



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze e Tecnologie Chimiche

Ciclo XXIII

**ESTRAZIONE DI COMPOSTI BIOLOGICAMENTE
ATTIVI DA PIANTE DELLA SARDEGNA**

Settori scientifico disciplinari di afferenza

CHIM/10 CHIMICA DEGLI ALIMENTI

CHIM/09 FARMACEUTICO TECNOLOGICO APPLICATIVO

Presentata da:

Danilo Falconieri

Coordinatore Dottorato:

Prof. Mariano Casu

Tutor/Relatore:

Dott.^{ssa} Silvia Porcedda

Esame finale anno accademico 2010 – 2011

INDICE

Ringraziamenti	pag.	4
Abstract		
Inglese	pag.	5
Italiano	pag.	6
Introduzione	pag.	7
Capitolo I. Biodiversità sarda e metaboliti secondari delle piante	pag.	12
1.1 Flora sarda ed etnobotanica	pag.	12
1.1.1 La flora e la vegetazione della Sardegna	pag.	12
1.1.2 La tradizione etnobotanica	pag.	14
1.2 Metaboliti secondari delle piante	pag.	16
1.2.1 Il metabolismo vegetale	pag.	16
1.2.2 Oli essenziali	pag.	17
1.2.2.1 Caratteristiche generali	pag.	17
1.2.2.2 Composizione chimica	pag.	21
1.2.2.3 Problematiche di estrazione	pag.	22
1.2.3 Biosintesi	pag.	23
1.2.3.1 Terpeni	pag.	23
1.2.3.2 Fenilproanoidi	pag.	27
1.2.4 Altri composti estraibili	pag.	29
1.2.4.1 Vitamina E	pag.	29
1.2.4.2 Acidi grassi poliinsaturi	pag.	31
Capitolo II. L'attività di ricerca	pag.	34
2.1 L'organizzazione del lavoro sperimentale	pag.	34
2.2 Le specie vegetali oggetto dello studio	pag.	36
2.3 Il processo di estrazione	pag.	46
2.3.1 Trattamenti preliminari	pag.	46
2.3.2 Panoramica sulle tecniche di estrazione	pag.	46
2.3.3 Idrodistillazione	pag.	49
2.3.4 Estrazione con solventi	pag.	50
2.3.5 Estrazione con CO ₂ supercritico	pag.	52
2.3.5.1 Principi e caratteristiche del metodo	pag.	52
2.3.5.2 Il processo di estrazione	pag.	57
2.3.5.3 L'impianto utilizzato e le condizioni operative	pag.	62
2.3.6 Confronto tra le tecniche estrattive utilizzate	pag.	65
2.4 Caratterizzazione chimica	pag.	67
2.4.1 Caratterizzazione degli oli essenziali	pag.	67
2.4.1.1 Caratterizzazione qualitativa	pag.	68
2.4.1.2 Caratterizzazione quantitativa	pag.	70
2.4.1.3 Strumentazione e condizioni operative	pag.	71

2.4.2	Caratterizzazione degli estratti non volatili	pag.	72
2.5	Caratterizzazione attività biologica	pag.	74
2.5.1	Attività antiossidante	pag.	74
2.5.1.1	Test <i>in vivo</i>		74
2.5.1.2	Test <i>in vitro</i> su linee cellulari umane	pag.	74
2.5.1.3	Test free radical scavenging	pag.	76
2.5.2	Attività antinfiammatoria	pag.	78
2.5.3	Attività antibatterica e antifunginea	pag.	80
Capitolo III. Risultati		pag.	83
3.1	<i>Salvia desoleana</i>	pag.	84
3.2	Germe di grano	pag.	90
3.3	<i>Pistacia lentiscus</i>	pag.	94
3.4	<i>Myrtus communis</i>	pag.	97
3.5	Verbenaceae e lamiaceae sarde	pag.	100
3.5.1	<i>Vitex agnus-castus</i>	pag.	100
3.5.2	<i>Satureja thymbra</i>	pag.	105
3.5.3	Altre lamiaceae: <i>Thymus capitatus</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Lavandula stoechas</i>	pag.	109
3.6	Piante sarde e portoghesi a confronto	pag.	112
3.6.1	<i>Bupleurum fruticosum</i>	pag.	112
3.6.2	<i>Smyrniolum olusatrum</i>	pag.	117
3.6.3	<i>Calamintha nepeta</i>	pag.	121
3.6.4	<i>Achillea millefolium</i>	pag.	125
3.7	Oltre la Sardegna	pag.	128
3.7.1	<i>Juniperus</i>	pag.	129
3.7.1.1	<i>Juniperus phoenicea</i>	pag.	129
3.7.1.2	<i>Juniperus oxycedrus</i>	pag.	132
3.7.2	<i>Laurus nobilis</i>	pag.	136
3.7.3	<i>Daucus carota</i>	pag.	140
3.7.4	<i>Stachys yemenensis</i>	pag.	142
Conclusioni		pag.	145
Bibliografia		pag.	147

RINGRAZIAMENTI

La discussione finale della tesi è solo il momento di sintesi finale del lungo lavoro di ricerca multidisciplinare portato avanti durante il dottorato e che per me ha rappresentato un'imperdibile occasione di crescita non limitata al solo campo scientifico e professionale.

Vorrei in primo luogo ringraziare tutto il gruppo di Ricerca di Termodinamica e Fluidi Supercritici del Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche dell'Università di Cagliari, che mi ha accolto e supportato per tutta la durata della tesi, in particolare la Dott.^{ssa} Silvia Porcedda, supervisore di tesi, sempre disponibile, prodiga di consigli ed eccellente revisore di tutto il lavoro scientifico svolto; la Dott.^{ssa} Alessandra Piras, la sua efficienza ed il suo supporto nelle attività sperimentali ha molto facilitato il mio lavoro; ed infine il Prof. Bruno Marongiu per i suoi preziosi insegnamenti e consigli di cui spero di poter far tesoro per lungo tempo.

Il mio ringraziamento, per il supporto in campo botanico e biologico va anche al Dott. Andrea Maxia (Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, sez. Botanica, Università di Cagliari) e alla Dott.^{ssa} Antonella Rosa (Dipartimento di Biologia Sperimentale, Sezione di Patologia Sperimentale, Università di Cagliari).

Un doveroso ringraziamento anche a tutti i ricercatori dei laboratori biologici per la collaborazione ed il supporto dato per la caratterizzazione dell'attività biologica degli estratti.

Infine, un ringraziamento speciale a tutto il personale dell'Istituto Tecnico "Michele Giua" di Cagliari per l'indispensabile supporto, non solo materiale, fornitomi nel corso dell'attività di ricerca.

ABSTRACT

This research work has been focused on the supercritical fluid extraction and characterization of volatile oils having interesting biological activities, possibly susceptible of therapeutic applications.

A further aim of this work was to separate biologically active molecules and nutraceuticals by means of SFE at high pressure. The investigated species have been selected on the basis of ethnobotanic information regarding, in particular, species endemic of Sardinia or that can be easily cultivated there and containing compounds of pharmacological interest.

Extraction by means of supercritical CO₂ has been preferred to the traditional techniques because of a number of advantages. First of all the obtaining of pure extracts deprived of organic solvents and of degradation compounds and not being modified by the loss of water-soluble compounds. The chemical characterization of extracts has been realized by means of different chromatographic techniques such as GC-MS, GC-FID and HPLC. Concerning the main results, the supercritical extraction at 250 bar on *Salvia desoleana* aerial parts allowed us to obtain an extract containing a relevant amount of sclareole: 811 µg/mg, determined by the internal standard method. These samples, tested on human cells model, showed a good antioxidant and cytoprotective activity.

As far as the wheath germ oil is concerned, the SFE carried out at 250 bar supplied extracts of good quality. The HPLC and GC-FID analyses of these extracts highlighted a PUFA and Vitamin E content greater than the those obtained by traditional solvent extractions. The SFE *Pistacia lentiscus* essential oil, tested *in vivo* on an oxidative model of the mice frontal cortex induced by hypochemia/riperfusion, BCCAO, showed a relevant protection against lipidic peroxidation. The *Myrtus communis* essential oil, tested *in vivo* on mice, demonstrated a good antinflammatory action against the ear edema induced by croton oil and against the cotton pellet-induced granuloma. Among the investigated Sardinian verbenacee and lamiacee such as *Vitex agnus-castus*, *Satureja thymbra* and *Thymus capitatus*, containing an essential oil particularly rich in phenolic compounds, showed a good antimicrobial activity and could be employed in therapeutic applications.

A comparative analysis on the composition of essential oils obtained from Sardinian and Portuguese plants (*Bupleurum fruticosum*, *Smyrniolum olusatrum*, *Calamintha nepeta nepeta* and *Achillea millefolium*) showed the existence of different chemotypes and showed that derivatives of Sardinian origin have a greater antimicrobial activity. Among the studied vegetable species coming from regions outside Sardinia, it is noteworthy the comparison among the *Laurus nobilis* leaves oil from Tunisia and Algeria that showed a strong variability of composition related to their geographical origin. Tunisian oils showed a greater biological activity than the Algerian ones. It has been also demonstrated that berries essential oil of *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* and *J. phoenicea* possess a relevant antioxidant activity.

ABSTRACT

Il lavoro di ricerca portato avanti durante tutto il periodo del dottorato è stato focalizzato principalmente sull'estrazione, mediante tecnologia supercritica e caratterizzazione di oli volatili dotati di attività biologica, nelle aspettative, utilizzabili a scopo terapeutico. Altro obiettivo perseguito è stato l'estrazione di molecole biologicamente attive e di nutraceuticals da matrici vegetali mediante tecnologia supercritica ad alta pressione. Le matrici vegetali studiate sono state individuate, in via preliminare, sulla base di informazioni di origine etnobotanica, principalmente tra le piante endemiche della Sardegna e di altre piante di potenziale interesse farmaceutico facilmente coltivabili nel nostro clima. Si è privilegiata la tecnica di estrazione mediante CO₂ allo stato supercritico (SFE), rispetto alle tecniche tradizionali, in quanto presenta una serie di vantaggi: primo fra tutti l'ottenimento di estratti completamente esenti da solventi e non degradati da processi termici, di idrolisi o di idro-solubilizzazione. Per la caratterizzazione chimica degli estratti si è ricorso a tecniche cromatografiche quali GC-MS, GC-FID e HPLC. Tra i principali risultati ottenuti si segnala che per la *Salvia desoleana*, l'ottimizzazione del processo SFE con CO₂ a 250 bar ha permesso di ottenere estratti con elevato contenuto in sclareolo (811 µg/mg) determinato mediante GC-FID con il metodo dello standard interno. Gli estratti, testati su modelli di cellule umane hanno mostrato una buona attività antiossidante e citoprotettiva. Per il germe di grano l'ottimizzazione del processo SFE con CO₂ a 250 bar ha permesso di ottenere estratti, di elevata qualità. L'analisi HPLC e GC-FID ha evidenziato un maggior contenuto globale di vitamina E e PUFA rispetto alle tradizionali tecniche di estrazione con solventi. L'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* ottenuto per SFE, testato *in vivo* su di un modello di stress ossidativo nella corteccia frontale del ratto indotto da ischemia/riperfusionne BCCAO, ha mostrato un elevato potere protettivo contro la perossidazione lipidica. L'olio essenziale di *Myrtus communis*, testato *in vivo* sui ratti, ha mostrato una buona attività antinfiammatoria verso l'edema dell'orecchio indotto da croton oil e verso il granuloma indotto da cotton pellet. Tra le verbenaceae e lamiaceae sarde studiate, gli oli essenziali ottenuti da *Vitex agnus-castus*, *Satureja thymbra*, *Thymus capitatus*, caratterizzati dal un elevato contenuto in composti fenolici, hanno dimostrato di avere una buona attività antimicrobica e potrebbero essere utili a scopo terapeutico. Il confronto tra piante sarde e portoghesi (*Bupleurum fruticosum*, *Smyrniolum olusatrum*, *Calamintha nepeta* e *Achillea millefolium*) ha evidenziato l'appartenenza a chemotipi differenti e che le piante sarde mostrano generalmente una migliore attività antimicrobica. Tra le piante non sarde oggetto di questa ricerca si segnala che il confronto fra estratti volatili SFE da foglie di *Laurus nobilis* provenienti dalla Tunisia e dall'Algeria ha mostrato una forte variabilità di composizione associata alla provenienza geografica e nei test di attività biologica gli oli tunisini hanno mostrato differente e maggiore attività rispetto a quelli algerini, da ipotizzarne l'uso terapeutico. Gli oli essenziali ottenuti da bacche di *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* e *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* e *J. phoenicea* provenienti dalla Tunisia hanno mostrato di possedere un'attività antiossidante (test radical scavenging DPPH e ABTS).

INTRODUZIONE

La vita sulla terra è stata sempre caratterizzata dalla presenza di una maggioranza di specie appartenenti al Regno Vegetale che, partendo dalle forme primitive degli alberi, hanno seguito il percorso evolutivo sino a costituire l'enorme patrimonio di biodiversità vegetale così come abbiamo oggi la fortuna di conoscere, almeno in parte. La biomassa vegetale è stata da sempre una fonte di sostentamento primaria per gli animali erbivori ed onnivori incluso il genere umano. L'uomo però non si è limitato all'utilizzo delle piante per il solo sostentamento, infatti con il tempo ha cominciato ad intuire prima e capire poi che dalle piante, opportunamente scelte e spesso utilizzate nel contesto di rituali che in un qualche modo oggi potremmo assimilare a quelli “sciamanici”, si potevano ricavare dei “rimedi”, spesso dotati di una certa efficacia, da utilizzare come medicinali.

È in questo contesto che dobbiamo inquadrare il ritrovamento di resti della pianta di efedra (contenente l'alcaloide efedrina) assieme allo scheletro di un “*Homo sapiens neanderthalensis*” databile a circa 60.000 anni fa. Pare che circa 10.000 anni fa in India fosse già diffuso l'uso di piante ed erbe in medicina, anche se la prima documentazione certa sulle proprietà ed uso dei medicinali e veleni la ritroviamo in Cina nell'erbario di Shen Nung Pen che risale al 2.700 a.C. mostrato in figura 1.



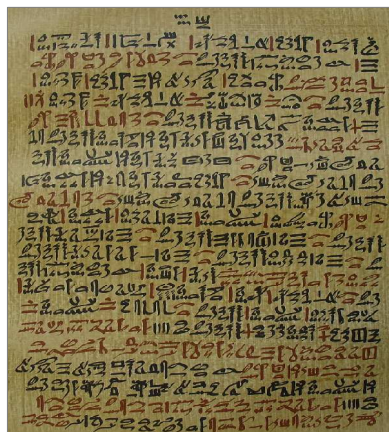
Figura 1. Shen-Nung Pen ts'ao (erbario e ricettario medico).

Tornando all'India, il termine tradizionale per indicare la medicina indiana è ayurveda, che deriva dal sanscrito ayur (vita) e veda (conoscenza). Essa discende dai Veda (i quattro libri indiani della saggezza risalenti a 3000-4500 anni fa), nei quali si

trovano anche formule per medicinali composti da 67 erbe, tra cui lo zenzero (*Zingiber officinalis*) e la cannella (*Cinnamomum sp.*).

Alle origini della cultura medica occidentale possiamo far risalire le tavolette sumeriche di Nipur del 3000 a.C. che riportano i nomi di droghe vegetali e il famoso papiro, del 1600 a.C. (figura 2a), ritrovato da Georg Ebers a Luxor, che in circa 20 metri di lunghezza riporta l'esperienza di oltre un millennio di medicina egizia. Esso comprende 876 formule erboristiche basate su più di 500 piante, di cui quasi un terzo compare ancora nelle farmacopee occidentali.

A Ippocrate (460-377 a.C), il più celebre tra i grandi medici greci, si fa risalire la prima raccolta sistematica di circa 300 specie di piante medicinali, poi ampliata a circa 600 specie con circa 4.000 formulazioni erboristiche da Dioscoride Pedanio (I secolo d.C.) tradotto in latino nel V secolo con il titolo di "*De Materia Medica*". in figura 2b è mostrata una tavola di tale trattato.



(a)



(b)

Figura 2. (a) Papiro Ebers, Parte della tavola XCVI; (b) *Rubus fruticosus*. Da Dioscoride, *De materia medica*, 512 d.C. circa.

Nel periodo romano (I secolo d.C.) comparvero i primi trattati di farmacognosia tra i quali va ricordata l'opera fondamentale "*Historia Naturalis*" di Plinio il Vecchio e l'opera di catalogazione dei medicinali da parte di Claudio Galeno. In questa epoca gli studi erano protesi verso la ricerca del "*rimedio universale*", come la Teriaca del tempo di Nerone, ottenuta miscelando oltre un centinaio di droghe.

Nel periodo dell'oscurantismo medievale le conoscenze scientifiche in occidente rimasero custodite all'interno dei monasteri, mentre si svilupparono molto rapidamente

nel mondo arabo; solo nel tardo medioevo, grazie ai traffici delle repubbliche marinare prima e della scoperta di nuovi continenti poi, una grande quantità di nuove piante commestibili e medicinali sarà studiata e catalogata.

La moderna nomenclatura botanica la dobbiamo all'opera dello svedese Carl von Linné (Linneo, 1707-1778), che tenendo conto della struttura dall'apparato riproduttore della pianta, sviluppa una suddivisione in classi, ordini, generi e specie del mondo vegetale. Con l'introduzione della nomenclatura binomia (binomio linneo) si è potuto classificare ogni organismo vivente.

Attualmente solo una parte abbastanza ristretta della popolazione umana ha facile accesso alle cure e soprattutto ai medicinali forniti dalla “*medicina ufficiale*”; in pratica la maggioranza dell'umanità ricorre abitualmente, spesso come unica possibilità, a piante ed erbe per curarsi con ricette tramandate come antico patrimonio di conoscenza medica popolare. Gli studi etnobotanici e più in particolare etnofarmacologici, hanno potuto fornire un grande aiuto sia per la ricerca di nuovi principi attivi da utilizzare come base di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci di sintesi, sia per lo sviluppo di nuovi ed efficaci fitopreparati ed il miglioramento di quelli esistenti affinché una sempre maggiore parte dell'umanità possa ricevere risposte adeguate alle proprie necessità di salute.

Nel ricco mondo occidentale industrializzato, dove l'accesso alle più moderne tecnologie mediche e farmaceutiche non rappresenta per ora un problema, la crescente consapevolezza della popolazione sui rischi per la salute dovuti ai moderni stili di vita e l'affermarsi di una filosofia di comportamento che vede nel consumo esclusivo di “*all-natural products*” la logica risoluzione di ogni problema, da oltre dieci anni ha accentuato l'interesse dei consumatori e produttori verso gli estratti naturali, come gli oli essenziali ed i loro componenti, specialmente se ottenuti con tecnologie “*pulite*”, cioè con minimi trattamenti chimici, termici e di irraggiamento, e comunque senza tracce indesiderate del processo di trasformazione adottato nella preparazione. Nel campo farmaceutico, in particolare, la competizione tra farmaci naturali e farmaci di sintesi, ha portato ad una rivalutazione e ad una riscoperta della droga vegetale, facendo crescere, da parte delle case farmaceutiche, l'interesse scientifico/commerciale verso gli estratti naturali da matrici vegetali.

In questo contesto, lo studio dei metaboliti secondari estraibili da piante ed erbe si è rivelato uno dei campi più importanti e promettenti della botanica applicata e della chimica moderna sia per le nuove tecniche estrattive e sia per le possibilità di utilizzo di nuove sostanze.

La Sardegna, quanto a patrimonio di biodiversità vegetale, presenta un contesto unico in ambito europeo, infatti riscontriamo la presenza di circa 2500 specie vegetali con circa 300 specie endemiche e circa 390 specie medicinali. In Sardegna, pur esistendo una consolidata tradizione etnobotanica, non sono disponibili molte informazioni scientifiche su un cospicuo numero di specie e anche riguardo l'utilizzo e l'efficacia dei fitopreparati in campo medicinale.

Il programma di ricerca del mio Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche è stato principalmente finalizzato all'estrazione dei metaboliti secondari, di piante autoctone ed endemiche della Sardegna e di altre piante di interesse farmaceutico facilmente coltivabili nel nostro territorio ed alla successiva caratterizzazione della composizione chimica e dell'attività biologica.

Le matrici vegetali sarde da studiare sono state individuate, in via preliminare, sulla base di informazioni di origine etnobotanica riguardanti principalmente l'attività antibatterica e antimicotica). L'elenco delle matrici vegetali studiate si è poi esteso anche a piante provenienti dal Portogallo, principalmente a scopo di confronto con le omologhe sarde e dalla Tunisia ed altri paesi del Maghreb e medioriente, con lo scopo di testare l'attività biologica degli estratti ottenuti. Infine, come potenziale nutraceutical, altra matrice studiata è stata il germe di grano.

Come tecnica di estrazione è stata privilegiata, rispetto alla tradizionale idrodistillazione o all'estrazione con solventi a cui si è ricorso spesso solo a scopo di confronto, l'estrazione con fluidi supercritici (SFE) con diossido di carbonio CO₂. Questa tecnica che può essere classificata come "*mild technology*", presenta una serie di vantaggi potenziali sulle altre "*tecniche tradizionali*": primo fra tutti l'ottenimento di estratti completamente esenti da solventi (spesso nocivi) e non degradati da processi termici, di idrolisi o di idro-solubilizzazione.

Sono state messe a punto condizioni di estrazione che hanno consentito di ottenere dei vantaggi rispetto alle tecnologie tradizionali, sia in termini di qualità dei prodotti, che di efficienza e d'impatto ambientale.

Gli estratti ottenuti, indipendentemente dalla tecnologia estrattiva, appartengono quasi tutti alla tipologia degli oli essenziali; solo nel caso del germe di grano e della *Salvia desoleana* si sono ottenuti anche degli estratti non volatili.

La caratterizzazione chimica dei prodotti ottenuti è stata realizzata principalmente mediante l'impiego della gascromatografia facendo uso di colonne con differenti polarità. Per la caratterizzazione qualitativa si è utilizzata la tecnica gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), mentre per la quantitativa si è principalmente ricorso alla GC-FID, anche con i metodi dello standard ext/int. Nel caso di frazioni con componenti ad alta massa molecolare e/o non separabili in GC, per la caratterizzazione qualitativa e quantitativa, si è ricorso alla cromatografia in fase liquida, LC.

Su tutti gli estratti sono stati effettuati, in collaborazione con diversi laboratori italiani e stranieri, molteplici test miranti a determinarne l'attività biologica (antibatterica, antimicotica, antiossidante, antinfiammatoria, etc...).

L'attività di ricerca è stata svolta principalmente presso il Laboratorio di Termodinamica e Fluidi Supercritici del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari e presso il Laboratorio di Tecniche Analitiche dell'I.T.I.S. "M. Giua" di Cagliari.

Altra importante collaborazione, in particolare per la raccolta e classificazione delle specie vegetali, è stata quella con il Laboratorio di Botanica Farmaceutica ed Economica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (macro sezione di Botanica e Orto Botanico) dell'Università degli Studi di Cagliari.

CAPITOLO I

Biodiversità sarda e metaboliti secondari delle piante

1.1. Flora sarda ed etnobotanica

1.1.1. La flora e la vegetazione della Sardegna



La Sardegna è un vero mosaico di paesaggi vegetali naturali, ognuno dei quali è caratterizzato da aspetti peculiari che lo differenziano dagli altri, anche se topograficamente vicini. Le cause di tali differenze sono da attribuire alla privilegiata posizione geografica dell'isola al centro del mediterraneo, ma soprattutto alle condizioni di isolamento nel quale l'isola si viene a trovare a partire dal Miocene inferiore e che hanno determinato la differenziazione genetica di specie che pertanto risultano uniche al mondo.

Un altro elemento che ha influito in maniera decisiva sulla composizione floristica della Sardegna è il quadro climatico, dato dall'alternarsi di due stagioni, una caldo-arida e una freddo-umida. Il deficit idrico estivo rappresenta il principale fattore limitante e costringe la flora ad una serie di adattamenti strutturali e funzionali.

I primi studi sulla flora della Sardegna risalgono alla seconda metà del '700 ma è solo nei primi anni dell'800 che ha inizio un'indagine sistematica su tutto il territorio isolano. L'autore di tale lavoro fu il Moris il quale diede vita ad un'opera dal titolo "Flora sarda" che, sebbene incompleta, fu fondamentale per la conoscenza del patrimonio vegetale dell'isola e che stimolò ulteriori e più approfondite ricerche. Da quel momento in poi il contributo di numerosi botanici delle università sarde e in particolare le indagini effettuate dall'Arrigoni [1] hanno consentito di definire lo stato delle conoscenze attuali della flora sarda.

La Sardegna ospita circa 2500 entità specifiche, distribuite in una superficie totale di 24000 km². Per meglio capire il concetto di “unicità della flora sarda”, risulta utile precisare quello di endemismo.

Per piante endemiche si intendono tutte quelle entità vegetali capaci di riprodursi e vegetare, allo stato naturale, esclusivamente in ambienti ristretti e aventi areali di distribuzione limitati: alcune specie vivono in località puntiformi mentre altre possiedono un areale più ampio riferito ad un particolare territorio, oppure esteso anche ad altri territori ad essa limitrofi. Un areale ristretto può dipendere da vari fattori come una limitata tolleranza rispetto alle variazioni ambientali, la diminuzione della capacità concorrenziale, le variazioni paleogeografiche oppure, ed è questo il caso della Sardegna, la presenza di barriere geografiche, ecologiche o biologiche che impediscono la dispersione e la diffusione di una determinata specie.

Le condizioni di isolamento prolungato hanno determinato per numerose entità (soprattutto quelle più polimorfe) una differenziazione morfologica e genetica in risposta alle condizioni ambientali, tale da produrre fenomeni di speciazione.

Ancor più, la presenza di vere e proprie “isole nell’isola”, ossia di zone ancor più isolate caratterizzate da peculiari condizioni microclimatiche, spiega la grande biodiversità vegetale della Sardegna.

Le specie endemiche indicate da Arrigoni sono 208, circa il 10 % della flora totale, anche se tale numero è destinato ad accrescersi progressivamente in risposta ai più recenti studi filogenetici e tassonomici [2]. Si può altresì notare che molte specie presenti in Sardegna sono presenti anche in Corsica, nell’Arcipelago Toscano e nelle Isole Baleari.

Definire in modo preciso la distribuzione e le peculiarità della vegetazione sarda costituisce un’ardua impresa. In modo molto semplificato possiamo affermare che il principale habitat vegetazionale della Sardegna è rappresentato dal paesaggio della foresta del leccio e dalle successive tappe della sua degradazione nella macchia (costituita da formazioni sempreverdi, di origine diversa e molto eterogenee nonostante il loro aspetto quasi uniforme) e successivamente nella gariga (distese, aride e sassose, in terreni quasi desertici e calcarei, sia costieri che montani, popolati da complessi arbusti bassi). Altro importante habitat alquanto diversificato, è quello rappresentato dalla vegetazione della zona costiera.

1.1.2. La tradizione etnobotanica

La ricerca etnobotanica è stata un qualificato ed affidabile punto di partenza per la predisposizione delle farmacopee popolari dapprima come modelli terapeutici su base empirica e successivamente, quali basi di partenza per l'identificazione di specie vegetali con comprovate proprietà fitoterapiche. I principi attivi vegetali con significativa attività farmacologica oggi in commercio sono molteplici e provengono in buona parte da questo tipo di indagine mirata. Tuttavia, per un certo periodo il farmaco di sintesi, di più comoda e semplice reperibilità, ha soppiantato il ricorso al rimedio naturale, con il rischio che il patrimonio culturale relativo all'utilizzo dei vegetali nell'automedicazione andasse perso per sempre. Attualmente si assiste ad un vivace dibattito che ha portato ad una rivalutazione e ad una riscoperta della droga vegetale con la convinzione, non sempre vera, che il naturale è sempre migliore o comunque "meno dannoso".

L'uso delle piante, in toto o parte di esse, è ancora una pratica attuale in quelle realtà nelle quali il quadro socio-economico, la storia e la geografia del territorio hanno contribuito a determinare una situazione di evidente isolamento. Tale fenomeno di "chiusura" ha avuto l'effetto di consolidare il rapporto tra l'uomo e l'ambiente naturale che lo circonda.

E' questo il caso della Sardegna, nella quale le ricerche hanno messo in evidenza l'esistenza di una consolidata tradizione etnobotanica, in particolare nei centri dell'interno dove vengono custodite negli usi e nei costumi le più antiche tradizioni e dove non si è mai spenta quella affezione profonda alle proprie modalità di cura. Nella tradizione popolare sarda è documentato l'utilizzo a vario titolo di oltre 800 piante. Nella maggior parte dei casi sono conosciuti degli usi, sull'uomo e gli animali, sia come medicinali in senso stretto, sia in associazione a pratiche religiose e/o magiche [3].

In Sardegna è stato messo in evidenza la presenza di un ricco contingente di specie vegetali suscettibili di interesse farmacologico: delle circa 2500 specie presenti sul territorio isolano ben 397 sono riconosciute come medicinali e 20 sono inserite nella XI Edizione della F.U.I. in quanto riconosciute officinali in senso stretto.

In Sardegna vegetano molte specie note in fitoterapia, quali ad esempio la *Digitalis purpurea* L., la *Gentiana lutea* L., il tasso (*Taxus baccata* L.), l'*Hypericum perforatum* L., la *Saponaria officinalis* L., la cui raccolta intensiva fece temere, in passato, una loro

estinzione. Attualmente, grazie ad una minore attenzione verso certi impieghi terapeutici, ma soprattutto grazie ad una maggiore regolamentazione dell'attività di raccolta delle specie spontanee, alcune di queste piante hanno potuto riconquistare gli spazi originali e andare a costituire popolamenti naturali di una certa consistenza.

1.2. I metaboliti secondari delle piante

1.2.1. Il metabolismo vegetale

Tutti gli organismi vegetali, anche se tra loro diversi per forma, organizzazione ed adattabilità all'ambiente, per i differenti processi biochimici legati al proprio metabolismo, utilizzano un numero piuttosto limitato di sostanze.

A. Kossel (1891) distinse il processo metabolico in primario e secondario (figura 3).

- Il **metabolismo primario**, o di base, comprende tutte le vie necessarie per la sopravvivenza delle cellule.
- I prodotti del **metabolismo secondario** sono sostanze spesso presenti solo in alcuni tipi di cellule specializzate e differenziate e non sono necessarie per le cellule stesse, ma sono utili alla pianta nel suo insieme.

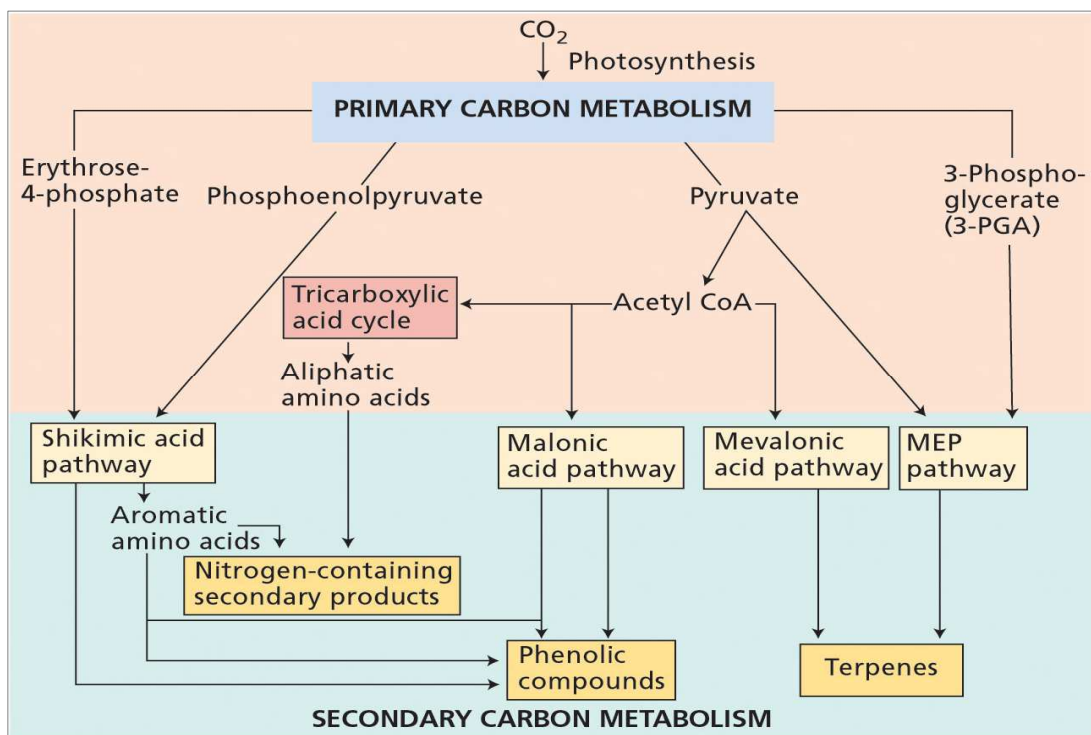


Figura 3. percorsi metabolici primari e secondari nel Regno Vegetale.

Dalla definizione appena citata potremmo affermare che, a partire dalla fotosintesi clorofilliana, tutti i processi, di biosintesi di composti e della loro successiva degradazione, legati alla vita cellulare costituiscono il metabolismo primario. In realtà i

vegetali spesso sintetizzano una varietà di composti sicuramente maggiore di quella necessaria al solo metabolismo primario. Possiamo pensare al metabolismo secondario come alla biosintesi di questi composti che avviene attraverso vie metaboliche utilizzando prodotti intermedi del metabolismo primario che, per differenti cause (es: per un'imperfezione biochimica o per un normale processo fisiologico), si accumulano nelle cellule vegetali.

Il metabolismo secondario può variare da specie a specie vegetale ed è condizionato da fattori ecologici (relativi all'ambiente) e genetici (relativi al vegetale) e può dar luogo a differenti metaboliti secondari che si formano prevalentemente durante il periodo di accrescimento del vegetale, cioè quando le trasformazioni metaboliche raggiungono la massima attività.

Le sostanze di interesse (principi attivi) contenute nei vegetali possono appartenere sia ai metaboliti primari (proteine, lipidi, polisaccaridi), che ai metaboliti intermedi come acidi organici, ma in particolare ai metaboliti secondari (terpeni, fenilpropanoidi, flavonoidi, alcaloidi, glicosidi,...); gruppo comprendente i principi attivi più interessanti da un punto di vista farmacologico.

1.2.2. Oli essenziali

1.2.2.1. Caratteristiche generali

Tra le sostanze con attività biologica estraibili dalle piante, gli oli essenziali sono quelle che rivestono un ruolo economico e strategico molto importante. Il termine olio essenziale viene abitualmente attribuito alla essenza della pianta una volta estratta, e quindi costituisce la vera e propria preparazione ad uso farmaceutico.

Secondo la norma AFNOR NF T 75-006 dell'ottobre 1987, alquanto restrittiva, l'olio essenziale "*è un prodotto ottenuto a partire da una materia prima vegetale, sia per distillazione con vapore, sia con dei processi meccanici a partire dall'epicarpo dei Citrus, sia per distillazione a secco. L'olio essenziale è poi separato dalla fase acquosa per mezzo di processi fisici*". È a causa di questa norma che gli estratti ottenuti mediante altri metodi come ad esempio l'estrazione mediante CO₂ supercritico, che spesso

presentano aspetto, caratteristiche chimico-fisiche e composizione analoga, vengono genericamente definiti come “estratti volatili”. Nel lavoro svolto in questa tesi le due tipologie di estratti vengono considerati entrambi, in senso più ampio, come “oli essenziali ottenuti per ...” messi confronto allo scopo di evidenziarne analogie e peculiarità.

Gli oli essenziali sono miscele complesse di composti volatili, liquidi e solidi che si ritrovano nelle strutture vegetali cui conferiscono l'odore caratteristico. I principi aromatici compaiono nelle parti verdi della pianta fin dai primi mesi di vita e continuano ad accumularsi, fino al principio della fioritura. Man mano che la fioritura progredisce il loro processo di formazione rallenta. Gli oli essenziali si trasferiscono, per diffusione, dalle foglie agli steli, dove sono contenuti nei cloroplasti (principali organuli cellulari ad azione fotosintetica) e dagli steli alle infiorescenze o ai frutti.

All'interno della cellula vegetale gli oli essenziali sono contenuti nei "vacuoli", cavità di forma tondeggiate nel quale sono riversati i "prodotti secondari" del metabolismo. Le strutture secretive, che elaborano l'olio essenziale, si presentano differenti e specializzate a seconda della famiglia cui appartiene la pianta [4-6]. Nelle Lamiaceae (*Lavandula* spp., *Origanum* spp. e *Mentha* spp.) sono elaborati nei peli secretori (figura 4).

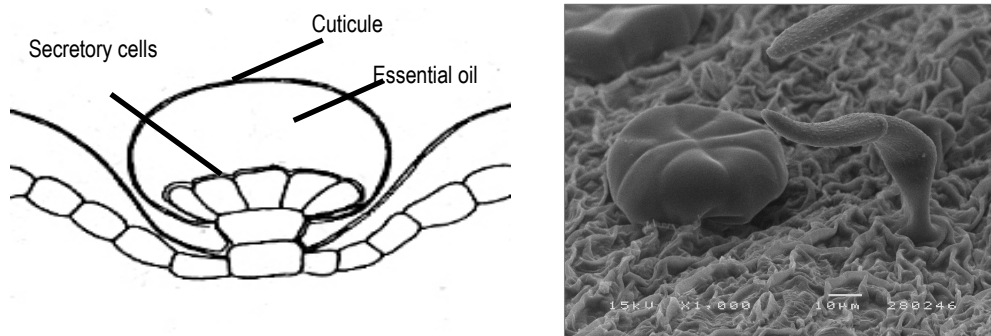


Figura 4. Tricomi ghiandolari, presenti sulla superficie fogliare.

Nelle Rutaceae (*Cytrus* spp.) e nelle Myrtaceae (*Eucalyptus* spp.) gli oli essenziali sono riversati in tasche lisigene o schizogene (figura 5)

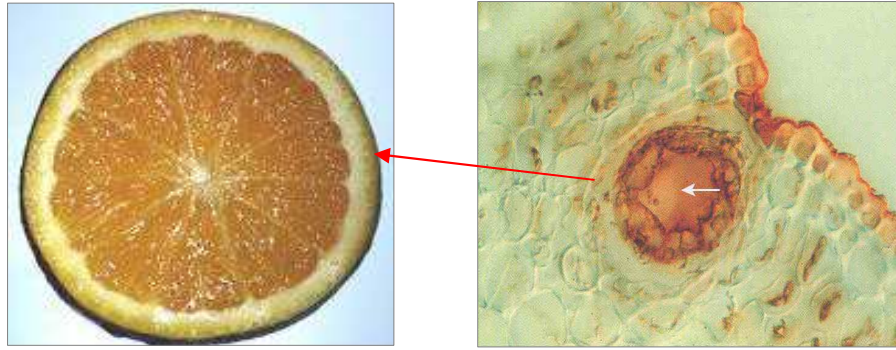


Figura 5. Tasca lisigena nel pericarpo di *Cytrus*.

Nelle Pinaceae, nelle Hypericaceae, nelle Asteraceae e nelle Apiaceae gli oli si ritrovano nei tessuti secretori (figura 6).

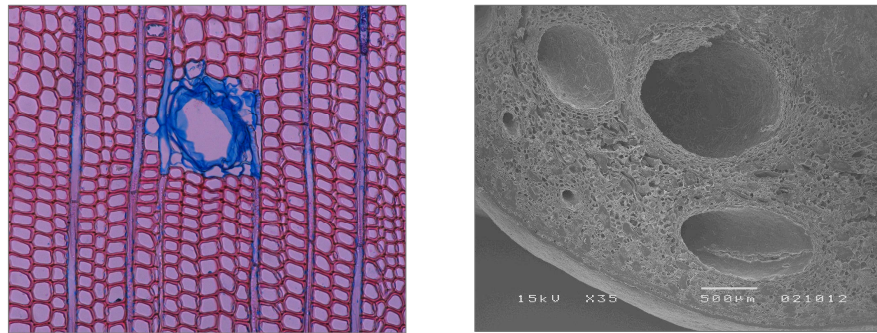


Figura 6. Tessuti secretori.

La localizzazione degli oli essenziali nelle varie parti della pianta (fiori, frutti semi, steli, corteccia, radice,...) differisce notevolmente a seconda del tipo di specie ed in particolare si accumulano: nelle foglie (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae), nei fiori (*Rosa* spp., Rosaceae), nei frutti (*Citrus aurantium* L. var. *dulcis* L., Rutaceae), nei semi (*Prunus amygdalus* Stok. var. *amara* Focke, Rosaceae).

Si deve tener conto che nel caso gli oli essenziali siano contenuti in differenti organi della medesima pianta, la loro concentrazione e composizione può variare notevolmente.

Durante il ciclo vitale della pianta le essenze mutano di continuo la propria composizione chimica in base alla stagione, alle condizioni climatiche, all'annata. Questa variabilità si riscontra talvolta anche in piante della medesima specie, appartenenti però a chemotipi diversi. Perciò, le piante destinate all'estrazione dell'olio essenziale dovrebbero essere raccolte solo in determinati periodi dell'anno e dello

sviluppo vegetativo (*periodo balsamico*), in corrispondenza dei quali la concentrazione delle essenze di interesse è massima.

Data la loro larga diffusione nei vegetali è molto probabile che gli oli essenziali rivestano importanti funzioni nella vita vegetale, quali la protezione contro piante o animali nocivi, l'azione repellente o di richiamo per gli insetti impollinatori.

L'ipotesi sulla funzione biologica degli oli essenziali è ancor oggi una questione controversa; in quanto contrasta con l'opinione diffusa tra i botanici, secondo la quale gli oli essenziali sono "scorie fisiologiche" al pari degli alcaloidi.

Nonostante ciò resta sicuramente da considerare l'importanza dell'utilizzo degli oli essenziali da parte dell'uomo: noti da millenni, usati a scopo medicinale o come incensi, profumi o aromi, sono tra i prodotti più pregiati ottenibili dalle piante: svolgono un ruolo importante nel rendere più gradevoli le pietanze, nello stimolare l'appetito, nel coadiuvare la digestione; costituiscono la materia prima per la formulazione dei profumi; vengono loro attribuite una serie di proprietà che vanno da quella antisettica a quella antinevralgica e cicatrizzante, che giustificano la moderna pratica dell'aromaterapia, che prevede la cura delle malattie e lo sviluppo del potenziale umano tramite l'utilizzo di oli essenziali; infine gli estratti per i quali esiste un riconoscimento ufficiale della loro attività biologica, trovano applicazione in campo farmaceutico.

Dal punto di vista chimico-fisico, gli oli essenziali presentano spesso caratteristiche simili: la densità, salvo qualche rara eccezione (*Cinnamomum zeylanicum*, cannella, calamo), è inferiore a quella dell'acqua, per esposizione alla luce tendono a resinificare, sono solubili in quasi tutti i solventi organici e generalmente pochissimo solubili in acqua (anche se alcuni costituenti ossigenati presentano una solubilità in acqua non trascurabile), sono volatili a temperatura ambiente (a differenza dagli oli "fissi"), hanno elevato indice di rifrazione ed esibiscono attività ottica.

1.2.2.2. Composizione chimica


Gli oli essenziali sono miscele complesse di composti organici volatili:

- Composti contenenti solo C e H, cioè idrocarburi alifatici, aromatici e terpenici
- Composti contenenti C, H e O, tra cui alcoli, aldeidi, chetoni, acidi, eteri, fenoli,.. (delle serie alifatiche, aromatiche e terpeniche).

Gli idrocarburi comprendono alcani, alcheni, composti aromatici e terpenici (tipicamente mono, sesqui e diterpenici).

I composti ossigenati sono responsabili delle notevoli differenze riscontrabili tra le varie essenze e di solito sono contenuti nelle frazioni più solubili. In alcuni casi solo alcuni dei costituenti sono responsabili delle caratteristiche olfattive, come nel caso dell'olio di *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) che è costituito principalmente dall'1,8-cineolo. Nella maggior parte dei casi, invece, le peculiari caratteristiche di un'essenza sono determinate dalla presenza, in particolari rapporti di concentrazione, di oltre cento componenti. Un'elevata presenza di composti ossigenati per un olio essenziale è normalmente considerata come fattore di pregio. Poco numerosi e poco diffusi sono i composti azotati e solforati.

Alcuni costituenti possono essere sintetizzati partendo da materie fornite dalla distillazione del carbon fossile e da derivati del petrolio. Tra i principali prodotti chimici impiegati nell'industria dei profumi vi sono aldeide cinnamica, vanillina e alcool fenilacetico.

Tra gli idrocarburi presenti nei vegetali, i composti terpenici sono prodotti di condensazione dell'unità isoprenica,  C₅H₈ (2-metil-1,3-butadiene).

I monoterpeni contengono 10 atomi di carbonio, i sesquiterpeni 15, i diterpeni 20 ed i triterpeni 30.

Le canfore sono dei derivati ossigenati dei terpeni, sono molto volatili, cristallizzano con estrema facilità ed hanno odore gradevole. Molte sostanze odorose inoltre sono contenute nella struttura vegetale legate a glucosidi e successivamente liberate per idrolisi enzimatica, per essere trasferite in diverse parti della pianta.

I terpeni costituenti un'essenza all'interno della struttura vegetale sono soggetti a reazioni secondarie. Questo può spiegare la varietà di derivati con la medesima struttura

ma con configurazione diversa. I componenti di un olio essenziale possono anche subire trasformazioni chimiche nel corso dello sviluppo della pianta; alcuni di essi possono essere i precursori dei prodotti che caratterizzano l'olio essenziale durante il periodo balsamico. Inoltre si è constatato che variazioni nella composizione dell'olio essenziale ottenuto in differenti periodi di raccolta possono essere spiegate attraverso delle trasformazioni biogenetiche dei suoi costituenti [7].

Esperienze cliniche dimostrano come le essenze sintetiche, cioè riproduzioni di laboratorio di essenze delle quali si conosce la composizione chimica, molto spesso, pur riproducendo in modo accettabile le caratteristiche olfattive, se utilizzate in campo farmacologico, non presentano la stessa efficacia e attività di quelle naturali. Evidentemente anche i costituenti presenti in tracce svolgono un'azione significativa.

1.2.2.3. Problematiche di estrazione

Dato che gli oli essenziali sono elaborati in quantità estremamente variabile e sono generalmente costituiti da numerose sostanze, talvolta di caratteristiche chimiche e fisiche differenti, la loro estrazione deve essere effettuata con metodi appropriati. È necessario evitare qualunque processo che possa modificare le caratteristiche chimiche dei costituenti l'olio. I prodotti naturali, in ogni caso, contengono un gran numero di composti chimici e lo stesso materiale, se viene trattato con diversi solventi, fornisce di regola prodotti differenti.

Spesso i processi di estrazione sono preceduti da uno stadio di concentrazione del materiale di partenza, che nel caso di prodotti vegetali può contenere dal 60 al 90 % di acqua. Questa procedura deve essere eseguita in condizioni non drastiche onde evitare modificazioni dei composti da estrarre. Si hanno situazioni molto diverse a seconda che si tratti di foglie, fiori, bucce, radici, cortecce o semi.

La temperatura a cui viene condotto il processo, l'uso di solventi, la presenza di ossigeno e la durata del trattamento, generalmente inducono modificazioni più o meno profonde nei prodotti ottenuti rispetto ai materiali di partenza. Anche il grado di comminazione del materiale ha una considerevole influenza sul processo di estrazione. Pertanto il problema della separazione di composti da prodotti naturali non è stato

ancora risolto in maniera del tutto soddisfacente, specialmente nel caso di composti molto volatili e/o termolabili. Inoltre, a seconda del metodo di estrazione adottato, sostanze pectiche, coloranti e cere vegetali possono contaminare l'olio essenziale che deve essere sottoposto a depurazione prima di essere immesso al consumo.

1.2.3. Biosintesi

1.2.3.1. Terpeni

I terpeni, costituenti principali degli oli essenziali, comunemente chiamati "essenze", sono ampiamente diffusi sia nel regno animale sia in quello vegetale sotto la forma di sostanze all'apparenza differenti ma tutte accomunate dalla stessa struttura base, tutti riconosciuti come multipli del composto 2-metil-1,3-butadiene o isoprene.

L'idea avanzata da Wallach [8] fu che i terpeni traessero origine dalle specie C₅. La regola dell'isoprene fu estesa nel XX secolo da Robinson e Ruzicka [9] e prevede che la composizione degli oli essenziali non sia puramente casuale ma che i loro costituenti siano termini geneticamente collegati da catene biochimiche che procedono da un comune metabolita fondamentale, l'isoprene appunto, e possano anche inserirsi in altri processi vitali della cellula.

Secondo l'ipotesi di questo schema generale si producono composti di notevole attività dai quali per reazione a catena si formano biopolimeri, quali gomma e guttaperca, oppure per semplice concatenamento (testa-testa o testa-coda) si ottengono i composti aciclici delle serie terpeniche mostrati in tabella 1.

Gli studi sinora condotti [10] hanno consentito la comprensione del meccanismo biosintetico mostrato in figura 7. Il prodotto di partenza è l'acido acetico che, attivato dal coenzima A e con l'intervento di uno specifico enzima, dopo molteplici passaggi, genera l'acido (3R)-3,5-diidrossi-3-metilpentanoico, meglio noto come acido mevalonico (figura 8), oggi ritenuto la "chiave di volta" della biogenesi dei terpeni. Infatti per tutte le molecole genitrici indicate nella tabella 1, come enuncia la teoria di Ruzicka, si identifica come precursore comune a tutti i terpeni l'acido mevalonico, dal quale si ottengono tutte le altre molecole attraverso varie reazioni metaboliche di condensazione, ciclizzazione, funzionalizzazione e riarrangiamento.

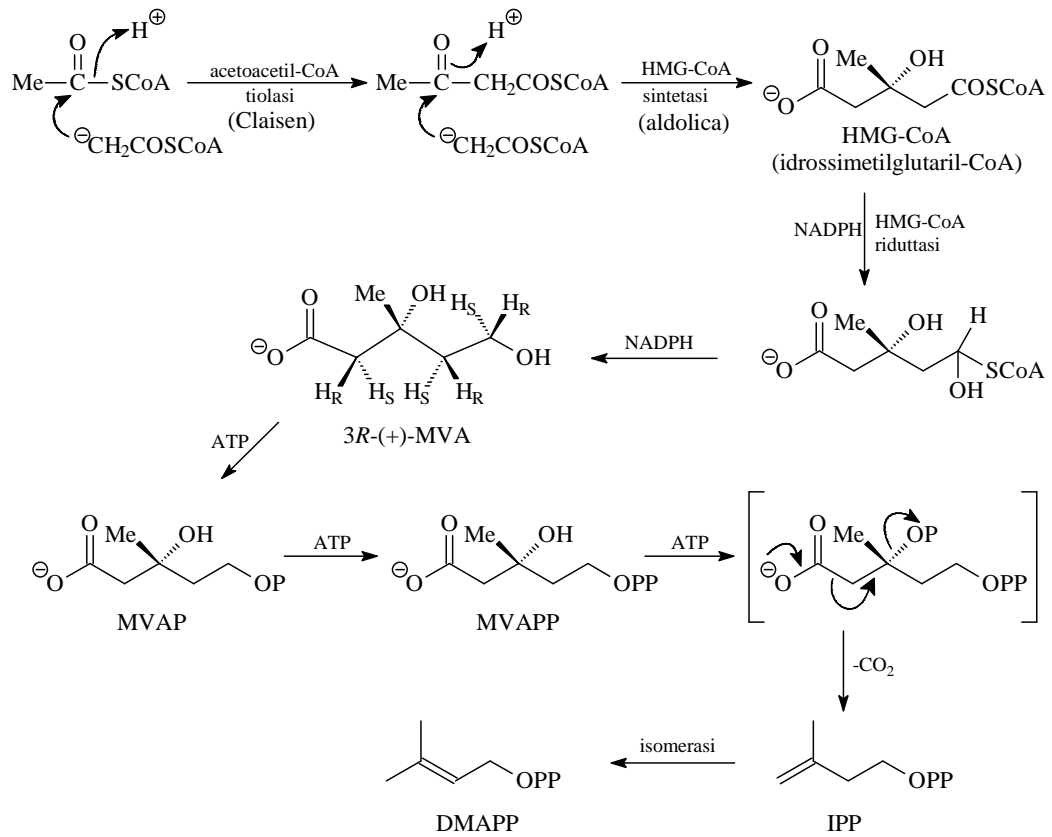


Figura 7. Meccanismo di biosintesi dei precursori dei terpeni.

