

ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DELL'OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO NEI CONFRONTI DI SPECIE DI INTERESSE ALIMENTARE

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ROSEMARY ESSENTIAL OIL AGAINST FOODSTUFFS FUNGI

Dragoni I., Vallone L.

Dip. di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare - Università di Milano

SUMMARY

The essential oils are well known for their antibacteric, antomycotic and insecticide effects. In this research the antomycotic activity of Rosemary essential oil has been tested in vitro versus different moulds, common contaminants of food and feed, as *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ustus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium aurantio-griseum*, *Fusarium moniliforme*. The Rosemary essential oil tested (produced in Sardegna, Italy) shows a different efficacy against various moulds and his activity seems to be produced by borneol, α -pinene, eucalyptol, camphor and limonene. *Aspergillus* and *Penicillium* are the genus showing an important inhibition of their development in vitro. Rosemary essential oil for these natural properties can be used as antimycotic additive to extended shelf-life of many foodstuffs.

Key words

Rosemary essential oil, moulds.

INTRODUZIONE

Gli oli essenziali sono composti naturali, volatili e complessi, estratti da piante aromatiche che li producono come metaboliti secondari. Molte varietà di queste piante sono localizzate in zone a clima temperato, come i paesi mediterranei e quelli tropicali, e rappresentano una parte importante della farmacopea tradizionale. Gli oli essenziali possono essere sintetizzati da tutti gli organi della pianta: fiore, foglie, gemme, semi, frutti ed anche legno e radici ed essere raccolti in cellule secretorie, cavità, canali, cellule epidermiche o tricomi secretori. È infinito il numero delle varianti prodotte in rapporto alla specie, al genere ed alla varietà della pianta, all'altitudine, alla composizione e all'esposizione del luogo dove cresce, agli agenti atmosferici, al clima, in ogni caso al "momento balsamico" termine con il quale si indica il periodo in cui esiste una maggiore concen-

trazione dei principi odorosi. Questo particolare momento può variare in relazione alle diverse parti della pianta (per esempio foglie e fiori) o anche a seconda del giorno e dell'ora di raccolta (1). Le metodologie di estrazione accettate per la definizione di un olio essenziale sono: la distillazione in corrente di vapore, la spremitura a freddo (delle bucce o epicarpo dei frutti del genere *Citrus*), la distillazione a secco o distruttiva (usata ad esempio per ottenere l'olio di cade a partire da *Juniperus oxycedrus*), l'estrazione in CO₂ supercritica (solubilizzazione di composti apolari che per loro natura sono scarsamente solubili in acqua) (2). Nonostante il concetto di estrazione in corrente di vapore sia abbastanza antico e probabilmente sia stato sviluppato dagli arabi più di mille anni fa, questa tecnologia non è stata mai utilizzata per isolare gli oli essenziali, bensì per ottenere le acque aromatiche, che erano considerate le vere "essenze" delle piante. Soltanto

con il progredire della tecnologia è stato possibile isolare con sempre maggior efficienza gli oli essenziali ed iniziare ad utilizzarli. Oggi sono largamente impiegati come antibatterici, antifungini e insetticidi. Si conoscono circa 3.000 tipi di oli essenziali, di cui circa 300 commercialmente importanti, in particolare nell'industria farmaceutica, agronomica, alimentare, sanitaria, cosmetica, e profumiera. Gli oli essenziali sono una miscela naturale molto complessa, che contiene da 20 a 60 composti in concentrazioni differenti ma che si possono distinguere in due grossi gruppi: terpeni e terpenoidi (geraniolo, citronella, timolo, mentolo), e composti aromatici e alifatici (safrolo, estrapolo, eugenolo) (1). In questo lavoro abbiamo voluto verificare l'attività antifungina dell'olio essenziale di rosmarino. Il rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) è un arbusto della famiglia delle *Lamiaceae*, spontaneo nel continente europeo, in Africa ed in Asia, tipico dei luoghi sassosi, delle rupi, delle arene in prossimità del mare. Cresce nei paesi attorno al Mediterraneo ed in Italia si trova sui litorali, dalla Liguria e Veneto sino alla Sicilia e Sardegna. Allo stato spontaneo cresce anche in Francia Meridionale, in Spagna ed in nazioni africane ed asiatiche affacciate sul Mediterraneo. È, quindi, una delle più rappresentative piante della flora mediterranea, ma, naturalizzato, il rosmarino si è alquanto spinto all'interno, ad esempio attorno ai Laghi del nord Italia, in Svizzera meridionale, sul Plateau-Central nella Francia, sui Pirenei. Coltivato ha raggiunto le nazioni più settentrionali d'Europa, localizzato in posizioni riparate e soleggiate, oppure coltivato in vaso e fatto svernare in serra fredda. Il rosmarino ha una ricca tradizione medica. Gli egiziani lo utilizzavano per curare i vizi di stomaco, le congestioni epatiche ed il vomito. Per i romani il rosmarino assicurava ai morti una serena permanenza nell'aldilà; veniva deposto nelle tombe e bruciato come i rametti di incenso. Nei Capitolari di Carlo Magno la specie è presente nell'elenco delle piante che non devono mancare mai negli orti del regno. Nel Medioevo il rosmarino veniva piantato in tutti i giardini, soprattutto in quelli dei conventi dove si coltivavano i "semplici" (varietà vegetali con virtù medicamentose). Venne introdotto nella mitologia cristiana: durante la fuga in Egitto la Vergine Maria avrebbe appeso ad un ramo di rosmarino alle fasce del Bambino Gesù. La moderna fitoterapia ha stabilito che i preparati a base di rosmarino favoriscono la secrezione biliare, hanno proprietà antisetiche e balsamiche, sono utili nelle affezioni dell'apparato respiratorio ed del fegato. Particolare interesse rivestono le proprietà antiossidanti dell'estratto di rosmarino, dovute alla presenza di terpeni

