



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di Dottorato in Scienze della Vita e Biotecnologie

Responsabile : Prof. Leonardo Antonio Sechi

**STUDIO DI ALCUNI OLI ESSENZIALI
NELLA PRATICA CLINICA**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Stefania Zanetti

Correlatore:

Dott.ssa Donatella Usai

Dottorando:

Dott. Matthew Gavino Donadu

Ciclo XXXI (Anni 2015-2018)

INDICE

Riassunto	3
Introduzione	4
Scopo della tesi	18
Materiali e Metodi	18
Risultati	30
Focus on :	
Timo	31
Lavanda	34
Iperico	39
Elicriso	40
Origano	43
Mirto	44
Studio “<i>in vivo</i>”	46
Conclusioni	52
Bibliografia	62

Riassunto

In questi anni di dottorato sono stati saggiati “*in vitro*” diversi oli essenziali : “*Thymus vulgaris – red thyme geraniol sel*, *Lavandula angustifolia* Miller, *Lavanda sumian*, *Lavanda grosso*, *L. hybrida*, *L. vera*, *L. latifolia*, *Origanum vulgare*, *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso, *Hypericum perforatum* subsp. *Angustifolium*, *Myrtus communis* L.” su numerosi ceppi batterici Gram positivi e Gram negativi, tra cui ceppi selezionati di *P. aeruginosa*, e su ceppi di *Candida spp.* e *Malassezia spp.*

Alla luce dei risultati ottenuti si evince che gli oli di *Thymus vulgaris – red thyme geraniol sel* e *L. grosso* hanno evidenziato una buona attività antimicrobica, rispetto alla *L. angustifolia* e alla *L. sumian* su ceppi clinici multi drug resistant di *P. aeruginosa* .

Mentre *L. angustifolia* Miller ha presentato un’azione citotossica su cellule CaCo-2 (Cellule Carcinoma Colon-retto) dovuta probabilmente all’azione di terpeni.

Gli Oleoliti (OM) di *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso e *Hypericum perforatum* subsp. *Angustifolium* sono stati saggiati nei confronti di 30 ceppi di *Candida spp.*: l’OM di *H. microphyllum* ha mostrato una maggiore attività antimicotica rispetto a *H. perforatum* .

Infine è stata studiata l’azione antifungina di *M. communis* nei confronti di 86 ceppi di *Malassezia spp.*: i dati ottenuti hanno mostrato una notevole attività nei confronti di *M. furfur* e *M. sympodialis*.

Inoltre è stato eseguito uno studio “*In vivo*” del quale in questo contesto vengono presentati i primi dati.

Introduzione

Il termine di “oli essenziali” o “oli eterei” non raggruppa una categoria di composti dotati di particolari caratteristiche chimiche ma viene usato per indicare miscele di sostanze organiche volatili ottenute distillando le piante aromatiche in corrente di vapore acqueo. È importante distinguere gli oli essenziali dalle essenze: si parla infatti di “olio essenziale” solo dopo l'estrazione mentre di “essenza” fintanto che la miscela di sostanze si trova ancora nella pianta (Campanini E. 2004).

Il termine “olio essenziale” deriva da un nome coniato nel XVI secolo dal medico e alchimista svizzero Paracelso (pseudonimo di Philipp Theophrast Bombast von Hohenheim). Egli chiamò infatti “*Quinta essentia*” uno dei componenti di un miscuglio estratto da una pianta.

Gli oli essenziali usati in aromaterapia devono obbligatoriamente essere ottenuti per distillazione in corrente di vapore acqueo della pianta intera o di una sua parte: questo è infatti l'unico procedimento che permette di ottenere degli estratti 100% naturali, senza tracce di solventi chimici. Fanno eccezione le essenze ottenute dalle bucce dei frutti degli agrumi, come ad esempio limone, arancio e mandarino. In questo caso infatti gli estratti vengono ottenuti per spremitura dei tessuti vegetali.

In passato i derivati odorosi delle piante aromatiche venivano chiamati con nomi diversi come oli eterei, aromi, essenze, ma la Farmacopea Francese dal 1972 ha standardizzato la nomenclatura introducendo tassativamente il termine di “olio essenziale” (Nedorostova, L. et al 2009).

Le piante aromatiche vengono utilizzate da migliaia di anni a scopo cosmetico ma anche in ambito medico e culinario (Burt S.A. 2004) Il loro impiego rituale costituiva parte integrante della tradizione di quasi tutte le culture. In Oriente le sostanze aromatiche erano spesso considerate molto più che semplici profumi, esse venivano impiegate infatti in ambito sia liturgico che terapeutico. Gli Egizi erano coloro che utilizzavano maggiormente gli oli essenziali. Alcuni manoscritti su papiro del 2800 a.C. registrano l'uso di molte erbe medicinali, di oli e di profumi. Resine e oli venivano infatti impiegati dagli Egizi per le operazioni di imbalsamazione ma anche per la cosmesi. Dagli Egizi impararono poi soprattutto i Greci. Il primo a registrare il metodo della distillazione, intorno al 425 a.C., e a fornire numerosi altri dettagli riguardanti profumi e altri materiali odorosi fu Erodoto.

Anche Ippocrate, considerato universalmente come “padre della medicina”, prescriveva cure a base di unguenti aromatici.

Tra il Settimo e il Tredicesimo secolo d.C. in Arabia ci furono molti miglioramenti nelle tecniche usate per la distillazione e ciò permise di ottenere oli essenziali puri e acque aromatiche. L'acqua di rose divenne uno dei profumi più diffusi e giunse in Occidente insieme ad altre essenze e al metodo della distillazione.

La prima testimonianza scritta autentica riguardante la distillazione di oli essenziali è stata attribuita a Villanova (1235-1311 d.C.), fisico catalano.

Durante il Medioevo, a causa dell'assenza in Europa delle piante orientali, si iniziarono a sperimentare erbe indigene quali rosmarino, salvia, menta e lavanda. Già dal Sedicesimo secolo erano in vendita nelle farmacie alcuni oli noti come "oli chimici", dedicati alla cura del corpo e della mente, e nello stesso periodo furono pubblicati numerosi erbari.

Per tutto il Rinascimento i materiali aromatici fecero parte delle farmacopee, rappresentando per secoli la principale forma di prevenzione contro le epidemie. Nel corso dei secoli successivi i farmacisti presero ad analizzare e a registrare le proprietà e applicazioni medicinali di un crescente numero di nuovi oli essenziali. Grazie alla Rivoluzione scientifica che ebbe luogo all'inizio dell'Ottocento i chimici furono in grado di identificare i vari componenti degli oli essenziali, chiamandoli con nomi specifici come ad esempio "geraniolo" e "limonene".

Le entusiasmanti ricerche posero le fondamenta dello sviluppo dei sostituti sintetici degli oli e della nascita della moderna industria farmaceutica. La fitoterapia e l'aromaterapia persero la loro credibilità tanto che mezzo secolo fa l'impiego terapeutico di erbe e oli essenziali non era visto di buon occhio ed era persino ufficialmente proibito, perché visto come forma di cura arcaica. Ma gli ultimi anni sono stati testimoni di una straordinaria rinascita dell'interesse per i metodi di cura naturali. La medicina erboristica ha raggiunto un buon grado di credibilità agli occhi di molti medici e dell'opinione pubblica in generale.

Il mondo scientifico sta, infatti, rivalutando il valore dei rimedi naturali: a mano a mano che vengono riconosciuti l'efficacia a volte limitata e gli effetti collaterali indesiderabili di alcuni farmaci di sintesi, gli oli essenziali tornano ad ottenere i dovuti riconoscimenti.

I componenti degli oli essenziali, o meglio delle essenze, sono metaboliti secondari della pianta, cioè sono prodotti del metabolismo che non partecipano direttamente alla crescita e allo sviluppo dell'organismo (Lawless, J.1992).

Nelle piante si possono individuare due tipi di metabolismo: il metabolismo primario e il metabolismo secondario.

Il metabolismo primario consiste nella biosintesi di sostanze indispensabili per lo sviluppo e il funzionamento delle strutture biologiche. I protagonisti del metabolismo primario, detti metaboliti primari, sono molecole che si trovano in tutte le cellule vegetali. Sono metaboliti primari gli zuccheri semplici, le proteine, i grassi e gli acidi nucleici.

Il metabolismo secondario, invece, riguarda la sintesi di molecole le cui funzioni riguardano tutti gli aspetti delle interazioni chimiche con l'ambiente circostante. Tali metaboliti, detti secondari sono caratterizzati dal basso peso molecolare e hanno una distribuzione delimitata sia all'interno di una stessa pianta sia nelle differenti specie vegetali. Esempi di metaboliti secondari sono appunto i componenti degli oli essenziali (terpeni, fenoli).

I vegetali infatti sono capaci di sintetizzare una grande varietà di altri composti, oltre ai metaboliti primari, indispensabili alla loro vita; alcuni di essi sono, dal punto di vista chimico, semplici mentre altri sono complessi. La biosintesi di metaboliti secondari avviene attraverso vie metaboliche che usano prodotti intermedi del metabolismo primario (Raven, P.H. et al 2002). Tale sintesi avviene generalmente in uno specifico tessuto o tipo di cellula, in un determinato stadio dello sviluppo. I metaboliti secondari sono prodotti in vari compartimenti della cellula e vengono conservati all'interno dei vacuoli. Molto spesso essi sono sintetizzati in una parte ben precisa della pianta e vengono immagazzinati in un'altra; inoltre, la loro concentrazione nella pianta varia, spesso significativamente, nel corso delle 24 ore. I processi del metabolismo primario e secondario sono strettamente connessi tra loro, tuttavia, la pianta utilizza il metabolismo primario per produrre metaboliti secondari solo se il metabolismo primario possiede sufficiente energia e reagenti per svolgere a pieno le sue funzioni normali, senza che queste vengano in alcun modo alterate o interrotte.

In condizioni favorevoli i metaboliti secondari vengono prodotti in quantità significative dalle piante, sebbene tali quantità siano decisamente inferiori in rapporto ai metaboliti primari (Pedretti, M. 2003).

Le funzioni dei metaboliti secondari sono tuttora in gran parte sconosciute, tuttavia, non sono più considerati dei rifiuti come una volta, ma si è potuto constatare che essi sono importanti per la sopravvivenza e la propagazione della pianta che li produce. Molti di essi agiscono come un segnale chimico che permette alla pianta di rispondere agli attacchi dell'ambiente; altri agiscono come sostanze di difesa contro gli erbivori, i patogeni e i competitori. Vi sono, inoltre, metaboliti che

forniscono alla pianta protezione contro le radiazioni solari e, infine, altri che aiutano nella dispersione di polline e semi.

Gli oli essenziali sono miscele molto complesse di metaboliti secondari. Ogni tipo di olio essenziale ha la sua specifica composizione chimica che varia non solo in base alla specie ma alle caratteristiche specifiche della pianta.

Nonostante la composizione chimica degli oli essenziali sia molto complessa, è possibile riunire i componenti in alcuni gruppi fondamentali sulla base degli elementi presenti nei composti:

Composti contenenti carbonio e idrogeno

- idrocarburi monoterprenici (C₁₀) alifatici e aromatici insaturi mono e biciclici: limonene, mircene, pinene, canfene, terpinene, sabinene, fellandrene, silvestrene.
- idrocarburi sesquiterprenici (C₁₅): cardinene, selinene, umulene, cariofillene, cedrene.
- azuleni: camazulene, eucazulene, gajazulene, vetivazulene.
- idrocarburi diterprenici (C₂₀): canforene, cupressene.

Composti contenenti carbonio, idrogeno e ossigeno

- alcoli: geraniolo, linalolo, terpineolo, mentolo, nerolo, citronellolo, borneolo, mirtenolo, santalolo, farnesolo.
- aldeidi: aldeide cinnamica, aldeide benzoica, aldeide anisica, vanillina, citrale, citronellale.
- chetoni: carvone, tujone, canfora, mentone, fencone, pulegone.
- eteri: eucaliptolo, safrolo, estragolo, anetolo, apiolo.
- esteri: acetato di linalile, salicilato di metile, acetato di geranile, acetato di bornile, benzoato di benzile, acetato di terpenili.
- acidi organici: acido benzoico, acido cinnamico, acido salicilico, acido cuminico.
- perossidi: ascaridolo
- fenoli: timolo, eugenolo, carvacrolo.

I composti fenolici comprendono i flavonoidi, i tannini, le lignine e l'acido salicilico. Il termine fenolici comprende un'ampia gamma di composti, i quali hanno tutti un gruppo ossidrilico legato ad un anello aromatico. Essi sono presenti in quasi tutte le piante e si possono accumulare in tutte le loro parti (Haart H. et al 2008).

Composti contenenti carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto e zolfo

➤ derivati solfo-cianici e solforati.

Tra questi tipi di composti è possibile evidenziare tre classi principali: gli alcaloidi, i terpenoidi e i composti fenolici.

I principali costituenti chimici degli oli sono rappresentati da terpeni che sono idrocarburi con formula generale $(C_5H_8)_n$.

Essi sono biomolecole costituite da multipli dell'unità isoprenica (sono chiamati anche isoprenoidi), e possono essere lineari, ciclici o entrambi. Essi rappresentano la classe più abbondante di metaboliti secondari, in quanto comprendono più di 22000 composti descritti.

Ogni unità isoprenica è costituita da cinque atomi di carbonio e viene legata ad altre unità isopreniche in diversi modi. Le varie unità che costituiscono i terpeni possono essere modificate e contenere elementi diversi da carbonio e idrogeno (Cozzi R. et al 1997; Ali N.A. et al 2010).

I terpeni vengono sintetizzati dalla pianta, a partire da acetato, attraverso un intermedio biochimicamente molto importante, il pirofosfato di isoprenile .

Essendo il più ampio gruppo di sostanze naturali vegetali, i terpeni nelle piante sono coinvolti in un'ampia varietà di processi, dalla fotosintesi e la crescita, alla riproduzione e la difesa. Una singola pianta può sintetizzare molti diversi terpenoidi, in tempi differenti durante il suo sviluppo e localizzati in parti diverse della pianta.

I terpeni vegetali non solo giocano un ruolo fondamentale nelle piante, ma sono anche impiegati come aromi, fragranze e medicinali.

Essi vengono classificati in base al numero di subunità (unità isopreniche (C_5H_8)) contenute nella loro struttura.

I composti con una sola unità isoprenica (C_5) sono piuttosto rari in natura, mentre quelli con due o tre unità (C_{10} e C_{15}), i cosiddetti monoterpeni e sesquiterpeni, sono assai frequenti.

Gli oli essenziali contengono in prevalenza monoterpeni e sesquiterpeni che non hanno un peso molecolare alto e proprio per questo a temperatura ambiente sono liquidi. Sono esempi di terpeni: il geraniolo, il mentolo, la canfora, il limonene e il pinene.

Oltre ai terpeni, tra i componenti degli oli essenziali vi sono anche i fenoli o altri idrocarburi ossigenati. Talvolta sono presenti anche acidi, lattoni (composti chimici la cui struttura è costituita da un estere ciclico) e composti contenenti zolfo o azoto.

La tipologia e la quantità dei componenti dell'olio essenziale ne determinano e ne caratterizzano le proprietà.

La varietà e la ricchezza dei composti contribuisce alle caratteristiche peculiari di ciascun olio. In alcuni oli essenziali può predominare un solo costituente, in altri non c'è un singolo componente che prevale, ma un equilibrio di vari composti. Anche i componenti presenti in minime tracce possono influenzare in modo preponderante l'attività biologica dell'olio essenziale stesso.

Dato che i componenti degli oli essenziali sono metaboliti secondari la composizione chimica dell'essenza subisce una forte influenza dell'ambiente esterno.

La composizione di un'essenza è influenzata dal clima e in particolare dalla stagionalità. Altri parametri importanti che influiscono sulla composizione delle essenze sono l'area geografica dove è cresciuta la pianta, l'altitudine, il tipo di terreno, la presenza di differenti quantità d'acqua, la pendenza del terreno, le modalità di coltivazione e, fattore molto importante, la durata della foto esposizione (esposizione alla luce del sole) infatti, la formazione delle essenze è strettamente legata all'azione della luce e del calore del sole (Piccaglia, R. et al 1993).

Anche i fattori genetici ed epigenetici influenzano la composizione di un'essenza. È noto infatti che tra gli individui di una stessa specie è sempre possibile evidenziare una variabilità nei caratteri morfologici e biochimici.

Per questi motivi, anche piante dello stesso genere o della stessa specie, possono produrre oli che si diversificano in parte nella composizione e nel contenuto dei diversi principi attivi (Heinrich, M. et al 2004).