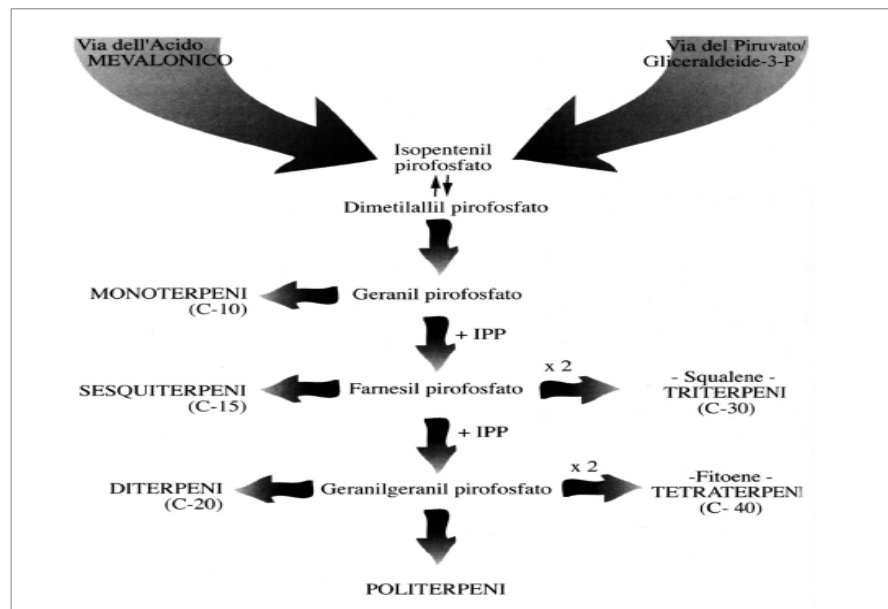


Figura 8. Vie di biosintesi dei terpeni.



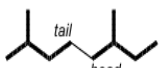
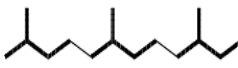
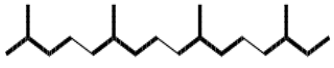
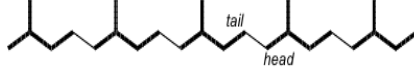

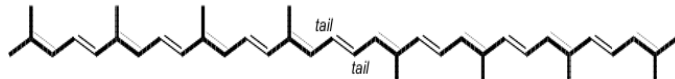
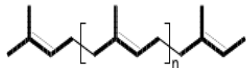
Serie terpeniche		Molecola genitrice	Presenza nelle piante
C ₅ Hemi- 2-Methylbutane		IPP e DMAPP	Oli
			
C ₁₀ Mono- 2,6-Dimethyloctane		GPP	Oli, petali
C ₁₅ Sesqui- 2,6,10-Trimethyl-dodecane (Farnesane)		FPP	Oli, resine, petali
C ₂₀ Di- 2,6,10,14-Tetramethylhexadecane (Phytane)		GGPP	Oli, resine, legno
C ₂₅ Sester- 2,6,10,14,18-Pentamethylcosane		GFPP	Oli, resine, legno
C ₃₀ Tri- 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosane (Squalane)		Squalene	Resine, legno, cera delle foglie
C ₄₀ Tetra- ψ, ψ -Carotene		Fitoene	Tutti i tessuti verdi, radici, petali
(C ₅) _n Poly- terpenes all-trans-Polyisoprene (Guttapercha)		IPP e DMAPP	Lattice, cera delle foglie

Tabella 1. Serie terpeniche e loro presenza nelle matrici vegetali.

La prosecuzione nel percorso di biosintesi, attraverso una serie di reazioni, permetterà di ottenere i composti precursori della classe degli emiterpenoidi, il DMAPP (3,3-dimetilallil pirofosfato) e l'IPP (isopentenil pirofosfato).

Il DMAPP, il quale è un ottimo agente alchilante può perdere facilmente il gruppo pirofosfato per formare un carbocatione allilico. Tale carbocatione subisce un attacco nucleofilo da parte di una molecola di IPP. Dalla condensazione di DMAPP e IPP si forma il geranylpirofosfato (GPP) che è il precursore di tutti i monoterpeni (figura 9).

Attraverso un meccanismo analogo si ha la condensazione tra DMAPP e una molecola di GPP dalla quale ha origine il farnesilpirofosfato (FPP), precursore dei sesquiterpeni.

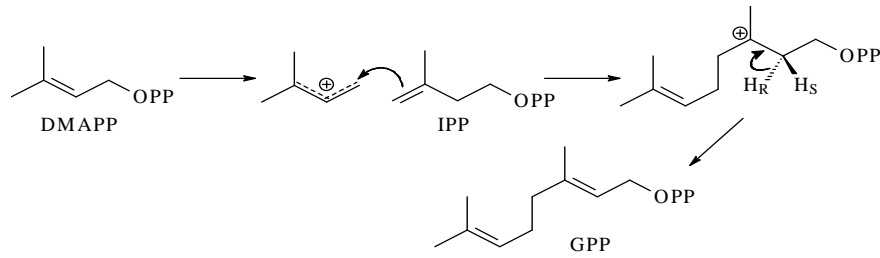


Figura 9. Meccanismo di biosintesi del GPP precursore dei monoterpenei.

Nel meccanismo di reazione mostrato in figura 10 si evidenzia la formazione delle molecole genitrici delle varie classi terpeniche.

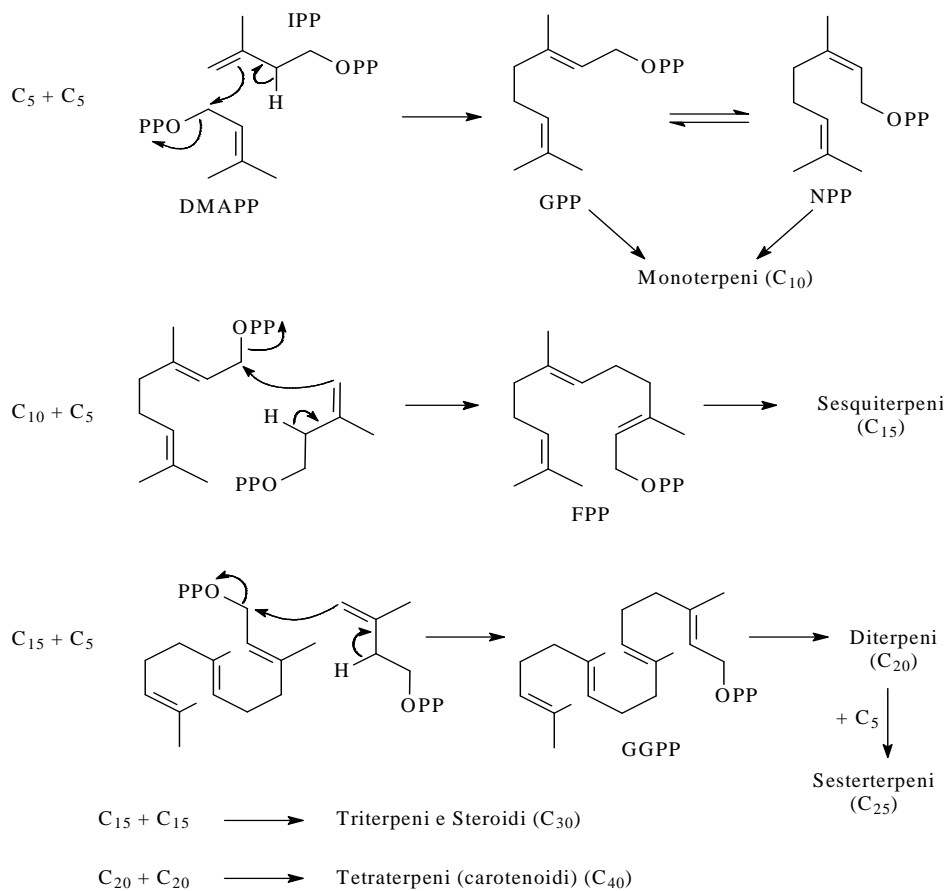
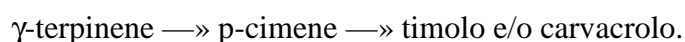


Figura 10. Meccanismo di biosintesi del GPP precursore dei monoterpenei.

I terpeni idrocarburi per idratazione danno gli alcoli corrispondenti quali geraniolo, C₁₀; farnesolo, C₁₅; geranylgeraniolo, C₂₀; etc.. Da questi per deidrogenazione, idrogenazione, ciclizzazione, condensazione testa-coda e coda-coda e trasposizione si origina la molteplicità terpenica.

1.2.3.2. Fenilpropanoidi

Questi composti costituiscono un'ampia classe di prodotti di origine naturale, chiamati anche "fenoli delle piante" per la presenza di uno o più gruppi ossidrilici. Sono contraddistinti da un anello di tipo fenilico cui è legato un gruppo propionico e costituiscono una classe molto ampia di prodotti naturali la cui origine biosintetica è negli amminoacidi aromatici quali fenilalanina (PHE) e tirosina (TYR) a loro volta prodotti della via biosintetica dello shikimato, che fornisce una via alternativa per la produzione di amminoacidi aromatici che è impiegata da piante e microrganismi, ma non da animali. Bisogna però precisare che alcuni fenoli, come ad esempio il timolo ed il carvacrolo, non hanno origine dalle vie biosintetiche appena indicate ma provengono da un altro percorso biosintetico che trae origine dal γ -terpinene:



Nella struttura chimica dei fenilpropanoidi sono presenti generalmente gruppi ossigenati quali quelli idrossilici, metossilici o metilendioossilici. Tra essi possiamo citare l'acido cinnamico ed i suoi derivati, l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido p-cumarico, le cumarine, i cromoni. L'acido cinnamico si genera per eliminazione di una molecola di ammoniaca dalla catena laterale della L-fenilalanina, mentre la stessa reazione nella L-tirosina porta alla formazione dell'acido 4-cumarico (figura 11).

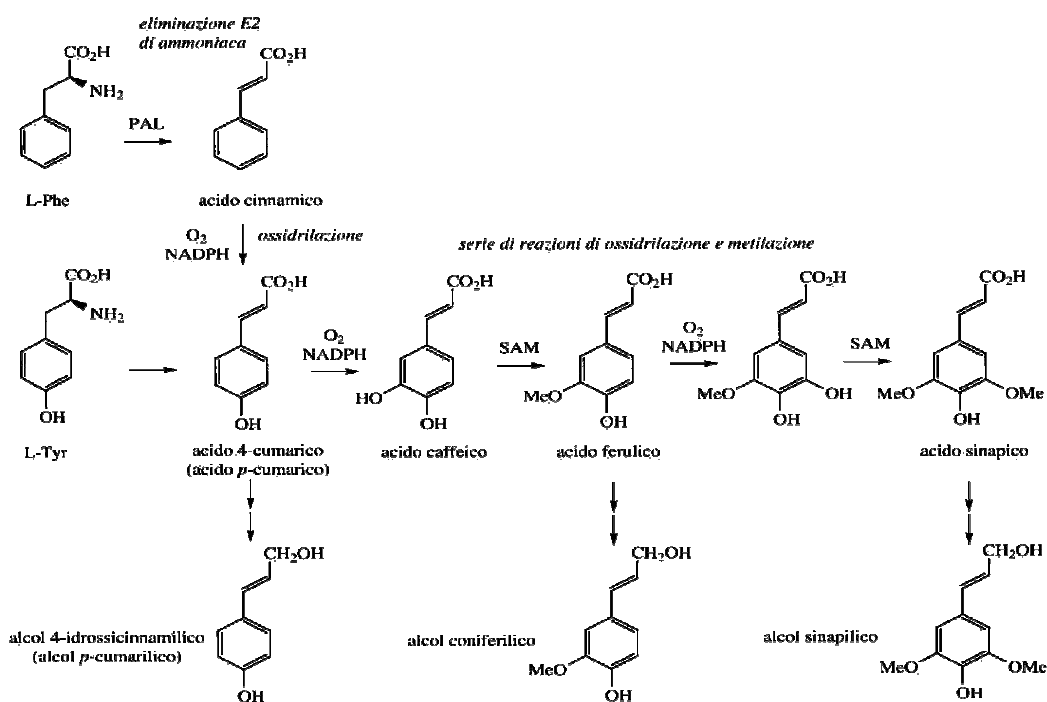


Figura 11. Meccanismo di biosintesi dei fenilpropanoidi.

La cinnamaldeide (figura 12) è il principale componente dell'olio dalla corteccia della cannella (*Cinnamomum zeylanicum*, Lauraceae), molto usata come aroma. La corteccia fresca contiene elevate quantità di acetato di cinnamile, e la cinnamaldeide è liberata da questa dai processi di fermentazione usati per la preparazione commerciale della corteccia, presumibilmente per idrolisi enzimatica e partecipazione di una aldeide-alcol ossido-reduttasi reversibile.

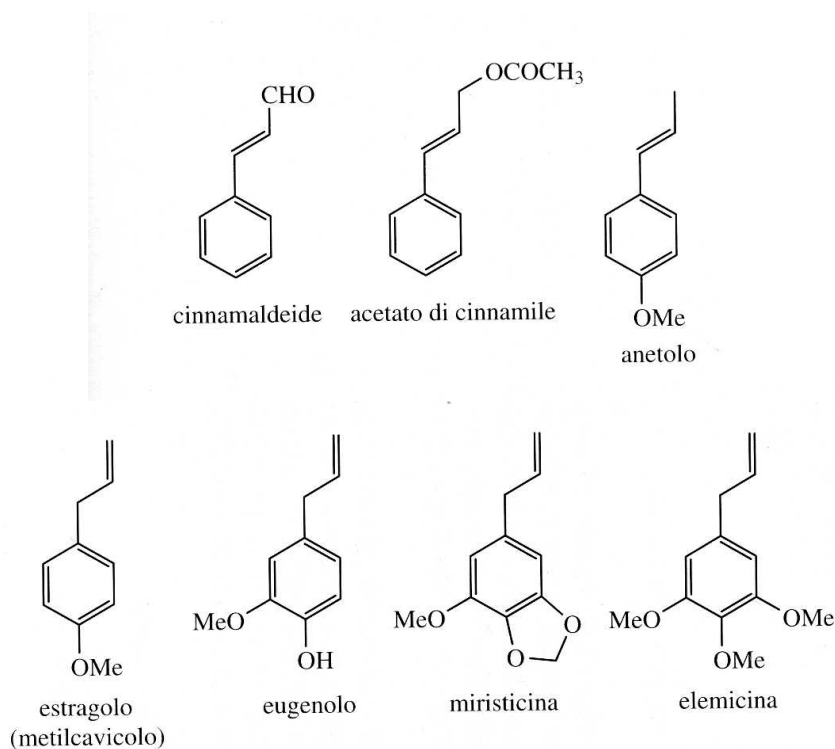


Figura 12. Alcuni dei fenilpropanoidi di interesse.

Le foglie della cannella contengono una grande quantità di eugenolo che è anche il principale componente dell'olio di chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*; Myrtaceae), usato per molti anni sia come anestetico dentale che come aroma. L'anetolo è il principale componente dell'olio essenziale di anice e di finocchio (*Pimpinella anisum* e *Foeniculum vulgare*; Umbrelliferae). La miristicina, contenuta nella noce moscata (*Myristica fragrans* Myristicaceae), è un ulteriore esempio di derivato dell'allilfenolo.

1.2.4. Altri composti estraibili

Nelle matrici vegetali, oltre gli oli essenziali, possono essere contenuti molti altri composti come gli acidi grassi e loro esteri metilici, noti con l'acronimo FAME, gli alcaloidi, sostanze colorate quali caroteni, ed infine cumarine, psolareni, steroli e flavoni. Molte di queste sostanze rivestono particolare importanza per l'attività biologica e sono ampiamente utilizzate anche in campo farmaceutico, sia come molecole di origine naturale, sia come base di emisinthesi per la produzione di farmaci sintetici.

In particolare, durante una parte del lavoro di tesi, l'attenzione è stata rivolta anche verso i “nutraceuticals”, basati sul paradigma del “curare con il cibo” e divenuti oggi molto attuali, anche al di fuori degli ambiti strettamente terapeutici, alimentando il fiorente ed appetibile mercato degli integratori alimentari e dei cibi arricchiti in principi attivi.

1.2.4.1. Vitamina E

Il tocoferolo è un nutriente vitaminico essenziale e vitale per l'uomo, un potente antiossidante liposolubile, presente in molti vegetali (olio di germi di grano, di arachidi, di oliva, di germi di mais, di girasole e di lino), ma anche negli alimenti di provenienza animale (carne, latte e derivati, tuorlo d'uovo). Il tocoferolo è uno dei principali composti che vengono detti vitamina E. In natura i composti denominati vitamina E in sono otto, derivati del 6-cromanolo con quattro gruppi metilici legati all'anello aromatico e con una catena laterale isoprenoide a 16 atomi di carbonio, satura od insatura, in posizione 2, dotati di struttura chimica comune ed aventi l'attività biologica della vitamina E.

A seconda della presenza di una catena satura od insatura, questi composti, rappresentati in figura 12, vengono divisi in due gruppi:

- i tocoferoli (α β γ δ)
- i tocotrienoli (α β γ δ , un tempo detti vitamina T)

Questi ultimi, infatti, presentano tre doppi legami sulla catena isoprenoide. La disposizione dei gruppi metilici permette di distinguere i singoli composti delle due classi. Biologicamente l' α -tocoferolo è la forma più potente ed attiva.

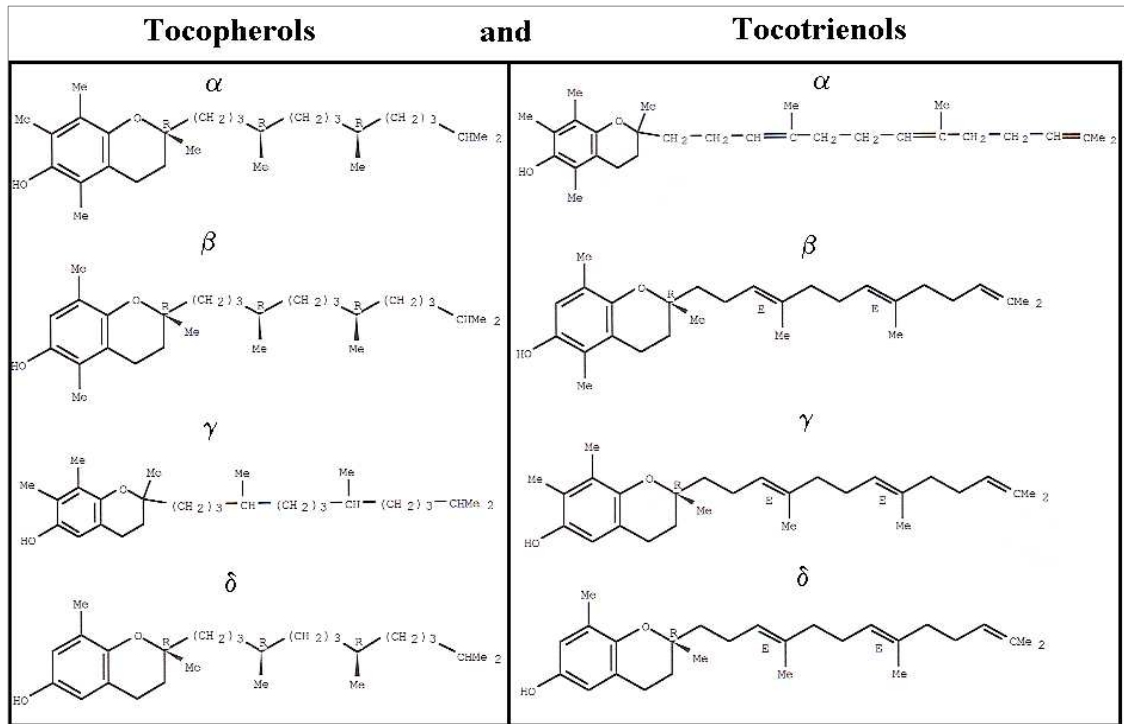


Figura 12. Gli otto composti costituenti la famiglia della vitamina E.

La struttura dei tocoferoli presenta tre centri di chiralità (su C2, C4 e C8), mentre i tocotrienoli uno solo (C2). Poiché la vitamina E è presente in otto forme, per poter effettuare valutazioni comparative tra esse si ricorre all'uso dei *Tocoferolo Equivalenti* o delle *Unità Internazionali* (UI).

$$1 \text{ Tocoferolo Equivalente} = 1 \text{ mg RRR-Tocoferolo} = 1,5 \text{ UI} = 2 \text{ mg } \beta\text{-Tocoferolo} = 3 \text{ mg } \gamma\text{-Tocotrienolo} = 10 \text{ mg } \gamma\text{-Tocoferolo}$$

L' α -tocoferolo è un olio liquido di colore giallo pallido, insolubile in acqua, stabile al calore e agli alcali, ma sensibile ai raggi UV e agli agenti ossidanti

La principale attività biologica riconosciuta alla vitamina E è quella di potente antiossidante; contrasta in sinergia con il glutathione, la perossidazione degli acidi grassi a livello della membrana plasmatica cellulare. In questa azione di contrasto ai radicali liberi, conosciuta come "*scavenging free radicals*", vengono prodotti i radicali tocoferolo e tocoferossili che vengono neutralizzati dalla vitamina C con successiva rigenerazione della vitamina E. Interviene anche nello sviluppo della muscolatura e del

tessuto connettivo. Viene definita anche vitamina antisterilità in quanto agisce sulla secrezione degli ormoni sessuali maschili e femminili. Contribuisce alla formazione e salute dei globuli rossi. In sinergia con la vitamina C protegge la cute dall'azione dei raggi solari UVA e UVB.

La vitamina E viene assorbita a livello dell'intestino tenue. Nel fegato viene attuata una selezione preferenziale di α -tocoferolo che viene incorporato nelle lipoproteine epatiche. Il metabolismo del tocoferolo è assai lento ed esso viene eliminato nelle feci, sotto forma di α -tocoferilidrochinone e α -tocoidrochinone, e nelle urine sotto forma di acido tocoferonico

Situazioni di carenza di vitamina E nell'uomo adulto in condizioni normali sono rare e si manifestano solo in casi di malassorbimento od abetalipoproteinemia; ciò comporta l'insorgenza di una sindrome neuro-degenerativa con neuropatia periferica associata a miopatia necrotizzante ed atassia cerebrale. Nei neonati invece, specie se prematuri, si può avere una carenza primitiva dovuta a scarse riserve tissutali conseguenti al modesto passaggio trans-placentare di tocoferolo.

Attualmente la vitamina E è molto utilizzata come forma di farmaco ma ancor più come integratore alimentare, per contrastare tutte le situazioni di stress ossidativo, legate a patologie, fattori ambientali o al tipo di attività svolta, in cui l'organismo umano si viene a trovare.

1.2.4.2. Acidi grassi poliinsaturi (PUFA)

Gli acidi grassi presenti in natura si distinguono, in base all'assenza o alla presenza di doppi legami, in saturi e insaturi. Gli acidi grassi insaturi, a loro volta, si differenziano in monoinsaturi o in poliinsaturi in relazione al numero di doppi legami presenti nella loro molecola (figura 13).

L'atomo di carbonio metilico situato all'estremità della catena idrocarburica opposta al carbossile è indicato come carbonio "n" oppure " ω ". Il primo doppio legame degli acidi grassi poliinsaturi si trova di solito tra gli atomi di carbonio 9 e 10 e tutti i doppi legami hanno configurazione cis. Inoltre, il sistema dei doppi legami è sempre di tipo non coniugato.

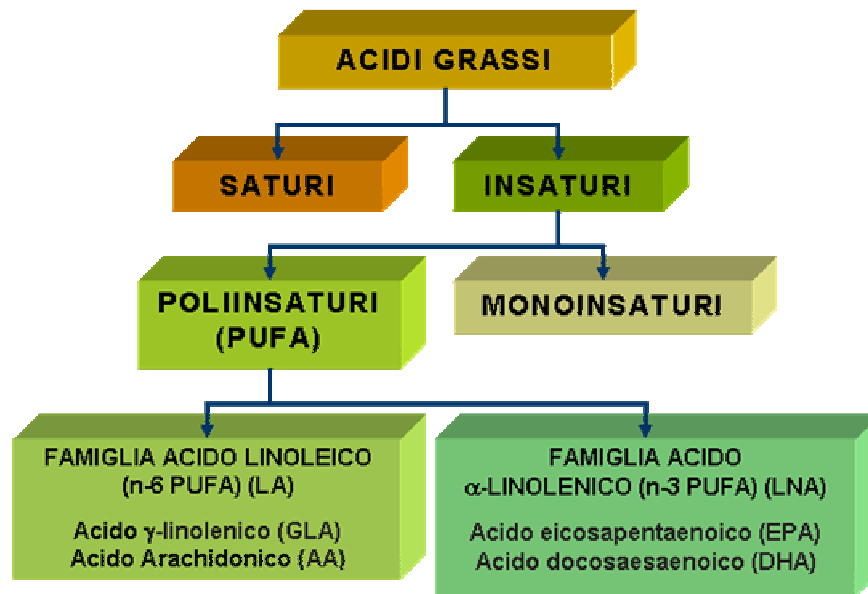


Figura 13. Classificazione degli acidi grassi.

La classificazione più usata degli acidi grassi prende in considerazione la posizione del primo doppio legame a partire dal carbonio ω : se, ad esempio, il primo doppio legame si trova in corrispondenza del terzo atomo di carbonio (a partire dal carbonio ω), l'acido grasso apparterrà alla classe degli "n-3" oppure " ω -3"; se il doppio legame si trova, invece, in corrispondenza del sesto atomo di carbonio, sarà chiamato "n-6" oppure " ω -6". Secondo la convenzione normalmente seguita l'acido linoleico è indicato come 9,12-ottodecadienoico oppure 18:2;9,12 dove i numeri separati dai due punti indicano rispettivamente il numero degli atomi di carbonio e quello dei doppi legami mentre gli altri numeri ne indicano la posizione.

Le strutture degli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) più importanti sono riportate in figura 14. In particolare l'acido linoleico ω -6 (18:2), il linolenico ω -3 (18:3) e in misura minore anche l'arachidonico ω -6 (20:4) sono classificati come EFA acidi grassi essenziali per l'organismo umano, che non è in grado di biosintetizzarli. Data la notevole importanza rivestita dagli EFA, considerati fattori vitamino-simili, spesso queste sostanze vengono commercializzate come integratori o addizionate a numerosi alimenti comunemente presenti nella dieta.

Gli acidi grassi poliinsaturi sono infatti precursori di importanti metaboliti (prostaglandine e leucotrieni), regolano i lipidi ematici contribuendo a ridurre il livello

di colesterolo e come componenti dei fosfolipidi conferiscono fluidità alle membrane biologiche. La presenza in serie di doppi legami, infatti, conferisce una minore rigidità alla catena carboniosa dei PUFA rispetto agli omologhi saturi.

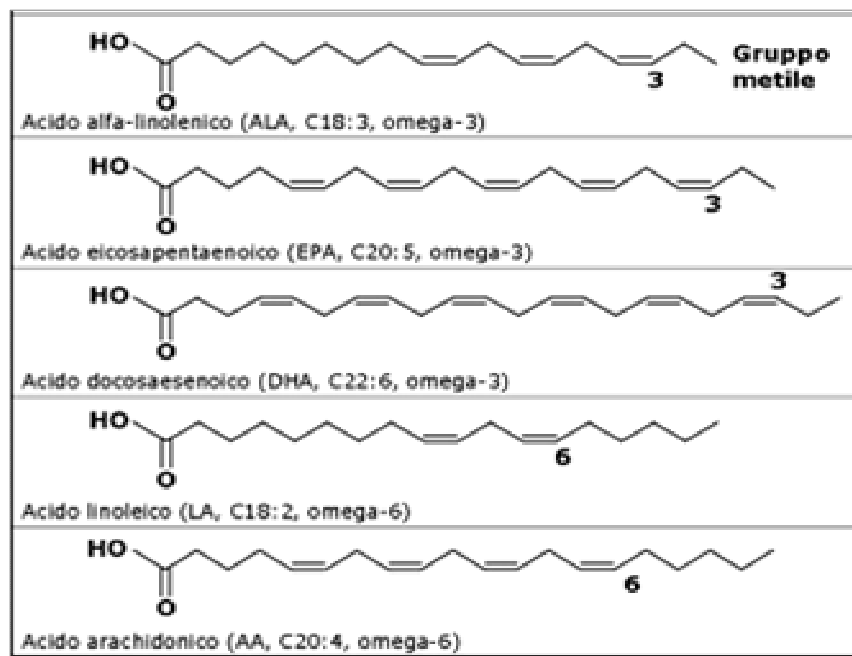


Figura 14. Acidi grassi poliinsaturi più importanti.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei PUFA a scopo terapeutico, negli ultimi anni sono stati condotti vari studi, sia sperimentali su modelli animali, sia clinici, che hanno dimostrato i numerosi effetti favorevoli dei PUFA n-3. Il primo effetto biologico individuato è stato quello ipotrigliceridemizzante. Successivamente sono stati evidenziati gli effetti antiaggregante, antiaterotrombotico e di recente, quello antiaritmogeno.

Gli acidi grassi ω -3 riducono la pressione arteriosa sia in soggetti sani, sia in pazienti affetti da ipertensione arteriosa attraverso diversi meccanismi e sono utilizzati sia come farmaci nella terapia post-infarto, che nella prevenzione primaria della cardiopatia ischemica e della morte cardiaca improvvisa. Un ruolo fondamentale è svolto dai PUFA n-3 anche per il normale sviluppo delle funzioni cerebrali.

CAPITOLO II

L'attività di ricerca

2.1. L'organizzazione del lavoro sperimentale

L'attività ricerca svolta nel corso del dottorato ha riguardato molteplici attività e si è articolata in più fasi:

- Ricerca sulle piante endemiche della Sardegna e sui metaboliti secondari di interesse farmaceutico.
- Ottenimento degli estratti.
- Caratterizzazione chimica.
- Valutazione e caratterizzazione dell'attività biologica degli estratti.
- Analisi dei risultati.

Fase 1. Indagine etnobotanica e raccolta delle piante da utilizzare

Questa è stata la fase iniziale propedeutica allo svolgimento dell'intera attività di ricerca. Inizialmente si è partiti con un'indagine su dati di etnobotanica esistenti, completata da una parallela indagine bibliografica, volta a individuare un set iniziale di piante sarde (non solo endemiche, sia spontanee che coltivate) che potesse fornire prodotti di trasformazione con potenziale attività biologica. Sono state fatte delle ricerche sulla distribuzione geografica (fondamentalmente nel bacino mediterraneo) di alcune delle piante precedentemente identificate, per poterle comparare con quelle sarde sia dal punto di vista della composizione chimica che dell'attività biologica. Si è scelto di inserire nella lista anche alcune piante, non provenienti o non presenti in Sardegna, potenzialmente interessanti.

L'attività è proseguita con la raccolta e la determinazione sistematica (nel caso delle specie spontanee) delle specie individuate, al fine di disporre di una sufficiente varietà e quantità di biomassa su cui sono stati effettuati i trattamenti preliminari e che poi è stata utilizzata nella fase di estrazione. La lista delle piante effettivamente studiate all'interno del mio lavoro si è evoluta dinamicamente durante gran parte del periodo di tesi soprattutto in funzione dei primi risultati ottenuti e delle possibilità reali di approvvigionamento dalle differenti aree geografiche, nei periodi stagionali scelti.

Fase 2. Estrazione dei principi attivi

Il processo di ottenimento degli estratti, dalle piante provenienti dalla fase 1, è stato in genere preceduto da uno stadio di essiccazione del materiale di partenza, eseguito in condizioni non drastiche onde evitare modificazioni dei composti da estrarre, seguito da macinazione. Gli estratti ottenuti e studiati ricadono per la quasi totalità nella tipologia degli estratti volatili / oli essenziali e solo in alcuni casi si sono ottenuti degli estratti più pesanti (assimilabili a concrete).

La scelta delle tecnologie di estrazione da utilizzare è stata ispirata, per quanto possibile, alla ricerca di tecnologie pulite come l'estrazione con diossido di carbonio in fase supercritica che ci ha permesso di ottenere sia gli estratti volatili, che quelli più pesanti. Sono state spesso utilizzate, soprattutto come confronto, tecnologie tradizionali come l'idrodistillazione per ottenere gli oli essenziali e in qualche caso anche l'estrazione con solventi per gli estratti più pesanti. Tutti gli estratti ottenuti sono poi stati utilizzati nelle fasi di caratterizzazione della composizione chimica e dell'attività biologica.

Fase 3. Caratterizzazione chimica degli estratti

La caratterizzazione della composizione chimica degli estratti ottenuti è stata realizzata fondamentalmente attraverso l'impiego di tecniche gas-cromatografiche (GC-FID e GC-MS), in qualche caso si è ricorso anche alla cromatografia in fase liquida (HPLC).

Fase 4. Valutazione e caratterizzazione dell'attività biologica

Gli estratti ottenuti, sono stati anche oggetto di valutazione dell'attività biologica, realizzata in collaborazione con più laboratori italiani e stranieri, mediante saggi *in vivo* e *in vitro* capaci di evidenziare differenti proprietà come: antiossidante, antinfiammatoria, citotossicità, attività antibatterica e antimicotica.

Fase 5. Analisi dei risultati

I risultati ottenuti sulle singole matrici vegetali a partire dalla fase di estrazione e per le fasi successive, sono stati continuamente oggetto di analisi ed utilizzati anche come feedback allo scopo di migliorare l'attività di ricerca.

Al termine dell'attività sperimentale e di trattamento dati, i risultati ottenuti ritenuti scientificamente interessanti sono stati utilizzati per la stesura di articoli pubblicati o in via di pubblicazione su riviste scientifiche internazionali di settore.

2.2. Le specie vegetali studiate

Nella tabella sottostante sono elencate le specie vegetali oggetto dell'attività di ricerca; sono specificate anche la provenienza, tecniche di estrazione, tecniche analitiche utilizzate e tipo di attività biologica testata.

Specie vegetale	Provenienza	T. Estr	T. Analitica	Att. Bio.
<i>Salvia desoleana</i> (Lamiaceae) [11]	Sardegna (Monti)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antiossidante
<i>Pistacia lentiscus</i> (Anacardiaceae) [12]	Sardegna (zona nord)	SFE	GC-MS, GC-FID, HPLC	Antiossidante
<i>Myrtus communis</i> (Myrtaceae) [13]	Sardegna (Sarrabus)	HD	GC-MS	Antinfiammatoria
<i>Thymus capitatus</i> (Lamiaceae) [14]	Sardegna (Sadali)	SFE	GC-MS, GC-FID	Antimicrobica
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae) [14]	Sardegna (Sadali)	SFE	GC-MS, GC-FID	Antimicrobica
<i>Lavandula stoechas</i> (Lamiaceae) [14]	Sardegna (Sadali)	SFE	GC-MS, GC-FID	Antimicrobica
<i>Satureja thymbra</i> (Lamiaceae) [15]	Sardegna (Cagliari)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antifunginea
<i>Vitex agnus-castus</i> (Verbenaceae) [16]	Sardegna (Ogliastra)	SFE, HD	GC-MS	Antifunginea
<i>Bupleurum fruticosum</i> (Apiaceae) [17]	Sardegna (Ogliastra), Portogallo (zona centro)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antifunginea
<i>Smyrniium olusatrum</i> (Apiaceae) [18]	Sardegna (Ogliastra), Portogallo (zona centro)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antifunginea
<i>Calamintha nepeta</i> (Lamiaceae) [19]	Sardegna (Ogliastra), Portogallo (Coimbra)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antifunginea
<i>Achillea millefolium</i> (Asteraceae) [20]	Sardegna (Sadali), Portogallo (Serra de Montemuro)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antifunginea
<i>Laurus nobilis</i> (Lauraceae) [21]	Algeria (Akkfadou), Tunisia (differenti zone)	SFE, HD	GC-MS	Antimicrobica
<i>Juniperus phoenicea</i> [22], <i>J. Oxycedrus</i> [23] (Cupressaceae)	Tunisia (differenti zone)	HD	GC-MS	Antiossidante
<i>Daucus carota</i> (Apiaceae) [24]	Tunisia (zona umida e zona sub-umida)	SFE, HD	GC-MS	Antimicrobica
<i>Stachys yemenensis</i> (Lamiaceae) [25]	Yemen (Ashmor)	SFE, HD	GC-MS, GC-FID	Antimicrobica
Altre matrici vegetali studiate				
Germe di grano [26]	Sardegna	SFE, SE	GC-FID, HPLC	Studio sui nutraceuticals

Di seguito sono riportate, in forma sintetica, le schede botaniche relative alle singole specie studiate.

NB: i dati relativi al nome vernacolare e agli utilizzi nella medicina popolare si riferiscono esclusivamente alla Sardegna.



***Salvia desoleana* Atzei & Picci (Salvia di Desole)**

Famiglia: Lamiaceae

Nome vernacolare: *Luccaia manna, Salvia bona, Salvione.*

Descrizione botanica: Pianta erbacea perenne suffrutticosa, vigoroso, alta anche fino a quasi 2 m, rivestita da una fitta peluria. L'intera pianta, ma in particolare le foglie, emana un forte aroma pungente. Foglie verdi-biancastre, feltrose al tatto, a lamina ovata con margine irregolarmente ondulato e crenato. I fiori, bianchi o rosa, sono riuniti a verticilli in spicacstri terminali ramificati, lunghi 30 ÷ 40 cm. Frutto tetrachenio.

Habitat: Predilige i luoghi soleggati, indifferente al substrato, la si rinviene dal livello del mare fino a circa 300 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce in tarda primavera fino all'estate inoltrata.

Utilizzi nella medicina popolare: Il decotto di foglia, zuccherato come antipiretico. Per uso esterno la foglia viene impiegata come antinfiammatorio topico.

Dati sulla raccolta: Campioni, provenienti da coltivazioni nella zona di Monti (SS, Sardegna, Italia), sono stati forniti dal Consorzio Officinerbe Sardinia.



***Pistacia lentiscus* L. (Lentisco)**

Famiglia: Anacardiaceae

Nome vernacolare: *Chessa, Listinchinu, Scovili, Modditzi.*

Descrizione botanica: Arbusto sempreverde molto ramificato e contorto. Foglie paripennate, lucenti e coriacee. Fiori unisessuati e privi di corolla portati su piante diverse. I frutti sono delle drupe dapprima rosse, poi nerastre a maturità, contenenti un solo seme.

Habitat: Tipico componente della macchia mediterranea, lo si rinviene dalle zone costiere fino agli 800 m s.l.m.

Fenologia: Fiorisce tra marzo e maggio.

Utilizzi nella medicina popolare: Il decotto delle radici veniva impiegato nella cura della scabbia; quello delle foglie è un disinfettante epidermico ed è utile nella cura della foruncolosi. La resina essiccata e polverizzata veniva usata in infuso contro la dissenteria e nella cura del raffreddore. Dalle bacche di otteneva un olio che veniva impiegato in cucina quale surrogato dell'olio d'oliva.

Dati sulla raccolta: Campioni, provenienti da raccolta di vegetazione spontanea nella zona di Monti (SS, Sardegna, Italia), sono stati forniti dal Consorzio Officinerbe Sardinia.



***Myrtus communis* L. (Mirto)**

Famiglia: Myrtaceae

Nome vernacolare: *Murta, Murtizzu, Muta.*

Descrizione botanica: Arbusto cespuglioso sempreverde che raggiunge i 3 m di altezza. Foglie opposte, ovali, coriacee e lucide. Fiori bianchi posti all'ascella delle foglie. Il frutto è una bacca nero-bluastro contenenti molti semi reniformi.

Habitat: Cresce in associazione con altre tipiche piante della macchia (cisto, lentisco, asparago) soprattutto lungo i litorali e fino a 500 ÷ 600 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce da maggio a luglio.

Utilizzi nella medicina popolare: Le foglie, in infuso, stimolano la digestione, hanno proprietà balsamiche e antinfiammatorie. Per uso esterno la stessa droga trova impiego come antisettico, nella cura della psoriasi, delle piaghe e delle ustioni. I frutti, in infuso e decotto, hanno proprietà astringenti e rinfrescanti.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti da vegetazione spontanea nella zona del Sarrabus (CA, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n. 514 Herbarium CAG).



***Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns & Link (Timo arbustivo)**

Famiglia: Lamiaceae

Nome vernacolare: *Tumu, Timu, Tumbu.*

Descrizione botanica: Pianta arbustiva di piccole dimensioni (20 ÷ 60 cm), legnosa e tomentosa. Foglie ridotte, acuminata e molto profumate. Fiori rosa in infiorescenze terminali ricche. Frutto tetrachenio.

Habitat: Predilige gli ambienti aridi e soleggiati delle zone prossime al litorale, dove diventa spesso una delle componenti principali delle garighe. È possibile osservarlo ad altitudini fino a 600 m, in particolare su substrati calcarei.

Fenologia: Fiorisce da maggio a luglio.

Utilizzi nella medicina popolare: il decotto delle foglie veniva usato come antipiretico nelle febbri malariche, come antinfiammatorio del cavo orale.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Sadali (CA, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n. 1066 Herbarium CAG).



***Rosmarinus officinalis* L. (Rosmarino)**

Famiglia: Lamiaceae

Nome vernacolare: *Cipari, Gramasinu, Ramasinu, Zippiri, Tipiri, Spiccu.*

Descrizione botanica: Arbusto sempreverde cespuglioso, fortemente aromatico. Fusti legnosi e ramosissimi, con foglie opposte, lineari, coriacee, scure superiormente e chiare sulla pagina inferiore. Fiori con corolla azzurro-violetta, riuniti in spighe terminali. Il frutto è un tetrachenio.

Habitat: Comune in Macchie e Garighe, dal livello del mare a 800 m d'altitudine.

Fenologia: Fiorisce da marzo a settembre.

Utilizzi nella medicina popolare: Il decotto delle foglie veniva usato nella cura del mal di testa, del mal di stomaco, dell'asma, della bronchite e, per uso esterno veniva impiegato contro la calvizie. L'infuso fatto con fiori e foglie è utilizzato come lenitivo per i dolori mestruali e i malesseri influenzali, oltre che come antisettico, diuretico e antispasmodico intestinale; quello preparato solo con i fiori è stimolante, tonico ed è usato contro le malattie respiratorie.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Sadali (CA, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.1091 Herbarium CAG).



***Lavandula stoechas* L. (Lavanda selvatica)**

Famiglia: Lamiaceae

Nome vernacolare: *Stecade, Buredda, Ispigula aresti, Spigu, Alhemissa.*

Descrizione botanica: Cespuglio perenne ramoso, alto fino a 1 m. Fusto legnoso inferiormente, con foglie lineari-lanceolate e opposte. Fiori piccoli, con corolla bruno-porporina, riuniti in un'infiorescenza a spiga ovoide coronata da un ciuffo di brattee sterili violette. I frutti sono degli acheni.

Habitat: Vegeta in ambienti di macchia e gariga, dal livello del mare fino a 700 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce da aprile fino alla tarda estate, a seconda dell'altitudine.

Utilizzi nella medicina popolare: L'infuso delle cime fiorite è impiegato nella cura del mal di testa, delle affezioni a carico dell'apparato respiratorio (tosse, bronchite, laringite), come antiasmatico e nella cura degli stati d'ansia; esternamente trova impiego come antiparassitario, antisettico e cicatrizzante.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Sadali (CA, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.1067 Herbarium CAG).



***Satureja thymbra* L. (Santoreggia Sarda)**

Famiglia: Lamiaceae

Nome vernacolare: *Issopu, Issopu.*

Descrizione botanica: Pianta arbustiva, pelosa, legnosa e aromatica. Fusti rossastri. Foglie oblungho-lineari, con apice acuto. Fiori rosa in infiorescenze sferiche distanziate. Frutto tetrachenio.

Habitat: Predilige i substrati rocciosi di natura calcarea, negli ambienti aridi, fortemente soleggiati e caldi, delle garighe costiere. Vegeta dal livello del mare fino a 600 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce da aprile a maggio.

Utilizzi nella medicina popolare: Per via interna è impegnata come antisettico, tonico-stimolante, sedativo dello stomaco e diuretico; per via esterna, in infuso, per favorire la cicatrizzazione di ferite e piaghe.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti da vegetazione spontanea nella zona del Colle S. Michele a Cagliari (Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.1079 Herbarium CAG).



***Vitex agnus-castus* L. (Agnocasto)**

Famiglia: Verbenaceae

Nome vernacolare: *Sammuccu de arriu, Pipiri sardu, Sambucu de frumene.*

Descrizione botanica: Arbusto con fusto eretto (1 ÷ 5 m) e foglie opposte a lamina palmata, formate da 5 ÷ 7 foglioline lanceolate e acute. I fiori, disposti in pannocchie all'apice dei rami, hanno corolla viola. Il frutto è una bacca nera divisa in logge, contenenti ciascuna un solo seme.

Habitat: E' molto diffusa lungo gli argini dei fiumi, ma anche in siepi ed incolti. Cresce dal livello del mare fino a 500 m.

Fenologia: Fiorisce da aprile ad agosto.

Utilizzi nella medicina popolare: Il decotto delle foglie veniva usato esternamente come disinfettante di ferite e abrasioni; quello dei fiori è impiegato come disinfettante oftalmico; i frutti, essiccati e polverizzati trovavano impiego, in infuso, come calmante.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti da vegetazione spontanea nella zona dell'Ogliastra (OG, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.1126 Herbarium CAG).



***Bupleurum fruticosum* L. (Bupleuro cespuglioso)**

Famiglia: Apiaceae

Nome vernacolare: *Linna pudescia, Lau crapinu.*

Descrizione botanica: Arbusto sempreverde con fusto eretto e ramoso. Foglie ellittico lanceolate. Fiori in ombrelle terminali. Frutto diachenio.

Habitat: Specie eliofila con spiccata tendenza calcicola, ma osservabile anche su granito. Pur prediligendo l'area costiera, la si rinviene anche nell'immediato entroterra, in zone rocciose e riparate fino a circa 1000 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce da giugno ad agosto, i frutti maturano subito dopo.

Utilizzi nella medicina popolare: Il decotto di radice e di fusto come antireumatico.

Dati sulla raccolta: Campioni sardi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Baunei (OG, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.590 Herbarium CAG).

Campioni portoghesi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Cerca di S. Comba (Portogallo centrale). Identificati nel Laboratorio di farmacognosia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Coimbra, (voucher n.LS355).



***Smyrniolus olusatrum* L. (Corinoli comune, Macerone)**

Famiglia: Apiaceae

Nome vernacolare: *Alisandru, Appiu cuaddaru, Macerroni.*

Descrizione botanica: Pianta erbacea biennale, colorazione generale verde scuro. Fusto eretto (30 ÷ 120 cm). Foglie pennatosette. Forma infiorescenze ad ombrella, con lunghi peduncoli a molti raggi. Frutti diacheni

Habitat: Specie moderatamente umbrofila, cresce lungo strade e siepi dove si raccoglie l'umidità. Vegeta dal livello del mare fino a 700 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce da gennaio a maggio.

Utilizzi nella medicina popolare: La foglia è ritenuta antiscorbutica, il frutto è ritenuto carminativo.

Dati sulla raccolta: Campioni sardi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Baunei (OG, Sardegna, Italia). Identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.566 Herbarium CAG).

Campioni portoghesi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Cerca di S. Bento (Portogallo centrale). Identificati nel Laboratorio di farmacognosia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Coimbra, (voucher n.LS360).



***Calamintha nepeta* (L.) Savi (Nepetella, Mentuccia)**

Famiglia: Lamiaceae

Nome vernacolare: *Bragamonti, Menta aerești, Nepida.*

Descrizione botanica: Specie erbacea perenne, suffruticosa, aromatica. Fusti ascendenti con foglie a lamina ovale o romboidale e a margine leggermente seghettato. Fiori piccoli di colore rosa violaceo. I frutti sono delle capsule.

Habitat: Specie eliofila, è presente sui costoni rocciosi e aridi, in prevalenza sui terreni calcarei, da quote medio-basse fino a 1500 m di altitudine..

Fenologia: Fiorisce dalla tarda primavera fino ad ottobre.

Utilizzi nella medicina popolare: L'infuso delle parti aeree stimola la digestione, è un ottimo stomachico e un buon espettorante. Per via esterna la foglia viene utilizzata come vulnerario-cicatrizzante, come antalgico su punture di vespe e ragni e come risolvente-epitelizzante nelle bruciature.

Dati sulla raccolta: **Dati sulla raccolta:** Campioni sardi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Baunei (OG, Sardegna, Italia). Campioni portoghesi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Vilarinho de Baixo (Coimbra, Portogallo). I campioni sono stati identificati nel Laboratorio di Botanica Farmaceutica del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Botanica e Orto Botanico dell'Università degli Studi di Cagliari, (voucher n.1182 Herbarium CAG).



***Achillea millefolium* L. (Millefoglio)**

Famiglia: Asteraceae

Nome vernacolare: *Èrba de veridas, Erba de gòrpu apèrtu.*

Descrizione botanica: Pianta erbacea perenne con fusto semplice (50 ÷ 60 cm) e foglie bipennatosette, lunghe, assai frastagliate in segmenti lineari acuti, hanno odore aromatico. I capolini fiorali, di colore bianco e rosato, sono piccoli e riuniti in vistosi corimbi. Produce un frutto, l'achenio.

Habitat: E' diffusa, dalla pianura fino alla montagna, nei prati, lungo i sentieri, negli incolti. Cresce bene nei climi temperati o temperato freddi. Il suolo, preferibilmente ben drenato, può essere sia acido che calcareo.

Fenologia: La fioritura avviene da giugno a settembre.

Utilizzi nella medicina popolare: Per via esterna viene utilizzata come astringente-emostatica, per disinfettare e rimarginare ferite da taglio, nelle piaghe e nelle ragadi. Per via interna come antispasmodico, antifermentativo, antidiarroico, antiartritico e depurativo epatico.

Dati sulla raccolta: Campioni sardi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Sadali (CA, Sardegna, Italia). Campioni portoghesi raccolti da vegetazione spontanea nella zona di Serra de Montemuro (Portogallo centrale). Identificati nel Laboratorio di farmacognosia della Facoltà di Farmacia dell'Università di Coimbra.



