



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
" BIOCHIMICA, BIOLOGIA MOLECOLARE E BIOTECNOLOGIE "

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Francesco Bernardi

**Biotrasformazioni di terpeni e oli essenziali con batteri e funghi  
isolati da frutti del genere Citrus della foresta amazzonica (Ecuador)**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

**Dottorando**

Dott. Maria Gabriela Moreno Rueda

---

*(firma)*

**Tutore**

Prof. Alessandro Medici

---

*(firma)*

Anni 2007/2009

# INDICE

## **Introduzione**

- Ecuador e la regione amazzonica *pag. 2*
- Il genere Citrus *pag. 20*
- Le biotrasformazioni *pag. 31*
- I microrganismi *pag. 37*
- Funghi epifiti *pag. 43*
- Oli essenziali *pag. 47*
- Biotrasformazioni di oli essenziali *pag. 57*
- I terpeni *pag. 61*
- Biotrasformazioni di terpeni *pag. 66*

## **Materiali e Metodi**

- Estrazione e caratterizzazione degli oli essenziali *pag. 77*
- Campionamento ed isolamento funghi e batteri *pag. 83*
- Biotrasformazioni di terpeni *pag. 92*
- Biotrasformazioni di oli essenziali *pag. 133*
- Test di attività antiossidante *pag. 147*

## **Risultati e discussione** *pag.150*

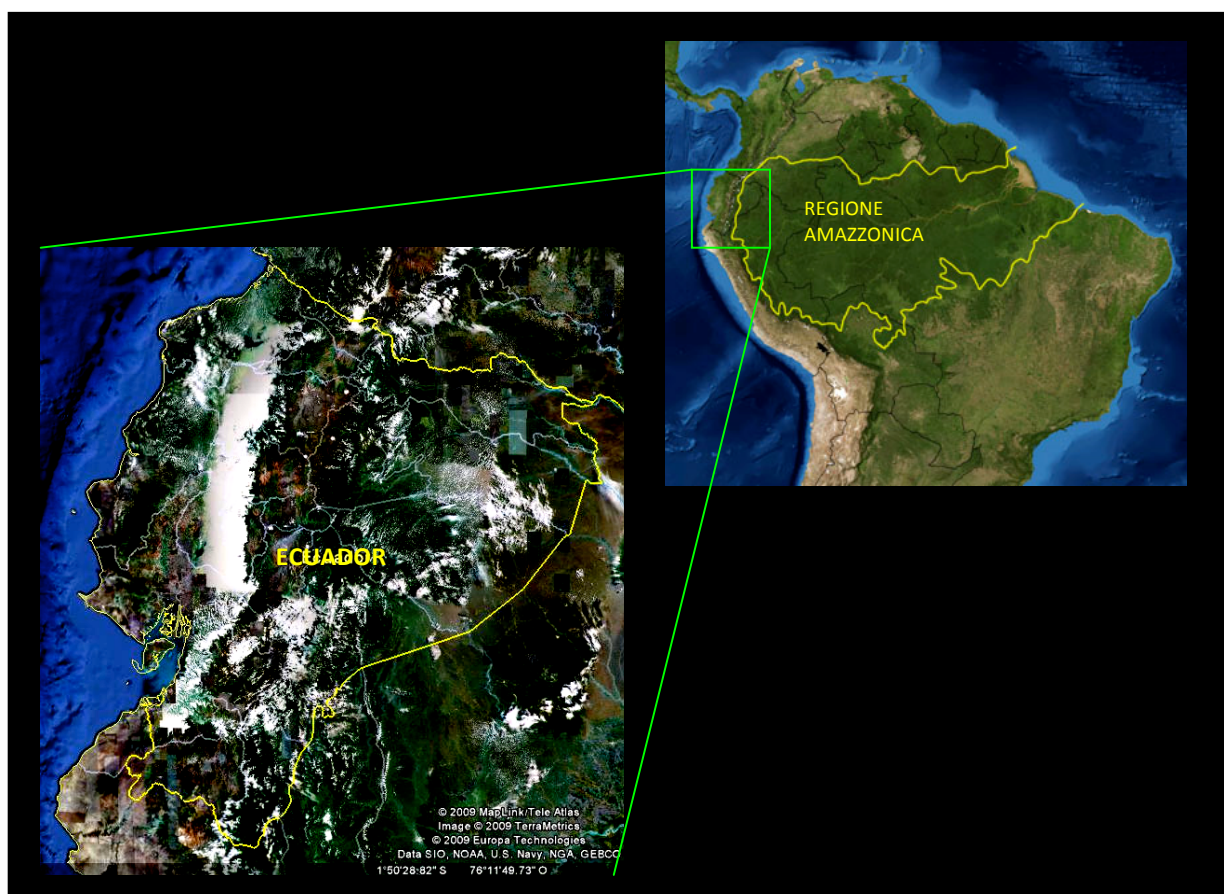
## **Appendice** *pag. 176*

## **Bibliografia** *pag. 187*

## **INTRODUZIONE**

## **ECUADOR E LA REGIONE AMAZZONICA**

La regione amazzonica o Amazzonia si estende per 7.8 milioni di km<sup>2</sup> circa lungo il bacino del fiume Rio delle Amazzoni. È una regione con una vasta area naturale tropicale. Il bacino del Rio delle Amazzoni si estende in Brasile, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guyana, Perù, Suriname e Guyana Francese. All'Ecuador appartengono 150.000 km<sup>2</sup> che corrispondono all'1.9% della superficie totale.



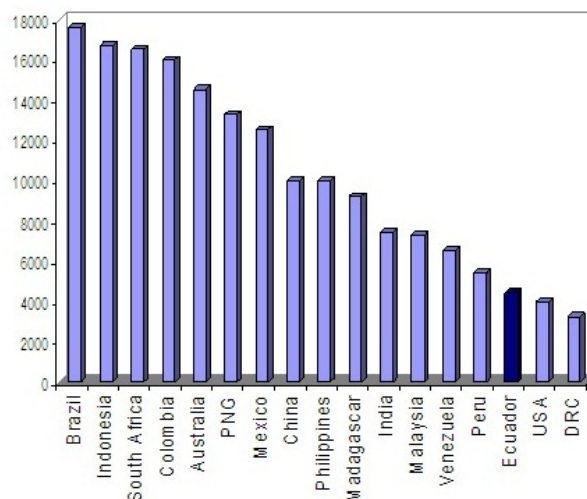
**Figura 1.** Ubicazione geografica dell'Ecuador all'interno della regione amazzonica.

Un numero considerevole di piante e di animali presenti sulla terra abita in questa regione: ci sono 40.000 specie di piante, 427 specie di mammiferi, 1.294 specie di uccelli, 378 specie di rettili e 427 di anfibi, 3.000 specie di pesci e tra 96.660 e 128.840 specie di invertebrati.<sup>1</sup>

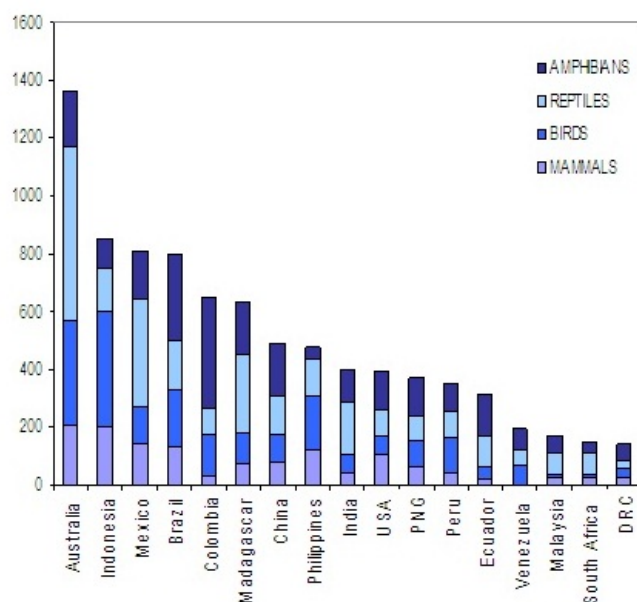
Nel Luglio del 2000 il World Conservation Monitoring Centre ha riconosciuto 17 paesi “megadiversi” (megadiverse countries). Questi 17 paesi ospitano più del 70% di tutte le specie presenti sulla Terra. L'Ecuador insieme a altri tre paesi della regione amazzonica (Brasile,

<sup>1</sup> [http://www.panda.org/what\\_we\\_do/where\\_we\\_work/amazon/the\\_area/](http://www.panda.org/what_we_do/where_we_work/amazon/the_area/)

Colombia e Perù) appartiene a questo gruppo. Come si può osservare nei **Grafici 1 e 2** l'Ecuador ha un numero basso tra i 17 paesi ad alto grado di biodiversità, se si considera il numero assoluto di specie endemiche dentro il suo territorio, ed occupa infatti rispettivamente il quindicesimo ed il tredicesimo posto in numero di specie di piante e di animali endemici.



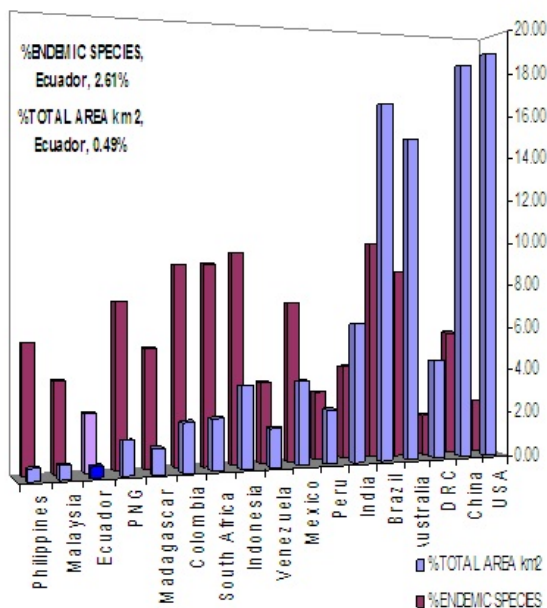
**GRAFICO 1.** Numero di specie di piante endemiche nei 17 paesi megadiversi.



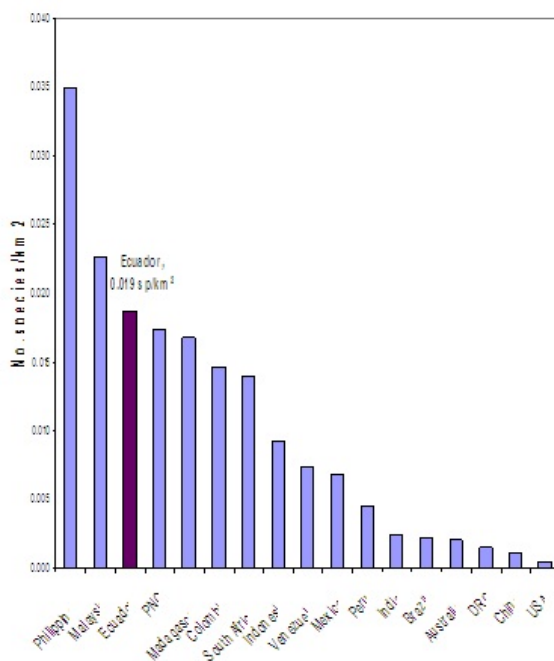
**GRAFICO 2.** Numero di specie di animali endemici (non pesci) nei 17 paesi megadiversi.

D'altra parte poiché la sua superficie è di soli 256.370 Km<sup>2</sup>, la più piccola all'interno del gruppo, l'Ecuador occupa il terzo posto per densità di specie endemiche per Km<sup>2</sup>, e, nel

dettaglio, é il paese con il maggior numero di anfibi per unità di superficie nel mondo. (**Grafici 3 e 4**).



**GRAFICO 3:** Percentuali di superficie confrontate con il numero di specie endemiche presenti nei 17 paesi megadiversi.



**GRAFICO 4:** Densità di specie endemiche nei 17 paesi megadiversi. Ecuador è il terzo paese con la densità più alta di specie in questo gruppo.

Esistono almeno cinque spiegazioni valide del motivo per cui ci sono tante specie concentrate in questo territorio:

- coefficiente equatoriale; luoghi che si trovano più vicino al meridiano dell'equatore hanno un numero maggiore di specie.
- tre ambienti assai diversi all'interno dello stato: la regione Costa, la foresta amazzonica e le Ande oltre alle isole Galàpagos.
- formazione di "microbacini", zone naturali isolate da ostacoli naturali dove nuove e diverse specie si sono sviluppate.
- l'Ecuador è un mosaico formato da bioregioni diverse che convergono in un "hot spot": Amazzonia, il Chocó, gli Altipiani Andini, e la regione Tumbesina.
- l'umidità della bioregione del Chocó dovuta alla presenza delle montagne delle Ande che intrappolano l'aria umida nella regione Costa, fenomeno che si vede aumentato per la corrente di El Niño fra gennaio e marzo (1).

Il maggiore livello di endemismo si concentra nella regione Costa per la diversità di habitat generato dalla variabilità di clima, tuttavia la regione Amazzonica ha più del 40% delle risorse naturali presenti.<sup>2</sup> Questa regione naturale si estende per circa il 58% del territorio nazionale e copre le aree sotto i 1300 m di altezza nelle propaggini orientali delle Ande che includono tutte le catene montagnose e i terreni bassi verso est. In tutta la regione si trovano pianure e valli fluviali, attraversate da grandi fiumi. Tra i principali ci sono: il Napo, il Curaray, il Pastaza, il Tigre, il Morona. Tutti sfociano nel Rio delle Amazzoni. L'area è molto ricca d'acqua ed è coperta da una foresta intricata. Il clima è equatoriale con temperature in media di 25°C e un'umidità ambientale del 90%. La regione amazzonica riceve annualmente precipitazioni superiori ai 2.500 mm ma ai piedi delle Ande questo valore raddoppia. L'acqua presente nella zona deriva dall'Oceano Atlantico e dall'evapotraspirazione della vegetazione, cioè il 50% del regime idrico dell'Amazzonia dipende dal suo riciclaggio interno. Questa regione è divisa in due sub-regioni, nord-centro e sud, sulla base della vegetazione presente e di fattori ecofisiologici e fisionomici (2).

All'Amazzonia Nord-Centro appartengono i seguenti ecosistemi: boschi sempreverdi delle "terre basse", allagati da acque bianche e da acque nere, boschi allagati di palme delle "terre basse" e prati lacustri delle "terre basse". Ognuno di questi sistemi ecologici è caratterizzato dalla

---

<sup>2</sup> <http://www.ecorae.org.ec>

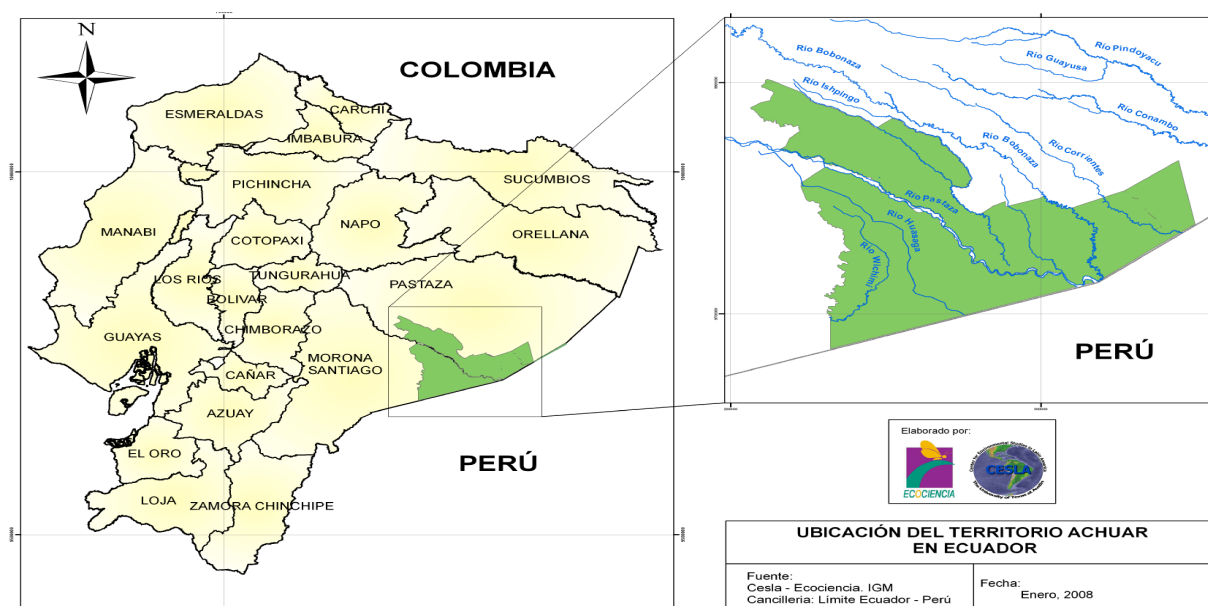
fisionomia e dal fenotipo della vegetazione di cui questi si compongono e anche dalle variazioni di altitudine, dai rapporti con il paesaggio e da altre differenze biogeografiche. Ciascuno di questi ecosistemi ha definite specie vegetali di importanza etnobotanica che forniscono un'idea di quanto questa diversità di ecosistemi in una superficie ridotta può avere effetto sugli altri tipi di vita macro- e microbiologica che in questi habitat si sviluppano. Gli effetti sono variazioni del fenotipo o “modificazioni” sia di carattere morfologico sia fisiologico e biochimico, quest'ultimo manifestato attraverso la possibile formazione di enzimi inducibili e reprimibili imposto dalle condizioni ambientali per la presenza di sostanze appartenenti alla chimica delle piante (3).

La regione Amazzonica dell'Ecuador é divisa politicamente in sei province (**Tabella 1**) in cui vivono alcuni gruppi etnici o “nacionalidades indígenas” tra le quali: Huaorani, Shuar, Cofán, Siona-Secoya, Shiwiar, Záparo, il popolo “intangibile” dei Tagaeri e gli Achuar. Nella regione Nord-Centro Amazzonica si trovano le province di Pastaza e Morona Santiago che ospitano il territorio del popolo Achuar, che rappresenta un sito importante per lo sviluppo di questa tesi. Questo territorio occupa il 2.6% del territorio nazionale e poco meno del 0.1% della superficie totale della regione amazzonica. Sono 6.812 Km<sup>2</sup> che sono stati riconosciuti dal governo ecuadoregno, nell'anno 1992, come territorio del popolo Achuar (**Figura 2**).

PROVINCIA	CAPOLUOGO	SUPERFICIE KM <sup>2</sup>	POPOLAZIONE 1998
Sucumbíos	Nueva Loja	18.612	130.095
Napo	Tena	11.409	79.610
Francisco de Orellana	Puerto Francisco de Orellana	22.000	85.771
Pastaza	Puyo	29.520	61.412
Morona Santiago	Macas	28.915	113.3003
Zamora Chinchipe	Zamora	20.681	76.414
Totale		131.137	546.602

**Tabella 1.** Divisione politica delle province della Regione Amazzonica dell'Ecuador





**Figura 2.** Mappa politica dell'Ecuador. In evidenza il territorio Achuar ubicato nelle provincie di Pastaza e Morona Santiago.

Il territorio Achuar rappresenta uno degli ultimi boschi primari che collega le Ande con il bosco basso dell'ovest del Perù e Brasile. Le difficoltà di accesso, per la mancanza di strade e per il limite geografico dato dalla diramazione Cutucù della Cordigliera Sudorientale delle Ande, rendono questo territorio raggiungibile solo per via aerea o fluviale. Questo isolamento ha impedito lo sviluppo di aziende che non possono essere considerate come sostenibili (aziende petrolifere, di legname, minerarie) e di conseguenza ha anche permesso la conservazione di questa importante area. L'isolamento geografico non è stato l'unico fattore a preservare la selva dai pericoli di forme di sfruttamento non sostenibili; infatti, il popolo Achuar con l'intervento delle tre Federazioni Shuar e Achuar (FINAE, FICSH e FIPSE) ha dimostrato una forte opposizione all'entrata nei propri territori di compagnie petrolifere. A questi territori che sono all'interno del blocco 23, dato in concessione dal Governo Ecuadorense alla compagnia CGC, e del blocco 24, dato in concessione alla Compagnia Arco che ha venduto nel 2000 i diritti alla Burlington, le compagnie petrolifere non sono ancora riuscite ad avere accesso.<sup>3</sup>

Circa 6.000 Achuar vivono in questo territorio. Fino al 2007 vi erano 64 comunità raggruppate in 10 associazioni: Pumpuentsa, Saapapentsa, Tsunkintsa, Wampuik, Wichim, Arutam, Churuya, Makusar, Associazioni di Centri Achuar di Pastaza, Associazione Achuar di Copataza. Queste

<sup>3</sup> <http://www.nacionalidadachuarecuador.org>

associazioni a loro volta appartengono alla Nacionalidad Achuar del Ecuador (NAE) che é l'organizzazione rappresentante dell'etnia e che interagisce con diversi attori tra cui ci sono alcuni dei comuni interessati, organizzazioni indigene a livello locale, regionale e nazionale, entità di governo interessate alla regione, ONG, ONLUS, ecc., con lo scopo di trovare meccanismi di sviluppo e di ottenere un ruolo nelle dinamiche sociali, culturali, politiche, economiche, scientifiche a livello nazionale e anche internazionale. Diversi progetti si svolgono con l'obiettivo di valorizzare la loro cultura, i loro saperi etno-botanici, etno-medici ottenuti tramite la conoscenza della natura che li circonda e il suo uso potenziale, e di proteggere la selva amazzonica da loro custodita. La presente tesi nasce a latere di alcuni di questi progetti.

Gli Achuar vivono delle risorse naturali presenti nel loro ambiente, quindi praticano ancora la caccia ad animali selvatici, la pesca, la raccolta di frutti, radici, foglie e altri prodotti di loro consumo abituale (insetti, larve). Hanno fatto esperienze con l'allevamento di animali e con l'agricoltura utilizzando specie sia autoctone sia introdotte dalle altre regioni, lavorando in spazi relativamente piccoli intorno alle loro abitazioni che costituiscono gli orti familiari chiamati "aja achuar".

Negli orti Achuar si possono trovare arachide, manioca, taro, patata dolce, fagiolo, mais, zenzero, zafferano delle indie e frutteti di anacardi, guaiava, cacao, anatto (**Tabella 2**).

Nome scientifico	Achuar	Spagnolo	Italiano
<i>Manihot esculenta</i>	Máma	Yuca	manioca
<i>Arachis hypogaea</i>	Nuse	Mani	arachide
<i>Colocasia esculenta</i>	Papachinia	Papachina	taro
<i>Ipomoea batatas</i>	Inchi	Camote	patata dolce
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Miik	Fréjol	fagiolo
<i>Zea mays</i>	Shaa	Maíz	mais
<i>Zingiber officinale</i>	Ajej	Jengibre	zenzero
<i>Curcuma longa</i>	Mankankiam	Curcuma	zafferano delle indie
<i>Musa paradisiaca</i>	Paantam	Plátano	banana
<i>Anacardium occidentale</i>		Guanábana	anacardo
<i>Eugenia stipitata</i>		Arazá	
<i>Psidium guajaba</i>	Kirim	Guayaba	
<i>Theobroma cacao</i>	Kawarunch	Cacao	cacao
<i>Bixa orellana</i>	Ipiak	Achiote	annatto

**Tabella 2.** Coltivazione tradizionale dell'aja

Frutti come gli agrumi sono stati introdotti e benché non siano i principali componenti degli orti si possono trovare sparsi nelle comunità, principalmente in zone di accesso comune come negli spazi adiacenti alle piste per gli aerei o per segnare l'inizio dei percorsi che collegano le diverse comunità o i sentieri di caccia. In tutti i casi sono in contatto diretto con la vegetazione selvatica perché non appartengono a coltivazioni specifiche e sono fuori dell'*aja*, generalmente ai confini tra le comunità e il bosco.

Per quanto riguarda la biodiversità microbiologica, batteri e funghi isolati da ambienti amazzonici sono stati soggetto di diversi studi. Borneman and Triplet, 1997, hanno fatto una prima descrizione della biodiversità dei batteri isolati da ecosistemi di questo tipo. In questa ricerca hanno trovato 100 sequenze di geni codificate per le sub-unità rRNA di cui il 18% non potevano essere classificate dentro nessun raggruppamento sistematico batterico conosciuto. Inoltre hanno stabilito le differenze di popolazioni microbiologiche tra suoli che hanno sofferto deforestazione e suoli di foresta matura.

Sia per la natura endemica sia per i fattori esterni che influiscono su di essi, i microrganismi con questa origine rappresentano un bersaglio interessante per ricerche che possano portare a nuove scoperte in diversi ambiti della scienza. Negli ultimi anni si sono eseguiti studi che coprono un ampio intervallo di argomenti; ad esempio sono stati realizzati studi di screening su attività antibatterica contro batteri gram-positivi come *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (4), sono stati trovati lieviti e batteri che sono attivi per la degradazione di fenolo (5) e sono state fatte indagini su attività antiossidante e anti-infiammatoria di funghi endofiti di provenienza amazzonica che stanno dando risultati positivi <sup>4</sup>

Questo conferma l'interesse scientifico di questo approccio.

In questo ambito fino ad ora sono stati considerati tre aspetti:

- l'importanza della regione amazzonica come fonte di una grande biodiversità, tenendo conto che quattro dei paesi che la formano sono paesi "megadiversi";
- la grande potenzialità di questa biodiversità nell'area delle scienze naturalistiche
- l'intervento dei gruppi umani che convivono con questa biodiversità, le loro conoscenze sui diversi tipi di sfruttamento e il loro ruolo nella conservazione e protezione ambientale.

Restano da analizzare ancora i meccanismi finora utilizzati per la ricerca di queste risorse naturali, gli attori che l'hanno svolta, il livello di intervento politico e scientifico dei paesi

---

<sup>4</sup> [http://www.eltiempo.com/vidadehoy/ciencia/descubren-decenas-de-microorganismos-beneficos-en-plantas-del-amazonas-\\_4463022-1](http://www.eltiempo.com/vidadehoy/ciencia/descubren-decenas-de-microorganismos-beneficos-en-plantas-del-amazonas-_4463022-1)

interessati e le loro capacità di ricerca. Per questo scopo prendiamo in esame alcuni indicatori economici per avere un'idea della situazione attuale dell'Ecuador.

Tranne il Brasile, gli altri paesi della regione appartengono al gruppo di PVS (Paesi in Via di sviluppo). Nel 2009 il Brasile è entrato nei paesi NIC (Nazioni di Recente Industrializzazione). Nella **Tabella 3** sono riportati gli indici economici che sono stati individuati come indicatori di crescita economica e sono messi a confronto i dati di paesi sviluppati (Stati Uniti e Italia) con i dati del Brasile, come esempio dei paesi NIC, e dell'Ecuador (Paese in Via di Sviluppo).

Se si guardano i dati del PIL (Prodotto Interno Lordo) è evidente il salto esistente tra le economie sviluppate e l'economia ecuadoregna. Il Brasile ha valori che superano 18-30 volte il PIL ecuadoregno a seconda che il valore sia nominale oppure a parità di potere di acquisto. Tuttavia, è noto che questo indicatore ha degli svantaggi nella sua interpretazione perché trascura alcune considerazioni o risorse che contribuiscono alla qualità della vita oltre ai beni e ai servizi che fanno muovere l'economia di un paese. Nel caso dell'Ecuador le risorse naturali, petrolifere e minerarie possono influire in maniera positiva o negativa sul benessere della popolazione.

Parlando di sfruttamento petrolifero e minerario bisogna porre attenzione al bilancio tra i benefici economici che potrebbero essere ottenuti dall'aumento del lavoro generato dall'industria e di conseguenza il potenziale aumento della ricchezza della nazione, e le "spese ambientali" che devono essere fatte per garantire la sostenibilità ambientale di questo tipo di attività. È necessario, inoltre, essere consapevoli della vera fattibilità di uno sfruttamento che non porti nel medio o lungo termine a un collasso ambientale, specialmente in zone di intervento che possiedono una biodiversità magnifica come questa che adesso ci interessa.

Le risorse naturali sono un fattore che contribuisce al benessere di un paese e per questa ragione si parla di un altro indicatore, il PIL verde che prende in considerazione le conseguenze ambientali delle attività che si svolgono per generare i beni e servizi con cui si misura l'andamento dell'economia. Purtroppo è molto difficile riuscire a monetizzare la biodiversità e la sua perdita o gli effetti del cambiamento di clima causati dalle emissioni dell'anidride carbonica. L'esperienza in Cina riguardo l'applicabilità di questo indicatore insieme alle teorie di alcuni economisti concludono che "si otterrebbe un risultato di crescita nulla o perfino negativa" (6).

PAESE	PIL (PPA) 2007 Banca Mondiale <sup>a</sup>		PIL (PPA) 2008 FMI <sup>a</sup>		PIL nominale 2008 FMI <sup>b</sup>		PIL nominale 2007 Banca Mondiale <sup>b</sup>		PIL (PPA) pro-capite <sup>c</sup> 2008		HDI			
	No. <sup>f</sup>	Valori	No. <sup>f</sup>	Valori	No. <sup>f</sup>	Valori	No. <sup>f</sup>	Valori	No. <sup>f</sup>	Valori	No. <sup>f</sup>	Valori	HDI 2006 <sup>d</sup>	HDI 2005 <sup>e</sup>
<b>Mondo</b>		65.435.067		68.996.849		60.689.812								
<b>Stati Uniti</b>	<b>1</b>	13.811.200	<b>1</b>	14.264.600	<b>1</b>	14.264.600	<b>1</b>	13.811.200	<b>6</b>	46.859	<b>15</b>	<b>▼</b> 0.95		<b>▼</b> -3
<b>Eurozona</b>		10.371.393												
<b>America Latina</b>		5.392.778												
<b>Italia</b>	<b>10</b>	1.780.135	<b>10</b>	1.814.557	<b>7</b>	2.313.893	<b>7</b>	2.107.481	<b>28</b>	30.581	<b>19</b>	<b>▲</b> 0.945		<b>▲</b> -1
<b>Brasile</b>	<b>9</b>	1.833.611	<b>9</b>	1.981.207	<b>10</b>	1.572.839	<b>10</b>	1.314.170	<b>78</b>	10.326	<b>70</b>	<b>▲</b> 0.807		<b>-</b> 0
<b>Ecuador</b>	<b>61</b>	98.681	<b>62</b>	106.993	<b>72</b>	52.572	<b>66</b>	44.184	<b>92</b>	7.685	<b>72</b>	<b>▲</b> 0.807		<b>▲</b> -17

**Tabella 3.** Tabella comparativa degli indici PIB e IDH tra paesi appartenenti a diversi gruppi di sviluppo economico.

<sup>a</sup> Milioni di dollari internazionali

<sup>b</sup> Milioni di dollari USA

<sup>c</sup> Dollari USA

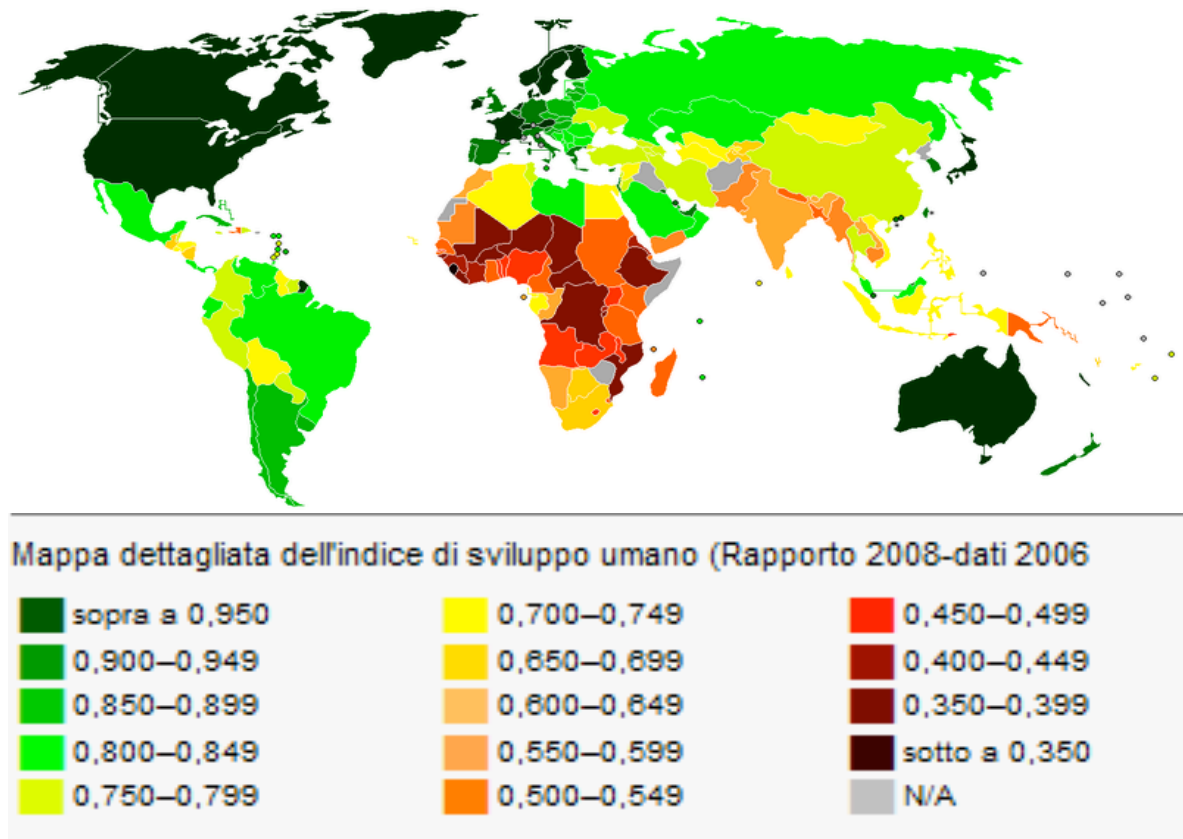
<sup>d</sup> Dati pubblicati nel 2008 e confrontati con il 2006

<sup>e</sup> Dati pubblicati nel 2007 e confrontati con il 2005

<sup>f</sup> Posizione nella tabella generale degli Stati

Sarebbe comunque interessante riuscire a stabilire un indice che faccia riferimento alla biodiversità e che permetterebbe, prendendo il caso dell'Ecuador, un miglioramento della sua posizione nella lista degli stati dove è ubicato al 62mo posto del PIL (PPA), al 72mo del PIL nominale e al 92mo del PIL procapite nell'anno 2008.