Gli oli essenziali sono, nella maggior parte dei casi, liquidi a temperatura ambiente, di consistenza oleosa e più o meno fluidi. Essi sono insolubili o poco solubili in acqua (sulla quale galleggiano), alla quale però trasmettono il loro aroma perché lievemente idrofili. Sono invece solubili in alcol, etere, cloroformio e nella maggior parte dei solventi organici. Sono tutti dotati, a causa della loro volatilità, di odore aromatico forte e per lo più gradevole. Questa caratteristica li contraddistingue tra l'altro dagli altri oli o lipidi.

Nonostante la diversa e variabile composizione chimica degli oli essenziali, essi hanno in comune alcune proprietà generali: antisettiche, antibatteriche e antifungine.

Alcuni oli essenziali possiedono inoltre anche proprietà antiossidanti, antivirali, analgesiche, antinfiammatorie, antitossiche, astringenti, digestive, drenanti, tonificanti, cicatrizzanti, immunostimolanti, mucolitiche ed espettoranti.

Le essenze sono particolarmente abbondanti nelle piante appartenenti alle famiglie delle *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Geraniaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Verbenaceae* (Standen, M.D. et al 2004; Ceoloni M. et al 2006).

Esse vengono sintetizzate in diverse parti della pianta a seconda della specie (steli, foglie, gemme, fiori, frutti, semi, legno e radici), sebbene siano generalmente sintetizzate nelle parti aeree. Le essenze sono spesso accumulate sotto forma di minuscole goccioline, negli spazi intercellulari o in strutture di secrezione interne o esterne come ad esempio nei canali resiniferi, molto diffusi in tutti gli organi della maggior parte delle conifere; questi sono tappezzati internamente da cellule secernenti, cellule vive che producono e secernono la resina nei dotti stessi, e delimitati da una guaina con pareti ispessite, nelle tasche lisigene (puntini visibili ad occhio nudo nella buccia dei frutti degli agrumi che si presentano, in sezione, come cavità sferiche, non chiaramente delimitate, in prossimità dell'epidermide). Si formano in seguito alla morte e alla disgregazione delle cellule secernenti contenenti oli essenziali, che procede dal centro verso l'esterno della tasca (Campbell N. et al 2006). Il secreto è quindi costituito dagli oli essenziali e dai resti delle cellule secernenti e dei peli ghiandolari esterni o tricomi ghiandolari, sottili escrescenze o appendici di piante che possono essere uni o pluricellulari.

Tutte le cellule possono essere secernenti, però nei tricomi più elaborati (ad esempio quelli della menta), generalmente si distingue una testa formata da ghiandole secernenti ricoperte da una spessa cuticola che forma una pellicola continua. Il prodotto della secrezione, costituito da oli essenziali, si accumula spesso al di sotto della cuticola che si stacca perciò dalla parete sottostante; la cuticola si può rompere e il prodotto della secrezione viene liberato.

Le essenze sono presenti nelle piante in piccole quantità rispetto alla massa del vegetale, generalmente la loro quantità varia dallo 0,01% al 10%.

Il ruolo delle essenze nella pianta resta ancora in gran parte sconosciuto; tuttavia il riconoscimento delle proprietà biologiche di molti composti degli oli essenziali ha aumentato l'interesse in questo campo per la ricerca di nuovi farmaci, antibiotici, insetticidi ed erbicidi ed ha portato ad una rivalutazione della funzione che questi assumono nelle piante, specialmente nel contesto ecologico (Enan E. 2001). È noto, infatti, che molti di questi composti hanno un importante significato adattativo nella

protezione contro gli erbivori e gli attacchi da parte di funghi e batteri. Il potere antimicrobico degli oli essenziali viene quindi già sfruttato in natura e questo dimostra in qualche modo la loro efficacia.

Gli oli essenziali possono giocare un ruolo importante anche come attrattivi per gli impollinatori invitandoli a cibarsi della pianta e a deporvi le uova.

Gli insetti sono inoltre particolarmente sensibili alle molecole aromatiche perché comunicano tramite messaggi chimici; gli oli essenziali interferiscono con gli organi sensoriali degli insetti, interagendo con le loro attività (ad esempio la ricerca del loro obiettivo) e i loro comportamenti.

Gli oli essenziali nella pianta possono svolgere una funzione allelopatica e cioè intervenire nella competizione interspecifica (cioè riduzione della sopravvivenza o dell'accrescimento di una popolazione a causa della presenza di altre specie interferenti) tra specie diverse di piante.

Il fenomeno dell'allelopatia consiste nel rilascio nel terreno, da parte di una pianta, di sostanze che inibiscono la crescita e lo sviluppo di piante concorrenti. L'allelopatia riduce la competizione interspecifica, perché diminuisce o elimina altre piante potenzialmente competitive nella disponibilità delle risorse come nutrienti, acqua o luce.

In alcuni casi invece i composti contenuti negli oli essenziali costituiscono prodotti di rifiuto della pianta, dispersione dei semi attraverso gli animali; ma anche come repellenti per gli insetti.

Diverse piante producono infatti dei profumi per attirare gli insetti per farli partecipare all'impollinazione altre, al contrario, sintetizzano, per allontanarli, sostanze insetto-repellenti e persino insetticidi capaci di interferire coi loro processi fisiologici e biochimici. Le essenze possono infatti agire come segnali biochimici che vengono recepiti dagli insetti come deterrente scoraggiandoli a cibarsi della pianta e a deporvi le uova.

Date le numerose proprietà oggi giorno gli oli essenziali vengono utilizzati, in particolare nell'industria alimentare, come aromatizzanti e come conservanti, nell'industria cosmetica, come profumi e nell'industria farmaceutica quali componenti di medicinali. Gli oli essenziali sono inoltre utilizzati in ambito domestico come cosmetici, per bagni profumati e massaggi, per profumare gli ambienti e infine, come insetticidi (Lee, K. 2004).

Nella medicina popolare così come in aromaterapia, gli oli essenziali e le molecole aromatiche sono state usate e tutt'ora lo sono, come agenti terapeutici.

Il potenziale terapeutico degli oli essenziali non è stato ancora stimato in tutta la sua portata. Resta ancora molto da scoprire riguardo il loro aspetto farmacologico, benché molte erbe medicinali siano impiegate fin dai tempi antichi. Questo è dovuto alla grande complessità della composizione degli oli essenziali, che contengono numerosissimi composti diversi (Capasso F. et al 2008; Goodman e Gilman 2013). Come norma generale, è preferibile impiegare gli oli essenziali solo diluiti ed omogeneizzati in una sostanza naturale neutra (eccipiente) prima di venire somministrati o applicati per via esterna. Lo rende consigliabile l'elevata concentrazione degli oli e la potenziale irritazione o il possibile danno che possono causare in forma non diluita alle mucose o alla pelle.

L'impiego di un buon eccipiente è spesso la chiave del successo terapeutico; il suo ruolo principale è quello di diluire e disperdere gli oli essenziali e facilitarne il dosaggio e l'assorbimento. Se l'eccipiente usato possiede inoltre delle proprietà emulsionanti, gli oli essenziali potranno mescolarsi con i liquidi acquosi, facilitando così la loro dispersione e la loro penetrazione nei tessuti (Bakkali F. et al 2008).

Esistono diverse modalità di impiego terapeutico degli oli essenziali:

l'assunzione per via orale: gli oli essenziali possono essere usati per via orale per trattare un'infezione del tubo digerente (diarrea, problemi di flora intestinale).

L'ambiente del tratto digerente è essenzialmente un ambiente "acquoso": è dunque importante che gli oli essenziali ingeriti siano diluiti e ben emulsionati (grazie ad un particolare eccipiente) in una soluzione acquosa. Più l'emulsione è omogenea, più gli oli essenziali saranno attivi e non irritanti.

L'assunzione per via rettale: l'uso di supposte permette un assorbimento rapido ed efficace degli oli essenziali. Questa è la via più pratica e più raccomandabile per i bambini. È anche utile per le persone che non possono assumere oli essenziali per via orale.

L'applicazione cutanea: gli oli essenziali possono essere applicati sulla pelle o sul cuoio capelluto. Oltre ad essere usati per dei massaggi terapeutici, essi permettono di disinfettare o di trattare alcune patologie della pelle (piaghe, ascessi, funghi e micosi, infezioni varie, eczemi). Per l'applicazione sulla pelle occorre utilizzare degli eccipienti come degli oli vegetali o saponi liquidi, oppure si può usare una preparazione di oli essenziali dispersi in una soluzione acquosa od un'emulsione (olio in acqua).

Il massaggio con gli oli essenziali rappresenta spesso la forma più diffusa di trattamento per quanto riguarda la loro applicazione cutanea.

L'applicazione sulla pelle attraverso il massaggio facilita l'assorbimento e la penetrazione dell'olio. Le molecole aromatiche entrano attraverso i follicoli piliferi e le ghiandole sudoripare ed essendo solubili nei lipidi possono penetrare anche attraverso il film idrolipidico della pelle. I capillari sanguigni sottostanti possono quindi assorbire l'olio essenziale che entra facilmente nel circolo sistemico.

È stato calcolato un diverso grado di assorbimento delle componenti aromatiche nel sangue, variabile dal 4% al 25%. La diffusione atmosferica: gli oli essenziali sono dei prodotti aromatici, dunque particolarmente adatti ad essere nebulizzati nell'atmosfera grazie a particolari diffusori.

Non sempre il "naturale" è benefico e innocuo e non sempre il "non convenzionale" è da preferire alla medicina ufficiale, infatti, la natura ci regala alcuni prodotti benefici e sicuri ma altri che bisogna evitare o trattare con cautela; tra le sostanze d'origine naturale troviamo molecole farmacologicamente molto attive, basti pensare ad esempio alla digitale attiva sul cuore e alla famosa cicuta di Socrate (Farmacopea E. V° Ed).

Da tutto ciò si evince che le cure alternative devono essere intraprese sotto controllo medico o persona competente e non autogestite, solo il corretto utilizzo conduce ad effettivi e sicuri risultati con il vantaggio di minori effetti collaterali rispetto ai farmaci di sintesi.

Il rimedio naturale va trattato con le dovute cautele per ottenere un beneficio senza incorrere in reazioni avverse che sempre più spesso sono segnalate quali:

- intossicazioni da abuso, da prescrizioni scorrette, da prodotti inquinati e/o contaminati;
- reazioni avverse fra prodotti naturali e terapie convenzionali;
- automedicazioni errate;
- allergie e intolleranze.

La confusione creatasi negli ultimi anni e le distorsioni inevitabili, quando i confini tra i vari prodotti sono poco definiti, come tra medicinale vegetale tradizionale, preparato erboristico o integratore con estratti vegetali, hanno determinato, all'interno di tale settore, una quantità di prodotti classificati come integratori alimentari a discapito dei prodotti erboristici.

Oggi, dal punto di vista giuridico, la classificazione di prodotti a base di piante che, pur diversi, hanno spesso caratteristiche simili, si basa sulla diversa finalità d'uso. Possiamo così parlare di:

- prodotti destinati ad un “impiego fitoterapico” che modificano, correggono o ripristinano le funzioni organiche dell’uomo, assoggettati alla normativa che regola i medicinali (DL.vo 24 aprile 2006, n. 219) “attuazione della direttiva 2001/83/CE) relativa al codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE e quindi vendibili esclusivamente in farmacia;
- prodotti dotati di “effetto di tipo salutistico” che favoriscono il normale funzionamento dell’organismo mediante azioni di tipo fisiologico, assimilati agli integratori alimentari (DL.vo 21 maggio 2004, n. 169) e quindi di libera vendita.
- in tale classificazione non figura “il prodotto erboristico” in quanto carente di una specifica legislazione che definisca la sua appropriata destinazione.

Meccanismo d’azione degli oli essenziali

Col termine “potere antimicrobico” si intende la capacità di un agente antimicrobico di rimuovere, inibire o uccidere i microrganismi.

Un agente antimicrobico è un agente chimico o fisico che interferisce con l’accrescimento e l’attività dei microbi. Questo termine designa, nell’uso comune, l’inibizione dell’accrescimento con riferimento a specifici gruppi di organismi (batteri, virus e funghi); si parla infatti di: antibatterico, antivirale e antimicotico detto anche antifungino (Ali N.A. et al 2010).

I numerosi processi e le sostanze impiegate (in questo caso oli essenziali) come agenti antimicrobici possono manifestare la loro attività in uno dei vari modi. I microrganismi vengono infatti inibiti o uccisi secondo un processo letale che inizia in uno specifico sito d’azione e una volta che è stato attivato il processo letale iniziale si instaura un effetto “domino” che può portare alla morte del microrganismo.

Si possono individuare le seguenti modalità d’azione antimicrobica:

- Danneggiamento della parete cellulare

La parete cellulare è una struttura importante, in quanto fornisce protezione e partecipa ad alcuni processi fisiologici della cellula.

Alcuni agenti possono inibire la formazione dei costituenti della parete cellulare dei batteri, con la risultante formazione di una struttura suscettibile a lisi e quindi a morte cellulare.

- Alterazione della permeabilità cellulare

La membrana citoplasmatica preserva l'integrità dei costituenti cellulari e assicura il trasporto selettivo delle sostanze nutritive nella cellula. Un danno a questa membrana può avere come effetto l'inibizione dell'accrescimento o la morte della cellula. L'attività antimicrobica dei composti fenolici è attribuibile al loro effetto sulla permeabilità cellulare. Queste sostanze infatti hanno la capacità di annullare la permeabilità selettiva della membrana, permettendo la fuga dei costituenti cellulari. L'azione battericida di questi agenti può essere correlata con la fuga d'azoto e fosforo dalla cellula. Nella membrana batterica risiedono parecchi enzimi e quindi un'alterazione della membrana può influenzarne negativamente il funzionamento.

- Alterazione delle proteine e degli acidi nucleici

La sopravvivenza di una cellula è associata alla conservazione delle proteine e degli acidi nucleici. Una condizione o una sostanza che alteri queste molecole, cioè denaturi proteine o acidi nucleici, può danneggiare irreversibilmente la cellula. Temperature elevate provocano ad esempio una denaturazione di questi costituenti cellulari.

- Inibizione dell'azione enzimatica

Ciascuno dei numerosi differenti enzimi presenti nella cellula rappresenta un potenziale bersaglio per un inibitore. L'inibizione delle reazioni che forniscono energia (ATP) risulta particolarmente dannosa. Alcuni agenti sono in grado di danneggiare i costituenti cellulari in misura tale che essi non sono più in grado di svolgere le normali funzioni metaboliche. Per esempio, l'attività di molti enzimi dipende da uno dei loro componenti, il gruppo solfidrilico. Un agente ossidante può alterare questo gruppo e inattivare gli enzimi.

Esistono alcuni casi di inibizione il cui danno iniziale è un'interferenza in una biosintesi specifica. Molti composti essenziali per il metabolismo microbico possono essere bloccati da composti strutturalmente simili al metabolita naturale, ma lievemente diverso da esso. Tali sostanze vengono chiamate antimetaboliti.

- Inibizione della sintesi degli acidi nucleici

Certe sostanze chimiche sono potenti inibitori della sintesi dell'RNA e del DNA. Due categorie di sostanze inibiscono la sintesi degli acidi nucleici: i composti che interferiscono con la formazione delle unità costitutive degli acidi nucleici, e cioè delle basi azotate, e i composti che interferiscono con la polimerizzazione dei nucleotidi in acidi nucleici. Il ruolo fondamentale del DNA e dell'RNA nella cellula

suggerisce che qualunque interferenza con la loro formazione e funzione danneggia gravemente la cellula.

Condizioni che influenzano l'azione antimicrobica. In generale la temperatura è in grado di influenzare l'attività antimicrobica di un dato agente antimicrobico in quanto un suo aumento accelera la distruzione dei microrganismi.

Una piccola quantità di agente chimico a una temperatura elevata conseguirà un risultato analogo di una maggior quantità della stessa sostanza a temperatura più bassa. Anche lo stato fisiologico degli organismi può influenzare la sensibilità ad un agente antimicrobico.

Le cellule giovani, che metabolizzano attivamente, possono essere distrutte più facilmente delle cellule vecchie, nel caso di un agente che interferisce col metabolismo: le cellule che non fossero in accrescimento non verrebbero influenzate.