***Laurus nobilis* L. (Alloro)**

Famiglia: Lauraceae

Nome vernacolare: *Lavru, Alloru, Lauru, Lau.*

Descrizione botanica: Pianta arborea sempreverde dioica, aromatica. Infiorescenze a piccoli ombrelli ascellari. Fiori bianco-giallastri.

Habitat: Vegeta in tutta l'area dell'olivo, sia spontaneo che naturalizzato o coltivato. Predilige un clima non troppo asciutto e caldo. Cresce dal livello del mare fino a 800 m di altitudine.

Fenologia: La fioritura avviene da marzo ad aprile

Utilizzi nella medicina popolare: Largamente utilizzato in infuso o decotto principalmente come antalgico, antispasmodico, antidispeptico, balsamico-bechico-espessorante, decongestionante, antireumatico.

Dati sulla raccolta: Campioni di foglie raccolte in Algeria nella zona di Akfadou (latitudine 36° 40' 81" N, longitudine 4° 35' 16" E); in Tunisia nei siti di Ain Drahem e Elkhassa (latitudine 36° 56' 57", longitudine 08° 51' 34"). I campioni sono stati identificati dal Prof. S. Bouzid (Department de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis)



***Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Ginepro coccolone)**

Famiglia: Cupressaceae

Nome vernacolare: *Ajacciu, Zinnipiri de arena.*

Descrizione botanica: Arbusto o alberello sempreverde. Rami penduli. Foglie aghiformi. Infiorescenze maschili e femminili, di norma, su piante diverse. Frutto galbulo bruno-violaceo.

Habitat: Eliofila e xerofila dei substrati sabbiosi dove può dar luogo a vegetazione impenetrabile. Difficilmente colonizza terreni distanti dalla costa e totalmente privi di componente sabbiosa.

Fenologia: Le infiorescenze compaiono a fine inverno e i frutti maturano l'anno successivo.

Utilizzi nella medicina popolare: Al frutto (infuso, estratto o marmellata) erano riconosciute proprietà diaforetica, diuretica, antiidropica, antiasmatica-anticatarrale, antimalarica. Per via esterna come antireumatico, antisettico e anticongestionante delle vie respiratorie.

Dati sulla raccolta: Frutti maturi e immaturi raccolti in Tunisia da esemplari femmina in 4 differenti siti: Hawaria (37_ 300N, 11_ 030E, altitudine: 29 m), Tabarka (36_ 570N, 10_ 350E, altitudine: 66 m), Dkhila (36_ 110N, 9_ 260E, altitudine: 502 m), Kbouche (36_ 130N, 8_ 340E, altitudine: 3649 m). I campioni sono stati depositati presso l'erbario del Laboratorio di Farmacognosia della Facoltà di Farmacia, Monastir, Tunisia (vouchers: JOM1, JOM2, JOM3, JOM4, JOR1 e JOR2).



***Juniperus phoenicea* L. (Ginepro fenicio)**

Famiglia: Cupressaceae

Nome vernacolare: *Nibadu, Zinnibiri masedu.*

Descrizione botanica: Arbusto o albero sempreverde. Rami estremi completamente ricoperti dalle foglie. Foglie squamiformi embricate. Fiori maschili e femminili portati su piante diverse. Frutto galbulo bruno.

Habitat: Eliofila, indifferente al substrato nelle zone costiere, nell'interno predilige i suoli calcarei dove vegeta fino a 700 ÷ 900 m di altitudine.

Fenologia: Le infiorescenze compaiono a febbraio-marzo; i frutti maturano l'anno successivo e possono restare sulla pianta per più anni.

Utilizzi nella medicina popolare: Al decotto dei rami erano riconosciute proprietà diuretica e eutocitica. È conosciuto l'uso anche come vermifugo e antisettico.

Dati sulla raccolta: Frutti maturi e immaturi raccolti in Tunisia da esemplari femmina in 3 differenti siti: Rimel (36° 50' N, 9° 35' E), Makthar (35° 49' N, 10° 9' 17' E) e Jbal Mansour (36° 15' N, 9° 50' E). I campioni sono stati depositati presso l'erbario del Laboratorio di Farmacognosia della Facoltà di Farmacia, Monastir, Tunisia (vouchers: JPR1, JPR2, JPM1, JPM2, JPJM1, JPJM2).



***Daucus carota* L. (Carota selvatica)**

Famiglia: Apiaceae

Nome vernacolare: *Canna 'e ingia, Aligaglia campina, Pestiana, Pubusone, Bastunàga, Frustinaca, Arriga.*

Descrizione botanica: Pianta biennale, a volte perenne, con radice carnosa ed ingrossata. Il fusto è generalmente peloso, semplice e leggermente ramoso nella parte superiore. Le foglie basali sono pennato-partite, le cauline sono alterne. L'infiorescenza è un'ombrella costituita da piccoli fiori quasi sempre bianchi, a volte rosa. I frutti sono degli acheni ovali con coste munite di setole e aculei uncinati.

Habitat: Vegeta negli incolti, nei prati, lungo le strade, in genere negli ambienti aridi sino a 1400 m di altitudine.

Fenologia: Fiorisce da aprile a ottobre.

Utilizzi nella medicina popolare: Le radici vengono impiegate per uso esterno nella cura delle dermatiti, delle ustioni e delle piaghe, ingerite sono utili come astringente e diuretico. Il decotto e l'infuso dei semi hanno proprietà carminative, diuretiche e digestive.

Dati sulla raccolta: Campioni raccolti in Tunisia in due differenti zone bioclimatiche nella zona di Sejnane (umida) e Tunisi (sub-umida). I voucher (n: COI00033068 e CAG 625) sono depositati nell'erbario del Dipartimento di Botanica dell'Università di Tunisi.



***Stachys yemenensis* Hedge**
Famiglia: Lamiaceae

Dati sulla raccolta: Le foglie sono state raccolte, da piante di vegetazione spontanea, nel distretto di Ashmor (Hajah, Yemen). I campioni sono stati identificati da Mr Hassan M. Ibrahim del Dipartimento di Botanica, Facoltà di Scienze dell'Università di Sana'a, Yemen, e depositati presso il Dipartimento di Farmacognosia dell'Università di Sana'a (voucher: *S. yemenensis*, YMP – La 13).

2.3. Il processo di estrazione

2.3.1. Trattamenti preliminari

Le piante appena raccolte normalmente possiedono un elevato grado di umidità (dal 60 al 90 % di acqua) che ne impedisce sia la conservazione che l'immediato utilizzo nelle estrazioni SFE e pertanto è necessario che il processo di estrazione sia preceduto da uno stadio di concentrazione del materiale di partenza per ridurre il tenore di H₂O fino a circa il 10 %.

La procedura di essiccazione deve essere eseguita in condizioni non drastiche onde evitare modificazioni dei composti da estrarre. Si è scelto di operare a temperatura ambiente lasciando asciugare le matrici vegetali in locali con ventilazione naturale per un periodo di 6 - 8 giorni.

Le matrici essiccate sono poi state triturate, avendo la massima cura di evitare surriscaldamenti che potrebbero alterarne la composizione, mediante dei robot da cucina Malavasi (MagicSet3) e Moulinex, (mod. La moulinette). Attraverso la vagliatura con setacci, i macinati sono stati poi suddivisi in diverse frazioni. Quella avente granulometria nell'intervallo 300 ÷ 800 µm è stata avviata alla fase di estrazione.

2.3.2. Panoramica sulle tecniche di estrazione

Fin dall'antichità l'uomo ha sviluppato e perfezionato molteplici metodi per trasformare le matrici vegetali in funzione dei differenti impieghi in campo farmaceutico, cosmetico ed alimentare. La scelta della tecnica di estrazione ottimale è influenzata da numerosi fattori come la specificità della pianta, le differenti parti che si intendono utilizzare (es. radici, corteccia, foglie, frutti,...) ed il particolare specifico utilizzo dell'estratto. In generale è possibile affermare che dalla stessa matrice vegetale, sottoposta a differenti processi di estrazione, si ottengono estratti che possono differire anche notevolmente per aspetto, composizione chimica ed attività biologica [27] come evidenziato in figura 15.

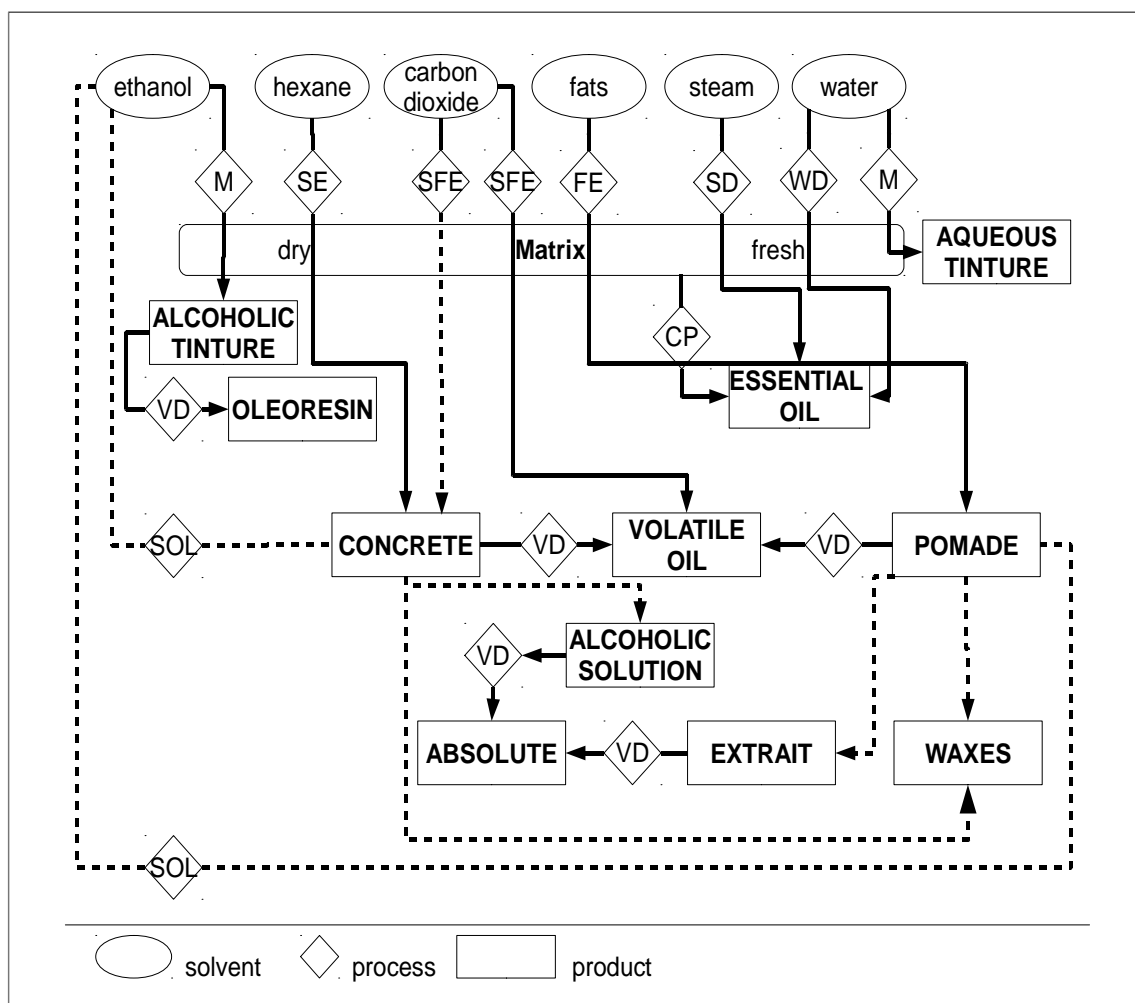


Figura 15. Schema delle differenti tipologie di prodotti ottenibili in funzione del metodo di estrazione: distillazione sotto vuoto, VD; estrazione con solvente, SE; macerazione, M; estrazione con fluidi supercritici, SFE; idrodistillazione, WD; distillazione in corrente di vapore, SD; estrazione mediante grassi, FE; spremitura, CP; solubilizzazione, SOL.

Le tecniche di estrazione tradizionalmente utilizzate sono principalmente basate sulla spremitura a freddo, l'estrazione con solventi e la distillazione. Pur se largamente diffuse, queste tecniche, spesso presentano degli inconvenienti come la degradazione chimica dei componenti ad opera del calore (distillazione ed estrazione con solventi a caldo) o per idrolisi (distillazione e macerazione acquosa), o la presenza indesiderata di residui di solvente nell'estratto come nel caso dell'estrazione con solventi. In tabella 2 sono riportate le principali applicazioni delle tecniche tradizionali.

In tempi relativamente recenti, al fine di ridurre gli inconvenienti delle tecniche tradizionali e di ottimizzare gli aspetti legati ai costi energetici e all'impatto ambientale,

sono state sviluppate numerose moderne tecniche estrattive che possono essere raggruppate in tre principali categorie: tecniche dello spazio di testa, distillazioni modificate ed estrazioni con solvente modificate, come riportato in tabella 3.

Tecnica	Principali varianti	Applicazioni specifiche
Spremitura	<i>Cold Pressing</i>	Oli essenziali dal pericarpo di agrumi (<i>Citrus</i>)
Distillazione	<i>Destructive Distillation</i>	Prodotti di degradazione (<i>juniperus oxycedrus</i>)
	<i>Vacuum Distillation</i>	Estratto volatile da soluzioni alcoliche
	<i>Water Distillation</i>	Oli essenziali da diverse matrici vegetali
	<i>Steam Distillation</i>	
Estrazione con solventi	<i>Macerazione (alcolica, acquosa)</i>	Tinture varie da diverse piante
	<i>Enfleurage (a freddo, a caldo)</i>	Estratto volatile (fiori di gelsomino, rosa, arancio)
	<i>Soxhlet (ciclica a caldo)</i>	Estratti pesanti (in funzione della matrice e del solvente)

Tabella 2. Tecniche tradizionali di estrazione.

Una parte delle moderne tecniche di estrazione elencate (es. tecniche headspace) sono utilizzate principalmente a fini analitici e trovano scarso impiego nei processi industriali, per contro, un processo innovativo come l'estrazione con fluidi supercritici SFE ha trovato impiego industriale nella decaffeinizzazione del caffè.

Nell'attività di ricerca si è scelto di utilizzare tecniche di estrazione applicabili a processi produttivi e che, almeno in parte, siano sensibili alle problematiche energetiche e di impatto ambientale.

In considerazione anche del fatto che la tipologia degli estratti da ottenere è costituita principalmente da oli essenziale e solo marginalmente da frazioni meno volatili, la scelta è ricaduta per le tecniche tradizionali sull'idrodistillazione (Clevenger) e sull'estrazione con solventi (Soxhlet), mentre per le tecniche moderne a basso impatto ambientale si è scelto di utilizzare l'estrazione con CO₂ supercritico che, grazie alla facile modulabilità del potere solvente, consente di ottenere sia le frazioni volatili sia quelle più pesanti.

Tecnica	Principali varianti
Spazio di testa	Static Headspace, SHS
	Dynamic Headspace, DHS
	Headspace - Solid Phase Microextraction, HS-SPME
	Solid – Phase Aroma Concentrate Extraction, SPACE
Distillazione modificata	Accelerated Distillation
	Hydrodiffusion
	Microwave - Assisted Process, MAP
	Compressed Air Microwave Distillation, CAMD
	Solvent-Free Microwave Extraction, SFME
	Microwave Hydrodiffusion and Gravity, MHG
	Microwave - Assisted Hydrodistillation, MAHD
Estrazione con solvente modificata	Ultrasound - Assisted Extraction, UAE
	Accelerated Solvent Extraction, ASE
	Continuous Subcritical Water Extraction, CSWE
	Extraction by liquid carbon dioxide
	Supercritical Fluid Extraction, SFE

Tabella 3. Moderne tecniche di estrazione.

2.3.3. Idrodistillazione

È il processo più utilizzato, in tutte le sue varianti, per la produzione di oli essenziali. I componenti gli oli sono quasi totalmente immiscibili allo stato liquido in acqua, spesso termolabili e hanno temperature di ebollizione comprese tra 150 e 250 °C. L'ebollizione avviene a basse T grazie all'apporto alla pressione totale dato dal vapore d'acqua, P_V :

$$P_{\text{tot}} = P_A + P_B + \dots + P_V$$

P_{tot} = pressione totale; P_A , P_B pressione parziale dei componenti A e B

Il materiale di partenza, a contatto diretto con l'acqua, è soggetto a temperature intorno a 100 °C. Si ritiene che l'acqua in questo processo svolga una triplice funzione: l'acqua calda ammorbidisce il materiale e penetra al suo interno agevolando la fuoriuscita dei componenti solubili; il vapore d'acqua ricondensando sulla superficie del materiale fornisce il calore latente di vaporizzazione ai componenti volatili e

contribuisce fortemente alla pressione totale grazie alla sua pressione di vapore. Dopo la condensazione del vapore, l'olio e l'acqua tornano ad essere immiscibili e possono essere facilmente separati. Questo processo può indurre modifiche per riarrangiamento di composti termolabili [28]. Inoltre, la presenza di acqua può indurre la parziale idrolisi di alcuni composti e solubilizzare i composti aventi solubilità in acqua non trascurabile. Le essenze particolarmente delicate vengono distillate a pressione ridotta in modo da essere soggette a temperature inferiori.

Le estrazioni sono state eseguite secondo la Farmacopea Europea [29], a partire da 100 g di matrice vegetale, con un apparato di tipo Clevenger (figura 16) per la durata di 4 ore. Gli oli ottenuti sono stati anidrificati con Na_2SO_4 e conservati in vials, a 4 °C, per le analisi successive.

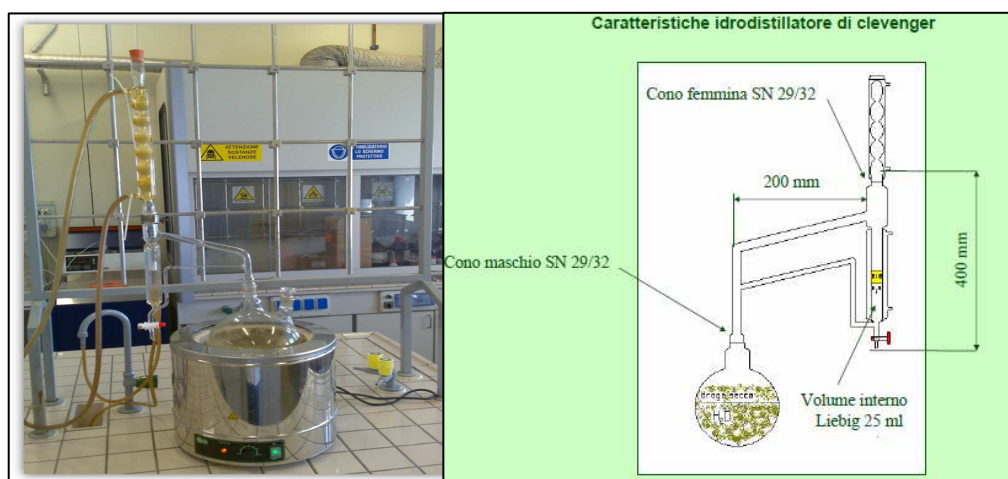


Figura 16. Apparato Clevenger per idrodistillazione.

2.3.4. Estrazione con solventi

L'estrazione con solventi organici è normalmente utilizzata per estrarre composti a più alto peso molecolare rispetto all'estrazione in corrente di vapore e per trattare prodotti termolabili. Questa si realizza mediante due distinti processi: prima si esegue l'estrazione vera e propria da cui si ottiene una miscela costituita dai composti estratti più il solvente (es. esano), poi si procede alla fase di eliminazione del solvente. Su scala di laboratorio si lavora a pressione ridotta utilizzando un evaporatore rotante.

Gli estratti da materiali secchi ottenuti con questo processo sono spesso definiti oleoresine; quelli ottenuti dai materiali freschi sono definiti essenze concrete o concreti.

I solventi organici apolari hanno generalmente una bassa selettività di estrazione, infatti, vengono estratti praticamente tutti i composti non polari dalla matrice di partenza eccetto i polimeri a più alto peso molecolare. Utilizzando un solvente organico a maggiore polarità o una miscela di più solventi (es. CHCl_3 , MeOH da soli o in miscela) è possibile estrarre anche frazioni polari.

Gli estratti ottenuti con questa tecnica sono poco idonei per l'utilizzo nelle applicazioni alimentari a causa della presenza residua, anche se solo in tracce, del solvente utilizzato. Inoltre, i residui vegetali impregnati di solvente spesso sono molto inquinanti.

L'apparecchio automatico semi-continuo da noi utilizzato in laboratorio è un estrattore solido-liquido di Soxhlet (figura 17). È costituito da tre parti fondamentali: dal pallone d'evaporazione, dal corpo centrale, in cui si realizza l'estrazione e dal refrigerante che provvede a condensare i vapori del solvente nel pallone e a farli ricadere nell'estrattore. L'estrazione avviene per percolazione a caldo del solvente nella matrice vegetale; quando il solvente saturo d'estratto raggiunge un determinato livello, per sifonamento ricade nel pallone d'evaporazione.

A questo punto l'estrazione diventa continua, automatica ed autosufficiente, con il risultato che la matrice vegetale nella camera di estrazione viene sottoposta a ripetuti passaggi di solvente puro; questo rende il processo molto più efficiente di una macerazione statica in un solvente in cui la concentrazione dei residui estratti aumenta costantemente, raggiungendo uno stato di equilibrio che impedisce progressivamente la liberazione e l'accumulo dei composti estratti della matrice.

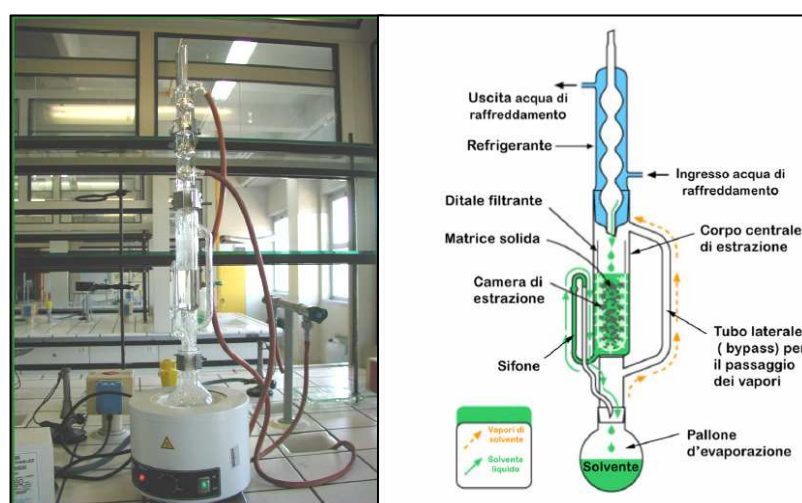


Figura 17. Apparato Soxhlet per estrazione con solventi.

2.3.5. Estrazione con CO₂ supercritico

2.3.5.1. Principi e caratteristiche del metodo

La tecnica di estrazione con Fluidi Supercritici (FS) sfrutta le peculiari caratteristiche che una sostanza assume quando si trova in particolari condizioni di temperatura, T e di pressione, p . La figura 18 riporta il diagramma di fase del CO₂. L'estremo superiore della curva d'equilibrio liquido-vapore viene identificato come punto critico di coordinate T_c (temperatura critica) e p_c (pressione critica). Per valori di T e p superiori a quelli critici non si ha più una netta distinzione fra le fasi liquido e vapore; è necessario sottolineare che la condizione di FS non corrisponde ad uno stato di aggregazione specifico: si tratta in pratica di gas con densità confrontabile con quella della corrispondente fase liquida; ciò conferisce al FS peculiari proprietà: somiglia al liquido per l'elevata densità, somiglia al gas per l'elevata diffusività e la bassa viscosità.

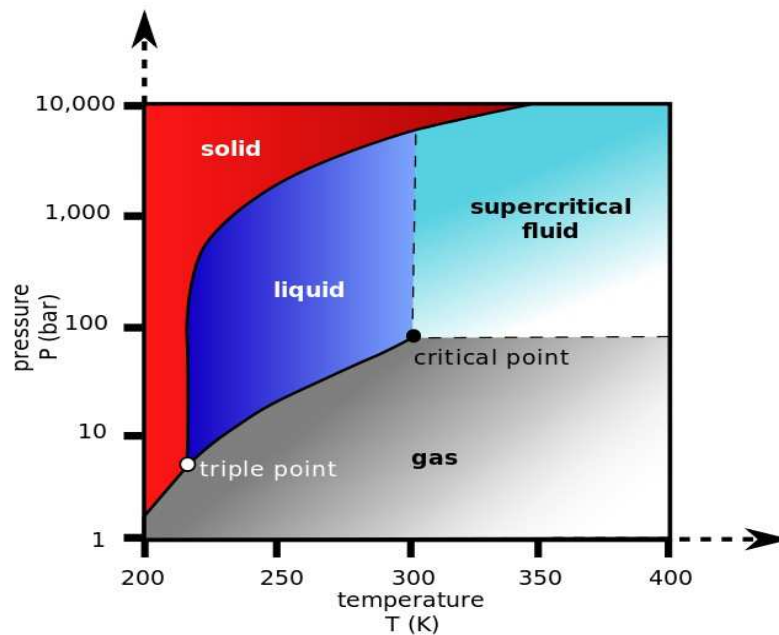


Figura 18. Diagramma di fase del CO₂ nel piano (p , T).

Il CO₂ è il principale solvente utilizzato nell'estrazione con fluidi supercritici, in quanto non è infiammabile né tossico, è economico e disponibile in grande quantità, ma soprattutto perché è facile passare con un modesto consumo di energia dallo stato liquido a quello supercritico; questo perché i suoi punti critici sono situati ad una temperatura ed una pressione non troppo elevati ($T_c = 304.2$ K, $p_c = 7.39$ MPa).

L'estrazione con un fluido supercritico comporta in generale due stadi fondamentali: l'estrazione propriamente detta dove si cerca la massima solubilità del soluto, e la separazione dove al contrario questa solubilità deve essere molto piccola al fine di recuperare l'estratto nella sua totalità.

Il CO₂ in fase liquida e supercritica si presenta come un buon solvente verso soluti compatibili per polarità molecolare, ma in fase liquida non è possibile avere una sufficiente selettività di estrazione. Al contrario, in fase supercritica è possibile modulare il potere solvente, normalmente correlato alla densità: piccole variazioni di pressione fanno variare notevolmente la densità, come messo in evidenza nel diagramma con andamento sigmoide riportato in figura 19 dove (a 313.15 K) per variazioni di pressione tra 9 e 70 MPa. In condizioni supercritiche la densità del diossido di carbonio varia rapidamente tra 200 e 700 kg/m³ acquisendo così un elevato potere solvente; la stessa cosa può dirsi della diffusività, della viscosità e della compressibilità. Un'ulteriore compressione porta ad un aumento moderato del potere solvente: caso per caso, si dovrà pertanto valutare bene l'opportunità di superare eccessivamente la pressione critica, poiché l'operazione potrebbe rivelarsi poco vantaggiosa nell'economia di esercizio dell'impianto di estrazione.

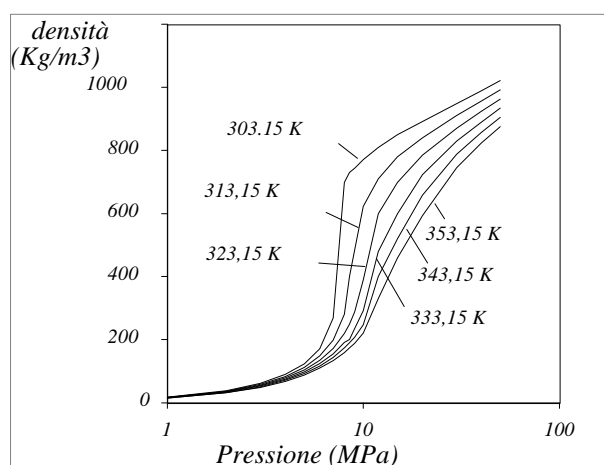


Figura 19. Densità del CO₂ in funzione della pressione in prossimità del punto critico.

La potenziale solubilità di una sostanza in CO₂ supercritico può essere stimata sulla base di quella riscontrata in CO₂ liquido. A questo proposito, di grandissima importanza sono i dati di A.W. Francis [30] relativi ad un rilevante numero di sistemi ternari. La

determinazione accurata della solubilità richiede sempre un approccio sperimentale. Infatti la conoscenza della solubilità non è comunque sufficiente a valutare la fattibilità dell'estrazione della sostanza con CO₂ supercritico da una matrice naturale dove sono presenti più composti di solubilità confrontabile. Pur prescindendo dalla permeabilità della matrice naturale al CO₂, si deve considerare la selettività dell'estrazione, cioè la possibilità di estrarre la sostanza di interesse lasciando nella matrice la maggior parte dei composti indesiderati.

La selettività di estrazione può essere modificata variando la polarità del solvente supercritico. Nel caso del diossido di carbonio, che è apolare, è possibile accrescere la polarità complessiva della fase supercritica dissolvendo in essa alcoli a basso peso molecolare o acqua. I soluti disciolti nella fase supercritica sono denominati **cosolventi**; composti sub-critici nelle condizioni operative, di volatilità intermedia tra quella del solvente e quella del soluto, in percentuale in moli non eccedente il 15 %.

Spesso nella pratica industriale si osserva che l'immissione di acqua o alcoli, in proporzioni superiori alle rispettive solubilità, nel flusso di solvente supercritico migliora considerevolmente le rese di estrazione di alcuni composti e quindi modifica significativamente la selettività complessiva del processo di estrazione. E' il caso della caffeina, della nicotina, del colesterolo, che vengono estratti in misura significativa rispettivamente dal caffè, dal grezzo proteico del tabacco, dal tuorlo d'uovo in polvere, in presenza di acqua o alcoli a basso peso molecolare, mentre mostrano una estraibilità molto minore in CO₂ supercritico puro. Le sostanze che producono questo effetto sono denominate **entrainers** e agiscono con un meccanismo completamente diverso da quello dei cosolventi. E' importante notare che la stessa sostanza, ad esempio l'acqua, è cosolvente (cioè agisce come modificatore della polarità) quando è effettivamente disciolta nella fase supercritica ($y_A < 0.01$), mentre è entrainer quando partecipa al processo estrattivo pur rimanendo indisciolta, cioè separata fisicamente dalla fase supercritica. In queste condizioni, il ruolo principale dell'acqua non riguarda la variazione della polarità o qualunque altra proprietà della fase supercritica, ma le modificazioni dello stato chimico e fisico del soluto da estrarre e della matrice che lo ospita.

Schematicamente, ai cosolventi e agli entrainers è possibile attribuire le seguenti caratteristiche:

Cosolvente

- Modifica il comportamento *PVT*. L'aggiunta di un cosolvente permette, in particolare, di variare la temperatura critica.
- Aumento della solubilità [31, 32]. Sembra che i cosolventi apolari migliorino indistintamente la solubilità dei composti polari e apolari. I cosolventi polari agiscono in modo più selettivo: la solubilità dei composti apolari è poco o niente influenzata mentre quella dei composti polari aumenta sensibilmente. Questo aumento della solubilità ottenuto col cosolvente permette di lavorare a pressioni molto meno elevate per una data solubilità.
- Migliora o crea la selettività. La selettività può essere indotta per aggiunta di un cosolvente apolare perché questo provoca delle interazioni specifiche con i soluti. Si può manifestare anche per formazione di un complesso. Questo è il caso del colesterolo e del stigmaterolo in presenza di CO₂ supercritico. L'aggiunta di metanolo (3.5 % molare) provoca la precipitazione del stigmaterolo mentre il colesterolo resta in fase supercritica.

Entrainer

- Modifica la permeabilità dei tessuti vegetali, delle pareti cellulari, delle membrane che racchiudono il soluto in compartimenti e lo sottraggono all'azione solubilizzante del solvente supercritico.
- Idrolizza o transesterifica le molecole di soluto immobilizzate da legami esterici a composti di più elevato peso molecolare, come gli acidi clorogenici, o a strutture supramolecolari, come membrane, fibrille, etc, e le rende disponibili alla dissoluzione nella fase supercritica.
- L'effetto entrainer può essere ottenuto semplicemente pretrattando la matrice che contiene il soluto: ad esempio, è sufficiente preumidificare i chicchi verdi del caffè, o il tuorlo d'uovo in polvere, e procedere in seguito all'estrazione con un normale impianto, dove parte dell'entrainer, trascinato per strappaggio nel flusso di fluido supercritico, viene ritrovato nel primo separatore.

Il trasporto di materia rappresenta il punto cardine del processo di estrazione; la matrice solida fissa (letto) è attraversata da una fase fluida in movimento (solvente). In questo modo si può ottenere il trasferimento di uno o più composti dalla matrice solida al solvente. Il solvente deve attraversare sia il film fluido che si forma intorno alle particelle di solido, sia la matrice solida sino al sito in cui è collocato il composto da estrarre e solubilizzare. La soluzione così formata deve poi riattraversare la matrice solida ed il film esterno per raggiungere la fase fluida in movimento verso l'uscita dell'estrattore. Questi processi appena descritti costituiscono gli stadi di trasporto di materia nel corso del processo di estrazione. La forza motrice del processo è in pratica proporzionale alla differenza di concentrazione del soluto nelle due fasi che a sua volta è

legato a parametri come la diffusività e il coefficiente di trasporto di materia. Nel caso di matrici solide, è anche necessario definire e valutare le resistenze al trasporto di materia all'interno della fase solida, che sfuggono ad una definizione semplice per via dell'estrema complessità dei materiali su cui in genere viene effettuata l'estrazione. Si ipotizza [33], come mostrato in figura 20 che il soluto possa trovarsi all'interno della matrice in tre collocazioni in ordine crescente di difficoltà di estrazione del soluto. La parte di soluto all'interno delle cellule può non essere completamente recuperabile. In una matrice reale il soluto può essere distribuito in tutte le tre collocazioni o esclusivamente in una di esse. Ad esempio nella SFE di oli essenziali quasi tutto il soluto è situato nella parte interna delle particelle. Il materiale esposto alla superficie delle particelle viene immediatamente disciolto per lavaggio (washing). La parte restante viene estratta per diffusione (diffusion).

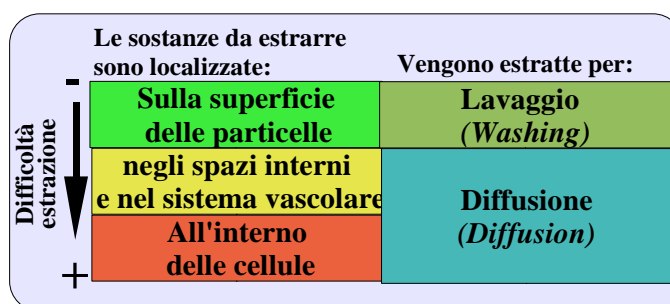


Figura 20. Localizzazione delle sostanze da estrarre e relativo meccanismo associato.

Le evidenze sperimentali per le SFE da matrici solide vegetali propongono la possibilità che lo stadio limitante, il trasporto di materia, possa essere collocato sia all'esterno che all'interno della matrice solida [34].

In figura 21 sono illustrati i possibili stadi in serie del processo di trasporto di materia da una matrice solida. Lo stadio più lento è quello che controlla la velocità dell'intero processo. Il caso in cui lo stadio più lento è la diffusione dei prodotti nel film supercritico si verifica nell'estrazione dell'olio di semi. Il caso in cui lo stadio più lento è la diffusione del CO₂ nella particella di solido è quello riferibile all'estrazione di oli essenziali da matrici erbacee e della caffeina dai chicchi di caffè, cioè di composti situati all'interno della matrice solida ed in essa contenuti in quantità modeste. In realtà, un più

dettagliato meccanismo di trasporto ipotizzato per l'estrazione degli oli essenziali è quello che prevede resistenze alla diffusione sia interne che esterne [34].

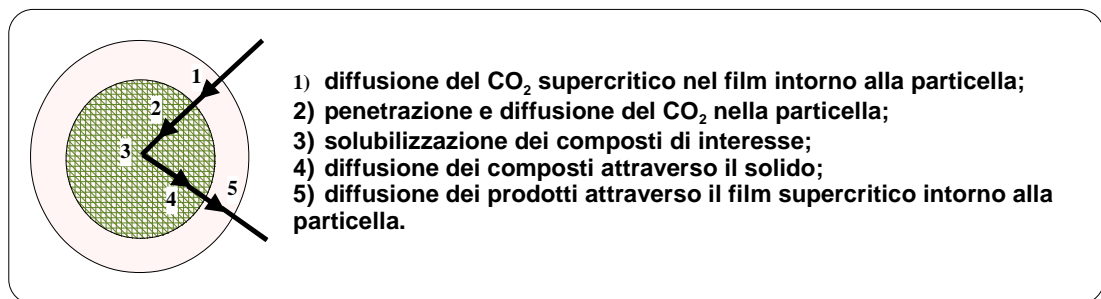


Figura 21. Meccanismo a stadi del trasporto di materia da una matrice solida.

2.3.5.2. Il Processo di estrazione

Il più semplice schema di processo è quello, riportato in figura 22, che prevede la separazione dell'estratto dal solvente per variazione di pressione. Se dopo il passaggio attraverso la matrice che contiene le sostanze da estrarre, il fluido supercritico viene riportato a pressioni inferiori alla sua p_c , perde il potere solubilizzante; le sostanze estratte si separano nello stato fisico stabile (liquido o solido) alle nuove condizioni di T e p , e risultano del tutto esenti da tracce del solvente, tornato allo stato di gas subcritico. Questo, una volta allontanato dall'ambiente dove ha luogo la separazione dei soluti, viene riportato in condizioni supercritiche e riciclato verso la camera di estrazione.

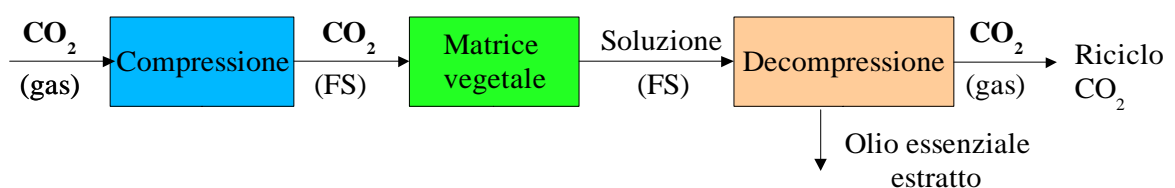


Figura 22. Schema del processo di estrazione con CO₂ supercritico.

Nella messa a punto delle condizioni ottimali del processo di separazione, per una determinata matrice vegetale, è necessario tenere conto anche di altri fattori, quali la comunicazione della matrice vegetale, la pressione, la temperatura, la portata del solvente e il tempo totale di estrazione.

Effetto della macinazione

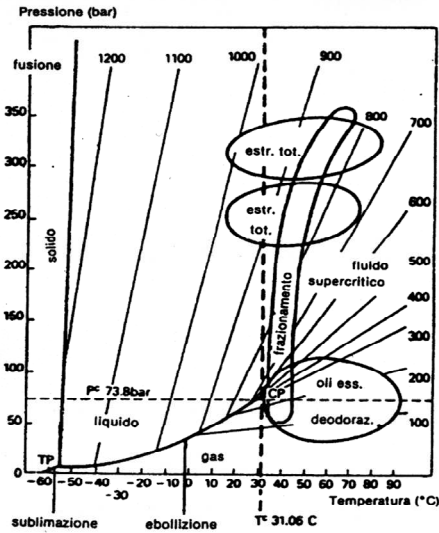
Le dimensioni medie delle particelle hanno un ruolo importante nell'andamento del processo di estrazione. Esse hanno influenza sulle resistenze al trasporto di materia perché sono collegate alla distanza di diffusione ed al numero di membrane cellulari distrutte nel processo di macinazione. Pertanto in linea di principio sarebbe utile operare con particelle che siano più piccole possibili. Però una macinazione troppo spinta può indurre degradazione della matrice vegetale se eseguita senza le necessarie precauzioni che ne evitino il surriscaldamento.

Effetto della pressione

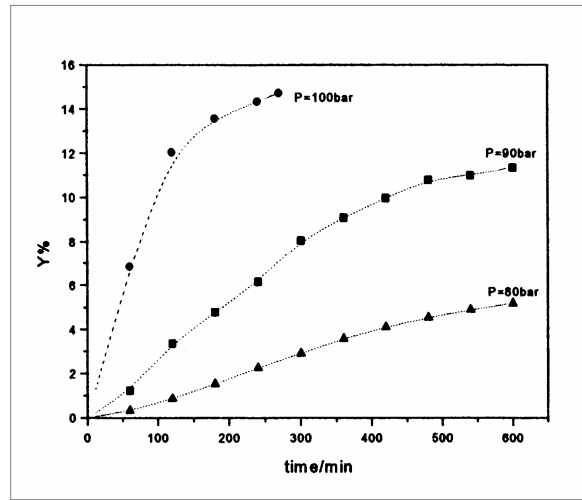
La scelta della pressione di estrazione ed il controllo rigoroso della stessa durante tutta la durata del processo sono gli elementi chiave per ottenere degli estratti di qualità. Nella figura 19 si è messo in evidenza come la densità del CO₂ supercritico, e di conseguenza il suo potere solvente, possa essere facilmente modulata con la pressione e che in tal modo si possano emulare differenti tipologie di estrazioni tradizionali. Lavorando nella prima parte ripida della curva sigmoide ($8.0 < p_{(\text{MPa})} < 10.0$) è possibile ottenere un estratto volatile che presenta caratteristiche molto simili a quelle degli oli essenziali ottenuti con il classico processo di idrodistillazione. Estrazioni condotte a differenti valori di p sempre all'interno di questa regione (8.0, 9.0, 10 MPa) sul legno di *Juniperus oxycedrus* [35] hanno messo in evidenza, così come riportato in figura 23(b) che la resa % di estrazione a 10 MPa aumenta significativamente e che il tempo di estrazione totale arriva quasi a dimezzarsi, mentre la composizione dei differenti estratti ottenuti non varia significativamente.

Lavorando nella parte centrale ripida della curva sigmoide ($20 < p_{(\text{MPa})} < 50$) è possibile ottenere differenti tipologie di estratto pesante che in un qualche modo può essere paragonato alla concreta ottenibile con la classica estrazione con solventi utilizzando sia solventi apolari, che a bassa/media polarità, come ben evidenziato nella figura 23(a).

La facile modulabilità del potere solvente viene spesso sfruttata per realizzare un frazionamento dei composti estraibili, effettuando estrazioni multiple, impiegando CO₂ dal potere solvente crescente, sulla stessa carica inserita nell'estrattore.



(a)



(b)

Figura 23. (a) Diagramma p,T del CO_2 e prodotti estraibili alle differenti pressioni nel campo supercritico; (b) Resa percentuale (w/w), Y %, dell'olio essenziale ottenuto dal legno di *J. oxycedrus* rispetto al tempo di estrazione a 50°C , $\phi_{\text{CO}_2}=1.5$ kg/h, alle differenti pressioni di 80, 90 and 100 bar.

Effetto della portata del solvente

Esaminando la figura 24, che riporta in grafico la resa di estrazione rispetto al tempo, per diverse portate di CO_2 supercritico, si nota che il tratto iniziale rettilineo della resa è attribuito ad una velocità costante di estrazione: durante la prima parte del processo la superficie esterna del materiale è completamente ricoperta di olio ed è possibile che il solvente raggiunga la concentrazione di equilibrio.

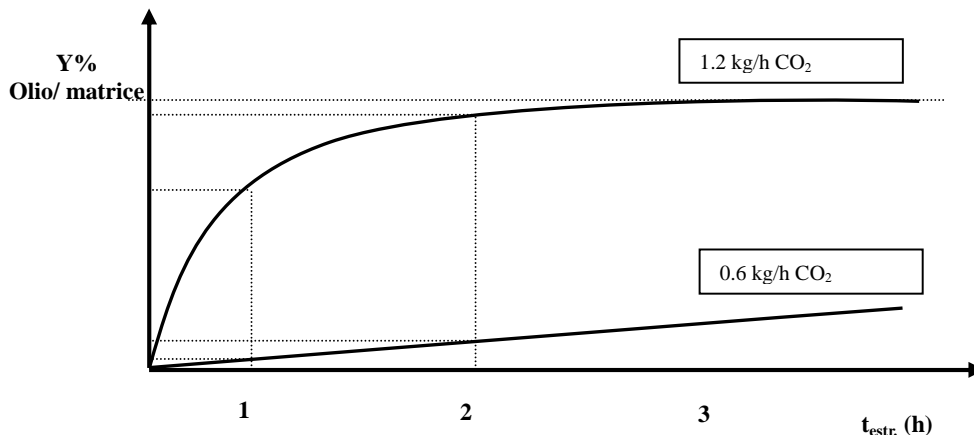


Figura 24. - Resa di estrazione nel tempo per diverse portate di solvente.

La successiva rapida diminuzione della velocità di estrazione può essere causata dalla scomparsa dello strato continuo di olio e in questa fase il trasporto di materia dipende

dalla diffusione all'interno della particella che produce velocità di estrazione molto basse. A portate basse (0.6 kg/h CO₂) la resistenza al trasporto di massa nel film superficiale è molto elevata.

Effetto della durata dell'estrazione

Il processo di estrazione non è istantaneo in quanto anche se i composti di interesse manifestano un'alta solubilità nel CO₂ supercritico, bisogna considerare anche l'affinità dei composti da estrarre con la matrice, che creerà una resistenza alla migrazione verso la miscela supercritica. L'esaurimento della matrice in un processo di estrazione con una portata di solvente ottimizzata, come mostrato anche dalla figura 24, richiederà alcune ore. È interessante notare la variazione nel tempo delle rese di estrazione cumulative per differenti classi di composti contenuti nella stessa matrice: nel caso dell'estratto volatile ottenuto dalla *Santolina insularis* [36] riportato in figura 25, dove nel primo grafico si vede che per tutte le classi di composti la resa aumenta con il tempo ma con differenti velocità. Se si considera il secondo grafico dove sono riportate le % delle varie classi di composti sull'estratto a tempi differenti, risulta evidente che è possibile ottenere degli estratti con composizioni differenti semplicemente variando il tempo di estrazione e/o frazionando l'estratto con prelievi a differenti tempi di estrazione.

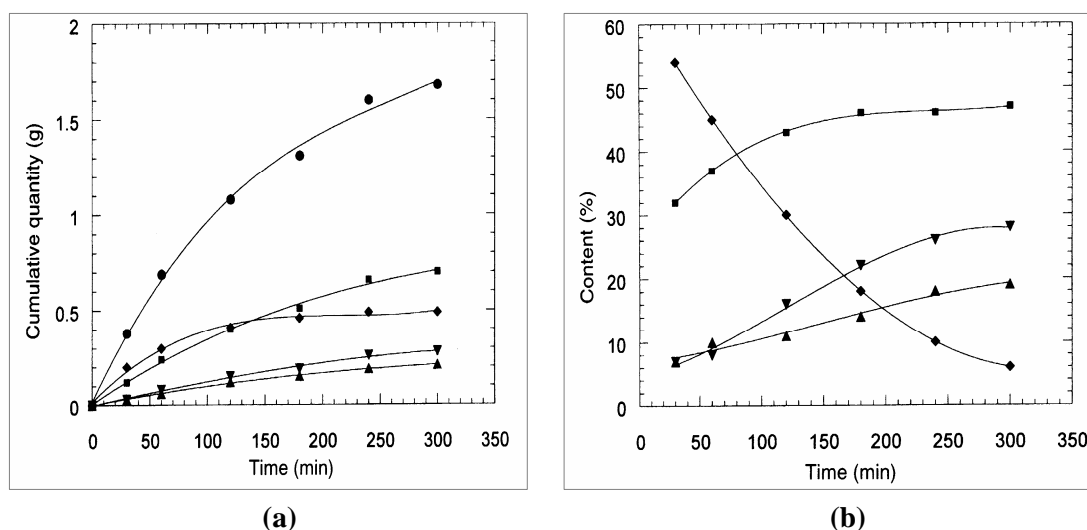


Figura 25. Evoluzione della composizione dell'olio essenziale di *Santolina insularis* rispetto al tempo di estrazione (a): Quantità cumulative espresso come grammi di estratto delle differenti famiglie di composti. (b) Percentuale delle diverse famiglie di composti. ◆, monoterpeni idrocarburi; ■, monoterpeni ossigenati; ▲, sesquiterpeni idrocarburi, ▼, sesquiterpeni ossigenati; ●, resa totale.

Estrazione frazionata

Un miglioramento della selettività delle estrazioni si può ottenere sfruttando la caratteristica dei fluidi supercritici di permettere una variazione continua del loro potere solvente tra due stati definiti, questa permette di realizzare facilmente delle operazioni di frazionamento molto complesse: si può utilizzare la variazione di solubilità dei prodotti nel solvente supercritico in funzione della temperatura a p costante ed in funzione della pressione a T costante al momento della decompressione.

Quando l'estratto trascinato dal solvente è una miscela molto complessa è spesso possibile frazionare questo estratto al momento della separazione del solvente realizzando la decompressione in più stadi ed i prodotti ottenuti sono molto differenti.

Le matrici erbacee di regola contengono anche altri composti solubili in CO_2 supercritico: cere cuticulari, trigliceridi, esteri di acidi grassi, pigmenti, steroli; tranne che per le cere cuticulari, la loro solubilità a 50°C diventa rilevante solo per pressioni intorno a 200 bar. Le cere cuticulari, in particolare, sono molto diffuse nel mondo vegetale come copertura fogliare ed elemento strutturale; sono costituite da idrocarburi saturi a catena lineare ed elevato peso molecolare, e sono solubili in CO_2 supercritico. La coestrazione di questi composti (che trovandosi all'esterno della superficie fogliare presentano una scarsa resistenza al trasferimento) conferisce all'estratto un' indesiderata consistenza cerosa che ne può impedire l'utilizzo in alcune applicazioni.

Il problema della coestrazione delle cere può essere risolto introducendo la separazione frazionata degli estratti (figura 26). Questa tecnica consiste nella separazione dei composti contenuti nella soluzione supercritica operando con due o più separatori in serie.

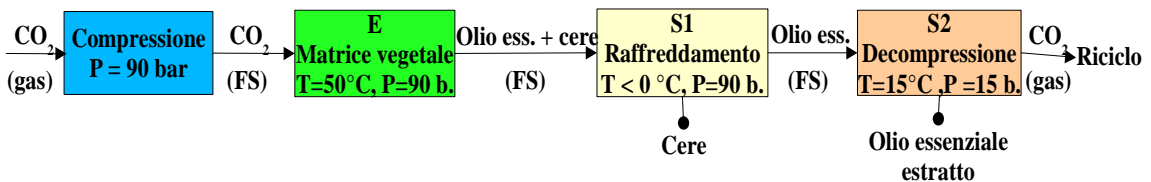


Figura 26. Schema del processo di estrazione frazionata con CO_2 supercritico.