e di composti fenolici quali acido rosmarinico, carnosolo, acido carnosico e flavonoidi (3, 4). Il possibile sfruttamento dell'attività antiossidante degli estratti di rosmarino in campo agroalimentare è stato descritto in numerosi lavori, riguardanti l'inibizione dell'ossidazione lipidica in vari alimenti quali: oli vegetali (5,6), salse (7), pane (8), carni (9,10,11,12) e salumi (13,14,15). Gli effetti dell'olio di rosmarino sono stati anche testati nei confronti di specie fungine contaminanti cereali (16) e di prodotti derivati (pane) (17), come nei confronti di specie fungine produttrici di micotossine (18). L'olio di rosmarino è un biocomponente di film plastici utilizzati nel packaging. (19). Considerato il numero limitato di ricerche sugli effetti dell'olio di rosmarino nei confronti di specie fungine di interesse alimentare, scopo del nostro lavoro è stato quello di testare la sua attività antifungina verso alcune specie comuni contaminanti di alimenti.

MATERIALI E METODI

Specie fungine testate. Le specie fungine utilizzate per il nostro test appartengono ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*; e più precisamente: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ustus*; *Penicillium expansum*, *Penicillium aurantio-griseum*; *Fusarium moniliforme*. Le specie fungine appartengono alla collezione della Micoteca del Dipartimento VSA e sono state isolate da diversi prodotti alimentari. I ceppi sono stati prelevati e trapiantati su terreni selettivi: per genere *Aspergillus* terreno M₅S₅, per genere *Penicillium* terreno M₂, per genere *Fusarium* terreno PDA (Merk, Germany).

Olio essenziale. L'olio di rosmarino testato è prodotto in Sardegna (S. Antioco, CA) ed è caratterizzato da chemiotipo α -pinene/borneolo/bornilacetato/verbenone. Nel primo step della ricerca è stata effettuata la semina delle specie fungine sui terreni di coltura selettivi sopra citati. Nel secondo step, è stata effettuata l'apposizione, sulle stesse piastre Petri, di 3 dischetti di carta da filtro imbibiti con olio di rosmarino puro ed un quarto dischetto di "controllo", imbibito con acqua sterile. Parallelamente, le stesse specie fungine sono state trapiantate sui terreni di coltura come bianco. Le piastre insemenate sono state quindi incubate a 25 °C (*Penicillium* e *Fusarium*) e a 35°C (*Aspergillus*), per 15 giorni, verificando quotidianamente lo sviluppo del micelio fungino. La sperimentazione è stata effettuata in doppio.

RISULTATI

L'olio di rosmarino testato ha dimostrato un'efficacia differente a seconda della specie fungine, così come evidenziato in tabella n. 1.

Specie fungina	Efficacia olio rosmarino
<i>Aspergillus flavus</i>	+++
<i>Aspergillus niger</i>	++++
<i>Aspergillus ochraceus</i>	++
<i>Aspergillus ustus</i>	++++
<i>Penicillium expansum</i>	++++
<i>Penicillium aurantio-griseum</i>	++++
<i>Fusarium moniliforme</i>	+/-

Legenda: ++++ = la specie fungina non si è sviluppata nell'intero periodo della sperimentazione; +++ = la specie fungina si è sviluppata all'11° giorno; ++ = la specie fungina si è sviluppata al 9° giorno; +/- = la specie fungina si è sviluppata al 3° giorno.

L'attività antifungina dell'olio si è dimostrata più efficace nei confronti di *A. niger*, *A. ustus*, *P. expansum* e *P. aurantio-griseum* che non si sono sviluppati nell'intero periodo della sperimentazione. *A. flavus* ha manifestato un debole sviluppo a cominciare dall'11° giorno di sperimentazione; *A. ochraceus* si è sviluppato al 9° giorno di sperimentazione. La crescita di *F. moniliforme*, invece, non è stata inibita dall'olio di rosmarino, così come riportato da Daferera et al. (2003) (16). È probabile che l'effetto inibitorio di un olio essenziale sia dovuto al sinergismo di tutte le molecole che rientrano nella composizione, anche se sembra che l'attività delle componenti principali (terpeni) sia modulata dai composti minoritari (composti aromatici) (1).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti possiamo affermare che l'estratto di rosmarino testato ha un'azione inibente su specie appartenenti al genere *Aspergillus* e *Penicillium* e, in particolare, l'attività antifungina sembra sia dovuta al borneolo e all' α -pinene, all'eucaliptolo, alla canfora e al limonene. Gli *Aspergillus spp* sono miceti molto diffusi in natura e vi sono poche derrate alimentari e prodotti zootecnici dai quali non si siano potuti isolare. Inoltre, sono potenzialmente produttori di micotossine, metaboliti secondari, cancerogeni e mutageni; in

