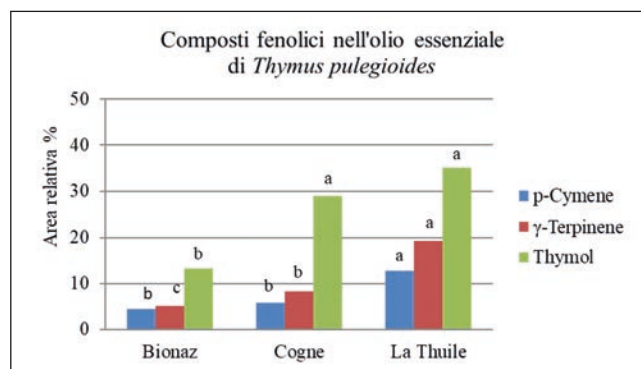


Figura 1. Concentrazione media del timolo e dei suoi precursori biosintetici nell'olio essenziale di *Thymus pulegioides* proveniente da 3 comuni valdostani: Bionaz, Cogne e La Thuile. Per ogni composto, le barre contrassegnate da lettere diverse mostrano valori che differiscono significativamente tra loro al test HSD di Tukey ($p < 0,05$).

Tabella 1. Concentrazione media delle classi di VOCs (composti organici volatili) nell'olio essenziale nelle tre specie del genere *Thymus* esaminate. In ogni riga, valori contrassegnati da lettere diverse differiscono significativamente tra loro al test HSD di Tukey ($p < 0,05$).

PRELIMINARY CHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF FIVE *PINUS* SPECIES FROM BOSNIA AND HERZEGOVINA

A. Žugić¹, V. Tadić¹, S. Mirković², I. Nešić³

¹Institute of Medicinal Plants Research "Dr. Josif Pančić", Belgrade, Serbia

²PHI Hospital "Sveti Vračevi", Bijeljina, Bosnia and Herzegovina

³Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

e.mail: azugic@mocbilja.rs

Introduction. Different parts of *Pinus* (bark, needle, cone, and resin) have been used in many areas for their high biological and antioxidant activities. However, very little is known about the chemistry and biological activity of pine species growing in Bosnia and Herzegovina and especially scarce are the data regarding green cone extracts. Therefore, the preliminary chemical profile and antioxidant activity of methanol extracts of needles and green cones of different *Pinus* sp. are reported.

Materials and Methods. The needles and green cones of five pine species (*Pinus heldreichii* Christ., *P. mugo* Turra., *P. nigra* J.F., *P. sylvestris* L. and *P. pinaster* Aiton) were collected in July and August 2016 from the area of mountain Čvrsnica (Bosnia and Herzegovina). The powdered plant materials were extracted with methanol by using a Soxhlet extractor, and total phenolic content was determined according to Folin-Ciocalteu reagent method, while flavonoid and tannin content was calculated using the method described in the European Pharmacopoeia. The antioxidant activity of the extracts was assessed using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP) assay.

Results and Discussion. Results of the preliminary chemical profile investigation of the investigated extracts revealed *P. nigra* and *P. pinaster* green cones to be the most abundant in total phenolic and flavonoid content. In the investigation of tannins content, *P. pinaster* green cones extract was singled out as the sample with the highest percentage of these secondary metabolites (Fig. 1). The antioxidant activity of all extracts determined by DPPH radical scavenging ability ranged from 0.173 to 1.209 µg DPPH/mL. The highest antioxidant activity was found in the extract of *P. pinaster* (green cones), and the lowest in *P. nigra*, needles (PNI). Following the same pattern, the FRAP value was the highest in *Pinus pinaster* (green

The plant and part used	IC ₅₀ DPPH (mg DPPH/mL)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /g dry material)
<i>P. nigra</i> , green cones (PNC)	0.436	6.63
<i>P. nigra</i> , needles (PNI)	1.029	8.94
<i>P. sylvestris</i> , green cones (PSC)	0.623	6.20
<i>P. sylvestris</i> , needles (PSN)	0.774	7.63
<i>P. heldreichii</i> , green cones (PHC)	0.620	5.57
<i>P. heldreichii</i> , needles (PHN)	0.900	4.43
<i>P. mugo</i> , green cones (PMC)	0.433	6.65
<i>P. mugo</i> , needles (PMN)	0.432	13.22
<i>P. pinaster</i> , green cones (PPC)	0.173	18.26
<i>P. pinaster</i> , needles (PPN)	0.616	9.04