I separatori sono settati a differenti condizioni di T e p , per precipitare selettivamente i composti estratti. Infatti, quando sia l'olio essenziale che le cere sono nella soluzione supercritica, non è presente la resistenza al trasferimento di massa, e sono applicate solo

le condizioni di solubilità. E' possibile, pertanto, usare i dati di solubilità per scegliere le appropriate condizioni di separazione. Attorno a 0 °C, nel CO₂ liquido, le paraffine ed i terpeni presentano differenti solubilità: quella delle paraffine è quasi nulla mentre, al contrario, i terpeni sono completamente miscibili [37]. Pertanto, paraffine superiori a C₂₅, solubilizzate durante l'estrazione supercritica, possono essere precipitate nel primo separatore settato a circa 0 °C, mentre i composti dell'olio essenziale vengono raccolti nel secondo separatore, come evidenziato dai cromatogrammi riportati in figura 27 [38], dove una grande riduzione di pressione induce il passaggio del CO₂ allo stato gassoso.

Inoltre questo metodo permette di facilitare la separazione solvente-estratto perché la brusca decompressione in un solo stadio può portare all' indesiderata formazione di una nebbia di goccioline fini di solvente liquido, contenente l'estratto, nel solvente gassoso.

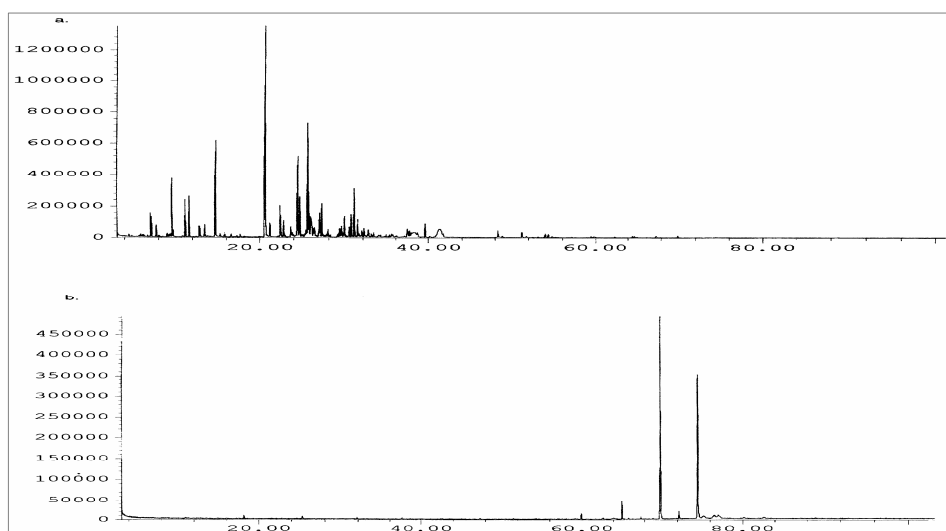


Figura 27. Tracciati GC degli estratti da foglie di *Helicrysum microphyllum* ottenuti tramite SFE alle condizioni di estrazione: 90 bar, 50 °C; primo separatore, 90 bar e -6°C; secondo separatore, 15 bar e 20 °C. (a), olio essenziale; (b) cere cuticulari.

2.3.5.3. L'impianto utilizzato e le condizioni operative

Gli estratti in fase supercritica oggetto di questo lavoro di tesi sono stati quasi tutti ottenuti utilizzando l'impianto del Laboratorio di Fluidi Supercritici (Dip. Scienze Chimiche Università di Cagliari) il cui schema è sotto riportato in figura 28.

L'apparecchiatura, costruita dalla ditta LA-ME (Bergamo) su progetto dell'Università degli Studi di Cagliari e Milano, è dotata di un estrattore di capacità 0.32 dm³, di due

separatori in serie di volume rispettivamente di 0.4 e 0.3 dm³ e pressione max di esercizio di 350 MPa . L'ultimo separatore è dotato di valvola micrometrica dalla quale in qualunque momento dell'estrazione è possibile prelevare gli estratti che si presentano allo stato liquido più o meno denso. Il CO₂ viene fatto circolare nell'impianto tramite l'uso di una pompa per liquidi ad alta pressione e la regolazione fine della pressione è effettuata con valvole micrometriche.

Il controllo delle pressioni nelle diverse sezioni dell'impianto è effettuato mediante manometri, mentre le temperature sono misurate da termocoppie Fe/Const da 1/8". La portata istantanea di CO₂ è misurata tramite rotometro calibrato posto a valle dell'impianto mentre la quantità totale è valutata mediante un contatore.

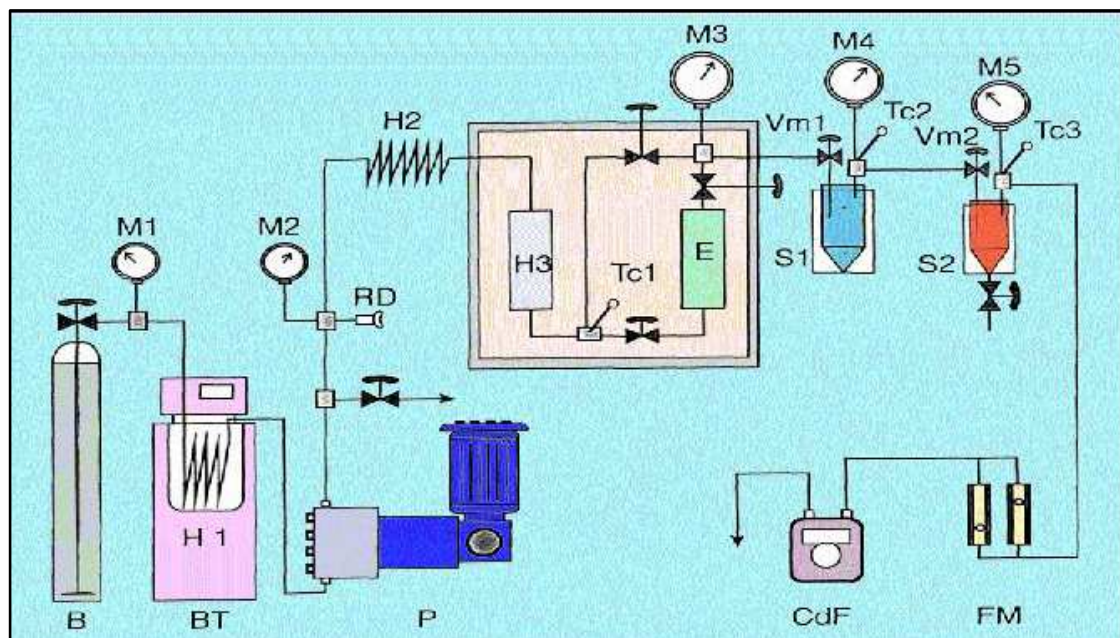


Figura 28. Schema dell'impianto di estrazione da laboratorio con fluidi supercritici: **B** bombola di CO₂; **M1** - **M5** manometri; **BT** criotermostato; **H1**, **H2** scambiatori di calore; **P** pompa per liquidi; **RD** disco di scoppio; **H3** polmone; **Tc1** - **Tc3** termocoppie; **E** estrattore; **Vm1**, **Vm2** valvole micrometriche; **S1**, **S2** separatori; **FM** flussimetro; **CdF** misuratore di portata.

Funzionamento dell'impianto e condizioni operative

Il CO₂ liquido in equilibrio con la sua fase vapore è contenuto in una bombola provvista di tubo pescante. Affinché possa essere pressurizzato dalla pompa a membrana è necessario che arrivi ad essa in fase liquida; per questo motivo è presente un sistema di termostatazione che regolato a -4 °C ci assicura che il CO₂ si mantenga allo stato liquido. Dopo pressurizzazione ad un valore superiore al suo p_c , il CO₂ passa attraverso

un preriscaldatore ad una temperatura superiore a T_c , arrivando così alla condizione di fluido supercritico.

Prima di arrivare all'estrattore, il CO_2 passa all'interno di un polmone riempito di materiale inerte allo scopo di attenuare le pulsazioni di flusso imposte dalla pompa. Polmone ed estrattore sono contenuti in un forno riscaldato mediante resistenze; la temperatura di esercizio (solitamente tra 40 e 50 °C) è programmata da una centralina. Esternamente al forno sono disposti i due separatori in serie, ciascuno preceduto da valvola micrometrica laminatrice, dotati di sistema per controllo della temperatura e della pressione.

Nel caso dell'estrazione di oli essenziali, nel primo separatore si imposta la pressione a 90 bar e la temperatura intorno ai -15 °C, mediante criotermostato a bagno. In queste condizioni il CO_2 è un liquido con elevata densità ($\sim 1.04 \text{ g cm}^{-3}$) in cui l'olio essenziale è molto solubile, mentre le cere cuticulari solidificano e precipitano. Nel secondo separatore la pressione è regolata a 20 bar e la temperatura a 15 °C, il CO_2 , nello stato di vapore, perde il suo potere solubilizzante e rilascia l'olio essenziale nel fondo del separatore. Il CO_2 passa attraverso un flussimetro, quindi arriva al rotometro e infine viene scaricato all'esterno, essendo il nostro impianto a loop aperto.

Nel caso lo scopo sia quello di ottenere l'estrazione di coloranti o di principi attivi a più alto peso molecolare, si lavora con la configurazione ad un solo separatore, in pratica viene eliminato lo stadio di frazionamento delle cere. La pressione di esercizio viene fissata a valori elevati (tipicamente 200, 250, 300 bar) in funzione della tipologia di estratto desiderato.

Durante il lavoro di tesi ho utilizzato per alcune estrazioni anche l'impianto pilota installato presso la Porto Conte Ricerche (Alghero) che presenta lo stesso schema funzionale del nostro, ma permette di effettuare studi per il passaggio di scala (fattore 15) in quanto è dotato di un estrattore da 5 dm³. La pressione massima di esercizio è di 600 bar e il CO_2 a fine processo non viene scaricato in atmosfera ma riutilizzato.

Procedura operativa

La biomassa vegetale, dopo aver subito la fase di pretrattamento (identica a quella per l'idrodistillazione) viene pesata e quindi caricata uniformemente evitando un eccessivo impaccamento all'interno dell'estrattore adeguatamente assemblato; nei casi in cui la

quantità di matrice disponibile non sia stata sufficiente al completo riempimento, si provvede a riempire il volume morto con delle sfere di vetro. I termostati ed il forno vengono accesi almeno un'ora prima dell'esperimento vero e proprio, che ha inizio una volta che l'impianto raggiunge le condizioni di pressione e temperatura stabilite. Particolare attenzione è rivolta alle condizioni termiche del primo separatore che inizia ad essere refrigerato almeno 4 h prima dell'avvio dell'astrazione, in modo da avere una temperatura compresa tra -15 e -20 °C all'inizio della prova. Nel momento in cui si dà inizio all'estrazione, si azzerano il misuratore volumetrico del gas e si eseguono degli spillamenti a tempi prefissati.

La temperatura del forno è normalmente fissata tra $40 \div 60$ °C; la pressione di esercizio è fissata tra $80 \div 100$ bar per l'ottenimento dell'estratto volatile, mentre viene fissata a 200/250/300 bar a seconda del tipo di estratto pesante che si vuole ottenere; il tempo di estrazione è normalmente di 4 h; il flusso del solvente è normalmente di 1kg/h di CO₂

Tutti i parametri monitorati in ogni prova vengono registrati su un foglio elettronico che calcola in automatico tutti gli altri dati utili.

2.3.6. Confronto tra le tecniche estrattive utilizzate

La notevole attività di estrazione da matrici vegetali svolta durante il lavoro di ricerca ci ha permesso di acquisire una buona confidenza con le differenti tecniche utilizzate. Le specifiche caratteristiche delle singole tecniche unite all'esperienza sul campo ci fanno propendere, come tecnica di elezione, verso l'estrazione con fluidi supercritici.

La tecnica SFE con CO₂ infatti costituisce una valida alternativa ai processi tradizionali di distillazione frazionata, distillazione in corrente di vapore, estrazione con solventi e estrazione con Soxhlet, che spesso richiedono condizioni di esercizio incompatibili con la stabilità chimica delle sostanze da estrarre oppure comportano la ritenzione di tracce indesiderate di solvente, e sono processi a bassa selettività.

L'estrazione con CO₂ supercritico è una tecnica promettente per la produzione di sostanze di interesse farmacologico, profumi e aromi da matrici vegetali; ad esempio possono essere ottenute formulazioni di profumi nuove e migliori se paragonate a quelle ottenute con le tecniche tradizionali.

Il processo SFE non è però privo di qualche svantaggio principalmente legato agli elevati costi dell'impianto e alla necessità di un'adeguata competenza tecnico/scientifica per la corretta ottimizzazione e gestione del processo.

La convenienza della SFE con CO₂ rispetto ai metodi tradizionali dipende principalmente da:

- valore commerciale del prodotto estratto;
- costo energetico;
- grado di purezza richiesto;
- limitazioni ecologico-ambientali obbligatorie.

Un confronto schematico fra le principali caratteristiche delle differenti tecniche estrattive utilizzate è riportato nelle tabelle 4 e 5.

SFE con CO ₂	Idrodistillazione
Condizioni di esercizio compatibili con la stabilità delle matrici vegetali (tipicamente 40 °C e 90 bar)	Temperature più elevate (~ 100 °C) che possono indurre processi di decomposizione e/o trasformazione dei composti termolabili
Assenza di fenomeni di idrolisi	H ₂ O nel processo di estrazione può indurre la parziale idrolisi e parziale solubilizzazione di alcuni composti nella fase acquosa.
Bassi costi energetici	Costi energetici più elevati
Elevati costi iniziali di impianto	Bassi costi iniziali di impianto

Tabella 4. Confronto tecnica di estrazione con CO₂ in fase supercritica e idrodistillazione.

SFE con CO ₂	Estrazione con solventi
Facile modubilità della capacità solvente variando pressione e temperatura	Bassa selettività di estrazione
Si può modificare parzialmente l'affinità del CO ₂ supercritico verso la frazione polare con l'aggiunta di cosolventi e/o entrainers	Buona capacità di estrazione verso la frazione polare (scegliendo l'opportuno mix di solventi)
Al termine del processo l'estratto è totalmente separato dal solvente	Processo in più fasi: prima si esegue l'estrazione vera e propria e poi si procede all'eliminazione del solvente
Totale assenza di tracce di solvente nell'estratto	Estratti poco idonei in particolare per le applicazioni alimentari per la presenza (anche se solo in tracce) del solvente utilizzato
Il residuo di estrazione può essere direttamente riutilizzato in altri processi come materia seconda	I residui vegetali impregnati di solvente sono molto inquinanti e necessitano di appositi trattamenti come rifiuti speciali
Totale atossicità del solvente	I solventi normalmente usati sono tossici
Bassi costi energetici	Costi energetici più elevati
Elevati costi iniziali di impianto	Bassi costi iniziali di impianto

Tabella 5. Confronto tecnica di estrazione con CO₂ in fase supercritica e estrazione con solventi.

2.4. Caratterizzazione chimica

L'analisi chimica degli estratti da matrici vegetali spesso presenta complessità e ostacoli che dipendono sia dalla natura specifica della matrice, che dalla tipologia dell'estratto. Gli estratti totali ad esempio esigono spesso di molteplici operazioni di frazionamento prima di poter eseguire l'identificazione dei diversi componenti.

La tipologia degli estratti che sono stati investigati da punto di vista qualitativo e quantitativo, appartiene principalmente a quella degli oli essenziali / estratti volatili. Nel caso di estratti non volatili, ottenuti mediante estrazione con solventi e con SFE alta pressione, le analisi sono state indirizzate principalmente alla quantificazione di alcuni composti di interesse.

2.4.1. Caratterizzazione degli oli essenziali

La caratterizzazione degli oli essenziali in passato si è basata [39,40], oltre che sull'esame organolettico, soprattutto su determinazioni di parametri quali: colore, limpidezza, densità, potere rotatorio, indice di rifrazione, residuo all'evaporazione, indice di acidità, indice di esteri ed in seguito anche alla cromatografia liquida TLC e su carta, etc... La determinazione della composizione qualitativa e quantitativa degli oli essenziali risultava, in passato, spesso un'operazione alquanto laboriosa e non priva di difficoltà. Solo in tempi relativamente recenti si è potuto far uso di tecniche analitiche strumentali che grazie al rapido progresso scientifico/tecnologico attualmente permettono di ottenere ottimi risultati.

I moderni metodi analitici per la caratterizzazione chimica degli oli essenziali sono principalmente basati su tecniche cromatografiche, anche se un importante contributo è dato anche dalla risonanza magnetica nucleare ^{13}C NMR [41]. La spettrometria di massa trova la sua migliore applicazione accoppiata alla cromatografia in fase gas (GC-MS) ma anche in fase liquida (LC-MS) [42].

Applicazioni più avanzate come ad esempio fast CG, cromatografia chirale e multidimensionale (GC e LC), unite a sofisticati algoritmi di elaborazione dati (deconvoluzione, analisi multivariata, etc..) [43,44] trovano sempre più diffusione nell'analisi degli estratti di origine vegetale.

2.4.1.1. Caratterizzazione qualitativa

La tecnica scelta per l'analisi degli estratti volatili è la cromatografia in fase gassosa (GC), per quanto riguarda le buone capacità separative e la possibilità di determinazioni quantitative, accoppiata alla spettrometria di massa (MS) che ha come caratteristica principale l'alta sensibilità e l'ottima capacità di identificazione.

Per la separazione dei componenti l'olio essenziale si utilizzano colonne capillari sia apolari contenenti dimetilpolisilossano (es. DB-1, HP-1, SPB-1) o poli(5 % difenil 95 % dimetil)silossano, che migliora la stabilità termica della fase (es. DB-5, HP-5, SPB-5), che polari contenenti polietilenglicol (es. Carbowax 20M, HP-INNOWax, Supelcowax 10); queste colonne hanno sensibilità ed efficienza elevate e consentono la separazione del maggior numero possibile di componenti la miscela (> 150.000 piatti teorici).

Dopo la separazione GC, i componenti la miscela sono evidenziati nel cromatogramma dai singoli picchi, ad ognuno dei quali è associato un tempo di ritenzione t_R (dipendente anche dalle condizioni d'uso dello strumento e quindi non utilizzabile a scopo di confronto con analoghi dati di letteratura) o meglio un indice di ritenzione, parametro al t_R associato. Tale indice permette di ottenere, per ogni componente, un valore indipendente dalle caratteristiche geometriche delle colonne, per ogni fase stazionaria e temperatura. L'effetto della temperatura può essere trascurato qualora si lavori con fasi stazionarie apolari. Gli indici di ritenzione più utilizzati sono quelli logaritmici di Kovats [45] che è stato sviluppato per condizioni di separazione isoterme e quello lineare di van den Dool e Kratz [46] per le separazioni non isoterme con rampa di temperatura programmata.

Nella pratica gli indici di ritenzione sono calcolati sulla base dei tempi di ritenzione, ottenuti nelle stesse condizioni cromatografiche, di un composto sconosciuto i e di due n -alcani, secondo le formule:

$$KI = \frac{\log(t_R)_i - \log(t_R)_z}{\log(t_R)_{z+1} - \log(t_R)_z} \times 100 + 100 \times z \quad (\text{indice logaritmico di Kovats})$$

$$LRI = \frac{(t_R)_i - (t_R)_z}{(t_R)_{z+1} - (t_R)_z} \times 100 + 100 \times z \quad (\text{indice lineare di van den Dool e Kratz})$$

dove z e $z+1$ sono il numero di atomi di carbonio degli alcani che eluiscono rispettivamente prima e dopo il componente i .

Gli indici di ritenzione così calcolati sono riproducibili, a parità di condizioni cromatografiche, con sufficiente precisione e possono essere utilizzati come parametro comparativo per l'identificazione dei componenti la miscela.

Le condizioni di separazione usate per gli oli essenziali normalmente prevedono l'uso della rampa di temperatura programmata; l'uso degli indici di ritenzione lineari (LRI) si rivela lo strumento ideale per identificare i componenti l'olio essenziale [47]. Si noti che nella letteratura concernente gli oli essenziali molto spesso sono riportati i valori degli indici di ritenzione logaritmici (KI), nonostante questi trovino la loro applicazione ottimale nelle separazioni isoterme. I valori degli indici di ritenzione dei diversi composti sono normalmente calcolati per analisi diretta di miscele standard di -alcani, anche se sul mercato sono disponibili banche dati sia generiche sia specializzate [48,49].

Nel caso si utilizzi solo un GC con detector FID o TCD, l'identificazione dei componenti tramite il solo indice di ritenzione (tecnica monodimensionale) può non essere totalmente affidabile e pertanto si preferisce utilizzare in contemporanea anche gli indici di ritenzione ottenuti, dallo stesso campione con una colonna a differente polarità (tecnica bidimensionale).

Risultati migliori si ottengono ricorrendo allo spettrometro di massa come detector, che permette di associare lo spettro di massa relativo ad ogni componente eluito dalla colonna cromatografica e al suo indice di ritenzione; anche in questo caso la tecnica è da considerare come bidimensionale. Lo spettro di massa, ottenuto per frammentazione mediante impatto elettronico (EI), fornisce il maggior contributo ai fini dell'identificazione del componente. Il ricorso alla procedura manuale di analisi dettagliata delle frammentazioni non è una pratica applicabile nel caso della caratterizzazione di oli essenziali, in quanto si tratta di miscele complesse con un elevato numero di componenti che possono avere, per classi di composti, la stessa massa molecolare. La soluzione al problema è il ricorso a banche dati di spettri di massa con cui confrontare gli spettri ottenuti; il confronto non viene effettuato manualmente (è comunque una pratica frequente confrontare e sovrapporre manualmente gli spettri in banca dati con quello incognito) ma tramite degli algoritmi software che ci propongono le corrispondenze più probabili e che possono essere principalmente classificati in:

- teorici (interpretazione spettro, confronto di più tecniche spettroscopiche);
- statistici (pattern, distanza minima, autoapprendimento);
- comparativi (identità, somiglianza).

Da questi algoritmi sono derivati i vari software di ricerca che spesso prevedono una codifica di riduzione preliminare dello spettro incognito secondo criteri che esaltino la parte strutturalmente significativa dello spettro.

Il sistema di ricerca utilizzato è il PBM (probability based matching), di tipo comparativo che utilizza i criteri statistici di unicità e abbondanza (per ogni M/z) e algoritmi di retroaderenza (misura del grado con cui lo spettro incognito è contenuto nello spettro di riferimento) per fornire dei risultati graduati secondo una probabilità finale mediata secondo fattori di affidabilità, sicurezza e contaminazione.

L'utilizzo di una singola banca dati di spettri di massa spesso non è sufficiente e pertanto sono state utilizzate in contemporanea banche dati di tipo generale come NIST (~ 250000 spettri) [48] e specifiche per gli oli essenziali come Adams (~ 2200 spettri) [49] oltre alla piccola banca dati creata autonomamente con gli spettri ottenuti dagli standards puri a nostra disposizione (~ 100 spettri).

L'identificazione finale dei componenti l'olio essenziale avviene incrociando i dati relativi alla ricerca nelle banche dati di spettri di massa con gli indici di ritenzione per ogni componente rilevato nel cromatogramma. Per alcune matrici vegetali [17,18,19] è stato possibile determinare anche gli indici di ritenzione su di una seconda colonna a differente polarità.

Tutti gli output (dati cromatografici e ricerche sugli spettri di massa) confluiscono in un foglio elettronico, appositamente sviluppato, che elimina la possibilità di errori nei calcoli e facilita notevolmente l'indispensabile fase di revisione manuale della corretta attribuzione dei picchi.

2.4.1.2. Caratterizzazione quantitativa

La quantificazione dei componenti gli oli essenziali è solitamente ottenuta mediante il metodo della normalizzazione [50] assumendo fattore di risposta unitario per tutti i componenti. Le aree di ciascun picco, ottenute con un'accurata scelta dei parametri di integrazione del cromatogramma e assumendo che il detector abbia una risposta lineare, sono rappresentative della percentuale relativa associata a quel determinato componente la miscela. La scelta di non introdurre fattori di risposta per i componenti l'olio è in parte giustificata dal fatto che quasi sempre abbiamo effettuato l'analisi quantitativa a scopo di confronto tra gli oli di una stessa matrice ottenuti con differenti metodi di estrazione.

Risultati più accurati si ottengono determinando, in via semplificata, i fattori di risposta: nel caso di un olio essenziale si scelgono un numero limitato di composti, uno rappresentativo di ogni classe e si determinano i relativi fattori di risposta che saranno applicati all'intera classe di appartenenza. Per es: myrcene, HM monoterpeni idrocarburici; eucaliptolo, OM monoterpeni ossigenati; γ -cadinene, HS sesquiterpeni idrocarburici; β -bisabolenolo, OS sesquiterpeni ossigenati; etc..

Il contenuto in sclareolo nell'estratto di *Salvia desoleana*, espresso come $\mu\text{g}_{(\text{scla})}/\text{mg}_{(\text{ext})}$, è stato determinato mediante tecnica GC-FID, utilizzando n-dodecano come standard interno [50].

2.4.1.3. Strumentazione e condizioni operative

GC-MS: Gascromatografo Agilent 6890N con autocampionatore 7683 e iniettore split/splitless. Colonne capillari Agilent HP5-MS (5%phenyl-95%methylpolysiloxane) o HP1 (polydimethylsiloxane), entrambe 30 m \times 0.25 mm i.d., spessore film 0.25 μm . Condizioni cromatografiche: programmata di temperatura da 60 $^{\circ}\text{C}$, rampa 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino a 250 $^{\circ}\text{C}$ seguita da 20 min in isoterma, temperatura iniettore 250 $^{\circ}\text{C}$, gas carrier He con flusso di 1.0 mL/min; volume campione 1 μL in modalità split (1:10). Il GC è accoppiato con lo spettrometro di massa a quadrupolo Agilent modello 5973 MSD detector con le seguenti condizioni operative: energia di ionizzazione 70 eV, corrente di ionizzazione 60 mA, temperatura sorgente ionizzazione impatto elettronico 230 $^{\circ}\text{C}$, temperatura quadrupolo 150 $^{\circ}\text{C}$, scan range: 35 \div 350 u, 4.51 scans/s. Software Agilent MSD ChemStation E.01.00.237

GC-FID: Gascromatografo Agilent 6890N con autocampionatore 7683 e iniettore split/splitless. Colonne capillari Agilent HP5 (5%phenyl-95%methylpolysiloxane) o SP1 (polydimethylsiloxane) e SupelcoWax10 (polyethyleneglycol), entrambe 30 m \times 0.25 mm i.d., spessore film 0.25 μm . Condizioni cromatografiche: programmata di temperatura da 60 $^{\circ}\text{C}$, rampa 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fino a 250 $^{\circ}\text{C}$ seguita da 20 min in isoterma, temperatura iniettore 250 $^{\circ}\text{C}$, gas carrier He con flusso di 1.0 mL/min; volume campione 1 μL in modalità split (1:10). Il GC è dotato di detector a ionizzazione di fiamma (FID), temperatura 250 $^{\circ}\text{C}$. Software Agilent ChemStation.

2.4.2. Caratterizzazione degli estratti non volatili

Sugli estratti non volatili ottenuti dal germe di grano sono stati determinati il contenuto in α -tocoferolo e acidi grassi mediante cromatografia liquida (HPLC) e gascromatografia (GC-FID). Prima di eseguire le analisi strumentali, gli estratti sono stati sottoposti a una procedura preparativa.

Preparativa dell' α -tocoferolo e degli acidi grassi

La separazione dell' α -tocoferolo e degli acidi grassi è stata ottenuta mediante saponificazione [51,52] con la seguente procedura: 3 mg dell'estratto sono disciolti in EtOH (5 mL), addizionato poi da una soluzione di Desferal (100 μ L, 25 mg/mL in H₂O), soluzione acquosa di acido ascorbico (1 mL, 25 % w/v) e KOH 10 N (0.5 mL). La miscela viene tenuta al buio a temperatura ambiente per 14 h. Dopo addizione di n-esano (10 mL) e H₂O (7 mL), il campione viene centrifugato per 1 h a 900 g (centrifuga refrigerata ALC 4237R). La fase organica contenente la vitamina E viene raccolta e il solvente è evaporato sotto vuoto con evaporatore rotante, il residuo viene disciolto in MeOH (500 μ L) e il campione contenente α -tocoferolo, suddiviso in aliquote, viene analizzato mediante HPLC. Sulla frazione acquosa viene aggiunto n-esano (10 mL) quindi acidificato a pH 3-4 con HCl al 37 % e centrifugato per 1 h a 900 g. La fase organica contenente gli acidi liberi viene raccolta ed il solvente evaporato. Una porzione del residuo viene disciolta in CH₃CN (500 μ L) con 0.14% di CH₃COOH (v/v) e suddivisa in aliquote che sono poi analizzate mediante HPLC.

Una seconda porzione del residuo contenete gli acidi grassi viene metilata con BF₃ al 14 % in MeOH (1 mL) [52] per 30 min a temperatura ambiente. Dopo addizione di n-esano (4 mL) e H₂O (2 mL) il campione viene centrifugato per 20 min a 900 g. La fase organica contenente gli esteri metilici degli acidi grassi viene raccolta, il sovente è evaporato, ed il residuo viene ridisciolti in n-esano (100 μ L), suddiviso in aliquote che sono poi analizzate mediante GC-FID. Il recupero in acidi grassi durante la saponificazione viene calcolato, mediante calibrazione, utilizzando una miscela di standard.

Analisi HPLC

L'analisi degli acidi grassi insaturi è stata effettuata utilizzando un cromatografo liquido Agilent 1100 con detector spettrofotometrico a serie di diodi, DAD, a 200 e 234 nm, colonna Chrompack Inertsil 5 ODS-2 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) e fase mobile CH₃CN/H₂O/CH₃COOH (70/30/0.12, v/v/v) con il flusso di 1.5 mL/min. I composti sono stati identificati mediante confronto con standard dei cromatogrammi ottenuti con il software Chemstation rev. A.10.02.

La quantità di α-tocoferolo negli estratti è stata determinata mediante detector elettrochimico [53], utilizzando una pompa P1000 della Thermo Separation Products (Milano, Italia) con un detector elettrochimico INTRO (Antec Leyden, Leiden, The Netherlands) e iniettore automatico Triathlon (Spark Holland BV, AJ Emmen, The Netherlands).

La colonna usata è una C-18 HP ODS Hypersil column, 5 µm, 100 × 2.1 mm, con fase mobile MeOH/CH₃COONa 0.05 M pH 5.5 (95/5, v/v) e flusso di 0.3 mL/min. Il potenziale di ossidazione del detector elettrochimico è fissato a 0.6 V. I dati sono raccolti ed elaborati con il software Chemstation rev. A.10.02. La determinazione è stata eseguita mediante curva di calibrazione (standard esterno).

Analisi GC-FID

Per la quantificazione degli esteri metilici degli acidi grassi si è utilizzato un gascromatografo Agilent 6890 dotato di detector a ionizzazione di fiamma (FID), con una colonna capillare HP-23 FAME (cyanopropyl methyl-polysiloxane, 30 m × 0.32 mm × 0.25 µm) e azoto come carrier con il flusso di 2 mL/min. La temperatura parte da 45 °C fino a 175 °C con rampa di 80 °C/min seguita da 45 min di isoterma; temperatura iniettore 250 °C, detector 300 °C. L'identificazione degli esteri metilici degli acidi grassi è avvenuta per confronto con uno standard mix; la composizione percentuale è stata calcolata mediante curva di calibrazione (standard esterno). Per la raccolta ed elaborazione dei dati si è utilizzato il software Chemstation rev. A.05.02

2.5. Caratterizzazione attività biologica

La caratterizzazione dell'attività biologica degli estratti ottenuti dalle differenti matrici vegetali è stata realizzata in collaborazione con laboratori di diverse Università ed Istituti di ricerca italiani e stranieri. I test, eseguiti su modelli *in vivo* ed *in vitro*, sono stati focalizzati sulla valutazione di differenti tipologie di attività biologica come quella antiossidante, antinfiammatoria e antimicrobica.

2.5.1. Attività antiossidante

2.5.1.1. Test *in vivo*

L'attività antiossidante degli estratti di *Pistacia lentiscus* è stata studiata utilizzando un modello *in vivo* sui ratti in collaborazione con i Dipartimenti di Citomorfologia, Neuroscienze, Biologia Sperimentale sez. Fisiologia (Università di Cagliari, Italia) e con i laboratori della società Nutriscience srl (Pula, Italia).

Lo studio è stato realizzato utilizzando un modello di danno ossidativo provocato da ischemia cerebrale indotta da occlusione delle carotidi.

Il complesso protocollo utilizzato è dettagliatamente riportato in [12].

In particolare è stato valutato, mediante tecnica analitica HPLC, il contenuto in acidi grassi altamente insaturi (HPUFAs) estratti da differenti aree del cervello e dal plasma.

2.5.1.2. Test *in vitro* su linee cellulari umane

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Biomediche e con il Centro di Eccellenza per lo Sviluppo di Biotecnologie e Ricerche sulla Biodiversità (Università di Sassari, Italia), sono stati eseguiti i test, *in vitro* con linee cellulari umane, di attività antiossidante sugli estratti di *Salvia desoleana*.

Protocollo utilizzato

Reattivi:

I sali per il tampone fosfato salino (PBS; 120 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 8.5 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.3), e glucosio, collagenasi e dimetilsolfossido (DMSO) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Medium 199,

foetal calf serum, new-born calf serum, penicillina, streptomicina, amfotericina e glutamina sono stati acquistati da GIBCO, Invitrogen. Per il test CyQUANT® NF, 2',7'-diclorodididfluoresceina diacetato (H₂DCFDA) ed il kit CyQUANT® sono stati acquistati da Molecular Probes (Eugene, OR, USA). La linea cellulare ECV304 proviene dall'European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK).

Colture cellulari e trattamenti:

Le HUVEC sono state ottenute dalla vena del cordone ombelicale, secondo il metodo descritto da Jaffe [54], modificato. Le vene principali dei cordoni ombelicali sono state accuratamente lavate con PBS e poi incubate con 0.2 % di collagenasi nel terreno M199 addizionato con antibiotici (10000 µg/ml penicillina, 25 mg/mL streptomicina, 0.85 % amfotericina) per 10 min a 37 °C. Lo strato di cellule endoteliali è stato lavato dalle vene con PBS. Quindi le cellule sono state pellettizzate mediante centrifugazione e seminate in coltura sul terreno M199 addizionato con 100 U/ml penicillina, 25 mg/mL streptomicina, 0.85 % amfotericina, glutammina 2 mM, 10 % foetal calf serum and 10 % new-born calf serum. Le cellule sono state coltivate in palloni a 37 °C, 90 % di umidità, e CO₂ al 5 % per 3-5 giorni. Le HUVEC sono state identificate dalla loro particolare morfologia e mediante la colorazione del fattore VIII. Le cellule così ottenute sono state utilizzate per gli esperimenti a 90 % al 100 % di confluenza apparente, al primo o al secondo passaggio. Per tutti gli esperimenti, sono stati utilizzati gruppi di cellule estratte da differenti cordoni ombelicali.

Le cellule ECV304 sono una linea di cellule endoteliali immortalizzate, spontaneamente trasformate, dalla vena del cordone ombelicale. Sono state coltivate in terreno M199 integrato con 10 % foetal calf serum, 100 U/ml penicillina, 25 mg/ml streptomicina, e 0.85 % amfotericina. Le cellule ECV304 sono state mantenute in un incubatore per colture standard con aria umidificata contenente 5 % di CO₂ a 37 °C. L'estratto di *S. desoleana* è stato solubilizzato in DMSO allo 0.1 %.

Misure di specie reattive dell'ossigeno intracellulari:

I livelli di ROS intracellulari sono stati determinati utilizzando la specifica sonda molecolare H₂DCFDA. All'interno della cellula, l'esterasi si attacca ai gruppi acetato di H₂DCFDA, intrappolando così la forma ridotta della sonda (H₂DCF). Il ROS intracellulare ossida H₂DCF, cedendo il prodotto fluorescente, DCF. Prima del

trattamento, le cellule sono state incubate per 30 min con PBS plus (PBS con 0.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 30 mM di glucosio) contenente 1 mM H₂DCFDA, e poi lavate con PBS. I trattamenti sono avvenuti con differenti concentrazioni di dell'estratto *S. desoleana* (0.1, 1, 10 µg/mL). Le misurazioni di fluorescenza sono state effettuate in un lettore per micropiastre (Tecan Mannedorf, Svizzera), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm, e una lunghezza d'onda di emissione di 535 nm. Le variazioni di fluorescenza indotte dal trattamento sono state misurate cinematicamente, ogni minuto per 120 min consecutivi.

Tutte le misurazioni di fluorescenza sono state corrette per la fluorescenza dovuta al fondo. I risultati sul potere antiossidante e pro-ossidante sono stati valutati, utilizzando cellule non trattate come riferimento, per confronto di cinque misurazioni e quindi espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato

Misurazione della proliferazione cellulare:

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante analisi del contenuto di DNA cellulare utilizzando il kit di analisi CyQUANT ® NF, capace di legare un colorante fluorescente al DNA, in quanto il contenuto di DNA cellulare è strettamente proporzionale al numero di cellule. Dopo il trattamento con gli estratti di *S. desoleana*, il mezzo di crescita delle cellule è stato rimosso e sostituito con la soluzione colorante-legante. Dopo un'incubazione di 40 min, le misurazioni di fluorescenza sono state effettuate in un lettore per micropiastre (Tecan Mannedorf, Svizzera), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm, e di emissione di 535 nm.

2.5.1.3. Test free radical scavenging

In collaborazione con il Laboratorio di Farmacognosia, Facoltà di Farmacia (Università di Monastir, Tunisia) sono stati eseguiti i test di attività antiossidante sugli estratti di *Juniperus phoenicea*, *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* e *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*.

Protocollo utilizzato

L'attività antiossidante antiradicalica è stata valutata mediante il test con difenilpicrilidrazile (DPPH) ed il test con acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS). I valori ottenuti, analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA), rappresentano le medie delle determinazioni in triplicato di tre test indipendenti.

Test DPPH:

Il test sull'attività di contrasto ai radicali liberi DPPH è stato eseguito secondo la metodica riportata da Ceel et al. [55], apportando alcune modifiche. Gli estratti da testare preparati a diverse concentrazioni (1, 3, 10, 100 e 150 µg/mL), sono aggiunti ad una soluzione in etanolo di DPPH 0.06 mM e la miscela di reazione viene agitata vigorosamente. Dopo incubazione per 30 min a temperatura ambiente, per via spettrofotometrica viene letta l'assorbanza a 517 nm. La soluzione di controllo, senza gli estratti, viene preparata e misurata con le stesse modalità. L'entità della decolorazione della soluzione è presa come indice dell'efficienza degli estratti nell'eliminazione dei radicali liberi (free radical scavenging).

L'attività antiossidante degli estratti è stata calcolata come effetto inibitorio (IE %) sulla formazione del radicale DPPH secondo la relazione:

$$IE_{(\%)} = 100 \times (A_{517} \text{ sample}) - (A_{517} \text{ control}) / (A_{517} \text{ control})$$

($A_{517} \text{ sample}$) e ($A_{517} \text{ control}$) rappresentano rispettivamente l'assorbanza a 517 nm dei campioni contenenti l'estratto e del controllo.

Il parametro IC_{50} (%) è stato definito come la concentrazione (µg/mL) dell'estratto necessaria per ridurre il radicale DPPH del 50 %.

Test ABTS:

La misura dell'attività antiradicalica è stata eseguita utilizzando il saggio di decolorazione del radicale libero ABTS^{•+} in accordo con la metodica sviluppata da Re et al. [56], con alcune modifiche. Il radicale monocationico ABTS^{•+} è stato generato facendo reagire una soluzione ABTS (7 mM) con 2.45 mM K₂S₂O₈. La miscela è stata lasciata riposare al buio per 15 h a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi diluita

con EtOH per ottenere l'assorbanza di $0.7 \div 0.2$ unità a 734 nm. I campioni degli estratti sono stati diluiti in EtOH per ottenere le differenti concentrazioni da testare (0.625, 1.25, 2.5, 5.75, 12 e 20 mg/mL). Per misurare l'attività antiossidante degli estratti, 10 µL di ciascun campione alle varie concentrazioni è stato aggiunto a 990 µL di soluzione diluita di ABTS^{•+}. L'assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 734 nm dopo 30 min.

È stata calcolata la riduzione percentuale dell'assorbanza (decolorazione della soluzione) a 734 nm per ogni concentrazione di estratto e la capacità antiossidante è stata espressa come percentuale di inibizione (I %) calcolata secondo la relazione:

$$I_{(\%)} = (A_x - A_0) / A_0$$

A_x e A_0 rappresentano rispettivamente l'assorbanza a 734 nm dei campioni contenenti l'estratto e del controllo.

Il parametro IC₅₀ (%) è stato definito come la concentrazione dell'estratto necessaria per ridurre ABTS^{•+} del 50 %.

È stata valutata anche la capacità antiossidante equivalente Trolox (TEAC) [57] confrontando la variazione di assorbanza a 734 nm in una miscela di reazione contenente un campione di estratto vegetale con quella contenente Trolox. Questo indice è definito come la concentrazione millimolare di una soluzione Trolox la cui capacità antiossidante è equivalente a 1.0 mg dell'estratto.

2.5.2. Attività antinfiammatoria

In collaborazione con il Pinnacle Biomedical Research Institute (Bhopal, India) sono stati eseguiti i test *in vivo* di attività antinfiammatoria sugli estratti di *Myrtus communis*.

Protocollo utilizzato

Animali:

Sono stati usati ratti maschi Albino Wistar (150 ÷ 170 g) e Swiss mice (25 ÷ 30 g) mantenuti in accordo con le direttive del Committee for the Purpose of Control and Supervision on Experiments in Animals (CPCSEA). Il protocollo di studio è stato

approvato dall'Institutional Animal Ethics Committee of Pinnacle Biomedical Research Institute, Bhopal, India.

Reattivi:

Bromuro di esadeciltrimetilammonio (Sigma-Aldrich, USA), desametasone e indometacina (Pharmaceuticals Maxheal, India). Olio di croton, tampone fosfato di potassio, e altre sostanze chimiche e solventi sono stati acquistati dalla Traders VK, Bhopal, India. ELISA Kit per TNF- α e IL-6 è stato acquistato da Ray-Bioteck, USA.

Edema dell'orecchio indotto da croton oil:

Lo spessore dell'orecchio è stato misurato prima e dopo l'induzione della risposta infiammatoria utilizzando un micrometro digitale. L'edema è stato indotto nell'orecchio destro mediante applicazione topica di croton oil ad una concentrazione di 0.4 mg/orecchio. L'estratto (1 ml/kg e 2 ml/kg), il desametasone (10 mg/kg) sciolto in PEG 400 o il veicolo, sono stati applicati topicamente immediatamente dopo il trattamento con croton oil [58]. Lo spessore dell'orecchio è stato misurato prima e 6 h dopo l'applicazione di croton oil [59].

Attività della mieloperoxidasi (MPO):

L'attività è stata valutata nei tessuti 24 h dopo l'applicazione croton oil nell'orecchio. Un campione di tessuto dell'orecchio (6 mm per lato) è stato macinato in 10 ml di tampone ghiacciato potassio fosfato 50 mM (pH 6) contenente esadeciltrimetilammonio bromuro 0,5 % e poi omogeneizzato. Il preparato è stato sonicato e centrifugato a 4 ° C per 20 min a 12000 g (centrifuga Remi, India). L'attività di MPO è stata determinata spettrofotometricamente aggiungendo 2.9 ml di tampone fosfato 50 mM in H₂O₂ 0.0005 % a 0.1 ml del supernatante. L'attività enzimatica è stata determinata a 460 nm [60]. L'attività è stata presentata come percentuale di MPO rispetto al ratto trattato con il solo veicolo.

Valutazione del granuloma indotto da cotton pellet e stima dei markers TNF- α e IL-6:

Il granuloma indotto da cotton pellet è ampiamente usato per valutare i componenti trasudativi e proliferativi nelle infiammazioni croniche [61]. Una pallina di cotone impregnata di olio di croton (50 mg) è stata impiantato per via sottocutanea nell'animale, l'olio essenziale miscelato con parti uguali di olio di paraffina è stato applicato

topicamente (1ml/kg e 2 ml/kg di olio essenziale) sul lato dorsale per 10 giorni. Il ratto è stato sacrificato 2 h dopo l'ultima applicazione e la massa del granuloma è stata pesata. Indometacina (10 mg/kg) è stata utilizzata come standard di controllo. Il siero è stato analizzato per la stima del TNF- α e IL-6 utilizzando le istruzioni fornite con il kit ELISA (Ray-Bioteck, USA).

2.5.3. Attività antibatterica e antifunginea

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica (Università di Sassari, Italia) sono stati eseguiti i test di attività antibatterica e antifunginea sugli estratti di *Thymus capitatus*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas*, *Daucus carota* e *Stachys yemenensis*.

Protocollo utilizzato

È stata testata l'attività degli estratti verso *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Candida albicans* (ceppo clinico), *C. glabrata* (ceppo clinico) e *C. tropicalis* (1011 RM) (ceppo clinico).

I batteri sono stati coltivati per una notte in brodo di Luria-Bertani (LB) e i funghi su piastre con Sabouraud destrosio agar. La Concentrazione Minima inibitoria (MIC) è determinata come la più bassa concentrazione di estratto che inibisce la crescita visibile dei microrganismi isolati dopo 24 ÷ 48 h di incubazione a 37 °C. il metodo di misura utilizzato è quello della microdiluzione (utilizzando micropiastre a 96 pozzetti) [62,63]. Sono state usate 9 differenti concentrazioni per ciascun estratto, dal 2.5 % v/v al 0.001 % v/v in 10 % Tween 80 (Sigma-Aldrich). Le colture batteriche e fungine sono state diluite con brodo LB e terreno RPMI, rispettivamente, per ottenere 1.0×10^8 CFU/ml (0.5 MacFarland). I Valori di Concentrazione Minima Cidal (MCC) sono stati determinati come la più bassa concentrazione di estratto che uccide batteri e funghi; è stata misurata con il metodo della diluizione a partire dalla MIC (concentrazione minima) fino alla concentrazione massima (2.5 % v/v).

In collaborazione con il Laboratorio de Farmacognosia, Facoltà di Farmacia/CEF (Università di Coimbra, Portogallo) sono stati eseguiti i test di attività antifunginea sugli estratti di *Satureia thymbra*, *Vitex agnus-castus*, *Achillea millefolium*, *Calamintha nepeta*, *Smyrniolum olusatrum* e *Bupleurum fruticosum*.

Protocollo utilizzato

L'attività degli estratti è stata testata verso lieviti, ceppi di dermatophyte e *Aspergillus*: due ceppi clinici di *Candida* isolati da casi di candidosi vulvovaginali (*C. krusei* H9, *C. guilliermondii* MAT23), tre ceppi provenienti dall'American Type Culture Collection (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 90018) e uno dalla Colección Española de Cultivos Tipo (*Cryptococcus neoformans* CECT 1078); tre ceppi clinici di dermatophyte isolati da unghie e pelle (*Epidermophyton floccosum* FF9, *Trichophyton mentagrophytes* FF7, *Microsporum canis* FF1) e quattro ceppi dalla Colección Española de Cultivos Tipo (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale* CECT 2958, *Trichophyton rubrum* CECT 2794, *T. verrucosum* CECT 2992, *M. gypseum* CECT 2908); un ceppo clinico di *Aspergillus* isolato da secrezioni bronchiali (*A. flavus* F44) e due ceppi provenienti dall'American Type Culture Collection (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *A. fumigatus* ATCC 46645).

La Minima Concentrazione Inibitoria (MIC) e la Minima Concentrazione Letale (MLC) sono state determinate mediante il metodo di macrodiluzione in accordo con i protocolli del Clinical and Laboratory Standards Institute [64,65] per i lieviti e i funghi filamentosi. Le diluizioni sono state preparate in dimetil solfossido (DMSO), con concentrazioni comprese tra 0.04 e 5 µL/mL. La concentrazione finale di DMSO non ha mai superato il 2 %. Colture fresche di ciascun ceppo sono state utilizzate per preparare la sospensione cellulare ($1 \div 2 \times 10^3$ cellule per ml per lieviti e $1 \div 2 \times 10^4$ cellule per ml per i funghi filamentosi). La concentrazione delle cellule è stata confermata dalla conta su agar Sabouraud. I valori di MIC sono stati determinati incubando i tubi in ambiente aerobico a 35 °C per 48/72 h (*Candida* spp. e *Aspergillus* spp. / *Cryptococcus neoformans*) ed a 30 °C per 7 giorni (dermatophytes). Per valutare la MLC, dai tubi che hanno fornito esito negativo nella determinazione del MIC, sono state prelevate aliquote (20 µL) del brodo e coltivate in piastre di Sabouraud destrosio agar.

Le piastre sono state incubate per 48 h a 35 °C (*Candida* spp. e *Aspergillus* spp.), 72 h per *Cryptococcus neoformans* e 7 giorni a 30 °C (dermatophytes). Come controllo sono stati utilizzati due composti antifungineo amphotericina B (Fluka) e fluconazolo (Pfizer).

In collaborazione con il Laboratorio di Farmacognosia, Facoltà di Farmacia (Università di Monastir, Tunisia) sono stati eseguiti i test di attività antibatterica e antifunginea sugli estratti di *Laurus nobilis*.

Protocollo utilizzato

L'attività degli estratti è stata testata verso i seguenti microrganismi: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 24912), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (3 ceppi clinici).

I ceppi sono stati mantenuti e testati in Muller Hinton agar (batteri) e Sabouraud destrosio agar (lieviti). Per le prove antibatteriche, i microrganismi sono stati coltivati per una notte nel terreno Muller Hinton. Per ogni estratto è stata preparata una diluizione in DMSO nell'intervallo 0.15 ÷ 2 % (v/v). Le colture (conc. 1.0×10^6 CFU/mL) sono state poi inoculate su piastre con terreno solido.

Dischi di carta (diametro 6 mm; Oxoid), ognuno impregnato con 15 µL di soluzione degli estratti a differenti concentrazioni (0.15 ÷ 2.5 % v/v) sono stati posati sulle piastre precedentemente inoculate.

Come controllo negativo è stato usato DMSO puro (15 µL), mentre dischi con vancomicina (30 µg), amoxicillina (10 µg) e amfotericina B (100 µg) sono stati utilizzati come controllo positivo. L'osservazione delle piastre è avvenuta dopo 18 h di incubazione a 37 °C (batteri) e 48 h a 37 °C (lieviti). I risultati sono stati espressi come MIC (mg mL⁻¹).

CAPITOLO III

Risultati

I risultati dell'attività di ricerca sulle 18 matrici vegetali investigate sono presentati in modo raggruppato seguendo uno schema così strutturato:

- **Estrazione di nutraceuticals - green chemistry**
Estrazioni SFE ad alta pressione su *Salvia desoleana* e germe di grano.
- **Piante sarde con test di attività biologica *in vivo***
Estrazioni di oli volatili su *Pistacia lentiscus* e *Myrtus communis*.
- **Verbenaceae e lamiacee sarde**
Estrazioni di oli volatili su *Vitex agnus-castus*, *Satureja thymbra*, *Thymus capitatus*, *Rosmarinus officinalis* e *Lavandula stoechas*.
- **Piante sarde e portoghesi a confronto**
Estrazioni di oli volatili su *Bupleurum fruticosum*, *Smyrniolum olusatrum*, *Calamintha nepeta* e *Achillea millefolium*.
- **Oltre la Sardegna**
Estrazioni di oli volatili su *Juniperus phoenicea* e *J. oxycedrus* (Tunisia), *Laurus nobilis* (Algeria e Tunisia), *Daucus carota* (Tunisia) e *Stachys yemenensis* (Yemen).