particolar modo *A. flavus* è il principale produttore di aflatossine, *A. niger* di ocratossina così come *A. ochraceus*. Inoltre, *A. flavus* nello specifico è contaminante tipico di cereali e derivati, prodotti di salumeria freschi e stagionati; *A. niger* contamina cereali, frutta e verdura, prodotti lattiero-caseari; *A. ochraceus* è specie fungina critica per cereali e derivati, prodotti ortofrutticoli, salumi e insaccati stagionati; *A. ustus* è responsabile di danni nei confronti di cereali, frutta secca, carne congelata e formaggi. I *Penicillium spp* rivestono una grande importanza nel deterioramento degli alimenti, sono considerati "critici" soprattutto per i prodotti lattiero-caseari perché in grado di provocare difetti delle caratteristiche sensoriali (20). Attualmente sorbati e propionati vengono utilizzati come antifungini nell'industria di preparazione delle bevande ed in quella alimentare, compresa quella della produzione di pane e altri prodotti da panetteria, latticini, gelatine, sciroppi, vini ed altre bevande. Oggi però i consumatori richiedono un minor utilizzo di additivi di origine chimica, ma l'aspettativa è che gli alimenti siano il più possibile privi di microrganismi, tossine e altri fattori deterioranti. L'utilizzo di oli essenziali potrebbe quindi rivestire una grossa importanza per la conservazione di molti alimenti, garantendo al consumatore l'uso di un prodotto naturale anziché di sintesi per prolungare la shelf-life di un alimento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- 2) Roggio, T., Scano, E.A. (2006) Progetto pilota "Erbe officinali". Porto Conte Ricerche S.r.l.
- 3) Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P. (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis L.* *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3530-3535.
- 4) Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22 (2), 257-268.
- 5) Basaga, H., Tekkaya, C., Acikel, F. (1997). Antioxidative and free radical scavenging properties of Rosemary extract. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 30, 105-108.
- 6) Damechki, M., Sotiropoulou, S., Tsimidou, M. (2001). Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *Grasas y Aceites*, 52 (3-4), 207-213.

- 7) Madsen, H.L., Sorensen, B., Skibsted, L.H., Bertelsen, G. (1998). The antioxidative activity of summer savory and rosemary in dressing stored exposed to light or in darkness. *Food Chemistry*, 63 (2), 173-180.
- 8) Frutos, M.J., Hernandez-Herrero, J.A. (2005) Effects of rosemary extract on the stability of bread with an oil, garlic and parsley dressing. *LWT*, 38, 651-655.
- 9) Djenane D., Sanchez-Escalante A., Beltran, J.A., Roncales, P. (2003). Extension of the shelf-life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and displayed under UV- free lighting. *Meat Science*, 64, 417-426.
- 10) Serdaroglu, M., Yldiz-Turp, G. (2004) The effects of ascorbic acid, rosemary extract and α -tocopherol/ascorbic acid on some quality characteristics of frozen chicken patties. *Food Science and Technology*, 7 (1).
- 11) Riznar, K., Celan, S., Knez, Z., Skerget, M., Bauman, D., Glaser, R. (2006) Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in Chicken Frankfurters. *J. of Food Science*, 71 (7), 425-429.
- 12) Seydim, A.C., Guzel-Seydim, Z.B., Acton, J.C., Dawson P.L. (2006). Effects of rosemary extract and sodium lactate on quality of vacuum-packaged ground ostrich meat. *J. of Food Science*, 71(1), 71-76.
- 13) Bradford, D.D., Huffman, D.L., Britt, J.M. (1994). Rosemary extract shown to improve shelf life of fresh pork sausage. *Highlights of Agricultural Research*, 41(1), 7.
- 14) Coronado, S.A., Trout, G.R., Dunshea, F.R., Shah, N.P. (2002). Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. *Meat Science*, 62, 217-224.
- 15) Tiekou Nassu, R., Guaraldo Goncalves, L.A., Pereira da Silva, M.A.A., Beserra F. (2003). Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science*, 63, 43-49.
- 16) Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. And *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 39-44.
- 17) Suhr, K.I., Nielsen, P.V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. of Applied Microbiology*, 94, 665-674.
- 18) Seydim, A.C., Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oil. *Food Research International*, 39, 639-644.
- 19) Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International J. Food Microbiology*, 122, 135-139.
- 20) Dragoni, I., Cantoni, C., Papa, A., Vallone, L. (1997) Muffe, alimenti e micotossicosi. Città Studi Edizioni, Milano.