Un altro importante fattore che influenza il potere antimicrobico è l'ambiente, cioè le proprietà chimiche e fisiche del mezzo o della sostanza in cui risiedono gli organismi. L'efficacia del calore per esempio, è molto maggiore in un ambiente acido che in uno basico. La presenza di materia organica estranea può ridurre notevolmente l'efficacia di un agente chimico antimicrobico inattivandolo o proteggendo il microrganismo dalla sua azione (Prabuseenivasan, S. et al 2006). Infatti l'agente antimicrobico si potrebbe combinare con la sostanza organica per formare un prodotto non microbica, oppure si potrebbe combinare con la sostanza estranea e formare un precipitato, impedendo la sua possibile combinazione con i microrganismi, o, infine, la sostanza organica si potrebbe accumulare sulla superficie della cellula microbica, costituendo un rivestimento che riduce il contatto fra l'agente antimicrobico e la cellula.

Le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali

Questa ricerca è incentrata sul potere antibatterico degli oli essenziali, e cioè sulla capacità dei loro costituenti di uccidere i batteri o di impedirne l'accrescimento.

Un agente antimicrobico infatti può avere funzione battericida, cioè in grado di uccidere i batteri, o batteriostatica, cioè capace di impedire l'accrescimento dei batteri, realizzando una condizione nota come batteriostasi. Il potere antibatterico è l'area più studiata degli oli essenziali e questa proprietà è l'unica che è realmente ben conosciuta e usata regolarmente (Deriu A. et al 2008).

Negli ultimi anni l'indiscriminato uso di antibiotici ha portato ad una selezione degli agenti patogeni che diventano sempre più resistenti ai tradizionali antibiotici. La lotta antimicrobica con medicinali naturali ha riscoperto negli oli essenziali dei presidi terapeutici di tutto rispetto per il loro elevato potere battericida e batteriostatico, cioè per la loro inequivocabile capacità di uccidere i batteri patogeni o di inibirne la moltiplicazione senza interferire negativamente, quando sono somministrati per via interna, con la flora dell'intestino. Il potere antimicrobico degli oli essenziali è conosciuto da molti anni; in particolare gli oli essenziali di *Melaleuca alternifolia* L., *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita* L. e *Rosmarinus officinalis* L. vengono e venivano utilizzati per il trattamento di infezioni batteriche e micotiche (Ali S.M. et al 2005 ; Nguetack, J. et al 2009).

I primi studi scientifici riguardanti il potere degli oli essenziali risalgono al 1887 per opera di Chamberland che dimostrò l'azione microbica degli oli essenziali di: origano, cannella e garofano sul *Bacillus anthracis*, di timo sul bacillo di *Eberth*, sullo stafilococco, sul bacillo di *Löffler* (difterite), sul meningococco e sul bacillo di *Koch*. A questi lavori seguirono i contributi di numerosi altri ricercatori. I lavori sperimentali dei primi studiosi consentirono di stabilire una gerarchia di attività antisettica degli oli essenziali usando come standard di riferimento il fenolo, l'antisettico maggiormente usato a quei tempi. Il metodo per giungere a questa determinazione fu quello messo a punto da due microbiologi inglesi, Rideal e Walker (1921), consistente nel misurare la minima concentrazione di olio essenziale capace di sterilizzare, in un certo tempo ed ad una temperatura, una sospensione batterica contenente un numero definito di cellule per millimetro cubo. In un secondo tempo la medesima operazione veniva eseguita usando come agente sterilizzante il fenolo. Il rapporto tra la minima concentrazione sterilizzante (M.C.S.) dell'olio essenziale in esame è quella del fenolo venne definito "coefficiente fenolo" ($K_f = \text{M.C.S. olio essenziale} / \text{M.C.S. fenolo}$). In base al test di Rideal-Walker il coefficiente fenolo deve essere interpretato come un indice che esprime quante volte l'olio essenziale esaminato è più attivo del fenolo. In epoca più recente venne messa a punto una nuova metodica per la valutazione in vitro del potere antisettico degli oli essenziali: l'aromatogramma. Esso consente d'individuare gli oli essenziali dotati di maggiore attività antimicrobica su un ben preciso ceppo batterico patogeno. Questa tecnica consiste nel misurare il diametro degli aloni di inibizione formati intorno a dischetti impregnati di oli essenziali e posti sopra una colonia batterica (Dorman H. J.D. et al 2000).

Scopo della tesi

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare la composizione fitochimica, l'attività biologica "*In vitro*" (antimicrobica, citotossica, antiossidante e anti-proliferativa) sino ad arrivare alla valutazione clinica di alcuni oli essenziali.

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati diversi oli essenziali e con varie metodiche è stata valutata la capacità antibatterica nei confronti di particolari ceppi clinici Gram positivi, Gram negativi e miceti (*Candida spp.*, *Malassezia spp.*).

Minima concentrazione battericida/fungicida (MBC/MFC) oli essenziali nei confronti di batteri e funghi.

Gli oli essenziali in esame sono stati diluiti in terreno Luria Broth (LB) liquido (nel caso di ceppi fungini in terreno Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640) con 0.5% di Tween 80 alle concentrazioni V/V dal 16% allo 0.0005%. Il saggio è stato eseguito in piastre a 96 pozzetti in un volume finale di 200 µl totali per pozzetto: 100 µl dell'appropriato terreno di coltura e 100 µl di inoculo batterico/fungino alla concentrazione di 10⁶ UFC/mL. Ogni ceppo viene saggiato in doppio e viene incluso in ogni test un controllo positivo di crescita (il ceppo in esame senza olio essenziale) e uno negativo (solo terreno). La piastra viene incubata a 37 °C e la MBC/MFC viene determinata prelevando 10 µl da ogni pozzetto e seminandoli su LB agar o Sabouraud-Dextrose agar. Le piastre vengono incubate a 37 °C per 24/48 h e controllate per rilevare la crescita microbica. La MBC/MFC viene considerata la concentrazione più bassa in grado di inibire la crescita batterica al 99%. Ogni esperimento è stato eseguito in duplicato e ripetuto tre volte. Non è stato possibile determinare la MIC perché le soluzioni risultano troppo torbide, anche per una lettura spettrofotometrica.

Citotossicità nei confronti di linee cellulari.

Le cellule prescelte sono state coltivate in terreno Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), supplementato con il 10 % di siero fetale bovino e 100 U/ml di penicillina e streptomina, e incubate a 37°C e al 5% di CO₂.

E' stata preparata una piastra a 96 pozzetti (200 µl per pozzetto di coltura cellulare alla concentrazione di 1,5x10⁵ cellule/mL) di cui una fila di controllo e una fila di solo terreno (utilizzata per la lettura). Il giorno successivo è stato aspirato il surnatante dai pozzetti e sono state preparate le diluizioni degli oli in esame in un intervallo di concentrazione V/V dal 16% allo 0.0005%.

Le diluizioni sono state preparate nel terreno di coltura con l'aggiunta di 0.5% di Tween 80 (100 µl per pozzetto di terreno, tranne la prima fila orizzontale, in quest'ultima saranno dispensati 200 µl di olio essenziale in esame al 16%). Una volta eseguite le diluizioni la piastra viene incubata overnight a 37°C e al 5% di CO₂. A questo punto sono stati aspirati gli oli essenziali dalla piastra a 96 pozzetti, dopo di che sono stati eseguiti due lavaggi con PBS e aggiunti 100 µl di terreno di coltura senza siero più un decimo di soluzione MTT (3-µ4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromide) /PBS. Segue una incubazione di 4 h a 37°C al 5% di CO₂ e successivamente l'aggiunta della soluzione di solubilizzazione (M-8910 MTT solubilization solution - 10% Triton X-100 plus 0,1N HCl in anhydrous isopropanol). Dopo 15 minuti di incubazione a T ambiente è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro a 570 nm. La percentuale di vitalità viene calcolata secondo la seguente formula:

$$\begin{aligned} \% \text{ di vitalità cellulare} &= (\text{OD (570) campione testato}) / \\ & / (\text{OD (570) controllo negativo}) = R \\ & = R \times 100 = \% \text{ vitalità cellulare} \end{aligned}$$

Se la percentuale dovesse essere superiore al 60% si potrà considerare una buona vitalità e quindi un olio che non presenta citotossicità, una percentuale inferiore a 60% verrà considerata indice di citotossicità.

Saggio di sterilità prodotti cosmetici.

E' stato preparato il terreno solido Plate Count Agar (PCA) ed è stato mantenuto liquido a una temperatura di circa 55°C. Da ogni prodotto in esame è stato prelevato sterilmente un grammo (o un mL nel caso di prodotti liquidi) che è stato miscelato con 25 mL di terreno PCA e posto in una piastra Petri del diametro di 10 cm. Le piastre sono state lasciate solidificare e successivamente capovolte e chiuse con Parafilm. A questo punto sono state tenute a T° ambiente per 4 giorni e successivamente sono state osservate per rilevare l'eventuale comparsa di colonie batteriche/fungine.

Challenge test

La prova consiste nello "sfidare" la preparazione, possibilmente nel suo contenitore finale, con un determinato inoculo di microrganismi adatti, lasciando la preparazione inoculata ad una temperatura prescritta e prelevando campioni dal contenitore a intervalli specifici di tempo e contando il numero di organismi presenti nei campioni prelevati. Le proprietà conservanti del preparato sono adeguate se, nelle condizioni della prova, c'è una diminuzione significativa o nessun incremento, se del caso, del numero dei microrganismi nella preparazione inoculata nei tempi ed alla temperatura prescritta. I criteri di accettazione, in termini della diminuzione del numero di microrganismi nel tempo, può variare per i diversi tipi di preparati a secondo del grado di protezione previsto .

Microrganismi da utilizzare:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus brasiliensis*

Per contare i microrganismi vitali nel prodotto inoculato, usare il terreno agarizzato utilizzato per la coltura iniziale dei rispettivi microrganismi. Seminare una serie di contenitori del prodotto che deve essere esaminato, ciascuno con una sospensione di uno degli organismi di prova per dare un inoculo da 10⁵ a 10⁶ microrganismi per millilitro o per grammo di preparato. Il volume della sospensione dell' inoculo non deve superare l' 1 per cento del volume del prodotto. Mescolare accuratamente per

garantire una distribuzione omogenea. Mantenere il prodotto inoculato a 20-25 ° C, al riparo dalla luce. Prelevare un campione idoneo da ciascun contenitore, normalmente 1 ml o 1 g, a ore zero e ad intervalli appropriati, in base al tipo di prodotto, e determinare il numero di microrganismi vivi per piastra o su membrana di filtrazione. Assicurarsi che qualsiasi attività residua antimicrobica del prodotto venga eliminata mediante diluizione, mediante filtrazione o mediante l'uso di un inattivatore specifico. Quando vengono utilizzate le procedure di diluizione, una dovuta indennità è fatta per la ridotta sensibilità nel recupero di un piccolo numero di microrganismi vitali. Quando viene usato un inattivatore specifico, la capacità del sistema di supportare la crescita del test sugli organismi, è confermata dall'utilizzo di controlli adeguati.

La procedura viene convalidata per verificare la sua capacità di dimostrare la necessaria riduzione del numero dei microrganismi vitali.

Adesione

È stata studiata la capacità di adesione delle specie batteriche/fungine in esame. Le cellule prescelte sono state coltivate in terreno Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), supplementato con il 10 % di siero fetale bovino e 100 U/ml di penicillina e streptomina, e incubate a 37°C e al 5% di CO₂.

Successivamente le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti con coverslips e utilizzate alla semiconfluenza. I ceppi in esame sono stati coltivati overnight in terreno liquido e diluiti a una concentrazione finale di 10⁶ CFU/mL, 1 mL di questa sospensione è stato aggiunto a ciascun pozzetto contenente le cellule; quindi le piastre sono state centrifugate per 10 minuti a 1500 rpm. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37 ° C in 5% di CO₂, le cellule sono state lavate due volte con PBS, colorate con May-Grunwald-Giemsa e infine osservate al microscopio ottico. Per ogni vetrino sono state osservate 100 cellule ed è stata calcolata la media aritmetica del numero di batteri aderenti per cellula. Per valutare l'adesione batterica sono stati utilizzati i seguenti valori: <10 batteri/cellula (debolmente adesivi), 10-40 batteri/ cellule (mediamente adesivi) ≥ 40 batteri/cellula (fortemente adesivi). Ogni esperimento è stato eseguito in duplicato e ripetuto tre volte.

Formazione di biofilm.

Gli isolati prescelti sono stati coltivati overnight in terreno liquido a 37 ° C. Le colture sono state diluite 1:20 in terreno fresco e 200 µL di questa sospensione sono stati utilizzati per inoculare piastre sterili a 96 pozzetti. Dopo 24 ore a 37 ° C i pozzetti sono stati lavati con PBS lasciati asciugare in posizione capovolta e colorati con cristalvioletto 1% per 15 minuti. I pozzetti sono stati nuovamente lavati con PBS e il cristalvioletto è stato solubilizzato in 200 µL di etanolo-acetone (80:20 v/v). La densità ottica a 595 nm (OD595) è stata determinata utilizzando un lettore di micro piastre. I seguenti valori sono stati utilizzati per valutare la formazione del biofilm: $OD595 \leq 1$ (nessuna formazione di biofilm); $1 > OD595 \leq 2$ (debole formazione di biofilm); $2 > OD595 \leq 3$ (media formazione di biofilm) e $OD595 > 3$ (forte formazione di biofilm).

(Per valutare l'attività degli oli essenziali sulla formazione di biofilm, dopo due ore di formazione del biofilm, il terreno è stato scartato e i pozzetti sciacquati delicatamente due volte con PBS. Un totale di 200 µL di olio essenziale è stato diluito dal 16% allo 0,125% (v/v) e aggiunto nei pozzetti. Le piastre sono state quindi incubate per 24 ore a 37 ° C dopo di che i pozzetti sono stati lavati con PBS e colorati come descritto in precedenza. Il controllo positivo era costituito dall'inoculo senza EO.)

Formazione di biofilm (Ring test).

Due millilitri di terreno liquido addizionato con glucosio (0,25% p/v) in provette di vetro sono stati inoculati con un' ansata di microrganismi cresciuti overnight in piastra e incubati per 48 ore a 37 ° C. Successivamente il contenuto è stato decantato e lavato con PBS (pH 7,3) e le provette sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente. A questo punto le provette sono state colorate per 15 min con una soluzione di cristalvioletto al 4%: ciascuna provetta è stata ruotata delicatamente per garantire una colorazione uniforme e il contenuto è stato decantato. Le provette sono state fatte asciugare capovolte e quindi osservate per la formazione del biofilm, che è stato considerato positivo quando si osservavano anelli sulle pareti e il fondo. La formazione dell'anello all'interfaccia liquida non è stata considerata indicativa della formazione di biofilm. I risultati sono stati valutati visivamente come segue: 0 anelli-nessuna formazione di biofilm, 1 anello-debole formazione di biofilm.

Dr. Matthew Gavino Donadu, Studio di alcuni oli essenziali nella Pratica Clinica ,
Tesi di Dottorato in Scienze della vita e Biotecnologie ,
Università degli Studi di Sassari, Italia.

biofilm, 2 anelli-moderata formazione di biofilm e 3 anelli-forte formazione di biofilm.

Raccolta del materiale vegetale ed estrazione oli essenziali

Piante utilizzate per l'estrazione degli oli essenziali: "*Thymus vulgaris* – red thyme geraniol sel, *Lavandula angustifolia* Miller, *Lavanda sumian*, *Lavanda grosso*, *L. hybrida*, *L. vera*, *L. latifolia*, *Origanum vulgare*, *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso, *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium*, *Myrtus communis* L.. Per ciascuna di esse sono stati raccolti 3 Kg di materiale, in particolare le parti in cui è presente la maggior quantità di principio attivo, in modo da permettere tre replicazioni. Dopo la raccolta, sono state pulite per eliminare rametti o marciumi e tenuti in freezer a -20 °C sino alla loro lavorazione.

Per ogni campione abbiamo utilizzato 600 g di biomassa che sono stati sottoposti per 4 ore a idrodistillazione utilizzando un apparato tipo Clevenger, come da Farmacopea Ufficiale Italiana (FUI, XII ed.). La resa è stata calcolata come mg/100g di materiale fresco. L'olio essenziale è stato conservato in *vials* sotto atmosfera inerte e a -20 °C sino al momento dell'analisi.

Analisi gas cromatografica

Per l'identificazione e quantificazione dei costituenti dell'olio essenziale dei vari campioni è stato utilizzato un Hewlett-Packard Model 5890A GC, equipaggiato con un detector FID e collegato a una colonna capillare ZB-5 (Phenomenex) di silice gel lunga 60 m per 0.25 mm (I.D.), spessore del film 0.25µm interfacciato con una *work station* fornita di un programma di gestione per gascromatografia.

Gli oli sono stati iniettati utilizzando un auto campionatore HP 7673 impostato in modo da iniettare ogni volta 0,1 µL d'olio essenziale, lo split utilizzato è stato 1/80.