Un ulteriore indicatore alternativo è l'indice di sviluppo umano (HDI) (**Figura 3**) che tiene conto oltre al PIL dell'alfabetizzazione e della speranza di vita. L'Ecuador occupa il 72mo posto nella lista dei 174 stati delle Nazioni Unite. Nonostante questo è stato classificato dentro al gruppo di **alto sviluppo economico** e ha registrato un miglioramento di 17 posti dal 2005, con una speranza di vita di 74.7 anni (dati 2005), con una percentuale di alfabetizzazione del 91% e un indice lordo di iscrizioni scolastiche del 75.3% (Relazione su Sviluppo Umano UNDP 2007/2008).



**Figura 3.** Mappa dell'indice di sviluppo umano HDI, Rapporto 2008 – dati 2006.

Gli aspetti interessanti da analizzare in riferimento a questi indicatori sono quelli in relazione con l'educazione, in particolare con l'attività di ricerca in discipline connesse alla biodiversità.

In Ecuador esistono 75 università e 380 istituti di educazione superiore, circa l'80% dei quali sono stati creati dopo il 1990.<sup>5</sup> Questi dati evidenziano una grande offerta formativa in termini di quantità, ma senza nessuna informazione sulla qualità. Fino all'anno 2006 vi erano circa 615.000 professionisti tra diplomati, tecnici superiori, laureati e post-laureati ([www.conesup.net](http://www.conesup.net)), cifra che corrisponde al 9% della popolazione di età superiore ai 22 anni. Di questa percentuale 31.300 professionisti hanno un titolo di quarto livello o post-laurea e, secondo la nuova riforma universitaria, sarebbero adatti all'insegnamento universitario.

Nell'ambito della ricerca, la spesa in scienza e tecnologia espressa in percentuale in rapporto al PIL è dello 0.23% (SENACYT – Dirección de Investigación Científica 2009). Questo valore pone l'Ecuador agli ultimi posti in America Latina. I finanziamenti provengono prioritariamente dal governo e dalle imprese, mentre i fondi che vengono dall'estero rappresentano solo il 4.4%. Le ricerche che riguardano l'ambiente sono al terzo posto come priorità negli obiettivi socio-economici con il 13.5%, precedute dalle tecnologie agricole e dalle ricerche civili, mentre subito dopo si trovano le tecnologie industriali.

Per portare avanti queste ricerche l'Ecuador conta su di 3619 unità tra ricercatori, dottorandi, borsisti, personale tecnico e di supporto, tra cui solo l'8.5% si interessa di scienze naturalistiche. Nel 2007 le spese per ricercatore sono di solo 35.59 dollari (dati pubblicati dalla Segretaria di Scienza e Tecnologia dell'Ecuador SENACYT). In questo modo si sono ottenuti, nel 2007, come prodotti di ricerca un totale di 329 pubblicazioni in riviste scientifiche, tra le quali 173 su temi ambientali, chimici e biologici (RICYT – Dirección de Investigación Científica 2009).

Analizzando i dati sopracitati è possibile concludere che le risorse economiche e umane per la ricerca sono abbastanza limitate, ed inoltre se si prendono in considerazione fattori come la distribuzione di queste due risorse tra le università e gli istituti, si vede che nella maggioranza dei casi non sono proporzionali, creando così una disparità del livello di formazione inter-istituzionale.

Le pubblicazioni sul tema "biodiversità amazzonica" mostrano il Brasile come un protagonista importante in ambito scientifico, tecnologico ed industriale in quanto possiede le strutture universitarie e le aziende in cui questa biodiversità viene valorizzata. Questa situazione non è la stessa per gli altri paesi che, come abbiamo visto prima, non rappresentano ancora una forza consolidata di ricerca e dove pratiche come la bio-pirateria sono avvenute in passato e dove il rischio è ancora presente, non tanto per la carenza di normative in riferimento a brevetti e

---

<sup>5</sup> [www.conesup.net](http://www.conesup.net)

protezione dei diritti di proprietà intellettuale e patrimonio genetico, ma principalmente per la mancanza di partecipazione significativa delle forze locali di ricerca.

In Ecuador, dopo la Costituzione del 1998, è stata istituzionalizzata l'amministrazione decentralizzata, che mediante il decreto esecutivo del 10 luglio del 2001 definisce gli ambiti di azione dei consigli provinciali, consigli municipali e giunte parrocchiali affinché queste possano poco a poco assumere funzioni che attualmente svolge il governo centrale.<sup>6</sup> Nel Piano Nazionale di Decentralizzazione si stabiliscono i 12 settori che devono essere decentralizzati: Pianificazione e Amministrazione Generale, Ordinamento Territoriale, Servizi Pubblici, Educazione e Cultura, Salute, Benessere Sociale, Fondazioni e Corporazioni senza fini di lucro, Trasporto, Ambiente, Produzione ed Occupazione, Risorse Naturali, Infrastruttura Economica.

In materia ambientale le Giunte Parrocchiali rurali, che sono organismi del Regime Locale Autonomo e che esercitano il governo a livello di comunità, hanno le seguenti attribuzioni:

- Coordinare con i consigli provinciali, i consigli municipali, gli enti statali e le organizzazioni non governative tutto quello che riguarda la gestione ambientale;
- Coordinare con gli organismi pubblici tutto quello che riguarda il controllo e l'applicazione delle sanzioni per l'uso indebito di elementi nocivi per la salute umana nella produzione agricola e zootecnica;
- Stimolare l'impiego di tecnologie alternative nella produzione agricola e zootecnica e loro derivati;
- Coordinare ed esigere dai municipi una gestione adeguata e lo smaltimento dei rifiuti solidi;
- Prevenire la nascita di conflitti che potrebbero derivare dalla gestione inadeguata delle risorse naturali nell'area della parrocchia.<sup>7</sup>

Il territorio Achuar è governato da 3 giunte parrocchiali Huasaga (Morona Santiago), Simón Bolívar e Nuevo Corrientes (Pastaza), questi tre governi hanno l'autonomia per gestire meccanismi alternativi di sviluppo per la popolazione locale e che allo stesso tempo salvaguardano l'equilibrio con l'ambiente. La loro attività è portata avanti con la collaborazione degli attori presenti nella zona e che in dipendenza dei tipi di progetti che svolgono possono influenzare sull'educazione a livello locale, e persino sull'attività di ricerca su temi di biodiversità. Alcuni degli attori presenti sul territorio sono:

---

<sup>6</sup> Constitución política de la República del Ecuador, título XI, capítulos 1-3

<sup>7</sup> Registro Ufficiale n°421 del 27 Settembre 2001



- Il PRODEPINE (Proyecto de Desarrollo de los Pueblos Indígenas y Negros del Ecuador) implementato dal Governo dell'Ecuador nel 1999, con fondi del Banco Mondiale, ha sviluppato un programma di costruzione di aule scolastiche, case comunali, cambiamenti radio HF congiuntamente con la NAE (Nacionalidad Achuar del Ecuador).
- La presenza della Missione Protestante è stata sporadica per cui la sua influenza sulle comunità è di gran lunga minore. Periodicamente i missionari portano i giovani Achuar delle comunità evangeliche in accampamenti organizzati all'esterno del loro territorio.
- La Fundación Pachamama dal 1996 sta aiutando a livello di direttivo e contribuendo al mantenimento dell'apparato amministrativo della NAE che ha sede a Puyo. Fornisce inoltre un sostegno puntuale nel campo della formazione professionale ed ha contribuito alla costituzione del Servizio Aereo Tsentsak.
- La presenza dello Stato si concretizza attraverso il Ministero dell'Educazione e il Ministero della Salute. Il Consiglio Provinciale appoggia inoltre la costruzione di infrastrutture comunitarie come scuole, case comunali, teleferiche, etc. La Direzione di Aviazione Civile fino a dicembre 2001 riconosceva economicamente ad ogni comunità il lavoro di mantenimento delle piste.
- La Missione Cattolica Salesiana, iniziata nel 1967 con una presenza periodica che a partire dal 1971 è divenuta permanente, oltre al suo lavoro pastorale ha operato nei campi dell'educazione, della salute, dell'organizzazione e della promozione umana. Quest'ultimo aspetto è stato assunto dalla Fundación Chankuap' a partire dal 1997.

La Fondazione Chankuap lavora con la collaborazione di ONG in progetti mirati allo sviluppo sostenibile del popolo Achuar. Tre di questi progetti vengono descritti di seguito.

Con il primo progetto intolato "Ecosviluppo Achuar", svoltosi dal 1997 al 2000, la Fundación Chankuap' ha installato botteghe comunitarie –centri di stoccaggio in luoghi strategici-raggiungibili anche a piedi dalle comunità circostanti. Tali botteghe svolgevano una doppia funzione: da un lato fornivano articoli di prima necessità come vestiti, materiale scolastico, sapone, dall'altro lato, ricevevano ed immagazzinavano la produzione agricola ed estrattiva delle comunità fino al momento di essere spedita in aereo a Macas. Le botteghe comunitarie si trovano nelle comunità di Wampui, Pumpuenta, Sasaim, Kaeptach, Youtsunts, Munti, Wichim,

Numpaim e Saapapentsa. I prodotti commercializzati attraverso le botteghe sono: achiote (annatto), sangue di drago, arachide, olio di ungurahua, ishpink (calici fiorali), fibra e cacao.<sup>8</sup>

Il secondo progetto "Realizzazione di piani di gestione con le comunità Achuar dell' Ecuador per un uso sostenibile delle risorse naturali" nasce dalla collaborazione fra la Fundacion Chankuap e l'ONG ACRA (Associazione per la Cooperazione Rurale in Africa e America Latina) con il finanziamento del Ministero degli Affari Esteri. Il progetto si articola in tre anni (2007-2010), e prevede tre attività principali:

1. il supporto all'attività di trasformazione e vendita dei prodotti della Fundacion Chankuap,
2. l'appoggio al rafforzamento istituzionale della NAE (Nacionalidad Achuar del Ecuador, organo rappresentativo delle comunità Achuar)
3. la realizzazione di piani di gestione delle risorse naturali calati a livello di comunità, attività principale del progetto.

Il piano di gestione nasce come strumento realmente partecipativo, messo in moto dalla Comunità e appoggiato solo esternamente da tecnici (zoologi, botanici, agronomi, geografi) e mirato a una riflessione condivisa dello stato di salute delle risorse naturali proprie della comunità, delle modalità fino ad ora adottate per gestire e utilizzare queste risorse e di conseguenza ad un'autoimposizione di norme di gestione valutate adeguate al mantenimento sul lungo periodo della ricchezza naturale. I temi che le comunità Achuar interessate al progetto hanno considerato pertinenti al piano di gestione sono state rispettivamente: gestione della fauna e della caccia, gestione del taglio di alberi per costruzione o alimentazione, gestione dei pascoli e deforestazione, gestione della pesca, gestione dei rifiuti, mantenimento delle tecniche artigianali tradizionali per limitare l'importazione di prodotti non biodegradabili. Il progetto, che si è avvalso di 8 tecnici Achuar e 9 collaboratori operanti dalla sede con periodi saltuari di intervento nella selva, ha coinvolto 4 comunità il primo anno, 8 il secondo e 4 il terzo.

Il terzo progetto "MAE 7998", realizzato con la collaborazione tra la Fondazione Chankuap e l'ONG italiana VIS (Volontariato Internazionale per lo Sviluppo) e svoltosi nel periodo 2006-2009, ha riguardato la trasformazione delle materie prime, provenienti dalla produzione agricola e dai procedimenti di estrazione effettuati dai membri delle comunità, in prodotti finiti con lo scopo aumentarne il valore aggiunto e di trovare loro un mercato adatto tale da valorizzarne la provenienza e l'industrializzazione in loco. Per questo motivo uno dei punti importanti su cui puntare è stata la qualità dei prodotti finiti (compatibile con gli standard del mercato), raggiunta

---

<sup>8</sup> Fundación Chankuap report 2001

mediante l'implementazione dei sistemi di gestione di qualità che puntano all'ottenimento di certificazioni internazionali come ISO 22000:2015 o GMP.

Con questa finalità la Fondazione Chankuap si avvale di vari tecnici in ogni step della filiera produttiva: agronomi e forestali, responsabili delle attività di pianificazione e monitoraggio continuo, e farmacisti per le attività di trasformazione di prodotti. Inoltre nell'equipe c'è un numero importante di stagisti Achuar, che facevano da tramite con la comunità trasferendo il know-how.

L'attività di trasformazione dei prodotti è realizzata principalmente presso il Centro de Acopio de la Fundación Chankuap ubicato a Macas, che è anche la sede delle attività amministrative dell'organismo. Questo centro è stato attrezzato per effettuare le attività di produzione, il controllo di qualità e il magazzinaggio, e attualmente si eseguono le procedure per la produzione di oli essenziali, di cosmetici, di prodotti erboristici e alimentari. Queste sono le linee di produzione principali.

Tra i prodotti alimentari si producono principalmente tisane (citronella, guayusa, e diverse miscele) e spezie (zenzero, curcuma, ishpingo), mediante l'impiego di tecniche di essiccamento e macinazione. Un prodotto di grande importanza è il "*mani*" (arachide) che per il valore culturale per il popolo Achuar è stato migliorato per quanto riguarda la produzione e la commercializzazione. Altro prodotto interessante è l'*achiote* (annatto) utilizzato come colorante naturale alimentare e cosmetico.

Tra i prodotti erboristici si sono sviluppati sciroppi per la tosse a base di zenzero, ishpingo (*Ocotea quixos*) ed eucalipto, e un gel a base di "*chuchuguazo*" (*Maytenus macrocarpa*) e zenzero utilizzato come antidolorifico ad uso esterno. Su questi prodotti sono stati fatti le analisi per verificare le capacità terapeutiche, le analisi chimico-fisiche e i test microbiologici che garantiscono la stabilità, sicurezza e efficacia del prodotto.

Per quanto riguarda i prodotti cosmetici si sono sviluppate 5 linee di prodotti liquidi/semiliquidi divise in base agli oli essenziali impiegati nelle formulazioni: ishpingo, zenzero, agrumi, curcuma, e la quinta linea corrisponde all'olio fisso di *ungurahua* (*Oenocardus bataua*) usato come composto attivo per la cura dei capelli. Ciascuna di queste linee si sviluppa in varie formulazioni cosmetiche come creme, bagni schiuma, shampoo, oli da massaggio e profumi. Esiste una linea aggiuntiva di saponi solidi: in questi prodotti si valorizzano l'olio di *ungurahua* di caratteristiche simili all'olio di oliva ed estratto nelle comunità, gli oli essenziali citati prima e

l'uso di coloranti naturali come la norbixina estratta dall'*achiote*" presso lo stesso Centro de Acopio.

Gli oli essenziali costituiscono una tipologia di prodotti di grande importanza sulla base dei seguenti fattori:

1. sono la base per lo sviluppo dei prodotti cosmetici ed erboristici.
2. la loro estrazione in loco fornisce a questi prodotti un valore aggiunto
3. la tecnologia di estrazione è trasferibile alle comunità Achuar, sprovviste di elettricità e di sistemi d'acqua potabile

La loro estrazione eseguita mediante distillazione in corrente di vapore è effettuata sia presso il Centro di Acopio sia nelle comunità Achuar all'interno della foresta amazzonica (Juyukamentsa, Wampuik, Wasakentsa). Il trasferimento di tecnologia è stato possibile e ha portato grandi vantaggi, sia per il volume di materia prima da trasportare per via aerea, sia per il beneficio economico e sociale che è legato allo svolgimento di un'attività innovativa in loco.

Gli oli essenziali estratti e commercializzati dalla Fondazione Chankuap' sono elencati nella

**Tabella 4.**

<b>OLIO ESSENZIALE</b>	<b>PARTE UTILIZZATA</b>	<b>NOME SCIENTIFICO</b>
Olio essenziale di ishpingo	Foglie e calici fiorali	<i>Ocotea quixos</i>
Olio essenziale di citronella	Foglie	<i>Cymbopogon citratus</i>
Olio essenziale di limone	Foglie	<i>Citrus limon</i>
Olio essenziale di mandarino	Foglie	<i>Citrus nobilis</i>
Olio essenziale di arancia	Foglie	<i>Citrus aurantium</i>
Olio essenziale di limone dolce	Foglie	<i>Citrus latifolia</i>
Olio essenziale di zenzero	Radici	<i>Zingiber officinale</i>
Olio essenziale di curcuma	Radici	<i>Curcuma longa</i>

**Tabella 4.** Oli essenziali prodotti dalla Fondazione Chankuap

Tutti i prodotti sono commercializzati sia nel mercato nazionale sia internazionale, principalmente in Italia dove si esportano gli oli essenziali e i saponi solidi. Nel 2006 sono stati venduti 48 L di olio essenziale di ishpingo e 24 L di olio essenziale di zenzero e nel 2008 sono state vendute 6000 pezzi di sapone solido.

L'ambito di ricerca all'interno della Fondazione Chankuap è stato sostenuto dallo sviluppo di queste linee di produzione, legato alla necessità di mettere a punto le formulazioni per quanto riguarda la loro innocuità e stabilità in modo da rendere regolare la loro commercializzazione.

In questo progetto l'Università di Ferrara tramite il Consorzio Ferrara Ricerche ha contribuito con le analisi di stabilità (Challenge Test) e il test di irritazione Patch Test negli anni 2007 e 2008. Un altro aspetto importante della ricerca è l'innovazione, per cui gli oli essenziali sono stati oggetto di analisi di attività biologica eseguite presso l'Università di Ferrara. Sono state testate l'attività antifungina e antiossidante degli oli di citronella (*Cymbopogon citratus*), ishpingo (*Ocotea quixos*), curcuma (*Curcuma longa*), (*Zingiber officinale*), albahaca (basilico) (2002).

## ***IL GENERE CITRUS***

La classificazione scientifica del genere *Citrus* è la seguente:

<b>Regno</b>	<b><i>Plantae</i></b>
<b>Divisione</b>	<b><i>Magnoliophyta</i></b>
<b>Classe</b>	<b><i>Magnoliopsida</i></b>
<b>Sottoclasse</b>	<b><i>Rosidae</i></b>
<b>Ordine</b>	<b><i>Sapindales</i></b>
<b>Famiglia</b>	<b><i>Rutaceae</i></b>
<b>Sottofamiglia</b>	<b><i>Auratioideae</i></b>
<b>Genere</b>	<b><i>Citrus</i></b>

Il genere *Citrus* appartiene alla famiglia delle *Rutaceae*. Si tratta di una famiglia di piante Dicotiledoni, comprendenti soprattutto alberi ed arbusti sempreverdi. Le foglie glabre, sono ricche di ghiandole che le possono rendere traslucide. I fiori hanno sepali brevi e saldati insieme, 4-5 petali. Sono in genere ricche di tessuti secretori di sostanze aromatiche. Hanno il ricettacolo dilatato in un disco glanduloso e carnoso. Assai importante è il genere *Citrus* le cui specie coltivate vengono chiamate collettivamente agrumi. Importanti generi: *Zanthoxylum*, *Fagara*, *Ruta*, *Diosma*, *Citrus*.

Numerosi sono i costituenti: alcaloidi, oli essenziali, glicosidi, cumarine e terpenoidi.

Esistono numerose specie di piante che appartengono al genere *Citrus*. Questo genere ha come origine genetica il Sudest asiatico e si è diffuso alle zone di attuale produzione mediante eventi storici legati alla migrazione ed all'esplorazione.

Si tratta di alberi o arbusti sempreverdi con foglie ovate e coriacee e fiori bianchi e fragranti. Il frutto molto succoso è un esperidio. Le essenze agrumarie presentano componenti ad elevata volatilità ed un residuo non volatile che funziona da "fissatore" naturale, ovvero ha la proprietà di "rallentare" la velocità di evaporazione delle sostanze odorose.

Molto importante, sia dal punto di vista alimentare che farmacologico, è il contenuto in vitamine. Tra queste le vitamine A, B2, PP ed i caroteni svolgono azione protettiva su cute e mucose; la vitamina C ha azione antiscorbutica e un effetto positivo sulla resistenza e permeabilità dei capillari oltre ad attivare il complesso enzimatico P450 con effetto antiossidante. A questo si associa l'azione antibatterica dei flavonoidi (7).

Secondo R.W. Scora, le specie primarie di questo genere sono *Citrus maxima* (pomelo) *Citrus medica* (cedro), *Citrus reticulata* (mandarino) e *Citrus halimii*, quest'ultima classificata di recente e scarsamente investigata. *Citrus maxima* è ritenuta la specie più antica evolutivamente. Tutte le altre specie si sono originate da questi biotipi tramite impollinazione incrociata e ibridazione. Alcuni esempi sono:

- *Citrus sinensis* e *Citrus aurantium* (arancia dolce e arancia amara) che sono l'ibrido tra il pomelo e una varietà di mandarino.
- *Citrus aurantifolia* (limone dolce) e *Citrus limon* (limone), ibridi del cedro e alcune altre specie appartenenti ad un sottogenere denominato "*Papeda*" del genere *Citrus*.
- *Citrus paradisiaca* (pompelmo) che è un ibrido del pomelo (*C. maxima*).

La complessità botanica del genere *Citrus* dovuta ai diversi ibridi esistenti in natura, ha creato difficoltà per identificare con accuratezza quali siano le specie vegetali che hanno come nome comune "lima" nelle diverse regioni del mondo di lingua spagnola. A causa dell'esistenza di diverse specie di ibridi, a loro volta con diverse denominazione e omonimi, i malintesi nel riconoscimento di queste specie possono essere frequenti.

Gli alberi di agrumi hanno raggiunto il continente Americano insieme ai Conquistadores Spagnoli e Portoghesi del secolo XV. Ci sono documenti risalenti al secolo XVI che parlano di arance, limoni e cedri delle Indie Occidentali. E' noto che i missionari cattolici hanno introdotto piante di agrumi in California e nella parte nord del Messico ed è probabile che l'abbiano fatto anche in altre zone, come in centro e sud America, dove queste specie attualmente sono facilmente rintracciabili.

Il pompelmo è stato rinvenuto per prima volta da Griffith Hughes nelle isole Barbados dove era conosciuto come "frutto proibito" o "shaddock", dopo di che un nobile spagnolo chiamato "don Felipe", portò il pompelmo in Florida dove successivamente si sono originate la maggioranza delle varietà.

La storia del *Citrus aurantifolia* in Sudamerica comincia con l'arrivo degli spagnoli in Perù, e successivamente la sua coltivazione si allarga ad altre zone dove acquista caratteristiche peculiari dovute alle caratteristiche pedologiche ed ecologiche locali.

La produzione di agrumi è andata aumentando a partire del secolo XVIII principalmente in Spagna e Italia, spostandosi dalle zone della riviera francese e del nord Italia fino alle zone più a sud dove le condizioni climatiche erano più favorevoli. In questo modo la Sicilia e il sud della

Spagna sono diventati i principali produttori di agrumi in Europa. In Sicilia la produzione ha raggiunto le 78.000 tonnellate nel 1869, mentre in Spagna le 37.000 tonnellate nel 1908 e i prodotti sono stati esportati nei diversi paesi europei e negli Stati Uniti. A partire della fine del secolo XVIII, nuove forme di utilizzo di questi frutti sono state scoperte e così, ad esempio, sono iniziate le esportazioni di succhi e di oli essenziali di limone e di bergamotto.

Oltre all'aumento di produzione e alla scoperta-produzione di prodotti derivati dagli agrumi è anche aumentato il numero di specie adatte ad essere commercializzate. Dal 1700 il bergamotto e il pompelmo sono stati usati per la produzione di oli essenziali il primo e di frutti il secondo. In Sicilia ci sono due varietà di mandarini; l' "Avana" (Willow leaf) e il "tardivo di Ciaculli" (Late Avana). Una varietà selezionata in Algeria, la clementina, sta attualmente sostituendo il mandarino mediterraneo. La ricerca agronomica o l'ibridazione accidentale hanno prodotto ibridi tra mandarino e arancia o pomelo chiamati tangelos tra i quali si possono trovare le varietà commerciali "mineola", "orlando" e "mapo". D'altra parte la selezione di nuove varietà di *Citrus* è molto interessante sia dal punto di vista agro-biologico sia commerciale con l'introduzione di ibridi e varietà come le *citrange*, *citrumelos*, *citremons*, *citrangors* e *citrangquats*.

Attualmente le specie e le varietà di agrumi si trovano in tutti i continenti. La coltivazione più ampiamente diffusa è quella dell'arancia (*C. aurantium*) la cui produzione per il 2005 è stata stimata in circa 59.000.000 tonnellate su un totale di 95.000.000 tonnellate di agrumi prodotti nel mondo. L'Italia contribuisce con 3.320.900 di tonnellate di cui 2.105.100 tonnellate di arance, 611.600 tonnellate di mandarini (compreso clementine e satsuma, una varietà di mandarino) e 597.400 tonnellate di limoni.

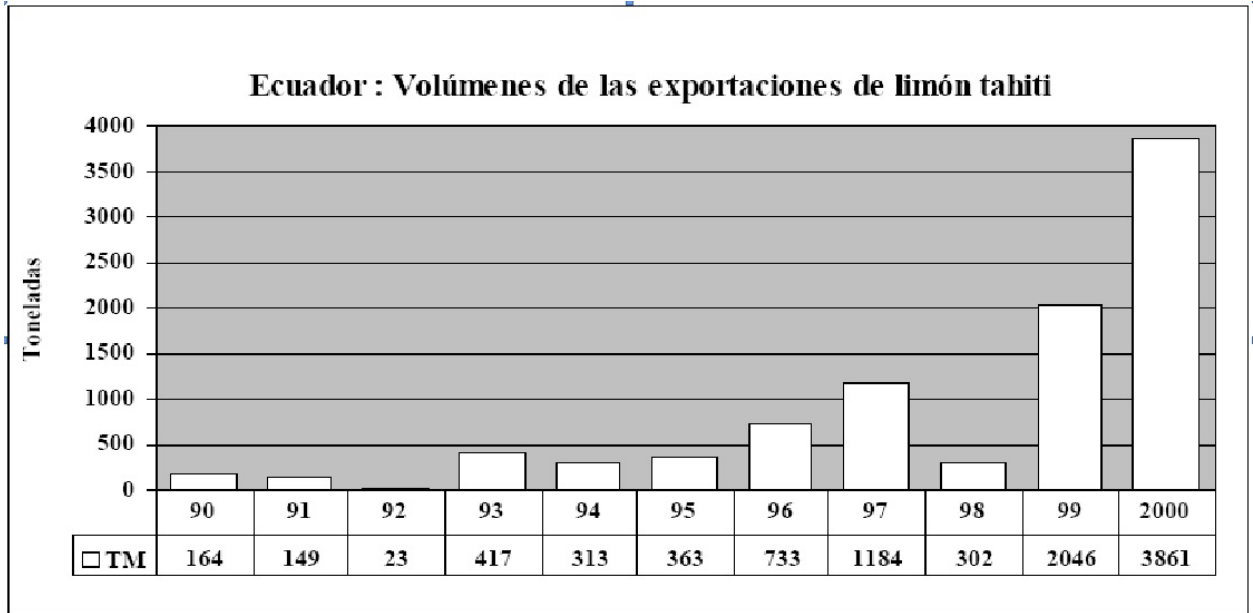
La produzione registrata in Ecuador è assai più bassa arrivando a 305.100 tonnellate di agrumi prodotti, tra i quali 38.300 tonnellate di limone.<sup>9</sup>

Il mercato dei frutti freschi a livello mondiale registra esportazioni di 10.980.000 di tonnellate e importazioni di 10.636.000 di tonnellate nel 2005. In particolare l'Ecuador ha esportato 3.400 tonnellate di limoni (limone Tahiti) principalmente negli Stati Uniti e in quantità minori in Colombia, e registra un picco massimo di esportazioni nel 2000, anno in cui si è raggiunta la quantità di 8.500 tonnellate (**Grafico 5**)<sup>10</sup>.

<sup>9</sup> Citrus Fruit, Fresh and Processed. Annual Statistics 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations

<sup>10</sup> [www.bce.fin.ec](http://www.bce.fin.ec)





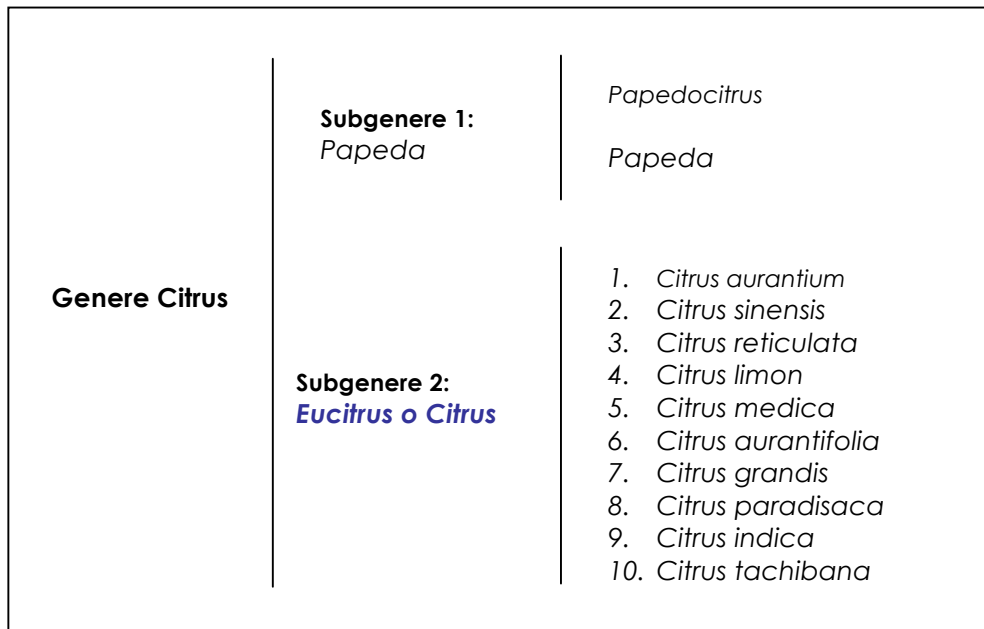
**Grafico 5.** Ecuador, volume delle esportazioni di limone tahiti.