3.1. *Salvia desoleana*

L'interesse sulla *Salvia desoleana*, pianta erbacea perenne endemica della Sardegna, è dovuto in gran parte alla sua grande affinità con la *Salvia sclarea* [66] di cui sono già noti i potenziali utilizzi degli oli essenziali principalmente in campo farmaceutico e profumiero. In particolare la ricerca è stata focalizzata principalmente sullo sviluppo di un processo pulito di estrazione basato sulle tecnologie della “green chemistry” come l'estrazione con CO₂ supercritico (SFE), al fine di massimizzare la resa in sclareolo, diterpene appartenente al gruppo dei labdani (figura 29) dotato di elevata attività antimicrobica [67] e ampiamente utilizzato dall'industria profumiera [68]. Altro obiettivo perseguito è stato quello di valutare l'attività biologica, antiossidante ed antiproliferativa su modelli di cellule endoteliali umane, degli estratti supercritici ad alta pressione.

Le estrazioni sono state realizzate utilizzando campioni di *S. desoleana* provenienti da coltivazioni nella zona di Monti (nord Sardegna).

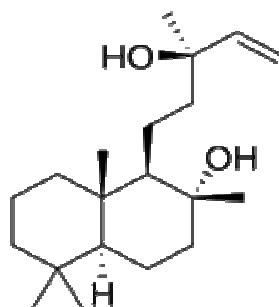


Figura 29. Struttura chimica dello sclareolo (Labd-14-ene-8,13-diol).

Per la messa a punto del processo SFE sono stati utilizzati l'impianto da laboratorio di Cagliari (capacità estrattore 0.3 L.) e per lo scale-up l'impianto pilota presso la Porto Conte Ricerche ad Alghero (capacità estrattore 5 L.). A scopo di confronto, su di un campione di *S. desoleana* è stata realizzata anche l'estrazione dell'olio essenziale per idrodistillazione (HD). Le rese globali di estrazione (tabella 6) sono superiori nel processo SFE a 90 bar rispetto a quello HD e aumentano ulteriormente al crescere della pressione nell'estratto SFE a 250 bar. Occorre precisare che mentre l'estratto supercritico a bassa pressione ha l'aspetto di un olio giallo paglierino ed è definibile olio volatile,

l'estratto ottenuto a pressione più elevata si presenta come un agglomerato eterogeneo di olio e materiale solido di consistenza cerosa, di colore giallo carico, costituito presumibilmente da idrocarburi, esteri, etc.. aventi massa molecolare > 400 u.

La caratterizzazione chimica (qualitativa e composizione %) è stata realizzata mediante analisi GC-MS (tabella 7), mentre per la determinazione del contenuto in sclareolo si è utilizzata la tecnica GC-FID con standard interno.

Campioni	Resa %
<i>Salvia desoleana</i> idrodistillato	0.13
<i>Salvia desoleana</i> estratto supercritico a 90 bar 50 °C 4 ore	0.6
<i>Salvia desoleana</i> estratto supercritico a 250 bar 40 °C 4 ore	0.9

Tabella 6. Resa di estrazione *S. desoleana*.

La figura 30 mostra il confronto della composizione per i componenti principali nei differenti estratti di *S. desoleana* (HD, SFE 90 bar, SFE 250 bar). L'estratto supercritico a 250 bar è quello che mostra la più alta percentuale di sclareolo (75.4 %), contiene anche minori quantità di altri composti come: dotriacontano (8.4 %), vitamina E (5.9 %), nonacosano (2.4 %), terpenil acetato (0.6 %), germacrene D (0.5 %) ed eucaliptolo (0.2 %). L'estratto supercritico a 90 bar mostra una composizione simile all'estratto a 250 bar e in netto contrasto con la composizione dell'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione che invece si caratterizza per una maggiore resa in composti idrofili come: linalolo (2.9 %) ed eucaliptolo (3.1 %) e per l'assenza, del tutto normale, di quelli più pesanti.

Compound	RI _K	% area		
		HD	SFE 90 bar	SFE 250 bar
Eucalyptol	1033	3.1	0.4	0.2
Linalool	1098	2.9	-	-
Terpenil acetate	1350	13.6	2.0	0.6
Germacrene D	1485	26.5	2.4	0.5
Sclareol	2221	5.0	74.6	75.4
Nonacosane, C ₂₉ H ₆₀	2900	-	1.7	2.4
Dotriacontano, C ₃₂ H ₆₄	3200	-	3.0	8.4
Vitamin E	3222	-	1.1	5.9

Tabella 7. Indici di ritenzione, RI_K e aree cromatografiche percentuali dei principali composti identificati negli estratti di *S. desoleanai* per idrodistillazione, (HD), e per SFE a 90 e 250 bar.

Il contenuto in sclareolo nei differenti estratti è stato per l'idrodistillato di 53.8 µg/mg mentre cresce di un ordine di grandezza nel SFE 90 bar con 540 µg/mg; nel SFE 250 bar si registra il contenuto più alto di sclareolo con 811 µg/mg.

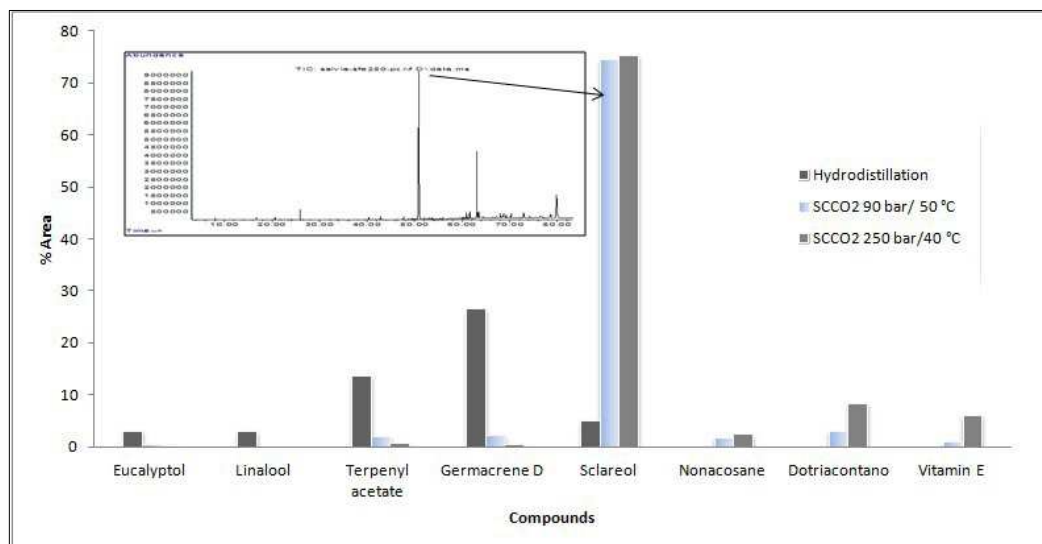


Figura 30. Contenuto nei principali componenti negli estratti di *S. desoleana* ottenuti per idrodistillazione, SFE a 90 bar 50 °C, SFE a 250 bar 40 °C. La figura interna mostra il cromatogramma GC-MS dell'estratto SFE a 250 bar 40 °C.

Dall'esame dei dati ottenuti si evidenzia come l'estrazione SFE a 250 bar rispetto a quella a 90 bar presenti la migliore efficacia e la più alta selettività verso lo sclareolo, in quanto a 250 bar oltre al maggior contenuto (811 µg/mg vs. 540 µg/mg) si ha anche una maggiore resa totale di estrazione (0.9 % vs. 0.6 %); in pratica, partendo dalla medesima quantità di *S. desoleana*, lavorando alla pressione di 250 bar si è ottenuta una quantità di sclareolo doppia rispetto all'estrazione condotta a 90 bar.

I buoni risultati ottenuti possono spiegarsi in quanto l'estrazione SC-CO₂ emula, variando le condizioni di temperatura e pressione, le caratteristiche di un solvente organico e riesce ad estrarre meglio i componenti di più alta massa molecolare.

L'estratto SCCO₂ a 250 bar è stato utilizzato per i test di attività biologica. Per i test sono state impiegate due differenti linee cellulari: HUVEC (cellule endoteliali umane primarie della vena del cordone ombelicale) e ECV304 (cellule endoteliali immortalizzate ottenute per spontanea trasformazione dalla vena del cordone ombelicale umano). In primo luogo è stato importante verificare se gli estratti esercitano un'azione

tossica sulle cellule e quindi possano influenzare la proliferazione cellulare e la produzione intracellulare di specie radicali dell'ossigeno (ROS): infatti, la produzione intracellulare di ROS è strettamente correlata alla sopravvivenza cellulare, alla proliferazione e all'apoptosi [69].

La valutazione dell'eventuale citotossicità dell'estratto di *S. desoleana*, è stata fatta incubando le cellule in tre diverse concentrazioni, 0.1, 1.0 e 10 µg/ml per 24 h a 37 °C. La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando il test CyQUANT® NF e confrontando con il bianco di controllo (0.1 % dimetilsolfossido DMSO). Dai risultati, riportati in figura 31, si vede che l'estratto SFE a 250 bar di *S. desoleana* non ha mostrato tossicità a nessuna delle concentrazioni testate.

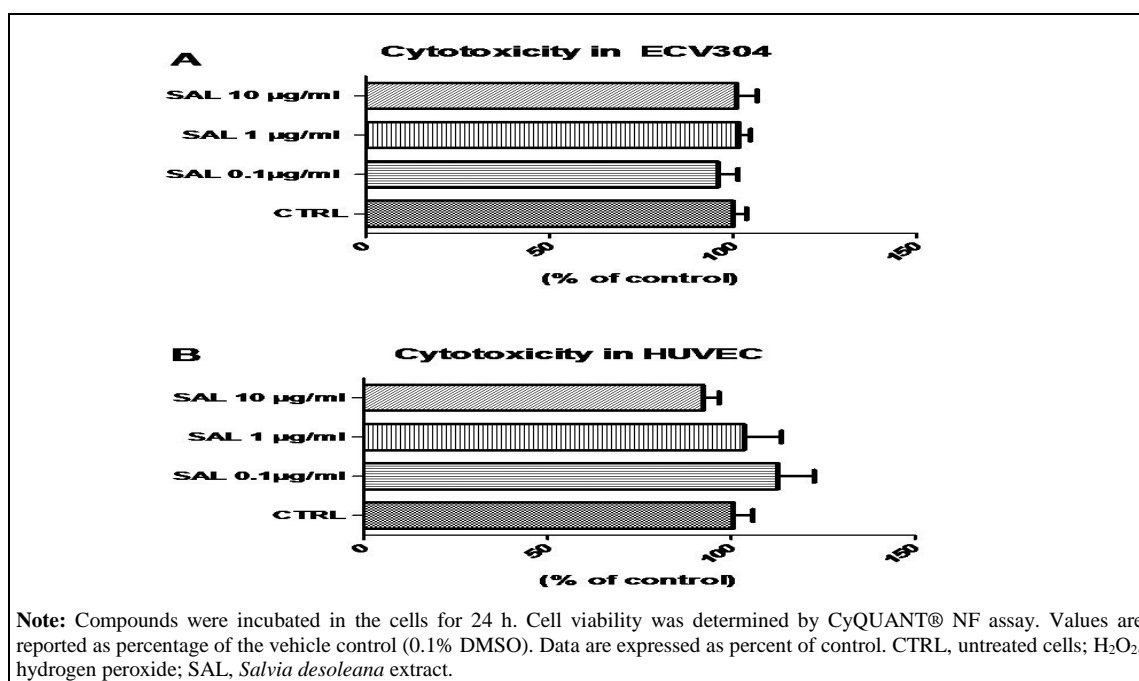


Figura 31. Citotossicità degli estratti di *S. desoleana* verso ECV304 (A) e HUVEC(B).

La misura del ROS è stata effettuata utilizzando la sonda fluorescente H₂DCFDA. Cellule endoteliali (ECV304 e HUVEC) sono state preincubate con la sonda, H₂DCFDA 1 µM e quindi trattate con tre differenti concentrazioni dell'estratto per 2 h in presenza di H₂O₂, 75 µM.

I risultati (figura 32) derivati da cinque serie di misure sono espressi come percentuale di cellule non trattate con il controllo (0.1 % DMSO). L'esposizione di ECV304 a concentrazioni crescenti degli estratti ha esercitato un significativo effetto

antiossidante rispetto alle cellule trattate solo con H₂O₂ (figura 32A). Analogamente il trattamento con le stesse concentrazioni sulla linea cellulare HUVEC ha indotto un significativo effetto antiossidante rispetto alle cellule trattate solo con H₂O₂ (figura 32B).

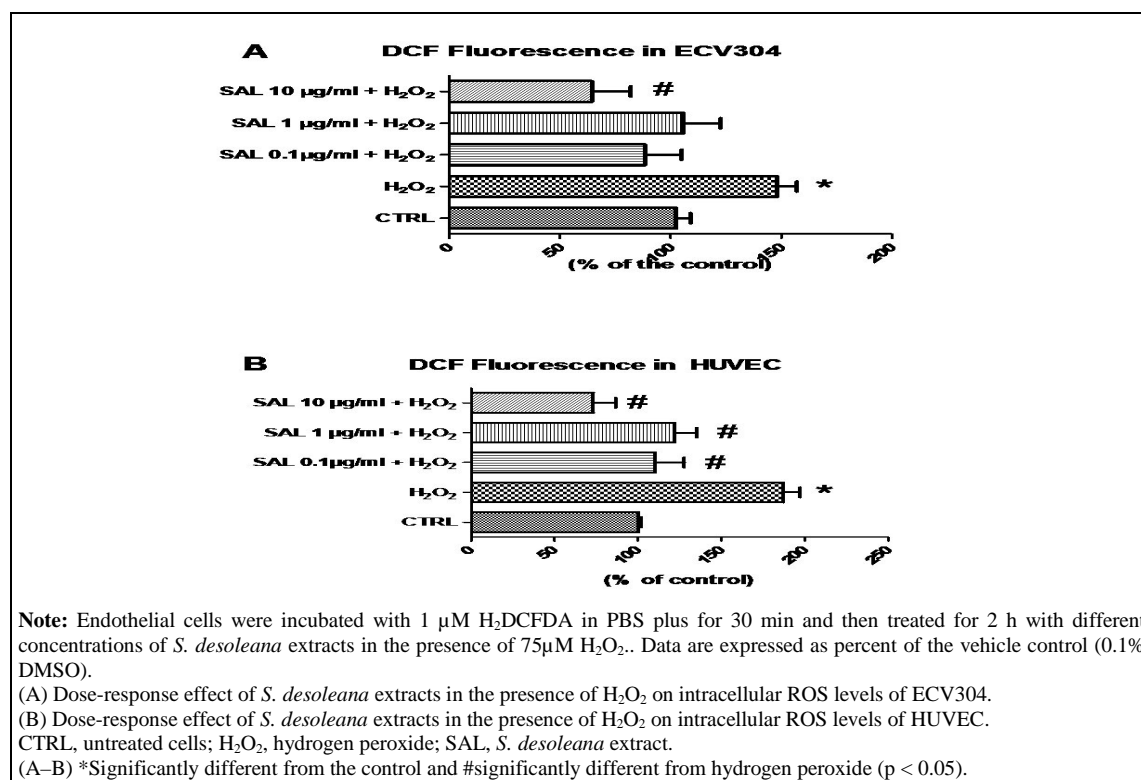


Figura 32. Effetto protettivo degli estratti di *S. desoleana* sulle linee cellulari ECV304 e HUVEC dallo stress ossidativo indotto da H₂O₂.

L'estratto è risultato efficace nel neutralizzare l'effetto stimolante sulla produzione di ROS, il miglior effetto si è ottenuto con la più alta dose (10 mg/ml). Questa proprietà osservata dell'estratto di *S. desoleana* può essere spiegata in parte attraverso l'azione antiossidante di alcuni componenti, come ad esempio sclareolo [70] e vitamina E che hanno dimostrato di essere efficaci donatori di idrogeno.

Inoltre, per analizzare l'eventuale effetto protettivo dell'estratto contro lo stress ossidativo *in vitro*, si è utilizzato un modello con H₂O₂ come induttore del danno ossidativo misurando il contenuto cellulare di DNA di ECV304 e HUVEC con il test kit CyQUANT® NF. Le cellule sono state trattate per 24 h con dosi crescenti di dell'estratto di *Salvia desoleana* (figura 33A/B). I risultati rivelano che il trattamento con una dose di 10 µg/ml di estratto ha avuto un effetto citoprotettivo su entrambe le linee cellulari rispetto al danno cellulare indotto da perossidazione.

Quindi, l'effetto antiossidante osservato per l'estratto di *S. desoleana* non diminuisce la quantità di radicali utili alla sopravvivenza delle cellule: infatti dopo 24 h di trattamento, il contenuto di DNA è sostanzialmente simile a quello delle cellule di controllo. È probabile che nel corso delle 24 h, le cellule siano in grado di ripristinare i meccanismi redox che permettono loro di sopravvivere a qualsiasi attacco ossidativo o riduttivo.

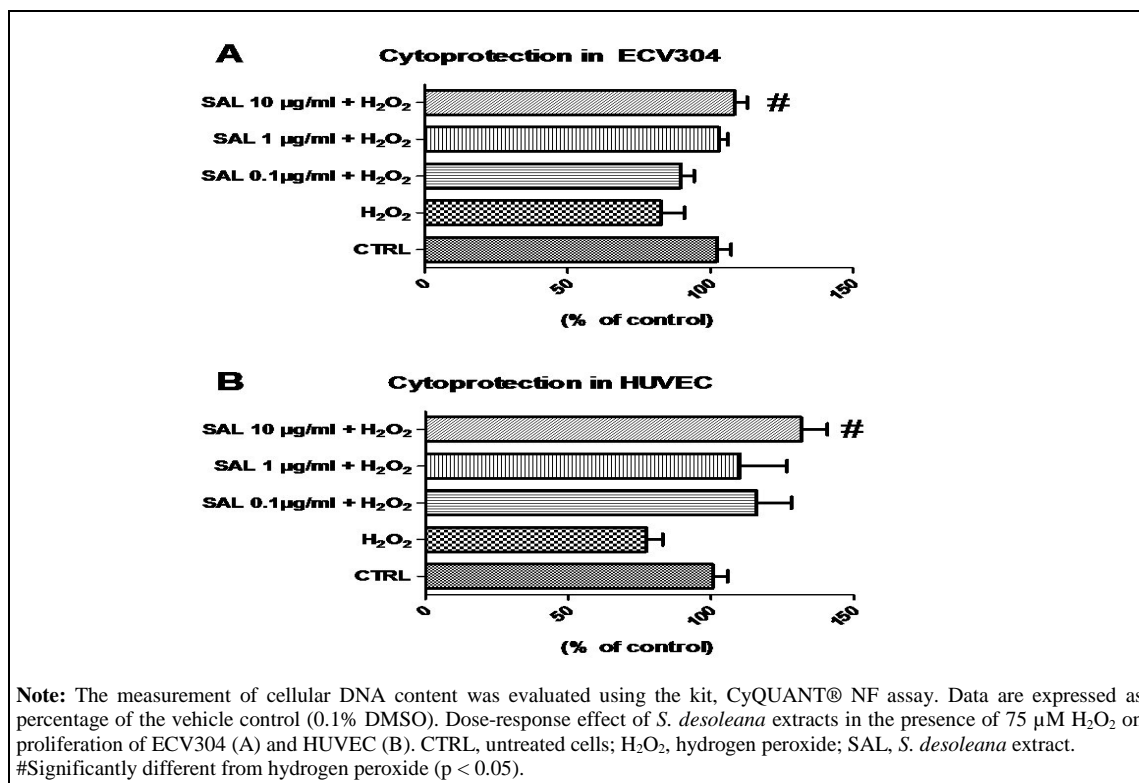


Figura 33. Effetto citoprotettivo dose-risposta dell'estratto di *S. desoleana* verso l'aggiunta di 75 µM H₂O₂.

3.2. Germe di grano

L'interesse sull'utilizzo come nutraceutical dell'olio di germe di grano è dovuto al fatto che esso presenta il più alto contenuto di tocoferolo tra tutti gli oli vegetali, fino a circa 2500 mg/kg, e in particolare il più alto contenuto di α -tocoferolo, che rappresenta circa il 60 % del contenuto totale. Inoltre, olio di germe di grano è molto apprezzato grazie al suo alto contenuto di acidi grassi essenziali (EFA). L'olio viene normalmente ottenuto dal germe di grano mediante il tradizionale processo di estrazione con solventi che però presenta inconvenienti che mal si conciliano con le esigenze di qualità e sicurezza delle moderne industrie farmaceutiche ed alimentari. L'estrazione con CO₂ supercritico potrebbe quindi porsi come una valida alternativa rispetto ai metodi tradizionali.

L'attività è stata focalizzata sullo studio degli effetti della pressione e del tempo estrazione sull'efficienza di estrazione e la qualità dell'olio, allo scopo di ottimizzare le condizioni operative del processo di estrazione supercritica, anche in prospettiva di un futuro passaggio di scala.

Differenti estrazioni con CO₂ sono state effettuate alle pressioni di 200, 250 e 300 bar; il tempo totale di estrazione è stato di 8 h con prelievi ogni ora. A scopo di confronto sono state eseguite anche tre differenti estrazioni con solvente (esano, metanolo, cloroformio-metanolo in miscela 2:1).

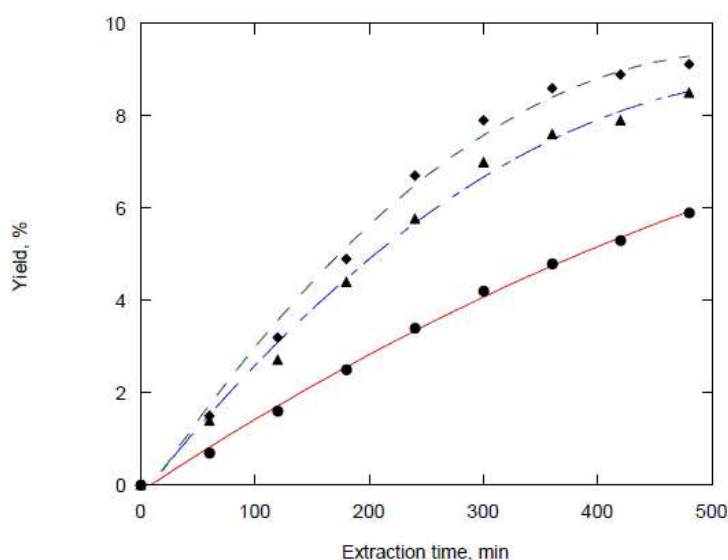


Figura 34. Effetto della pressione sulla resa di estrazione per l'olio da germe di grano:
●, 200 bar; ▲, 250 bar; ◆, 300 bar.

In figura 34 è mostrata la resa di estrazione rispetto al tempo per le prove alle diverse pressioni di esercizio. Un tempo di estrazione di 8 h a 300 bar dà una resa in olio di germe di grano superiore al 9 % (m/m). il SC-CO₂ dà una resa di estrazione solo di poco inferiore a quelle relative all'estrazione con solvente organico (figura 35).

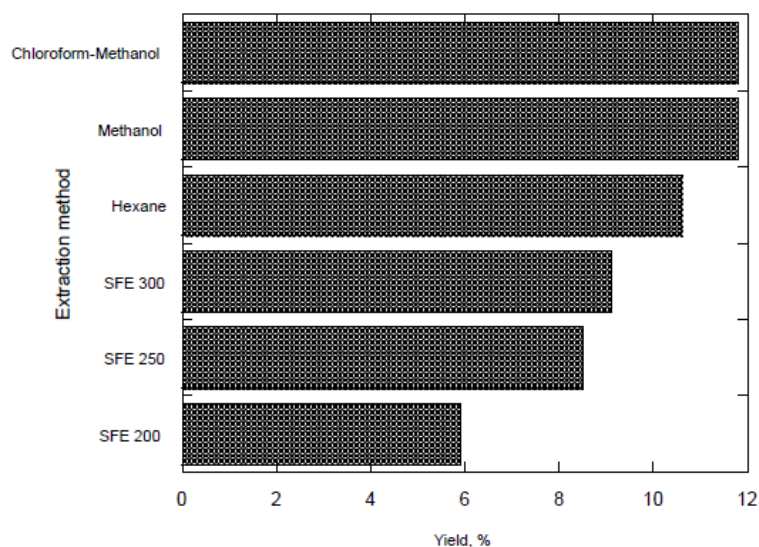


Figura 35. Effetto del metodo utilizzato sulla resa di estrazione per l'olio da germe di grano.

La maggiore resa di estrazione dei solventi organici, rispetto al SC-CO₂ potrebbe spiegarsi con la scarsa selettività di tali solventi, i cui estratti potrebbero contenere anche alcuni composti indesiderati.

La concentrazione di α -tocoferolo ($\mu\text{g}/\text{mg}$ di olio, misurata in HPLC con 6 repliche) nei campioni di olio di germe di grano ottenuti (SC-CO₂ 200, 250 e 300 bar, tempo di estrazione di 8 h e da solventi organici) non presenta variazioni considerevoli fatta eccezione per l'olio estratto in MeOH, che ha mostrato valori significativamente più bassi (figura 36). I valori più alti competono comunque agli estratti mediante SFE.

L'analisi GC della composizione in acidi grassi (tabella 8) di tutti i campioni ha rilevato come costituenti principali gli acidi: palmitico (16:00), oleico (18:1 n-9), linoleico (18:02 n-6), linolenico (18:3 n-3), e eicosaenoico (20:1 n-9). La tabella 8 mostra anche i risultati relativi agli acidi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA). I PUFA, con valori nell'intervallo 57 ÷ 60 %, sono stati il principale gruppo di acidi grassi, in tutti i campioni analizzati; valori di circa il 18 % e il 21 ÷ 23 % sono stati osservati per SFA e acidi grassi monoinsaturi, rispettivamente.

L'analisi statistica (one-way ANOVA) ha mostrato differenze significative ($p < 0.05$) tra le differenti procedure di estrazione, in particolare relativamente alle concentrazioni degli acidi: oleico, linoleico, linolenico, arachidonico (20:00), e eicosaenoico. Sono emerse anche significative differenze tra le diverse procedure di estrazione nel caso di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi. L'estrazione con metanolo ha mostrato il valore più basso per MUFA e il valore più alto per la frazione PUFA.

In figura 37 sono riportati i valori espressi in $\mu\text{g}/\text{mg}$ di olio ottenuti dall'analisi HPLC dei principali acidi grassi insaturi (18:01, 18:02, 18:03). Differenze significative ($p < 0.05$) sono state osservate tra le differenti procedure di estrazione. A conferma dei dati precedentemente ottenuti in GC, l'estratto metanolico ha mostrato la più bassa quantità di acidi grassi insaturi (101.7, 230.3 e 36.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 18:01 n-9, 18:02 n-6, e 18:03 n-3, rispettivamente, come valori medi su 6 campioni), mentre l'olio ottenuto mediante SC-CO₂ a 250 bar ha espresso i massimi livelli (188.4, 409.1, e 59.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 18:01 n-9, 18:02 n-6, e 18: 3 n-3, rispettivamente).

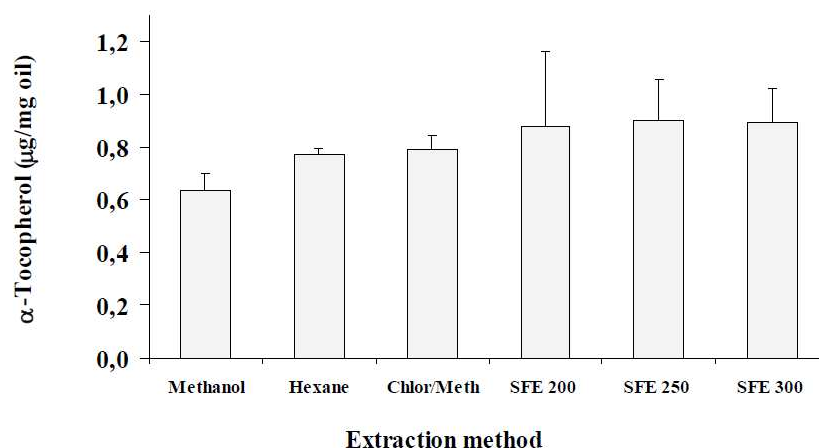


Figura 36. Contenuto di α -Tocoferolo (espresso come $\mu\text{g}/\text{mg}$ olio) nei campioni di olio di germe di grano ottenuti mediante SFE (200, 250 e 300 bar) e estrazione con solventi (esano, metanolo e cloroformio-metanolo).

In conclusione i risultati confermano, in accordo con la letteratura [71,72], le significative differenze sulla qualità dell'olio ottenuto mediante SC-CO₂ rispetto all'estrazione con solventi. L'olio estratto in SC-CO₂ a 250 bar ha dimostrato di possedere il più alto contenuto nei composti desiderati (α -tocoferolo e PUFA). Il processo di estrazione SC-CO₂ dimostra grande flessibilità, grazie alla possibilità di

modulazione continua del potere solvente / selettività, oltre al vantaggio immediato rispetto alle tecniche di estrazione tradizionali, di non richiedere un costoso post-trattamento degli estratti per l'eliminazione dei solventi nocivi.

Fatty acid	Chloroform/Methanol	Methanol	Hexane	SFE 200	SFE 250	SFE 300
14:0	0.11 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.15 ± 0.05 ^c	0.16 ± 0.02 ^{bc}	0.12 ± 0.01
16:0	16.98 ± 0.06	17.12 ± 0.73	17.53 ± 0.23	17.49 ± 0.83	17.15 ± 0.09	16.49 ± 0.60 ^{bd}
16:1 n-7	0.25 ± 0.01 ^a	0.37 ± 0.14	0.30 ± 0.00	0.26 ± 0.04	0.29 ± 0.05	0.25 ± 0.01 ^a
18:0	0.90 ± 0.06	0.85 ± 0.04	0.91 ± 0.01	0.92 ± 0.10	0.98 ± 0.07 ^a	0.90 ± 0.03
18:1 n-7	0.79 ± 0.08	0.91 ± 0.01	0.87 ± 0.08	0.88 ± 0.16	0.87 ± 0.05	0.79 ± 0.05
18:1 n-9	20.06 ± 0.18 ^a	18.87 ± 0.16	20.45 ± 0.03 ^a	20.15 ± 0.69 ^a	19.97 ± 0.09 ^a	20.41 ± 0.22 ^a
18:2 n-6	51.90 ± 0.03	52.57 ± 0.66	50.82 ± 0.01 ^a	51.00 ± 1.03 ^a	51.55 ± 0.18 ^a	52.13 ± 0.51 ^{bd}
18:3 n-3	7.02 ± 0.05 ^{ab}	7.62 ± 0.11	6.53 ± 0.01 ^a	6.40 ± 0.16 ^{ac}	6.42 ± 0.09 ^{ac}	6.48 ± 0.07 ^{ac}
20:0	0.19 ± 0.04 ^{ab}	0.11 ± 0.00	0.30 ± 0.00 ^a	0.13 ± 0.03 ^b	0.36 ± 0.04 ^{acd}	0.29 ± 0.06 ^{acd}
20:1 n-9	1.29 ± 0.01 ^a	1.02 ± 0.02	1.39 ± 0.01 ^a	1.19 ± 0.16 ^{ab}	1.39 ± 0.01 ^{ad}	1.43 ± 0.01 ^{acd}
SFA	18.20±0.08	18.25±0.77	18.87±0.21	18.00±0.70	18.67±0.04	17.82±0.70 ^b
MUFA	22.39±0.09 ^a	21.17±0.02	23.00±0.06 ^a	22.53±0.91 ^a	22.53±0.00 ^a	22.88±0.22 ^a
PUFA	58.92±0.18 ^a	60.20±0.77	57.35±0.02 ^a	57.27±0.70 ^{ac}	57.97±0.27 ^{ac}	58.61±0.57 ^{abd}

SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.
Mean and standard deviation of 6 samples (n = 6).
p < 0.05, ^a = versus methanol, ^bhexane, ^cchloroform-methanol, ^d200 bar, ^e250 bar.

Tabella 8. Contenuto in acidi grassi (% analisi GC) dell'olio di germe di grano ottenuto mediante le differenti tecniche di estrazione.

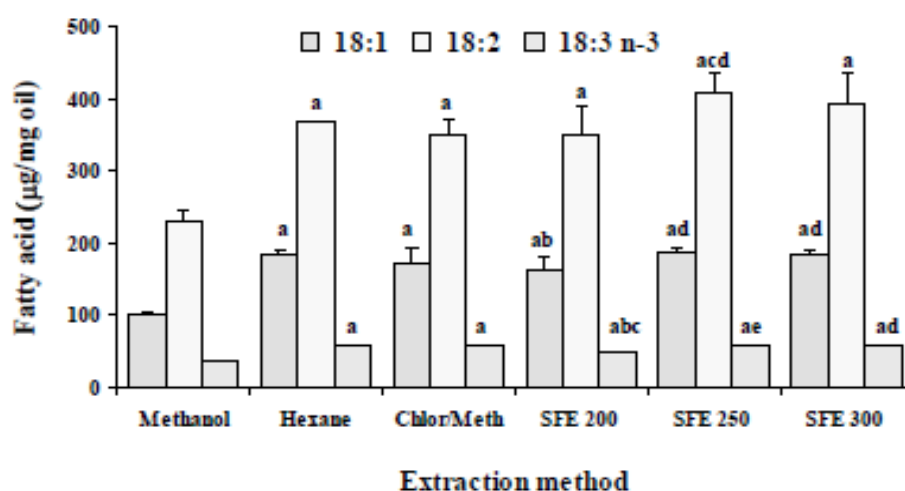


Figura 37. Contenuto in acidi oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolenico (18:3 n-3) (espresso come µg/mg di olio) negli estratti di germe di grano ottenuti mediante SFE (200, 250 e 300 bar) ed estrazione con solventi (metanolo, esano e cloroformio-metanolo).

3.3. *Pistacia lentiscus*

Il lentisco (*Pistacia lentiscus* L.), appartiene alla famiglia delle Anacardiaceae, è un arbusto legnoso sempreverde, molto ramificato, che può raggiungere i 3-4 m di altezza. È uno degli arbusti più comuni nel bacino Mediterraneo ed in particolare in Sardegna dove esiste una consolidata tradizione d'uso per vari scopi, dalla trasformazione delle varie parti della pianta (olio fisso dalle bacche, infuso dalle foglie, resina, olio essenziale da foglie e bacche) per uso alimentare, cosmetico e nella medicina popolare. L'olio essenziale ricavato dalle foglie è dotato di attività antimicrobica, antifungina e antiossidante [73,74], la sua composizione varia a seconda della zona geografica di provenienza e del metodo di estrazione utilizzato [75,76].

L'interesse in questa parte della ricerca è stato focalizzato sullo studio *in vivo* sui ratti dell'attività antiossidante dell'olio essenziale di *P. lentiscus* ottenuto mediante estrazione con CO₂ supercritico (SFE). La matrice usata era costituita da foglie di *P. lentiscus* raccolte nel nord Sardegna, l'estrazione è stata realizzata a 90 bar e 50 °C in configurazione con due separatori, condizioni di processo ottimizzate in precedenza [77]; a scopo di confronto si è ottenuto anche l'olio essenziale per idrodistillazione (HD) in apparato Clevenger secondo F.U.

Gli estratti sono stati caratterizzati chimicamente mediante tecnica GC e GC-MS; 76 sono i componenti l'olio rilevati, la percentuale di identificazione è stata del 94.9 % (HD) e del 90.4 % (SFE). Gli oli SFE e HD presentano composizione chimica simile anche se sono presenti alcune differenze quantitative (tabella 9); si noti che nell'estratto SFE la componente idrocarburica è maggiore che in quello HD (81.5 % *vs.* 78.5 %), in particolare con i sesquiterpeni germacrene D (19.9 % *vs.* 11.2 %) e γ -cadinene (8.7 % *vs.* 1.2 %).

Lo studio dell'attività antiossidante dell'estratto SFE di *P. lentiscus* *in vivo* sui ratti è stato eseguito utilizzando un modello di danno ossidativo da ischemia cerebrale indotto da occlusione delle carotidi. L'occlusione carotidea è spesso associata a ischemia cerebrale [78-80]. L'interruzione della circolazione nel cervello impedisce ai tessuti di sostenere il metabolismo basale, in concomitanza si verificano degli eventi patofisiologici che possono produrre modificazioni strutturali e funzionali nell'organizzazione del tessuto cerebrale [81,82]. In modo esemplificativo possiamo

affermare che il processo di ischemia / ri-perfusione porta ad infiammazione e stress ossidativo che danneggia nella corteccia centrale la membrana degli acidi grassi altamente poliinsaturi (HPUFAs) e induce infine la morte neuronale.

Si è valutato l'effetto della somministrazione di olio essenziale di *P. lentiscus* nel ratto, sulle modifiche del profilo degli acidi grassi indotta da occlusione transitoria bilaterale dell'arteria carotide (BCCAO) corteccia frontale e nel plasma.

Sono stati impiegati 16 ratti adulti Wistar sottoposti a BCCAO per 20 min seguita da 30 min di ri-perfusione; 6 h prima dell'intervento chirurgico, ai ratti, assegnati in modo casuale in quattro gruppi, è stato somministrato l'estratto SFE di *P. lentiscus* (200 mg in 0.45 ml di olio di girasole come veicolo), al gruppo di controllo è stato somministrato il solo veicolo.

Si è riscontrato che nei ratti trattati con il solo veicolo il processo di BCCAO seguito da ri-perfusione ha innescato nella corteccia frontale una diminuzione, valutata mediante tecnica HPLC, del livello di acido docosaesaenoico ω -3, $C_{22}H_{32}O_2$ (DHA) (figura 38), costituente la membrana degli acidi grassi altamente poliinsaturi (HPUFAs) più sensibili all'ossidazione. Nei ratti pre-trattati con l'olio essenziale non si è verificato questo cambiamento, si è anche riscontrata una diminuzione dei livelli dell'enzima cicloossigenasi-2 (COX-2), valutati mediante Western Blot (immunofissazione) e nel plasma sono aumentati sia il contenuto di DHA e il suo precursore, l'acido eicosapentaenoico $C_{20}H_{30}O_2$ (EPA) che i livelli di palmitoylethanolamide $C_{18}H_{37}NO_2$ (PEA) e oleoylethanolamide $C_{20}H_{39}NO_2$ (OEA).

In conclusione è possibile ipotizzare che il trattamento con l'olio di *P. lentiscus* prima del processo di BCCAO/R prevenga la diminuzione dei livelli di DHA nella corteccia frontale indotti dallo stress ossidativo. È ipotizzabile che l'aumento dei livelli plasmatici di PEA e OEA possa indurre la biosintesi DHA proteggendo così il tessuto cerebrale durante il processo di ischemia / ri-perfusione.

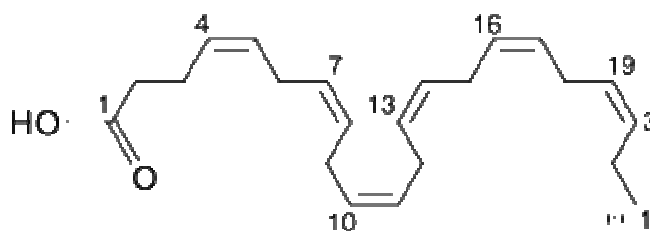


Figura 38. Acido docosaesaenoico (DHA).

RI	Compound	% HD	% SFE
933	ALPHA-PINENE	8.7	6.3
973	SABINENE	2.9	5.8
977	BETA-PINENE	3.0	2.4
991	MYRCENE	4.6	3.9
1006	ALPHA-PHELLANDRENE	2.2	1.5
1016	ALPHA-TERPINENE	1.7	0.4
1028	BETA-PHELLANDRENE	4.3	3.7
1057	GAMMA-TERPINENE	2.5	0.7
1177	TERPIN-4-OL	4.3	1.0
1294	2-UNDECANONE	1.4	1.0
1375	ALPHA-COPAENE	1.3	1.7
1389	BETA-CUBEBENE	0.4	1.1
1391	BETA-ELEMENE	1.3	1.3
1418	BETA-CARYOPHYLLENE	5.7	6.6
1452	ALPHA-HUMULENE	2.1	2.4
1477	GAMMA-MUUROLENE	2.6	2.9
1481	GERMACRENE-D	11.2	19.9
1495	ALPHA-SELINENE	1.5	1.7
1499	ALPHA-MUUROLENE	2.3	1.6
1513	GAMMA-CADINENE	1.2	8.7
1524	DELTA-CADINENE	10.5	4.2
1641	EPI-ALPHA-MUUROLLOL	3.3	1.0
1653	ALPHA-CADINOL	2.6	0.9
% totale componenti identificati		94.9	90.4
% totale comp. idrocarburici		78.5	81.4
% totale comp. ossigenati		14.5	7.5

Tabella 9. Indici di ritenzione (RI) e area cromatografica percentuale (%) dei principali componenti identificati, su 75 rilevati, nell'olio essenziale da foglie di *P. Lentiscus* ottenuto mediante SFE a: 90 bar, 50 °C e HD

3.4. *Myrtus communis*

Il Mirto (*Myrtus communis* L., Myrtaceae) è un arbusto diffuso nella macchia mediterranea e particolarmente in Sardegna. L'olio essenziale ottenuto da foglie, fiori e bacche è stato utilizzato nella medicina tradizionale sarda per le sue proprietà tonificanti e balsamiche, rendendolo quindi interessante per un potenziale impiego polivalente come antiossidante, antibatterico e antisettico [83-85]. È documentata anche l'attività antimicrobica dell'olio essenziale [86] contro *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e ceppi clinici di *Mycobacterium* spp. *romani* [87] ed è stata riscontrata anche attività antitumorale e antiossidante [88].

Il nostro interesse, sull'olio essenziale di *M. communis* si è concentrato sullo studio dell'attività antinfiammatoria topica nei ratti, verso l'edema dell'orecchio indotto da croton oil e sull'attività della myeloperossidasi (MPO). L'olio è stato utilizzato anche sul granuloma indotto da cotton pellet determinando i valori dei markers: tumor necrosis factor- α (TNF- α) e interleukina-6 (IL-6).

L'olio essenziale è stato ottenuto per idrodistillazione, in apparato Clevenger secondo F.U., da foglie di *M. communis* raccolte in Sardegna (zona del Sarrabus). La caratterizzazione chimica, eseguita mediante tecnica GC-MS, evidenzia la presenza di α -pinene (11 %), 1,8-cineolo (16 %), linalool (12 %), α -terpineol (7 %), e limonane (5 %) come componenti maggioritari (tabella 10).

Per la caratterizzazione dell'attività antinfiammatoria *in vivo* sono stati impiegati esemplari maschi di ratto albino Wistar (150 ÷ 170 g) e topi Swiss in accordo con le direttive CPCSEA (Committee for the Purpose of Control and Supervision on Experiments in Animals)

L'edema da croton oil (ottenuto da semi di *Croton tiglium*, Euforbiaceae) è stato indotto mediante applicazione dell'olio di croton nell'orecchio di tutti gli animali utilizzati. L'applicazione topica dell'olio essenziale riduce lo spessore dell'orecchio dell'animale in modo dose dipendente (tabella 11).

L'attività della MPO è stata valutata su un campione di tessuto dell'orecchio del topo a 24 h dal trattamento con croton oil mediante misura spettrofotometrica [13]; l'attività del 100 % è quella misurata nei topi trattati solo con croton oil; su quelli trattati poi per via topica con l'olio essenziale di *M. communis* o con dexamethasone (antinfiammatorio

di riferimento) viene misurata la diminuzione relativa dell'attività della MPO (tabella 12).

RI	%	Compound
940	11.2	α -PINENE
1032	4.87	LIMONENE
1035	15.92	1,8-CINEOLE
1100	11.83	LINALOOL
1191	7.10	α -TERPINEOL

Tabella 10. Indici di ritenzione (RI) e aree cromatografiche percentuali (%) dei principali componenti l'olio essenziale ottenuto da foglie di *M. communis* (Sardegna – zona Sarrabus).

Treatment	Ear thickness in μm (mean \pm SEM)
Vehicle	145.5 \pm 9.5
MCEO (1 mL/kg)	65.4 \pm 7.5*
MCEO (2 mL/kg)	45.6 \pm 3.5*
Dexa (10 mg/kg)	27.4 \pm 2.5*

* P < 0.05 compared with vehicle treated group (One-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Tabella 11. Effetto dell'olio essenziale di *M. communis* (MCEO) sull'edema dell'orecchio indotto da croton oil nei topi.

Treatment	MPO activity in U/mg tissue (mean \pm SEM)
Vehicle	100 \pm 15.5
MCEO (1 mL/kg)	58.6 \pm 12.4*
MCEO (2 mL/kg)	45.4 \pm 8.5*
Dexa (10 mg/kg)	40.5 \pm 5.5*

* P < 0.05 compared with vehicle treated group (One-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Tabella 12. Effetto del MCEO sull'attività della MPO nei topi.

Sui ratti è stato indotto un granuloma da cotton pellet del peso di 96.0 ± 5.0 g. L'applicazione topica dell'olio essenziale di *M. communis* o di indometacina (riferimento), ha ridotto la massa di granuloma in modo significativo con andamento dose-dipendente come mostrato in tabella 13.

La valutazione, nel siero dei ratti con granuloma indotto da cotton pellet, dei markers TNF- α e IL-6 è stata eseguita secondo il protocollo ELISA [89]; anche in questo caso l'applicazione topica dell'olio essenziale di *M. communis* o di indometacina ha ridotto significativamente i valori dei markers rispetto a quelli misurati sui ratti trattati con il solo veicolo (olio di paraffina) come mostrato in tabella 13.

Treatment	Granuloma mass mg (mean \pm SEM)	Serum TNF- α pg/mL	Serum IL-6 pg/mL
Vehicle	96.0 \pm 5.0	458.3 \pm 39.6	429.16 \pm 45.9
MCEO (1 mL/kg)	48.2 \pm 9.8*	324.9 \pm 34.7	320.8 \pm 25.0
MCEO (2 mL/kg)	44.6 \pm 5.2*	305.3 \pm 28.4	289.4 \pm 32.4
Indomethacin (10 mg/kg)	43.2 \pm 6.2*	279.1 \pm 36.9	258.3 \pm 34.7

Tabella 13. Inibizione del granuloma da cotton pellet e riduzione dei markers TNF- α and IL-6 nei ratti dovuta all'applicazione topica di olio essenziale di *M. communis*.

L'edema nell'orecchio indotto da croton oil è un modello animale ampiamente utilizzato per studiare l'infiammazione della pelle, analogamente il granuloma indotto da cotton pellet è ampiamente utilizzato per valutare le componenti transudative e proliferativa nell'infiammazione cronica [90]. Dati di letteratura riportano composizioni similari [91] per l'olio di *M. communis*; la presenza di 1,8-cineolo è riportata anche in altri oli su cui si è riscontrata attività antinfiammatoria [92].

I risultati ottenuti forniscono una prova sperimentale *in vivo* della buona attività antinfiammatoria dell'olio essenziale di *M. communis* che si suppone sia attribuibile alla riduzione della migrazione dei leucociti verso il tessuto danneggiato.

3.5. Verbenaceae e lamiaceae sarde

Gli estratti volatili ottenuti da queste matrici vegetali sono stati oggetto, oltre che di caratterizzazione chimica, di test *in vitro* sull'attività biologica antibatterica e antifunginea. In particolare sul *Vitex agnus-castus* [16] si sono investigati i vari organi della pianta (foglie, fiori e frutti), mentre nel caso della *Satureia thymbra* [15] l'interesse si è rivolto soprattutto sullo studio del processo di estrazione SFE. Per le altre lamiaceae studiate, sempre con estrazioni SFE, l'interesse principale è stato il confronto delle composizioni chimiche e dell'attività antibatterica e antifunginea riscontrate.

3.5.1. *Vitex agnus-castus*

I differenti oli essenziali sono stati ottenuti mediante SC-CO₂ (SFE) e idrodistillazione (HD) utilizzando foglie, fiori e frutti di *V. agnus-castus* raccolta in Ogliastra (Sardegna centro-orientale). La resa di estrazione (m/m) è stata simile per foglie (0.5 %, SFE e HD) e fiori (0.4 %, SFE e HD), mentre risulta più elevata sui frutti (2.2 % SFE, 0.8 % HD). La composizione degli estratti è stata ottenuta mediante analisi GC-MS con colonna HP5.

L'estratto SFE ottenuto dalle foglie (tabella 14) è caratterizzato dalla presenza di: bicyclogermacrene (13.6 %), 1,8-cineolo (11.2 %), sclarene (10.9 %), sabinene (10.0 %), (E)- β -farnesene (9.2 %), manool (5.3 %), α -pinene (3.8 %), α -terpinyl acetate (3.6 %) e (E)-caryophyllene (3.5 %). l'olio HD ottenuto dalle foglie è caratterizzato dai medesimi componenti maggioritari dell'estratto SFE, anche se in proporzioni differenti (tab. 14).

Nel caso dell'estratto SFE ottenuto dai fiori di *V. agnus-castus* (tabella 15) i componenti principali sono: bicyclogermacrene (13.7 %), (E)- β -farnesene (8.3 %), manool (8.2 %), (E)-caryophyllene (5.0 %), 1,8-cineolo (4.1 %), α -terpinyl acetate (2.2 %), spathulenol (1.5 %) e sabinene (1.7 %). Per l'olio HD ottenuto dai fiori (tabella 15), valgono le stesse considerazioni fatte per le foglie.

I componenti principali nell'estratto SFE ottenuto dai frutti (tabella 16) sono: (E)- β -farnesene (16.9 %), bicyclogermacrene (15.7 %), 1,8-cineolo (9.1 %), manool (5.9 %), α -terpinyl acetate 4.7 %, sabinene 4.2 %, α -pinene 3.6 %, β -phellandrene

(2.3 %), (E)-caryophyllene 2.3 % e spathulenol 1.5 %. anche in questo caso l'olio HD (tabella 16) non presenta, a parte la diversa resa di estrazione, sostanziali differenze con l'estratto SFE.

L'analisi comparativa dei risultati dell'analisi GC-MS , come sinteticamente riportato in figura 39, mostra chiaramente che tutti gli oli ottenuti sono caratterizzati da elevate quantità di bicyclogermacrene, (E)- β -farnesene and 1,8-cineolo. Tuttavia la concentrazione di (E)- β -farnesene è maggiore nei frutti (16.9 %) che nelle foglie o nei fiori (9.2 % e 8.3 %, rispettivamente). Inoltre il contenuto di 1,8-cineolo è maggiore nelle foglie (11.2 %) rispetto ai frutti e ai fiori (9.1 % e 4.1 %).