Le condizioni cromatografiche utilizzate sono state le seguenti:

- detector ed iniettore alla stessa temperatura di 280°C;
- temperatura iniziale del forno 50°C con un incremento termico di 5°C/min sino a raggiungere i 135 °C (per un minuto) seguito da un incremento termico di 5°C/min sino a raggiungere la temperatura di 225°C (5 minuti). Sempre con lo stesso

incremento termico si raggiungono i 260 °C e si rimane in queste condizioni per 10 minuti, in modo da permettere alla colonna di pulirsi da tutti gli eventuali residui; -carrier utilizzato: elio ppm ed il suo flusso mantenuto a 1mL/min.

Gli oli sono stati diluiti e per ogni campione sono state eseguite 4 iniezioni.

Per la quantificazione dei singoli composti si è fatto riferimento a uno standard interno, l'n-tetradecano, che ha permesso una corretta quantificazione dei singoli composti.

Per l'identificazione dei vari composti si è fatto riferimento ai tempi di ritenzione di ciascun composto, per questo motivo sono stati iniettati standard puri di riferimento (Fluka).

Analisi Gas Massa degli oli essenziali.

L'analisi gas massa è stata condotta utilizzando uno strumento Agilent Technologies model 7820A connesso ad un MS detector 5977E MSD (Agilent), ed utilizzando le stesse condizioni indicate per la GC. La colonna è stata connessa con la sorgente ionica dello spettrometro di massa. I parametri impostati per la sorgente di ioni sono stati i seguenti: 150 °C, 70eV per quanto riguarda l'energia di ionizzazione, EI e gli spettri di massa sono stati acquisiti in un range di 35-350 (tempo di scansione: 1s).

L'identificazione dei componenti è stata basata sulla comparazione dei valori del R_t e degli spettri di massa con quelli ottenuti dagli standard puri e/o con gli spettri della biblioteca NIST2011 e della libreria degli spettri di massa Wiley (NIST 2011; Adams, 2001) o sull'interpretazione della frammentazione EI di ogni molecola.

Proprietà antiossidanti

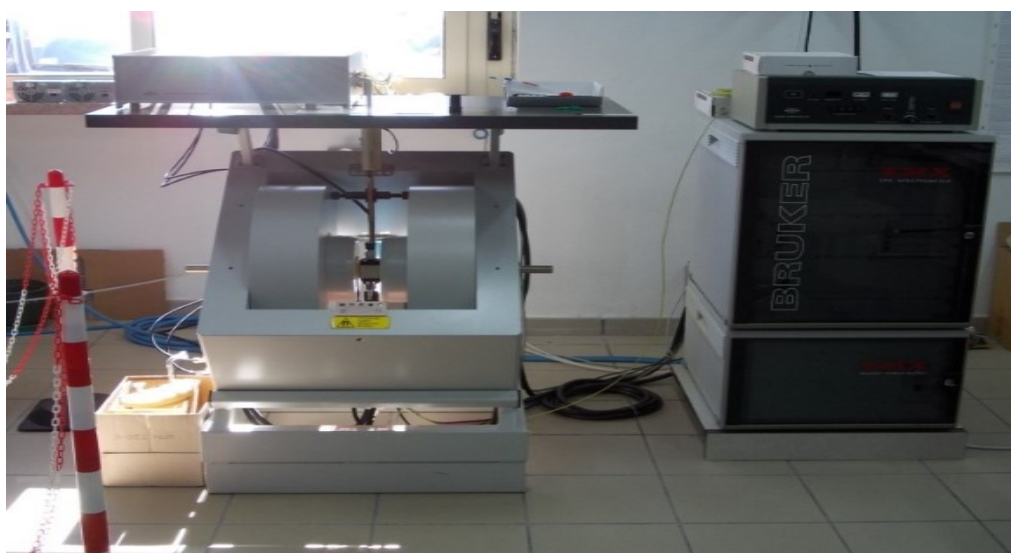
Per valutare le proprietà antiossidanti degli oli essenziali in esame sono stati due strumenti: uno spettrometro UV Perkin Elmer e un EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Bruker EMK

La spettrofotometria

È una tecnica analitica, qualitativa e quantitativa che permette il riconoscimento e la quantizzazione di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento della luce. L'analisi spettrofotometrica è applicabile, con determinati accorgimenti a tutte le sostanze; se la sostanza in esame è di per sé foto assorbente alla lunghezza d'onda scelta, è possibile una misura diretta, se non lo è si può farla partecipare ad una reazione chimica nella quale la sostanza stessa o un suo derivato reagisce con un colorante dando un prodotto finale colorato.



L'EPR è una tecnica spettroscopica impiegata per individuare e analizzare specie chimiche contenenti uno o più elettroni spaiati (chiamate specie paramagnetiche).

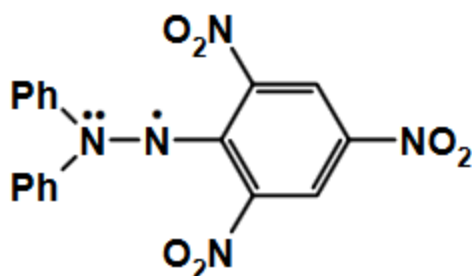


Queste specie includono: radicali liberi, ioni di metalli di transizione, difetti in cristalli, molecole in stato elettronico di tripletto fondamentale (ad es. l'ossigeno molecolare) o indotto per fotoeccitazione. I concetti basilari della tecnica EPR sono

analoghi a quelli della risonanza magnetica nucleare, ma in questo caso sono gli spin elettronici ad essere eccitati al posto degli spin dei nuclei atomici.

Per valutare la capacità antiossidante abbiamo utilizzato **il saggio DPPH+**.

La prova permette di determinare il potere antiossidante facendo reagire il campione da analizzare con una soluzione di DPPH [2,2-difenil-1-picrylhydrazyl, PM 394.33, C₁₈H₇₂N₅O₆] ed analizzando all'UV la diminuzione del picco a 517 del radicale.



Composti antiossidanti (AOH) che sono capaci di trasferire un atomo d'idrogeno al radicale, causano una decolorazione della soluzione. Si analizza quindi all'UV-Vis la diminuzione del picco a 517 nm del radicale (DPPH) dopo un tempo d'incubazione prestabilito. Questa diminuzione (decolorazione) è proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione. La reazione è stata fatta direttamente usando cuvette da 1.5 mL e utilizzando come bianco, una soluzione contenente solo il solvente MeCN.

Apparecchiature e reagenti

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| 1) bilancia analitica | 6) DPPH (MW = 394.32 g/mol) |
| 2) eppendorf | 7) Etanolo EtOH |
| 3) Vortex | 8) Acqua Deionizzata |
| 4) cuvette usa e getta | 9) Campioni di PRODOTTO |
| 5) Micropipette | |

Procedimento

- 1) Preparare 1 mL di DPPH 5 mM in EtOH (pesare 0.0019715 g in boccetta: riaggiustare il volume in base alla pesata)
- 2) Preparare i campioni da analizzare allo spettrofotometro nel seguente modo (su cuvetta):

Dr. Matthew Gavino Donadu, Studio di alcuni oli essenziali nella Pratica Clinica ,
Tesi di Dottorato in Scienze della vita e Biotecnologie ,
Università degli Studi di Sassari, Italia.

B. 950 μ L EtOH + 50 μ l Acqua Deionizzata

C. 850 μ L MeCN + 100 μ l DPPH 1 mM (Cfinale= 100 μ M) + 50 μ l Acqua Deionizzata

T. 850 μ L MeCN + 100 μ l DPPH 5 mM + 50 μ l soluzione **CAMPIONE**

3) Agitare le soluzioni con vortex

4) Leggere l'assorbanza da 400 a 900 nm del campione C contro il bianco (provetta "B")

5) Leggere l'assorbanza a 517 nm del campione T per 10 minuti contro il bianco (provetta "B") con le seguenti modalità:

Ciclo1 = Step 0.1 min per 0.5 min

Aggiunta del campione dopo la prima lettura

Ciclo2 = Step 0.05 min per 9.5 min

DPPH ha due applicazioni importanti, nella ricerca di laboratorio: uno è un indicatore di reazioni chimiche che coinvolgono radicali e un altro è uno standard della posizione e l'intensità di risonanza paramagnetica elettronica dei segnali.

DPPH è un noto radicale, e una trappola ("scavenger") per altri radicali. Pertanto, la riduzione di velocità di una reazione chimica dopo l'aggiunta di DPPH è utilizzata come indicatore del carattere radicale di quella reazione.

A causa di una forte banda di assorbimento centrata a 517 nm, il radicale DPPH ha un colore profondo violetto in soluzione, e diventa, con il procedere della reazione, incolore o giallo chiaro quando neutralizzato.

Questa proprietà consente il controllo visivo della reazione, e il numero di radicali iniziale può essere calcolato a partire dal cambiamento della assorbimento ottico a 517 nm o nel segnale EPR del DPPH.

Durante la reazione il DPPH⁺ passerà da avere una colorazione violacea a una gialla paglierino, che ci indicherà che il nostro composto ha delle proprietà antiossidanti.

Attività campioni di olio essenziale ottenuto in idrodistillazione:

Il nostro campione è costituito da 105,2 mg posto in un palloncino a cui vengono aggiunti 25 mL di EtOH, .Per facilitare la solubilizzazione del campione si tiene in agitazione per qualche minuto.

Sono stati preparati una serie di campioni come riportato in tabella:

I campioni contengono la soluzione in cui è sciolto l'analita ed il "bianco" di riferimento, che serve per eliminare gli assorbimenti della matrice.

Campione	Composizione	Ora di preparazione/analisi
Bianco	100 μ L DPPH+ , 1900 μ L EtOH	10:38/11:08
1	100 μ L olio, 100 μ L DPPH+, 1800 μ L EtOH	10:37/11:07
2	1000 μ L olio, 100 μ LDPPH+, 900 μ L EtOH	11:12/11:42
3	500 μ L olio, 100 μ LDPPH+, 1400 μ L EtOH	11:29/11:59
4	250 μ L olio, 100 μ LDPPH+, 1650 μ L EtOH	11:54/12:24
5	350 μ L olio, 100 μ LDPPH+, 1550 μ L EtOH	12:15/12:45

I primi due campioni sono stati confrontati a livello visibile, per renderci conto se il nostro campione possa avere delle caratteristiche antiossidanti; ed infatti dopo 30 minuti si è potuta notare la differente colorazione tra il campione bianco ed il campione 1; questo sta a significare che il nostro composto presenta attività antiossidanti.



UV-Vis
Camera di caricamento
cuvetta

Prima di iniziare l'analisi dei campioni allo spettrofotometro ed all'EPR, si sono eseguite delle letture all'UV del bianco .

Per quanto riguarda lo spettrofotometro il campione viene caricato all'interno di una cuvetta da 1000 μ L, rettangolare con 2 lati smerigliati, e 2 lati lisci (sezione nella quale passerà il fascio luminoso); viene caricato nello spettrofotometro e si inizia l'analisi.

(EPR) Cella al quarzo



Per quanto riguarda l'EPR, il campione è caricato all'interno di una cella piatta al quarzo.

Tra l'analisi di un campione e l'altro sia la cella al quarzo che la cuvetta sono lavati con acetone ed asciugati con azoto.

Risultati

FOCUS ON: TIMO

Thymus vulgaris L. (sin. *Thymus odoratus* Tourn, *T. niger* Tab., *T. durius* Dod), appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae*, è comunemente noto in Italia come timo, internazionalmente come *Thyme* o *Gardenthyme*. Il timo è una pianta perenne suffruticosa a fusti eretti fibro-legnosi di 20- 30 cm. Le foglie sono piccole, ovate, verdi con riflessi argentei, punteggiate di ghiandole. in infiorescenza subsferica o allungata con brattee lanceolate simili alle foglie ma più piccole; calice lungo 3-4 mm, con 10-13 nervi e tubo convesso sul dorso, vellutato con due labbri cigliati di

cui il superiore trifido a denti saldati su più di metà dell' altezza, l'inferiore bifido a denti lanceolato-lesiniformi, separati da un seno profondo; corolla roseo-biancastra lunga 5-6 mm, con tubo sporgente e dritto, bilabiata, con labbro superiore dritto e smarginato, l' inferiore trilobato; 4 stami sporgenti e divergenti, quasi eguali, con antere



biloculari, ellissoidali; stilo bifido, a lacinie corte, divergenti. Il frutto è un tetrachenio subsferico marrone. Il timo è pianta tipica dell'area mediterranea, balcanica e del Caucaso. Cresce in Italia dal mare alla regione montana (0-800 m. s.l.m.), ma preferisce le zone marine. Si trova nei luoghi aridi e soleggiati, fra le rocce e le ghiaie. La droga è costituita dalle foglie e dalle sommità fiorite (da raccogliere in maggio-luglio). L'olio essenziale di timo è una droga carminativa, antisettica, anti-tosse, espettorante, e spasmolitica, in quanto tale, viene utilizzato per il trattamento di tosse, bronchite, sinusite, pertosse e disturbi respiratori similari (Cosentino S. et al 1999; Juliano C. et al 2000; Cannas S. et al 2015).

Si ritiene che la maggior attività venga esplicata dal timolo, che è espettorante e fortemente antisettico. Il timolo è irritante e tossico se assunto a dosi elevate e quindi dovrebbe esser utilizzato con cautela. L'olio essenziale può essere assunto a piccole dosi di non oltre 0.3 ml a meno che non sia incluso in un collutorio, che non è destinato a essere ingerito in quantità significativa. Il timo oggetto del nostro studio è stato il *Thymus vulgaris* – *red thyme geraniol sel* nei confronti di cinque ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistenti isolati da pazienti con infezioni oculari , (**Tab.1**): ceppi isolati da tamponi oculari di pazienti affetti da endoftalmite

post-operatoria molto grave in India , un *P. aeruginosa* isolato da un paziente con cheratite, isolato dalla Clinica Oculistica di Sassari, e un *P. aeruginosa* di riferimento (ATCC n. 27853).

L'olio essenziale (OE) di *L. angustifolia* ha mostrato un MBC di 0,5 (% v / v), nei confronti di *P. aeruginosa* (India n.1), resistente a cefazolina, cloramfenicolo, tetraciclina e aminoglicoside, mentre per gli altri ceppi è risultato resistente a concentrazioni superiori al 16 %. L'olio essenziale di *Thymus vulgaris – red thyme geraniol sel* ha mostrato dei valori di MCB compresi tra 8 e il 16%.

Tra i due oli essenziali valutati, il *Thymus vulgaris – red thyme geraniol sel* ha mostrato una buona attività antimicrobica, che sembra essere associata ad alte concentrazioni di terpinen-4-olo. Questi due oli essenziali, hanno avuto una citotossicità vs cellule WKD congiuntivali molto marcata (non citotossici a concentrazioni inferiori <0.12%).

I valori ottenuti di MBC evidenziano una buona attività antimicrobica dell' olio essenziale di *Thymus vulgaris – red thyme geraniol sel* , rispetto alla *L. angustifolia* eccezion fatta solo per un ceppo multi drug resistant di *P. aeruginosa* che presenta un valore di 0,5 % (Cannas S. et al 2015).

Per quanto riguarda la citotossicità i risultati ottenuti saranno confermati da studi “*in vivo*”, attualmente in corso.

MBC values of essential oils (%v/v)

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	India no. 1 4R	India no. 18 2R	India no. 25 1R	CLINICAL STRAIN	ATCC 27853
<i>Lavandulus angustifolia</i>	0.5	> 16	16	16	16
<i>Thymus vulgaris</i> red thyme geraniol sel	8	8	8	16	8

Tab 1.

FOCUS ON: LAVANDA

Il genere *Lavandula* appartiene alla famiglia delle *Lamiaceae* e comprende una trentina di specie originarie dei Paesi del Mediterraneo.

La lavanda è una pianta che la ritroviamo nei terreni aridi e sassosi a formare dei bellissimi cespugli. Sono piante perenni, sempreverdi di piccole dimensioni raggiungendo infatti al massimo un'altezza di un metro. Le foglie sono lineari, lanceolate, strette, di un caratteristico colore verde-grigio. Le infiorescenze, portate da lunghi steli, sono delle spighe. Ciascuna spiga contiene un numero variabile di fiori molto profumati e con aroma variabile a seconda della specie. Il frutto è un achenio che contiene al suo interno un solo seme.