Secondo i dati FAO, l'Ecuador non registra importazioni destinate alla trasformazione che nel 2005 fu di 26.635.000 di tonnellate a livello mondiale e solo in Italia di 2.174.500 di tonnellate.

Nonostante questo a livello di America Latina e paesi caraibici si ha un notevole aumento delle esportazioni di prodotti trasformati come succhi concentrati e questo valore va da 461.800 tonnellate nel 1981 a 1.108.400 di tonnellate nel 2005. Questo aumenta l'interesse per l'industrializzazione in alcuni paesi che appartengono a questa zona e che sono paesi in via di sviluppo, e di conseguenza si potrebbe prevedere una tendenza all'aumento della produzione di trasformati anche in Ecuador.

In Ecuador si conoscono 15 generi e 39 specie di cui 2 sono state riconosciute come endemiche. Per quanto riguarda la distribuzione, queste piante crescono in clima tropicale, subtropicale, temperato e freddo, da 0 a 3.500 m di altitudine nella regione Costa, nella regione delle Ande e nell'Amazzonia (8).

Il genere *Citrus* è di gran lunga il genere più ampio della famiglia delle *Rutaceae*. La frequenza di mutamenti spontanei, la produzione di ibridi naturali insieme all'alto numero di ibridi artificiali danno come risultato una larga lista di ibridi e varietà di diversa importanza commerciale. Nel genere *Citrus* sono stati riconosciuti due subgeneri: *Papeda* ed *Eucitrus* o *Citrus*. Il primo è caratterizzato dal gusto amaro dei frutti ed è poco o nulla commestibile, mentre al secondo appartengono specie di interesse maggiore agronomico, alimentare e commerciale (Figura 4).



**Figura 4.** Classificazione del Genere *Citrus*

Di seguito viene presentata una breve descrizione di alcune delle specie del subgenere *Citrus* che interessano questo lavoro di tesi.

***Citrus aurantium***



**Figura 5.** *Citrus aurantium*

Questa è l'arancia più comune in Ecuador, che è conosciuta come "Naranja agria" (arancia amara). È un albero coltivato generalmente alto fino a 5 m, poco ramificato con chioma sferoidale. Vanno distinte le due sottospecie o varietà: *dulcis* e *amara*. Della prima vengono utilizzati i frutti per fini alimentari, mentre la sottospecie *amara*, oltre che per uso alimentare, è impiegata soprattutto in farmacia, erboristeria e profumeria. L'arancio, che sembra originario dell'Indocina, viene coltivato in Cina da tempo remotissimo ed è diffuso ora in tutte le regioni temperate e calde. Di seguito viene riportata una descrizione botanica più dettagliata della specie.

**Arancio amaro (*Citrus aurantium* subsp. *amara*).** È un albero che si differenzia dall'arancio dolce soprattutto per le spine culinari verdi. Le foglie sparse, glabre, lucide di colore verde scuro, presentano un'articolazione tra lembo e picciolo, il quale porta lateralmente due ali laminari, più o meno espanse. I fiori sono bianchi, odorosi, con 5 petali e numerose antere; il frutto è un esperidio di forma sferica che presenta 8-12 spicchi contenenti pochi semi. La buccia del frutto è costituita dall'esocarpo verde (nei frutti immaturi) ed aranciato (in quelli maturi, flavedo), mentre il mesocarpo è biancastro e spugnoso (albedo). Gli spicchi sono ricchi di ghiandole ripiene di succo.

Si usano le foglie, i fiori e i frutti; le foglie ed i fiori si raccolgono in primavera, mentre i frutti nel periodo di inizio autunno-inverno. Tutte le parti utilizzate sono ricche di ghiandole oleifere, che nelle foglie sono piccolissime e numerose, mentre nei fiori sono traslucide e nella buccia si presentano come tasche schizolisigene grandi e tondeggianti. L'olio essenziale si ottiene con modalità diverse dalle diverse parti della pianta anche in funzione di questa diversità organografica ed istologica:

- a) dopo la macerazione con acqua, dai fiori si ottiene per distillazione l'essenza di neroli;
- b) sempre per distillazione si ottiene dalle foglie l'essenza di petitgrain;
- c) l'essenza della buccia viene ottenuta meccanicamente sfruttando la superficialità delle tasche oleifere: apposite macchine ad aghi perforano lo strato epidermico, dal quale l'essenza sgorga spontaneamente e viene raccolta.

Nell'ultimo caso la resa è dello 0.2-0.7%. La composizione presenta soprattutto limonene (80-90%), accompagnato da terpinolene, linalolo, nerale, geraniale, cumarine e furocumarine. Vengono ascritte all'essenza proprietà sedative, spasmolitiche, amaro-toniche ed antinfiammatorie, da utilizzare in caso di disturbi nervosi, gastrointestinali e circolatori.

L'essenza di arancio trova impiego soprattutto in profumeria (in particolare quella di neroli), ma vengono apprezzate anche le proprietà sedative, aromatiche e correttive. L'odore è aromatico ed il sapore amaro. Le foglie vengono impiegate come blando sedativo e stomachico. Infine, la buccia (epicarpo) essiccata è ampiamente utilizzata in erboristeria come stomachico, digestivo ed antispasmodico; inoltre viene utilizzata nella fabbricazione dei liquori (Curaçao) (7).

Oltre a questi usi, diverse parti della pianta trovano impieghi secondo le diverse culture popolari dell'Ecuador, ad esempio in Pichincha nella cultura meticcia l'estratto in etanolo è utilizzato come antiparassitario contro elmintiasi intestinali, e le foglie si usano per malattie nervose. Per gli Shuar di Orellana la corteccia e le foglie vengono utilizzate come antinfiammatori, e secondo alcune etnie della regione delle Ande l'infusione delle foglie viene impiegata in caso di "ricadute" post-parto, e per affezioni al tratto urinario (2).

Per quanto riguarda l'uso etno-medicinale dell'arancio fatto dai popoli Achuar e Shuar di Morona Santiago e Pastaza (luoghi dove sono stati raccolti i campioni microbiologici e oli essenziali trattati nel presente lavoro di tesi) ci sono altre usanze che coinvolgono la terapia di disturbi respiratori (Tapiamu), per cui gli indigeni utilizzano una miscela di foglie (mango, avocado, citronella, basilico, annato e altre) insieme alle foglie dell'arancio. Le bucce vengono impiegate in infuso nella terapia per i dolori di stomaco (wake najamanti) (9).

### *Citrus limon e Citrus aurantifolia*



**Figura 6.** *Citrus limon*



**Figura 7.** *Citrus aurantifolia*

L'albero di limone è nativo del Nord dell'India; è ampiamente coltivato nei paesi del Mediterraneo e in altre parti del mondo. In Ecuador il limone (*Citrus limon* (L.) Burm.f.) non è molto comune; il lime (*Citrus aurantifolia*) o limone dolce conosciuto come "limón sutil" ,

“limòn Tahiti” o “limón persa” è la varietà più disponibile e più impiegata. Il lime è un frutto più piccolo e più amaro del limone ma le proprietà sono praticamente le stesse e possono essere utilizzati indifferentemente.

*Citrus limon* è un alberello sempreverde, spinoso allo stato selvatico. Le foglie sono ovate e seghettate dal colore verde chiaro con ampie zone di giallo; il picciolo è alato e possono essere presenti spine culinari; i fiori, bianchi, solitari ed ascellari, compaiono tutto l’anno. Il frutto è un esperidio di forma ovale e di colore giallo-pallido. I frutti si usano anche per preparare bevande con il succo che contiene il 7-10% di acido citrico.

*Citrus aurantifolia* è un alberello simile a *Citrus limon* con alcune varianti. Le foglie sono ovate e intere a margine liscio dal colore verde pallido e di grandezza che fluttua dai 2.5 ai 9 cm, molto simili a quelle dell’arancio, ed è da qui che proviene il nome latino *aurantifolia*. I fiori sono di colore bianco-giallastro, con una linea porpora sottile nei margini, solitari ed ascellari. Il frutto è un esperidio di forma ovale di 2.5-3 cm e di colore verde-giallastro quando è maturo, sebbene sia comune consumarlo prima della maturazione.<sup>11</sup>

**Sinonimi di *Citrus aurantifolia***

- *Citrus acida* [Roxb.](#)
- *Citrus hystrix subsp. acida* (Roxb.) [Engl.](#)
- *Citrus lima* [Lunan](#)
- *Citrus limetta var. aromatica* [Wester](#)
- *Citrus medica var. acida* ([Roxb.](#)) [Hook.f.](#)
- *Limonia aurantiifolia* [Christm. basónimo](#)

Dalla scorza di questi frutti, per procedimento a freddo con mezzi meccanici appropriati analoghi a quelli dell’arancio, si estrae un’essenza (0.2-0.6%), contenente soprattutto limonene, insieme al citrale da cui deriva il caratteristico odore, ed ancora numerosi

flavonoidi, glicosidi, tannini, cumarine e acido citrico. Si utilizzano sia le scorze per le proprietà stomachiche, carminative e corroboranti, che il complesso flavonoidico per l’azione vasoprotettrice. La polpa è ricca di vitamina C. Il succo serve a preparare ottime bevande, a condire vivande e dolci, ad aromatizzare l’acqua, a frizionare la pelle per conservarla fresca ed asettica. È un ottimo detersivo della cute ed è efficacissimo contro le rughe. Il succo di limone può essere utilizzato come collutorio e per gargarismi, contro stomatiti ed angine. Soprattutto efficace è il succo di limone contro lo scorbuto. Il decotto delle foglie essiccate è considerato capace di stimolare l’appetito (7).

In Ecuador si utilizza principalmente il succo del frutto. Le etnie Achuar e Shuar lo impiegano per via orale per l’epatite (akap sunkur tsuwamartin) insieme a foglie di **tsapuk**, per le infiammazioni del fegato (akap taramaunau) con foglie di avocado e annatto. Mediante applicazione topica viene utilizzato per favorire l’eliminazione locale del veleno di serpente

<sup>11</sup> [http://es.wikipedia.org/wiki/Citrus\\_%C3%97\\_aurantifolia](http://es.wikipedia.org/wiki/Citrus_%C3%97_aurantifolia)

(napiniu) insieme a foglie di cotone, e da solo per il mal di testa (muk najamamti niartiin). Si fanno anche altre preparazioni che includono altri ingredienti, ad esempio per la leishmaniosi umana (kuchapa tsuakri) si utilizza in una preparazione con cenere, olio bruciato, sale, succo di ananas e sangue de drago, mentre per certe malattie della pelle (sepkati sunkuri turi) viene utilizzato con diesel e sale. I semi del limone sono impiegati a livello topico per il trattamento di ascessi (unku tsuwamu) (9).

### ***Citrus latifolia* (Lima o Limone dolce)**



**Figura 8.** *Citrus latifolia*

Lima è il nome comune con cui sono conosciuti alcuni alberi di agrumi. La denominazione in generale più utilizzata è comunque *Citrus aurantifolia*.

La maggior parte di frutti che condividono il nome di lima sono ibridi che provengono dal cedro (*Citrus medica*), dal mandarino (*Citrus reticulata*) e dal pomelo (*Citrus grandis*).<sup>12</sup>

In accordo con le caratteristiche morfologiche dei frutti di lima che si trovano in Ecuador l'attribuzione ibrida più probabile è che sia ***Citrus latifolia***, probabilmente un incrocio tra *Citrus aurantifolia* e *Citrus medica*, conosciuto come “lima persa” o “lima Tahiti” (sebbene quest'ultimo sia anche notocomo *Citrus aurantifolia*)<sup>13</sup>. Questo frutto è più grande, di scorza più grossa, meno aromatico e di acidità minore se confrontato con la specie originaria *Citrus aurantifolia*.

*Citrus latifolia* è un albero con spine diffuse e raggiunge i 6 m di altezza. Le foglie sono ovate e intere a margine liscio con piccioli alati. I fiori sono leggermente porpora e il frutto è un esperidio di forma ovale, obovata, oblunga o leggermente ellittica, di solito rotondeggiante alla

<sup>12</sup> [http://es.wikipedia.org/wiki/Lima\\_\(fruta\)](http://es.wikipedia.org/wiki/Lima_(fruta))

<sup>13</sup> CONVENIO MAG / IICA Subprograma de Cooperación Técnica (Préstamos BID / MAG 831/OC y 832/OC – EC)

base e all'apice dove c'è un piccolo capezzolo. Le dimensioni vanno da 4 a 6.5 cm di larghezza e da 5 a 7.5 cm di lunghezza; dal colore verde vivido fino alla maturità, quando cambia a giallo-pallido, la polpa giallo-verde è divisa in 10 segmenti. Solitamente non presenta semi (10).

Per quanto riguarda l'utilizzo, la lima produce un succo utilizzato come bevanda. L'olio essenziale ottenuto dalla buccia è considerato di qualità minore, ma viene utilizzato per rinforzare il sapore e l'aroma del succo.

### *Citrus nobilis*



**Figura 9.** *Citrus nobilis*

Albero con frutto (esperidio) dalla forma sferica, ma leggermente schiacciata, la cui buccia è sottile e di colore aranciato ed il succo dolcissimo. Il mandarino è attualmente coltivato in Sicilia assieme all'arancio. L'olio essenziale della buccia (epicarpo) del frutto, prodotto mediante spremitura a freddo, è molto usato nell'industria dei liquori. L'olio ha un colore rosso-bruno chiaro ed un odore che ricorda il frutto fresco, e trova impiego anche come aromatizzante alimentare ed in profumeria (7).

In Ecuador l'uso principale di questo frutto è alimentare: le foglie sono utilizzate per fare infusi così come i fiori, che secondo la cultura popolare della zona sud del paese (Loja) sono efficaci nella terapia di malattie nervose (come ansiolitico) (2).

### *Citrus paradisiaca*



**Figura 10.** *Citrus paradisiaca*

È un albero sempreverde alto solitamente dai 5 ai 6 m, ma può raggiungere anche i 13-15 metri. Le sue foglie sono di colore verde scuro, lunghe (oltre i 15 cm) e sottili. Produce fiori bianchi composti da quattro petali di 5 cm. Il frutto è giallo, di aspetto globoso di diametro di 10-15 cm ed è composto da spicchi. La buccia del pompelmo è abbondantemente foderata da una massa spugnosa (albedo) che è però leggermente meno compatta di quella del limone. Il pompelmo è un ibrido tra il pomelo (*Citrus maxima*) e l'arancio dolce (*Citrus aurantium*, var. *dulcis*). Ci sono due teorie per la sua origine: la prima lo colloca come proveniente dall'Estremo Oriente e di conseguenza un'origine simile agli altri agrumi; mentre la seconda afferma che è stato rinvenuto nel secolo XVIII in America Centrale, probabilmente a Barbados o alle Bahamas.

Il succo di pompelmo viene consumato come bevanda, considerata molto rinfrescante in luoghi dal clima molto caldo. Gli impieghi in diverse terapie sono molto diffusi a causa di mode spesso infondate di senso scientifico. È consigliato in caso di infezioni dell'apparato digerente e come antidolorifico se usato con la caffeina. La bergamottina, contenuta nel succo di pompelmo, è inoltre un potente competitore e inibitore dell'isoforma CYP3A4 del citrocomo P450 con l'effetto di provocare una minore disponibilità del complesso enzimatico e una minore produzione di enzimi a livello epatico. In questo modo il metabolismo della maggioranza di xenobiotici (farmaci, nutrienti, sostanze tossiche) non avviene e questi non riescono a esprimere i loro effetti.<sup>14</sup>

<sup>14</sup> [http://it.wikipedia.org/wiki/Citrus\\_%C3%97\\_paradisi](http://it.wikipedia.org/wiki/Citrus_%C3%97_paradisi)



## **LE BIOTRASFORMAZIONI**

Molto tempo prima di scoprire l'esistenza dei microrganismi, l'uomo ne faceva un uso inconsapevole per la trasformazione di sostanze soprattutto a scopo alimentare. I microrganismi agiscono infatti su cibi e bevande, migliorandone la qualità o deteriorandoli. I progressi nella conoscenza dei microrganismi e gli studi compiuti nelle discipline scientifiche quali la biochimica, la chimica organica e la microbiologia, hanno permesso la comprensione dei processi chimici che sono alla base di queste trasformazioni. Nel 1862 Pasteur mise in luce il meccanismo della conversione dell'alcol ad acido citrico ad opera di *Bacterium xylinum* (11). Nel 1874 Dumas analizzò per la prima volta l'azione del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (11). In seguito molte altre biotrasformazioni vennero studiate, nei loro aspetti chimici, molte altre biotrasformazioni come ad esempio quelle di galattosio in acido lattico da parte di *Lactobacillus bulgaricus* e quella di saccarosio ad acido citrico da parte di *Aspergillus niger* (11). Il passo successivo per la comprensione e lo sfruttamento di questi processi fu rappresentato dai primi tentativi di modificare il metabolismo dei microrganismi. A questo proposito, la prima osservazione importante riguardò la possibilità di aumentare la produzione di glicerolo, sottoprodotto della conversione degli zuccheri ad etanolo, semplicemente aumentando il pH del mezzo in cui avveniva il processo. Questi studi posero in risalto anche l'importanza dei prodotti del metabolismo secondario di alcuni microrganismi, quali ad esempio la penicillina e la cefalosporina prodotte rispettivamente dai funghi del genere *Penicillium* e *Cefalosporium* (12). Negli ultimi anni le reazioni biochimiche operate da microrganismi o catalizzate da enzimi, hanno avuto una notevole rivalutazione nel campo delle sintesi organiche e hanno mostrato un alto potenziale applicativo.

Lo scopo che si persegue è quello di utilizzare reazioni biologiche per processi di sintesi, ad esempio per preparazioni farmaceutiche o per la sintesi di additivi alimentari e di prodotti chimici. Tale tecnologia di sintesi è detta trasformazione microbiologica o, alternativamente, bioconversione, conversione microbiologica o biotrasformazione.

In una prospettiva futura le applicazioni delle biotrasformazioni interesseranno i settori della produzione di energia e del disinquinamento, ma la prospettiva di intervento più affascinante nel campo delle biotrasformazioni riguarda la possibilità di intervenire direttamente sul patrimonio genetico dei microrganismi utilizzati, allo scopo di ottenere ceppi mutati che siano in grado di modificare substrati che non sarebbero modificabili ad opera di ceppi selvatici. A questo

proposito potrebbero risultare molto utili le tecniche della clonazione e della mutagenesi e in questo campo la biologia molecolare sta compiendo passi da gigante (12).

### ***Biotrasformazioni e Fermentazioni***

Per biotrasformazione si intende la conversione di una sostanza (substrato) in un'altra (prodotto) grazie all'intervento di un microrganismo. Si tratta di una reazione chimica catalizzata da un particolare enzima cellulare o da un enzima originariamente prodotto dalla cellula. Per la maggior parte questi enzimi sono necessari per il normale metabolismo della cellula. Nelle trasformazioni microbiche, tuttavia, tali enzimi agiscono semplicemente da catalizzatori della reazione chimica (ne accelerano cioè la velocità). Oltre ai loro normali substrati gli enzimi sono in grado di usare altri composti strutturalmente correlati a questi o addirittura di catalizzare reazioni non naturali se viene aggiunto al mezzo di coltura un substrato estraneo.

Diversa dalla biotrasformazione è la fermentazione. Essa consiste in un processo di ossidazione in cui un donatore di elettroni organico (ad es. il glucosio) viene convertito in uno o più prodotti organici che si comportano da accettori. Organismi come lieviti e molti batteri possono usare la via della fermentazione per vivere in condizione di anaerobiosi. Questo fu scoperto da Louis Pasteur con i suoi studi sulla fermentazione del vino durante la quale, in presenza di cellule di lievito e dei loro enzimi, il glucosio veniva convertito ad alcool etilico e anidride carbonica. La produzione di alcool etilico sotto forma di vino e liquori per fermentazione degli zuccheri contenuti nei frutti è stata probabilmente il primo successo dell'uomo nel campo della sintesi organica. La fermentazione ha quindi origini antiche e in particolare la fermentazione alcolica è la tecnica ancora oggi più usata per la produzione di composti come acidi organici, solventi, antibiotici, amminoacidi e composti correlati agli acidi nucleici.

A differenza delle biotrasformazioni, la fermentazione è considerata un processo biologico in quanto è il risultato del metabolismo del microrganismo che utilizza appropriate fonti di carbonio (C) e azoto (N). Nella fermentazione è necessario che le cellule microbiche siano vitali e i prodotti della fermentazione sono sempre naturali.

La biotrasformazione, al contrario, non richiede che le cellule siano vive, ma è necessario solo che nelle cellule ci sia abbondanza di enzimi. La biotrasformazione, infatti, pur richiedendo l'intervento di un particolare enzima per la conversione di un substrato in un prodotto, non sempre coinvolge fenomeni legati al suo metabolismo. Il substrato, inoltre, può anche non essere naturale (**Tabella 5**).

	<b>BIOTRASFORMAZIONE</b>	<b>FERMENTAZIONE</b>
Microrganismo	Cellule in crescita, quiescenti, trattate	Cellule in crescita
Reazione	Reazione catalizzata semplice (ad uno o più passaggi)	Processo vitale (reazione multistep)
Tempo di reazione	Breve	Lungo
Substrati di partenza	Costosi	Fonti naturali di carbonio e di azoto
Prodotto	Naturale o non naturale	Naturale
Concentrazione prodotto	Alta	Bassa
Purificazione prodotto	Facile	Difficile

**Tabella 5.** Differenze tra biotrasformazione e fermentazione.

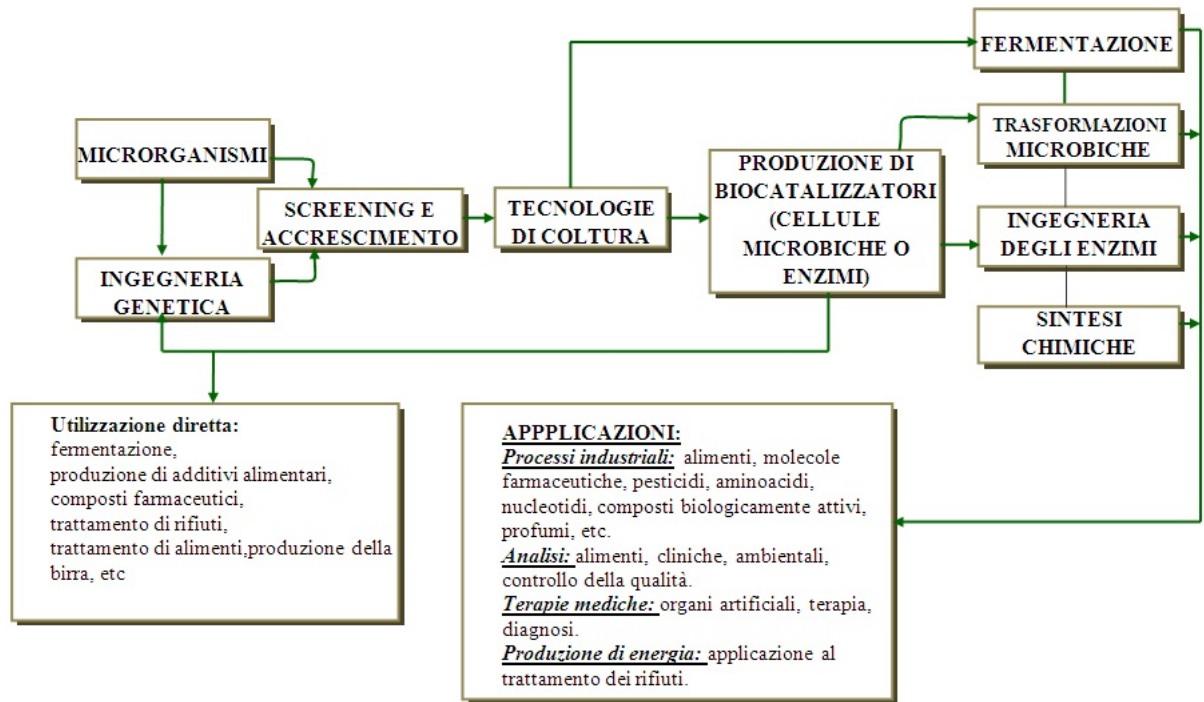
### ***Impiego di Microrganismi nelle Biotrasformazioni***

Inizialmente i microrganismi sono stati usati nelle biotrasformazioni per ottenere modificazioni di anelli steroidici. Alcune di queste reazioni, infatti, non potevano essere ottenute utilizzando i convenzionali metodi di sintesi (13). L'elevata versatilità mostrata dai microrganismi nelle trasformazioni degli steroidi ne fece intuire le grandi potenzialità nelle sintesi chimiche. Negli ultimi anni i microrganismi vengono impiegati in numerosi campi di ricerca (**Schema 1**) e questo grazie alle loro proprietà che consentono:

- la risoluzione di miscele racemiche (enantioselettività);
- la modifica selettiva dei gruppi funzionali in una molecola che presenta più gruppi funzionali con simile reattività (regioselettività);
- l'introduzione di un centro chirale e funzionalizzazione di un carbonio non attivato.

Tali proprietà trovano applicazione:

- in chimica organica, dove i microrganismi sono impiegati per la sintesi di prodotti chirali;
- in biochimica;
- in farmacologia, dove i microrganismi vengono utilizzati per la modificazione selettiva di molecole complesse e permettono la sintesi di nuovi farmaci.



**Schema 1.** Campi di ricerca in cui vengono impiegati i microrganismi.

La gamma dei prodotti che si possono ottenere con le biotrasformazioni si è notevolmente ampliata nel corso degli anni e si è affacciata una nuova prospettiva di sintesi legata all'utilizzazione di enzimi purificati. La problematica che sorge a questo punto consiste nel verificare se sia più conveniente l'uso di cellule o di enzimi. Ancor oggi questo problema è oggetto di discussione (**Tabella 6**).

SISTEMA CATALITICO	VANTAGGI	SVANTAGGI
<b>Microrganismi</b> (cellule integre)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Economico</li> <li>Cofattore già presente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Equipaggiamento di laboratorio di grandi dimensioni</li> <li>Metodologia di lavoro spesso complessa</li> <li>Reazioni parallele che possono interferire</li> <li>Co-solventi mal tollerati</li> </ul>
<b>Enzimi isolati</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Equipaggiamento di laboratorio semplice</li> <li>Metodologie di lavoro facili</li> <li>Co-solventi tollerati</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Costoso</li> <li>Necessita la presenza di cofattori e quindi del riciclo dei cofattori</li> </ul>

**Tabella 6.** Vantaggi e svantaggi nell'uso di microrganismi e di enzimi isolati

L'uso di cellule risulta effettivamente meno costoso ed inoltre elimina il problema di dover aggiungere alla reazione dei cofattori. Si definiscono "cofattori", atomi, ioni o molecole non proteiche che si legano covalentemente agli enzimi affinché questi possano esplicare la loro attività catalitica. L'uso di cellule presenta, d'altra parte, il problema di una conoscenza più approfondita in campo microbiologico da parte dell'operatore e dell'utilizzo di apparecchiature di fermentazione senza dubbio più complesse.

Inoltre le colture di microrganismi utilizzate sono necessariamente in fase acquosa, e questo risulta essere un problema per substrati idrofobici come i terpeni. Lo sviluppo di una notevole biomassa può inoltre creare problemi relativi alla separazione dei prodotti desiderati e all'entrata del substrato all'interno della cellula.

Per quanto riguarda l'impiego di enzimi isolati, alcune limitazioni sono rappresentate dalla disponibilità commerciale, dalla loro possibile perdita di attività nel tempo, da problemi di denaturazione (3) ed infine dal loro costo. Pur essendo, infatti, il numero degli enzimi purificati abbastanza alto, quelli disponibili in commercio sono relativamente pochi ed il loro costo può risultare proibitivo per un impiego industriale (**Tabella 7**). Una parte dei costi è dovuta alla necessità di usare in tali reazioni cofattori che rendano possibile il riciclo dell'enzima (ad es. il NADH).

TIPO DI ENZIMA	NUMERO DI ENZIMI PURIFICATI	NUMERO DI ENZIMI DISPONIBILI IN COMMERCIO
Ossidoriduttasi	650	90
Transferasi	720	90
Idrolasi	636	125
Liasi	255	35
Isomerasi	120	6
Ligasi	80	5

**Tabella 7.** Numero di enzimi purificati e disponibili in commercio classificati in funzione del tipo di attività enzimatica svolta

Gli enzimi più comuni sono:

- **Ossidoriduttasi** (deidrogenasi, ossidasi, perossidasi, ecc.): catalizzano le reazioni di ossidoriduzione, ossigenazione di legami C-H, C-C, C=C, C=O, e più in generale rimozione o addizione di atomi di idrogeno con variazione dello stato di ossidazione del carbonio rimuovendo una coppia di elettroni (o un atomo di idrogeno) da una molecola

donatore (ossidazione) che viene addizionata ad una molecola accettore (riduzione). Per questa classe di enzimi è sempre presente il cofattore specifico (ad es.  $\text{NAD}^+$  /  $\text{NADH}$ ).

- **Tranferasi** (transaminasi, transcarbossilasi, ecc.): catalizzano reazioni di trasferimento di gruppi funzionali (gruppi azotati, fosforici, ecc.) da una molecola all'altra.
- **Idrolasi** (fosfatasi, amilasi, esterasi, peptidasi, ecc.): catalizzano la rottura di legami tra il carbonio e un altro atomo (anidridi, ammidi, glucosidi, esteri, ecc.) con l'intervento di acqua. Richiedono come cofattori: acidi, ammine, ecc.
- **Liasi** (aldolasi, decarbossilasi, deidrasi, ecc.): catalizzano l'addizione di gruppi a doppi legami o l'inverso. Agiscono su legami C-C, C-S, C=O, C-N (escluso il legame peptidico).
- **Isomerasi** (epimerasi, racemasi, mutasi, ecc.): catalizzano le reazioni di isomerizzazione. Agiscono su racemi, isomeri cis e trans, ossidoriduzioni intramolecolari.
- **Ligasi** (DNA-ligasi, AA-sintetasi, ecc.): catalizzano la formazione di legami covalenti C-O, C-N e C-C atti ad unire due molecole diverse a spese della rottura di un legame pirofosfato nell'ATP.

## I MICRORGANISMI

### *Lieviti*

I lieviti sono un gruppo piuttosto omogeneo di microrganismi, la cui definizione tuttavia è difficile; quelle proposte in passato ma anche la più recente accolta nella classificazione di Kreger-van-Rij (1984) (14), sono imprecise e si prestano a critiche giustificate. Kreger-van-Rij, privilegiando la definizione secondo la quale i lieviti sono funghi unicellulari che si moltiplicano per gemmazione o per scissione, dà importanza esclusivamente a caratteri morfologici e non prende in considerazione alcun carattere fisiologico e, in particolare, la capacità di effettuare la fermentazione alcolica degli zuccheri. Questa capacità, tuttavia, non è posseduta da tutti i lieviti ma, al contrario, sono alquanto numerosi quelli dotati di sola attività respiratoria.

Esistono all'incirca 350 specie di lieviti, distinti in circa 39 generi. Questi taxa sono comunque relativamente scarsi se confrontati con le specie di alghe, batteri e protozoi che ammontano a molte migliaia. La sistematica e la tassonomia dei lieviti cambiano di continuo a causa dell'introduzione di nuovi caratteri distintivi, individuati grazie a progressi compiuti su parecchi fronti. Tecniche di ricerca avanzata sono, infatti, state applicate nella classificazione dei lieviti; tra esse possiamo citare:

- l'analisi della composizione chimica delle pareti cellulari;
- la microscopia elettronica, particolarmente utile per individuare la forma precisa delle spore;
- l'analisi del DNA.

Uno schema generale di classificazione riconosce tre sottodivisioni principali:

1. *lieviti ascosporigeni* riconducibili agli ascomiceti;
2. *lieviti basidiosporigeni* riconducibili ai basidiomiceti;
3. *lieviti privi di uno stadio perfetto* appartenenti ai funghi imperfetti (*Deuteromycetes*).