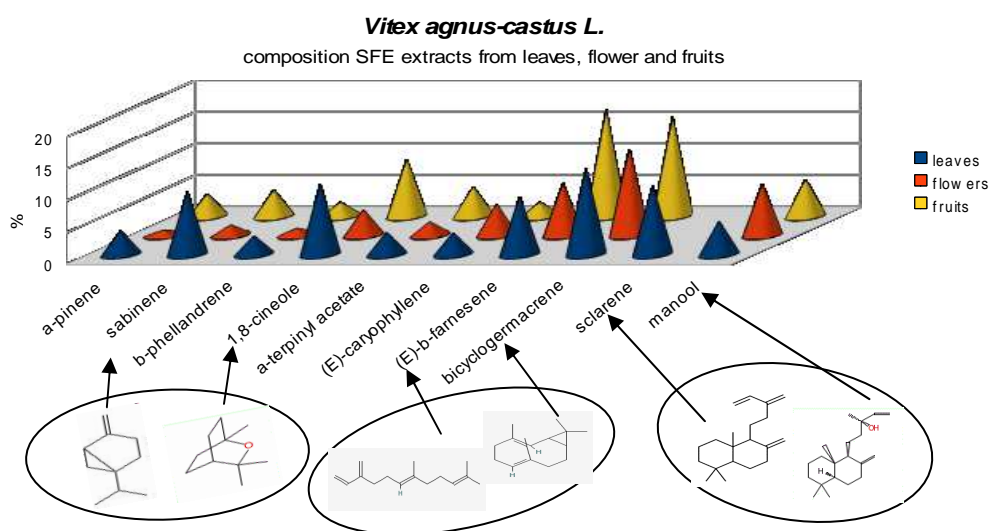


Figura 39. Principali componenti degli estratti SFE 90 bar dai differenti organi di *V. agnus-castus*.

Si potrebbe concludere, rispetto alla composizione chimica, che i risultati ottenuti rafforzano i precedenti dati di letteratura [93] sulle differenze qualitative e quantitative degli oli essenziali ottenuti dai diversi organi della pianta. Per quanto riguarda i metodi di estrazione, gli oli SFE e HD non presentano notevoli differenze nella composizione chimica. Le differenze osservate possono essere dovute al fatto che l'idrodistillazione induce migrazione di composti volatili dalla parte interna delle strutture di secrezione fino alla superficie foliare, seguita poi da una successiva evaporazione. Pertanto, i componenti a basso peso molecolare vengono estratti più facilmente dalla matrice vegetale, mentre nel processo FSE il CO₂ supercritico emula un solvente organico capace di estrarre meglio i componenti a più alta massa molecolare.

T _R	I _R	HD	SFE	Compound	Identification ^a
5.21	927	0.2	tr	α-thujene	MS, I _R
5.39	934	2.5	3.8	α-pinene	MS, I _R , Inj
6.42	975	5.6	10.0	sabinene	MS, I _R , Inj
6.51	978	0.4	0.5	β-pinene	MS, I _R , Inj
6.87	993	0.6	0.8	myrcene	MS, I _R , Inj
7.29	1007	0.3	0.3	α-phellandrene	MS, I _R , Inj
7.68	1018	0.4	-	α-terpinene	MS, I _{Rj}
8.08	1030	2.2	3.0	β-phellandrene	MS, I _R
8.18	1032	8.1	11.2	1,8-cineole	MS, I _R , Inj
8.71	1048	0.3	tr	(E)-β-ocimene	MS, I _R
9.09	1059	0.7	-	γ-terpinene	MS, I _R , Inj
9.37	1067	-	0.3	cis-sabinene hydrate	MS, I _R
10.16	1090	0.2	-	terpinolene	MS, I _R , Inj
10.57	1101	0.2	tr	linalool	MS, I _R , Inj
13.64	1178	1.4	0.3	terpin-4-ol	MS, I _R , Inj
14.17	1191	0.5	0.6	α-terpineol	MS, I _R , Inj
20.30	1338	0.2	0.3	δ-elemene	MS, I _R
20.85	1352	4.1	3.6	α-terpinyl acetate	MS, I _R , Inj
23.29	1411	1.7	1.5	α-gurjunene	MS, I _R , Inj
23.70	1421	5.0	3.5	(E)-caryophyllene	MS, I _R , Inj
24.17	1433	0.1	tr	β-gurjunene	MS, I _R
24.36	1437	0.2	tr	α-trans-bergamotene	MS, I _R
24.45	1440	0.2	-	aromadendrene	MS, I _R
24.66	1445	0.4	-	(Z)-β-farnesene	MS, I _R
25.03	1454	0.2	tr	α-humulene	MS, I _R
25.30	1461	10.1	9.2	(E)-β-farnesene	MS, I _R
26.15	1482	0.1	-	γ-murolene	MS, I _R
26.86	1500	16.2	13.6	bicyclogermacrene	MS, I _R
26.95	1502	0.1	-	epizonarene	MS, I _R
27.29	1511	0.1	-	(Z)-α-bisabolene	MS, I _R
27.47	1515	0.1	tr	trans-γ-cadinene	MS, I _R
29.50	1568	0.6	0.3	ledol	MS, I _R
29.81	1576	-	0.6	germacrene D-4-ol	MS, I _R
29.87	1578	0.3	0.3	spathulenol	MS, I _R
30.11	1584	0.7	tr	globulol	MS, I _R
30.86	1604	1.9	1.5	viridiflorol	MS, I _R
32.26	1642	0.7	0.4	epi-α-cadinol	MS, I _R
32.77	1655	0.4	-	α-cadinol	MS, I _R
33.85	1685	0.1	-	α-bisabolol	MS, I _R
36.01	1746	0.2	-	6R,7R-bisabolone	MS, I _R
37.72	1795	2.0	-	bicyclo-vetivenol	MS, I _R
41.11	1896	0.8	0.6	8S,14-cedrane-diol	MS, I _R
41.93	1921	0.2	-	8S,13-cedrane-diol	MS, I _R
42.15	1928	1.7	-	epi-laurene	MS, I _R
42.94	1953	1.8	2.6	beyrene	MS, I _R
43.09	1957	0.3	tr	ent-rosadiene	MS, I _R
43.21	1961	0.2	tr	pimaradiene	MS, I _R
43.88	1982	0.2	tr	sandaracopimara-8(14)-15-diene	MS, I _R
44.10	1989	5.9	10.9	sclarene	MS, I _R
46.11	2054	0.2	0.5	epi-13-manoyl oxide	MS, I _R
46.85	2078	2.0	5.3	manool	MS, I _R
51.25	2229	-	0.4	sclareol	MS, I _R
52.66	2279	0.9	1.4	7-α-hydroxy-manool	MS, I _R
56.73	2430	-	0.9	methyl strictate	MS, I _R

Note:^a Identification has been realized by comparing mass spectra (MS), retention indices (I_R), and injection of authentic compound (Inj) and injection of authentic compound (Inj).

Tabella 14. Tempi di ritenzione, T_R, indici di ritenzione, I_R e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli oli essenziali da foglie di *Vitex agnus-castus* L. estratti per idrodistillazione, (HD), e per SFE a 90 bar, 40 °C (SFE).

T _R	I _R	HD	SFE	Compound	Identification ^a
5.38	934	1.0	0.9	α-pinene	MS, I _R , Inj
6.39	974	1.2	1.7	sabinene	MS, I _R , Inj
6.85	992	0.2	tr	myrcene	MS, I _R , Inj
8.07	1029	0.9	1.2	β-phellandrene	MS, I _R
8.14	1031	1.5	4.1	1,8-cineole	MS, I _R , Inj
13.60	1177	0.3	tr	terpin-4-ol	MS, I _R , Inj
14.15	1191	0.3	0.7	α-terpineol	MS, I _R , Inj
20.81	1351	2.0	2.2	α-terpinyl acetate	MS, I _R , Inj
23.26	1410	0.8	1.2	α-gurjunene	MS, I _R , Inj
23.66	1420	3.0	5.0	(E)-caryophyllene	MS, I _R , Inj
24.34	1437	0.2	tr	α-trans-bergamotene	MS, I _R
24.64	1444	0.7	0.9	(Z)-β-farnesene	MS, I _R
25.25	1459	5.2	8.3	(E)-β-farnesene	MS, I _R
26.80	1498	9.7	13.7	bicyclogermacrene	MS, I _R
27.26	1510	0.3	0.5	β-bisabolene	MS, I _R
27.83	1525	0.4	tr	trans-γ-cadinene	MS, I _R
29.47	1567	0.5	tr	ledol	MS, I _R
29.86	1577	1.4	1.5	spathulenol	MS, I _R
30.09	1583	1.1	tr	globulol	MS, I _R
30.39	1591	0.3	tr	viridiflorol	MS, I _R
32.14	1638	0.4	tr	β-acorenol	MS, I _R
32.24	1641	0.4	tr	epi-α-cadinol	MS, I _R
32.35	1644	1.6	tr	himachalol	MS, I _R
32.74	1655	0.3	tr	α-cadinol	MS, I _R
33.82	1684	0.6	tr	α-bisabolol	MS, I _R
37.72	1795	6.4	-	biciclo-vetivenol	MS, I _R
42.13	1927	5.2	tr	epi-laurenene	MS, I _R
43.86	1982	4.1	2.3	sandaracopimara-8(14)-15-diene	MS, I _R
46.85	2078	7.9	8.2	manool	MS, I _R
52.63	2278	1.5	0.8	7-α-hydroxy-manool	MS, I _R

Note:^a Identification has been realized by comparing mass spectra (MS), retention Indices (I_R), and injection of authentic compound (Inj) and injection of authentic compound (Inj).

Tabella 15. Tempi di ritenzione, T_R, indici di ritenzione, I_R e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli oli essenziali da fiori di *Vitex agnus-castus* L. estratti per idrodistillazione, (HD), e per SFE a 90 bar, 40 °C (SFE).

T _R	I _R	HD	SFE	Compound	Identification ^a
5.38	934	4.1	3.6	α-pinene	MS, I _R , Inj
6.40	974	4.9	4.2	sabinene	MS, I _R , Inj
6.50	978	0.5	0.4	β-pinene	MS, I _R , Inj
6.85	992	0.6	0.5	myrcene	MS, I _R , Inj
7.28	1006	0.5	0.3	α-phellandrene	MS, I _R , Inj
8.08	1030	2.7	2.3	β-phellandrene	MS, I _R
8.16	1032	7.4	9.1	1,8-cineole	MS, I _R , Inj
9.36	1067	tr	0.2	cis-sabinene hidrate	MS, I _R
13.60	1177	0.4	tr	terpin-4-ol	MS, I _R , Inj
14.15	1191	0.6	0.5	α-terpineol	MS, I _R , Inj
20.82	1351	4.9	4.7	α-terpinyl acetate	MS, I _R , Inj
21.00	1355	0.4	0.2	citronellyl-acetate	MS, I _R
23.26	1410	1.0	1.1	α-gurjunene	MS, I _R , Inj
23.64	1419	2.5	2.3	(E)-caryophyllene	MS, I _R , Inj
24.33	1437	tr	0.2	α-trans-bergamotene	MS, I _R
24.63	1444	0.5	0.5	(Z)-β-farnesene	MS, I _R
25.30	1461	14.4	16.9	(E)-β-farnesene	MS, I _R
26.82	1499	14.0	15.7	bicyclogermacrene	MS, I _R
27.82	1524	0.4	tr	trans-γ-cadinene	MS, I _R
29.46	1567	0.5	0.4	ledol	MS, I _R
29.85	1577	1.1	1.5	spathulenol	MS, I _R

T _R	I _R	HD	SFE	Compound	Identification ^a
30.07	1583	0.6	0.3	globulol	MS, I _R
30.82	1602	1.2	1.0	viridiflorol	MS, I _R
32.14	1638	0.4	tr	β-acorenol	MS, I _R
32.24	1641	1.75	1.3	epi-α-cadinol	MS, I _R
37.70	1794	4.3	-	bicyclo-vetivenol	MS, I _R
43.17	1960	tr	0.2	pimaradiene	MS, I _R
46.82	2077	4.0	5.9	manool	MS, I _R
52.62	2278	1.0	1.2	7-α-hydroxy-manool	MS, I _R

Note:^a Identification has been realized by comparing mass spectra (MS), retention Indices (I_R), and injection of authentic compound (Inj) and injection of authentic compound (Inj).

Tabella 16. Tempi di ritenzione, T_R, indici di ritenzione, I_R e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli oli essenziali da frutti di *Vitex agnus-castus* L. estratti per idrodistillazione, (HD), e per SFE a 90 bar, 40 °C (SFE).

Per quanto riguarda l'attività biologica antifunginea (tabella 17), la valutazione del MIC e MLC ha mostrato che l'olio ottenuto dalle foglie possiede la maggiore attività, in particolare contro *M. canis*, *T. rubrum* e *E. floccosum*, con valori di MIC di 0,64 µL/mL. Anche se i risultati di MIC e MLC variano tra i microrganismi testati, nella maggior parte dei casi, MIC e MLC hanno valori equivalenti; questo è un indice dell'attività fungicida degli oli testati. L'olio essenziale di *Vitex agnus-castus* isolato dalle foglie può essere utile per scopi terapeutici, in particolare nelle dermatofitosi provocate da *E. floccosum*, *mentagrophytes T.* e *T. rubrum*.

Strains	HD leaves		HD flowers		SFE flowers		HD fruits		SFE fruits		Fluconazole	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	1.25	1.25	2.5	2.5	≥10	>10	1.25	2.5	2.5	5	16-32	32-64
<i>Microsporium canis</i> FF1	0.64	0.64	2.5	2.5 - 5	5	5	1.25	1.25 - 2.5	1.25	1.25	128	128
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0.64	0.64 - 1.25	1.25 - 2.5	5	5 - 10	>10	1.25	5	1.25	10	16	64
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	1.25	1.25 - 2.5	2.5	5	5 - 10	>10	1.25	5	5	10 - 20	128	>128
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0.64	0.64	0.64	0.64	2.5	2.5	0.64	1.25	1.25	1.25	16	16

MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in µl/ml (V/V).
^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in µg/ml (W/V).

Tabella 17. Attività antifunginea (MIC and MLC) degli estratti di *Vitex agnus-castus* L. su ceppi di dermatophyte.

3.5.2. *Satureja thymbra*

Le parti aeree di *Satureja thymbra* raccolte a Cagliari (Sardegna) in località Colle S. Michele, sono state utilizzate per ottenere l'olio essenziale mediante idrodistillazione (HD) e l'estratto volatile mediante SC-CO₂ (SFE) con prelievi ogni ora e per un tempo totale di estrazione di 4 h. La resa di estrazione totale è stata 3.3 % (HD) e 2.1 % (SFE).

I campioni ottenuti sono stati caratterizzati qualitativamente mediante analisi GC-MS e quantitativamente mediante GC-FID (tabella 18). È possibile raggruppare, sulla base della struttura chimica, i componenti identificati negli estratti di *S. thymbra* in quattro classi principali: monoterpeni idrocarburici (HM), monoterpeni ossigenati (OM), sesquiterpeni idrocarburici (HS) e sesquiterpeni ossigenati (OS). In figura 40 è riportato l'andamento della composizione percentuale delle differenti classi rispetto al tempo di estrazione.

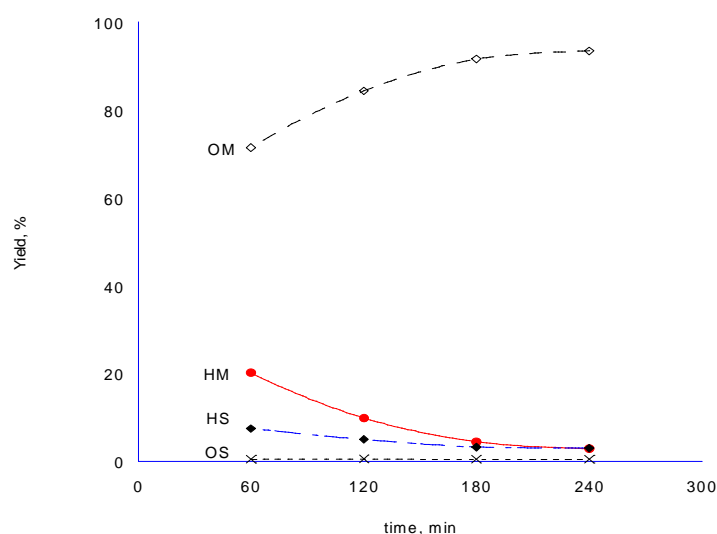


Figura 40. Evoluzione nel tempo della composizione dell'estratto volatile di *Satureja thymbra*. Percentuali delle classi ai differenti tempi di estrazione: monoterpeni idrocarburici (HM), monoterpeni ossigenati (OM), sesquiterpeni idrocarburici (HS) e sesquiterpeni ossigenati (OS).

È possibile notare che, le percentuali di HS e di OS sono basse e praticamente indipendenti dal tempo di estrazione, mentre la percentuale di HS decresce con l'avanzare dell'estrazione; al contrario, la percentuale della classe OM cresce per tutta la durata dell'estrazione. Questo tipo di comportamento (riferito alle classi dei componenti)

potrebbe spiegarsi sulla base della struttura della matrice vegetale e dei meccanismi di trasferimento di massa coinvolti nei processi SFE; normalmente, la fase di diffusione interna è quella che regola il trasferimento di massa durante l'estrazione SFE di oli essenziali [34], è ragionevole quindi ipotizzare che i composti a più leggeri all'interno della matrice vegetale abbiano tempi di diffusione inferiori a quelli dei più pesanti.

I componenti caratterizzanti gli estratti SFE e HD (figura 41) sono: timolo (64.0 ÷ 57.3 %) e carvacrolo (5.2 ÷ 4.4 %), i loro precursori γ -terpinene (7.2 ÷ 9.8 %) e p-cimene (6.3 ÷ 9.8 %); infine è da segnalare la presenza non trascurabile del sesquiterpene β -caryophyllene (6.5 ÷ 5.3 %).

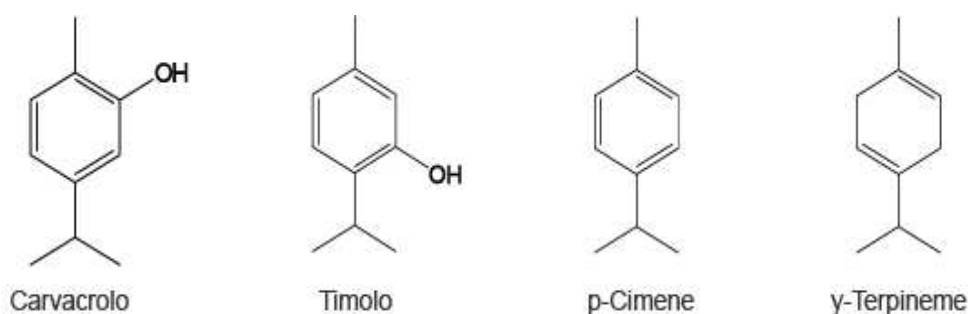


Figura 41. Componenti maggioritari negli estratti volatili di *Satureja thymbra*.

La comparazione della composizione degli estratti SFE e HD non mostra differenze di rilievo; anche nell'idrodistillato le classi di componenti dominanti risultano essere i monoterpeni ossigenati (OM) e idrocarburici (HM) con il 66.2 % e il 27.4 % rispettivamente. Studi precedenti sulla caratterizzazione dell'olio essenziale di *S. thymbra* raccolta sempre a Cagliari [94], hanno mostrato la presenza dei medesimi componenti caratterizzanti, ma in proporzioni alquanto differenti (γ -terpinene 32 ÷ 40 %, timolo 22 ÷ 29 % e p-cimene 11 ÷ 13 %), indipendentemente dalla fase vegetativa. Più in generale gli oli essenziali ottenuti da *S. thymbra* proveniente da differenti paesi del mediterraneo risultano essere caratterizzati dalla coppia carvacrolo / timolo con alternanza come componente maggioritario.

RI	Compound	SFE	HD
930	α -Thujene	0.2	0.5
937	α -Pinene	0.4	1.4
953	Camphene	0.3	0.7
980	β -Pinene	0.5	0.8
992	Myrcene	0.4	0.8
1006	α -Phellandrene	tr.	0.2
1020	α -Terpinene	1.0	1.7
1027	p-Cymene	6.3	9.8
1032	Limonene	0.6	1.0
1040	(Z)- β -Ocimene	0.2	0.3
1051	(E)- β -Ocimene	0.2	0.3
1062	γ -Terpinene	7.2	9.8
1070	Cis-Sabinene hydrate	0.4	tr.
1090	Terpinolene	tr.	0.2
1098	trans-Sabinene hydrate	0.2	-
1100	Linalool	0.3	0.3
1167	Borneol	2.3	2.0
1179	Terpinen-4-ol	0.3	0.5
1247	Carvacrol, methyl ether	1.7	1.7
1294	Thymol	64.0	57.3
1302	Carvacrol	5.2	4.4
1419	β -Caryophyllene	6.5	5.3
1453	α -Humulene	0.3	0.2
1477	γ -Muuroolene	0.2	tr.
1494	Valencene	0.2	tr.
1524	δ -Cadinene	0.3	0.2
1581	Caryophyllene oxide	0.7	0.6
1901	Not identified compound	0.2	tr.
tr: traces	Total identified	99.9	98.8
	Per cent yield	2.1	3.3

Tabella 18. Indici di ritenzione (RI) e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli oli essenziali di *Satureia thymbra* ottenuti mediante idrodistillazione (HD), e con CO₂ supercritico (SFE).

Gli estratti volatili di *S. thymbra* hanno mostrato possedere una buona attività antifunginea (tabella 19) sia verso i lieviti, che nei confronti di ceppi di dermatofiti ed *Aspergillus*, con valori di MIC che vanno 0.16 ÷ 0.32 μ L/mL. L'attività antifunginea degli estratti può essere associata con l'elevato contenuto di fenoli, in particolare il timolo, che si è già dimostrato efficace contro questi ceppi [95]. Questi risultati evidenziano il potenziale utilizzo degli estratti volatili di *S. thymbra* nella cura di dermatomicosi, aspergilloso e candidosi, che sono comuni infezioni causate da funghi filamentosi e dai lieviti, che possono divenire gravi nei soggetti immunodepressi.

Strains	HD		SFE		Fluconazole		Amphotericin B	
	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC	MLC	MIC ^(b)	MLC ^(b)	MIC	MLC
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.32	0.32-0.64	0.32	0.32-0.64	1	>128	N.T ^(c)	N.T
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	0.32	0.64	0.32	0.64	4	>128	N.T	N.T
<i>C. krusei</i> H9	0.32	0.32-0.64	0.32	0.32	64	64-128	N.T	N.T
<i>C. guilliermondii</i> MAT23	0.32	0.32	0.32	0.32	8	8	N.T	N.T
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0.32	0.64	0.32	0.64	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0.16	0.32	0.16	0.32	16	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FF7	0.16	0.32	0.16	0.32	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	0.16	0.32	0.16	0.32	128	≥128	N.T	N.T
<i>T. rubrum</i> CECT 2794	0.16	0.16	0.16	0.32	16	64	N.T	N.T
<i>T. verrucosum</i> CECT 2992	0.16	0.32	0.16	0.32	>128	>128	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	0.16	0.16	0.16	0.16	128	128	N.T	N.T
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	0.16	0.32	0.16	0.16	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0.16	0.16	0.16	0.16	16	16	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	0.32	1.25	0.32	1.25	NT	NT	1-2	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	0.32	0.64	0.32	0.64	NT	NT	2	4
<i>A. flavus</i> F44	0.32	0.64	0.32	0.64	NT	NT	2	8

Notes: ^a MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in µl/ml (V/V).
^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in µg/ml (W/V).
^c Not tested
Results were obtained from 3 independent experiments performed in duplicate

Tabella 19. Attività antifunginea (MIC and MLC) degli estratti di *Satureja thymbra* su lieviti e ceppi di dermatophyte e *Aspergillus*.

3.5.3. Altre lamiaceae:

Thymus capitatus, *Rosmarinus officinalis* e *Lavandula stoechas*

Sono state utilizzate le foglie di *Thymus capitatus*, *Rosmarinus officinalis* e le parti aeree di *Lavandula stoechas* raccolte a Sadali (Sardegna, Italia). Le matrici vegetali, dopo il pretrattamento, sono state sottoposte al processo di estrazione mediante CO₂ supercritico (SFE), con rese di estrazione tra 1.2 ÷ 1.8 % (m/m), gli estratti volatili così ottenuti sono stati sottoposti a caratterizzazione chimica mediante analisi GC-MS e GC-FID; in tabella 20 è riportata la composizione percentuale dei principali componenti i tre estratti volatili.

α-Pinene (34.5 %), bornyl acetate (19.1 %) e verbenone (18.5 %) sono risultati essere i componenti più rappresentativi nell'estratto di *R. officinalis*; questa è una tipica composizione del chemotipo α-pinene \ bornylacetate \ verbenone in accordo con i dati di letteratura sul *R. officinalis* sardo [96].

L'estratto volatile di *L. stoechas* mostra un'elevata percentuale di canfora (31.7 %), fenchone (20.7 %) e 1,8-cineolo (10.9 %), in accordo con i dati di letteratura per oli essenziali provenienti da altre nazioni [97]. Componenti minori, anche se comunque rilevanti sono: bornyl acetate (5.0 %) e myrtenyl acetate (2.1 %).

Nell'estratto di *T. capitatus* il componente predominante è il carvacrolo (87.8 %), seguito da β-caryophyllene (2.3 %) e *p*-cymene (2.2 %); l'elevato contenuto di carvacrolo risulta essere in accordo con i dati ottenuti da piante della stessa specie raccolte in altri paesi del Mediterraneo [98]. Per contro, i risultati ottenuti differiscono significativamente da altri dati riportati per il *T. capitatus* raccolto sempre in Sardegna [99], dove i componenti maggioritari risultavano essere timolo (29.3 %), *p*-cymene (26.4 %) e carvacrolo (10.8 %).

Per quanto riguarda l'attività biologica (tabella 21), gli estratti volatili di *R. officinalis* e *L. stoechas* supercritici non hanno alcuna capacità inibitoria neanche alla più alta concentrazione (2.5 %).

L'estratto di *T. capitatus* ha invece mostrato un buon effetto batteriostatico contro ceppi di lievito e contro *E. coli* (MIC = 0.6 %) e *S. aureus* (MIC = 0.078 %). L'attività antimicrobica trovata nell'estratto SFE di *T. capitatus*, è in linea con dati sull'olio essenziale HD precedentemente riportati in letteratura [99] e confermano la possibilità di

utilizzare oli essenziali di timo (o una miscela dei componenti principali) in campo alimentare per prevenire la crescita batterica e prolungare la shelf-life degli alimenti. Analogamente, anche l'attività antifunginea è risultata in linea con quanto riportato in letteratura [100]; l'estratto volatile di *T. capitatus* potrebbe quindi trovare un utilizzo topico nel trattamento delle candidosi mucocutanee e delle dermatofitosi.

I_R	Compound	<i>R. officinalis</i>	<i>L. stoechas</i>	<i>T. capitatus</i>
938	α -Pinene ^a	34.5	tr	tr
953	Camphene ^a	5.9	1.1	tr
980	β -Pinene ^a	1.7	-	tr
1028	para-Cymene	-	-	2.2
1032	Limonene ^a	3.3	-	-
1035	1,8-Cineole ^a	tr	10.9	-
1062	γ -Terpinene ^a	-	-	0.7
1090	Fenchone	-	20.7	-
1100	Linalool ^a	-	-	1.0
1147	Camphor ^a	1.1	31.7	-
1168	Borneol ^a	2.2	0.2	0.5
1183	<i>meta</i> -Cymene-8-ol	-	0.7	-
1186	<i>para</i> -Cymene-8-ol	-	0.6	-
1209	Verbenone ^a	18.5	0.7	-
1287	Bornyl acetate ^a	19.1	5.0	-
1310	Carvacrol ^a	-	-	87.8
1327	Myrtenyl acetate	-	2.1	-
1420	β -Caryophyllene ^a	2.3	-	2.3
1493	Valencene ^a	-	0.7	-
1514	γ -Cadinene	-	0.6	-
	Total identified	88.6	75.0	94.5
<p>Note: I_R: GC retention indices relative to C₉-C₂₅ n-alkanes on the HP-5 column; tr: traces<0.1% ^a Peaks identified by comparison with respective pure standards.</p>				

Tabella 20. Indici di ritenzione [RI] e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli estratti SFE di *R. officinalis*, *L. stoechas* e *T. capitatus*.

Strains	<i>R. officinalis</i>		<i>T. capitatus</i>		<i>L. stoechas</i>	
	MIC*	MCC*	MIC	MCC	MIC	MCC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	> 2.5	> 2.5	0.078	0.15	> 2.5	> 2.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	> 2.5	> 2.5	0.6	2.5	> 2.5	> 2.5
<i>Candida albicans</i> (Clinical strain)	> 2.5	> 2.5	1.25	> 2.5	> 2.5	> 2.5
<i>Candida glabrata</i> (Clinical strain)	> 2.5	> 2.5	0.039	> 2.5	> 2.5	> 2.5
*MIC Minimal Inhibitory Concentration, % (v/v); MCC Minimal. Cidal Concentration, % (v/v) .						

Tabella 21. Attività biologica antibatterica e antifunginea degli estratti SFE di *R. officinalis*, *L. stoechas* e *T. capitatus*.

3.6. Piante sarde e portoghesi a confronto

Un interesse particolare ha rivestito lo studio comparativo, dal punto di vista della composizione chimica e dall'attività biologica, di specie comuni raccolte in differenti zone geografiche.

Bupleurum fruticosum L., *Smyrniium olusatrum* L., *Calamintha nepeta* L. Savi subsp. *nepeta* e *Achillea millefolium* L. sono le piante, comuni alla Sardegna e al Portogallo, sono state le piante oggetto di questa parte della ricerca. Le diverse specie di piante sono state raccolte, ad eccezione di *A. millefolium*, in differenti periodi vegetativi. Gli oli essenziali, ottenuti mediante SC-CO₂ (SFE) e idrodistillazione (HD), sono stati caratterizzati chimicamente mediante GC-MS e GC-FID, mentre per quanto riguarda l'attività biologica è stata testata l'attività antifunginea.

3.6.1. *Bupleurum fruticosum*

Sono state utilizzate le parti aeree di *Bupleurum fruticosum* L. raccolte nel corso di tre diverse fasi vegetative: prima della fioritura (campione 1), durante la fioritura (campioni 2, 4) e durante la fruttificazione (campioni 3, 5). La raccolta è stata fatta da due siti diversi: Cerca de Santa Comba (Portogallo centrale) (campioni 4, 5) e Baunei (Sardegna, Italia) (campioni 1, 2, 3). Tutti e cinque i campioni sono stati sottoposti a estrazione mediante SC-CO₂ (SFE) e idrodistillazione (HD); i campioni sardi sono quelli che hanno sempre fornito le maggiori rese di estrazione (tabelle 22, 23). Le composizioni degli estratti HD e SFE, ottenute mediante analisi GC-FID e GC-MS, sono riassunte nelle tabelle 22 e 23 rispettivamente. I componenti sono elencati in base al loro ordine di eluizione su una colonna SPB-1.

Tutti gli oli essenziali (HD) ottenuti dal *B. fruticosum* raccolto in Sardegna sono caratterizzati da un elevato contenuto di β -phellandrene (71.4 ÷ 57.8 %), e sabinene (13.9 ÷ 12.1 %). La composizione degli HD ottenuti dalle piante sarde raccolte nei differenti periodi vegetativi (prima, durante e dopo la fioritura) ha mostrato significative variazioni: β -phellandrene aumenta dal 57.8 % al 71.4 % e il sabinene dal 12.1 % al 13.9 %; mentre gli altri componenti non mostrano significative variazioni.

La composizione chimica degli oli HD portoghesi è molto differente da quelli sardi: α -pinene e β -pinene rappresentano oltre il 70 % del totale dell'olio essenziale. Il loro contenuto è quasi costante nelle varie fasi vegetative anche se α -pinene mostra una variazione dal 37.3 % in fase di fioritura, fino al 42.7 % in quella di fruttificazione. Nei medesimi periodi il β -phellandrene e il (E)- β -ocimene mostrano variazioni opposte.

I risultati mostrano che i *B. fruticosum* sardi e portoghesi appartengono a chemotipi differenti (figura 42). La composizione degli oli sardi è molto simile a quella riscontrata in altri oli ottenuti da *B. fruticosum* raccolto nel bacino del Mediterraneo (chemotipo β -phellandrene / sabinene) [101-103]; mentre l'olio portoghese potrebbe appartenere al chemotipo α -pinene / β -pinene già riscontrato in Spagna [104].

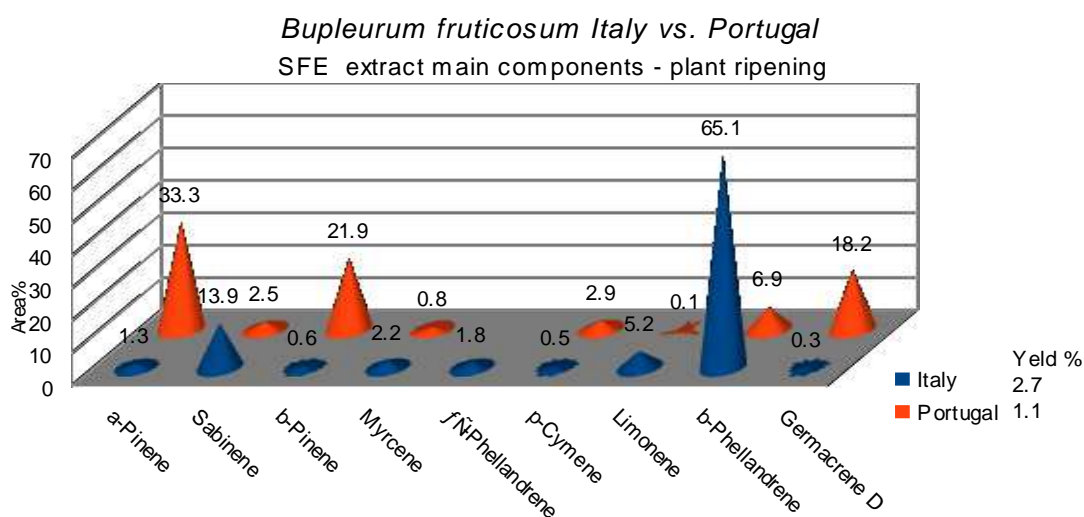


Figura 42. Confronto delle composizioni degli estratti SFE 90 bar da piante con frutti di *B. fruticosum* raccolte in Sardegna e in Portogallo.

La differenza principale tra gli oli SFE e HD è il contenuto in sesquiterpeni che risulta superiore negli oli SFE (tabelle 22, 23): ad esempio per il germacrene D (24.6 vs 1.1 %). Questo risultato potrebbe spiegarsi con il fatto che i componenti gli oli essenziali presentano una piccolissima solubilità in acqua e che quindi il processo di idrodistillazione induce principalmente la migrazione di questi composti dall'interno della foglia fino alla sua superficie, seguita dalla loro successiva evaporazione e perciò solo i composti a basso peso molecolare sono esaustivamente estratti dalla matrice vegetale durante l'idrodistillazione. Invece l'estrazione SC-CO₂ emula, variando le

condizioni di temperatura e pressione, le caratteristiche di un solvente organico e riesce ad estrarre meglio i componenti a più alta massa molecolare.

RI (SPB-1)	RI (SuperW-10)	1	2	3	4	5	Compound
924	1029	-	-	-	1.3	-	α -Thujene
932	1028	1.4	1.5	1.4	37.3	42.7	α -Pinene
945	1074	0.1	-	0.1	1.1	1.0	Camphene
967	1125	12.1	12.2	13.9	1.0	2.5	Sabinene
973		0.1	-	-	33.0	33.5	β -Pinene
982	1159	1.8	2.2	2.4	2.0	1.6	Myrcene
1000	1169	1.0	1.2	1.7	0.1	0.1	α -Phellandrene
1014	1271	1.7	0.9	0.7	2.7	2.7	p-Cymene
1014	1183	-	0.1	0.2	tr	0.1	α -Terpinene
1024	1231	-	0.9	-	1.0	-	(Z)- β -Ocimene
1024	1215	57.8	68.5	71.4	7.8	6.2	β -Phellandrene
1037	1246	0.3	-	0.5	4.7	3.5	(E)- β -Ocimene
1049	1246	0.4	-	0.5	1.7	1.4	γ -Terpinene
1053	1455	0.4	-	-	-	-	trans-Sabinene hydrate
1080	1284	0.1	-	-	0.2	0.1	Terpinolene
1084	1553	0.4	-	-	-	-	cis-Sabinene hydrate
1084	1539	tr	-	0.4	-	-	Linalool
1123	1644	-	-	-	0.2	0.1	cis-Verbenol
1123	1643	-	-	-	-	0.1	trans-Pinocarveol
1154	1660	4.3	2.0	-	tr	-	Cryptone
1160	1592	0.7	-	0.5	-	0.8	Terpinen-4-ol
1160	1622	-	-	-	0.2	0.1	Myrtenal
1174	1667	0.2	-	-	tr	-	Estragol
1174	1672	0.2	-	-	-	-	cis-Piperitol
1193	1823	0.6	-	-	-	-	trans-Carveol
1211	1770	0.6	-	-	-	-	Luminal
1226	1423	-	-	-	0.6	-	Hexyl-2-methyl butirate
1226	1600	-	-	-	0.7	-	Carvacrol methyl ether
1236	1836	0.6	-	-	-	-	Geraniol
1247	1709	1.4	-	0.1	-	-	Phellandral
1258	1752	2.4	-	-	-	-	Decanol
1281	2200	1.5	-	-	-	-	Carvacrol
1360	1741	3.0	-	-	-	-	Geranyl acetate
1370	2002	2.6	2.8	-	-	-	Methyl eugenol
1371	1490	tr	-	1.5	0.1	tr	α -Copaene
1416	1593	-	-	-	0.5	-	(E)-Caryophyllene
1416		-	-	-	0.5	-	β -Cedrene
1446	1661	-	-	-	0.2	-	α -Humulene
1470	1698	-	-	0.2	1.1	0.4	Germacrene D
1485	1723	-	-	0.2	-	-	(Z)- α -Bisabolene
1498	1719	-	-	-	0.8	-	β -Bisabolene
1510		-	-	0.1	-	-	δ -Cadinene
1518	2215	0.3	-	-	0.1	-	Elemicin
1557		0.3	-	0.3	0.1	-	Caryophyllene oxide
Total identified		96.3	92.3	96.1	99.0	96.9	
Per cent yield		1.0	1.8	2.6	0.8	1.1	
Notes: Compounds listed in order to their elution on the SPB-1 column.							

Tabella 22. Indici di ritenzione (RI) and aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli oli essenziali di *Bupleurum fruticosum* ottenuti per idrodistillazione: **1** foglie, Italia; **2** foglie e ombrelle fiorite, Italia; **3** foglie e ombrelle con frutti maturi, Italia; **4** foglie e ombrelle fiorite, Portogallo; **5** foglie e ombrelle con frutti maturi, Portogallo.

RI (SPB-1)	RI (SuperW-10)	1	2	3	4	5	Compound
924	1029	-	-	0.1	-	-	α -Thujene
932	1028	1.3	1.4	1.3	30.3	33.3	α -Pinene
945	1074	-	0.1	0.1	-	-	Camphene
967	1125	12.0	12.1	13.9	1.0	2.5	Sabinene
973		0.4	0.3	0.6	19.1	21.9	β -Pinene
982	1159	1.1	2.2	2.2	0.5	0.8	Myrcene
1000	1169	1.0	1.3	1.8	-	-	α -Phellandrene
1006	1152	-	0.1	0.4	-	0.1	3-Carene
1014	1271	2.3	1.7	0.5	2.5	2.9	p-Cymene
1019	1205	0.5	0.9	5.2	-	0.1	Limonene
1024	1231	-	1.0	0.7	-	-	(Z)- β -Ocimene
1024	1215	53.0	64.9	65.1	5.7	6.9	β -Phellandrene
1037	1246	0.1	0.2	0.2	2.3	2.1	(E)- β -Ocimene
1049	1246	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5	γ -Terpinene
1080	1284	-	0.2	0.1	0.1	-	Terpinolene
1160	1592	0.2	0.3	0.1	0.4	0.1	Terpinen-4-ol
1370	2002	9.8	4.0	1.2	0.2	0.1	Methyl eugenol
1380	1535	0.1	0.4	0.2	0.4	0.2	β -Cubebene
1416	1593	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	(E)-Caryophyllene
1470	1698	0.4	0.4	0.3	24.6	18.2	Germacrene D
1481	1725	0.1	0.1	0.2	0.9	0.7	Bicyclogermacrene
1554	2110	-	-	0.3	0.2	0.1	Spathulenol
Total identified		82.6	91.8	94.8	88.4	90.8	
Per cent yield		0.6	0.4	2.7	0.1	1.1	
Notes: Compounds listed in order to their elution on the SPB-1 column.							

Tabella 23. Indici di ritenzione (RI) and aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli estratti ottenuti a 90 bar con CO₂ supercritica di *Bupleurum fruticosum*: **1** foglie, Italia; **2** foglie e ombrelle fiorite, Italia; **3** foglie e ombrelle con frutti maturi, Italia; **4** foglie e ombrelle fiorite, Portogallo; **5** foglie e ombrelle con frutti maturi, Portogallo.

Per quanto riguarda l'attività biologica antifunginea degli oli sardo e portoghese, la valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima letale (MLC) ha mostrato una certa variabilità della capacità di inibizione sui differenti funghi testati (tab. 24). L'olio sardo ha dimostrato di essere attivo contro *Cryptococcus neoformans*, con valori di MIC e MLC compresi tra 0.32-0.64 μ L/mL. Questo olio può essere utile per il controllo delle infezioni da criptococco. D'altro canto entrambe gli oli hanno mostrato una bassa attività contro i ceppi di *Candida* e *Aspergillus*, con valori di MIC compresi tra 10 ÷ 20 μ L/mL.

Strains	A Portugal		B Italy		Fluconazole		Amphotericin B	
	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC	MLC	MIC ^(b)	MLC ^(b)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5.0	5.0	1.25	2.5	1	>128	N.T ^(c)	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	5.0	5.0	5.0	5.0	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	5.0	5.0-10.0	2.5	2.5	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	2.5	2.5-5.0	2.5	2.5	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	5.0	2.5-5.0	2.5	5	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	1.25-0.64	1.25	0.32	0.64	16	128	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> FF7	2.5	2.5	2.5	5	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	1.25	1.25	1.25-2.5	1.25-2.5	128	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	1.25	1.25	1.25	1.25	16	64	N.T	N.T
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	2.5	2.5	2.5	5	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	1.25	2.5	1.25	1.25	16	16	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	10.0	>20	5-10	20	N.T	N.T	1-2	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	10-20	20	5-10	>20	N.T	N.T	2	4
<i>A. flavus</i> F44	>20	>20	10	>20	N.T	N.T	2	8
^a MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{L}/\text{mL}$ (V/V). ^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}$ (W/V). ^c Not tested. Results were obtained from 3 independent experiments performed in duplicate.								

Tabella 24. Attività antifunginea (MIC and MLC) degli estratti di *Bupleurum fruticosum* su lieviti e ceppi di dermatofyte e *Aspergillus*.

3.6.2. *Smyrniium olusatrum*

Sono state utilizzate le parti aeree di *Smyrniium olusatrum* L. La raccolta dei campioni è avvenuta nel corso di due diverse fasi vegetative: durante la fioritura (campioni 1, 3) e dopo la fruttificazione (campioni 2, 4). La raccolta è stata fatta da due siti diversi: Cerca de Santa Comba (Portogallo centrale) (campioni 1, 2) e Baunei (Sardegna, Italia) (campioni 3, 4). I quattro campioni sono stati sottoposti a estrazione mediante SC-CO₂ (SFE) e idrodistillazione (HD). La resa di estrazione degli HD è stata 0.4 % (fioritura) e 0.5 ÷ 0.6 % (fruttificazione), quella degli estratti SFE 1.4 % e 1.4 ÷ 2.2 % rispettivamente. Le composizioni degli estratti HD e SFE, ottenute mediante analisi GC-FID e GC-MS, sono riassunte nella tabella 25. I componenti sono elencati in base al loro ordine di eluizione su una colonna SPB-1.

Gli estratti HD portoghesi e sardi hanno mostrato una composizione estremamente differente; il β -felandrene è il componente principale dell'olio portoghese (fioritura 67.3 %; fruttificazione 42.7 %), mentre quello sardo è caratterizzato da α -pinene (fioritura 31.9 %; fruttificazione 1.2 %) e 1- β -acetoxifurano-4(15)-eudesmene (8.3 % fioritura; fruttificazione 17.6 %). Altri composti importanti presenti in entrambi gli oli sono: curzerene (5.2 ÷ 7.6 %; 8.1 ÷ 11 %), germacrene B (4.1 ÷ 6.0 %; 3.1 ÷ 4.5 %) e β -elemene (2.3 ÷ 2.2 %, 1.0 ÷ 2.0 %). 1- β -Acetoxifurano-3-eudesmene è un importante costituente solo dell'olio del Portogallo ottenuto dopo la fruttificazione (12.2 %), mentre il germacrone è un composto importante nei campioni sardi (5.7 ÷ 9.9 %). La composizione chimica dell'olio sardo è piuttosto diversa da quelli di altre origini [105-107], in particolare per quel che riguarda la quantità di α -pinene. I risultati hanno anche mostrato grandi variazioni nella composizione durante l'ontogenesi, in particolare la quantità di monoterpeni idrocarburici che si riduce significativamente negli oli ottenuti dalle piante raccolte dopo la fruttificazione.

Per quanto riguarda la composizione degli estratti SFE, tutti i campioni sono caratterizzati da un'alta percentuale di 1- β -acetoxifurano-4(15)-eudesmene (Portogallo: 53.4 ÷ 58.4 %; Sardegna: 54.6 ÷ 39.9 %) e alexandrofurano (21.9 ÷ 13.0 %; 16.3 ÷ 18.7 %), seguiti da β -phellandrene (8.1 ÷ 3.9 %; 7.6 ÷ 0.4 %) e curzerene (7.6 ÷ 8.3 %; 11.9 ÷ 17.7 %).

Dalla comparazione delle composizioni degli estratti HD e SFE si evidenzia una netta differenza di composizione: gli estratti HD sono più ricchi in monoterpeni idrocarburici, mentre gli SFE sono caratterizzati dai furano-sesquiterpenoidi. Questo risultato potrebbe essere spiegato in modo analogo a quanto già descritto per il *B. fruticosum*.

RI SPB1	RI S-W10	1-HD	1-FS	2-HD	2-FS	3-HD	3-FS	4-HD	4-FS	Compound
922	1029	tr	-	-	-	-	-	-	-	α -Thujene
932	1029	0.7	-	0.3	-	31.9	-	1.2	0.3	α -Pinene
945	1074	0.1	-	tr	-	-	-	-	-	Camphene
947	1127	-	-	-	-	0.9	-	-	-	Verbenene
967	1125	0.2	-	0.2	-	-	-	-	-	Sabinene
973	1115	0.2	-	0.1	-	3.2	-	-	-	β -Pinene
980	1290	-	-	tr	-	-	-	-	-	Octanal
983	1159	2.5	-	1.3	-	0.9	-	-	-	Myrcene
1001	1169	2.3	-	1.5	-	0.3	-	-	-	α -Phellandrene
1008	1159	0.6	-	-	-	-	-	-	-	δ -3-Carene
1014	1271	0.4	-	0.2	-	1.3	-	-	-	<i>p</i> -Cymene
1014	1184	0.1	-	0.3	-	-	-	-	-	α -Terpinene
1025	1215	67.3	8.1	42.7	3.9	8.8	7.6	-	0.4	β -Phellandrene
1025	1204	3.1	-	-	-	-	-	-	-	Limonene
1037	1248	0.5	-	0.3	-	-	-	-	-	<i>E</i> - β -Ocimene
1046		tr	-	tr	-	-	-	-	-	γ -Terpinene
1069		-	-	-	-	0.1	-	-	-	Cymenene
1076	1284	0.1	-	tr	-	-	-	-	-	Terpinolene
1079	1393	-	-	tr	-	-	-	-	-	Nonanal
1085	1539	0.3	-	0.6	-	0.3	-	-	-	Linalool
1105		tr	-	0.1	-	-	-	-	-	<i>Z</i> - <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol
1106	1486	-	-	-	-	0.6	-	0.6	-	α -Campholenal
1123		-	-	0.1	-	-	-	-	-	<i>E</i> - <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol
1124	1651	-	-	-	-	0.2	-	-	0.1	<i>Z</i> -Verbenol
1123	1643	-	-	-	-	0.5	-	1.2	-	<i>trans</i> -Pinocarveol
1129		-	-	-	-	1.1	-	1.3	-	<i>E</i> -Verbenol
1155	1632	0.5	-	-	-	0.3	-	-	-	Cryptone
1162	1837	-	-	-	-	0.3	-	-	-	<i>p</i> -Cymene-8-ol
1162	1591	0.1	-	0.2	-	0.3	-	-	-	Terpinene-4-ol
1161	1619	-	-	-	-	-	-	1.0	-	Myrtenal
1173	1700	0.2	-	0.3	-	0.3	-	0.4	-	α -Terpineol
1180	1694	-	-	-	-	0.7	-	1.2	-	Verbenone
1195		-	-	-	-	0.2	-	-	-	<i>trans</i> -Carveol
1213	1764	-	-	0.1	-	0.3	-	-	-	Citronellol
1213	1771	-	-	tr	-	0.4	-	-	-	Cuminaldehyde
1249	1706	-	-	tr	-	0.4	-	-	-	Phellandral
1267	1573	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-	Bornyl acetate
1333	1468	0.1	-	0.2	-	-	-	-	-	δ -Elemene
1334	1660	0.2	-	tr	-	0.7	-	1.8	-	Citronellyl acetate
1361		-	-	-	-	0.5	-	1.2	-	Geranyl acetate
1377		0.1	-	-	-	-	-	-	-	α -Elemene
1385	1585	2.3	1.1	2.2	1.5	1.0	1.9	2.0	1.1	β -Elemene
1410		t	-	0.1	-	0.6	-	0.8	-	<i>E</i> -Caryophyllene
1425		0.4	-	0.5	0.5	0.2	-	0.4	0.5	γ -Elemene
1445	1661	-	-	0.5	-	-	-	-	-	α -Humulene
1471	1700	1.8	-	2.4	0.6	1.3	-	-	1.4	Germacrene D
1480	1859	5.2	7.6	7.6	8.3	8.1	11.9	11.0	17.7	Curzerene
1494	1751	1.0	-	1.4	-	-	-	0.4	-	Germacrene A
1499	1719	-	-	-	-	-	-	2.3	0.2	β -Bisabolene
1511	1749	-	-	-	-	0.2	-	0.5	-	δ -Cadinene
1511	2216	-	-	-	-	-	-	1.1	-	Elemicin
1545	1816	4.1	1.3	6.0	-	3.1	2.2	4.5	1.7	Germacrene B
1562		-	-	-	-	1.5	-	1.7	-	Caryophyllene oxide

RI SPB1	RI S-W10	1-HD	1-FS	2-HD	2-FS	3-HD	3-FS	4-HD	4-FS	Compound
1562	1983	-	-	-	-	0.6	-	-	-	Salvial-4(14)-en-1-one
1570		-	-	-	-	1.3	-	1.1	-	E- β -Elemenone
1586		-	-	-	-	-	-	2.2	-	Humulene epoxide II
1607	2170	-	-	-	-	-	-	1.0	-	T-Muurolol
1620		-	-	2.9	-	-	-	-	-	Atractilone
1633		-	-	-	-	-	-	3.5	-	α -Cadinol
1665		-	-	-	-	5.7	-	9.9	-	Germacrone
1667		1.1	-	2.5	-	-	2.0	-	5.1	Hydroxy- eudesmadienolide
1879		0.4	21.9	0.6	13.0	-	16.5	1.0	18.7	Alexandrofuran
1955		3.4	53.4	-	58.4	8.3	54.6	17.9	39.9	1- β -acetoxyfurano- 4(15)-eudesmene
1967		0.2	1.8	12.2	-	-	1.7	-	-	1- β -acetoxyfurano-3- eudesmene

Note: Compounds listed in the order of their elution on the SPB-1 column. For component co-elute on the apolar column, and their relative percentages are measured on the polar column. tr, traces 50.1%; 1, unripe umbels, Portugal; 2, umbels containing ripe seeds, Portugal; 3, unripe umbels, Italy; and 4, umbels containing ripe seeds, Italy. ^aidentified by comparison of literature data (Baldovini et al., 2001; Molleken et al., 1998).