DPPH = 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay

FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Potential assay

Table 1. The antioxidant activity of the investigated samples: *Pinus* extracts (*P. nigra*, green cones (PNC) and needles (PNI); *P. sylvestris*, green cones (PSC) and needles (PSN); *P. heldreichii*, green cones (PHC) and needles (PHN); *P. mugo*, green cones (PMC) and needles (PMN); *P. pinaster*, green cones (PPC) and needles (PPN).

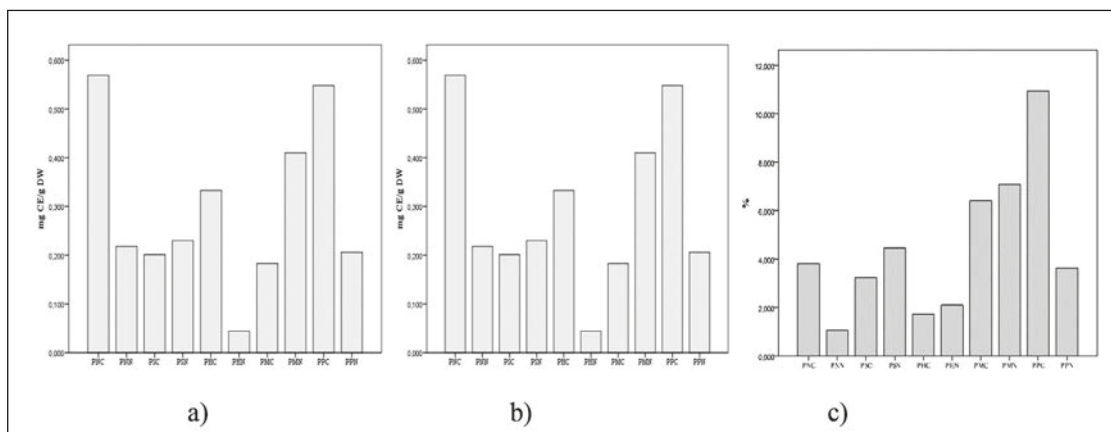


Figure 1. Content of a) total phenolics, b) flavonoids and c) tannins of ten *Pinus* extracts (*P. nigra*, green cones (PNC) and needles (PNI); *P. sylvestris*, green cones (PSC) and needles (PSN); *P. heldreichii*, green cones (PHC) and needles (PHN); *P. mugo*, green cones (PMC) and needles (PMN); *P. pinaster*, green cones (PPC) and needles (PPN).

cones) (18.26 mmol Fe²⁺/g) and the lowest in *P. heldreichii*, needles (PHN) (4.43 mmol Fe²⁺/g) (Tab. 1).

Conclusions. This is the first report on the antioxidant properties and polyphenol content of the needle and cone extracts of *Pinus* species from Bosnia and Herzegovina. The highest antioxidant activity according to both assays was detected in methanol extract of the green cones of *Pinus pinaster*, being proportional to the high content of total phenol and flavonoids, and in particular, tannins, found in this extract.

This study indicated that extract is the potential source of new, natural, pharmacologically active compounds that may find potential applications in the medicine, pharmaceutical, cosmetic, and food industry.

Keywords. *Pinus* species, DPPH, FRAP, Total phenols, Total flavonoids. Total tannins

Acknowledgments: Authors are thankful for financial support, The Ministry of Science, Technological Development, and Innovation projects number EUREKA E! 17236 and E! 13632.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF FIVE *PINUS* SPECIES FROM BOSNIA AND HERZEGOVINA

A. Žugič¹, V. Tadić¹, M. Milenković², S. Mirković³, I. Nešić⁴

¹Institute of Medicinal Plants Research "Dr. Josif Pančić", Belgrade, Serbia

²Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³PHI Hospital "Sveti Vračevi", Bijeljina, Bosnia and Herzegovina

⁴Faculty of Medicine, University of Niš, Niš, Serbia

e.mail: azugic@mocbilja.rs

Introduction. Essential oils (EOs) of *Pinus* sp. have been proven to possess antimicrobial properties against bacteria and fungi and could serve as a source of antimicrobial agents. The aim of the present study was to investigate the *in vitro* antibacterial activities of the EOs isolated from the fresh needles and cones of *Pinus* spp., as related to their chemical composition.