In linea generale le cellule dei lieviti sono più grandi di quelle della maggior parte dei batteri anche se i lieviti più piccoli hanno dimensioni minori rispetto a quelle dei batteri più grandi. Le dimensioni dei lieviti variano notevolmente: la larghezza può variare da 1 a 5  $\mu\text{m}$ , la lunghezza è invece compresa in media tra 5 e 30  $\mu\text{m}$ . Le cellule di lievito sono di solito ovoidali, ma possono avere forma allungata o anche sferoidale, e sono prive di flagelli o di altri organi di locomozione ed in certi casi possono mostrarsi unite fra loro a formare catenelle. Ciascuna specie ha una

forma caratteristica sebbene anche in coltura pura si possano registrare notevoli variazioni di dimensione e forma in relazione all'età e all'ambiente.

I lieviti sono organismi eucarioti e fondamentalmente le loro strutture corrispondono a quelle degli altri eucarioti. La maggior parte delle informazioni sui lieviti sono su *Saccharomyces cerevisiae* data l'importanza che questa specie, da sempre, riveste nei settori dell'agricoltura e dell'industria; tuttavia recenti studi hanno riguardato altre specie appartenenti ai generi *Hansenula*, *Rhodotorula* ed altri.

### **Batteri**

I batteri sono microrganismi unicellulari procarioti. Il termine procariota significa “prima del nucleo” ed è riferito alle cellule che presentano una struttura interna non ben definita; le cellule procariotiche si mostrano, infatti, prive di membrane interne che realizzino una compartimentazione dei contenuti cellulari.

I batteri assieme alle alghe azzurre (dette anche cianobatteri) vengono raggruppati nel regno Monere. Sono caratterizzati da una parete mucopolisaccaridica e da altre numerose caratteristiche citologiche tipiche degli organismi procarioti (unico cromosoma circolare, ribosomi 70S, ecc.) che rendono ragionevole il loro raggruppamento in un grande unico Regno. Possono vivere isolati o in colonie.

I batteri differiscono tra loro per alcuni aspetti riguardanti la morfologia, la struttura e le funzioni, che vengono anche utilizzati come criteri generali di classificazione (15).

La moltiplicazione dei batteri può avvenire per scissione o per gemmazione. Si possono trovare anche sotto forma di spore, ritenute forme di resistenza alle condizioni avverse; quando le condizioni tornano ad essere ottimali per lo sviluppo, le spore germinano dando origine alle forme vegetative.

Per il loro sviluppo, i batteri necessitano di fonti di carbonio, azoto ed elementi minerali, mentre l'idrogeno e l'ossigeno vengono ricavati dall'acqua. Essi hanno bisogno, inoltre, di vitamine e aminoacidi. I batteri producono energia mediante processi di respirazione (batteri aerobi) o di fermentazione (batteri anaerobi). Respirazione e fermentazione differiscono fra loro essenzialmente per la quantità di energia prodotta: l'energia sviluppata nella fermentazione risulta infatti minore in quanto i prodotti finali contengono ancora energie di legame che non sono state liberate.



I batteri svolgono azioni varie e complesse. Oltre a quelle patogene, essi sono capaci di azioni sfruttabili in agricoltura e nell'industria. In agricoltura questi microrganismi sono in grado di degradare composti organici complessi rimettendo così in circolazione elementi chimici quali C, H, O, N, Fe e Mn. A livello industriale vengono, invece, utilizzati nella macerazione di fibre tessili, nella lavorazione della cellulosa e nei processi fermentativi (16).

Nelle biotrasformazioni, infine, i batteri vengono impiegati come microrganismi capaci di dare reazioni di ossidazione (17).

### ***Funghi***

Dal punto di vista della sistematica, i funghi costituiscono da soli un Regno. Anticamente erano considerati piante, come si può osservare nella definizione data da Per Batelli nel 1841: “sono piante terrestri o parassite, che si allontanano dagli altri vegetali per la loro natura, per la consistenza non mai erbacea, per le forme, e soprattutto per la mancanza delle foglie, dei fiori, della cupola, dell'urna, o di organo che possa loro paragonarsi” (18). Nella più moderna rivisitazione del Regno dei Funghi (19) vengono considerate quattro Divisioni, Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e Zygomycota. La sistematica dei funghi ha come presupposto guida aspetti quali metabolismo eterotrofo, assenza di tessuti propriamente differenziati e riproduzione per spore; sulla base di questi postulati biologici, tenendo conto delle variazioni e delle eccezioni, si sviluppa tutto l'albero sistematico del Regno Funghi, fino alla singola specie.

Empiricamente i funghi si presentano sotto due forme principali: funghi filamentosi conosciuti come “muffe” o funghi a forma di lievito. Il corpo di un fungo filamentoso ha due porzioni, una riproduttiva o “corpo fruttifero” che porta gli sporangi produttori di spore, e un'altra vegetativa. La parte vegetativa aploide, che generalmente non presenta nessuna colorazione, è composta da filamenti chiamati ife che formano i miceli visibili. Queste costituiscono le cellule che possono essere mono o polinucleate ed essere divise da setti.

I funghi a forma di lieviti sono unicellulari e di forma sferica e non c'è una distinzione tra il corpo vegetativo e riproduttivo.

I funghi, come gli animali, le piante e i protisti, sono organismi eucarioti; le loro cellule “ben nucleate”, sono caratterizzate da una struttura interna ben definita. Da un punto di vista morfologico, la maggior parte dei funghi presenta un corpo, detto tallo, formato dall'insieme di più cellule tubulari che costituiscono dei filamenti, detti ife. Ad un insieme di ife viene dato il nome di micelio, struttura vegetativa costituita da una massa citoplasmatica multinucleata

racchiusa in un sistema di tubuli rigidi e pluriramificati. Normalmente il micelio ha origine dalla germinazione di una singola cellula riproduttiva, la spora, che emette un lungo filamento o ifa; quest'ultima ramificandosi ripetutamente ed allungandosi forma il micelio (20).

Il metabolismo energetico dei funghi utilizza sia condizioni ossidative sia fermentative e quindi i funghi sono aerobi o anaerobi facoltativi. I funghi sono organismi eterotrofi e sono quindi in grado di demolire un gran numero di sostanze organiche, ad esempio gli zuccheri, che sono trasformati in acqua e anidride carbonica, come avviene nei processi respiratori della maggior parte delle piante e degli animali. In tal modo essi vanno incontro ai loro fabbisogni nutritivi ed energetici, tanto che si può affermare che non si conoscono substrati naturali che non vengano utilizzati da questa o quella specie. Di norma una singola specie non è in grado di trasformare in maniera completa una sostanza fino alla liberazione dei composti inorganici. In questo caso nei processi ossidoriduttivi che accompagnano la liberazione di energia, non è l'ossigeno l'accettore finale dell'idrogeno, ma un composto intermedio, di solito accumulato nel substrato.

Si hanno quindi delle fermentazioni nelle quali l'energia prodotta è di molto inferiore a quella che si ottiene dalla respirazione ossidativa e, di conseguenza, la quantità di sostanze utilizzate deve essere molto elevata.

Questo spiega il larghissimo uso industriale di varie specie di funghi, ognuna delle quali è sfruttata per la sintesi di particolari composti o per la parziale trasformazione di sostanze, i cui prodotti intermedi rivestono interesse per l'economia umana. Su questo principio si basa anche l'utilizzo dei funghi per le biosintesi in cui sono impiegati come agenti riducenti (21). Per il loro metabolismo i funghi hanno bisogno di sostanze elementari che ricavano dalla catalisi di molecole complesse. Sul metabolismo dei funghi giocano un ruolo di primaria importanza alcuni fattori ambientali, quali la concentrazione di ossigeno nel mezzo, il pH, la temperatura, la quantità d'acqua ed in qualche caso anche la luce.

Per quanto riguarda l'ossigeno, quasi tutti i funghi sono organismi tipicamente aerobi, tuttavia, in alcuni casi, essi possono vivere anche in un'atmosfera poverissima di ossigeno.

Riguardo alla temperatura è stato osservato che ogni specie è caratterizzata da un minimum, al di sotto del quale non è in grado di crescere, e da un optimum, al di sopra del quale la specie subisce gravi danni. L'optimum di temperatura per la crescita, non sempre coincide con quello per la produzione di metaboliti. Questo fatto è di particolare interesse per le coltivazioni industriali di funghi, effettuate allo scopo di ottenere composti organici. In questi casi, prima si coltiva il fungo in condizioni di temperatura tali da consentire la sua più rapida crescita, quindi si

modifica la temperatura in modo da raggiungere l'optimum di velocità di produzione del metabolita desiderato.

Le cellule fungine non sono in grado di compiere la fagocitosi (ingestione di elementi solidi da parte della cellula) a causa delle loro pareti chitinose, per cui la loro nutrizione avviene sempre per diretto assorbimento dall'esterno attraverso la parete e il plasmalemma. I composti organici di dimensioni limitate, vengono assorbiti direttamente, quelli più complessi, invece, vengono di norma trasformati attraverso l'emissione di esoenzimi. I composti semplici, ottenuti da queste trasformazioni, una volta assorbiti, vengono sottoposti nelle cellule a diverse reazioni catalizzate da endoenzimi.

Alcuni funghi non sono in grado di sintetizzare alcune sostanze come le vitamine, per cui devono essere aggiunte nel mezzo di cottura.

Come fonte di carbonio i funghi utilizzano una vasta gamma di sostanze organiche, quali alcoli, acidi e carboidrati come la cellulosa, l'amido e il saccarosio. L'azoto è ottenuto sia da composti organici sia inorganici: in presenza di carboidrati, molte specie di funghi crescono bene anche quando l'azoto viene fornito sotto forma di nitrati, che vengono ridotti tramite una nitrato-riduttasi. Altre specie di funghi, sprovviste di questo enzima, necessitano invece di composti ammoniacali.

I funghi necessitano tra l'altro della presenza nel mezzo di microelementi, alcuni dei quali sono diversi da quelli delle piante superiori. Ad esempio, mentre nelle piante superiori il calcio costituisce un macroelemento nutritivo, nei funghi sono sufficienti minime quantità di calcio, che per essi quindi è un macroelemento.

### ***Metodi di conservazione dei microrganismi***

Sono tre gli obiettivi da raggiungere per conservare i ceppi microbici: la coltura deve essere pura, una percentuale di sopravvivenza dal 70% al 80% e la stabilità genetica delle cellule.

### ***Metodi a lungo termine***

Le cellule vengono paralizzate senza morire. E' garantita la stabilità genetica. Ci sono due metodi: congelamento e liofilizzazione.

*Congelamento:* si utilizza un mezzo di coltura liquido e un agente crioprotettivo come il glicerolo al 20%. L'acqua congela e le cellule non possono crescere. Conviene impiegare cellule matura (inizio della fase stazionaria della curva di crescita o in alcuni casi la fase di preparazione prima dello stato latente). La variazione di temperatura deve essere rapida sia per il

congelamento che per lo scongelamento. La coltura posta in criovials viene congelata in azoto liquido a  $-195^{\circ}\text{C}$ .

*Liofilizzazione*: questo metodo prevede il congelamento delle cellule ed eliminazione dell'acqua per sublimazione. E' piú conveniente del congelamento per lo stoccaggio a temperatura ambiente ( $18^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$ ) e per la facilità di trasporto.

### ***Metodi alternativi***

Non è garantita la stabilità genetica e conviene prendere in considerazione utilizzare piú di uno di questi per la conservazione dei microrganismi.

*Trasferimento periodico*: è il metodo peggiore per la stabilità genetica per lo sviluppo di nuove generazioni ogni volta che la coltura viene trasferita in terreno nuovo. Il metodo può essere migliorato mediante prolungamento dell'intervallo tra i trasferimenti, o mediante ritardo dell'invecchiamento delle cellule, che si raggiunge utilizzando una quantità minore di inoculo, diminuendo i nutrienti del terreno di coltura, abbassando la temperatura di stoccaggio a  $4$ - $8^{\circ}\text{C}$ , oppure utilizzando uno strato di olio minerale sterile per evitare l'essiccamento del terreno.

*Sospensione in acqua distillata o acqua di mare sterile*: è un metodo molto impiegato con alte percentuali di vitalità per diversi tipi di microrganismi, funghi filamentosi, lieviti e alcuni batteri. Consiste nel sospendere in acqua sterile alcune cellule della coltura da conservare. Possono essere impiegati criovials oppure provette con tappo a vite. Per funghi filamentosi che non sporulano si possono mettere pezzi di agar in sospensione. In casi di microrganismi marini la sospensione si fa in acqua di mare sterile.

I risultati ottenuti dalla CECT<sup>15</sup> mostrano alte percentuali di vitalità delle cellule conservate con questo sistema per periodi di piú di 5 anni. La stabilità delle caratteristiche morfologiche e fisiologiche è buona ma non è confermata per caratteristiche specifiche come la virulenza e l'attività fermentativa.

---

<sup>15</sup> María Dolores García López y Federico Uruburu Fernández. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (Valencia).

## ***FUNGHI EPIFITI***

Un fungo epifita è un fungo che cresce sopra, o attaccato a una pianta viva. Il termine epifita deriva dal greco “epi” sopra e “phyton” pianta.

I funghi epifiti, quali gli *uredo* e gli *orcidium* conosciuti come *ruggine* in agricoltura, coprono interamente alcune piante erbacee, oppure prescelgono una parte specifica della pianta su cui svilupparsi. Ci sono alcune specie che si propagano sulla superficie inferiore delle foglie (funghi ipofiti), e altre su quella superiore (funghi epifiti); alcuni crescono soltanto sui calici, altri preferiscono la scorza o le radici.

I funghi che si sviluppano su piante sono di due tipi:

- funghi parassiti e privi di peridio, protetti, quando sono giovani, dall'epidermide della pianta sulla quale vivono (*Gynosporangium* Hedw., *Puccinia* Pers., *Uredo* Pers.) e
- funghi con peridio membranoso o coriaceo (*Aecidium* Alb, et. Schw., *Mucor* Linn., *Licea* Schrad., *Tubulina* Pers., *Onygena* Pers.).

### ***Funghi Epifiti degli Agrumi***

La microflora epifita è dipendente da fattori ambientali e climatici. La temperatura, il grado di piovosità, la siccità e l'umidità relativa dell'intorno influiscono sulla quantità e il tipo di funghi che si sviluppano sopra le bucce dei frutti. A causa di questi fattori vi sono differenze che dipendono anche dalla parte della pianta da cui il frutto viene prelevato. Insieme alle condizioni ambientali, la fisiologia della pianta contribuisce al maggiore o minore sviluppo dei ceppi: per questo motivo alcune infezioni pre-raccolta in cui il fungo resta inattivo differiscono da quelle di post-raccolta dove le diverse condizioni permettono lo sviluppo della malattia (22).

Il rapporto fra popolazione fungina e temperatura generalmente è positivo, cioè frutti sottoposti ad un clima più caldo registrano una maggiore popolazione di funghi epifiti. Allo stesso modo il rapporto con le precipitazioni e l'umidità relativa sono positivi, anche se non si può affermare che si tratta di una regola, ad esempio la crescita di *Penicillium* in Tarragona (Spagna) su mandarini ha registrato un rapporto negativo debole con la temperatura e l'umidità e nessun rapporto con le precipitazioni (23).

I generi di funghi epifiti noti per la loro capacità a svilupparsi sulle bucce degli agrumi sono *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Rhizopus*. Inoltre è noto che le infezioni post-raccolta sono date da:

- *Penicillium digitatum* (Pers. Fr.) Sacc., che è causa della muffa verde;

- *Penicillium italicum* Wehmer, che è causa della muffa azzurra;
- *Geotrichum candidum* Link ex. Pers., che è causa del marciume acido;
- *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb) Lind (24).



**Figura 11.** Principali infezioni post-raccolta

Mentre le infezioni pre-raccolta più importanti sono date da:

- *Alternaria citri* Ell. E Pierce (oppure da *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler), che è causa del marciume nero dell'asse carpellare;
- *Phytophthora citrophthora* Smith & Smith, che è causa del marciume bruno o allupatura;
- *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr., che è causa della muffa grigia;
- *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc, che è causa della antracnosi.



**Figura 12.** Principali infezioni pre-raccolta

Il genere *Mucor* è poco frequente sulla superficie degli agrumi. Altre specie che si trovano come epifiti di foglie di *Citrus limon* sono: *Amerosporium* sp., *Cladosporium herbarum*, *Mycosphaerella tassiana*, *Phyllosticta adusta*, *Pleospora herbarum* f. *citrorum*, *Sternophyllum botryosum* (25).

*Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, descritto come un patogeno post-raccolta (24), è stato identificato come il principale patogeno di *Citrus limon* in uno studio realizzato in Catalogna (Spagna) (25), tuttavia non è un patogeno importante degli agrumi mentre è più frequente nelle patologie delle mele “golden Delicious” nella zona di Lleida sempre nella comunità autonoma di Catalogna (26). E' un fungo saprofito con caratteristiche di buona adattabilità a condizioni di

siccità, quindi la sua presenza è dovuta principalmente alle condizioni ambientali della zona da cui sono ricavati i dati.

*Penicillium digitatum* e *P. italicum* sono i patogeni che danno le maggiori perdite post-raccolta degli agrumi (27,28), mentre *P. ulaiense* è stato identificato in marciumi post-raccolta delle clementine in Italia (29).

Nonostante i funghi epifiti siano colpevoli di grandi perdite economiche, potrebbero essere studiati per investigare la loro capacità biotrasformativa di substrati che sono presenti nei frutti, come terpeni che sono i maggiori componenti degli oli essenziali degli agrumi.



## **OLI ESSENZIALI**

Gli oli essenziali (O.E.) sono delle miscele aromatiche di sostanze organiche diverse come alcoli, aldeidi, chetoni, acidi, esteri, eteri, terpeni, ecc. Sono sostanze bassobollenti, e quindi volatili a temperatura ambiente. Le loro funzioni nella fisiologia delle piante sono ignote ma ci sono alcune ipotesi che li considerano come prodotti di rifiuto o sostanze che attirano gli insetti per favorire l'impollinazione incrociata, come nutrienti delle piante o moderatori dei processi ossidativi cellulari, come deterrenti contro la crescita di altre piante o protezione contro i predatori erbivori, ecc. Le piante che producono queste sostanze sono dette per convenzione "vegetali a oli essenziali" se la percentuale di distillazione è compresa tra lo 0.01% e il 20% del peso della pianta fresca.

### ***Proprietà chimico-fisiche***

Gli oli essenziali sono, nella maggior parte dei casi, liquidi a temperatura ambiente, volatili, di consistenza oleosa, più o meno fluidi (densità: 0.759–1.187), di odore aromatico, incolori ma spesso colorati, destrogiri o levogiri ma raramente otticamente inattivi. Sono insolubili in acqua ma possono trasmettere il loro aroma per essere lievemente idrofili, sono solubili in alcol, etere, cloroformio ed altri soventi organici.

### ***Metodi di preparazione***

La scelta del metodo estrattivo dipende dal tipo di pianta e dal tessuto, dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'olio essenziale e dal prodotto che si vuole ottenere. Per molti agrumi (il cui olio essenziale si trova nell'epicarpo del frutto) è ottimale la spremitura a freddo, per *pressione meccanica*; per tessuti molto delicati (fiori) si ricorre all'*enfleurage*; per altri casi, che non sopportano alterazioni di temperatura, si procede con solventi organici volatili. Il metodo più comunemente utilizzato ed efficace è comunque la *distillazione in corrente di vapore*.

La *distillazione in corrente di vapore* consente di distillare a una temperatura più bassa di quella di ebollizione dell'acqua. Il vapor di acqua generato nella caldaia opportunamente riscaldata, investe il vegetale e, facendo scoppiare le piccole ghiandole oleifere, si satura di sostanze oleose volatili. La miscela vapor d'acqua/olio essenziale attraversando la serpentina refrigerante si condensa e si raccoglie nell'apposito recipiente. Generalmente le piante si distillano allo stato

fresco perchè una loro conservazione anche di poche ore, può innescare dei processi fermentativi capaci di distruggere in parte l'essenza o di alterarne irrimediabilmente il profumo.

La distillazione è il metodo più usato per estrarre gli oli essenziali in quanto:

1. la temperatura di ebollizione della miscela vapore/olio essenziale è prossima ai 100°C, ancora lontana da quella di ebollizione degli oli essenziali e non aumenta per tutta la durata della lavorazione, evitando così i rischi di deterioramento degli O.E., ma assicurando una buona volatilità degli stessi;
2. il vapore acqueo rigonfia i tessuti vegetali, ne dilata i pori, rompe le cellule essenziali e le strutture di secrezione, facilitando la fuoriuscita degli oli essenziali e trascinandoli con sé;
3. vi è una perdita minima di olio essenziale, dovuta alla sua bassissima solubilità in acqua;
4. il metodo riduce i fenomeni di ossidazione;
5. il procedimento è economico e non crea particolari problemi per la sicurezza del lavoro.

Lo svantaggio di questa procedura è la possibilità di andare incontro ad eventuali degradazioni termiche e processi idrolitici. Questi fenomeni possono essere ricercati o non voluti, ad esempio l'O.E. ottenuto dall'epicarpo dell'arancio amaro per distillazione, contiene circa il 90% di terpeni e sesquiterpeni, mentre il loro contenuto medio, per spremitura è del 10%.

A volte invece eventuali degradazioni sono volute per estrarre alcuni principi attivi, come nell'estrazione del camazulene della Camomilla, in cui per distillazione si ha l'idrolisi termica della matricina.

L'**estrazione per spremitura** è solitamente riservata per quelle droghe aromatiche che contengono gli oli essenziali in cellule superficiali e in grande quantità come i frutti del genere Citrus. Le essenze di questi frutti sono facilmente ossidabili tanto da non sopportare un'estrazione a caldo. L'estrazione viene fatta per azione meccanica mediante torchi manuali o idraulici che esercitano pressione sull'epicarpo del frutto provocando la rottura degli otricoli o cellule oleifere e la fuoriuscita dell'olio essenziale.

La composizione chimica degli oli essenziali è molto variabile a causa di fattori:

- ecologici o ambientali, quali luce, acqua, latitudine e composizione del terreno;
- genetici infatti l'esistenza di varietà chimiche nell'ambito della stessa specie è ben documentata per numerosi vegetali.

L'**enfleurage** è una metodica utilizzata per i tessuti molto delicati (fiori o petali) che non sopporterebbero un'eccessiva manipolazione e per quegli oli essenziali presenti in basse quantità

tali da non poter esser ottenuti in resa sufficiente con la distillazione. Con questa tecnica è possibile estrarre profumi di grande finezza, che con un altro sistema estrattivo tenderebbero ad alterarsi. Fra le piante estratte con questo processo ricordiamo Tuberosa, Rosa centifolia e Eliotropo.

L'enfleurage consiste nell'appoggiare i fiori su una griglia, che viene posta, a distanza di qualche millimetro, su delle lastre di vetro ricoperte di grassi animali (maiale e bue) purificati (i grassi utilizzati devono essere inodore, stabili nel tempo e avere un elevato potere assorbente) o grassi minerali.

I fiori vengono sostituiti ogni 24-72 ore e, dopo circa una trentina di sostituzioni, il grasso risulta saturo dell'essenza. Queste sostanze profumate sono dette "pommade" e vengono classificate in base al numero delle sostituzioni dei fiori sul grasso.

L'**estrazione con solventi organici**, è un metodo usato per vegetali dal profumo delicato, poco ricchi di oli essenziali, i quali sono facilmente alterabili dall'aumento di temperatura nel processo di distillazione come Violetta, Iris, Mimosa, Gelsomino, Mughetto, Ylang-ylang ecc.

Per l'estrazione si usano delle apposite apparecchiature dentro cui si mette la droga, che viene fatta attraversare da un opportuno solvente (esano, etere di petrolio, butano, benzene). Il solvente che si utilizza non deve reagire con gli O.E., deve essere bassobollente, immiscibile con l'acqua e inodore.

Una volta finita l'estrazione si procede all'allontanamento del solvente tramite evaporazione: rimarrà così una massa solida non cristallina detta "concreta". Con questo sistema si ha l'inconveniente di estrarre anche le cere e altri composti lipofili non volatili. La concreta viene estratta con etanolo e raffreddata in modo da far precipitare le cere e poterle eliminare mediante filtrazione o centrifugazione; l'alcol invece viene eliminato tramite distillazione a pressione ridotta, ottenendo così l'essenza assoluta, una massa vischiosa contenente gli oli essenziali.

### ***Classificazione***

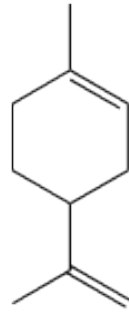
In virtù della diversità della composizione chimica gli oli essenziali si classificano secondo il costituente chimico contenuto in maggior concentrazione (30) (**Tabella 8**).

TIPO DI OLIO	OLIO ESSENZIALE	COMPOSTO PREVALENTE
Monoterpeni, sesquiterpeni, diterpeni	Limone	Limonene (2C <sub>5</sub> )
	Ginepro	Pineni (2C <sub>5</sub> ), Canfene, Cadinene (3C <sub>5</sub> )
	Trementina	Pineni, Canfene (2C <sub>5</sub> )
	Canfora	Canforene (4C <sub>5</sub> )
	Cipresso	Cupressene (4C <sub>5</sub> )
	Garofano	Cariofillene (3C <sub>5</sub> )
Aldeidi	Cannella	Aldeide cinnamica
	Mandarlo	Aldeide benzoica
Chetoni	Assenzio	Tuione
	Salvia	Tuia
Alcoli	Geranio	Geraniolo
	Sandalò	Santalolo
	Coriandolo	Linalolo
Fenoli	Garofano	Eugenolo
	Timo	Timolo
Composti solforati	Aglio	Bisolfuro di allile
Esteri e alcoli	Lavanda	Linalolo e acetato di linalile
Aldeidi e fenoli	Canella di Ceylon	Aldeide cinnamica e eugenolo
Perossidi	Chenopodio	Ascaridolo

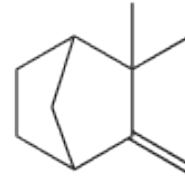
**Tabella 8.** Classificazione degli oli essenziali

***Idrocarburi (elementi caratterizzanti C e H):***

- *Idrocarburi monoterpenici (2C<sub>5</sub>) alifatici, aromatici, insaturi, mono e biciclici:* gli idrocarburi monoterpenici, sono caratterizzati da una spiccata lipofilia, tendono per questo ad integrarsi nell'intima struttura della membrana cellulare modificandone le relazioni interne in modo più o meno determinate in funzione della concentrazione. Gli idrocarburi monoterpenici possono causare infiammazioni: a seconda dei tessuti interessati e dell'entità dello stimolo si possono osservare differenti reazioni ed effetti. Ad esempio come i pineni, il terpinene e il limonene influenzano le ghiandole secretrici di mucina delle vie respiratorie, oppure le ghiandole secretrici dei succhi gastrici dello stomaco. Gli idrocarburi monoterpenici sono principalmente presenti in famiglie quali Labiate, Pinacee, Rutacee e Umbrellifere.

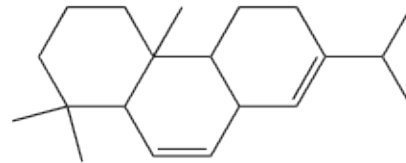


limonene

 $\beta$ -pinene

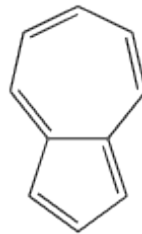
canfene

- *Idrocarburi sesquiterpenici (3C<sub>5</sub>)*: si differenziano dai monoterpeni per la minor volatilità. Principalmente presenti in Labiate, Mirtacee, Pinacee, Malvacee e anche Umbrellifere.
- *Idrocarburi diterpenici (4C<sub>5</sub>)*: canforene (Canfora), cupressene (Cipresso).



cupressene

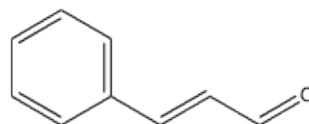
- *Azuleni*: camazulene (Camomilla, Achillea), eucazulene (Eucalipto), guajazulene (Guajaco) vetivazulene (Vetiver).



azulene

#### ***Idrocarburi ossigenati (elementi caratterizzanti C,H,O):***

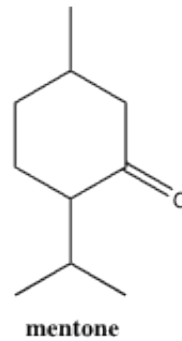
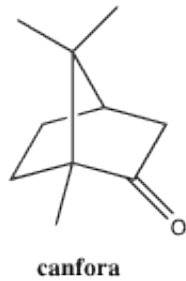
- *Aldeidi*: le aldeidi monoterpeniche sono generalmente più volatili e più reattive degli alcoli. Questa notevole volatilità ne determina le proprietà irritanti.



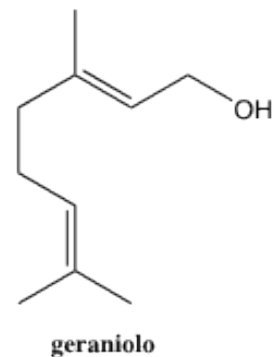
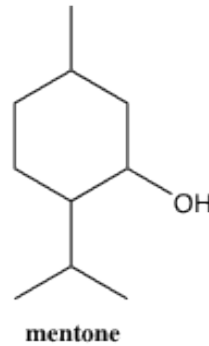
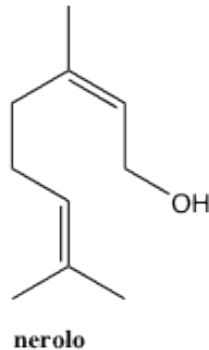
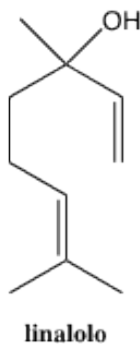
aldeide cinnamica

- *Chetoni*: i chetoni pur essendo meno irritanti delle aldeidi, sono neuroattivi, ossia in dosi elevate hanno un'attività convulsivante, ma anche a basse dosi registrano degli effetti collaterali. In condizioni normali stimolano il SNC, al contrario ne deprimono le funzioni. Hanno azione mucolitica a livello delle vie respiratorie, dell'intestino e dell'apparato uro-

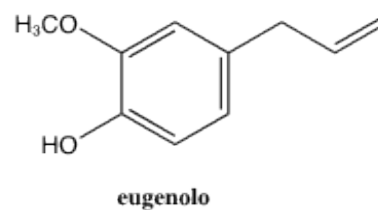
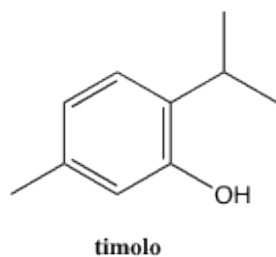
genitale. A livello epidermico svolgono una duplice azione: da una parte riducono le manifestazioni edematose, dall'altra regolano la liberazione di fattori di crescita cellulare. Alcuni esempi sono: carvone (Carvi, Anice), tuione (Salvia, Assenzio), canfora (Canfora, Cannella, Salvia, Basilico), mentone (Menta), fencone (Finocchio).



- *Alcoli*: gli alcoli monoterpenici possiedono due gruppi ossidrilici in grado di interagire con l'acqua. Ciò li rende più solubili degli idrocarburi, ed è possibile trovarne in varie concentrazioni nelle acque di distillazione.



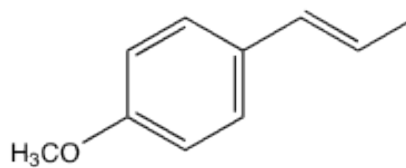
- *Fenoli*: i fenoli presentano un'attività antimicotica, in quanto destabilizzano la parete cellulare di batteri e lieviti, e riducono l'assemblaggio delle parti costituenti dei virus. Tutti i fenoli sono piuttosto irritanti a livello delle mucose, irritazione che può divenire caustica se l'applicazione dell'olio essenziale puro è prolungata nel tempo.



- *Eteri*: anetolo (Anice, Finocchio, Aneto), saffrolo (Sassofrasso, Noce moscata), eucaliptolo (Eucalipto).