Gli oli essenziali sono presenti in maniera variabile nelle diverse specie di *Lavandula* e conferiscono quindi aromi differenti. La lavanda presenta un olio essenziale molto attivo che le conferiscono proprietà antisettiche, disinfettanti, vasodilatatrici, antinevralgiche, cicatrizzanti, diuretiche, per i dolori muscolari e artrici ed è considerata anche un leggero sedativo (Churl Lim W. et al 2005).



Il caratteristico profumo di lavanda è dato dagli oli essenziali che vengono prodotti da ghiandole, localizzate in tutte le parti verdi della pianta (fiori, foglie e gambi) ma particolarmente concentrati nei fiori freschi.

Della lavanda si utilizzano le sommità fiorite fatte essiccare in luoghi bui e ventilati. I fiori di lavanda si raccolgono in epoche diverse a seconda del loro utilizzo: per uso erboristico si raccolgono all'inizio della fioritura mentre per l'industria cosmetica e per la profumeria nel periodo di massima fioritura. Le inalazioni di infuso di lavanda calmano il raffreddore, la tosse e hanno un'azione positiva per chi ha problemi respiratori (Haze, S. et al 2002).

I risciacqui con infuso di lavanda hanno un'azione disinfettante per la bocca e sono rinfrescanti per l'alito. La lavanda viene anche usata per fare bagni tonificanti e rilassanti versando qualche goccia di olio essenziale nell'acqua calda.

L'infuso di lavanda viene usato per risciacquare i capelli grassi e l'olio, applicato al cuoio capelluto, massaggiando delicatamente, facilita la crescita dei capelli.

Con la lavanda si preparano anche dei tonici astringenti per i pori dilatati della pelle.

Normalmente la lavanda è poco usata per scopi alimentari.

Oggetto del nostro studio sono state diverse specie di lavande : *Lavanda sumian*, *lavanda grosso*, *Lavandula angustifolia* Miller, *L. hybrida*, *L. vera*, *L. latifolia*.

Lavanda sumian, *lavanda grosso* sono stati saggiati su 16 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* tutti multi drug resistant di isolamento oculare.

L'OE derivato da *L. sumian* ha un'attività antimicrobica inferiore rispetto a *L. grosso*. *L. sumian* era inefficace su undici ceppi di *P. aeruginosa* alla concentrazione del 16%, mentre *L. grosso* era efficace sullo stesso numero di *P. aeruginosa* alla concentrazione dell'8% della (**Tab. 2**). Tutti i ceppi hanno mostrato una multiresistenza a 14 antibiotici testati, tra cui amoxicillina / acido clavulanico, ampicillina / sulbactam, ampicillina, cefpodoxima, ceftriaxone, cefuroxima, cloramfenicolo, ertapenem, fosfomicina, norfloxacin, ofloxacin, tetraciclina, trimetoprim e trimetoprim / sulfametossazolo. Tutti erano sensibili agli aminoglicosidi, ai fluorochinoloni di terza generazione, alle cefalosporine di terza generazione e ai carbapenemi. L'OE derivato da *L. sumian* ha mostrato citotossicità superiore al 50% a concentrazioni superiori allo 0,015% (IC₅₀ 34 mg / ml). Al contrario, per l'OE derivato da *L. grosso* è stato riscontrato un effetto citotossico per concentrazioni superiori allo 0,0005% (IC₅₀ 4,3 mg / ml). Gli OE di *L. sumian* e *L. grosso* riducevano significativamente l'attività del NOS nelle cellule macrofagiche solo a concentrazioni superiori a 8,5 mg / ml a concentrazione dipendente. Nessuna differenza significativa è stata trovata tra *L. sumian* e *L. grosso*. La massima attività inibitoria è stata osservata a concentrazioni di 34 mg / ml e 8,5 mg / ml (Donadu M. et al 2018).

Donadu *et al.* – Lavender essential oils against *P. aeruginosa*

Infect Dev Ctries 2018; 12(1):009-014.

Antimicrobial activity of lavender EOs (% v/v) against 16 multidrug resistant *P. aeruginosa*.

Strains number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
lavanda SUMMAN Exentiae s.r.l.	16%	16%	16%	8%	16%	8%	16%	16%	16%	16%	16%	8%	8%	16%	8%	8%
lavanda GROSSO Exentiae s.r.l.	16%	16%	16%	16%	16%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%

Tab.2

Oltre allo studio dell'attività antibatterica di diverse specie di Lavanda è stata valutata l'attività citotossica su linee cellulari, quali CaCO-2 (Carcinoma Colon). La **Fig. 1** mostra l'analisi dell'effetto di quattro OE di lavanda su cellule Caco-2. Gli OE testati si sono rivelati non citotossici a concentrazioni molto basse, comprese tra 0,03% (IC50 0,9132 mg / ml) (*L. hybrida*), 0,015% (IC50 0,7798 mg / ml) (*L. latifolia* Medikus), 0,008% (IC50 1,224mg/ml) (*L. vera* D.C.), e 0,001% (IC50 1,631 mg / ml) (*L. angustifolia* Miller). L'olio essenziale di lavanda come derivato naturale multicomponente potrebbe essere una fonte di sostanze farmacologiche attive che interferiscono con le cellule Caco-2. Gli EO nel loro insieme sono considerati più efficaci dei singoli costituenti grazie al loro effetto sinergico. Inoltre, gli OE derivati da piante cresciute in ambienti diversi si differenziano per la composizione e quindi hanno usi diversi. La valutazione microscopica dei monostrati cellulari ha evidenziato la loro morfologia eterogenea confermata anche visivamente. L'osservazione al SEM delle cellule tumorali appartenenti al gruppo di controllo (**Fig. 1 (a)**) ha evidenziato un monostrato di cellule ben conservate e (**Fig. 1 (b)**) mostra le cellule Caco-2 trattate con *Lavandula hybrida* a una concentrazione non citotossica dello 0,0005%.

Le cellule Caco-2 esprimono giunzioni strette, microvilli e una serie caratteristica di enzimi e trasportatori di cellule enterocitiche: peptidasi, esterasi, glicoproteina P, trasportatori di amminoacidi, acidi biliari, acidi carbossilici, ecc. Le cellule appaiono piatte, di forma variabile per lo più allungata molto vicine tra loro con uno stretto spazio intercellulare, tuttavia sono state identificate anche alcune cellule arrotondate, probabilmente staccate dal monostrato. La superficie si presenta liscia con minuscoli microvilli e sono stati osservati sottili filamenti all'interno delle cellule e un ampio rilievo nucleare. Le cellule trattate con concentrazioni di OE citotossiche hanno evidenziato la perdita del monostrato cellulare uniforme con ampi spazi vuoti e poche isole cellulari (**Fig. 1 (c)**). Nel gruppo in cui l'OE ha mostrato maggiore citotossicità sono state osservati cambiamenti della morfologia cellulare (**Fig.1 (d)**). Le cellule apparivano rigonfie e separate da ampi spazi intercellulari, con la superficie cellulare levigata in seguito alla perdita dei microvilli e irregolarità dovute alla presenza di numerose vescicole. Inoltre, sono stati osservati detriti cellulari. Questi fenomeni probabilmente derivano dall'apoptosi indotta da composti lipofili come i terpeni. La composizione degli EO di lavanda suggerisce che *L. angustifolia* Miller presenta

un'alta citotossicità, dovuta probabilmente alla elevata percentuale di terpeni.

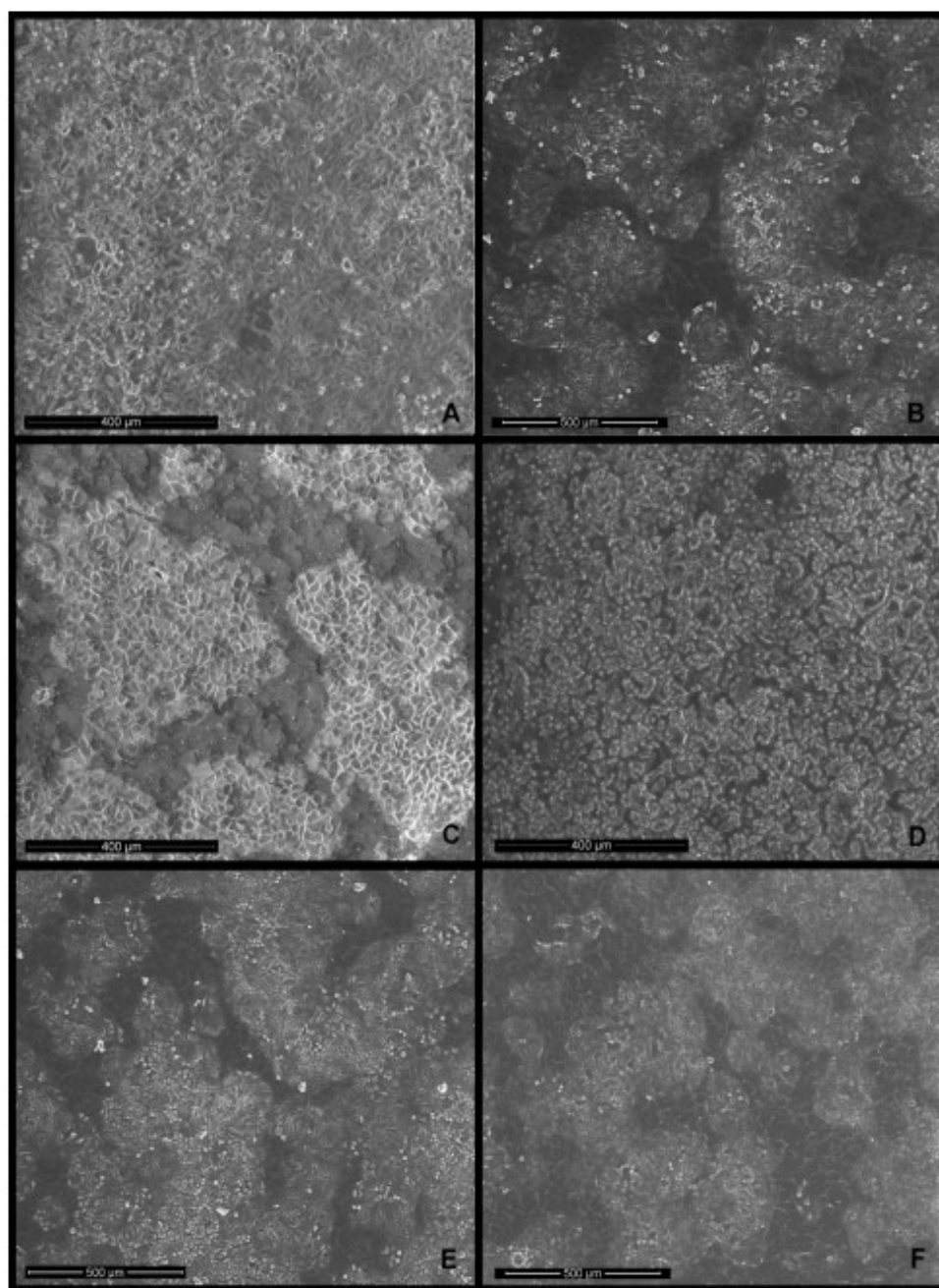


Fig.1: fotografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) di cellule Caco-2. Figura S1 (a) Controllo. Figura S1 (b) Caco-2 cellule trattate con *Lavandula hybrida* a una concentrazione non citotossica dello 0,0005%. Figura S1 (c) Caco-2 cellule trattate con *L. hybrida* a una concentrazione citotossica dello 0,06%. Figura S1 (d) cellule di Caco-2 trattate con *L. vera* a una concentrazione citotossica dello 0,015%. Figura S1 (e) cellule Caco-2 trattate con *L. vera* a una concentrazione non citotossica dello 0,008%. Figura S1 (f) cellule Caco-2 trattate con *L. hybrida* a una concentrazione non citotossica dello 0,008% (Donadu M.G. et al 2017).

FOCUS ON: IPERICO

L'iperico (*Hypericum perforatum*) è una pianta officinale del genere *Hypericum*. Si tratta di una pianta sempreverde, presenta il fusto eretto, un rizoma corto e ramificato. Presenta foglie di forma ovale ed oblunga. Tra i tratti che lo caratterizzano troviamo foglioline che in controluce sembrano bucherellate (da qui la denominazione *perforatum*) e che permettono di riconoscere la pianta anche quando i fiori non sono presenti. Le foglie comprendono delle piccole strutture ghiandolari, dove è contenuta l'ipericina.

L'iperico ha piccoli fiori di colore giallo brillante, e composti da cinque petali profumati. L'iperico è una specie originaria della Gran Bretagna, ma oggi è diffuso in tutto il mondo, anche in Europa, compresa la Sardegna (*Hypericum perforatum subsp.*



Angustifolium). Cresce in aree soleggiate e luminose, comprese le radure all'interno dei boschi. Preferisce i terreni asciutti e la semi-esposizione al sole. Per le sue proprietà benefiche è nota da secoli alla medicina naturale, che la impiega in ambito curativo e cosmetico. Contiene sostanze preziose per il trattamento della pelle irritata e arrossata, presenta inoltre un'azione cicatrizzante, soprattutto in caso di piccole ustioni e scottature solari, con particolare riferimento all'ipericina. Un altro utilizzo prevede la preparazione dell'oleolito di iperico, un olio dal caratteristico colore rosso preparato per macerazione. L'estrazione dei principi attivi dell'iperico, a partire dall'ipericina, avviene soprattutto dai fiori. L'iperico trova altri impieghi nella preparazione di tinture e compresse. Dell'iperico si raccolgono sia i fiori che le foglie. Per la preparazione dell'oleolito di iperico si raccolgono interi steli da lasciare in macerazione in olio vegetale. L'iperico si raccoglie durante la fioritura, che raggiunge il culmine nel mese di giugno. L'iperico viene utilizzato fresco o secco per la preparazione dell'oleolito. L'essiccazione della pianta avviene all'ombra, in luoghi asciutti e ventilati. L'oleolito di iperico si conserva in bottigliette di vetro scuro o barattoli di vetro, al buio.

L'oleolito di iperico è stato da noi saggiato esclusivamente "In vitro" nei confronti di 30 ceppi di *Candida spp.* confrontato con l'oleolito di elicriso (vedi **Tab.3**)

FOCUS ON: ELICRISO

L'elicriso (*Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso) è un suffrutice aromatico perenne appartenente alla famiglia delle Asteracee. Il portamento della pianta è piuttosto compatto, con fusti legnosi contorti, alti 25-40 cm, rami arcuati, ascendenti rivestiti di peli lisci che al tatto tendono a staccarsi. Le foglie sono fitte, lineari, verde-argentato, le inferiori patenti e tomentose, lunghe 1-5 cm e larghe circa 1 mm. I fiori sono prevalentemente tubulosi, di colore giallo chiaro, riuniti in capolini conici, con 12-23 fiori per capolino in cui prevalgono quelli maschili. I capolini sono a loro volta riuniti in corimbi densi di 25-35 infiorescenze. Le brattee dell'involucro florale sono caratteristiche, giallo-brunastre e alla fine brune. Il frutto è un achenio ovale-oblungo con la superficie corrugata da numerosi piccoli tubercoli. Nella sua parte superiore è inserito il pappo di peli semplici.



La droga è principalmente costituita dai corimbi di capolini, raccolti all'inizio della fioritura ed essiccati. Per la distillazione però si raccoglie tutta la parte aerea.

L'olio essenziale è di colore giallo chiaro, di odore delicato, a volte invece emerge una nota canforata e l'olio appare piuttosto denso, con un odore aspro e "pesante", simile all'olio di oliva. L'elicriso viene utilizzato in fitoterapia nel trattamento delle allergie, che colpiscono le vie aeree e i tessuti cutanei. Gli studi clinici attuali hanno infatti dimostrato l'utilità dell'elicriso nelle affezioni dell'apparato respiratorio sia di tipo allergico che infettivo, inoltre la pianta presenta proprietà antistaminiche, antinfiammatorie, espettorante e antibatterica.

Infatti l'elicriso favorisce l'eliminazione del catarro bronchiale, attenua gli spasmi eccessivi dell'asma e le infiammazioni di origine allergica della mucosa nasale. Per uso locale la pianta rappresenta il rimedio specifico per lenire e sfiammare la pelle in caso di psoriasi, herpes d'ogni genere, eczemi, ustioni ed eritema solare, irritazioni della pelle sensibile, grazie alla sua azione decongestionante e protettiva.

Un'altra proprietà importante dell'uso esterno dell'elicriso è quella astringente, antiedemigena, analgesica.