Material and Methods. The needles and green cones of five pine species (*Pinus heldreichii* Christ., *P. mugo* Turra., *P. nigra* J.F., *P. sylvestris* L. and *P. pinaster* Aiton) were collected in July and August 2016 from the area of mountain Čvrtnica (Bosnia and Herzegovina). The fresh needles and cones of each species were cut into small pieces and separately subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for 2 hours. The obtained EO was extracted with diethyl ether and dried over anhydrous sodium sulfate. Quantitative and qualitative data of EOs were obtained by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the micro-broth dilution method.

Results and Discussion. The chemical composition of the tested EOs showed a high percentage of α -pinene in *P. nigra* needles (54.42%), *P. pinaster* cones (47.47%), *P. nigra* cones (40%), *P. sylvestris* needles (39.82%), *P.*

MIC (μ g/mL)	PMN	PMC	PNN	PNC	PSN	PSC	PPN	PPC	PHN	PHC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1000	>1000	>1000	>1000	800	100	150	150	800	400
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1000	1000	800	1000	600	100	150	100	100	100
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	500	500	600	800	800	1000	400	800	600	400
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	400	400	1000	600
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>300	>300	>300	100	>300	150	200	150	>300	>300
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	200	>300	>300
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>300	>300	>300	>300	>300	150	100	100	100	150

Table 1. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) of *Pinus* sp. essential oils (*P. mugo*, green cones (PMC) and needles (PMN); *P. nigra*, green cones (PNC) and needles (PNI); *P. sylvestris*, green cones (PSC) and needles (PSN); *P. pinaster*, green cones (PPC) and needles (PPN); *P. heldreichii*, green cones (PHC) and needles (PHN).

sylvestris cones (37.86%), *P. heldreichii* cones (23.98%), *P. pinaster* needles (17.02%), *P. mugo* needles (11.18%) and *P. heldreichii* needles (11.13%) EOs. (*E*)-Caryophyllene was found in high percentage in *P. pinaster* needles, *P. mugo* cones, *P. nigra* cones, *P. pinaster* cones, *P. sylvestris* cones EOs (24.69 %, 21.27%, 14%, 11.7% and 9.13%, respectively). Limonene was found mainly in EOs of *P. heldreichii* cones and needles (60.92 % and 36.79%). As one of the main compounds, (11E,13Z)- λ -abdiadien-8-ol only appeared in the EO of *P. nigra* cones. Germacren, as a main compound of *P. heldreichii* needles (30.22%), also appeared in the EO of *P. nigra* needles (16.34%) and *P. mugo* cones (16.30%). The major components of *P. pinaster* needles, *P. pinaster* cones, and *P. sylvestris* cones EOs were myrcen (24.65%, 14.61% and 13.8%, respectively). *P. mugo* cones and needles EOs contained predominantly δ -3-carene (23.36% and 19.95%). Tested EOs, isolated from *Pinus* species, have shown to possess inhibitory action against tested isolates in the range of 100–1000 μ g/mL (MICs) (Tab. 1). Among the tested oils, the one isolated from cones and needles of *P. pinaster* exhibited the highest antimicrobial action.

Conclusions. Based on the present results, it could be hypothesized that the antibacterial activity and the synergistic effect of *Pinus* EOs and gentamicin relate to the high percentage of monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons. The results point to high potential and completely justified pharmacological utilization of the pine EO because of the wide antimicrobial spectrum of some investigated *Pinus* species' EOs.

Keywords. *Pinus* species, Essential oils, Antimicrobial, Chemical analysis

Acknowledgments: Authors are thankful for financial support, The Ministry of Science, Technological Development, and Innovation, projects number EUREKA E! 17236 and E! 13632.