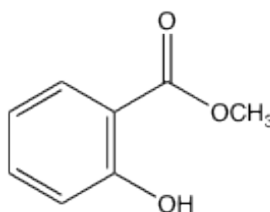


eucaliptolo



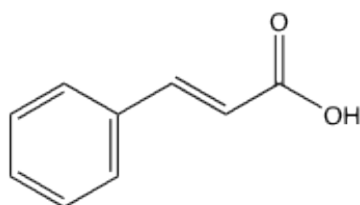
anetolo

- *Esteri*: gli esteri derivano generalmente dalla reazione fra un alcol monoterpenco e un acido alifatico o aromatico. La proprietà caratteristica degli esteri è quella antispasmodica con specificità di bersaglio dovuta alla loro struttura complessiva e in particolare al residuo alcolico. Acetato di linalile (Lavanda, Bergamotto), salicilato di metile (Betulla), acetato di geranile (Lavanda, Eucalipto), acetato di terpenile (Cipresso, Pino).

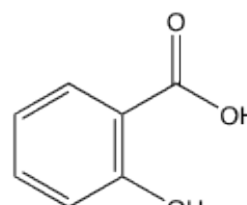


salicilato di metile

- *Acidi organici*: acido benzoico (Ylang-Ylang, Benzoino), acido cinnamico (Storace, Balsamo del Perù, Balsamo del Tolù), acido salicilico (Betulla, Pioppo), acido cuminico (Cumino).



acido cinnamico

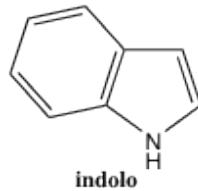


acido salicilico

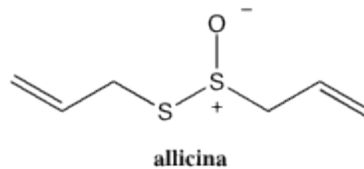
- *Perossidi*: ascaridolo (Chenodopio).

#### ***Idrocarburi solforati, azotati (elementi caratterizzanti C,H,O,N,S):***

- *Derivati azotati*: indolo (Lillà), acido cianidrico (Mandorla, semi di Pesca e di Albicocca), antranilato di metile (Gelsomino, Bergamotto, Ylang-Ylang).



- *Derivati solforati e solfocianici*: allicina o diallildisolfuro-S-ossido (Aglione), isotiocianato di allile (Senape).



### ***Attività Biologica degli Oli Essenziali***

Benchè l'uso degli oli essenziali risalga a 4.000 anni fa, il loro impiego nella cura delle malattie dell'uomo è iniziato solo dal 1700 d.C. Attualmente solo 30-40 oli essenziali sono usati in terapia tra gli oltre un centinaio che sono disponibili.

Gli oli essenziali esercitano attività terapeutiche polivalenti. In termini molto generali si possono avere:

- *funzioni biologiche*:
  - influenzano tutti i sistemi organici con una azione aspecifica di potenziamento delle funzione vitali.
  - possiedono un loro tropismo specifico verso determinati organi, sistemi o apparati.
- *funzioni psichiche*:
  - producono effetti somatopsichici dovuti all'azione singola o sinergica dei loro costituenti chimici, odore e sapore, che determinano un'azione globale che coinvolge l'unità psicosomatica dell'uomo.

Le diverse azioni terapeutiche degli oli essenziali in base al loro effetto sui sistemi e sugli apparati sono riportate nella **Tabella 9**. E' importante tenere presente che queste azioni sono sempre integrate e mai isolate o limitate ad una funzione o ad un solo organo (30).



ORGANI	AZIONE TERAPEUTICA	OLI ESSENZIALI
Apparato digerente	Azione antispasmodica sulla muscolatura liscia	Basilico, Camomilla
	Azione antiacida	Chiodi di Garofano
	Tropismo sul pancreas	Eucalipto, Geranio, Ginepro
	Tropismo sul fegato	Rosmarino, Camomilla
Apparato cardiocircolatorio	Stimolazione del muscolo cardiaco	Canfora
	Diminuzione della frequenza cardiaca	Melissa, Arancio fiori
	Vasodilatazione – ipotensione	Issopo, Lavanda, Aglio
	Vasocostrizione – ipertensione	Canfora, Rosmarino, Timo
Sistema nervoso	Azione parasimpaticomimetica	Origano, Verbena
	Azione parasimpaticolitica	Timo, Serpillo, Cipresso
	Azione simpaticolitica	Lavanda, Ylang-Ylang
	Azione simpaticomimetica	Basilico, Pino, Limone
	Azione convulsivante	Salvia, Assenzio, Anice
	Azione eccito-stupefacente stimolanti	Basilico, Finocchio, Limone
	Azione eccito-stupefacente calmanti o sedative	Camomilla, Verbena
	Azione stupefacente	Noce moscata, Menta
Sistema endocrino	Azione Anticonvulsivante	Calamo, Lavanda
	Stimolanti della corteccia surrenale	Basilico, Pino, Rosmarino
Sistema immunitario	Stimolanti dell'ipofisi	Menta, Gelsomino
	Stimolanti della produzione di linfociti	Bergamotto, Timo, Lavanda
Apparato polmonare	Azione antispastica	Finocchio, Menta piperita
	Azione spettorante	Aglio, Eucalipto, Origano
	Stimolanti respiratori	Canfora
Apparato urinario	Diuretici	Aglio, Anice verde, Limone
	Azione antilitiasica	Camomilla, Finocchio

**Tabella 9.** Schema delle attività farmacoterapeutiche degli oli essenziali

Le qualità terapeutiche e gli usi terapeutici tradizionali degli oli essenziali impiegati nel presente lavoro di tesi, *Citrus limon*, *C. aurantifolia*, *C. latifolia*, *C. aurantium* e *C. nobilis*, sono stati descritti nella sezione riguardante il genere *Citrus*.

### ***Purificazione ed attivazione***

Gli oli essenziali naturali possono essere purificati ed attivati. La purificazione consente di togliere composti di caratteristiche organolettiche, terapeutiche o tossiche che possiedono certi oli allo stato grezzo, permettendo così il loro utilizzo senza il rischio di effetti indesiderati. Questo processo può essere realizzato mediante distillazione frazionata o per deterpenazione. Con questa operazione si ottengono oli essenziali liberi di idrocarburi monoterpenici, poco

solubili in acqua ed irritanti per la pelle, e arricchiti di costituenti sesquiterpenici e ossigenati che aumentano l'attività battericida.

L'attivazione di oli essenziali mediante perossidazione consente di aumentarne l'attività battericida con conseguenti vantaggi sul piano terapeutico. La perossidazione con ozono in condizioni definite di temperatura, pressione, quantità di reagenti e tempo di reazione produce perossidi terpenici più adatti alla liberazione di ossigeno allo stato nascente, che in contatto con i germi provocano l'ossidazione dei substrati del protoplasma.

## **BIOTRASFORMAZIONI DI OLI ESSENZIALI**

Le biotrasformazioni degli oli essenziali utilizzando batteri e funghi, data la diversità degli microrganismi impiegati e del loro patrimonio enzimatico, potrebbero essere considerate sia come un metodo di purificazione sia di attivazione.

L'uso di ceppi microbici isolati dalle stesse matrici vegetali da cui provengono gli oli essenziali è una sufficiente garanzia alla sopravvivenza dei medesimi in presenza degli oli e alla probabilità che alcuni componenti chimici degli oli vengano inclusi nel loro metabolismo.

Questa metodologia potrebbe permettere una deterpenazione partendo da un olio essenziale a prevalente contenuto di idrocarburi monoterpenici come substrato e, utilizzando per la biotrasformazione microrganismi che possiedano enzimi capaci di metabolizzare o degradare questi composti mediante reazioni di ossidazione, riduzione, acetilazione, ecc., la formazione di prodotti di biotrasformazione modificati.

Allo stesso tempo si potrebbe tentare di attivare gli oli essenziali sottoponendoli a reazioni di ossidazione mediate da microrganismi. L'attivazione può essere vista o come un aumento di composti ossigenati che migliorano l'attività battericida, o come la conversione in molecole diverse da quelle di partenza che abbiano attività biologica differente (antiossidante, mutageno-protettiva, ecc). In questo modo l'olio essenziale può essere arricchito di molecole attive e diventa adatto ad uso terapeutico.

Scarsa è la letteratura che riguarda le biotrasformazioni degli oli essenziali grezzi. La maggior parte della ricerca in questo campo si è focalizzata sui singoli composti, in particolare monoterpeni, che si trovano in percentuale significativa all'interno dell'olio.

Le biotrasformazioni sugli oli essenziali di agrumi, come atteso, hanno dato come risultato la formazione di prodotti derivanti dai monoterpeni principali, limonene, linalolo, ecc. Altro esempio è la produzione di R-(+)- $\alpha$ -terpineolo mediata da *Fusarium oxysporum* a partire dall'olio di arancio attraverso la trasformazione del R-(+)-limonene che è il suo principale componente (31). Altri studi fatti utilizzando gli stessi substrati e lo stesso microrganismo hanno dato come prodotto l'alcol perillico (32). L'olio essenziale dopo la biotrasformazione presenta un'importante attività antiossidante, maggiore di quella dei composti singoli: questo comporta una riduzione dei costi dovuti all'applicazione di tecniche di purificazione dei componenti per ottenere composti attivi. Questo è uno dei motivi per cui la ricerca sulla biotrasformazioni di oli essenziali diventa un argomento interessante da studiare.

Gli oli essenziali di agrumi che sono stati oggetto di studio in questa tesi di dottorato sono a prevalente contenuto di derivati monoterpeneici. La composizione media degli oli è riportata nella **Tabella 10**, in cui si può notare che i vari oli hanno di solito un componente principale.

PIANTA	COMPOSIZIONE MEDIA		CONCENTRAZIONI %				
		%	Ref 33	Ref 34	Ref 35	Ref 36	Ref 37
<i>Citrus limon</i> *	<b>Limonene</b>	<b>31.3</b>	40.9	12.3	44.2	25.2	33.9
	Linalolo	2.4	12.2				
	Geraniale	2.4	12.1				
	Nerale	1.8	9.1				
	(z)- $\beta$ -ocimene	1.4	7.3				
	Citronellale	14.3		67.9		3.7	
	Citronello	2.3		11.4			
	$\beta$ -pinene	6.4			10.6		21.2
	Sabinene	7.6				37.8	
	$\gamma$ -terpinene	3.5					17.4
			Ref 38				
<i>Citrus aurantifolia</i>	Citrale	54.7	54.7				
	Limonene	17.80	17.8				
	neril acetato	8.30	8.3				
	Citronellale	5.00	5				
			Ref 39			Ref 36	Ref 37
<i>Citrus nobilis</i> *	N-metil-metil-antranilato	24.8	74.3				
	Limonene	15.0	4.9				40.2
	trans- $\epsilon$ -ocimene	3.6				10.9	
	Linalolo	13.9				41.6	
	$\gamma$ -terpinene	16.8	12.8			14.3	23.4
	$\alpha$ -pinene	4.1					12.2
				Ref 40		Ref 36	Ref 37
<i>Citrus aurantium</i> *	Sabinene	12.8				38.3	
	$\Delta^3$ -carene	3.0				8.9	
	R-limonene	27.4				7.9	74.4
	trans $\epsilon$ -ocimene	1.1				3.2	
	$\gamma$ -terpinene	14				4.1	
	Linalolo	6.7		11.2		8.8	
	$\beta$ -pinene	2.2		6.7			
	linalil acetato	13.2		39.8			
$\beta$ -mircene	3.8					11.3	

**Tabella 10.** Composizione media di oli essenziali di foglie di agrumi

(\*) Oli utilizzati nel presente lavoro di tesi.

Il limonene è senz'altro il componente più importante, sia per la sua presenza in tutti gli oli essenziali sia per la quantità. Il limonene, tra l'altro è l'unico composto presente in tutti gli oli anche provenienti da fonti diverse come si è messo in evidenza nella tabella.

Il linalolo è altrettanto comune negli oli essenziali sopracitati (tranne *Citrus aurantifolia*) sebbene in percentuale minore e con una distribuzione meno diffusa, mentre il citronellale si trova come composto prevalente solo nell'olio di *Citrus limon* del Bangladesh e il sabinene è presente sia in *Citrus limon* sia in *Citrus aurantium* entrambi di provenienza ecuadoregna.

### **Composizione degli oli essenziali**

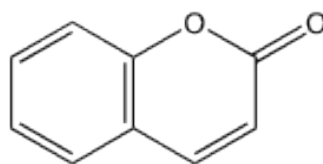
Gli oli essenziali, per quanto riguarda la loro composizione, possono essere divisi in due classi:

1. Oli che contengono derivati fenilpropanoidici (i.e. eugenolo, isoeugenolo, cumarine, flavonoidi);
2. Oli che contengono terpeni, principalmente mono e sesquiterpeni.

### **Derivati fenilpropanoidici**

I fenilpropanoidi sono composti originati dall'acido scichimico avente come substrato il fosfoenolpiruvato e possiedono generalmente strutture aromatiche. A questa classe appartengono le cumarine e i flavonoidi.

Le cumarine, sono caratterizzate dalla presenza di due anelli di cui uno lattonico.

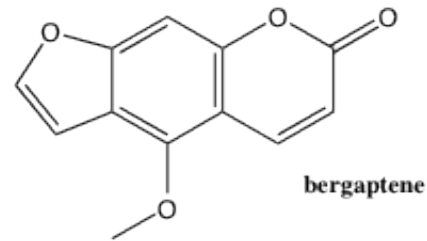


**cumarina**

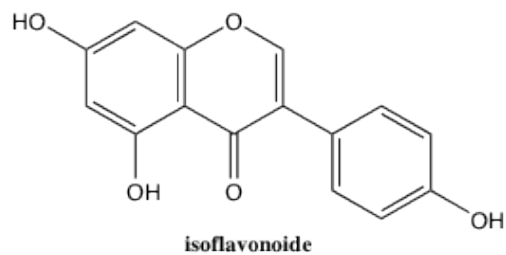
Le furocumarine o le piranocumarine possiedono in posizione 6,7 o 7,8 dell'anello aromatico, un gruppo furanico o piranico che ne modifica le proprietà. Pirano- e furocumarine si trovano prevalentemente nelle famiglie delle *Apiaceae* e delle *Asteraceae*. Tutte le cumarine agiscono sul sistema nervoso riducendo l'eccitabilità sia a livello centrale che periferico. Presentano inoltre, attività spasmolitica, capillarotropica e vasodilatatrice.

Dal punto di vista tossicologico meritano particolare attenzione le furocumarine in quanto responsabili di fotosensibilizzazione e a tutt'oggi sospettate essere mutagene e cancerogene (41).

Il composto più comune di questa classe è il bergaptene, una furocumarina presente nell'olio essenziale di diversi agrumi (arancio amaro, bergamotto, ecc.) che presenta una fotoreattività elevata e la sua attività mutagena aumenta se esposta alla luce.



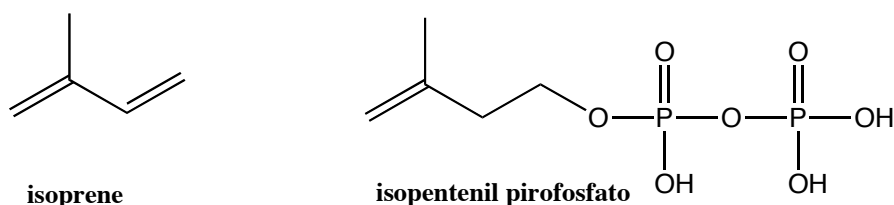
I **flavonoidi** a livello cellulare, si accumulano nel vacuolo e nei plastidi, conferendo un evidente colorazione agli elementi vessillari. La loro distribuzione è ubiquitaria in tutto il regno vegetale, ma con differente concentrazione nelle parti della pianta. Le principali attività biologiche dei flavonoidi sono attività antiossidante, antiallergica, antinfiammatoria, antiepatotossica, antiaggregante piastrinica, antiulcera, antivirale e citotossica.



## ***I TERPENI***

I terpeni sono composti prodotti dalla via biosintetica del acido mevalonico. Questa classe merita un approfondimento speciale in questa tesi perchè sono le molecole scelte come substrato delle biotrasformazioni.

Il nome terpeni proviene della parola tedesca “*terpentin*” che significa “*trementina*”. Costituiscono una classe di fitocostituenti secondari molto vasta. Hanno come origine biosintetica l’unione di elementi a 5 atomi di carbonio ( $C_5$ ), denominati unità isopreniche.



La biosintesi dei terpeni parte dall’acetil CoA e prosegue attraverso la via dell’acido mevalonico che passa a isopentenil-pirofosfato per disidratazione, decarbossilazione ed esterificazione con acido fosforico. A seconda del grado di polimerizzazione i composti terpenici si dividono in: monoterpeni e iridoidi ( $2C_5$ ), sesquiterpeni ( $3C_5$ ), diterpeni ( $4C_5$ ), sesterpeni ( $5C_5$ ), triterpeni ( $6C_5$ ), tetraterpeni ( $8C_5$ ) e politerpeni [ $(C_5)_n$ ] (**Schema 2**).

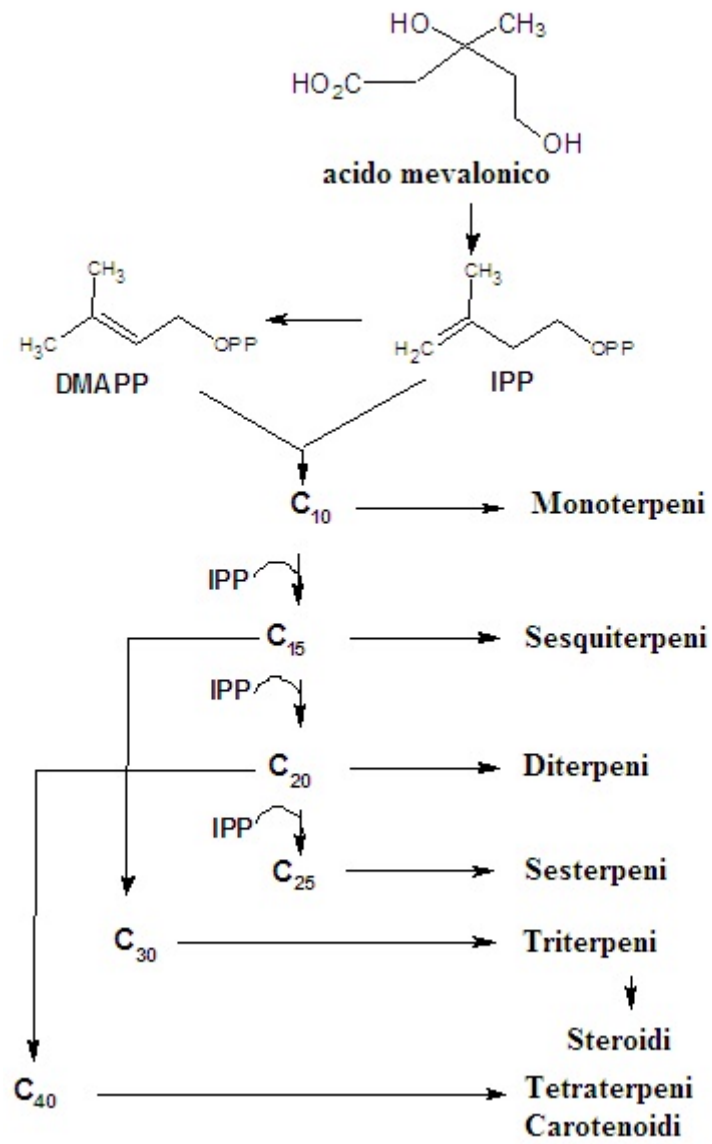
Sono di particolare interesse i composti monoterpenici costituenti principali degli oli essenziali di agrumi utilizzati nel presente lavoro di tesi.

I **monoterpeni**, derivano dall’unione testa-coda di due unità di acido mevalonico. Il loro scheletro è costituito da 10 atomi di carbonio e si conoscono circa 600 sostanze, divise in base alle caratteristiche strutturali: lineari aciclici come citronellale, linalolo, mircene; monociclici come limonene, terpinolene, mentolo; biciclici come pinene, tuione, canfene; ed irregolari (iridoidi) come le piretrine.

Queste sostanze si trovano disciolte nel vacuolo sotto forma glucosidata, prima di essere traslocate, segregate e riaccumulate nelle strutture secretorie in forma libera. Insieme ai sesquiterpeni sono i maggiori costituenti degli oli essenziali.

Si trovano in famiglie quali Labiate, Pinacee, Rutacee, Umbrellifere, ma sono considerati ubiquitari. La loro funzione biologica è generalmente legata all’attrazione degli agenti impollinatori o come agenti protettivi.

I monoterpeni che si trovano negli insetti sono feromoni sessuali e sostanze di difesa, e per questo motivo alcuni monoterpeni di origine vegetale hanno delle proprietà insetticide o repellenti.



**Schema 2.** Biosintesi dei terpenoidi



### ***Impiego Industriale dei Terpeni***

I terpeni trovano il loro impiego in diversi ambiti industriali. Di seguito sono riportati gli impieghi più comuni.

#### *Insetticidi e Repellenti*

La natura, attraverso le interazioni di tipo offensivo tra diverse specie ha determinato una coevoluzione che ha permesso la biosintesi di composti chimici che svolgono il ruolo di attacco o di difesa contro altre specie come meccanismo di selezione naturale. I principali terpeni con attività insetticida sono i piretroidi, derivati sintetici delle piretrine presenti nel genere *Chrysanthemum*. Ci sono altri monoterpeni come la azaridactina dall'albero di neem (*Azadirachta indica*) e da *Melia azedarach*, e il mircene comunemente presente nella resina delle conifere. Monoterpeni come il geraniolo fungono da repellenti. L'azione insetticida o repellente può manifestarsi solo verso determinati tipi di insetti o su un ampio spettro di specie, e i meccanismi per cui queste interazioni si presentano in natura sono vari e quasi sempre dipendenti dalla volatilità che influenza il comportamento delle specie di insetti. I meccanismi sono i seguenti:

- **Attrazione:** i terpeni portano gli insetti in una sorta di trappola dove un altro composto non volatile agisce come insetticida, oppure mascherano la presenza di sostanze attive altrettanto volatili.
- **Precursori di feromoni:** il mircene ha un'attività repellente dovuta al fatto di essere il precursore di ipsidienolo e ipsenolo, che mantengono lontani gli scarafaggi del genere *Ips*.
- **Azione ormono-simile:** è il caso del sesquiterpene cariofillene che agisce come repellente specifico verso gli afidi, oppure l'azione insetticida di altri terpeni come l'azadiractina. Alcuni composti che agiscono con questo meccanismo possono presentare anche attività mutagenica o tossica del metabolismo cellulare che risulta lesivo per un impiego su scala industriale.
- **Alterazione della trasmissione degli impulsi nervosi:** a questo gruppo appartengono le piretrine.

#### *Composti ad Azione Fungicida e molluscicida*

Questa attività è ascrivibile a saponine e triterpeni. Le saponine agiscono come antifungini a basse concentrazioni (7.5 – 25 ppm). I terpenoidi presenti nella patata come solavetivone, lubimina e risitina agiscono come fitoalessine inibendo la crescita del tubo germinale del fungo epifita *Phytophthora infestans*, mentre triterpeni come sclareolo ed 1,3 episclareolo in miscela sono

utilizzati in forma nebulizzata per bloccare l'infezione da ruggine (provocata da altri funghi epifiti) della piante di pisello.

#### *Composti ad azione erbicida*

Le modalità di azione come composti fitotossici non sono ancora ben note e riconducibili ad un modello unitario, ma i terpenoidi si caratterizzano più come inibitori della crescita che inibitori della germinazione. Alcuni meccanismi di azione sono:

- Inibizione della respirazione: 1,8-cineolo
- Inibizione del trasporto elettronico del PS II: omograndiolo e grandiolo
- Inibizione di crescita: lattoni sesquiterpenici come l'isoalantolattone
- Regolatori di crescita: podolactoni
- Azione sinergica tra composti terpenici: è il caso dell'acido ursolico che abbassa la volatilità del composto fitotossico aumentando la solubilità grazie alla sua azione detergente e così facilita l'assorbimento.

Purtroppo la complessità molecolare delle strutture terpeniche rende molto dispendiosa una loro produzione sintetica su scala industriale. Inoltre non c'è una conoscenza approfondita riguardo la loro tossicità, selettività, efficacia e persistenza nel terreno (42).

#### *Terpeni nell'industria degli aromi e sapori*

I terpeni sono i più importanti costituenti degli oli essenziali che sono utilizzati nell'industria dei sapori e dei profumi. Il loro impiego va dall'utilizzo diretto, il miglioramento dell'aroma di prodotti industriali nel caso dei monoterpeni biciclici, all'uso come substrato di partenza per l'ottenimento di composti costosi e difficili da ottenere, e questo è l'esempio del limonene, molto abbondante in natura.

#### ***Attività biologica***

Alcuni monoterpeni, derivati ossigenati del limonene, carveolo, carvone, alcol perillico, mentolo e 4-terpineolo, presentano bioattività contro alcuni tipi di tumori cellulari, non solo nella fase di prevenzione, ma anche come terapia per la regressione dei tumori maligni (43,44). Monoterpeni come il 4-terpineolo hanno mostrato attività antiossidante (test del DPPH e di -OH radical scavenging) (45).

#### *Tossicità degli oli essenziali*

Gli oli essenziali sono dei fitocomplessi che intervengono generalmente sulle attività dell'organismo o di un organo in particolare, contribuendo a regolarizzarne la funzionalità. Non

bisogna dimenticare, però, che diversi costituenti degli oli essenziali possiedono delle proprietà che ne impongono un uso sempre controllato. I fenoli sono caustici e possono provocare fenomeni di irritazione renale e lesioni alle mucose del tubo digerente. Alcuni chetoni (tuione) si caratterizzano per un loro spiccato neurotropismo e per la loro tendenza ad accumularsi nell'organismo. I terpeni sono irritanti per la pelle e le mucose. Alcuni esteri (anetolo) sono stupefacenti ad alte dosi.

Gli oli essenziali che richiedono una particolare attenzione sono: l'olio di Assenzio (tuione) che ad alte dosi può provocare danni a carico del sistema nervoso, l'olio di Anice (anetolo) che ad alte dosi provoca torpori muscolari, diminuzione della frequenza cardiaca, l'olio di Garofano (eugenolo) che a dosi elevate è caustico per le mucose e l'olio di Menta (mentolo) che ad alte dosi ha proprietà stupefacenti (30).

## **BIOTRASFORMAZIONI DI TERPENI**

I microrganismi sono capaci sia di sintetizzare sia di degradare o trasformare i prodotti terpenici, in particolare i funghi che sono responsabili della loro produzione, ma anche i batteri, capaci di sintetizzare pochi terpenoidi volatili come geosmina e cadin-4-ene-1-olo. Numerosi microrganismi sono in grado di sintetizzare monoterpeni, tra questi *Cratocystis miniliformis*, *Kluyveromyces lactis*, *Sporobolomyces odorus*, *Trametes odorata* e *Trichoderma viridae* (46).

Biotrasformazioni di terpeni con microrganismi sono state studiate da vari autori e monoterpenoidi come citronellale, citrale, limonene e mentolo (acetati) possono essere biotrasformati rispettivamente a citronello, acido geranico, carveolo e 1-mentolo.

I terpeni sono un buon materiale di partenza per la sintesi di molte sostanze con struttura simile. Oltre alle loro caratteristiche di fragranza e di bioattività già dimostrata contro certi tipi di tumori sia in fase di prevenzione sia di cura, alcuni terpeni sono di facile reperibilità.

Nell'industria trovano diversi impieghi, principalmente in cosmesi e nell'industria alimentare. Possono essere utilizzati direttamente o diventare precursori di nuovi aromi. Si sa che dei circa 6500 aromi conosciuti, solo 300 sono utilizzati. Di questi un centinaio sono ottenuti da fermentazione microbica mentre gli altri da sintesi chimica. Da questo l'esistenza di un gran interesse nella ricerca per l'ottenimento di nuovi "bioflavors" che soddisfano le richieste di aromi alternativi e l'utilizzo di prodotti naturali per questi scopi.

Tradizionalmente le biotrasformazioni vengono svolte in mezzo acquoso per essere compatibili con gli enzimi e con le cellule, purtroppo però i terpeni hanno una scarsa solubilità in acqua (per il limonene la solubilità è di 0.15 mmol/L a 25°C) (47).

Un metodo per migliorare le biotrasformazioni di terpeni con enzimi o microrganismi è l'utilizzo di un sistema bifasico, che da altri vantaggi quali la diminuzione dell'inibizione della biocatalisi causata dal substrato e il recupero del substrato e dei prodotti diventa più facile se confrontato con l'uso della sola fase acquosa.

L'uso di solventi organici come unica fase nelle biotrasformazioni con cellule è stato studiato ma questi solventi in molti casi inattivano e causano la perdita di vitalità perché interferiscono con le membrane cellulari.

Alcuni metodi prevedono una fase organica con piccole quantità di acqua: molti studi sulla biotrasformazione di limonene e linalolo sono stati fatti con colture di superficie dove il substrato può fungere da solvente organico.

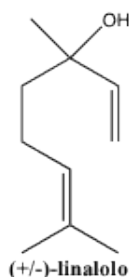
La tossicità del solvente e del substrato è un fattore importante da considerare nell'utilizzo dei microrganismi e da questo dipende la variabilità dei risultati.

Altri mezzi non convenzionali, utilizzati nelle biotrasformazioni, sono i liquidi ionici, solventi polari non acquosi che possono solubilizzare molti composti (questi solventi sono utili nelle biotrasformazioni di terpeni) e i fluidi supercritici, utilizzati nella sintesi di esteri di terpeni (48).

Per quanto riguarda i materiali e la procedura, molti biotrasformazioni di terpeni vengono realizzate in beute sotto agitazione, metodo semplice e efficiente per lo screening di microrganismi, dei substrati e delle condizioni di reazione.

### ***Biotrasformazioni del linalolo***

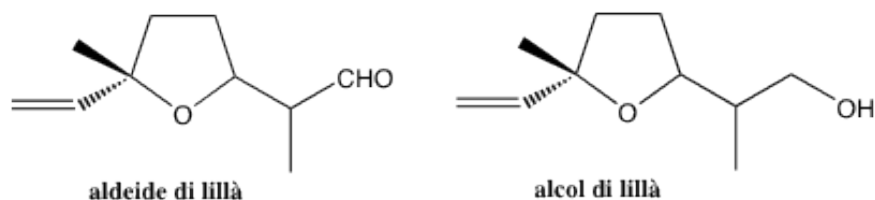
Il linalolo è un alcol terpenico molto diffuso e si trova nel tè nero e tè di Oolong insieme agli ossidi di linalolo e altri composti.



È presente anche negli oli essenziali di alcuni agrumi: limone, arancia e principalmente nell'olio delle foglie di mandarino dove gli ossidi sono assenti (36). La biotrasformazione del linalolo è stata molto studiata in passato e la maggior parte degli studi fatti riportano gli ossidi di linalolo come prodotti principali. Tra questi composti ci sono i *cis*- e *trans*-furanlinalolo ossidi e i *cis*- e *trans*-piranlinalolo ossidi prodotti da microrganismi come *Aspergillus niger* (49,50), con una preferenza per la trasformazione del enantiomero (S)-(-)-linalolo rispetto al (R)-(+)-linalolo con *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassicola* (51), e *Diplodia gossypina* (52,53).