Gli oleoliti di *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso e *Hypericum perforatum* subsp. *Angustifolium* sono stati saggiati nei confronti di 30 ceppi di *Candida spp.*, isolati da altrettanti pazienti affetti da candidosi (**Tab.3**). Cinque diverse specie di *Candida spp.* sono state identificate come segue: *C. albicans* (43,3%, 13/30), *C. parapsilosis* (26,6%, 8/30), *C. tropicalis* (16,6%, 5/30), *C. glabrata* (6,6%, 2/30), *C. krusei* (6,6%, 2/30).

Dopo 48 ore i valori di MFC ottenuti erano compresi tra 1.95 e 125 mg / ml per *C. albicans*, 3.9 mg / ml per *C. glabrata*, <0.98-1.95 mg / ml per *C. krusei*, 1.95->125 mg / ml per *C. tropicalis* e <0.98-125 mg / ml per *C. parapsilosis*, inoltre, *C. glabrata* e *C. krusei* erano resistenti al fluconazolo (256 e 128 µg / ml). L'*H. microphyllum* OM (oleolito o macerato) ha presentato una migliore attività rispetto all'OM di *Hypericum perforatum* nei confronti di *C. glabrata* e *C. krusei*.

Negli ultimi due decenni, è stato osservato un aumento significativo dell'incidenza di infezioni fungine profonde, non solo nei pazienti ospedalizzati, ma anche in soggetti sani. Inoltre, l'incidenza di *C. albicans*, la principale specie di *Candida* patogena finora, è diminuita mentre quella di *Candida* non-*albicans* è stata amplificata. (Polke M. et al. 2015).

I nostri risultati suggeriscono che *H. microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso OM potrebbe sostituire o integrare farmaci antifungini standard nel trattamento delle infezioni della pelle e delle mucose. L'attività inibitrice ad ampio spettro sulla crescita di *Candida spp.* di *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso OM e la sue proprietà antimicotiche meritano ulteriori ricerche con l'obiettivo di considerare questo oleolito come candidato per l'uso topico nel trattamento della candidosi esterna prima che diventi invasiva (Donadu M.G. et al 2018)

Inhibition effect of Oils Macerates against different *Candida* species

Fungi (n)	OM		OM		FLUCONAZOLE
	<i>Hypericum</i>		<i>Helichrysum</i>		
	Range (mg/ml)	Median MFC (mg/ml)	Range (mg/ml)	Median MFC (mg/ml)	Range (µg/ml)
<i>C. albicans</i> (13)	1.84-118	118	1.95->125	1.95	0.25-1
<i>C. parapsilosis</i> (8)	<0.92-1.84	0.93	<0.98-125	0.99	0.5-2
<i>C. tropicalis</i> (5)	14.75-118	15.2	1.95->125	1.95	0.5-2
<i>C. glabrata</i> (2)	14.75-59	59	3.9	3.9	8-256
<i>C. krusei</i> (2)	<0.92-3.7	3.7	<0.98-1.95	1.95	32-128

Abbreviations: OM, oils macerates; MFC, minimum fungicidal concentrations.

Tab.3

FOCUS ON: ORIGANO

L'origano, nome scientifico *Origanum vulgare* L., appartiene alla famiglia *Lamiaceae* ed è una pianta che cresce spontanea nei luoghi assolati e aridi fino a 2000 m s.l.m. ed è coltivata come pianta aromatica e per le sue proprietà terapeutiche. Il fusto è eretto, quadrangolare, alto 50-80 cm, ramificato e nella parte superiore di colore rossastro e ricoperto da una fitta peluria. La radice è un rizoma strisciante nerastro provvisto di radici fibrose. Le foglie sono ovali-lanceolate, a margini lisci o leggermente dentellati, provviste di un corto picciolo, spesso pubescenti. I fiori dell'origano sono raccolti in pannocchie poste alla sommità degli steli e di un bel colore bianco - rosato - rosso provvisti di brattee rossastre - violacee e sono ermafroditi a impollinazione entomofila soprattutto api e farfalle. Il frutto è una capsula di colore scuro.

La composizione in principi attivi è variabile a seconda dell'epoca di raccolta, delle condizioni di coltivazione e di come la pianta viene raccolta e conservata. Le proprietà dell'origano sono: antalgico, antiseptico,



analgesico, antispasmodico, espettorante, stomachico e tonico, aiuta la digestione, attenua i dolori intestinali e il meteorismo. (Sivropoulou, A. et al 1996). Dell'origano si utilizzano le foglioline e le sommità fiorite raccolte d'estate in piena fioritura. Sia le foglie che le sommità fiorite dell'origano possono essere essiccate in luoghi bui e ventilati ma si raccomanda di effettuarla molto rapidamente dalla raccolta in quanto gli oli essenziali sono molto volatili e quindi potrebbe perdere parte delle sue proprietà. Bevuto come infuso è un ottimo coadiuvante nei trattamenti per la cellulite. L'infuso mescolato al vino stimola le funzioni digestive, allevia il mal di testa, i dolori intestinali e aiuta nei casi di raffreddore. In cosmesi l'origano viene usato per fare bagni purificanti, stimolanti e deodoranti immergendo nell'acqua del bagno un sacchetto di tela con una manciata di origano (Lambert, R.J.W. et al 2001).

L' *Origanum vulgare* L. è stato da noi utilizzato in una formulazione Galenica e saggiata "In Vivo" (Vedi **Pag 46**)

FOCUS ON: MIRTO

Il mirto, nome scientifico *Myrtus communis* L., appartiene alla famiglia delle *Mirtaceae* ed è una pianta molto famosa fin dai tempi più antichi simbolo di gloria e di amore felice. In più passi nella Bibbia, il mirto è una delle piante dell'identità mediterranea. In Isaia ad esempio leggiamo che “invece di spini cresceranno cipressi, invece di ortiche cresceranno mirti”: il mirto è considerata una pianta di civiltà, che apporta benessere e prosperità. Anche i Greci adoravano il mirto, facendolo derivare dalla bellissima ninfa Myrsine, e cingevano le teste degli sposi con corone di mirto. E' anche una pianta dalle numerose proprietà medicinali oltre che molto utilizzata come pianta aromatica.

E' un arbusto con fusto molto ramificato, molto diffuso nelle coste mediterranee fino a 1000 m di altitudine.

Le foglie sono coriacee di un bel verde intenso, lucenti, opposte, prive di picciolo e ricche di numerose ghiandole, visibili in controluce, contenenti l'olio essenziale. I fiori sono bianchi, piccoli, solitari che crescono all'ascella delle foglie. Fiorisce da maggio a luglio. I frutti sono delle bacche di colore blunastro.



Il mirto contiene tannino, olio essenziale formato principalmente da mirtolo e geraniolo, resine, acido citrico e acido malico, vitamina C.

Le sue proprietà principali sono: astringente, balsamiche, antinfiammatorie e antisettiche, antibatterica e antimicotica (Zanetti, S. et al 2010; Cannas S. et al 2013; Cannas S. et al 2014).

Le parti utilizzate della pianta sono le foglie, raccolte ad agosto e i frutti (le bacche) raccolte a settembre - ottobre. Il mirto viene usato in erboristeria per la preparazione di medicinali per le affezioni delle vie respiratorie e dell'apparato digerente.

L'uso principale è sicuramente nell'industria dei liquori per realizzare numerose bevande ricavate dalle foglie o dalle bacche. Oltre l'attività antibatterica è stata saggiata l'attività antimicotica su numerose specie di *Malassezia spp.*

Lo studio in (Tab. 4) ha riguardato 86 ceppi di *Malassezia spp.*, di cui: *Malassezia furfur* (42,5%, 37/86), *M. sympodialis* (23,5%, 20/86), *M. slooffiae* (13,9%, 12/86), *M. globosa* (7,5%, 7/86), *M. obtusa* (6%, 5/86), *M. japonica* (4%, 3/86) e *M. restricta* (2,5%, 2/86). L'OE di *M. communis* OE è risultato efficace in: 96% (36/37) degli isolati di *M. furfur*, 83% (16/20) di *M. sympodialis*, 78% (9/12) di *M. slooffiae*, 78% (5/7) di *M. globosa*, 75% (4/5) *M. obtusa*, 73% (2/3) di *M. japonica* e 62% (1/2) di *M. restricta*.

I nostri dati hanno dimostrato che MIC mediana e MFC di *M. communis* testate contro dieci isolati di *M. globosa* e *M. japonica* erano 31.25 e 62,5 µl / ml rispettivamente, mentre l'attività d'inibizione più alta è stata mostrata su crescita di *M. furfur* (96%) e *M. sympodialis* (83%). Si può concludere che l'attività antimicrobica ad ampio spettro di *M. communis* L'OE include anche una potente inibizione sulla crescita di *Malassezia spp.* suggerendo l'utilizzo di questo OE nel trattamento di malattie della pelle (Barac A. et al 2018).

Inhibition effect of Myrtus communis against different *Malassezia* species

Fungi (n)	EO			
	<i>M. communis</i>			
	Range	Median MIC (µl/ml)	Range	Median MFC (µl/ml)
<i>M. furfur</i> (37)	15.625–31.25	31.25	31.25–62.5	62.5
<i>M. sympodialis</i> (20)	31.25–62.5	62.5	62.5–125	125
<i>M. slooffiae</i> (12)	15.625–31.25	31.25	31.25–62.5	62.5
<i>M. globosa</i> (7)	15.625–31.25	31.25	62.5–350	350
<i>M. obtusa</i> (5)	15.625–62.5	62.5	62.5–125	125
<i>M. japonica</i> (3)	15.625–31.25	31.25	31.25–62.5	62.5
<i>M. restricta</i> (2)	31.25–125	125	125–600	600

EO essential oils, *MIC* minimum inhibitory concentration, *MFC* minimum fungicidal concentrations

Tab.4

STUDIO “*in vivo*”

A seguire gli studi “*in vitro*” è stato eseguito uno studio clinico randomizzato dal titolo “Valutazione dell’efficacia di un preparato galenico coadiuvante il trattamento della pelle acneica vs ACNATAC® gel”

È stata formulata una crema combinata contenente Tretinoina, alle stesse concentrazioni dei prodotti commerciali (0,025%), e oli essenziali di Mirto e Origano di cui è stata valutata l’attività antibatterica su ceppi clinici isolati da pazienti con acne . Tale crema è da considerarsi un’alternativa ai preparati topici in cui la tretinoina è combinata ad un antibiotico (ACNATAC® gel).

Sulla base dei dati di Concentrazione Minima Inibente (MIC) relativi all’olio essenziale di Mirto e olio essenziale di Origano, è stata formulata una crema avente la seguente composizione:

- Olio essenziale di origano (Specchia Sol)
- Tretinoina (Sigma Aldrich)
- Olio essenziale di mirto (Erbe di Sardegna)
- Olio di Macadamia (Farmalabor)
- Crema gel a base di fitosomi estremamente idratante grazie all'elevato contenuto di acido oleico e linoleico

La crema è stata preparata distribuendo lo 0,74% (p / p) di olio essenziale di origano, il 3,15% (peso / peso) di olio essenziale di mirto, lo 0,025% (peso / peso) di acido retinoico e il 5% di macadamia nella crema Crema gel a base di fitosomi estremamente idratante grazie all'elevato contenuto di acido oleico e linoleico.

Tutti i componenti sono stati aggiunti gradualmente in costante omogeneizzazione utilizzando un mixer da laboratorio da banco. Durante la preparazione la crema è stata protetta dalla luce. La crema è stata confezionata in contenitori di plastica bianca opaca da 10 ml, per limitare la possibile contaminazione della formulazione dovuta ad una scorretta manipolazione da parte dei pazienti.

Trattasi di una crema idrofila con emulsionanti naturali e fitosomi, con eccellenti proprietà idratanti e non comedogena; indicata per soggetti con pelle grassa, normale e in condizioni patologiche.

È stato inserito nella formulazione l’Olio di Macadamia per le sue proprietà emollienti e antiossidanti. Per la sua peculiare composizione (elevato contenuto di tocotrienoli e squalene), è capace di prevenire lo stress ossidativo indotto dalla luce (71), contrastando l’effetto fotosensibilizzante della tretinoina.

La crema è stata prodotta presso i laboratori di Tecnologia Farmaceutica del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell’Università degli Studi di Sassari, secondo Norme di Buona Preparazione (FU XII) e confezionata in contenitori di materiale plastico opachi (conformi alle specifiche FU XII), da 10 g (in numero adeguato alla terapia) adatti ad evitare/limitare la contaminazione microbica del preparato, privo di agenti conservanti.

La crema è stata sottoposta, per ogni lotto, al test di sterilità e Challenge test (FE VEd)

I Soggetti sottoposti all'esperimento e criteri per l'inclusione sono stati n° 40 soggetti, sia di sesso maschile che femminile, con pelle acneica di grado 1-2 divisi in 2 gruppi (prodotto galenico e ACNATAC® gel).

Criteri di selezione dei volontari: buono stato di salute, assenza di altre patologie cutanee, assenza di trattamenti farmacologici topici o sistemici in atto, anamnesi negativa per atopia e DAC. Esclusioni: donne in gravidanza e allattamento.

Lo studio è stato autorizzato dal Comitato Etico dell'ATS Sardegna Prot.llo 2490/CE.

Schema di esecuzione del saggio: i saggi della crema sono stati eseguiti a tempistiche differenti quali a tempo 0 (T0) a 15 giorni (T15) e a 30 giorni (T30)

- 1) T0: arruolamento dei volontari, raccolta dei dati anagrafici, anamnesi familiare e personale, esame obiettivo dermatologico, registrazione dei dati, consenso informato. Dopo breve acclimatazione e foto macroscopica, è stata effettuata, sulle aree di applicazione del prodotto, misurazione corneometrica, misurazione della perdita dell'acqua trans-epidermica (TEWL), sebometrica, pHmetrica e colorimetrica. Successivamente è stato applicato il prodotto.
- 2) T15: dopo 15 giorni di applicazione giornaliera del prodotto: foto macroscopica e misurazione misurazione corneometrica, TEWL, sebometrica, pHmetrica e colorimetrica. Valutazione clinica di eventuali effetti collaterali.
- 3) T30: dopo 30 giorni di applicazione giornaliera del prodotto: foto macroscopica e misurazione misurazione corneometrica, TEWL, sebometrica, pHmetrica e colorimetrica. Valutazione clinica di eventuali effetti collaterali. Test psicoreologico.

Paziente trattato con il preparato galenico a base di oli essenziali al tempo "T0"(Fig.2 A) e dopo trenta giorni "T30" (Fig.2 B)

T0

T30



Fig. 2 A

Fig. 2 B

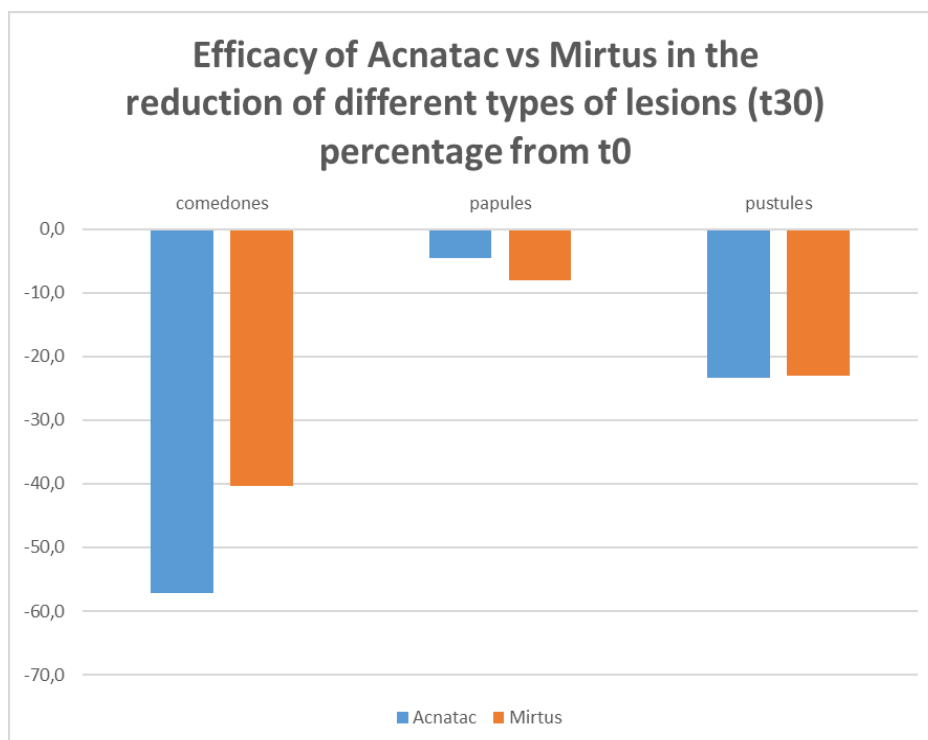


Fig. 3

Riduzioni delle singole lesioni contate sui pazienti acneici, confronto prodotto galenico a base di oli essenziali(MYRTUS) vs ACNATAC® gel.