Tabella 25. Indici di ritenzione (RI) e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli estratti volatili ottenuti mediante idrodistillazione e SFE di *S. olusatrum* raccolto in Sardegna e in Portogallo.

L'attività antifunginea è stata valutata negli oli ottenuti dopo la fase di fruttificazione delle piante, dato il maggiore utilizzo delle stesse durante questa fase. La valutazione del MIC e MLC ha evidenziato che gli oli presentano differenti gradi di inibizione contro tutti i funghi studiati (tabella 26).

Cryptococcus neoformans e ceppi di dermatofiti hanno mostrato maggiore sensibilità (MIC valori di 0.32 ÷ 0.64 μ L/mL) a questi oli rispetto ai ceppi di *Candida* e *Aspergillus*. Questi oli potrebbero essere utilizzati a fini terapeutici, in particolare per il controllo di *C. neoformans* e per il trattamento delle infezioni superficiali della pelle, capelli e unghie causate da funghi dermatofiti.

Strains	Sample 2 (Portugal)		Sample 4 (Italy)		Fluconazole		Amphotericin B	
	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC	MLC	MIC ^(b)	MLC ^(b)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20	>20	20	>20	1	>128	N.T ^(c)	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	20	>20	>20	>20	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	10	≥20	5	>20	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	10	>20	5	>20	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	10	>20	5	>20	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	0.32	0.64	0.64	0.64	16	128	N.T	N.T
<i>Trichophyto mentagrophytes</i> FF7	0.32	0.64	0.32	0.64-1.25	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	0.64	0.64	0.32	0.64	128	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0.32	0.32	0.32	0.64-1.25	16	64	N.T	N.T
<i>Microsporum gypseum</i> CECT 2905	0.64	0.64-1.25	0.64	0.64	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0.32	0.64	0.32	0.32	16	16	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	20	>20	10	>20	N.T	N.T	1-2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 46645	20	20	10	20	N.T	N.T	2	4
<i>Aspergillus flavus</i> F44	>20	>20	>20	>20	N.T	N.T	2	8

Note: Results were obtained from 3 independent experiments performed in duplicate. ^c Not tested. ^a MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{L}/\text{mL}(\text{V}/\text{V})$. ^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}(\text{W}/\text{V})$.

Tabella 26. Attività antifungina (MIC and MLC) degli estratti di *Smyrniium olusatrum* su lieviti e ceppi di dermatophyte e *Aspergillus*.

3.6.3. *Calamintha nepeta*

Gli estratti, mediante SC-CO₂ e idrodistillazione, sono stati ottenuti utilizzando le parti aeree della pianta raccolte nella fase di fioritura in due siti diversi: Vilarinho de Baixo (Coimbra, Portogallo) e Baunei (Sardegna, Italia). Sono stati identificati, mediante GC-FID e GC-MS, 41 composti (pari al 82.3 ÷ 96.2 % del totale) e i risultati sono riassunti nella tabella 27 in base all'ordine di eluizione dei componenti su una colonna SPB-1.

Entrambe gli oli essenziali ottenuti dalla *C. nepeta* sarda (Italy) sono caratterizzati da alto contenuto di pulegone (64.4 ÷ 39.9 %), piperitenone (6.4 ÷ 7.7 %), e di piperitenone ossido (2.5 ÷ 19.1 %). Altri composti presenti sono il limonene (4.8 ÷ 2.8 %), mentone (2.8 ÷ 2.5 %) e isomenthone (1.9 ÷ 2.0 %). La composizione chimica degli oli ottenuti dalla *C. nepeta* portoghese (Portugal) è risultata essere molto diversa da quelle di quella italiana. I componenti caratterizzanti sono: isomenthone (35.8 ÷ 51.3 %), 1,8-cineolo (21.1 ÷ 21.4 %) e trans-isopulegone (7.8 ÷ 6.0 %). Altri composti sono: neo-iso-pulegol (4.1 ÷ 1.4 %), neo-iso-mentolo (3.1 ÷ 3.9 %), pulegone (2.7 ÷ 2.4 %), e β-pinene (2.3 ÷ 1.5 %). In figura 43 è riportato un grafico comparativo relativo alla composizione dei 4 estratti.

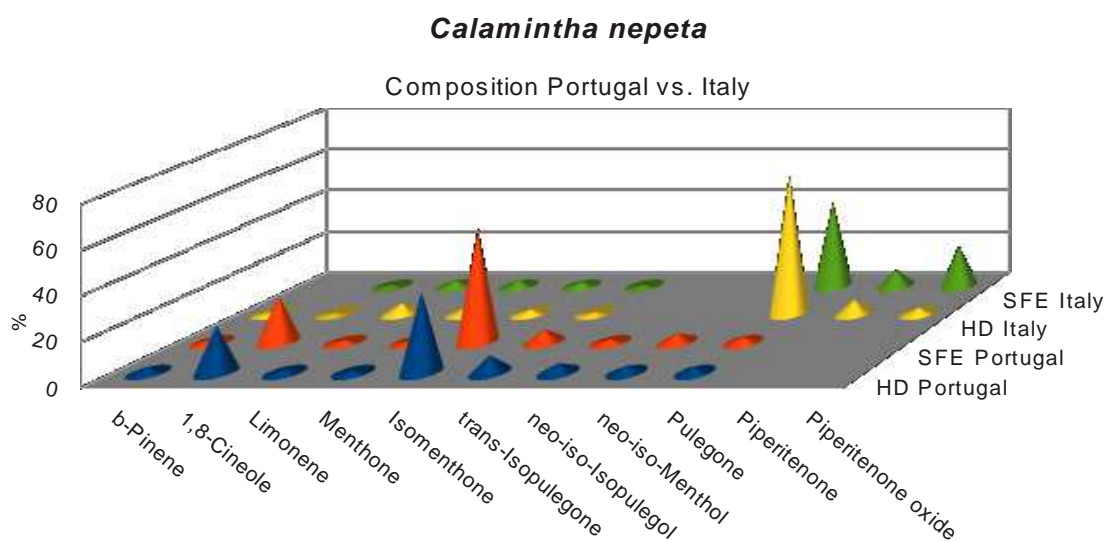


Figura 43. Confronto della composizione percentuale per i principali componenti degli oli essenziali di *Calamintha nepeta* HD, SFE, ottenuti da piante raccolte in Portogallo e in Italia.

Dall'analisi dei risultati ottenuti emerge chiaramente la presenza di un notevole polimorfismo chimico; infatti anche i dati della letteratura [108] evidenziano una variabilità della composizione chimica anche legata alla zona d'origine delle piante. L'olio essenziale ottenuto da *C. nepeta* raccolta in Sardegna, caratterizzato da pulegone e piperitenone ossido, presenta una composizione molto simile agli oli essenziali ottenuti da *C. nepeta* raccolta in Corsica [109]. La composizione chimica dell'olio portoghese è piuttosto diversa da quella sarda e dalle altre riportate in letteratura; infatti, sembrerebbe che si tratti di un nuovo chemotipo caratterizzato da elevate quantità di isomentone e 1,8-cineolo e da piccole quantità di pulegone.

Rispetto alla tecnica di estrazione, la composizione dell'estratto volatile portoghese (SFE) è simile alla composizione dell'olio essenziale (HD): si differenziano solo per la percentuale più alta di isomentone (51.3 vs 35.8 %, HD); mentre l'estratto volatile sardo (SFE) presenta una composizione differente rispetto all'olio essenziale (HD): è più ricco di piperitenone ossido (19.1 vs 2.5 %, HD) e più povero in pulegone (39.9 vs 64.4 %, HD). Infatti, essendo il piperitenone ossido (PO), un composto moderatamente polare la sua solubilità in acqua non è trascurabile [110]. Il PO è preferenzialmente sciolto nell'acqua e quindi non pienamente recuperato nell'olio; quindi l'olio HD, per effetto di bilanciamento, contiene una percentuale più elevata di pulegone. Si può affermare che l'estratto volatile (SFE), rispetto all'olio essenziale (HD), è quello che meglio riproduce la proporzione originale dei componenti rispetto al materiale di partenza.

Dal punto di vista dell'attività biologica antifunginea, la valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima letale (MLC) ha dimostrato che l'olio sardo è più attivo che quello portoghese, con valori di MIC che vanno 0.32 ÷ 1.25 µL/mL (tabella 28). Valori di MIC e MLC simili, ottenuti per *Candida* e dermatofiti, indicano una attività fungicida dell'olio. La più alta attività antifunginea dell'olio sardo può essere associato con il contributo del pulegone. Altri oli ricchi di pulegone, come *Mentha pulegium* e *Mentha cervina*, hanno presentato una significativa attività antifungina [111]. L'olio sardo con elevata quantità di pulegone (64.4 %) potrebbe essere utilizzato a per scopo terapeutico, in particolare nel trattamento delle dermatofitosi e aspergillosi.

RI (SPB-1)	RI (SuperW-10)	1	2	3	4	COMPOUND
932		1.1	0.6	0.7	-	α -Pinene
945		0.1	0.1	0.1	-	Camphene
966	1126	1.4	1.1	0.3	-	Sabinene
972	1117	2.3	1.5	0.7	-	β -Pinene
980	1385	0.2	0.2	2.2	1.9	3-Octanol
983	1161	1.2	0.5	0.1	-	Myrcene
1014	1272	0.1	-	0.2	0.3	<i>p</i> -Cymene
1023	1213	21.1	21.4	0.3	0.4	1,8-Cineole
1023	1205	1.6	1.1	4.8	2.8	Limonene
1027	1232	0.5	-	0.2	-	<i>Z</i> - β -Ocimene
1037	1248	0.1	-	-	-	<i>E</i> - β -Ocimene
1049	1248	0.1	-	-	-	γ -Terpinene
1053	1461	0.1	0.4	0.1	-	<i>trans</i> -Sabinene hydrate
1076	1286	0.1	-	-	-	Terpinolene
1084	1540	0.1	0.1	-	-	<i>cis</i> -Sabinene hydrate
1084	1539	0.2	0.16	0.7	0.4	Linalool
1132	1461	0.8	0.8	2.8	2.5	Menthone
1144	1557	0.3	-	-	-	<i>neo</i> -Isopulegol + <i>iso</i> -Isopulegol
1141	1488	35.8	51.3	1.9	2.0	Isomenthone
1149	1578	1.4	0.6	0.4	0.3	<i>cis</i> -Isopulegone
1149	1567	7.8	6.0	0.5	0.5	<i>trans</i> -Isopulegone
1151	1594	0.7	-	-	-	<i>neo</i> -Menthol
1151	1662	0.8	1.1	-	-	δ -Terpineol
1156	1631	-	-	-	0.3	Menthol
1161	1594	-	-	0.4	0.2	Terpinene-4-ol
1161	1600	4.1	1.4	-	-	<i>neo-iso</i> -Isopulegol
1168	1620	3.1	3.9	-	-	<i>neo-iso</i> -Menthol
1172	1690	0.6	0.9	0.3	-	α -Terpineol
1172	1657	0.2	-	-	-	<i>iso</i> -Menthol
1216	1642	2.7	2.4	64.4	39.9	Pulegone
1225	1720	-	-	0.4	2.2	<i>cis</i> -Piperitone oxide
1225	1716	0.1	-	0.5	1.0	Piperitone
1228	1701	-	-	0.2	-	<i>trans</i> -Piperitone oxide
1254		-	-	0.3	-	Isopulegyl acetate
1308	1907	-	-	6.4	7.7	Piperitenone
1330	1943	-	-	2.5	19.1	Piperitenone oxide
1413	1594	0.4	0.2	0.2	-	<i>E</i> -Caryophyllene
1471	1701	0.3	-	0.1	-	Germacrene D
1562	1967	-	0.6	0.2	0.8	Caryophyllene oxide
Total identified		89.1	96.2	91.6	82.3	
Per cent yield		2.9	3.4	3.0	3.8	

Tabella 27. Composizione percentuale (area cromatografica), indici di ritenzione (RI) e resa di estrazione degli oli essenziali di *Calamintha nepeta*: **1** HD Portogallo; **2** SFE Portogallo; **3** HD Italia; **4** SFE Italia; I composti sono elencati in base all'ordine di eluizione su colonna SPB-1.

Strains	Portugal		Italy		Fluconazole		Amphotericin B	
	1	3	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC	MLC	MIC ^(b)	MLC ^(b)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2.5	2.5	1.25	1.25	1	>128	N.T ^(c)	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2.5	2.5	1.25	1.25	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	2.5	2.5	1.25	1.25	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	2.5	2.5	1.25	1.25	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2.5	5	1.25	2.5	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	1.25	1.25	0.32-0.64	1.25	16	128	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> FF7	5	5	0.64	1.25	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	2.5	2.5	0.64	0.64	128	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	2.5-5	2.5-5	0.64	1.25	16	64	N.T	N.T
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	5	5	1.25	1.25	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	2.5	2.5	0.64	0.64	16	16	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	5-10	>20	0.32	5	N.T	N.T	1-2	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	5	10	0.64	2.5	N.T	N.T	2	4
<i>A. flavus</i> F44	10	20	1.25	2.5	N.T	N.T	2	8

Note: Results were obtained from 3 independent experiments performed in duplicate. ^a MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{L}/\text{mL}(\text{V}/\text{V})$. ^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}(\text{W}/\text{V})$. ^c Not tested.

Tabella 28. Attività antifunginea (MIC and MLC) degli estratti di *Calamintha nepeta* su lieviti e ceppi di dermatophyte e *Aspergillus*.

3.6.4. *Achillea millefolium*

Sono state utilizzate le parti aeree di *Achillea millefolium* raccolte in due siti diversi: Sadali (Sardegna, Italia) e Serra de Montemuro (Portogallo centrale). I campioni sono stati sottoposti a estrazione mediante SC-CO₂ (SFE) e idrodistillazione (HD). La resa di estrazione degli HD è stata 0.4 % (Portogallo) e 0.9 % (Sardegna), quella degli estratti SFE 0.7 %. Le composizioni degli estratti HD e SFE, ottenute mediante analisi GC-FID e GC-MS, sono riassunte nella tabella 29. I componenti sono elencati in base al loro ordine di eluizione su una colonna HP5.

Gli estratti ottenuti per SFE e HD hanno composizione qualitativamente comparabile, anche se i componenti sono presenti in differenti proporzioni. Gli estratti volatili ottenuti dall'*Achillea millefolium* sarda sono caratterizzati da un alto contenuto di α -asarone (25.6 ÷ 33.3 %, SFE e HD rispettivamente), β -bisabolene (27.3 ÷ 16.6 %) and α -pinene (10.0 ÷ 17.0 %). Gli estratti ottenuti dalla pianta portoghese, presentano una composizione alquanto differente e hanno come principali componenti: trans-thujone (31.4 ÷ 29.0 %), trans-crysanthenyl acetato (19.8 ÷ 15.8 %) e β -pinene (1.2 ÷ 11.1 %).

I risultati ottenuti (figura 44) evidenziano per l'*Achillea millefolium* sarda e portoghese l'appartenenza a due chemotipi differenti non riconducibili a nessuno, del pur elevato numero, dei chemotipi di *A. millefolium* di altri paesi già presenti in letteratura [112-114].

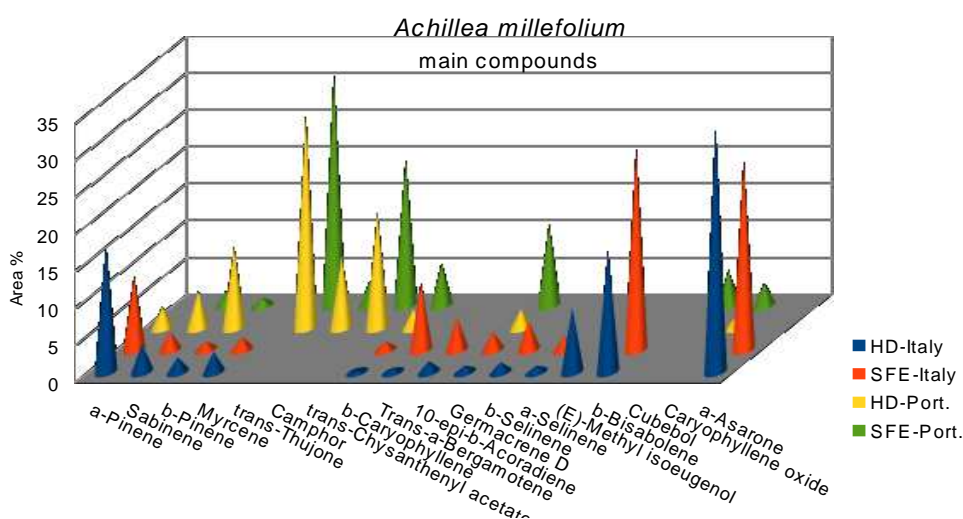


Figura 44. Confronto della composizione percentuale per i principali componenti degli oli essenziali di *A. millefolium* HD, SFE Portogallo e Italia.

È evidente una grande variabilità della composizione chimica dovuta all'elevato numero di chemotipi presenti in natura. Ai fini dello sfruttamento massivo in campo medicinale è necessaria un'attenta opera di selezione dei chemotipi più pregiati.

RI	HD-1	SFE-1	HD-2	SFE-2	Compound
930	0.2	tr.	-	-	α -Thujene
938	17.2	10.0	2.9	tr.	α -Pinene
953	0.7	0.5	0.9	tr.	Camphene
976	3.9	2.5	5.0	2.1	Sabinene
980	2.1	1.2	11.1	1.2	β -Pinene
992	2.8	1.8	-	-	Myrcene
1019	0.4	-	0.4	-	α -Terpinene
1027	0.4	tr.	1.0	1.2	ortho-Cymene
1031	1.4	1.5	0.8	tr.	Limonene
1032	1.5	1.4	-	-	β -Phellandrene
1034	-	-	1.6	1.0	1,8-Cineole
1062	0.7	tr.	0.9	tr.	γ -Terpinene
1100	0.3	tr.	tr.	tr.	Linalool
1116	-	-	29.0	31.4	trans-Thujone
1123	-	-	0.5	tr.	Cis-p-Menth-2-en1-ol
1127	-	-	tr.	1.0	Chrysanthenone
1147	-	-	9.7	3.3	Camphor
1167	-	-	1.6	tr.	Borneol
1179	1.4	tr.	1.5	tr.	Terpinen-4-ol
1191	tr.	-	0.5	tr.	α -Terpineol
1238	-	-	15.8	19.8	trans-Chysanthenyl acetate
1286	0.4	0.7	1.5	tr.	Bornyl acetate
1293	-	-	0.8	1.1	Thymol
1376	tr.	tr.	tr.	0.9	α -Copaene
1410	tr.	0.5	-	-	α -Cedrene
1419	0.3	1.1	2.6	5.7	β -Caryophyllene
1436	0.4	9.1	-	-	trans- α -Bergamotene
1454	0.9	1.0	tr.	tr.	α -Humulene
1459	0.4	0.8	0.6	2.0	trans- β -Farnesene
1474	1.6	4.4	-	-	10-epi- β -Acoradiene
1481	0.9	2.5	2.5	11.0	Germacrene D
1485	1.4	3.9	-	-	β -Selinene
1494	0.9	2.0	-	-	α -Selinene
1498	8.8	tr.	-	-	(E)-Methyl isoeugenol
1509	16.6	27.3	tr.	tr.	β -Bisabolene
1514	tr.	tr.	tr.	4.8	Cubebol
1523	tr.	tr.	1.1	2.3	δ -Cadinene
1565	-	-	0.7	2.6	(E)-Nerolidol
1575	tr.	tr.	tr.	0.8	Germacrene D-4-ol
1581	-	-	1.7	3.0	Caryophyllene oxide
1628	-	-	1.3	1.6	1-Epi-cubenol
1635	-	-	1.2	1.8	Caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5-a-ol
1640	-	-	2.2	1.4	α -Muurolol
1681	33.3	25.6	-	-	α -Asarone

Tabella 29. Indici di ritenzione (RI) e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli estratti di *Achillea millefolium* ottenuti mediante SFE a 90 bar 40°C: Sadali (SFE-1); Serra de Montemuro (SFE-2); mediante idrodistillazione: Sadali (HD-1); Serra de Montemuro (HD-2).

Per quanto riguarda l'attività biologica antifunginea (tabella 30) degli oli sardo e portoghese, la valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della concentrazione minima letale (MLC), questi hanno mostrato una capacità di inibizione verso i ceppi di dermatophyte con MIC compresi tra 0.32 ÷ 1.25 µL/mL.

Strains	Portugal		Italy		Fluconazole		Amphotericin B	
	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC ^(a)	MLC ^(a)	MIC ^(b)	MLC ^(b)	M	MLC ^(c)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2.5	2.5	2.5	2.5-5	1	>128	N.T	N.T
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	2.5	2.5	2.5	5	4	>128	N.T	N.T
<i>Candida krusei</i> H9	2.5	2.5	2.5	5	64	64-128	N.T	N.T
<i>Candida guilliermondii</i> MAT23	1.25	1.25	1.25	2.5	8	8	N.T	N.T
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2.5	2.5	2.5	≥20	<1	<1	N.T	N.T
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1078	1.25	1.25	0.64	1.25	16	128	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> FF7	0.64	0.64	0.32	0.64	16-32	32-64	N.T	N.T
<i>Microsporum canis</i> FF1	0.32	0.32	0.64	0.64-1.25	128	128	N.T	N.T
<i>Trichophyton rubrum</i> CECT 2794	0.32	0.64	0.32	1.25	16	64	N.T	N.T
<i>M. gypseum</i> CECT 2905	0.64	0.64	0.64	0.64-1.25	128	>128	N.T	N.T
<i>Epidermophyton floccosum</i> FF9	0.64	0.64	0.64	0.64	16	16	N.T	N.T
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> CECT 2958	0.64	1.25	0.64	1.25	128	≥128	N.T	N.T
<i>T. verrucosum</i> CECT 2992	1.25	1.25	0.64	1.25	>128	>128	N.T	N.T
<i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	5	>20	1.25	>20	N.T	N.T	1-2	4
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645	2.5-5	>20	1.25	>20	N.T	N.T	2	4
<i>A. flavus</i> F44	10	>20	1.25	>20	N.T	N.T	2	8

Note:^a MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in µl/ml (V/V). ^b MIC and MLC were determined by a macrodilution method and expressed in µg/ml (W/V). ^c Not tested. Results were obtained from 3 independent experiments performed in duplicate

Tabella 30. Attività antifunginea (MIC and MLC) degli estratti di *Achillea millefolium* su lieviti e ceppi di dermatophyte e *Aspergillus*.

3.7. Oltre la Sardegna

Durante l'attività di ricerca non ci si è limitati allo studio piante raccolte in Sardegna e del confronto con alcune omologhe raccolte in Portogallo, ma ci si è rivolti anche all'area del Maghreb, Tunisia ed Algeria, fino ad arrivare allo Yemen nella penisola arabica. Sono state studiate le seguenti matrici vegetali: *Juniperus phoenicea* e *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* e ssp. *rufescens* (Tunisia), *Laurus nobilis* (Tunisia ed Algeria), *Daucus carota* (Tunisia) e *Stachys yemenensis* (Yemen).

Il ginepro, molto diffuso nell'area mediterranea, è presente con circa 70 specie; piante raccolte in Sardegna sono già state oggetto di precedenti studi del nostro gruppo di ricerca [35,120-121]. Lo scopo di questa parte della ricerca è stato di investigare la composizione chimica e l'attività biologica antiossidante degli oli essenziali estratti da bacche, raccolte in Tunisia, da differenti specie di *Juniperus* [22,23].

L'alloro (*Laurus nobilis* L.) è un'importante pianta utilizzata come aromatica e medicinale, il lavoro di ricerca realizzato [21], a completamento di un ampio programma di ricerca sul *Laurus* tunisino [115,116], ha messo a confronto la composizione chimica e l'attività biologica antifunginea di oli essenziali ottenuti da piante raccolte in Tunisia ed Algeria.

Il *Daucus carota* ssp. *carota* (Apiaceae), diffusa in Europa, Africa e Asia, è una pianta utilizzata nella medicina tradizionale per la cura delle insufficienze epatiche e renali. Piante raccolte in Sardegna sono state oggetto di precedenti studi del nostro gruppo di ricerca [117]. In questa parte del lavoro di ricerca [24] si è studiata la composizione chimica e l'attività biologica antibatterica e antifunginea degli estratti ottenuti da piante raccolte in Tunisia in differenti siti e stadi vegetativi.

Il genere *Stachys* è presente in natura con oltre 200 specie. Lo studio realizzato [25], primo in assoluto sulla specie *S. yemenensis*, ha evidenziato la composizione chimica e l'attività biologica antibatterica e antifunginea dei differenti estratti ottenuti.

3.7.1. *Juniperus tunisino*

3.7.1.1. *Juniperus phoenicea*

Le bacche mature e immature di *J. phoenicea* sono state raccolte in Tunisia in tre siti distinti. Gli oli essenziali sono stati ottenuti per idrodistillazione in apparato Clevenger secondo F.U., la resa di estrazione ha mostrato ampia variabilità (2 ÷ 7 %) in relazione sia allo stato di maturazione delle bacche (le bacche immature mostrano rese maggiori in quanto con la maturazione parte dei componenti l'olio essenziale va a costituire la resina della pianta [118]), che alla zona geografica di provenienza; in generale le rese ottenute appaiono maggiori rispetto a quanto già riportato in letteratura [119].

La caratterizzazione chimica degli oli essenziali ottenuti è stata realizzata mediante GC-MS, sono stati identificati 42 componenti (96.5 ÷ 99.5 % del totale rilevato). In tabella 31 sono riportati i risultati dell'analisi GC-MS.

Tutti gli oli essenziali ottenuti sono costituiti per la maggior parte da monoterpeni idrocarburici (74.0 ÷ 89.8 %) la cui concentrazione si riduce leggermente nelle bacche immature. I monoterpeni ossigenati sono presenti in modesta quantità nelle bacche mature (3.3 ÷ 5.7 %), mentre la loro presenza è notevolmente maggiore nelle bacche immature (17.5 % Rimel, 12.6 % J. Mansour). I sesquiterpeni ossigenati sono presenti significativamente solo nelle bacche raccolte a Rimel (9.2 % mature e 3.8 % immature).

Il componente principale in tutti gli oli è α -pinene (58.6 ÷ 77.3 %), altri componenti rilevati: camphene (0.6 ÷ 9.3 %), Δ -3-carene (0 ÷ 10.0 %) e trans-verbenol (0 ÷ 5.2 %). Le differenze rilevate nella composizione degli oli estratti dalle bacche provenienti dai diversi siti potrebbero essere correlate alle particolari condizioni ambientali e/o alla differente chemotassonomia delle piante di *J. phoenicea*.

I dati ottenuti sostanzialmente concordano con quanto emerso in altri studi su *Juniperus* proveniente dalla Sardegna [35,120-121] dove il componente maggioritario risulta sempre essere α -pinene.

Compounds	KI kovats	Ripe berries			Unripe berries		
		Rimel	Makthar	J. Mansour	Rimel	Makthar	J. Mansour
Tricyclene	926	-	-	-	0.3	-	-
α -pinene	939	63.4	69.5	77.3	58.6	63.1	68.3
Camphene	953	1.1	9.3	0.6	6.4	0.9	0.6
Verbenene	967	-	0.3	0.5	1.2	-	0.6
Sabinene	976	-	0.3	-	0.3	2.4	0.6
β -pinene	980	2	2.1	2.5	3.4	2.2	1.9
Myrcene	991	1.1	2.1	1.6	0.9	-	1.3
α -phellandrene	1005	-	-	-	0.1	-	-
δ -3-carene	1011	10	1.2	3.7	-	7.8	2
p-cymene	1026	0.9	0.7	1.1	0.4	0.7	0.6
β -phellandrene	1031	0.9	1.7	2.5	1.9	2.3	2.2
<i>Terpinolene</i>	1088	-	-	-	0.5	-	-
α -campholenal	1125	1	0.8	1.2	2.3	0.8	2
Trans-pinocarveol	1139	1.5	0.7	1.5	3.5	1.2	3.1
Cis-verbenol	1140	-	-	1.6	0.6	-	0.8
<i>Trans-verbenol</i>	1144	2.4	1.1	-	3.3	2.8	5.2
<i>Trans-pinocamphone</i>	1160	-	-	-	0.2	-	-
<i>Pinocrovone</i>	1162	-	-	-	0.2	-	-
<i>P-mentha-,5-dien-8-ol</i>	1166	0.8	0.7	0.9	3	0.8	1.5
Terpinen-4-ol	1177	-	-	-	0.2	-	-
<i>m-cymen-8-ol</i>	1180	-	-	-	0.4	-	-
α -terpineol	1189	-	-	-	0.3	-	-
<i>Myrtenal</i>	1193	-	-	-	1.2	-	-
Verbenone	1204	-	-	-	1.3	-	-
Trans-carveol	1217	-	-	-	1	-	-
Isobornyl acetate	1285	-	-	-	1	-	-
<i>α-terpinyl acetate</i>	1298	1.7	1.7	1.3	1	3.9	-
(E)-caryophyllene	1418	1.1	1.8	0.8	-	2.4	0.5
α -humulene	1454	0.6	0.9	-	-	1.2	-
<i>γ-muurolene</i>	1477	0.9	1.2	-	-	-	-
β -dihydro agarofuran	1496	-	-	-	0.2	-	-
Cis-calamenene	1521	-	0.5	-	-	-	-
α -cadinene	1538	-	-	-	0.4	-	-
<i>Occidentalol</i>	1548	0.7	-	-	0.2	-	-
Germacrene B	1556	-	0.5	-	-	1.4	-
Caryophyllene oxide	1581	3.5	1.1	1.5	1.7	1.7	1.6
Humulene epoxide II	1606	1.4	-	-	0.2	-	-
1,10-di-epi-cubenol	1614	0.9	-	-	0.6	-	-
α -cadinol	1653	1.8	-	-	0.3	-	-
Acorenone	1685	0.9	-	-	-	-	-
Sandracopimara-8(14)15-diene	1960	-	-	-	0.6	-	-
abietadiene	2080	-	-	-	0.3	-	-
Total Identified		98.6	98.2	98.6	98	95.6	92.8
Hydrocarbon Monoterpenes		79.4	87.2	89.8	74	79.4	78.1
Oxygenated Monoterpenes		5.7	3.3	5.2	17.5	5.6	12.6
Hydrocarbon Sesquiterpenes		2.6	4.9	0.8	0.4	5	0.5
Oxygenated Sesquiterpenes		9.2	1.1	1.5	3.8	1.7	1.6

Tabella 31. Composizione percentuale degli oli essenziali ottenuti da bacche di *J. phoenicea*.

L'attività biologica antiossidante degli estratti di *J. phoenicea* è stata valutata rispetto alla capacità di contrasto dei radicali liberi (free radical scavenger); infatti è ormai assodato che i radicali liberi sono coinvolti nel processo di perossidazione lipidica, svolgono un ruolo cardine in numerose malattie croniche e sono implicati nei processi di invecchiamento precoce.

L'attività è stata misurata utilizzando i test DPPH e ABTS.

Quando una soluzione di DPPH è miscelata con un antiossidante che può donare un atomo di idrogeno, ha luogo la riduzione alla forma di difenilpicrilidrazina (non radicale) con la scomparsa della colorazione viola [122]. In tabella 32 sono riportati i dati ottenuti, bassi valori di IC₅₀ indicano una maggiore attività antiossidante. Gli oli essenziali estratti dalle bacche acerbe hanno mostrato minore attività antiossidante di quelli maturi. L'attività antiossidante maggiore è stata riscontrata negli oli essenziali provenienti dalle bacche raccolte a Makthar (72,6 % immature - 66,3 % mature), mentre negli altri casi l'attività riscontrata è più debole.

locations	Ripe berries			Unripe berries		
	Rimel	Makthar	J. Mansour	Rimel	Makthar	J. Mansour
IC ₅₀ (µg/ml)	136.1	72.6	160.1	109.8	66.3	94.7

Tabella 32. Valori di IC₅₀ per l'attività antiradicalica DPPH degli oli essenziali ottenuti da bacche di *J. phoenicea* raccolte in Tunisia

Si è ritenuto opportuno valutare il potere antiossidante degli oli estratti anche mediante il test ABTS (da preferirsi se con DPPH sorgono problemi di solubilità e/interferenze [123]). La diminuzione della concentrazione ABTS⁺, misurata con la riduzione della colorazione blu, è linearmente dipendente dalla capacità antiossidante; viene utilizzato il Trolox come standard di calibrazione. I risultati ottenuti (tabella 33) hanno rivelato che gli oli estratti dalle bacche mature hanno mostrato una buona capacità antiossidante con IC₅₀ 0.5 mg/ml, 0.4 mg/ml e 0.5 mg/ml (J. Mansour, Makthar e Rimel rispettivamente), mentre gli oli essenziali raccolti dalle bacche immature si sono mostrati meno efficaci (1.9 mg/ml, 1.0 mg/ml e 2.0 mg/ml). I dati ottenuti con ABTS sono in sostanziale accordo con i risultati del test DPPH.

Concentrations	Ripe berries			Unripe berries		
	Rimel	Makthar	J. Mansour	Rimel	Makthar	J. Mansour
0.625	20.3	40.3	33.3	80.9	87.1	73.3
1.25	40	55.1	42.2	86.2	87.5	85.7
2.5	58.9	62.7	55.3	87.9	90.3	86.3
5	62.1	75.4	68.3	90.8	92.4	89.2
7.5	67.6	82.3	78.5	92.1	95.2	93.8
12	73.5	87.3	82.8	94.3	98.3	93.8
20	82.8	92.2	87.8	98.1	99.9	95.1
IC ₅₀	1.9	1	2	0.5	0.4	0.5
TEA (Mm)	0.8	1.1	0.8	1.8	2	1.8

Tabella 33. Attività antiradicalica ABTS⁺ degli oli essenziali ottenuti da bacche di *J. phoenicea* raccolte in Tunisia

In conclusione possiamo affermare che gli oli essenziali estratti da bacche di *J. phoenicea* raccolte in Tunisia hanno mediamente presentato un buon potere antiossidante di contrasto ai radicali liberi; le variazioni delle attività riscontrate potrebbero essere attribuite a tre fattori principali: genetici, stadio vegetativo, e fattori ambientali (es. suolo e clima) [124].

3.7.1.2. *Juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* e ssp. *rufescens*

Le bacche mature e immature di *J. oxycedrus* sono state raccolte in Tunisia in due siti distinti per ciascuna sottospecie. Gli oli essenziali sono stati ottenuti per idrodistillazione in apparato Clevenger secondo F.U.

La caratterizzazione chimica degli oli essenziali ottenuti è stata realizzata mediante GC-MS e i risultati sono indicati in tabella 34. Di 51 componenti rilevati, 48 sono stati identificati (78.9 ÷ 98.9 % del totale). Gli oli essenziali di *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* (località Dkhila e Kbouche) sono costituiti principalmente da monoterpeni idrocarburi (49.0 % e 47.7 %) e gli idrocarburi sesquiterpenici (32.0 % e 39.6 %). I monoterpeni ossigenati risultano assenti nel campione proveniente da Kbouche e solo con 1.7 % nel campione proveniente da Dkhila. Gli oli essenziali di *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (loc. Tabarka e Hawaria) sono composti principalmente da monoterpeni idrocarburi (46.9 % e 65.7 % rispettivamente).

I componenti principali degli oli provenienti da Dkhila e Kbouche sono: α -pinene, germacrene D, mircene, abietadiene e cis-calamenene. α -pinene è maggiormente presente nell'olio proveniente da Dkhila (42.1 % vs 37.6%) mentre quello di Kbouche è più ricco di germacrene D (31.1 % vs 23.7 %). Gli oli essenziali di *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* oli sono caratterizzati da α -pinene, germacrene D e cis-calamenene.

I campioni provenienti da Hawaria sono più ricchi in α -pinene, germacrene D, mentre registrano valori relativamente bassi, confrontati con campioni provenienti da Tabarka, di cis-calamenene.

Rispetto allo stato di maturazione delle bacche, con l'avanzare della maturazione si registrano variazioni nella composizione: es. un aumento di α -pinene: Hawaria (57.5 ÷ 54.1 %) e Tabarka (37.9 ÷ 47.4 %) e analogamente per Germacrene D (7.6 ÷ 15 %) e (4 ÷ 22.7 %). Alcuni componenti minori hanno presentato un comportamento differente tra i due siti.

Gli oli essenziali delle due sottospecie hanno rivelato un'ampia variazione della composizione chimica e nel numero di componenti rilevati. Sinteticamente possiamo affermare che gli oli di *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* sono più ricchi in α -pinene, mentre quelli di *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* sono più ricchi in germacrene D.

Dal confronto con la letteratura si evince che l'olio tunisino ottenuto da bacche di *J. oxycedrus* presenta molte differenze. L'olio da bacche di *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* raccolte in Spagna, è caratterizzato da α -pinene (60.6 %) e mircene (24.9 %) [125]; quello ottenuto da bacche raccolte in Sardegna [126] è caratterizzato soprattutto da α -pinene (84.5 %), Δ -3-carene (3.6 %), limonene (2.5 %) e myrcene (2.1 %).

Gli oli da bacche di *J. oxycedrus* ssp. *badia* [128] sono caratterizzati da elevate quantità di α -pinene (61.5 ÷ 59.8 %) e mircene (18.6 ÷ 18.5 %) e minore quantità di germacrene D.

I risultati ottenuti sottolineano che *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* e *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* sono taxa distinti da *J. oxycedrus* ssp. *badia* e *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus*.

No.	Compounds	KI	Unripe berries				Ripe berries	
			<i>J.oxycedrus</i> ssp. <i>rufescens</i>		<i>J.oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>		<i>J.oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>	
			Kbouche	Dkhila	Hawaria	Tabarka	Hawaria	Tabarka
1	α -Pinene	939	37.6	42.1	57.5	37.9	61.1	47.4
2	Camphene	953	0.3	–	0.5	0.4	0.5	0.3
3	Sabinene	976	0.3	–	–	–	0.3	0.2
4	β -Pinene	980	1.4	1.2	2.3	1.7	2.5	1.6
5	Myrcene	991	6.4	4.0	2.5	1.5	2.8	1.9
6	α -Phellandrene	1005	1.3	1.3	–	0.3	–	–
7	<i>p</i> -Cymene	1026	–	–	0.8	1.1	0.2	–
8	β -Phellandrene	1031	–	–	2.1	3.4	1.8	1.5
9	1,8-Cineol	1033	–	–	–	–	0.2	–
10	Terpinolene	1088	0.4	0.4	–	0.6	0.8	0.6
11	α -Campholenal	1125	–	–	0.7	1.6	–	–
12	<i>trans</i> -Pinocarveol	1139	–	–	0.6	1.0	–	0.2
13	<i>trans</i> -Verbenol	1144	–	–	–	0.6	0.2	–
14	<i>para</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1166	–	–	–	0.9	–	–
15	<i>meta</i> -Cymen-8-ol	1180	–	–	–	0.6	–	–
16	<i>meta</i> - α -Terpineol	1189	–	–	–	1.2	0.2	–
17	Myrtenal	1193	–	–	–	0.7	–	–
18	Verbenone	1204	–	–	–	0.5	–	–
19	<i>trans</i> -Carveol	1217	–	–	–	0.7	–	–
20	Isobornyl acetate	1285	–	0.6	–	–	–	–
21	Carvacrol	1298	–	–	1.7	–	0.5	–
22	α -Terpinyl acetate	1298	–	1.1	2.3	5.9	0.5	0.3
23	(<i>E</i>)-Caryophyllene	1418	2.0	1.5	1.4	3.0	1.2	1.6
24	α -Humulene	1454	2.0	1.4	1.0	1.7	1.0	1.6
25	γ -Muurolene	1477	–	–	2.8	–	1.7	–
26	Germacrene D	1480	31.1	23.7	7.6	4.0	15.0	22.7
27	<i>epi</i> -Cubebol	1493	–	–	–	–	0.5	0.9
28	<i>epi</i> -Zonarene	1497	0.6	0.5	–	0.5	0.3	0.5
29	<i>trans</i> -Cadinene	1513	–	–	1.3	–	0.8	1.4
30	<i>cis</i> -Calamenene	1521	2.6	3.3	3.5	0.8	2.5	3.8
31	<i>trans</i> -Cadinene	1538	1.3	1.6	–	–	–	–
32	Germacrene-D-4-ol	1574	0.7	–	–	–	0.3	–
33	Caryophyllene oxide	1581	–	–	1.2	2.3	–	–
34	β -Copaene-4 α -ol	1584	–	–	0.6	0.5	–	0.3
35	Humulene epoxide II	1606	–	–	–	0.8	–	–
36	Ni	–	–	–	0.8	0.9	–	0.3
37	1,10-di- <i>epi</i> -Cubebol	1614	–	–	–	0.9	–	0.7
38	1- <i>epi</i> -Cubebol	1627	1.2	1.1	–	–	–	–
39	α -Cadinol	1653	1.5	1.1	2.0	2.3	0.7	1.3
40	Acorenone	1685	–	–	0.9	0.9	–	0.5
41	Cembrene	1929	–	0.6	1.1	–	0.5	0.8
42	Sandracopimara-8(14)-15-diene	1960	2.3	2.6	1.1	–	0.5	1.2
43	Bifloratriene	1974	–	0.6	–	–	–	–
44	Kaurene	2034	0.6	1.0	–	–	–	–
45	Abietadiene	2080	3.0	5.8	–	1.1	–	1.1
46	Octadecanol	2082	0.6	1.4	–	–	–	–
47	Sclareol	2220	0.7	1.1	–	–	–	–
48	Ni	–	–	–	–	–	0.7	–
49	<i>cis</i> -Totarol	2278	–	0.5	–	–	–	–
50	3- α -OH-manool	2295	–	0.5	–	–	–	–
51	Ni	–	0.4	0.4	–	–	–	–
	Total		98.3	98.9	95.6	79.8	97.3	91.1
	Hydrocarbon monoterpenes		47.7	49.0	65.7	46.9	70.0	52.9
	Oxygenated monoterpenes		–	1.7	5.3	13.1	1.6	0.5
	Hydrocarbon sesquiterpenes		39.6	32.0	17.6	9.5	22.5	31.6
	Oxygenated sesquiterpenes		5.7	4.8	5.8	7.7	2.1	4.5
	Diterpenes		4.3	9.6	1.1	1.1	0.5	1.3
	Others		1.0	1.8	0.8	0.9	0.7	0.3

Notes: Ni, non-identified compound; KI, Kovats index.

Tabella 34. Composizione percentuale degli oli essenziali ottenuti da bacche di *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* and *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* raccolte in Tunisia.

Analogamente a quanto già mostrato per *J. phoenicea*, sugli oli estratti dalle bacche di *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* e *J. oxycedrus* ssp. *rufescens* è stata valutata l'attività biologica antiossidante mediante i test DPPH e ABTS e i risultati sono riportati nelle tabelle 35 e 36.

Concentrations [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Unripe berries				Ripe berries	
	<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>		<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>rufescens</i>		<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>	
	Hawaria	Tabarka	Dkhila	Kbouche	Hawaria	Tabarka
1	22.3 ± 2.7	23.9 ± 1.1	22.3 ± 1.7	3.4 ± 1.7	33.1 ± 1.5	30.2 ± 0.4
5	25.0 ± 0.9	26.0 ± 2.8	25.1 ± 3.2	6.2 ± 1.1	48.1 ± 2.3	37.5 ± 0.3
10	28.1 ± 0.5	30.4 ± 1.4	28.2 ± 4.4	9.6 ± 2.1	51.9 ± 1.1	42.1 ± 1.2
20	32.4 ± 1.7	38.8 ± 0.9	32.4 ± 1.8	14.7 ± 0.9	55.2 ± 2.4	46.8 ± 1.9
40	44.4 ± 1.8	41.5 ± 0.4	44.4 ± 3.3	25.5 ± 2.3	62.6 ± 1.9	48.1 ± 0.5
80	66.4 ± 1.1	42.9 ± 1.2	66.4 ± 1.5	46.7 ± 2.3	75.9 ± 1.4	58.4 ± 2.6
100	77.2 ± 1.4	46.6 ± 1.7	77.2 ± 2.9	68.7 ± 1.3	83.7 ± 2.1	70.2 ± 0.6
150	85.3 ± 0.8	57.5 ± 1.1	85.3 ± 1.9	75.7 ± 1.1	88.2 ± 1.5	78.1 ± 1.3
IC ₅₀	43.0 ± 2.8	116.0 ± 9.7	51.0 ± 5.2	83.0 ± 2.3	8.0 ± 1.7	44.0 ± 4.1

Note: Values are given as mean ± SD of triplicate experiment.

Tabella 35. Attività antiradicalica DPPH degli oli essenziali ottenuti da bacche di *J. oxycedrus* raccolte in Tunisia

[mg mL ⁻¹]	Unripe berries				Ripe berries	
	<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>		<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>rufescens</i>		<i>J. oxycedrus</i> ssp. <i>macrocarpa</i>	
	Hawaria	Tabarka	Dkhila	Kbouche	Hawaria	Tabarka
0.625	72.1 ± 0.5	52.1 ± 1.3	67.2 ± 1.4	63.9 ± 1.3	90.9 ± 2.4	80.8 ± 3.8
1.25	80.3 ± 0.8	65.5 ± 2.5	79.9 ± 1.2	70.3 ± 1.8	97.1 ± 1.3	87.4 ± 0.9
2.5	95.1 ± 3.2	73.1 ± 3.1	83.1 ± 1.7	78.1 ± 2.3	99.0 ± 2.9	97.5 ± 0.5
5	97.8 ± 2.9	80.0 ± 1.8	90.7 ± 2.6	85.1 ± 0.4	99.8 ± 0.8	98.0 ± 1.5
7.5	98.0 ± 1.5	97.1 ± 1.7	98.3 ± 2.3	90.1 ± 0.9	100 ± 3.2	99.3 ± 1.8
12	99.5 ± 2.7	98.4 ± 2.4	100 ± 3.0	93.1 ± 1.1	100 ± 2.6	100 ± 2.9
20	100 ± 1.1	100 ± 3.8	100 ± 1.5	100 ± 1.7	100 ± 1.5	100 ± 2.5
IC ₅₀	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2
TEAC (mM)	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.8	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.1

Note: Values are given as mean ± SD of triplicate experiment.

Tabella 36. Attività antiradicalica ABTS⁺ degli oli essenziali ottenuti da bacche di *J. oxycedrus* raccolte in Tunisia

L'attività antiossidante riscontrata è stata generalmente buona, gli oli essenziali ottenuti da bacche mature hanno mostrato un'attività antiossidante maggiore rispetto quelli ottenuti da bacche immature; in assoluto il maggior potere antiossidante è stato riscontrato nell'olio essenziale ottenuto da bacche mature raccolte ad Hawaria. Non si registrano differenze significative di attività antiossidante tra le diverse sottospecie.

Questi oli potrebbero rivelarsi un'importante fonte facilmente accessibile di antiossidanti naturali impiegabili come additivi nel settore alimentare.

3.7.2 *Laurus nobilis*

La matrice vegetale utilizzata era costituita da foglie di *L. nobilis* raccolte nel periodo balsamico della fioritura in Algeria nella località di Akfadou e in Tunisia nella località di Ain Drahem. A scopo di confronto è stato ottenuto l'olio essenziale per idrodistillazione (HD).

Le estrazioni mediante SC-CO₂ (SFE) sono state condotte, sulla base del lavoro precedentemente svolto dal gruppo di ricerca [115,116], alle pressioni di 90 e 110 bar; la prova a 90 bar è quella che ha fornito il miglior estratto volatile privo dei componenti indesiderati (liquido giallo); in entrambe le prove, le cere cuticulari (solide, di colore bianco e inodori) vengono precipitate nel primo separatore. Le rese di estrazione sono state del 1.6 % (SFE) e 2.1 % (HD) per gli estratti tunisini e del 1.3 % (SFE) e 0.5 % (HD) per quelli algerini.

Gli estratti ottenuti sono stati caratterizzati chimicamente mediante analisi GC-MS e i risultati sono riportati nella tabella 37. Le tecniche SFE e HD hanno fornito degli estratti con composizioni molto simili, con una leggera predominanza delle classi monoterpeniche negli estratti HD. Passando al confronto sulla provenienza geografica, non sono state riscontrate differenze qualitative sulla composizione, ma i componenti maggioritari sono presenti in proporzioni differenti.

È interessante notare che 1,8-cineolo, componente maggioritario negli estratti provenienti dalla Tunisia (31.0 % SFE, 32.1 % HD), negli estratti provenienti dall'Algeria è presente con una concentrazione circa dimezzata (17.6 % SFE, 16.3 % HD). Nel caso del linalolo la situazione si inverte con la maggiore presenza negli estratti algerini (13.4 % SFE, 10.9 % HD) rispetto a quelli tunisini (2.2 % SFE, 2.1 % HD). Il contenuto in monoterpeni (idrocarburi e ossigenati) è maggiore negli estratti tunisini rispetto a quelli algerini, che invece sono più ricchi in sesquiterpeni (idrocarburi e ossigenati).

Altri componenti presenti in elevata percentuale in tutti gli estratti sono: sabinene (2.2 ÷ 4.6 % Algeria, 6.8 ÷ 7.2 % Tunisia), α -terpinil acetato (10.6 ÷ 16.6 % Algeria, 15.3 ÷ 15.6 % Tunisia), metil eugenolo (10.6 ÷ 11.0 % Algeria, 10.2 ÷ 10.6 % Tunisia), (E)-caryophyllene (4.2 ÷ 6.4 % Algeria, 3.0 ÷ 2.9 % Tunisia), elemicina (3.2 ÷ 2.0 % Algeria, 1.9 - 1.0 % Tunisia).

Dai dati su esposti è possibile notare che la composizione chimica degli estratti ottenuti da foglie di *L. nobilis* raccolte in Tunisia differisce notevolmente da quella degli estratti algerini e si potrebbe ipotizzare l'appartenenza a chemotipi differenti (figura 45).