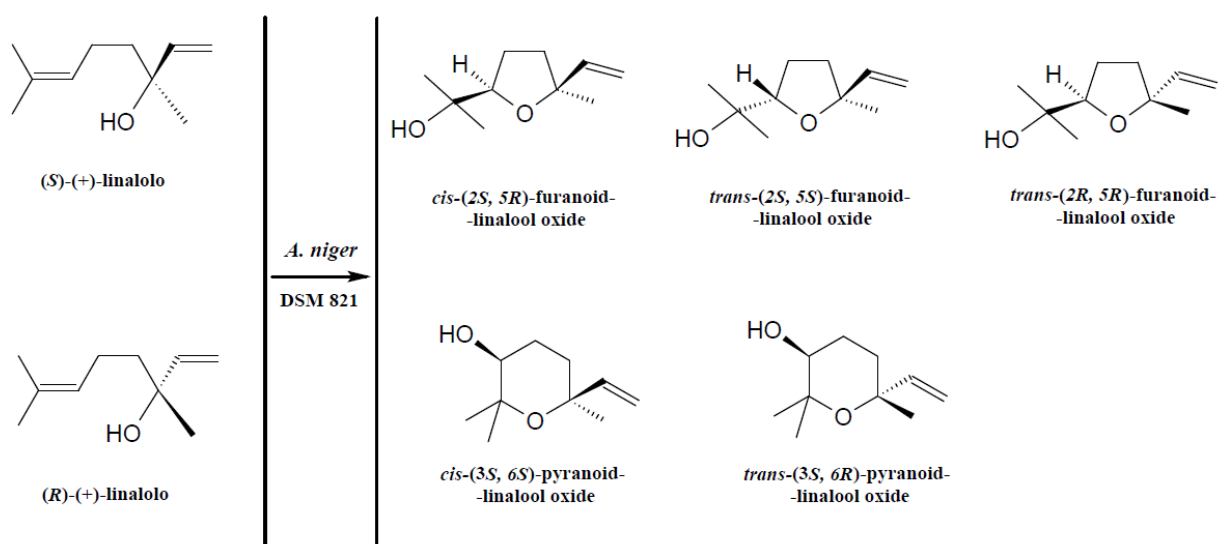
Un altro prodotto della biotrasformazione del linalolo è l' $\alpha$ -terpineolo ottenuto da ceppi isolati dall'ambiente *Debaryomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. e *Pichia* sp. (54).

L'idrossilinalolo è presente insieme agli ossidi di linalolo nelle biotrasformazione sopracitate con *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea*, insieme ad altri composti di interesse nel settore cosmetico come aldeide ed alcol di lillà, che sono state ottenuti in piccole percentuali.



Altre reazioni riportate in letteratura sono l'ossidazione e l'idrossilazione ad acido oleuropeico e acido perillico con *Pseudomonas incognita* (55) e a furanlinalolo ossido, 2-vinil-2-metiltetraidrofurano-5-one, 8-idrossilinalolo, carbossilinalolo, acido oleuropeico e a-terpineolo con *Pseudomonas. Aspergillus niger*, isolato dal suolo di giardino, è riportato idrossilare regiospecificamente il linalolo a 8-idrossilinalolo, geraniolo e a-terpineolo (56,57).

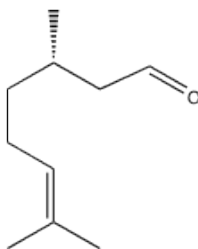
I principali metaboliti, *cis*-(2*S*,5*R*)-furan e *cis*-(3*S*,6*S*)-piranlinalolo ossidi, hanno un aroma dolce, floreale e cremoso, per questo motivo sono molto impiegati in profumeria. Nello **Schema 3** è riportata la bioconversione della miscela naturale di *S*-(+)-linalolo e *R*-(-)-linalolo a furan e piran-linalolo ossidi effettuata da *Aspergillus niger* (50).



**Schema 3**

### ***Biotrasformazioni del citronellale***

Il citronellale è un'aldeide monoterpica rinvenuta nell'olio essenziale di *Melissa officinalis*, di cannella della Cina, e di *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon* spp.



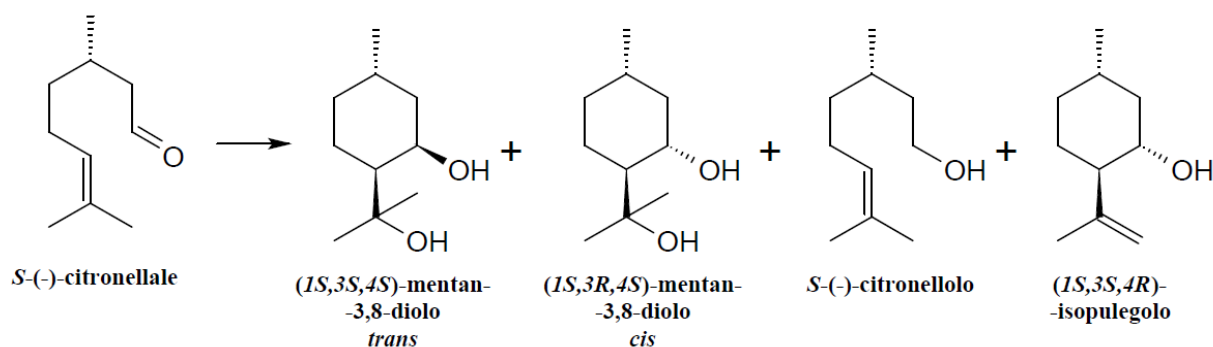
Ha azione antisettica e sedativa. Trova soprattutto impiego nell'industria dei profumi e come repellente per gli insetti (7). Studi sulla biotrasformazione del citronellale sono stati condotti utilizzando microrganismi e cellule vegetali.

Viene riportata la bioconversione dell'isomero ottico (*R*)-citronellale a (*R*)-citronellolo con *Saccharomyces cerevisiae* (58,59) e con *Pseudomonas aeruginosa* (60). (*S*)-citronellolo è prodotto partendo da (*S*)-citronellale con *Candida reukaufii* (61) e con *Rhodotorula minuta* (62). Altri prodotti come l'acido citronellico, il mentolo e 3,7-dimetil-ottane-1,7- diolo sono stati descritti da Joglekar et al. (60).

Il mezzo di reazione è importante per le rese di biotrasformazione ottenute. Leuenberger (63) ha riportato il miglioramento delle rese di biotrasformazione a citronellolo solubilizzando o emulsionando il substrato immiscibile in un solvente specifico, tuttavia si devono tenere in considerazione fattori come la citotossicità dei solventi determinata dal  $\log P$ , per stabilire la natura e la concentrazione con cui questi vengono utilizzati (64). Parametri di solubilità come la dispersione e le interazioni di legami polari e idrogeno influiscono sull'attività enzimatica sia in sistema acquosi che non acquosi (65). Un esempio di solvente è il dimetil solfossido ( $\log P = -1.35$  e solubilità in acqua 3.3 mM) (62).

Studi di bioconversione con cellule vegetali di *Petroselinum crispum* (66), con alcune specie di *Mentha* (67) e con semi di frumento in germinazione (68) hanno portato alla formazione di citronellolo.

Biotrasformazioni con cellule vegetali di *Solanum aviculare* hanno confermato la formazione di citronellolo e hanno riportato l'isopulegolo e i due diastereoisomeri, *cis*-p-mentan-2,8-diolo e *trans*-p-mentan-2,8-diolo, come prodotti di reazione (Schema 4) (69).



**Schema 4**

In natura la miscela racemica degli stereoisomeri di p-mentan-3,8-dioli è presente nelle foglie di *Eucalyptus citriodora* (70), e la loro estrazione avviene mediante distillazione in corrente di vapore e successiva estrazione con solventi organici (71).

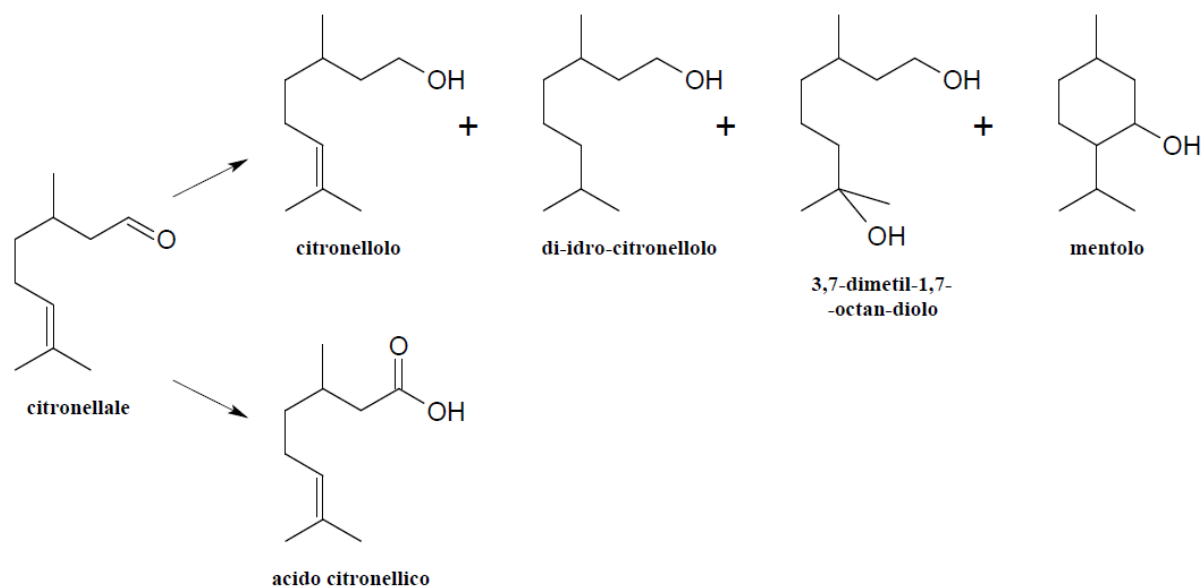
Questi prodotti possono essere ottenuti a partire da (R)-(+)-citronellale per ossidazione con acido solforico (72). La miscela racemica del citronellale porta alla formazione degli enantiomeri (+)- e (-)-*cis*-p-mentan-3,8-dioli, mentre gli enantiomeri (+)- e (-)-*trans*-p-mentan-3,8-dioli si sintetizzano da (+)- e (-)-isopulegolo (71).

I quattro diastereoisomeri del p-mentan-3,8-diolo presenti in *Eucalyptus citriodora* hanno effetto repellente contro le zanzare e tra queste si trovano alcuni vettori della malaria afrotropicale come *Anopheles gambiae*, *A. funestus*, *A. arabiensis* (73-75), e anche contro moscerini, zecche e mosca cavallina (74). Questa attività è attribuita alla presenza del secondo gruppo idrossilico che rende la molecola più polare e meno volatile, prolungando il tempo di azione del repellente (71). È stato dimostrato che in genere l'isomero *cis*- è più attivo che *trans*- (76), tuttavia i quattro isomeri hanno dimostrato avere la stessa capacità repellente contro *Anopheles gambiae* (71).

Un'altra proprietà dimostrata dei p-mentan-3,8-dioli è l'effetto allelopatico evidenziato per l'inibizione della germinazione dei semi di lattuga e di altri semi. Anche in questo caso l'attività biologica degli isomeri *cis*- si è dimostrata più alta rispetto agli isomeri *trans* (70).

Nello **Schema 5** è riportata la bioconversione di citronellale con *Pseudomonas aeruginosa* (60).





**Schema 5**

Si è dimostrata l'attività repellente di un altro prodotto di biotrasformazione del citronellale. L'acido citronellico, componente principale dell'estratto di *Callitris glaucophylla* ha dimostrato di essere attivo contro *Coptotermes formosanus* (77).

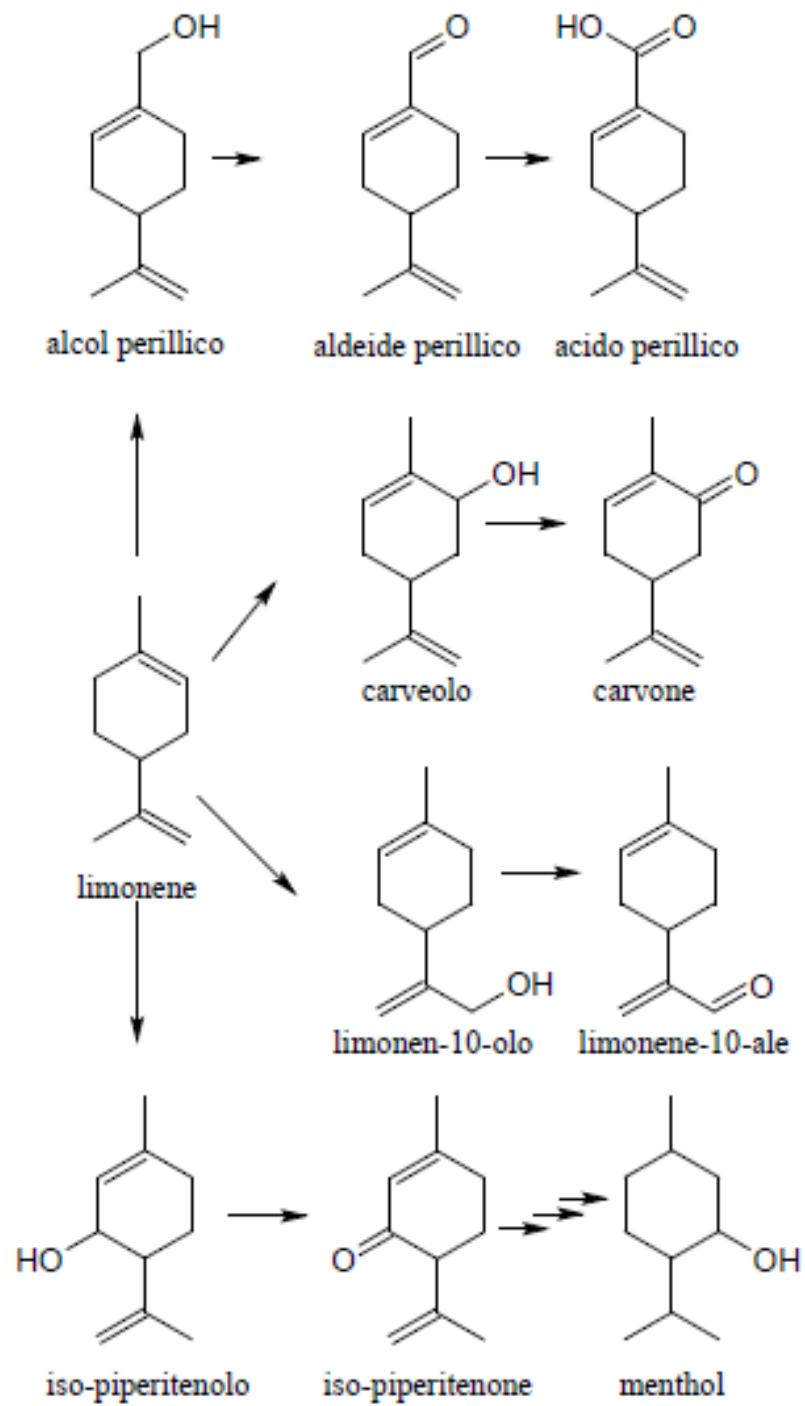
Il citronellolo è un prodotto di interesse industriale principalmente come aroma nell'industria alimentare e dei profumi, e anche uno dei pochi repellenti naturali contro zanzare ed è il componente di candele anti-insetti disponibili in commercio.

Il citronellolo dall'altra parte ha attività anticonvulsivante dovuta a un effetto neuroprotettivo in convulsioni indotte da pentilenetetrazolo, picrotoxin ed elettroshock in topi (78).

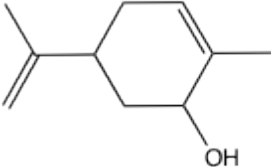
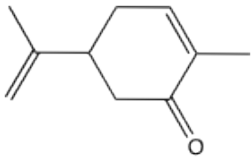
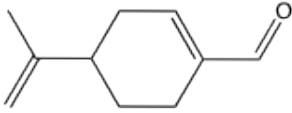
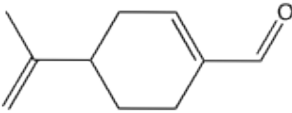
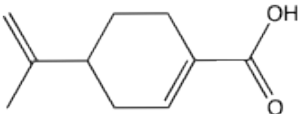
### ***Biotrasformazioni del limonene***

Le biotrasformazioni del limonene sono state molto studiate, in particolare per quanto riguarda l'enantiosellettività e la regiosellettività dei prodotti sintetizzati.

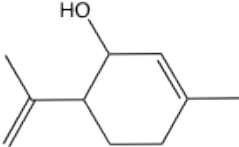
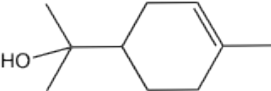
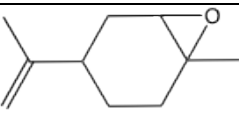
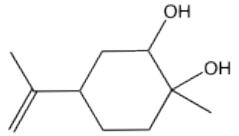
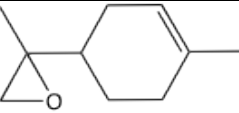
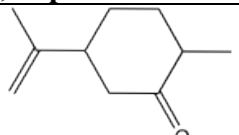
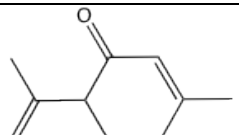
Uno schema riassuntivo dei prodotti che si ottengono dalle biotrasformazioni di limonene è riportato nello **Schema 6** (79). I prodotti di biotrasformazione e le cellule utilizzate (funghi, batteri o piante) sono elencate nella **Tabella 11**.



**Schema 6**

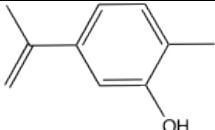
PRODOTTI	SUBSTRATO	MICRORGANISMI (ref.)
 <p><b>Carveolo</b></p>	R-limonene	<i>Pseudomonas</i> sp.(80) <i>Penicillium digitatum</i> (81) <i>Aspergillus cellulosa</i> (82) <i>Pleurotus sapidus</i> (83) <i>Escherichia coli</i> (84) <i>Rhodococcus opacus</i> (85) <i>Rhodococcus erythropolis</i> (85) <i>Penicillium</i> sp. (86) <i>Streptococcus faecalis</i> (87) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (87)
	R/S-limonene	<i>Pseudomonas simplicissimum</i> (88)
 <p><b>carvone</b></p>	R-limonene	<i>Pseudomonas</i> sp. (80) <i>Penicillium digitatum</i> (81) <i>Pleurotus sapidus</i> (83) <i>Escherichia coli</i> (84) <i>Rhodococcus erythropolis</i> (85) <i>Penicillium</i> sp. (86) <i>Streptococcus faecalis</i> (87)
	R-limonene	<i>Aspergillus cellulosa</i> (86) <i>Bacillus stearothermophilus</i> (89) <i>Escherichia coli</i> (90) <i>Escherichia coli</i> (84) <i>Mycobacterium</i> sp. (91) <i>Pseudomona putida</i> (92) <i>Mortierella minutissima</i> (93)
 <p><b>alcol perillico</b></p>	S-limonene	<i>Mycobacterium</i> sp. (91)
	R,S-limonene	<i>Pseudomona putida</i> (88)
 <p><b>aldeide perillica</b></p>	R-limonene	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (89) <i>Escherichia coli</i> (90) <i>Escherichia coli</i> (84)
	R,S-limonene	<i>Mycobacterium</i> sp. (91)
 <p><b>acido perillico</b></p>	R-limonene	<i>Pseudomonas</i> sp.(80) <i>Pseudomonas incognita</i> (94) <i>Psudomonas gladioli</i> (95) <i>Pseudomonas putida</i> (96) <i>Escherichia coli</i> (97) <i>Yarrowia lipolytica</i> (98) <i>Arxula adenivorans</i> (98) <i>Aspergillus niger</i> (99) <i>Fusarium verticilloides</i> (100)
	R,S-limonene	<i>Mycobacterium</i> sp. (91)

**Tabella 11.** Prodotti di biotrasformazione del limonene

 <p><b>iso-pipiritenolo</b></p>	R-limonene	<i>Hormonema sp.</i> (101)
 <p><b>α-terpineolo</b></p>	R-limonene	<i>Cladosporium sp.</i> (102) <i>Penicillium digitatum</i> (103) <i>Armillareira melleae</i> (104) <i>Pseudomonas gladioli</i> (95) <i>Aspergillus cellulosa</i> (82) <i>Bacillus stearothermophilus</i> (89) <i>Escherichia coli</i> (90) <i>Penicillium digitatum</i> (105) <i>Penicillium sp.</i> (86) <i>Penicillium digitatum</i> (106) <i>Streptococcus faecalis</i> (87)
	R,S-limonene	<i>Aspergillus niger</i> (88)
 <p><b>1,2-epossi-limonene</b></p>	R,S-limonene	<i>Diplodia tubericola</i> (107) <i>Corynespora cassicola</i> (107)
	R-limonene	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (108)
 <p><b>limonene-1,2-diolo</b></p>	R-limonene	<i>Pseudomonas sp.</i> (80) <i>Cladosporium sp.</i> (109) <i>Armillareira melleae</i> (104) <i>Aspergillus cellulosa</i> (82) <i>Penicillium sp.</i> (86) <i>Aspergillus sp.</i> (86) <i>Trichosporon</i> (98) <i>Corynespora cassicola</i> (106)
	R,S-limonene	<i>Corynespora cassicola</i> (106) <i>Corynespora cassicola</i> (107) <i>Xanthobacter sp.</i> (108)
 <p><b>8,9-epossi-limonene</b></p>	R,S-limonene	<i>Xanthobacter sp.</i> (108)
 <p><b>diidrocarvone</b></p>	R-limonene	<i>Penicillium sp.</i> (86)
 <p><b>iso-pipiritenone</b></p>	R-limonene	<i>Penicillium sp.</i> (86) <i>Aspergillus sp.</i> (86) <i>Trichosporon</i> (98)

Continua

Tabella 11. Prodotti di biotrasformazione del limonene

 <p><b>Deidrocarveolo</b></p>	R,S-limonene	<i>Aspergillus niger</i> (88)
--	--------------	-------------------------------

Continua

**Tabella 11.** Prodotti di biotrasformazione del limonene

## **MATERIALI E METODI**

### ***ESTRAZIONE di OLI ESSENZIALI***

Gli oli essenziali sono stati ottenuti mediante distillazione in corrente di vapore dalle foglie di quattro specie di piante di agrumi: *Citrus limon*, *Citrus latifolia*, *Citrus aurantium* e *Citrus nobilis*. La materia prima vegetale è stata acquistata da produttori locali di due comunità Shuar, San Luis di Inimkis e Wapù, mentre i processi di estrazione sono stati realizzati presso il Dipartimento di Trasformazione della Fondazione Chankuap' della città di Macas in Ecuador.

Per la distillazione è stato utilizzato un distillatore costruito interamente in acciaio dotato di:

- un serbatoio di 50 L e con capacità di 50 kg di materia prima vegetale, provvisto di una griglia metallica che separa la materia vegetale dall'acqua da cui si genera il vapore direttamente.
- Un refrigerante formato da un doppio tubo collegato alla rete di acqua potabile per il raffreddamento.
- Un recipiente di raccolta del distillato che permette una buona separazione tra le due fasi.

Il serbatoio è riscaldato da un fornello con alimentazione a gas.

La materia prima che viene immessa è stata sottoposta a controlli di qualità su scala macroscopica in modo da verificare la morfologia delle foglie, l'aroma, il colore, l'assenza di corpi estranei o qualsiasi evidenza di contaminazione fisica o microbica. Dopo questa prima fase il materiale viene distillato entro le prime 24 ore dall'arrivo dei prodotti.

Il tempo di distillazione è stato di 6 ore, a 97°C di temperatura che corrisponde al punto di ebollizione dell'acqua sui 1.000 m di altitudine e 680 mmHg di pressione (Macas, Ecuador).

Gli oli risultanti già separati dall'acqua sono stati trattati con sodio solfato anidro e conservati durante la permanenza in Ecuador in contenitori sigillati di vetro di 1 L di capacità, al buio e alla temperatura e umidità relativa dell'ambiente (25°C, U.R. 90%). In Italia gli oli essenziali sono stati conservati a -18°C in contenitori sigillati di vetro di 10 mL, in assenza di luce.

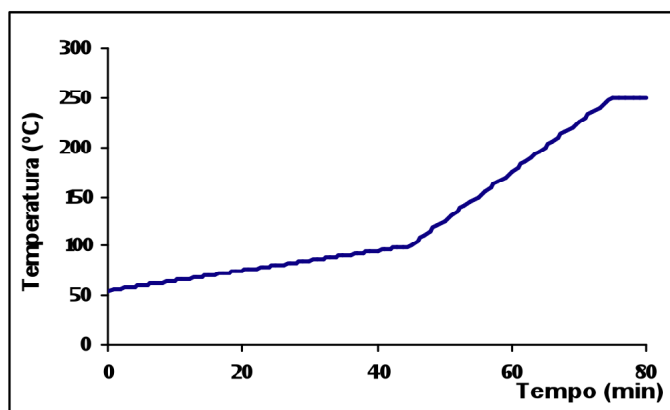
### ***ANALISI degli OLI ESSENZIALI***

La composizione degli oli essenziali è stata determinata con gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS).

L'analisi GC-MS è stata eseguita in Italia presso il Dipartimento di Biologia ed Evoluzione dell'Università di Ferrara nel marzo 2009. È stato utilizzato uno strumento Varian SATURN 4000, dotato di gas cromatografo Varian 3800 con una colonna capillare Varian VF-5 con fase stazionaria di poli-5%fenil-95%dimetil-silossano (30 m X 0.25 mm, 0.15 µm film).

La programmata di temperatura del forno è: 55°C-100°C (1°C/min), 100°C-250°C (5°C/min).

L'iniettore è mantenuto a 300°C. Il flusso di He: 1.0 ml/min. Le condizioni dello spettrometro di massa sono: EI, 70eV, corrente in emissione 10 µAmp, velocità di scansione 1scan/s, intervallo di massa 20-400 Da, temperatura della trappola ionica 150°C, temperatura della transfer line 300°C.



**Grafico 1.** Programmata GC-MS per analisi degli oli essenziali

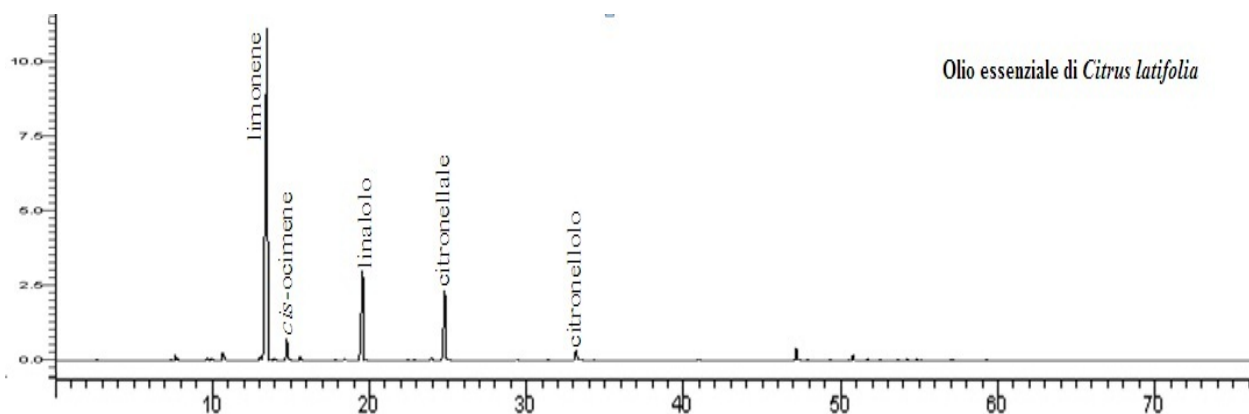
L'identificazione dei singoli composti è stata ottenuta in gas-cromatografia su colonna VF-5MS non chirale accoppiata alla massa per confronto dei rispettivi spettri di massa e indici di Kovats con quelli di letteratura (111, 51). Per calcolare gli Indici di Kovats sperimentali è stata iniettata una miscela commerciale, Retention Index mixture for GC (Sigma), di 24 idrocarburi alifatici.

Alcuni terpeni sono stati impiegati come standard interni.



## COMPOSIZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI ANALIZZATI

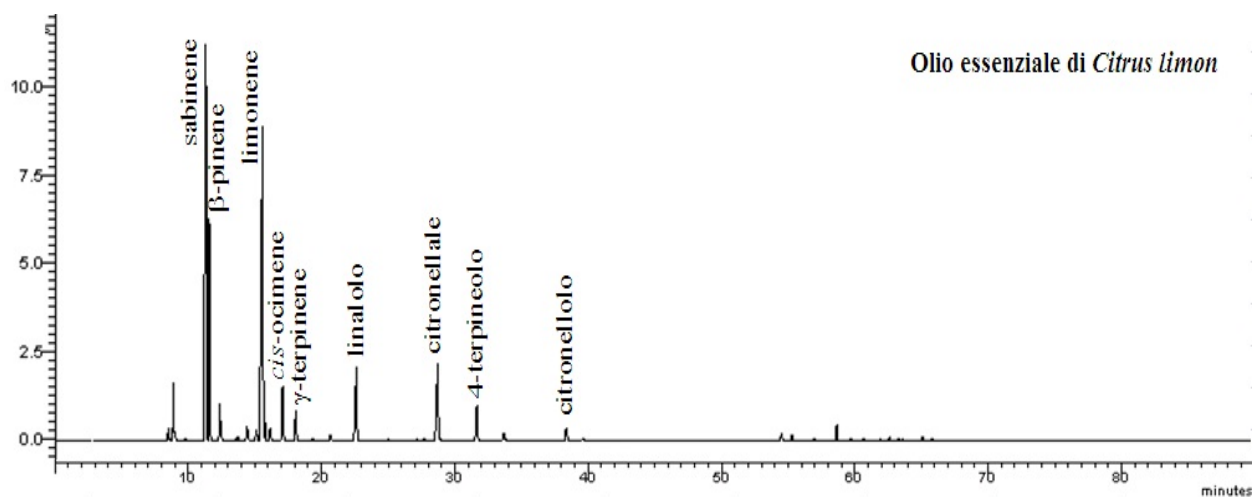
### Olio essenziale di *Citrus latifolia* (limone dolce)



Composti	KI	RT (min)	% Area	Composti	KI	RT (min)	% Area
$\alpha$ -tuiene	930	7.333	0.125	4-terpineolo	1177	27.356	0.041
$\alpha$ -pinene	939	7.67	0.618	$\alpha$ -terpineolo	1189	29.099	0.056
sabinene	975	9.715	0.277	citronellolo	1226	33.148	1.72
$\beta$ -pinene	979	9.961	0.23	nerale	1242	34.291	0.067
$\beta$ -mircene	991	10.682	1.073	timolo	1290	40.876	0.033
isosilvestrene	1009	11.829	0.033	citronellil acetato	1353	47.126	1.514
p-cimene	1025	13.037	0.631	neril acetato	1362	47.82	0.053
limonene	1029	13.406	<b>62.812</b>	$\beta$ -elemene	1391	49.257	0.036
$\Delta^3$ -carene	1031	13.943	0.145	metil N-metil antranilato	1406	50.456	0.042
cis-ocimene	1037	14.761	2.913	$\beta$ -cariofillene	1419	50.725	0.514
$\gamma$ -terpinene	1060	15.618	0.459	trans- $\alpha$ -bergamotene	1435	51.624	0.104
cis-sabinene idrato	1070	16.695	0.038	$\alpha$ -cariofillene	1455	52.445	0.05
terpinolene	1089	17.854	0.074	germacrene D	1485	53.559	0.069
p-cimenene	1091	18.407	0.206	Biciclogermacrene	1500	54.137	0.091
linalolo	1097	19.575	<b>14.057</b>	$\beta$ -bisabolene	1506	54.726	0.122
cis-limonene ossido	1137	22.423	0.095	(-)-spatuleno	1578	56.92	0.041
trans-limonene ossido	1142	23.156	0.073	cariofillene ossido	1583	57.05	0.033
isopulegolo	1150	23.91	0.419				
citronellale	1153	24.774	<b>10.887</b>	<b>TOT ID</b>			<b>99.751</b>

**Tabella 1:** Analisi GC-MS dell'olio essenziale di *Citrus latifolia*

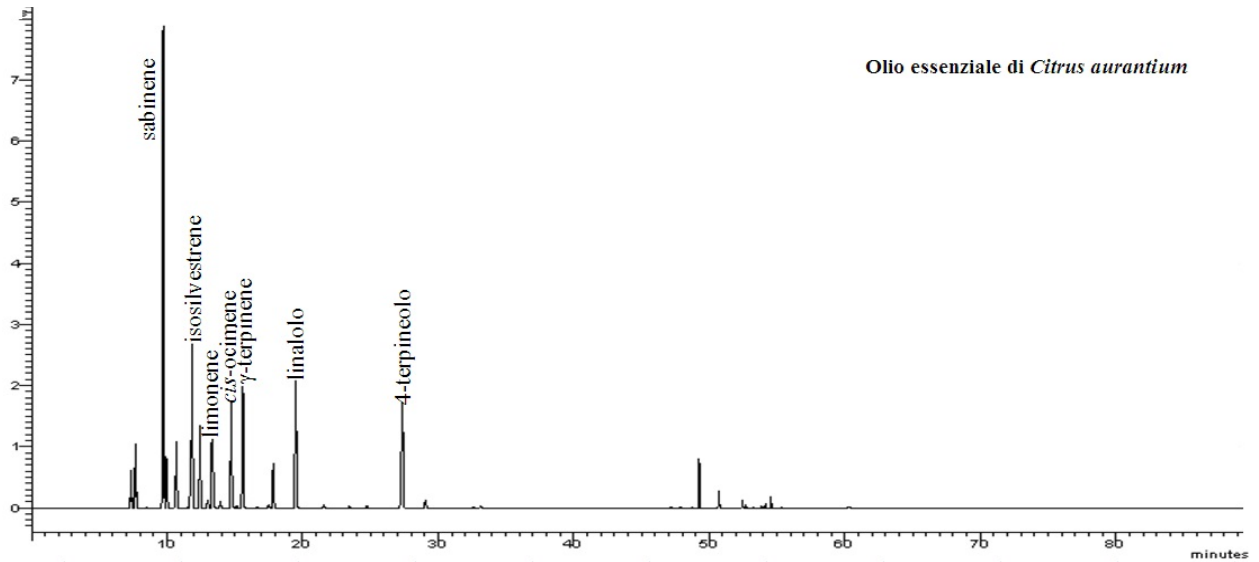
*Olio essenziale di Citrus limon (limone)*



Composti	KI	RT (min)	% Area	Composti	KI	RT (min)	% Area
$\alpha$ -tuiene	930	7.333	0.579	cis-piperitolo	1196	30.74	0.109
$\alpha$ -pinene	939	7.67	2.717	nerolo	1230	32.649	0.068
canfene	954	8.475	0.082	citronellolo	1226	33.148	1.159
sabinene	975	9.715	<b>27.844</b>	nerale	1242	34.291	0.198
$\beta$ -pinene	979	9.961	<b>11.153</b>	geraniale	1267	37.907	0.09
$\beta$ -mircene	991	10.682	2.04	citronellil formiato	1274	38.478	0.02
$\Delta^2$ -carene	1002	11.567	0.029	$\delta$ -elemene	1341	44.804	0.077
$\alpha$ -fellandrene	1003	11.73	0.088	citronellil acetato	1353	47.126	0.471
isosilvestrene	1009	11.829	0.222	neril acetato	1362	47.82	0.369
$\alpha$ -terpinene	1017	12.448	0.886	$\beta$ -elemene	1391	49.257	0.145
p-cimene	1025	13.037	0.779	$\beta$ -cariofillene	1419	50.725	0.736
limonene	1029	13.406	<b>26.155</b>	trans- $\alpha$ -bergamotene	1435	51.624	0.062
eucaliptolo	1031	13.627	0.894	$\alpha$ -cariofillene	1455	52.445	0.113
$\Delta^3$ -carene	1031	13.943	0.793	germacrene D	1485	53.559	0.116
cis-ocimene	1037	14.761	3.283	biciclogermacrene	1500	54.137	0.184
$\gamma$ -terpinene	1060	15.618	1.868	$\beta$ -guaiene	1503	54.338	0.023
cis-sabinene idrato	1070	16.695	0.158	germacrene A	1509	54.559	0.057
terpinolene	1089	17.854	0.423	$\beta$ -bisabolene	1506	54.726	0.129
linalolo	1097	19.575	<b>5.381</b>	$\delta$ -cadinene	1523	55.038	0.061
cis-p-ment-2-en-1-olo	1122	21.606	0.105	$\beta$ -sesquifellandrene	1523	55.26	0.02
cis-limonene ossido	1137	22.423	0.022	$\beta$ -vetivenene	1533	55.725	0.026
trans-limonene ossido	1142	23.156	0.089	germacrene B	1561	56.302	0.138
trans-p-ment-2-en-1-olo	1141	23.715	0.196	(-)-spatulenolo	1578	56.92	0.077
citronellale	1153	24.774	<b>6.208</b>	cariofillene ossido	1583	57.05	0.042
4-terpineolo	1177	27.356	2.645	$\beta$ -atlantolo	1608	58.476	0.041
$\alpha$ -terpineol	1189	29.099	0.669	<b>TOT ID</b>			<b>99.839</b>

**Tabella 2:** Analisi GC-MS dell'olio essenziale di *Citrus limon*

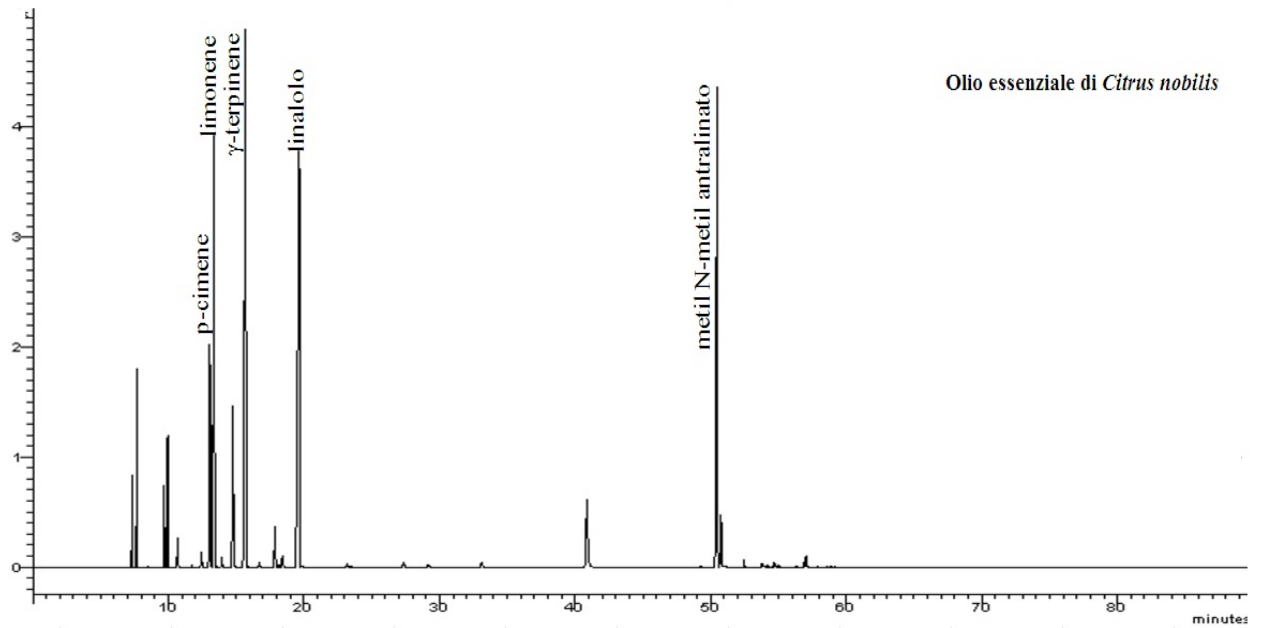
**Olio essenziale di *Citrus aurantium* (arancia)**



Composti	KI	RT (min)	% Area	Composti	KI	RT (min)	% Area
$\alpha$ -tuiene	930	7.333	1.742	trans-p-ment-2-en-1-olo	1141	23.715	0.156
$\alpha$ -pinene	939	7.67	2.953	citronellale	1153	24.774	0.251
camfene	954	8.475	0.05	4-terpineol	1177	27.356	<b>8.335</b>
sabinene	975	9.715	<b>27.342</b>	$\alpha$ -terpineol	1189	29.099	0.665
$\beta$ -pinene	979	9.961	2.503	cis-piperitolo	1196	30.74	0.074
$\beta$ -mircene	991	10.682	3.607	nerolo	1230	32.649	0.174
$\Delta^2$ -carene	1002	11.567	0.04	citronello	1226	33.148	0.284
$\alpha$ -phellandrene	1003	11.73	0.809	nerale	1242	34.291	0.063
isosilvestrene	1009	11.829	<b>9.191</b>	citronellil acetato	1353	47.126	0.116
$\alpha$ -terpinene	1017	12.448	4.639	neril acetato	1362	47.82	0.123
p-cimene	1025	13.037	0.609	$\beta$ -elemene	1391	49.257	2.271
limonene	1029	13.406	<b>5.767</b>	metil N-metil antralinato	1406	50.456	0.037
$\Delta^3$ -carene	1031	13.943	0.446	$\beta$ -cariofillene	1419	50.725	0.741
cis-ocimene	1037	14.761	<b>6.257</b>	$\alpha$ -cariofillene	1455	52.461	0.313
trans-ocimene	1050	15.167	0.122	$\beta$ -farnesene	1457	52.61	0.033
$\gamma$ -terpinene	1060	15.618	<b>7.062</b>	sesquisabinene	1460	52.701	0.156
cis-sabinene idrato	1070	16.695	0.104	germacrene D	1485	53.559	0.037
iso-terpinolene		17.505	0.25	$\beta$ -selinene	1490	53.86	0.126
terpinolene	1089	17.854	2.803	$\alpha$ -selinene	1498	54.143	0.194
linalolo	1097	19.575	<b>8.38</b>	germacrene A	1509	54.559	0.464
cis-p-ment-2-en-1-olo	1122	21.606	0.229	$\beta$ -sesquifellandrene	1523	55.26	0.037
				<b>TOT ID</b>			<b>99.639</b>

**Tabella 3:** Analisi GC-MS dell'olio essenziale di *Citrus aurantium*

*Olio essenziale di Citrus nobilis (mandarino)*



Composti	KI	RT (min)	% Area	Composti	KI	RT (min)	% Area
$\alpha$ -tuiene	930	7.333	1.82	linalolo	1097	19.575	<b>20.402</b>
$\alpha$ -pinene	939	7.67	3.88	p-1,3,8-mentatriene	1110	23.192	0.139
sabinene	975	9.715	1.799	4-terpineolo	1177	27.356	0.254
$\beta$ -pinene	979	9.961	2.928	$\alpha$ -terpineolo	1189	29.099	0.189
$\beta$ -mircene	991	10.682	0.734	timolo metiletere	1235	33.121	0.247
$\alpha$ -fellandrene	1003	11.73	0.064	timolo	1290	40.876	3.389
$\alpha$ -terpinene	1017	12.448	0.398	$\beta$ -elemene	1391	49.257	0.046
p-cimene	1025	13.037	<b>6.269</b>	metil N-metil antralinato	1406	50.456	<b>16.502</b>
limonene	1029	13.406	<b>12.326</b>	$\beta$ -cariofillene	1419	50.725	1.287
$\Delta^3$ -carene	1031	13.943	0.305	$\alpha$ -cariofillene	1455	52.461	0.157
cis-ocimene	1037	14.761	4.682	etil N-metil antranilato		53.757	0.156
$\gamma$ -terpinene	1060	15.618	<b>19.398</b>	biciclogermacrene	1500	54.137	0.054
cis-sabinene idrato	1070	16.695	0.158	$\alpha$ -farnesene	1506	54.692	0.106
terpinolene	1089	17.854	1.262	$\delta$ -cadinene	1523	55.038	0.04
cis-linalolo ossido	1087	18.136	0.092	(-)-spatuleno	1578	56.92	0.209
p-cimenene	1091	18.407	0.39	cariofillene ossido	1583	57.05	0.245
				<b>TOT ID</b>			<b>99.927</b>

**Tabella 4:** Analisi GC-MS dell'olio essenziale di *Citrus nobilis*

## **CAMPIONAMENTO MICRORGANISMI**

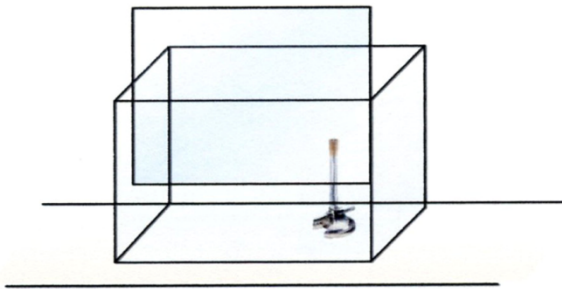
Il campionamento di funghi e batteri è stato fatto dall'epicarpo dei frutti di *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium* e *Citrus paradisi*, raccolti dal 3 al 7 novembre del 2008 nelle comunità Achuar di Pumpuenta, Wasakentsa e Sewastian, ubicate nella zona Transcutucú della provincia di Morona Santiago in Ecuador.

I frutti sono stati raccolti direttamente dalla pianta utilizzando guanti sterili e conservati in garza e borse di plastica sterili fino alla loro analisi. Durante i primi quattro giorni i frutti sono stati conservati a temperatura ambiente a causa dell'assenza di elettricità nelle comunità, dopo di che sono stati messi in frigorifero a 4°C.

L'isolamento dei microrganismi è stato realizzato entro i primi 7 giorni dalla raccolta presso il Laboratorio del CIVABI (Centro de Investigación y Valorización de la Biodiversidad) dell'Università Politecnica Salesiana – Sevilla Don Bosco (provincia Morona Santiago). Il laboratorio in cui questo lavoro è stato svolto è provvisto di autoclave di 25 L di capacità, non è attrezzato con cappa a flusso laminare e al posto di questa è stata utilizzata una cabina di vetro e un becco bunsen per mantenere le condizioni di sterilità durante le prove.



**Figura 1:** Autoclave a operazione manuale 25L



**Figura 2:** Cabina di vetro per lavoro in sterilità

Tutti i frutti sono stati tagliati a metà in modo da isolare dallo stesso frutto sia funghi sia batteri. Un'area di 4 cm<sup>2</sup> è stata tagliata per separare il flavedo dall'albedo e realizzare il campionamento sia dalla parte esterna che interna dell'epicarpo.

Il prelievo é stato effettuato strisciando le parti interessate con un cotone sterile imbevuto in terreni di coltura di arricchimento non selettivi per batteri (Pepton Water) e per funghi (PDB) e immerso nei rispettivi terreni per il periodo di incubazione.

Pepton Water: 15 g di Bacteriological Pepton OXOID in 1 L di acqua distillata.

Potato Dextrose Broth (PDB): 27 g di Potato Dextrose Broth Liofichem sciolti in 1 L di acqua distillata.

I batteri sono stati incubati per 24 h a 35° C, e i funghi per 48 h a 30° C.

## ***ISOLAMENTO DEI FUNGHI***

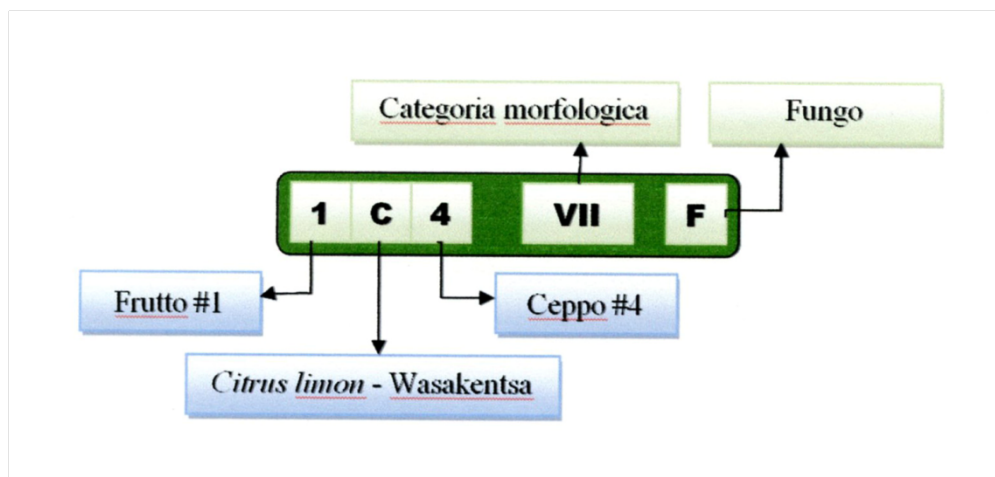
### ***Preparazione del terreno di coltura***

Il terreno di coltura, usato per la crescita dei microrganismi in questione, è costituito da 1 L di acqua distillata al quale vengono aggiunti 39 g di Potato Dextrose Agar dell'Oxoid.






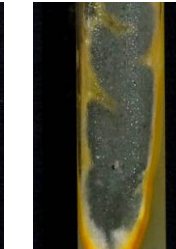

















### ***Procedura di isolamento***

Dopo la coltura di arricchimento, ogni campione è stato strisciato su piastre petri con PDA e lasciato in incubazione per cinque giorni a 30°C ottenendo piastre con colture miste. Le colonie visibilmente isolate sono state prelevate con un'ansa metallica sterile e trasferite su petri fresche facendo tre incisioni sull'agar equidistanti fra di loro. Questa procedura si è ripetuta le volte necessarie per ottenere piastre con ceppi puri.

In base alle caratteristiche morfologiche quali forma, colore e dimensione delle colonie sviluppate sul terreno PDA, si sono etichettati diversi ceppi di funghi, siglati secondo il numero del frutto e della pianta da cui provengono. Dal momento che le caratteristiche morfologiche dei ceppi isolati da diverse piante erano simili, questi ceppi sono stati raggruppati in categorie identificate da numeri romani accompagnati della lettera F (per funghi).



Sono stati isolati 55 ceppi di funghi, raggruppati in 23 categorie (**Tabella 5**).

					
Categoria IF	Categoria IIF	Categoria IIIF	Categoria IVF	Categoria VF	Categoria VIF
2D7	2B4, 2D1, 1F1	1A6, 2A14, 2A16, 2A17	1A5, 1A13, 2A1, 2A5, 2A13, 2A18, 1B20	1B6, 1B17, 1B23	1B18
					
Categoria VIIF	Categoria VIIIF	Categoria IXF	Categoria XF	Categoria XIIF	Categoria XIIIF
1C4, 1C18	1D6	2D4	1B13	1C22	2D27, 2D6, 2D10
					
Categoria XIIIIF	Categoria XIVF	Categoria XVF	Categoria XVIIF	Categoria XVIIIF	Categoria XVIIIIF
1B5	2A2, 1C3	1D4	1B14, 1B25	1B7, 1C21	1B24, 2D3, 2D15
					
Categoria XIXF	Categoria XXF	Categoria XXIF	Categoria XXIIIF	Categoria XXIIIIF	
1C19, 1C20	2D17, 1F2	1C5, 1C8, 2D2, 2D5, 1F5	1F9	1D1, 1D2, 1D3, 1D5, 1D7, 1F6	

**Tabella 5:** Funghi isolati dall'epicarpo di agrumi raggruppati in categorie morfologiche

A, *Citrus aurantifolia* (Pumpuentsa); B, *Citrus aurantifolia* (Wasakentsa); C, *Citrus limon* (Wasakentsa); D, *Citrus paradisiaca* (Wasakentsa); F, *Citrus aurantium* (Sewastian).



**Citrus limon:** si è prelevato un frutto nella comunità di Wasakentsa, corrispondente alla sigla **1C**, e sono stati isolati 6 ceppi di funghi siglati: 1C4 VIIF, 1C22 XIF, 1C3 XIVF, 1C21 XVIIIF, 1C19 XIXF, 1C5 XXIF.

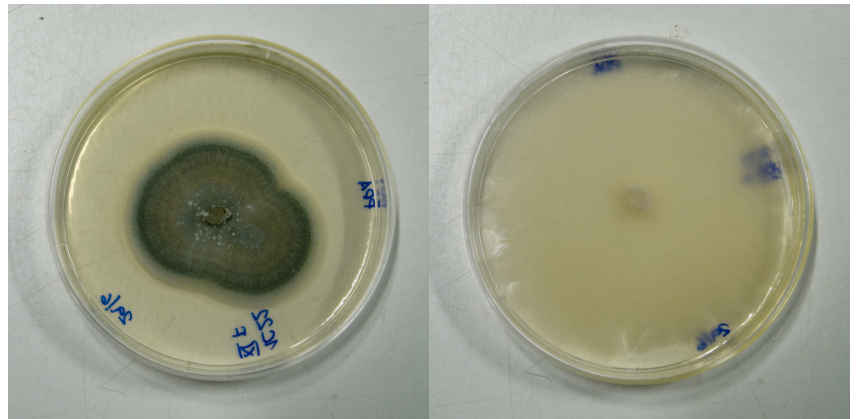


Figura 1: 1C22 XIF

1C5 VIIIIF

**Citrus aurantifolia:** si sono raccolti cinque frutti di due comunità diverse; **1A**, **2A** e **3A** prelevati a Pumpuentsa, **1B** e **2B** a Wasakentsa. Da questi sono stati isolati 9 ceppi di funghi: 2A17 IIIIF, 2B4 IIF, 1B20 IVF, 1B23 VF, 1B18 VIF, 1B13 XF, 1B5 XIIIIF, 1B14 XVIIF, 1B24 XVIIIIF.

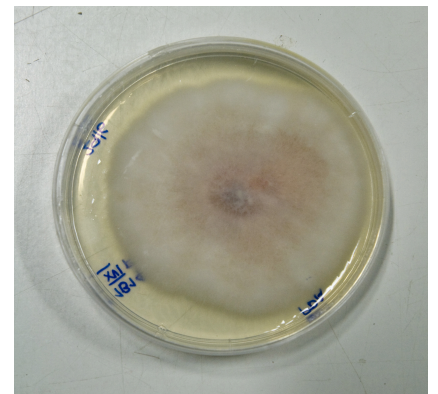


Figura 2: 1B24 XVIIIIF

**Citrus aurantium:** nella comunità di Sewastian si è raccolto un frutto nominato **1F**, da cui sono stati isolati 4 funghi: 1F1 IIF, 1F2 XXF, 1F5 XXIF, 1F9 XXIIF.

**Citrus paradisiaca:** da due frutti della comunità di Wasakentsa siglati **1D** e **2D**, si sono isolati 10 ceppi di funghi nominati 2D7 IF, 2D1 IIF, 1D6 VIIIIF, 2D4 IXF, 2D10 XIIF, 1D4 XVF, 2D15 XVIIIIF, 2D2 XXIF, 1D2 XXIIF.

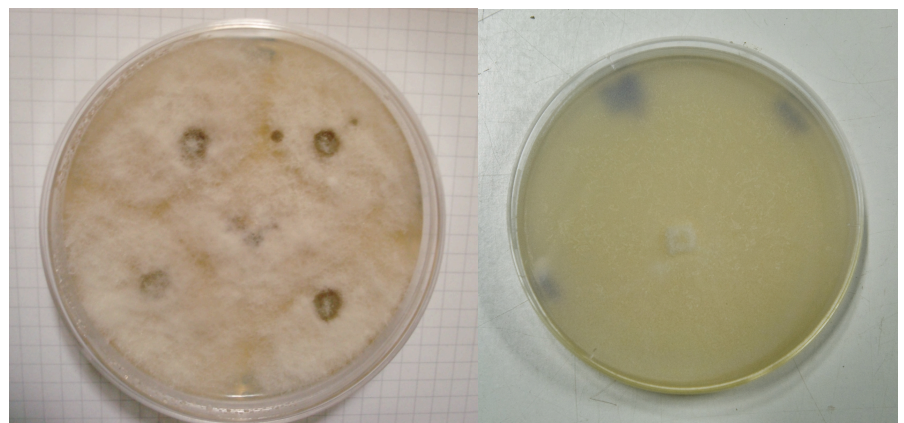


Figura 3: 1F2 XXF

1D2 XXIIF

## ***ISOLAMENTO DEI BATTERI***

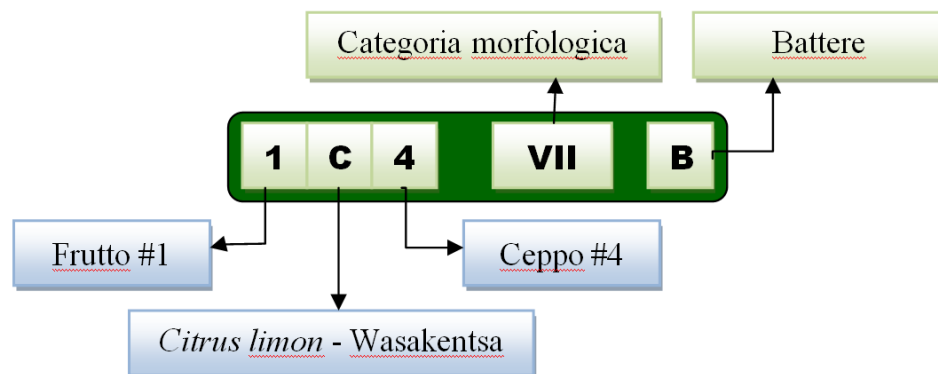
### ***Preparazione del terreno di coltura***

Il terreno di coltura usato per la crescita dei batteri è costituito da 1 L di acqua distillata al quale vengono aggiunti 23 g di Nutrient Agar (Oxoid).



### ***Procedura di isolamento***

Dopo la coltura di arricchimento, ogni campione è stato strisciato su piastre petri con Nutrient Agar e lasciato in incubazione per 48 ore a 35°C ottenendo piastre con colture miste. Le colonie visibilmente isolate sono state prelevate con un'ansa metallica sterile e trasferite su petri fresche facendo tre incisioni sull'agar equidistanti fra di loro. Questa procedura si è ripetuta le volte necessarie per ottenere piastre con ceppi puri.

In base alle caratteristiche morfologiche quali forma, colore e dimensione delle colonie sviluppate sul terreno Nutrient Agar, si sono etichettati diversi ceppi di funghi, siglati secondo il numero del frutto e della pianta da cui provengono. Dal momento che le caratteristiche morfologiche dei ceppi isolati da diverse piante erano simili, questi ceppi sono stati raggruppati in categorie identificate da numeri romani accompagnati della lettera B (per Batteri).



Sono stati isolati 61 ceppi di batteri raggruppati in 23 categorie (**Tabella 6**).

					
Categoria IB	Categoria IIB	Categoria IIIB	Categoria IVB	Categoria VB	Categoria VIB
3A3	1B22, 1C11	1B8, 1C13	1A1, 1F10	2A19, 1D8, 2D16	3A5, 1C15, 2D8
					
Categoria VIIIB	Categoria VIIIB	Categoria IXB	Categoria XB	Categoria XIB	Categoria XIIB
1B9	1C1, 2D9, 2D11	1B12	1B10, 1C10, 2D14	2B1, 2B2, 2B3, 2B5, 2B6, 2B7	2A4, 2A7, 3A1, 1B1
					
Categoria XIIIIB	Categoria XIVB	Categoria XVIB	Categoria XVIIB	Categoria XVIIIB	Categoria XVIIIIB
2A3, 1C2, 1C7, 1C9	1A3, 2A9	1F11, 1F12, 1F13, 1F14	1B19	1A14, 1B11, 1B21	1A12, 2A11, 2A12, 2D13
					
Categoria XIXB	Categoria XXB	Categoria XXIB	Categoria XXIIB	Categoria XXIIIB	
1C12	1A4, 1F4, 1F7, 1F8	1B2, 1B3, 1B16	1F3, 1F12'	2A15, 1C17	

**Tabella 6:** Batteri isolati dall'epicarpo di agrumi raggruppati in categorie morfologiche

A, *Citrus aurantifolia* (Pumpuentsa); B, *Citrus aurantifolia* (Wasakentsa); C, *Citrus limon* (Wasakentsa); D, *Citrus paradisiaca* (Wasakentsa); F, *Citrus aurantium* (Sewastian).

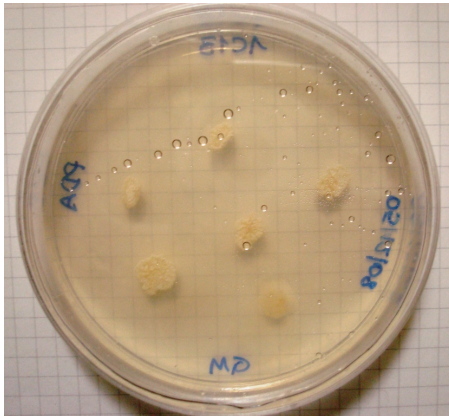
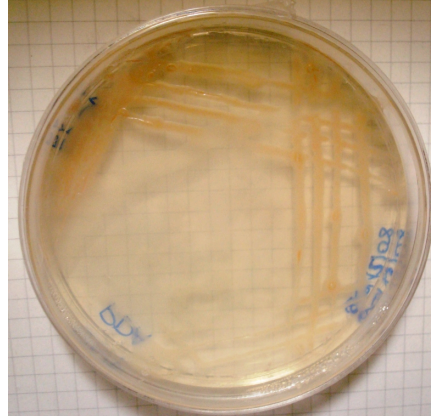


Figura 4: 1C13 IIIIB



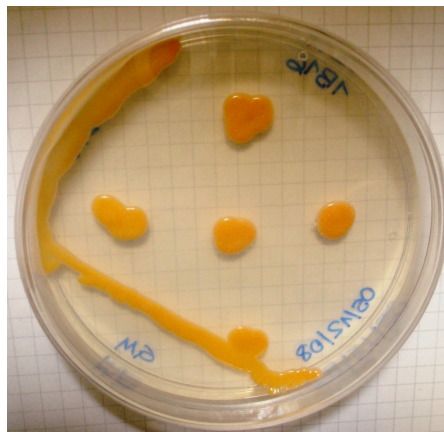
1C17 XXIIIIB

***Citrus limon***: sono stati isolati 8 ceppi di batteri siglati: 1C11 IIB, 1C13 IIIIB, 1C15 VIB, 1C1 VIIIIB, 1C10 XB, 1C2 XIIIIB, 1C12 XIXB, 1C17 XXIIIIB.

***Citrus aurantifolia***: sono stati isolati 17 ceppi di batteri: 3A3 IB, 1B22 IIB, 1B8 IIIIB, 1B9 VIIIB,



Figura 5: 1A4 XXB



1B16 XXIB

1B12 IXB, 1B10 XB, 2B6 XIB, 2A7 XIIB, 1B1 XIIIB, 2A3 XIIIIB, 2A9 XIVB, 1B19 XVIB, 1A14 XVIIIB, 1B11 XVIIIB, 1A12 XVIIIIB, 1A4 XXB, 1B16 XXIB.



Figura 6. 1 F12' XXIIB

***Citrus aurantium***: 5 ceppi di batteri: 1F10 IVB, 1F12 XVB, 1F14 XVB, 1F4 XXB, 1F12' XXIIB.

***Citrus paradisiaca***: 5 ceppi di batteri: 2D16 VB, 2D8 VIB, 2D9 VIIIIB, 2D14 XB, 2D13 XVIIIIB.

### ***CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI MICRORGANISMI***

I funghi e batteri isolati sono stati trasportati in Italia utilizzando come tecnica di conservazione la sospensione in acqua distillata.

Mediante l'utilizzo di un bisturi vengono prelevati sterilmente 2 campioni quadrati di agar contenenti micelio e/o corpi fruttiferi del fungo (1cm x 1cm), riposti poi all'interno di provette di vetro con tappo a vite contenenti 2 mL di acqua distillata sterile. I campioni ottenuti vengono conservati a temperatura ambiente. Per ogni ceppo sono stati preparati due flaconi: uno conservato in Ecuador e l'altro portato in Italia.

Entro le prime due settimane dopo l'arrivo in Italia i microrganismi sono stati trasferiti in slant, due per ogni ceppo. Gli slant sono stati conservati a 4 °C durante la fase di screening di biotrasformazione di terpeni. I microrganismi che avevano mostrato attività nelle biotrasformazioni sono stati trasferiti in criovials partendo dalle sospensioni in acqua distillata e mantenuti in azoto liquido a -195°C.

## **BIOTRASFORMAZIONI DI TERPENI**

Questa fase è stata eseguita presso il Dipartimento di Biologia ed Evoluzione dell'Università di Ferrara.