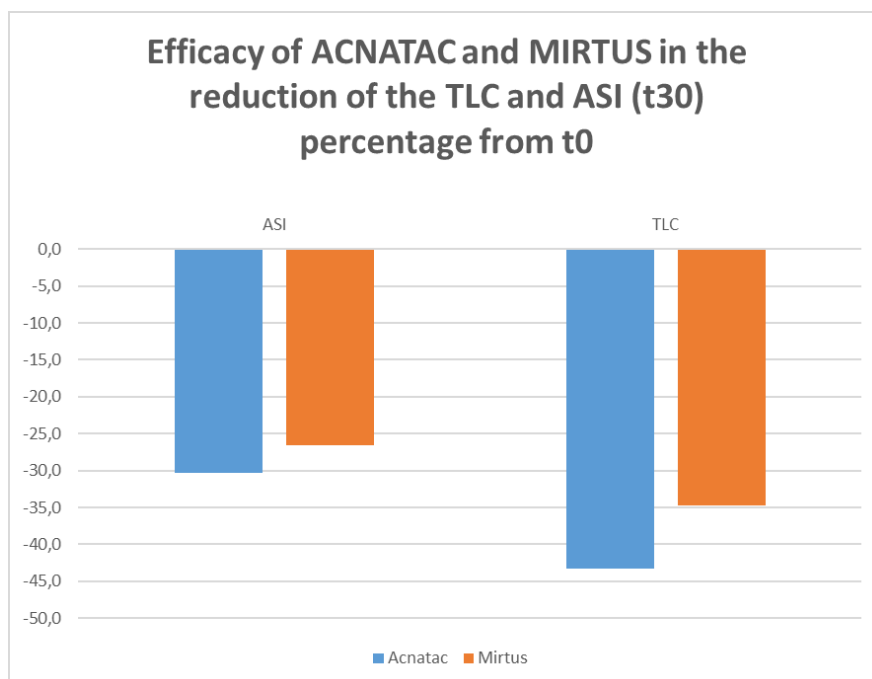


Fig. 4

Confronto preparato galenico a base di oli essenziali (MYRTUS) vs ACNATAC® gel, su ASI [(Papule + (pustulex2) + (comedoni/4)] e TLC [comedoni+papule+pustole] a 30 giorni : il prodotto galenico presenta una buona riduzione di TLC e ASI in rapporto al farmaco.

Attivo	t0	t15d	t30d
Mexameter E measurement	596,2 ± 69,6	559,4 ± 115,	566,6 ± 93,6
Baseline change from t0 (mean and SD)		-36, ± 68,1	-29, ± 57,1
Percentage change from t0 (mean)		-6,8 %	-5,1 %
<i>p-value</i>		0,030	0,037

ACNATAC	t0	t15d	t30d
Mexameter E measurement	637,7 ± 32,6	630,4 ± 21,5	623,4 ± 29,7
Baseline change from t0 (mean and SD)		7,20 ± 10,5	-14, ± 19,6
Percentage change from t0 (mean)		1,16 %	-2,1 %
<i>p-value</i>		0,077	0,031

Fig. 5

Misure di eritema su lesioni papulari acneiche: è presente una maggiore attività antiinfiammatoria del prodotto galenico a base di oli essenziali, già dopo 15 giorni.

Attivo	t0	t15d	t30d
pH measurement	5,227 ± 0,57	5,382 ± 0,57	5,305 ± 0,55
Baseline change from t0 (mean and SD)		0,15 ± 0,52	0,07 ± 0,59
Percentage change from t0 (mean)		3,59 %	2,17 %
p-value		0,114	0,217

ACNATAC	t0	t15d	t30d
pH measurement	6,263 ± 3,12	5,5 ± 0,5	5,6 ± 1,15
Baseline change from t0 (mean and SD)		0,15 ± 0,63	4,44 ± 0,84
Percentage change from t0 (mean)		2,72 %	-0,8 %
p-value		0,398	0,500

Fig. 6

Misure di pH cutaneo che si presenta immutato in entrambi i prodotti.

Dai primi risultati si evince che il prodotto galenico a base di oli essenziali presenta una maggior attività nella riduzione di TLC e ASI , papule e pustole , con un maggior attività antinfiammatoria rispetto al farmaco ACNATAC® gel.

Conclusioni

Tenendo conto che oramai il mondo scientifico sta considerando i prodotti naturali quale potenziale approccio terapeutico alternativo e/o sinergico per il trattamento di alcune patologie croniche e acute; si è alla ricerca di nuove sostanze e/o molecole sicure ed efficaci contro il dolore, l'infiammazione o con attività antimicrobica, antitumorale o immunomodulante.

Molti dei farmaci in commercio sono derivati di sostanze naturali, come ad esempio molti antibiotici, alcuni antitumorali, vari cardiotonici ecc.

Tale risultato importante dal punto di vista microbiologico e farmacologico ha confermato e approfondito degli studi precedenti svolti nella Sezione di Microbiologia Clinica e Sperimentale del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'UNISS coordinati dalla Prof.ssa Stefania Zanetti.

La ricerca eseguita con quella attuale e futura può avere un importante impatto sulla salute pubblica, offrendo indicazioni utili per l'ottimizzazione dell'impiego terapeutico di alcuni "farmaci naturali". In particolare nell'ambito delle sostanze vegetali, le ricerche in corso potranno fornire, partendo dalla valutazione delle attività biologiche del fitocomplesso e dall'identificazione dei principali componenti attivi, basi utili per la sperimentazione di nuove sostanze usate sia singolarmente che in combinazione con farmaci già impiegati nella pratica clinica. Questo presuppone la necessità di uno studio accurato, su basi sperimentali e con rigoroso metodo scientifico, delle sostanze naturali, con la prospettiva di integrare e anche sostituire farmaci di sintesi caratterizzati dai ben noti effetti collaterali e di elevato costo economico.

In conclusione si può affermare che la progressiva penuria di farmaci antimicrobici, con l'associata e crescente farmacoresistenza e lo scarso coinvolgimento delle grandi industrie nei farmaci orfani, stanno facendo da volano a nuovi trattamenti basati sulla facilità della prescrizione e sulla moderazione dei costi, oltre che su un'idea di rapporto ottimale con la natura.

CURRICULUM VITAE ET STUDIORUM

Dott. Matthew Gavino DONADU

Nato a Sassari il 19/07/1990,

residente in via Capitano Cossu n°17

a Chiaramonti(SS) - 07030

Tel: 3458593956

Posta elettronica:

mdonadu@uniss.it ;

matthew.donadu@hotmail.it

ISTRUZIONE E FORMAZIONE

◆ Diploma di liceo scientifico sperimentale “Brocca” indirizzo biologico conseguito presso l’ ITAS “S. Ruju” di Sassari con votazione 94/100 conseguito il 06/07/2009.

◆ Laurea in “Chimica e tecnologia farmaceutiche” presso l’Università di Sassari con votazione 108/110 conseguita, in corso, il 21/10/2014 con tesi dal titolo “Studio di diversi oli essenziali nella patologia oculare” relatore la Prof.ssa Stefania Zanetti correlatori: il Dott. Antonio Pinna e la Dott.ssa Donatella Usai.

◆ Abilitazione alla professione del Farmacista il 21/11/2014 presso l’Università di Sassari.

◆ Iscrizione all’Ordine interprovinciale dei Farmacisti di Sassari e Olbia-Tempio con delibera del 13/01/2015 al n° 1603.

◆ Dottorando di Ricerca dal 1/11/2015 ad oggi presso la Scuola Life Sciences and Biotechnologies – XXXI ciclo – Dipartimento di Scienze Biomediche (vincitore concorso pubblico per titoli ed esami) tutor : Prof.ssa Stefania A. L. Zanetti.

Durante la frequenza alle attività del PhD in Life Sciences and Biotechnologies il sottoscritto ha collaborato anche ad altri progetti di ricerca quali:

➤ per lo studio di neo formulazioni per patologie infettive oculari (Clinica Oculistica – AOU Sassari , con il Prof. Antonio Pinna);

- per lo studio ed efficacia di preparazioni galeniche per il trattamento di diverse patologie (Clinica Dermatologica – AOU Sassari, con la Dott.ssa Maria Antonietta Montesu)
- per lo Studio degli oli essenziali nei confronti di ceppi multi – resistenti d’isolamento clinico; Studio e valutazione dell’uso Off-Label dell’anabolizzante Teriparatide; Studio ed uso della curcuma, pepe nero, epigallocatechin-gallato nel trattamento delle tendinopatie sportive. Studio e valutazione di diversi oppiacei di origine naturale nel trattamento del dolore acuto e ricorrente (con l’U.O. Complessa di Ortopedia e Traumatologia- AOU Sassari diretta dal Prof. Carlo Doria).
- per lo studio di terapie antibiotiche in ascessi della testa e del collo (con la Clinica Otorinolaringoiatrica – AOU Sassari diretta dal Prof. Francesco Bussu).

Ho inoltre collaborato con:

- il gruppo di Ricerca del Prof. Antonello Paparella della Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali.
- il Prof. Mauro Marchetti (Direttore dell’Istituto di Chimica Biomolecolare CNR) e la Prof.ssa Marianna Usai (Prof. Associato di Botanica farmaceutica del dipartimento di Chimica e Farmacia dell’Università di Sassari) per analisi fitochimiche e interpretazione della composizione chimica dei diversi oli essenziali e droghe.
- la Prof.ssa Elisabetta Gavini e la Prof.ssa Giovanna Rassa (Prof.ri Associati di Tecnologia farmaceutica del dipartimento di Chimica e Farmacia dell’Università di Sassari) per la preparazione delle diverse formulazioni farmaceutiche utilizzate nei diversi studi Clinici.
- il Prof. Vittorio Mazzarello (Prof. Associato di Anatomia Umana del dipartimento di Scienze Biomediche dell’Università di Sassari, Responsabile dello Skinlab) per i test cosmetologici delle diverse preparazioni utilizzate nei diversi studi Clinici.

Collaborazioni internazionali quali :

- Con la Prof.ssa Aleksandra Barac (direttore della Clinica di Malattie infettive di Belgrado – Serbia , Università di Belgrado)
- Con il Prof. Robert Tulio González-Mina dell’Università di Palmira-Colombia
- Le L , Tran T , Ngo VT : Department of Chemistry, Hue University of Sciences, Hue University, Hue City, ThuaThien Hue Province, Vietnam. Department of Biochemistry, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue City, ThuaThien

Hue Province, Vietnam. Department of Microbiology and Carlo Urbany Center, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue City, ThuaThien Hue Province, Vietnam.

- Visiting formativo presso l'istituto di Microbiologia – Università Cattolica del Sacro Cuore Roma- referente visiting è stato il Prof. Giovanni Delogu
- Co-relatore di diverse tesi di Laurea in Medicina e Chirurgia, Farmacia e Scienze Infermieristiche.

Lingua **Italiano**

madre

Altre lingue	COMPRESIONE		PARLATO		PRODUZIONE
	Ascolto	Lettura	Interazione	Produzione orale	SCRITTA
Francese	B2	B2	B2	B2	B2
Inglese	B2	B2	B2	B2	B2

Livelli: A1/2 Livello base - B1/2 Livello intermedio - C1/2 Livello avanzato

Quadro Comune Europeo di Riferimento delle Lingue

COMPETENZE PROFESSIONALI

- Buona conoscenza della Farmacologia di genere , farmacoterapia avanzata e impostazione di clinical monitor.
- Buona conoscenza della Farmacologia sportiva.
- Studio ed attività di ricerca in tematiche medico sportive
- Certificazione per personale sanitario BLS D E PBLSD (22/09/2017) dell'american heart association (riconosciuto a livello nazionale ed internazionale)
- Buona padronanza di lavoro in un laboratorio di analisi microbiologiche (batterologia) e analisi chimiche , in particolare di analisi farmaco – chimico tossicologiche;

- Reviewer presso riviste scientifiche internazionali indicizzate: Industrial Crops e Product (IF 3.849), JIDC (IF 1.67), Journal of Clinical and Investigative Dermatology (IF 1.58)
- Editor nella Rivista Internazionale impattata (IF 1.67) The Journal of Infection in Developing Countries.

ESPERIENZE LAVORATIVE

- Farmacista - 1° livello presso la Farmacia “Satta” di Perfugas (SS) dal 15 Gennaio 2015 ad oggi – titolare Dr. Mario Satta .
- Direttore Provvisorio della Farmacia “Satta” di Perfugas (SS) per piccoli periodi su delega del Titolare negli anni 2016/2017/2018 .
- Docente incaricato per l’a.a. 2015-2016 del modulo di Tossicologia (CHIM/08) - “Scienze degli alimenti 2” per il CdL di Tecnici della prevenzione negli ambienti e luoghi di lavoro.
- Docente Attività didattica integrativa di Farmacologia Clinica ed applicata presso la Scuola di Specializzazione di Ortopedia e Traumatologia dell’Università di Sassari – Direttore : Prof. Carlo Doria.
- Docente Attività didattica integrativa di Farmacologia antibatterica ed applicata presso la Scuola di Specializzazione di Microbiologia e Virologia dell’Università di Sassari – Direttore: Prof. Salvatore Rubino.
- Presidente del seggio elettorale n° 2 del Comune di Chiaramonti nel 2012 , su nomina del Sindaco del Comune di Chiaramonti.
- Tirocinante presso la farmacia “Satta” di Perfugas (SS) da Luglio 2012 a Gennaio 2014.
- Coordinatore didattico presso l’I.C. “F.P. Serra” di Nulvi e sez. dist. di Chiaramonti nelle scuole, primaria e secondaria di 1° grado, del progetto “Le piante officinali e i fitofarmaci” a.s. 2011-2012 finanziato con fondi della Provincia di Sassari – Assessorato all’ambiente - Nodo I.N.F.E.A.
- Esperto aggiuntivo- esterno a tempo determinato presso l’Istituto Comprensivo di Osilo- Nulvi di matematica e scienze negli a.s. 2012-2013 e 2013-2014 nei progetti:
- progetto e viaggio d’istruzione “Barcellona 2014”.

- progetto N. Bobbio nella scuola sec.1° di Nulvi: legalità nelle scuole secondarie, con simulazione di un processo presso il Tribunale Minorile di Sassari riguardante un reato di spaccio di sostanze stupefacenti
- progetto “Drugs” nella scuola sec.1° di Nulvi finanziato dal comune di Nulvi e dal fondo unico MIUR : progetto riguardante le tossicodipendenze con la collaborazione dell’ass. Mondo x di Padre Salvatore Morittu (2014) e l’Ass. Don Bosco Nulvi.
- “Sportello serale di Recupero e d’ascolto”presso la scuola secondaria di 1° grado di Nulvi.

COMPETENZE INFORMATICHE

- Buona padronanza degli strumenti Microsoft Office, Internet Explorer , programmi di analisi : Spettroscopy Database, Adobe pdf; gestionali di farmacia sia per vendita al banco che per la tariffazione: Platinum e Winfarm.