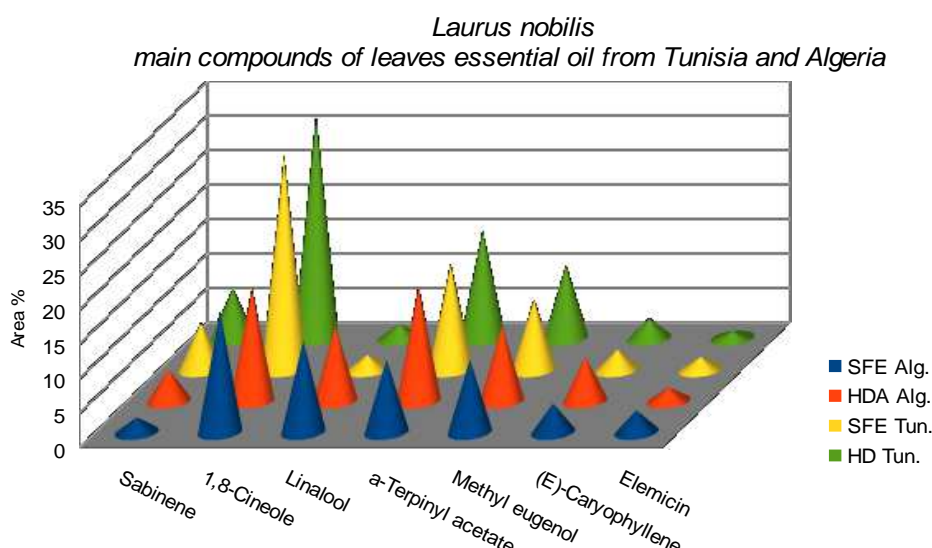


Figura 45. Confronto della composizione percentuale per i principali componenti degli oli essenziali da foglie di *L. nobilis* HD, SFE Algeria e Tunisia.

Nel caso dell'estrazione SFE è stato condotto uno studio della resa percentuale di estrazione (totale e rispetto alle 4 classi principali di composti estraibili) rispetto alla durata del processo (figura 45).

Risulta evidente che la durata dell'estrazione influenza notevolmente la composizione dell'olio volatile ottenuto. Dopo 90 min la resa percentuale in sesquiterpeni (idrocarburi e ossigenati) e in monoterpeni (idrocarburi) si stabilizza e il contributo di queste classi alla resa totale è decisamente modesto; la resa in monoterpeni ossigenati (maggiormente responsabili dell'aroma) continua a crescere significativamente fino a 240 min, tempo minimo per avere un'estrazione esaustiva.

Gli estratti volatili di *L. nobilis* della Tunisia, Algeria e Sardegna [128] mostrano un minore contenuto in 1,8-cineolo rispetto a dati presenti in letteratura [129].

Sono state effettuate delle estrazioni SFE a pressione più elevata (240 bar e 50 °C con densità di CO₂ di 0.831 kg/m³ per 4 h); l'estratto ottenuto con una resa del 2.0 % si presentava come un solido di colore verde/giallo. L'analisi GC-MS ha rivelato che circa il 10 % era costituito dai componenti l'olio essenziale, mentre la parte rimanente era fondamentalmente costituita da un elevato numero di composti non responsabili della

fraganza, come esteri metilici di acidi grassi (FAME). Pertanto possiamo concludere che un aumento della pressione di estrazione non è consigliabile se si vuole ottenere un estratto volatile aromatico di buona qualità.

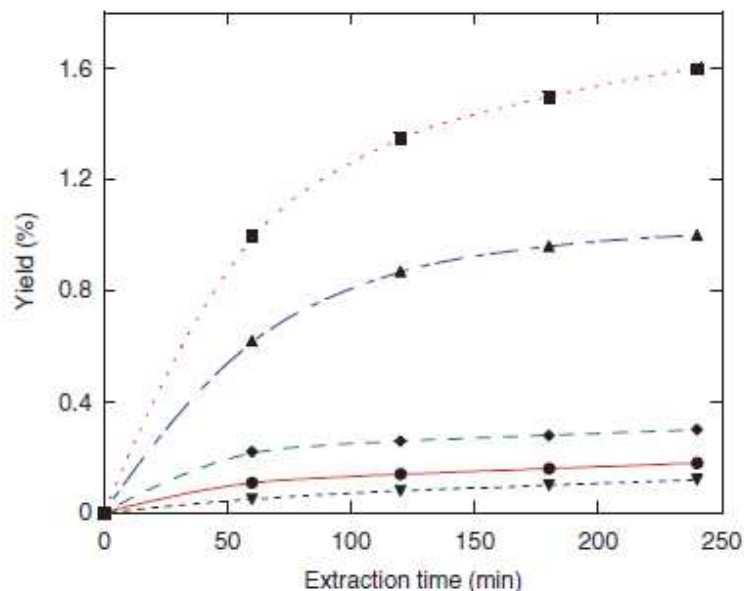


Figura 45. Evoluzione della composizione dell'estratto di *L. nobilis* ottenuto mediante SFE 90 bar in funzione del tempo di estrazione. ●, monoterpeni idrocarburi; ▲, monoterpeni ossigenati; ◆, sesquiterpeni idrocarburi; ▼, sesquiterpeni ossigenati; ■, resa totale.

Per quanto riguarda l'attività biologica degli estratti, è stata valutata l'attività antibatterica (MIC) contro *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e l'attività antifungina contro *C. albicans*; i risultati sono rappresentati in tabella 38. Gli estratti hanno mostrato un'interessante attività contro 3 delle 5 specie testate (*C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*). L'estratto SFE tunisino (90 bar) è particolarmente attivo, inibisce *C. albicans* (diametro di inibizione di 12 mm) ad una concentrazione dello 0.05 %. I risultati ottenuti (tabella 38) indicano che le differenze in attività antimicrobica degli estratti di *L. nobilis* provenienti da diverse località e ottenuti con diverse tecniche riflettono le differenze nei rendimenti di estrazione dei singoli componenti.

È noto [130] che la combinazione di componenti dell'olio essenziale, per esempio 1,8-cineolo, linalolo o terpinen-4-olo, con antibiotici, inibisce fortemente crescita di microrganismi, per cui questi risultati fanno ipotizzare, per l'estratto SFE tunisino, l'uso medicinale e una possibile applicazione terapeutica per trattamento di alcune infezioni.

I _K	Compound	SFE _A	HD _A	SFE _T	HD _T
960	α -Pinene	0.9	2.7	2.6	2.9
993	Sabinene	2.2	4.6	6.8	7.2
996	β -Pinene	0.8	2.1	2.2	2.5
1043	1,8-Cineole	17.6	16.3	31.0	32.1
1073	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.4	tr	0.4	0.3
1099	Linalool	13.4	10.9	2.2	2.1
1171	Para-mentha-1,5-dien-8-ol	0.4	tr	0.4	0.4
1181	Terpin-4-ol	1.3	2.5	0.6	1.3
1194	α -Terpineol	2.2	2.6	2.1	2.3
1357	α -Terpinyl acetate	10.6	16.6	15.3	15.6
1364	Eugenol	2.3	tr	1.6	tr
1376	α -Ylangene	0.6	0.8	0.4	tr
1393	β -Cubebene	tr	tr	1.1	0.6
1394	β -Longipinene	1.3	1.6	2.4	1.9
1407	Methyl eugenol	10.6	11.0	10.2	10.6
1410	α -Gurjunene	0.4	tr	0.8	0.6
1420	(E)-Caryophyllene	4.2	6.4	3.0	2.9
1439	α -Guaiene	1.2	1.0	0.7	0.6
1453	α -Humulene	0.6	1.1	0.5	0.4
1456	<i>allo</i> -Aromadendrene	0.6	0.9	tr	tr
1479	Germacrene D	1.1	1.3	1.1	0.9
1483	<i>cis</i> - β -Guaiene	1.2	1.3	0.4	0.4
1493	Bicyclogermacrene	1.9	0.9	3.3	3.2
1501	α -Bulnesene	1.5	tr	1.6	1.8
1508	<i>trans</i> -Cadinene	1.2	1.7	0.6	0.8
1518	δ -Cadinene	0.4	1.4	0.5	1.1
1549	Elemicin	3.2	2.0	1.9	1.0
1563	Germacrene D-4-ol	tr	tr	1.8	0.8
1564	Spathulenol	2.8	4.0	0.5	0.8
1569	Caryophyllene oxide	2.0	4.4	tr	tr
1576	Globulol	0.4	tr	tr	0.3
1631	β -Eudesmol	0.5	tr	tr	tr
1635	α -Cadinol	1.3	1.2	tr	1.1
1673	5-Isocedranol	0.6	tr	1.3	0.8

Note: A, Algerian laurel; T, Tunisian laurel; tr = traces.

Tabella 37. Indici di ritenzione (I_K) e aree cromatografiche percentuali dei principali composti identificati negli estratti volatili di *L. nobilis* ottenuti mediante SFE a 90 bar e HD provenienti dall'Algeria e dalla Tunisia.

Sample	<i>C. albicans</i> ATCC 2091 (mg mL ⁻¹)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mg mL ⁻¹)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (mg mL ⁻¹)	<i>E. faecalis</i> ATCC 24912 (mg mL ⁻¹)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (mg mL ⁻¹)
HD Tunisian	100	100	10	100	10
HD Tunisian	100	100	100	100	100
SFE 90 Tunisian	0.5	100	10	100	10
SFE 90 Tunisian	10	100	100	100	100
SFE 250 Tunisian	10	100	100	100	100

Note: Antibiotic activity is given as MIC, the minimal inhibitory concentration.

Tabella 38. Attività biologica degli estratti volatili di *L. nobilis* ottenuti mediante SFE 90 bar e HD provenienti dall'Algeria e dalla Tunisia.

3.7.3 *Daucus carota*

Sono state utilizzate le parti aeree di *D. carota* (ombrelle fiorite e con semi) raccolte in due differenti zone bioclimatiche in Tunisia: Sejnane (campione 1 - zona umida) e Tunisi (campione 2 - zona sub-umida). Gli estratti sono stati ottenuti mediante estrazione con CO₂ supercritico a 90 bar e 40 °C in configurazione con doppio separatore e per idrodistillazione a scopo di confronto. Le rese di estrazione ottenute sono state del 2.0 % (SFE) e 1.0 % (HD) e la caratterizzazione della composizione chimica degli estratti è stata realizzata mediante tecnica GC-MS (tabella 39).

L'olio ottenuto dalle ombrelle mature del campione 1 (HD e SFE) è caratterizzato da sesquiterpeni idrocarburici (36.1 ÷ 37.2 %) e sesquiterpeni ossigenati (29.2 ÷ 35.9 %). I principali componenti sono: carotolo (3.5 ÷ 5.2 %), β-bisabolene (5.5 ÷ 7.6 %), α-selinene (7.4 ÷ 8.6 %), eudesm-7(11)-en-4-olo (8.2 ÷ 8.5 %), sabinene (12.0 ÷ 14.5 %) e 11-α-(H)-himachal-4-en-1-β-ol (12.7 ÷ 17.4%). L'olio del campione 2 è invece fortemente caratterizzato dalla presenza di carotolo (48.0 ÷ 55.7 %) e elemicina (31.5 ÷ 35.3 %) come componenti maggioritari. Questo olio è prevalentemente composto da sesquiterpeni ossigenati (48.0 ÷ 55.7 %) e fenilpropanoidi (31.5 ÷ 35.3 %), mentre a differenza del campione 1, non contiene monoterpeni ossigenati.

È interessante notare che fenilpropanoidi rappresentano il 31.5 % del campione 2, ma solo il 4.7 % del campione 1 (negli estratti HD). Risultati simili sono stati riportati [131] nel caso oli ottenuti da ombrelle mature di *D. carota* ssp. *carota* raccolte in Italia (Sardegna) e in Portogallo: l'olio italiano conteneva il 15.2 % di fenilpropanoidi, circa cinque volte più di quanto riscontrato negli oli ottenuti dalle piante portoghesi (3.4 %).

Si noti che i componenti maggioritari del campione 1 (11α-H-himachal-4-ene-1β-olo e eudesm-7(11)-en-4-olo) non sono presenti invece nel campione 2. Gli stessi componenti sono stati trovati nell'olio di *D. carota* sardo [131]. Queste differenze potrebbero dipendere da più fattori, come il clima, il suolo o altri fattori geografici [132], ma anche le differenze genetiche probabilmente sono responsabili della variabilità della composizione chimica nell'olio di *D. carota*.

Il confronto tra le composizioni degli estratti SFE con quelli HD evidenzia alcune differenze: gli estratti SFE, rispetto agli HD, contengono una minore quantità di monoterpeni (15.0 vs 23.6 % e 1.7 vs 4.9 %) e una maggiore quantità di fenilpropanoidi (5.1 vs 4.7 % e 35.3 vs 31.5 %). Questo comportamento può essere spiegato, come già

ampiamente riscontrato nei risultati ottenuti su di un consistente numero di matrici vegetali oggetto di questo lavoro di ricerca, con il fatto che nel processo di estrazione la CO₂ supercritico emula un solvente organico e pertanto possa favorire l'estrazione di composti a più alto peso molecolare.

L'attività biologica antimicrobica degli estratti volatili di *D. carota* è stata testata contro *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, e ceppi clinici di *Candida albicans* e *C. tropicalis* 1011 RM. Gli oli testati hanno mostrato una bassa attività antimicrobica, infatti i valori di MIC ottenuti da entrambe gli oli con il metodo della microdiluzione sono stati > 2.5 % (v/v) per tutti i microrganismi testati.

RI	Compound	A1	B1	A2	B2
937	α -Pinene ^{a,b,c}	1.0	0.5	1.4	0.4
977	Sabinene ^{a,b,c}	14.5	12.0	1.7	0.5
980	β -Pinene ^{a,b,c}	2.7	2.0	1.0	0.3
992	Myrcene ^{a,b,c}	0.6	0.2	0.2	-
1019	α -Terpinene ^{a,b}	0.6	-	0.2	-
1027	<i>p</i> -Cymene ^{a,b,c}	0.5	-	-	-
1031	Limonene ^{a,b,c}	0.4	0.1	0.4	0.5
1061	γ -Terpinene ^{a,b,c}	0.7	-	-	-
1141	<i>cis</i> -Sabinol ^{a,b}	0.5	-	-	-
1178	Terpinen-4-ol ^{a,b,c}	1.2	0.2	-	-
1191	α -Terpineol ^{a,b}	0.4	-	-	-
1286	Bornyl-acetate ^{a,b,c}	0.5	-	-	-
1351	α -Longipinene ^{a,b}	1.3	1.4	1.3	0.8
1376	α -Copaene ^{a,b}	0.2	1.9	0.2	-
1380	β -Cubebene ^{a,b}	0.2	0.3	0.1	-
1391	β -Elemene ^{a,b}	0.8	0.9	0.2	-
1404	Methyleugenol ^{a,b,c}	0.7	0.5	-	-
1415	<i>cis</i> - α -Bergamotene ^{a,b}	0.3	-	-	-
1418	(<i>E</i>)-Caryophyllene ^{a,b,c}	0.4	0.4	2.2	1.4
1437	<i>trans</i> - α -Bergamotene ^{a,b}	3.8	0.2	0.2	-
1445	(<i>Z</i>)- β -Farnesene ^{a,b}	4.5	5.0	2.6	1.6
1453	α -Humulene ^{a,b,c}	1.3	1.5	-	-
1458	(<i>E</i>)- β -Farnesene ^{a,b}	2.9	3.5	-	-
1480	γ -Muurolene ^{a,b}	1.2	2.0	-	-
1485	Bicyclogermacrene ^{a,b}	2.4	0.2	-	-
1493	δ -Selinene ^{a,b}	1.0	1.2	-	-
1498	α -Selinene ^{a,b}	7.4	8.6	-	-
1509	β -Bisabolene ^{a,b}	5.5	7.6	-	-
1513	Elemecin ^{a,b}	1.4	1.6	31.5	35.3
1524	<i>E</i> (α)-Bisabolene ^{a,b}	1.8	1.9	0.4	0.5
1556	Germinenone B ^{a,b}	0.6	0.6	0.3	0.3
1559	Carotol ^{a,b}	3.5	5.2	48.0	55.7
1630	11- α -(H)-Himacal-4-en-1- β -ol ^{a,b}	12.7	17.4	-	-
1653	α -Cadinol ^{a,b}	1.8	2.3	-	-
1682	α -Asarone ^{a,b}	1.6	2.6	-	-
1694	Eudesm-7(11)-en-4-ol ^{a,b}	8.2	8.5	-	-
Monoterpene hydrocarbons		21.0	14.8	4.9	1.7
Oxygen containing monoterpenes		2.6	0.2	-	-
Sesquiterpene hydrocarbons		36.1	37.2	7.5	4.6
Oxygen containing sesquiterpenes		29.2	35.9	48.0	55.7
Phenylpropanoids		4.7	5.1	31.5	35.3
Total identified		93.6	93.2	91.9	97.3

Identification has been realized by comparing mass spectra (a), retention indices (b), and injection of authentic compound (c).

Tabella 39. Indici di ritenzione (RI) e aree cromatografiche percentuali dei composti identificati negli estratti di *Daucus carota* subsp. *carota* raccolto dal sito 1 (A1=HD e B1=SFE) e dal sito 2 (A2=HD e B2=SFE).

3.7.4. *Stachys yemenensis*

Gli estratti sono stati ottenuti mediante SC-CO₂ (SFE) e idrodistillazione (HD) utilizzando foglie di *S. yemenensis* raccolto nel distretto di Ashmor (provincia di Hajah, Yemen). La resa di estrazione (m/m) è stata simile per HD e SFE a 90 bar (0.8 ÷ 0.9 %); sulla matrice esausta dall'estrazione a 90 bar è stata effettuata un'ulteriore estrazione a 250 bar da cui si è ottenuto un estratto pesante (assimilabile a una concreta) con una resa di estrazione molto maggiore (4.4 %).

I campioni ottenuti sono stati caratterizzati qualitativamente mediante analisi GC-MS e quantitativamente mediante GC-FID, entrambe su colonna HP5. La tabella 40 mostra la composizione chimica degli estratti HD e SFE (90 e 250 bar). L'olio essenziale (HD e SFE90) è costituito principalmente da sesquiterpeni ossigenati (41.0 % SFE, 32.1 % HD) e monoterpeni idrocarburici (29.9 % SFE, 45.4 % HD). Tuttavia, sono stati trovate alcune differenze nella quantità dei componenti principali.

Entrambe i campioni hanno sono caratterizzati dalla presenza di α -fellandrene e β -fellandrene come componenti maggioritari (20.7 ÷ 13.9 % e 16.8 ÷ 11.7 %). Altri costituenti minori degli oli trovati sono: elemolo (12.0 % SFE, 7.5 % HD), spatulenolo (6.7 % SFE, 4.7 % HD), β -eudesmolo (5.0 % SFE, HD 5.1 %), α -eudesmolo (4.7 % SFE, 6.4 % HD) e squalene (4.8 % SFE).

L'estratto a 250 bar, con una resa di estrazione del 4.4 %, è caratterizzato dallo squalene che rappresenta il 49.7% del totale e da una notevole quantità di sostanze volatili (sesquiterpeni ossigenati) non completamente estratta a 90 bar.

In linea con le aspettative, l'olio essenziale ottenuto da *S. yemenensis* presenta una composizione estremamente differente da quelli ottenuti da altre specie di *Stachys* [133,134]; i composti che caratterizzano l'olio di *S. yemenensis* sono assenti o presenti in piccolissime quantità negli oli di altri *Stachys*.

I_R	Compound	HD	SFE 90 bar	SFE 250 bar
938	α -Pinene ^a	4.6	2.4	0.3
977	Sabinene ^a	0.2	0.2	tr
980	β -Pinene ^a	0.1	tr	–
992	Myrcene	2.8	1.8	tr
1006	α -Phellandrene ^a	20.7	13.9	1.7
1027	<i>o</i> -Cymene	8.5	5.3	0.6
1032	β -Phellandrene	16.8	11.7	1.5
1090	Terpinolene ^a	0.1	tr	–
1100	Linalool ^a	0.1	tr	–
1302	Carvacrol ^a	0.2	tr	tr
1339	δ -Elemene	tr	0.2	tr
1392	β -Elemene	0.4	0.6	tr
1409	α -Gurjunene ^a	0.3	0.5	tr
1419	β -Caryophyllene ^a	0.4	0.5	tr
1434	γ -Elemene	tr	tr	–
1439	Aromadendrene ^a	0.2	0.2	tr
1451	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-diene	0.1	–	–
1454	α -Humulene ^a	0.3	0.3	tr
1461	Allo-aromadendrene	0.1	0.2	tr
1474	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	0.2	–	–
1477	γ -Muurolole	0.2	tr	tr
1481	Germacrene D	0.2	0.2	tr
1485	β -Selinene	0.4	0.4	tr
1491	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-diene	0.2	tr	–
1496	Bicyclogermacrene	3.4	4.3	1.1
1499	α -Muurolole	0.6	0.3	tr
1503	Premnaspirodiene	0.2	0.3	tr
1514	γ -Cadinene	0.6	1.3	0.5
1524	δ -Cadinene	3.4	1.2	tr
1550	Elemol	7.5	12.0	5.9
1557	Germacrene B	0.6	0.7	tr
1566	Spathulenol	4.7	6.7	3.3
1590	Viridiflorol	0.4	0.4	tr
1618	10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	0.3	–	–
1631	γ -Eudesmol	3.2	1.7	1.6
1638	Hinesol	0.5	0.7	0.4
1642	α -Muurolol	1.4	0.4	tr
1650	β -Eudesmol	5.1	5.0	5.1
1653	α -Eudesmol	6.4	4.7	5.2
1668	Bulnesol	0.8	3.1	3.8
1689	Shyobunol	1.5	6.0	6.2
1736	Oplopanone	–	0.3	0.5
1808	Cryptomeridiol	–	tr	0.8
2299	Tricosane ^a	tr	0.5	0.6
2500	Pentacosane ^a	–	0.6	1.6
2700	Heptacosane ^a	–	tr	0.7
2850	Squalene ^a	–	4.9	49.7
Y%		0.8	0.9	4.4

Notes: I_R , GC retention indices relative to C₉–C₂₅ *n*-alkanes on the HP-5 column; tr, traces < 0.1%; and Y%, percentage of yield. ^aPeaks identified by comparison with respective pure standards.

Tabella 40. Rese di estrazione percentuali (Y%), Indici di ritenzione (I_R) e aree cromatografiche percentuali dei principali composti identificati negli estratti di *S. yemenensis*.

Per quanto riguarda l'attività biologica antimicrobica, i risultati sulla valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) di entrambi i campioni HD e SFE, ottenuta con il metodo della microdiluizione sono riportati nella tabella 41. In particolare, i valori di MIC mostrati contro il ceppo *E. coli* ATCC sono stati 0.15 % (v/v) e 0.3 % (v/v), rispettivamente; *S. aureus* ATCC ha mostrato sensibilità diverse per gli estratti HD e SFE: i valori di MIC sono stati 0.6 % (v/v) per SFE e > 2.5 % (v/v) per HD. I valori di MIC trovati nei confronti dei ceppi di *Candida* sono stati > 2.5 % (v/v), con l'eccezione di *C. glabrata*, per il quale il MIC nell'olio SFE è stato del 2.5 % (v/v). Concludendo, l'estratto SFE a 90 bar ottenuto dalle foglie di *S. yemenensis* ha mostrato una buona attività antimicrobica contro i ceppi di *E. coli* e *S. aureus*, sarebbe interessante approfondire la ricerca testando la sua attività contro altri batteri Gram-positivi e negativi.

Strains	HD		SFE 90 bar	
	MIC% (v/v)	MCC% (v/v)	MIC% (v/v)	MCC% (v/v)
<i>S. aureus</i> ATCC	>2.5	>2.5	0.6	2.5
<i>E. coli</i> ATCC	0.15	>2.5	0.3	>2.5
<i>C. albicans</i>	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
<i>C. glabrata</i>	>2.5	>2.5	2.5	>2.5

Tabella 41. Attività biologica degli estratti di *S. yemenensis*.

Conclusioni

Il lavoro di ricerca durante tutto il periodo del dottorato è stato principalmente finalizzato all'estrazione dei metaboliti secondari, da piante endemiche della Sardegna e da altre piante di potenziale interesse farmaceutico facilmente coltivabili nel nostro clima.

Questo lavoro trova gran parte della sua motivazione nella tematica della ricerca portata avanti, fortemente legata allo sviluppo di processi ed applicazioni nell'ambito della green chemistry, che attualmente riveste un forte interesse anche per l'industria farmaco-cosmetico ed alimentare. Altra considerazione importante è che la Sardegna, possiede un patrimonio di biodiversità vegetale unico in ambito europeo, ma sicuramente non sufficientemente studiato nell'ottica della sua valorizzazione come potenziale fonte di "molecole bioattive".

L'attenzione è stata rivolta, oltre che sull'ottimizzazione del processo di estrazione e la caratterizzazione chimica degli estratti, anche sullo studio dell'attività biologica, utilizzando sia modelli *in vivo* che *in vitro*. In particolare i test hanno riguardato l'attività antiossidante, antinfiammatoria ed antimicrobica.

I risultati finora ottenuti sulle 18 differenti matrici vegetali studiate sono da considerarsi positivi ed incoraggianti, sia per le nuove conoscenze prodotte in campo scientifico, ma ancor più per le possibili applicazioni in campo terapeutico e alimentare.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che:

- La maggior parte degli estratti ottenuti ha mostrato una buona attività biologica *in vitro*; in particolare gli oli essenziali ottenuti da *Vitex agnus-castus*, *Satureja thymbra* e *Thymus capitatus* per i quali è possibile ipotizzarne il futuro uso in campo terapeutico e alimentare. È da sottolineare che, nel caso del confronto delle stesse specie vegetali provenienti da differenti paesi, gli oli essenziali ottenuti da

piante raccolte in Sardegna hanno generalmente dimostrato di possedere una maggiore attività biologica, come nel caso della *Calamintha nepeta*.

- I positivi risultati ottenuti nei primi test *in vivo* sugli oli essenziali di *Myrtus communis* per quanto riguarda l'attività antinfiammatoria e di *Pistacia lentiscus* come protettivo antiossidante, fanno ben sperare in nuovi scenari di utilizzo in campo terapeutico per gli oli essenziali e richiedono un futuro sviluppo e approfondimento della sperimentazione.
- L'uso di tecnologie di estrazione “*pulite*” e facilmente modulabili, come la SC-CO₂ a media/alta pressione nel caso della *Salvia desoleana* e del germe di grano, ha permesso di ottenere estratti arricchiti nei composti d'interesse e totalmente esenti da tracce di solvente indesiderate per l'utilizzo in campo farmaceutico, cosmetico ed alimentare.
- L'utilizzo della tecnologia di estrazione con CO₂ supercritico ha permesso di ottenere oli essenziali mediamente di qualità superiore rispetto a quelli ottenuti con la tradizionale idrodistillazione in quanto l'uso di basse temperature l'assenza di acqua evitano i processi di degradazione e/o la formazione di artefatti.

Bibliografia

1. Arrigoni, P.V., (2006). *Flora dell'Isola di Sardegna*. Carlo Delfino Editore, Sassari.
2. Conti, F., Abbate, G., Alessandrini, A., Blasi, C., (2005). *An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora*. Palombi Editori, Roma.
3. Atzei, A.D., (2003). *Le piante nella tradizione popolare della Sardegna*. Carlo Delfino Editore, Sassari.
4. Fahn, A., (1979). *Secretory Tissues in Plants*, Academic Press, London.
5. Gershenzon, J., Maffei, M., Croteau, R., (1989). *Plant Physiol.*, 89: 1351.
6. Russin, W. A., Uchtyl, T. F., Durbin, R. D., (1992). *Plant Science*, 85: 115.
7. Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. and Sangwan, R.S., (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34: 3–21.
8. Wallach, O., (1915). *Terpene und Camper*, 2nd Ed. Vit. & Co, Liepig.
9. Rutzicka, L., (1953). The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia*, 9: 357.
10. Dewick, P.M., (2002). The biosynthesis of C₅–C₂₅ terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 19: 181-222. doi: 10.1039/B002685I
11. Posadino, A.M., Porcu, M.C., Marongiu, B., Cossu, A., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Cappuccinelli, R., Biossa, G., Pintus, G., Pretti, L., (2012). Antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts of *Salvia desoleana* on two human endothelial cell models. *Food Research International*, 46: 354 – 359.
12. Quartu, M., Serra, M.P., Boi, M., Pillolla, G., Melis, T., Poddighe, L., Del Fiacco, M., Falconieri, D., Carta, G., Murru, E., Cordeddu, L., Piras, A., Collu M. and Banni, S., (2012). Effect of acute administration of *Pistacia lentiscus* L. essential oil on rat cerebral cortex following transient bilateral common carotid artery occlusion. *Lipids in Health and Disease*, 11: 8, doi:10.1186/1476-511X-11-8.
13. Maxia, A., Frau, M.A., Falconieri, D., Singh Karchuli, M., Kasture, S., (2011). Essential oil of *Myrtus communis* L. inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF – α . *Natural Product Communications*, 6 (10): 1545 - 1548.
14. Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Frau, M.A., Molicotti, P., Zanetti, S., (2010). Composition and biological activity of supercritical CO₂ extract of some Lamiaceae growing wild in Sardinia (Italy). *J. Essential Oil Bearing Plants*, 13 (5): 625 – 632.
15. Piras, A., Cocco, V., Falconieri, D., Porcedda, S., Marongiu, B., Maxia, A., Frau, M.A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2011). Isolation of the Volatile Oil from *Satureja thymbra* by Supercritical Carbon Dioxide Extraction: Chemical Composition and Biological Activity. *Natural Product Communications*, 6 (10): 1523 – 1526.
16. Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Gonçalves, M.J., Salgueiro, L., Maxia, A., Lai, R. (2010). Extraction, separation and isolation of volatiles from *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) wild species of Sardinia Island, Italy, by supercritical CO₂. *Natural Product Research*, 24(6): 569-579, doi:10.1080/14786410902899915.

17. Maxia, A., Frau, M.A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2011). Biological assays and chemical composition of volatile oils of *Bupleurum fruticosum* L. Apiaceae. *Records of Natural Products*, 5 (2): 92 – 99.
18. Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Frau, M.A., Maxia, A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2011). Antifungal activity and chemical composition of essential oils from *Smyrniololus atrum* from Italy and Portugal. *Nat. Product Research*. doi:10.1080/14786419.2010.541876
19. Marongiu, B. Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Natural Product Research*, 24 (18): 1734 – 1742, doi:10.1080/14786410903108944
20. Falconieri, D., Piras, A., Porcedda, S., Marongiu, B., Gonçalves, M.J., Cabral, C., Cavaleiro, C., Salgueiro L., (2011). Chemical Composition and Biological Activity of the Volatile Extracts of *Achillea millefolium* L. *Natural Product Communications*, 6 (10): 1527 – 1530.
21. Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., Marongiu, B., (2009). Biological activity evaluation of the oils from *laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Products Res.*, 23 (3): 230 – 237, doi:10.1080/14786410801976400
22. Medini, H., Elaïssi, A., Khouja, M.L., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Chemli, R., (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. berries. *Nat. Product Research*, 25 (18): 1695 – 1706.
23. Medini, H., Elaïssi, A., Khouja, M.L., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Chemli, R., (2011). Chemical composition of the essential oils of the berries of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *rufescens* (L. K.) and *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* (S. & m.) Ball. and their antioxidant activities. *Nat. Product Research*, doi:10.1080/14786419.2011.558014
24. Marzouki, H., Khaldi, A., Falconieri, D., Piras, A., Marongiu, B., Molicotti, P. and Zanetti, S., (2010). Essential Oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Natural Product Communications*, 5 (12): 1955 – 1958.
25. Awadh Ali Nasser, A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Molicotti, P., Zanetti, S., (2010). Essential oil composition of leaves of *Stachys yemenensis* obtained by supercritical CO₂. *Natural Product Research*, 24(19): 1823 – 1829, doi:10.1080/14786411003754272
26. Piras, A., Rosa, A., Falconieri, D., Porcedda, S., Dessì, M.A., Marongiu, B., (2009). Extraction of Oil from Wheat Germ by Supercritical CO₂. *Molecules*, 14(7): 2573 – 2581, doi:10.3390/molecules14072573
27. Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A. and Falconieri, D., (2012). Traditional and Modern Methods for the Preparation of Essential Oils. In: *Essential Oils as Natural Food Additives*. Editor Luca Valgimigli. Nova Science Publisher, Inc. ISBN 978-1-62100-241-3.
28. Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., (2006). Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia arborescens* L. and *Helichrysum splendidum* (Thunb.) Less. *Natural Product Res.*, 20: 421 – 428.

29. *Farmacopea ufficiale della Repubblica italiana XII ed.* (2008). Editore: Istituto Poligrafico dello Stato.
30. Francis, A.W., (1954). *J. Phys. Chem.*, 58: 1099.
31. Dobbs, J.M., Wong, J. M., Johnston, K. P., J. (1986). *Chem. Eng. Data*, 30: 4303.
32. Dobbs, J. M., Wong, J. M., Johnston, K. P., J. (1987). *Eng. Chem. Res.*, 26: 56.
33. Reverchon, E. (1993). Il trasporto di materia. In: *Fluidi Supercritici: Applicazioni Agroalimentari*. Editor E. Reverchon, A. Schiraldi, P. Fantozzi. RAISA-CNR sottoprogetto 4, Milano. p. 41 – 50.
34. Reverchon, E. (1993). Modellazione del processo di estrazione. In: *Fluidi Supercritici: Applicazioni Agroalimentari*. Editor E. Reverchon, A. Schiraldi, P. Fantozzi. RAISA-CNR sottoprogetto 4, Milano. p. 50 – 56.
35. Marongiu, B., Porcedda, S., Caredda, A., De Gioannis, B., Vargiu, L., La Colla, P., (2003). Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flav. Fragr. J.*, 18: 390 – 397.
36. Cherchi, G., Deidda, D., De Gioannis, B., Marongiu, B., Pompei, R., Porcedda, S., (2001). Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flav. Fragr. J.*, 16: 35 – 43.
37. Stahl, E., Quirin, K. W., Gerard, D., (1988). *Versichtelè Gase zur Extraktion und Raffination*. Springer Verlag.
38. Marongiu, B.; Piras, A.; Desogus, E.; Porcedda, S.; Ballero, M., (2003). Analysis of the volatile concentrate of the leaves and flowers of *Helichrysum italicum* (Roth) Don ssp. *Microphyllum* (Willd.) Nyman (Asteraceae) by supercritical fluid extraction and their essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 15: 120 – 126.
39. Parry, E.J., (1908). *The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes*, 2nd ed. London: Scott, Greenwood & Son.
40. Guenther, E., (1972). *The Essential Oils Vol. 1: History Origin in Plants Production Analysis*, reprint of 1st ed. (1948). Florida: Krieger Publishing Company.
41. Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., Casanova, J., (1995). Computer-aided identification of individual components of essential oils using ¹³C NMR spettroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*. 25 – 34.
42. d'Acampora Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G. and Mondello, L., (2008). Analysis of Essential Oils. In: *Handbook of Essential Oils*. Editor K. Hüsni Can Başer, G. Buchbauer. CRC Press Publisher. ISBN: 978-1-4200-6315-8.
43. Bicchi, C., Cagliero, C. and Rubiolo, P., (2011). New trends in the analysis of the volatile fraction of matrices of vegetable origin: a short overview. A review. *Flavour Fragr. J.* 26: 321 – 325.
44. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS)-NIST. www.amdis.net
45. Kovats, E., (1958). *Helv. Chim. Acta*, 41: 1915.
46. Van Den Dool, H., Kratz, P.D., (1963). *J. Chromatography*. 11: 463 – 471.
47. d'Acampora Zellner, B., Bicchi, C., Dugo, P., Rubiolo, P., Dugo, G. and Mondello, L., (2008). Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour Fragr. J.* 23: 297 – 314.

48. NIST/EPA/NIH., (2005). *Mass spectral library*. Gaithersburg: National Institute of Standard and Technology.
49. Adams, R.P., (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass Spectroscopy, 4th Ed.* Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
50. Grob, R.L., Kaiser, M.A., (2004). Qualitative and Quantitative Analysis by Gas Chromatography. In: *Modern Practice of Gas Chromatography*, Editor Grob and Barry. J.Wiley & sons Publisher, Inc. ISBN: 0-471-22983-0.
51. Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G.H., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipid from animals tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497 – 509.
52. Christie, W.W., (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advantage in Lipid Methodology – Two*; Christie, W.W., Ed.; The Oily Press: Dundee, UK, pp. 69 – 111.
53. Rosa, A., Deiana, M., Corona, G.; Atzeri, A., Incani, A., Appendino, G., Dessì, M.A., (2005). Protective effect of capsinoid on lipid peroxidation in rat tissues induced by Fe-NTA. *Free Radic. Res.*, 39: 1155 – 1162.
54. Jaffe, E.A., (1984). Culture and identification of large vessel endothelial cells. In: Jaffe E.A., editor. *Biology of Endothelial Cells*, Boston: Martinus Nijhoff Publisher, p. 1 – 13.
55. Cheel, C., Theoduloz, T., Rodriguez, C., Caligari, J. and Shemada-Hirschmann, G., (2007). Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. Vesca* and *F. Ananassa* cv. *Food Chemistry*, 102: 36 – 44.
56. Re, P., Proggente, R., Pannala, N., Yang, A. and Rice-Evans, C.M.A., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Bio. Med.*, 26: 1231 – 1237.
57. Skandrani, I., Ben Sghaier, M., Neffati, A., Boubaker, J., Bouhleb, I., Kilani, S., Mahmoud, A., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L., (2007). Antigenotoxic and free radical scavenging activities of extracts from *Moricandia arvensis*. *Drug Chemistry and Toxicology*, 30: 361 – 382.
58. Ali, N., Yousef, J., Mohammad, R.S., Mohammad, B.J., (2005). The effect of type and concentration of vehicles on the dissolution rate of a poorly soluble drug indomethacin from liquisolid compacts. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 8: 18 – 25.
59. Cabrini, D.A., Moresco, H.H., Imazu, P., Delai da Silva, C., Pietrovski, E.F., Mendes, D.A., Prudente, A.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., Otuki, M.F., (2011). Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. *eCAM*, 1 – 7.
60. Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., (1984). Qualitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology*, 87: 1344 – 1350.
61. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., (1963). Antiinflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 141: 369 – 376.
62. Deriu, A., Zanetti, S., Sechi, L.A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., (2008). Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 588 – 590.

63. Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., (1995). Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82: 181 – 185.
64. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, (2008b). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; third informational supplement M27-S3. Wayne, USA.
65. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2008c). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved standard document M38-A. Wayne, USA.
66. Ilkay, O., Murat, K., Qamar, N., Asma, E., Gulderen, Y., Yuksel, K., Belma, K., Bilge, S., Iqbal Choudhary, M., (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, 103: 1247 – 1254.
67. Souza A., Souza M., Moreira M.A., Moreira, M.R., Furtado N., Martins C., Bastos J., Santos R., Heleno V., Ambrosio S., Veneziani R., (2011). Antimicrobial Evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. *Molecules*, 16 (11): 9611 – 9619, doi:10.3390/molecules16119611
68. Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., (2001). *Common Fragrance and Flavour Materials*. Wiley-VCH, ISBN: 3-527-30364-2, p.146, 217.
69. Ruiz-Gines, J.A., Lopez-Ongil, S., Gonzalez-Rubio, M., Gonzalez-Santiago, L., Rodriguez-Puyol, M., Rodriguez-Puyol, D., (2000). Reactive oxygen species induce proliferation of bovine aortic endothelial cells *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35: 109 – 113.
70. Moulines, J., Lamidey, A.M., and Desvergnès-Breuil, V., (2001). A practical synthesis of Ambrox® from sclareol using no metallic oxidant. *Synthetic communications*, 31 (5): 749 – 758.
71. Molero Gomez, A.; Martinez de la Ossa, E., (2002). Quality of wheat germ oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. *JAOCs*, 77: 969 – 974.
72. Ge, Y.; Yan, H.; Hui, B.; Ni, Y.; Wang, S.; Cai, T., (2002). Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 50: 685 – 689.
73. Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S., (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Med*, 65: 749 – 752.
74. Baratto, MC, Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Pogni, R., (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *Pistacia lentiscus* leaves. *Free Radical Research*, 37: 405 – 412.,
75. Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A., (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 55: 7093 – 7098.
76. Chryssavgi, G., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T., Komaitis, M., (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L and *Myrtus communis* L., Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107: 1120 – 1130.
77. Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., (2002). Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oils by supercritical CO₂. *Flav. Fragr. J.*, 17 (4): 239 – 244, doi:10.1002/ffj.1095

78. Verhaeghe, R., Naert, J., Vermeylen, J., (1991). Bilateral carotid artery occlusion: clinical presentation and outcome. *Clin Neurol Neurosurg*, 93: 123 – 126.
79. AbuRahma, A.F., Copeland, S.E., (1998). Bilateral internal carotid artery occlusion: natural history and surgical alternatives. *Cardiovasc Surg*, 6: 579 – 583.
80. Martin, R.S. 3rd, Edwards, W.H., Mulherin, J.L. Jr., Edwards, W.H. Jr., (1993). Surgical treatment of common carotid artery occlusion. *Am J Surg*, 165: 302 – 306.
81. Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22: 391 – 397.
82. White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*, 179 (S 1-2): 1 – 33.
83. Appendino, G., Maxia, L., Bettoni, P., Locatelli, M., Valdivia, C., Ballero, M., Stavri, M., Gibbons, S., Sterner, O., (2006). Antibacterial galloylated alkylphloroglucinol glucosides from myrtle (*Myrtus communis*). *Journal of Natural Products*, 69, 251 – 254.
84. Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid, S., Pérez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., (2009). Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts, *Natural Product Communications*, 4: 819 – 824.
85. Gündüz, G.T., Gönül, S.A., Karapinar, M., (2009). Efficacy of myrtle oil against *Salmonella typhimurium* on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 130: 147 – 150.
86. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I., (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67: 1249 – 1255.
87. Zanetti, S., Cannas, S., Molicotti, P., Bua, A., Cubeddu, M., Porcedda, S., Marongiu, B., Sechi, L.A., (2010). Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease*, vol. 2010, Article ID 931530, 3 pages. doi:10.1155/2010/931530
88. Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F.F., Franconi, F., (2004). Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radical Research*, 38: 97 – 103.
89. Thieringer, R., Fenyk-Melody, J.E., Le Grand, C.B., Shelton, B.A., Detmers, P.A., Somers, E.P., Carbin, L., Moller, D.E., Wright S.D. and Berger, J., (2000). Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Does Not Inhibit IL-6 or TNF- α Responses of Macrophages to Lipopolysaccharide *In Vitro* or *In Vivo*. *The Journal of Immunology*, 164: 1046 – 1054.
90. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., (1963). Antiinflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-indole-3-acetic acid. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 141: 369 – 376.
91. Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., (1980). Constituents of essential oil of *Myrtus communis*. *Planta Medica*, 39: 164 – 167.
92. Chao, K., Hua, K.F., Hsu, H.Y., Cheng, S.S., Liu, J.Y., Chang, S.T., (2005). Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 53: 7274 – 7278.
93. Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., and Maia, J.G.S., (1999). The essential oil of *Vitex agnus castus* L. growing in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 211 – 213.

94. Capone, W., Mascia, C., Spanedda, L., Chiappini, M., (1989). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from Sardinian *Satureja thymbra*. *Fitoterapia*, 60: 90 – 92.
95. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martinez-de-Oliveira, J., (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55: 1367 – 1373.
96. Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. and Casanova, J., (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flav. Fragr. J.*, 17: 15 – 19.
97. Dob, T., Dahmane, D., Agli, M. and Chelghoum, C., (2006). Essential oil composition of *Lavandula stoechas* from Algeria. *Pharmaceutical Biology*, 44: 60 – 64.
98. Faleiro, L., Miguel, M., Gomes, S., Costa, L., Venancio, F., Teixeira, A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. and Pedro, L.G., (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8162 – 8168.
99. Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arredi, E. and Palmas, F., (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Let. Appl. Microbiol.*, 29: 130 – 135.
100. Salgueiro, L.R., Pinto, E., Goncalves, M.J., Pina-Vaz, C., Cavaleiro, C. Rodrigues, A.G., Palmeira, A., Tavares, C., Costa-de-Oliveira, S. and Martinezde-Oliveira, J., (2004). Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Thymbra capitata*. *Planta Med.*, 70: 572 – 575.
101. Manunta, A., Tirillini, B. and Fraternali, D., (1992). Secretory tissues and essential oil composition of *Bupleurum fruticosum* L. *J. Essent. Oil Res.*, 4: 461 – 466.
102. Giamperi, L., Ricci, D., Fraternali, D., Manunta, A. and Tabacchi, R., (1998). The essential oil from *Bupleurum fruticosum* L. of the Cyrenaica region of eastern Lybia and the problem of bupleurol, *J. Essent. Oil Res.*, 10: 369 – 374.
103. Liu, K., Lota, M.L., Casanova, J., Tomi, F., (2009). The essential oil of *Bupleurum fruticosum* L. from Corsica: a comprehensive study, *Chemistry & Biodiver.*, 6: 2244 – 2254.
104. Lorente, I., Ocete, M.A., Zarzuelo, A., Cabo, M.M. and Jimenez, J., (1989). Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *J. Nat. Prod.*, 52: 267 – 272.
105. Baldovini, N., Tomi, F. and Casanova, J., (2001). Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by ¹³C-NMR. *Phytochemical Analysis*, 12: 58 – 63.
106. Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Fraternali, D., Giampieri, L. and Ricci, D., (2004). Volatile constituents of different part (roots, stems and leaves) of *Smyrniololus atrum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 522 – 525.
107. Molleken, U., Sinnwell, V. and Kubeczka, K.H., (1998). Essential oil composition of *Smyrniololus atrum*. *Phytochemistry*, 49: 1709 – 1714.
108. Baldovini, N., Ristorcelli, D., Tomi, F. and Casanova, J., (2000). Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal*, 15: 50 – 54.

109. Ristorcelli, D., Tomi, F. and Casanova, J., (1996). Essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and subsp. *glandulosa* from Corsica (France). *The Journal of Essential Oil Research*, 8: 363 – 366.
110. Sousa, P.J.C., Magalhaes, P.J.C., Lima, C.C., Oliveira, V.S. and Leal-Cardoso, J.H., (1997). Effects of the piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 787 – 791.
111. Gonçalves, M.J., Vicente, M., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L., (2007). Composition and antifungal activity of the essential oil of *Mentha cervina* from Portugal. *Natural Product Research*, 21: 867 – 871.
112. Kakkalou, E., Kokkini, S., Hanlidou, E., (1992) Volatile constituents of *Achillea millefolium* in relation to their infraspecific variation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20: 665-670.
113. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pais, M.S.S., Scheffer, J.J.C., (1992) Composition of essential oils from leaves and flowers of *Achillea millefolium* L. ssp *millefolium*. *Flavour and Fragrance Journal*, 7: 219 – 222.
114. Agnihotri, V.K., Lattoo, S.K., Thappa, R.K., Kaul, P., Qazi, G.N., Dhar, A.K., Saraf, A., Kapahi, B.K., Saxena, R.K., Agarwal, S.G., (2005) Chemical variability in the essentials oil components of *Achillea millefolium* Agg. from different Himalayan habitats (India). *Planta Medica*, 71: 280 – 283.
115. Marzouki, H., Piras, A., Bel Haj Salah, K., Medini, H., Pivetta, T., Bouzid, S., Marongiu, B., Falconieri, D., (2009). Essential oil composition and variability of *Laurus nobilis* L. growing in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs. *Natural Product Res.*, 23 (4): 343 – 354. doi:10.1080/14786410802076200
116. Marzouki, H., Elaissi A., Khaldi, A., Bouzid, S., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., (2009). Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *Open Natural Products Journal*, 2: 86 – 91.
117. Maxia, A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2009) Supercritical extraction and biological assays of essential oils from *Daucus carota* subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia*, 80: 57 – 61.
118. Mc Nair, J. B., (1932). The interrelation between substances in plant essential oils and resins, cyanogene and oxalate. *Botanical soc. Amer.* 19: 255 – 272.
119. Ennajar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Savagnac, A., Abderraba, M., Raies, A. and Romdhane, M. J., (2010). The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *Journal of Science Food Agriculture*. 90: 462 – 470.
120. Marongiu, B., Porcedda, S., Caredda, A., Piras, A., Vargiu, L., La Colla, P., (2004). Isolation of *Juniperus phoenicea* volatiles by supercritical carbon dioxide: extraction and bioactivity assays. *J. Essential Oil Res.*, 16: 256 – 261.

121. Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Sanna, G., Murreddu, M., Loddo, R., (2006). Extraction of *Juniperus communis* L. ssp. *nana* Willd essential oil by supercritical carbon dioxide. *Flav. Fragr. J.*, 21: 148 – 154.
122. Molyneux, P. and Songk., (2004). The use of the free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *J. Sci. Tech.*, 26: 211 – 219.
123. Dorman, H. J. D. and Hiltunen, R., (2004). (Fe III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*, 88: 193 – 199.
124. Kamatou, G.P.P., Zyl, R.I.V., Vuuren, S.F.V., Fugueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Vljoen, A.M., (2008). Seasonal variation in essential oil composition. Oil toxicity and the biological activity of solvent extracts from three South African *Salvia* species. *South African Journal of Botany*, 74: 230 – 237.
125. Guerra, H.E., Del Carmen, L.M.M. and Garci, V.R., (1987). Determination by gas chromatography of terpenes in the berries of the species *Juniperus oxycedrus* L., *J. thurifera* L.; *J. Sabina* L. *Journal of Chromatography A*, 396: 416 – 420.
126. Angioni, A., Barra, A., Russo, M.T., Coroneo, V., Dessi, S. and Cabras, P., (2003). Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 51: 373 – 374.
127. Velasco-negueruela, A., Perez-Alonso, M.J., Pala-Paul, J., Inigo, A., Cervera, M. and Lopez, J., (2003). Essential oil analysis of the leaves and berries of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *badia* (H. Gay) Debaux. *Botanica Complutensis*, 27: 147 – 154.
128. Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., & Soro, C., (2002). Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50: 1492 – 1496.
129. Ozek, T., Bozan, B. and Baser, K.H.C., (1998). Supercritical CO₂ extraction of volatile components from leaves of *Laurus nobilis* L. *Chemistry Natural Compounds*, 34: 668 – 675.
130. Kalembe, D. and Kunika, A., (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813 – 819.
131. Maxia, A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2009). Supercritical extraction and biological assays of essential oils from *Daucus carota* subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia*, 80: 57 – 61.
132. Sartorelli, P., Marquiereito, A.D., Amaral-Baroli, A., Lima, M.E.L., Moreno, P.R.H., (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of eucalyptus. *Phytotherapy Research*, 21: 231 – 233.
133. Grujic-Jovanovic, S., Skaltsa, H.D., Marin, P. and Sokovic, M., (2004). Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 139 – 144.
134. Skaltsa, H.D., Demetzos, C., Lazari, D. and Sokovic, M., (2003). Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64: 743 – 752.

Testi di carattere generale consultati

- Capasso, F., Grandolini, G., (2006). *Fitoterapia*, Springer, Milano.
- Cossu, N., (2007). *Medicina popolare in Sardegna*. Carlo Delfino Editore, Sassari.
- Campanili, E., (2009). *Piante medicinali in Sardegna*. Ilisso Edizioni, Nuoro.
- Dewick, P.M., (2001). *Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*. Piccin, Padova.
- Marisili, R., (2002) *Fragrance and odor Analysis*. Marcel Dekker AG., Basel, Switzerland.
- Niessen, W.M.A., (2002). *Current Practice Of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker AG., Basel, Switzerland.
- Paulis, G., (1992). *I nomi popolari delle piante in Sardegna*. Carlo Delfino Editore, Sassari.
- Pignatti, S., (1982). *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Rowe, D., (2005). *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. CRC Press.
- Senatore, F., (2004) *Biologia Cellulare e Botanica Farmaceutic*. Piccin, Padova.
- Senatore, F., (2000). *Oli Essenziali: Provenienza, estrazione ed analisi Chimica*. EMSI, Roma.