PUBBLICAZIONI INDICIZZATE / CONFERENZE /SEMINARI

DOTT. MATTHEW GAVINO DONADU (www.orcid.org/0000-0001-7681)

PUBBLICAZIONI

1. “In vitro” activity of Melaleuca cajuputi against mycobacterial species. Bua A , Molicotti P, **Donadu MG**, Usai D., Le L, Tran T, Ngo VT , Marchetti M , Usai M , Cappuccinelli P , Zanetti S . 2018 doi: 10.1080/14786419.2018.1509335 Nat Prod Res. **IF 1.928**
2. Treatment of acne with a combination propolis, tea tree oil, aloe vera compared with erythromycin cream: two double-blind investigations. Mazzarello V., Ferrari M., Piu G., Usai D., Donadu M., Zanetti S., Sotgiu A. 2018 Clinical Pharmacology: Advances and Applications **IF 3.04**
3. In vitro activity of essential oils against Pseudomonas aeruginosa isolated from infected hip implants. Amorese V., **Donadu M.**, Usai D., Sanna A., Milia F, Pisanu F., Molicotti P., Zanetti S., Doria C. 2018 (J Infect Dev Ctries **IF 1.67**)
4. Antifungal activity of oils macerates of North Sardinia plants against Candida species isolated from clinical patients with candidiasis. **Donadu M.G.**, Usai D, Marchetti M., Usai M., Mazzarello V., Molicotti P., Montesu M.A., Delogu G. and Zanetti S. 2018 (In Press - Nat Prod Res. **IF 1.928**)

5. Potential of *Borojoa patinoi* Cuatrecasas water extract to inhibit nosocomial antibiotic resistant bacteria and cancer cell proliferation in vitro. Chaves-López C, Usai D, **Donadu MG**, Serio A, González-Mina RT, Simeoni MC, Molicotti P, Zanetti S, Pinna A, Paparella A. *Food Funct.* 2018 May 23;9(5):2725-2734. doi: 10.1039/c7fo01542a. **IF 3.289**
6. Correction to: Antifungal activity of *Myrtus communis* against *Malassezia* sp. isolated from the skin of patients with pityriasis versicolor. Barac A, **Donadu M**, Usai D, Spiric VT, Mazzarello V, Zanetti S, Aleksic E, Stevanovic G, Nikolic N, Rubino S. *Infection.* 2018 Apr;46(2):287. doi: 10.1007/s15010-017-1104-2. **IF 2.773**
7. Antifungal activity of *Myrtus communis* against *Malassezia* sp. isolated from the skin of patients with pityriasis versicolor. Barac A, **Donadu M**, Usai D, Spiric VT, Mazzarello V, Zanetti S, Aleksic E, Stevanovic G, Nikolic N, Rubino S. *Infection.* 2018 Apr;46(2):253-257. doi: 10.1007/s15010-017-1102-4. Epub 2017 Nov 20. Erratum in: *Infection.* 2018 Jan 2. **IF 2.773**
8. In vitro activity of hybrid lavender essential oils against multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Donadu M.**, Usai D., Pinna A., Porcu T., Mazzarello V., Fiamma M., Marchetti M., Cannas S., Delogu G., Zanetti S., Molicotti P. (2018) *J Infect Dev Ctries* 12:009-014. doi: doi.org/10.3855/jidc.9920. **IF 1.67**
9. Antimicrobial activity of *Austroeupeatorium inulaefolium* (H.B.K.) against intracellular and extracellular organisms. Bua A, Usai D, **Donadu MG**, Delgado Ospina J, Paparella A, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C, Zanetti S, Molicotti P. *Nat Prod Res.* 2017 Oct 11:1-3. doi: 10.1080/14786419.2017.1385014. **IF 1.928**
10. Total hip prosthesis complication, periprosthetic infection with external fistulizing due to *Enterobacter cloacae* complex multiple drugs resistance: A clinical case report. Amorese V, Corda M, **Donadu M**, Usai D, Pisanu F, Milia F, Marras F, Sanna A, Delogu D, Mazzarello V, Manzoni G, Conti M, Meloni GB, Zanetti S, Doria C. *Int J Surg Case Rep.* 2017;36:90-93. doi: 10.1016/j.ijscr.2017.05.018. Epub 2017 May 17. **IF 0.66**
11. Change in Caco-2 cells following treatment with various lavender essential oils. **Donadu MG**, Usai D, Mazzarello V, Molicotti P, Cannas S, Bellardi

MG, Zanetti S. Nat Prod Res. 2017 Sep;31(18):2203-2206. doi: 10.1080/14786419.2017.1280489. Epub 2017 Jan 23. **IF 1.928**

12. Essential oils in ocular pathology: an experimental study. Cannas S, Usai D, Pinna A, Benvenuti S, Tardugno R, **Donadu M**, Zanetti S, Kaliamurthy J, Molicotti P. J Infect Dev Ctries. 2015 Jul 4;9(6):650-4. doi: 10.3855/jidc.6842. **IF 1.67**

- Socio Ordinario della SIROE (Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali)
- Relatore al Congresso Nazionale SIROE 2018 Teramo 19/20 Ottobre con la relazione : Attività antifungina di *Myrtus communis* verso *Malassezia* sp. isolata dalla cute di pazienti con pityriasis versicolor.
- Presentation poster Congresso Europeo Nizza 03-06/10/2018 EVER 2018 dal titolo ” In vitro antimicrobial activity of a new ophthalmic solution containing povidone-iodine 0.6% (IODIM®)”
- Presentation poster Congresso Nazionale della SIDEMAST Società Italiana di Dermatologia 23-26 Maggio 2018 – Verona dal titolo “Attività antimicotica degli oleoliti di Elicriso ed Iperico vs *Candida* spp. Multi Drug Resistant”
- Relatore al Meeting della Società di Chirurgia Vertebrale e Gruppo Italiano Scoliosi SICV&GIS “ Targeted antibiotic treatment in the spondylodiscitis: a systematic and applied Review” M. G. Donadu, V. Amorese, F. Altamore, R. Pinna Nossai, F.,Milia, S. Zanetti, C. Doria . Eur Spine J (2018) 27:941–973 <https://doi.org/10.1007/s00586-018-5531-2>
- Componente del Comitato Organizzatore 22/03/2018 a Sassari della “Giornata delle malattie sessualmente trasmesse: proteggiti te stesso e gli altri”
- Presentation poster 45°Congresso Nazionale Società Italiana di Microbiologia 2017 – Genova - 27/29 Settembre 2017
- Presentation Poster e Comunicazione Orale 102° Congresso Nazionale SIOT 2017 – Palermo 20-23 Ottobre 2017 Poster dal titolo “nuova formulazione iniettabile per il trattamento delle osteomieliti”; Comunicazione orale dal titolo “studio dell’attività antibatterica di diversi oli essenziali nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da protesi d’anca”.

- Presentazione Poster al congresso internazionale “Infection in Cancer and autoimmunity” Stintino - 05/06/2017 dal titolo “Change in Caco-2 cells following treatment with various lavender essential oils”.
- Partecipazione al Congresso “medicina rigenerativa nello sportivo diversamente abile” 20/05/2017 a Sassari.
- Relatore al Congresso Nazionale SIROE 2016 – Roma tor Vergata con la relazione : Studio dell’attività antimicrobica e citotossica dell’olio essenziale di Austroeupeatorium inulifolium colombiano su ceppi patogeni oculari.
- Relatore al Congresso Nazionale SIROE 2016 con la relazione : Studio dell’attività antimicrobica e citotossica dell’olio essenziale di Austroeupeatorium inulifolium colombiano su ceppi patogeni oculari.
- Relatore al convegno XI Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia Farmaceutica con la comunicazione orale : Use of different essential oils in multi drug resistance strains 9-10 Giugno 2016 Bologna
- Relatore, moderatore e membro del comitato organizzativo del Convegno dal titolo: Alimentazione e il doping : istruzioni per l’uso – <http://www.aia-figc.it/dettaglio.asp?ID=13140>
- Relatore ed organizzatore del convegno “L’ambiente che vorrei “: Le piante officinali e i fitofarmaci anno 2012 (Chiamonti)con la relazione : I fitofarmaci la nuova frontiera terapeutica.
- Dopamina: psicobiologia e psicopatologia, con il Dott. Paolo D’Aquila: Neuro-farmacologo del Dipartimento di Scienze Biomediche dell’Università di Sassari (2011).
- Malattie maniaco depressive, disturbi d’ansia e psicosi: dalla neurobiologia alla terapia farmacologica con il Prof. Gino Serra , professore ordinario presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell’Università di Sassari 2012.
- Le acque come fonti d’inquinamento: il giudizio di potabilità , con il Dott. Antonio Nuvole del Dipartimento di Chimica e Farmacia2011.
- Corso: Prevenzione e protezione dei rischi lavorativi nei laboratori di ricerca e nelle farmacie Classificazione ATECO 2007 Codici:46.46.20,47.73.10 e 72.11.00 – Livello di rischio basso (Ai sensi dell’Accordo Stato-Regioni del 21/12/2011)2012.

- Internato di tesi da giugno 2013 a Ottobre 2014 presso l'istituto di Microbiologia e Virologia clinica sotto la guida della Prof.ssa Stefania Zanetti: docente ordinario presso il dipartimento di scienze biomediche dell'Università di Sassari e resp. del laboratorio di micobatterologia dell'AOU di Sassari. Collaborazione di ricerca con: il Dott. Antonio Pinna e la Dott.ssa Donatella Usai
- Corso teorico – pratico di Farmacologia Cellulare e tossicologia previsto dal piano di studio, sostenuto nel 2012, con votazione 30/30 con la Prof.ssa Flavia Franconi: docente ordinario dell'Università di Sassari presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari, Professore presso la scuola di Dottorato di ricerca in Medicina di Genere presso l'Università di Sassari. Responsabile del gruppo Farmacologia di Genere della Società italiana di Farmacologia.
- Relatore ed organizzatore del convegno “ La donazione nello sport”(2013-Chiaramonti) con la relazione : le sostanze e i metodi dopanti .
- Relatore al Convegno Nazionale della FIDAS presso Ozieri (2013) con la relazione : “il donatore e gli stili di vita adeguati” su proposta del Resp. Scientifico del Convegno il Dott. Sergio Bartoletti (Direttore del Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Ozieri).
- Relatore ed organizzatore del convegno “Drugs” (Nulvi -2014) con la relazione “Le droghe e la liberalizzazione della Cannabis”.

ATTIVITA' ASSOCIAZIONE ITALIANA ARBITRI – FEDERAZIONE ITALIANA GIOCO CALCIO (AIA-FIGC)

- Delegato AIA presso il giudice sportivo provinciale
- Membro del area Biomedica sezionale .
- Relatore, moderatore e membro del comitato organizzativo del 1° Convegno dell'area Biomedica regionale dal titolo: Alimentazione e il doping : istruzioni per l'uso – <http://www.aia-figc.it/dettaglio.asp?ID=13140>
- Componente del Settore Tecnico Arbitrale Nazionale – AREA STUDIO – MODULO BIOMEDICO

ALTRE ATTIVITA'

- Revisore dei conti e con funzione di segretario esterno presso l'Associazione Turistica Pro Loco di Chiaramonti nel 2009-2010; Consigliere interno nell'anno 2012 e negli anni 2013-2014.
- V. Presidente della Commissione allo Sport del Comune di Chiaramonti dal 2012 al 2014.
- Giudice Arbitro GAC/GAT 1° livello di tennis (qualifica nazionale);
- Hobby, guardo partite di calcio e tennis.

Dati personali : Autorizzo il trattamento dei miei dati personali ai sensi del Decreto Legislativo 30 giugno 2003, n. 196 "Codice in materia di protezione dei dati personali".

Bibliografia

- Ali, N.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. *Nat Prod Res.*
- Ali, S.M., Khan, A.A., Ahmed I., Musaddiq, M., Ahmed, K.S., Polas, H., Venkateswar Rao, L., Habibullah, C.M., Sechi, L.A., Ahmed, N., 2005. (Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial* 4:20.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, pp 446-475.
- Barac A, Donadu M, Usai D, Spiric VT, Mazzarello V, Zanetti S, Aleksic E, Stevanovic G, Nikolic N, Rubino S. *Infection*. 2018 Apr;46(2):287. doi: 10.1007/s15010-017-1104-2. IF 2.773 Correction to: Antifungal activity of *Myrtus communis* against *Malassezia* sp. isolated from the skin of patients with pityriasis versicolor.
- Bukovská, A., Čikoš Š., Juhás, Š., Il'ková G., Reháč, P., Koppel J., 2007. Effects of a Combination of Thyme and Oregano Essential Oils on TNBS-Induced Colitis in Mice. *Mediators of Inflammation*.

- Burt, S. A., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp 223-253.
- Campanini, E., *Dizionario di fitoterapie e piante medicinali, Tecniche nuove*, 2004, pp 332-334, 444-447, 530-535.
- Campbell, N., Reece, J., Mitchell L., Taylor, M., *Immagini della biologia*, Zanichelli, 2006, pp 58-59, 62-63, 541.
- Cannas S, Usai D, Pinna A, Benvenuti S, Tardugno R, Donadu M, Zanetti S, Kaliyamurthy J, Molicotti P. *J Infect Dev Ctries*. 2015 Jul 4;9(6):650-4. doi: 10.3855/jidc.6842. IF 1.67 Essential oils in ocular pathology: an experimental study.
- Cannas, S., Molicotti, P., Ruggeri, M., Cubeddu, M., Sanguinetti, M., Marongiu, B., Zanetti, S., 2013. Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida spp.* From isolates. *J. Infect Dev. Ctries*.
- Cannas, S., Molicotti, P., Usai, D., Maxia, A., Zanetti, S., 2014. Antifungal, anti-biofilm and adhesion activity of the essential oil of *Myrtus communis* L. against *Candida species*. *Nat. Prod. Res*.
- Capasso, F., Grandolini, G., Pescitelli, R., *La fitoterapia in uno sguardo*, Springer, 2008, pp 3-4, 5-6.
- Ceoloni, M., Bocchitto, E., Todeschi, S., *Il grande atlante delle piante medicinali, Tecniche nuove*, 2006, pp 581, 784, 931.
- Churl Lim, W., Min Seo, J., Lee, C.I., Bae Pyo, H., Chun Lee, B., 2005. Stimulative and Sedative Effects of Essential Oils upon Inhalation in Mice. *Archives of Pharmacal Research* 28, pp 770-774.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, pp 130-135.
- Cozzi, R., Protti, P., Ruaro, T., *Analisi chimica e strumentale*, Zanichelli, 1997, volume C capitolo 15.
- 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.* *Int J Antimicrob Agents*.

- Donadu M., Usai D., Pinna A., Porcu T., Mazzarello V., Fiamma M., Marchetti M., Cannas S., Delogu G., Zanetti S., Molicotti P. (2018) J Infect Dev Ctries 12:009-014. doi: doi.org/10.3855/jidc.9920. IF 1.67 In vitro activity of hybrid lavender essential oils against multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Donadu M.G., Usai D, Marchetti M., Usai M., Mazzarello V., Molicotti P., Montesu M.A., Delogu G. and Zanetti S. 2018 (Submitted - Nat Prod Res. IF 1.928) Antifungal activity of oils macerates of North Sardinia plants against *Candida* species isolated from clinical patients with candidiasis.
- Donadu MG, Usai D, Mazzarello V, Molicotti P, Cannas S, Bellardi MG, Zanetti S. Nat Prod Res. 2017 Sep;31(18):2203-2206. doi: 10.1080/14786419.2017.1280489. Epub 2017 Jan 23. IF 1.928 Change in Caco-2 cells following treatment with various lavender essential oils.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, pp 308-316.
- Enan, E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130, pp 325- 337.
- Farmacopea Europea V° Ed.
- Goodman & Gilman, le basi farmacologiche della terapia, 12° ed., Zanichelli, 2013.
- Hart, H., Craine, L.E., Hart, D.J., Hadad, C.M., *Chimica organica*, Zanichelli, 2008, pp 186, 199, 399-400.
- Harvey, R.A., Champe, P.C., Fisher, B.D., *Le basi della microbiologia*, Zanichelli, 2008, pp 34-35, 56-59, 88-90, 97-98.
- Haze, S., Sakai, K., Gozu, Y., 2002. Effect of Fragrance Inhalation on Sympathetic Activity in Normal Adults. *Jpn. J. Pharmacology* 90, pp 247-253.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M., *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, Churchill Livingstone (Elsevier Science), 2004, pp 3-10, 15-18, 184-187.
- Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, pp 512-522.

- Lambert, R.J.W., Skandamis P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, pp 453-462.
- Lawless, J. *The Encyclopedia of Essential oils*, Element Books Limited Longmead, 1992, pp11-37, 44-48.
- Lee, K.-W, Everts, H., Beynen, A.C., 2004. Essential Oils in Broiler Nutrition. *International Journal of Poultry Science* 3 , pp 738-752.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, pp 157-160.
- Nguefack, J., Lekagen Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.M., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Amvam Zollo, P.H., Nkengfack, A.E., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 131, pp 151-156 .
- Pedretti, M., *Chimica e farmacologia delle piante medicinali*, Studio edizioni, 2003, pp 62- 64, 66-70.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S.G., Eaglesham, E., 1993. Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 2, pp47-50.
- Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida survival strategies*. *Adv Appl Microbiol.* 2015.91:139- 235.
- Prabuseenivasan, S., Manickam, J., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E, *Biologia delle piante*, Zanichelli, 2002, pp 34-39, 797-798.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras T., Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 , pp 1202–1205.

- Standen, M.D. e Myers, S.P., 2004. The roles of essential oils in the modulation of immune function and inflammation: survey of aromatherapy educators. *International Journal of Aromatherapy* 14, pp 150-161.
- Zanetti, S., Cannas, S., Molicotti, P., Bua, A., Cubeddu, M., Porcedda, S., Marongiu, B., Sechi, LA. 2010. Evaluation of the Antimicrobial Properties of the Essential Oil of *Myrtus communis* L. against Clinical Strains of *Mycobacterium spp.* *Interdiscip Perspect Infect Dis*.