Gli standard di terpeni (+/-)-linalolo (95%, PM 154.25) e (+)-*R*-limonene (96%, PM 136.23) sono stati acquistati da Fluka, il (-)-*S*-citronellale (96%, PM 154.25) da Sigma Aldrich e sabinene (PM 136.23) da Extrasynthese.

Altri terpeni sono stati impiegati come standard interni e di confronto per dare conferma dei prodotti di biotrasformazione. Tra questi borneolo,  $\alpha$ -terpineolo, la miscela di cis- e trans-furanlinalolo ossido, p-cimene e 4-terpineolo sono prodotti Aldrich mentre il carvolo è stato ottenuto per riduzione del carvone (Fluka) con NaBH<sub>4</sub>.

Il solvente utilizzato per estrarre le miscele di biotrasformazione è l'etere etilico (Fluka). Per anidrificare l'etere di estrazione viene utilizzato sodio solfato anidro (Fluka).

Per la crescita dei microrganismi sono stati utilizzati due terreni di coltura; Sabouraud acquistato dalla Sigma Aldrich per i funghi e Plate Count Broth (PCB) per i batteri.

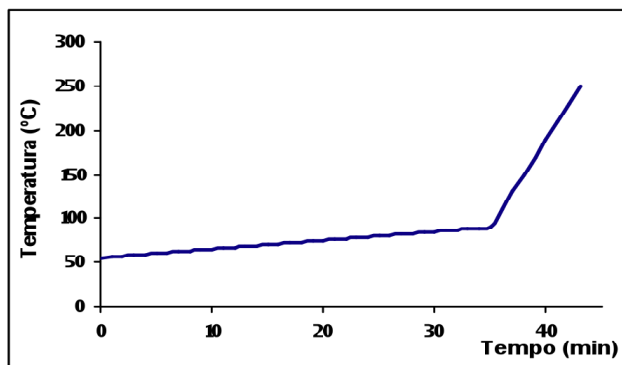
Il terreno Sabouraud è stato preparato sciogliendo 30 g di terreno liofilizzato in 1 L di acqua distillata.

Il terreno per i batteri PCB è stato preparato con 2.5 g di Yeast Extract (Sigma Aldrich), 5.0 g di Tryptone per Batteriologia e 1.0 g di D-(+)-glucosio (Sigma Aldrich) in 1L di acqua distillata.

Tutti i terreni sono stati sterilizzati a 120°C per 20 minuti.

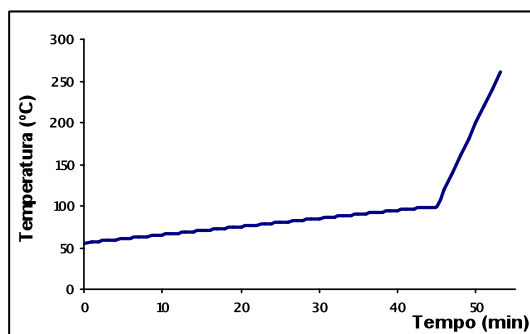
Tutte le biotrasformazioni sono state seguite per via gascromatografica (GC-FID) o con gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS) per la determinazione strutturale.

L'analisi GC-FID è stata eseguita con uno strumento GC-TRACE, con una colonna capillare Varian VF-5 con fase stazionaria di poli-5%fenil-95%dimetil-silossano (30 m X 0.25 mm, 0.15  $\mu$ m film). Per le biotrasformazioni del linalolo, sabinene e limonene sono state usate le seguenti condizioni: temperatura 55-90°C (1°C/min) e 90-250°C (20°C/min); temp. iniettore 280°C.; He 1 mL/min. Con il citronellale le condizioni usate sono: 55°C-90°C (1°C/min), 90°C-300°C (20°C/min), 300°C (3 min), temp. iniettore 280°C; He 1 mL/min.



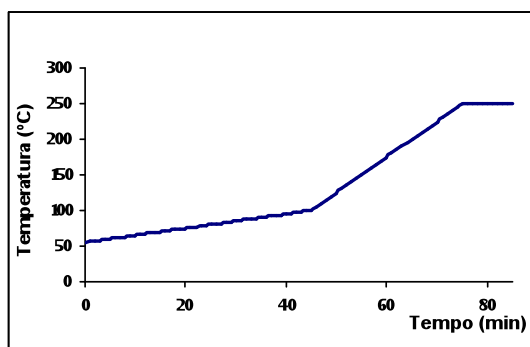
**Grafico 2.** Programmata GC-FID per lo screening dei terpeni

L'analisi GC-MS è stata eseguita utilizzando uno strumento Varian SATURN 4000, dotato di gas cromatografo Varian 3800 con una colonna capillare Varian VF-5 con fase stazionaria di poli-5%fenil-95%dimetil-silossano (30 m X 0.25 mm, 0.15  $\mu$ m film). L'iniettore è mantenuto a 300°C. Per le biotrasformazioni del linalolo e del sabinene si utilizzano le seguenti condizioni: temp. 55-100°C (1°C/min) e 100-250°C (20°/min).



**Grafico 3.** Programmata GC-MS per lo screening di biotrasformazione del linalolo

Per le biotrasformazioni del citronellale si utilizzano le seguenti condizioni: temp. 55-100°C (1°C/min) e 100-250°C (5°C/min).



**Grafico 4.** Programmata GC-MS per i prodotti di biotrasformazione del citronellale

Le condizioni dello spettrometro di massa sono: EI, 70eV, corrente in emissione 10  $\mu$ Amp, velocità di scansione 1 scan/s, intervallo di massa 20-400 Da, temperatura della trappola ionica 150°C, temperatura della transfer line 300°C.



**SCREENING DELLA BIOTRASFORMAZIONE DI LINALOLO E CITRONELLALE CON  
FUNGHI. Procedura generale**

Sono stati testati 28 ceppi di funghi sui 55 purificati e sono stati scelti sulla base dei seguenti criteri: un ceppo per ogni categoria morfologica e più ceppi della stessa categoria se provenienti da zone diverse (2D7IF, 2B4IIF, 2D1IIF, 1F1IIF, 2A17IIIF, 1B20IVF, 1B23VF, 1B18VIF, 1C4VIIF, 1D6VIIF, 2D4IVF, 1B13XF, 1C22XIF, 2D10XIIF, 1B5XIIIF, 1C3XIVF, 1D4XVF, 1B14XVIF, 1C21XVIIIIF, 1B24XVIIIIF, 2D15XVIIIIF, 1C19XIXF, 2D17XXF, 1F2XXF, 1C5XXIF, 2D2XXIF, 1F9XXIIF, 1D2XXIIIF).

Le colture vengono preparate ponendo 20 mL di Sabouraud in beute da 50 mL ed inoculando il microrganismo partendo da slant. Dopo 5 giorni sotto agitazione a 80 rpm alla temperatura di 28 a 30°C si aggiunge il substrato in concentrazione di 1 g/L [200 µL di una soluzione preparata sciogliendo 0.1 g di citronellale o di linalolo in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO)].

Le colture sono state lasciate in incubazione per altri 5 giorni prelevando campioni ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

Al quinto giorno è stata fatta l'estrazione totale della miscela di reazione con 5 mL di etere etilico anidrificando con sodio solfato anidro.

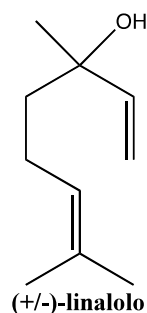
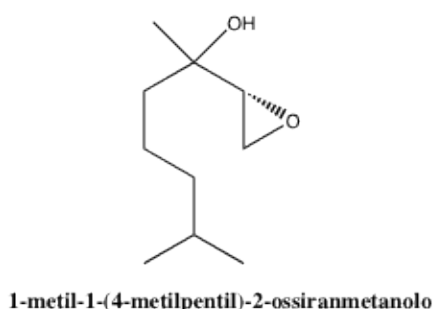
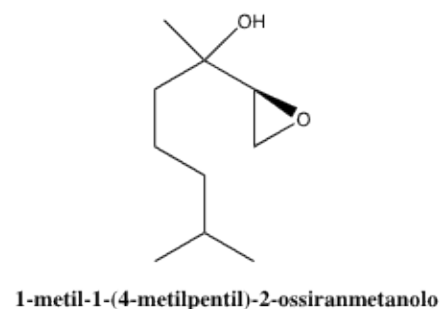
La miscela di reazione è stata analizzata mediante analisi gascromatografica e i prodotti sono stati riconosciuti attraverso l'analisi GC-MS.

I dati di biotrasformazione del linalolo sono i seguenti:

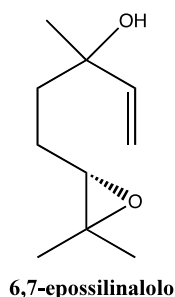
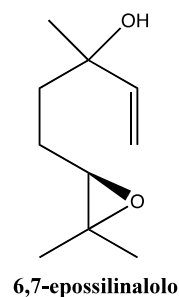
<b>Prodotti della biotrasformazione di linalolo</b>	<b>RT (min) GC-FID</b>	<b>RT (min) GC-MS</b>	<b>KI</b>
<b>linalolo</b>	21.86	19.59	1097
<b>2-metil-2-epten-6-one</b>	12.22	10.65	986
<b>2-metil-2-epten-6-olo</b>	12.78	11.19	992
<b>(trans)-furanlinalolo ossido</b>	18.86	16.89	1073
<b>1-metil-1-(4-metilpentil)-2-ossiranmetanolo</b>	19.18	19.02	1095
<b>1-metil-1-(4-metilpentil)-2-ossiranmetanolo</b>	19.58	19.43	1012
<b>(cis)-furanlinalolo ossido</b>	20.37	18.33	1087
<b>(trans)-piranlinalolo ossido</b>	28.9	26.51	1174
<b>(cis)-piranlinalolo ossido</b>	29.65	27.19	1177
<b>6,7-eossi linalolo</b>	32.1	29.57	1203
<b>6,7-eossi linalolo</b>	32.6	30.14	1209

**Tabella 7.** Tempi di ritenzione GC-FID e GC-MS dei prodotti del linalolo

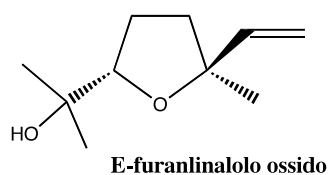
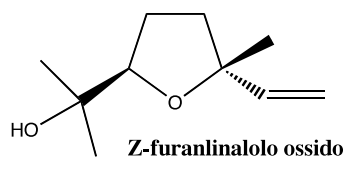
I prodotti ottenuti nelle biotrasformazioni sono i seguenti: il linalolo **1** non reagito, i prodotti di 1,2 epossidazione e riduzione del doppio legame in C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> **2** e **3** e di 6,7 epossidazione **4** e **5**, i prodotti di ciclizzazione E e Z furanlinalolo ossido **6** e **7**, i prodotti di ciclizzazione E e Z piranlinalolo ossido **8** e **9** ed i prodotti di degradazione della catena alchilica **10** ed **11**.

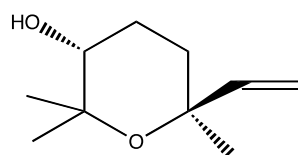
**1****2****3**

Il linalolo **1** viene confrontato con il prodotto commerciale (Fluka), e l'identificazione dei diastereoisomeri, denominati 1-metil-1-(4-metilpentil)-2-ossiranmetanolo **2** e **3** è avvenuta tentativamente per confronto con lo spettro di massa presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library.

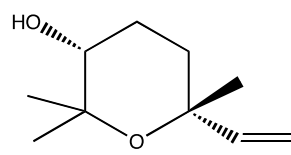
**4****5**

I diastereoisomeri del 6,7-epossilinalolo **4** e **5** sono stati preparati con il metodo descritto da P. Winterhalter (110) a partire da (±)-linalolo e identificati in gas-cromatografia accoppiata alla massa su colonna VF-5MS non chirale. Lo spettro di massa è in accordo con quello di letteratura. La stereochimica dei diastereoisomeri è ancora oggetto di approfondimento.

**6****7**



E-piranalalolo ossido

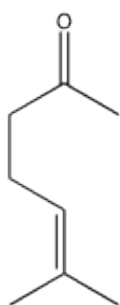
**8**

Z-piranalalolo ossido

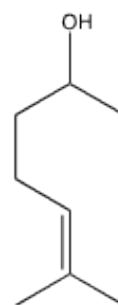
**9**

Una miscela di cis e trans furanalalolo ossido è stata acquistata da Aldrich.

L'identificazione e l'attribuzione delle configurazioni cis e trans dei furanalalolo ossidi **6 e 7** e dei piranalalolo ossidi **8 e 9** è stata ottenuta in gas-cromatografia su colonna VF-5MS non chirale accoppiata alla massa per confronto dei rispettivi spettri di massa e indici di Kovats con quelli di letteratura (51, 111). Per calcolare gli Indici di Kovats sperimentali è stata iniettata una miscela commerciale, Retention Index mixture for GC (Sigma), di 24 idrocarburi alifatici.



2-metil-2-epten-6-one

**10**

(±)-2-metil-2-epten-6-olo

**11**

**Tabella 8:** Biotrasformazioni di linalolo con funghi isolati dall'epicarpo del genere Citrus (Ecuador)

microorganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)										
	1	10	11	6	2	3	7	8	9	4	5
2D7 IF		4		47	1	1	45	2	3		
2B4 IIF	100										
2D1 IIF	100										
1F1 IIF	78			10			8	1	1	1	1
2A17 IIIF	87				6	6	1				
1B20 IVF	88				6	6					
1B23 VIF	88										
1B18 VIF	100										
1C4 VIIF	89				6	5					
1D6 VIIIF	88				6	6					
2D4 IXF	88				6	6					
1B13 XF	88				6	6					
1C22 XIIF	88				6	6					
2D10 XIIIF	83				9	8					
1B5 XIIIF	84				8	8					
1C3 XIVF	82				9	9					
1D4 XVIF	1			46			45	3	4		
1B14 XVIF	29	62	9								
1C21 XVIIF	69	8			11	12					
1B24 XVIIIF	71	29									
2D15 XVIIIIF	59				22	19					
1C19 XIXF	87				7	6					
2D17 XXF	100										
1F2 XXF	40			29	1		25	1	2	2	1
1C5 XXIIF	14			36	29	1		16	2	1	
2D2 XXIIF	100										
1F9 XXIIIF	78				11	11					
1D2 XXIIIF	1			49			46	1	2		

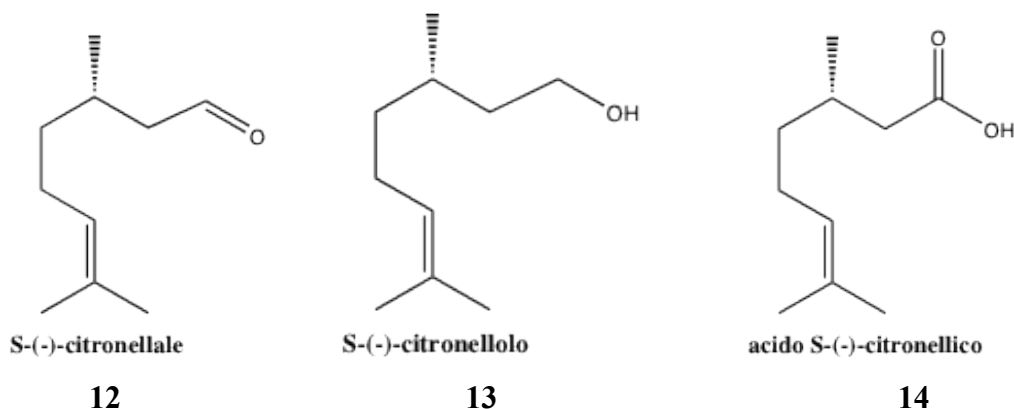
<sup>a</sup> I prodotti sono inseriti in tabella secondo l'ordine di uscita in gascromatografia

I dati di biotrasformazione del citronellale sono i seguenti:

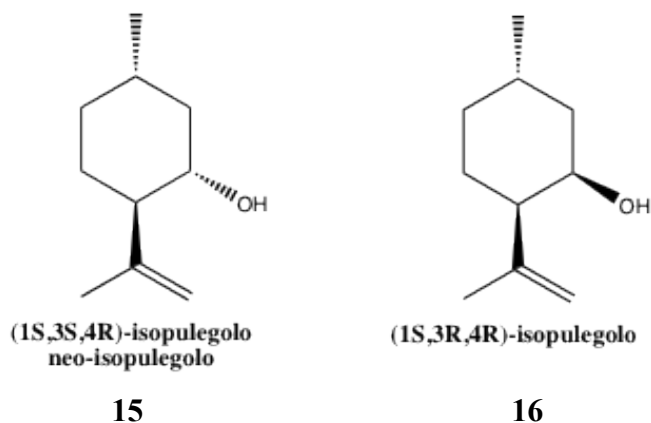
Prodotti di biotrasformazione del citronellale	RT (min) GC-FID	RT (min) GC-MS	KI
<b>Citronellale</b>	27.18	25.66	1153
<b>Isopulegolo</b>	26.49	23.93	1150
<b>neo-isopulegolo</b>	27.45	24.92	1148
<b>Citronellolo</b>	35.60	33.14	1226
<b>acido citronellico</b>	38.48	44.97	1333
<b>cis-p-mentan-3,8-diolo</b>	38.74	46.03	1343
<b>trans-p-mentan-3,8-diolo</b>	38.12	48.14	1355

**Tabella 9.** Tempi di ritenzione GC-FID e GC-MS dei prodotti del citronellale

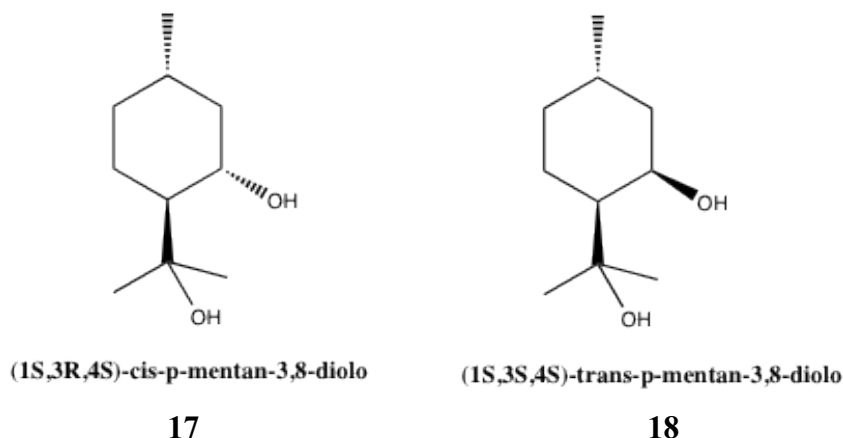
I prodotti ottenuti nelle biotrasformazioni sono i seguenti: il citronellale non reagito **12**, il prodotto di riduzione citronellolo **13**, il prodotto di ossidazione acido citronellico **14** e quattro prodotti di chiusura ad anello di cui due idrossilati **15-18**.



L'S-citronellale **12** è un prodotto commerciale (Aldrich). L'S-(-)-citronellolo **13** è stato preparato in laboratorio per riduzione del citronellale con NaBH<sub>4</sub>. L'acido S-(-)-citronellico **14** è stato preparato in laboratorio per ossidazione del citronellale con KMnO<sub>4</sub>.



I prodotti otticamente attivi isopulegolo e neo-isopulegolo sono sottoprodotti della reazione di ciclizzazione di S-(-)-citronellale come descritto in letteratura e coincidono con quelli ottenuti dalle biotrasformazioni.



I due p-mentan-3,8-dioli **17** e **18** otticamente attivi sono stati preparati da S-(-)-citronellale seguendo il metodo di ciclizzazione con acido solforico al 5%, descritto da H. E. Zimmermann et al. (112) e ripreso da H. Nishimura et al. (113). I prodotti ottenuti raffrontati con quelli di biotrasformazione con il ceppo 1D6VIIF, analizzati in GC-MS con colonna non chirale VF-5MS e con colonna chirale, hanno evidenziato un'esatta sovrapposizione.

L'(1S,3R,4S)-mentan-3,8-diolo **17** (113, 69) <sup>1</sup>H-NMR: 0.87 (3H, d, J = 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.92 (1H, m), 1.06 (1H, m), 1.16 (1H, m), 1.23 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.64-1.73 (2H, m), 1.75-1.88 (3H, m), 3.12 (2OH, s), 4.41 (1H, pseudoq, J = 2.9 Hz, HCOH) ppm.

L'(1S,3S,4S)-mentan-3,8-diolo **18** (113, 69) <sup>1</sup>H-NMR: 0.93 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.98 (1H, m), 1.00-1.10 (2H, m), 1.27 (6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.44 (1H, m), 1.64-1.73 (2H, m), 1.81 (1H, m), 1.97 (1H, pseudod, J = 12.2 Hz), 3.24 (2OH, s), 3.72 (1H, dt, J = 10.6-4.0 Hz, HCOH) ppm.

**Tabella 9:** Biotrasformazioni di citronellale con funghi isolati dall'epicarpo del genere Citrus (Ecuador)

microrganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)							
	12	16	15	13	14	17	18	ni <sup>b</sup>
2D7 IF	0	7		43		34		16
2B4 IIF	0	3		40	15	27	15	
2D1 IIF		4		2	28	45	11	10
1F1 IIF	1			75	24			
2A17 IIIF	2			98				
1B20 IVF	1			99				
1B23 VF				38	62			
1B18 VIF	1	2		57	7	25	8	
1C4 VIIF		4		23	4	50	19	
1D6 VIIIF		2				72	25	
2D4 IXF	2	12	2	11		53	20	
1B13 XF	1			83	16			
1C22 XIF		4	1	7		63	25	
2D10 XIIIF	1	2		81	11	5		
1B5 XIIIIF				64	36			
1C3 XIVF		2		51		35	12	
1D4 XVF		13		11		55	21	
1B14 XVIF	1			45	54			
1C21 XVIIF				86	12			2
1B24 XVIIIF	1			63		31	5	
2D15 XVIIIIF				100				
1C19 XIXF				84	16			
2D17 XXF	6			74				20
1F2 XXF	3	4		74	19			
1C5 XXIF				69	22	9		
2D2 XXIF	5	8		68		7		11
1F9 XXIIF				72	11			17
1D2 XXIIIF				84	16			

<sup>a</sup> I prodotti sono inseriti in tabella secondo l'ordine di uscita in gascromatografia

<sup>b</sup> ni = prodotti non identificati

**SCREENING DELLA BIOTRASFORMAZIONE DI SABINENE E LIMONENE CON  
FUNGHI. Procedura generale**

Sono stati testati 10 ceppi di funghi sui 55 purificati e sono stati scelti sulla base dei seguenti criteri:

- Ceppi che hanno biotrasformato il citronellale in rese superiori al 50%.
- Ceppi che hanno biotrasformato il linalolo in rese superiori al 20%.
- Ceppi che hanno mostrato prodotti interessanti sia nelle biotrasformazioni con linalolo che con citronellale con rese superiori al 20%

I ceppi selezionati sono: 2D7 IF, 2D1 IIF, 1D6, VIIIIF, 2D4 IXF, 1C22 XIF, 1B14, XVIF, 1B24 XVIIIIF, 2D15 XVIIIIF, 1C5 XIF, 1D2 XXIIIIF.

Le colture vengono preparate ponendo 20 mL di Sabouraud in beute da 50 mL ed inoculando il microrganismo partendo da slant. Dopo 5 giorni sotto agitazione a 80 rpm alla temperatura di 28 a 30°C si aggiunge il substrato in concentrazione di 1 g/L [200 µL di una soluzione preparata sciogliendo 0.1 g di sabinene o di limonene in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO)].

Data la volatilità dei substrati di partenza le colture sono state divise in 3 provette con tappo a vite sigillate con parafilm ponendo in ogni provetta 3 mL di coltura corrispondente a 3 mg di prodotto inoculato.

Le colture sono state lasciate in incubazione per altri 5 giorni prelevando campioni (una provetta per prelievo) ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

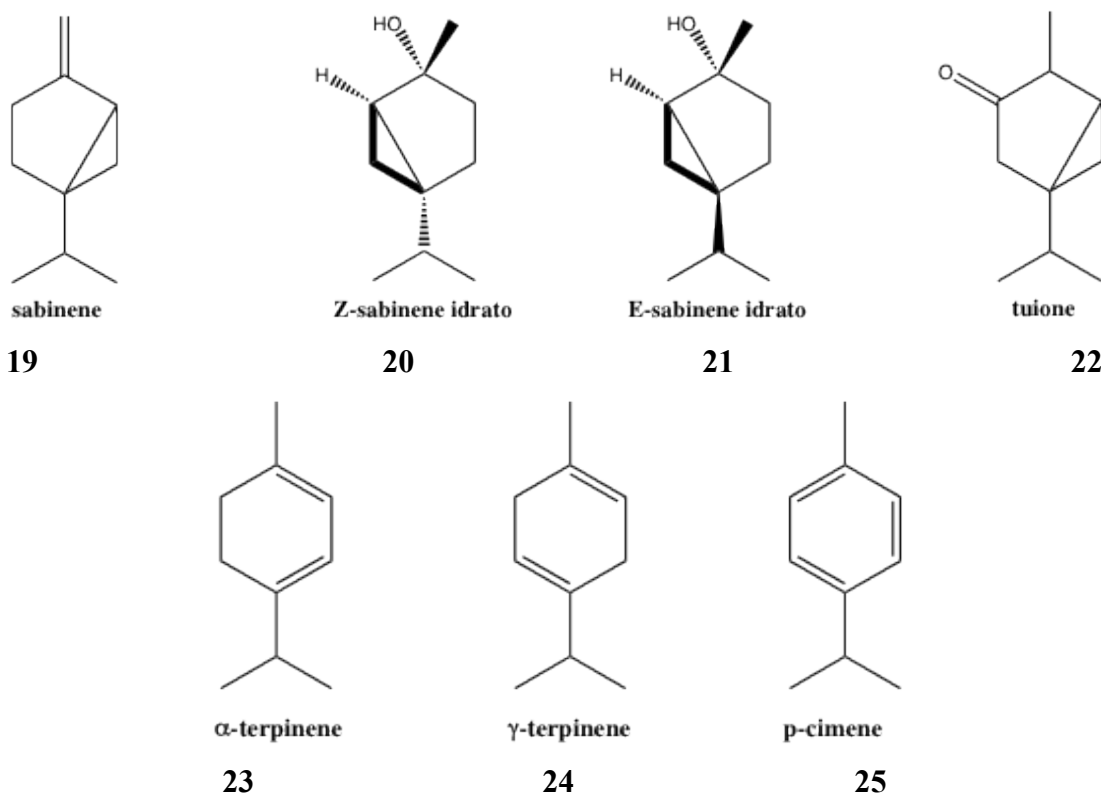


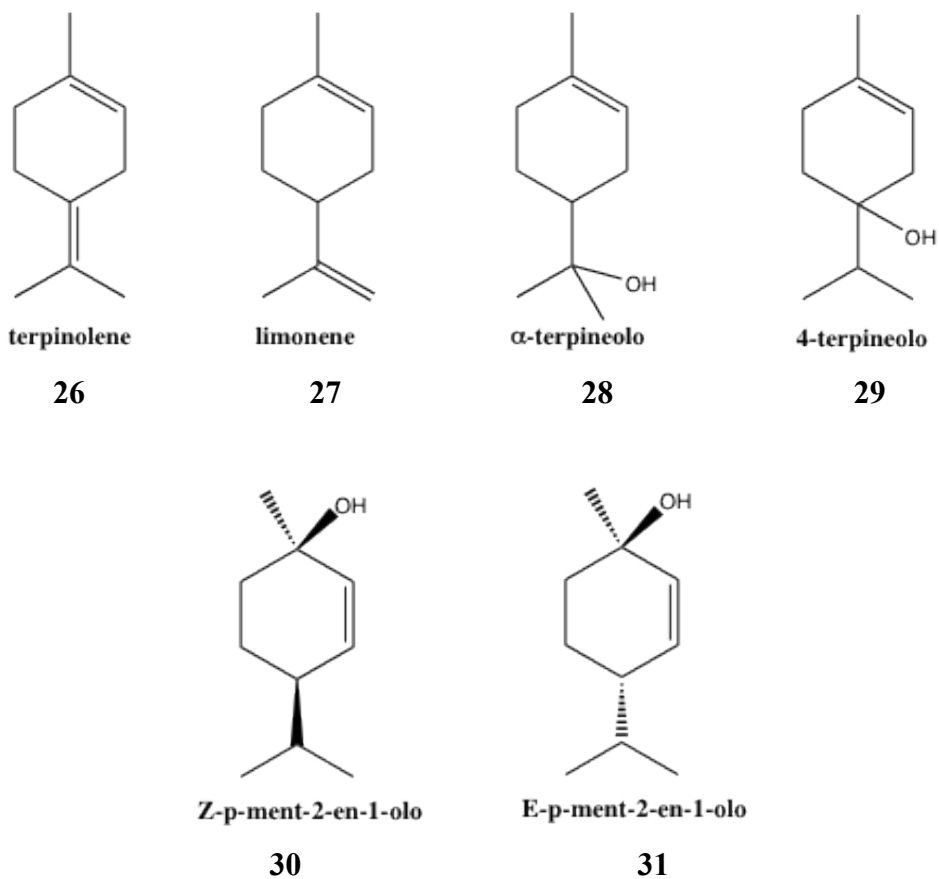
I dati di biotrasformazione del sabinene sono i seguenti:

Prodotti di biotrasformazione del sabinene	RT (min) GC-FID	RT (min) GC-MS	KI
sabinene	11.26	9.58	975
$\alpha$ -terpinene	14.27	12.36	1017
p-cimene	14.89	12.97	1025
limonene	15.33	13.23	1029
$\gamma$ -terpinene	17.65	15.48	1037
cis-sabinene-idrato	18.85	16.57	1070
terpinolene	20.05	17.74	1089
trans-sabinene-idrato	21.77	19.32	1098
tuione	23.16	20.85	1114
cis-ment-2-en-1-olo	24.03	21.48	1122
trans-ment-2-en-1-olo	25.95	23.35	1141
4-terpineolo	30.00	27.22	1177
$\alpha$ -terpineolo	31.72	20.02	1189

**Tabella10 .** Tempi di ritenzione GC-FID e GC-MS dei prodotti del sabinene

I prodotti ottenuti nelle biotrasformazioni sono il sabinene non reagito **19**, i prodotti di idratazione del doppio legame **20** e **21**, un prodotto di idrossilazione dell'anello **22** e vari prodotti di riarrangiamento dell'anello per via ossido-riduttiva **23-31**.





Il sabinene **19** è un prodotto commerciale da Extrasynthese. Il p-cimene **25**, il limonene **27**, l' $\alpha$ -terpineolo **28** e il 4-terpineolo **29** sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

Tutti gli altri composti sono stati identificati in gascromatografia su colonna VF-5MS non chirale accoppiata alla massa per confronto dei rispettivispettri di massa e indici di Kovats con quelli di letteratura (111, 51). Per calcolare gli Indici di Kovats sperimentali è stata iniettata una miscela commerciale, Retention Index mixture for GC (Sigma), di 24 idrocarburi alifatici.

**Tabella 11.** Biotrasformazioni di sabinene con funghi isolati dall'epicarpo del genere Citrus (Ecuador)

microrganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)												
	19	23	25	27	24	20	26	21	22	30	31	29	28
<b>2D7 IF</b>	81	2			3	1		1				12	
<b>2D1 IIF</b>	79	2			4	1	1	1				13	
<b>1D6 VIIF</b>	94	0.5			1		0.7	0.1	0.1	0.6		3	
<b>2D4 IXF</b>	79				0.4	2	0.4	2				7	
<b>1C22 XIIF</b>	6	3	1	0.3	8	3	1	2		1	1	74	1
<b>1B14 XVIF</b>	85					3		2				9	
<b>1B24 XVIIIIF</b>	74					3		3				13	
<b>2D15 XVIIIIF</b>	100												
<b>1C5 XXIIF</b>	77					3		3				17	
<b>1D2 XXIIIF</b>	82					3		5				10	

<sup>a</sup> I prodotti sono inseriti in tabella secondo l'ordine di uscita in gascromatografia

Le biotrasformazioni con limonene sono state eseguite ma non si sono ricavati prodotti. Il limonene per la sua volatilità non era più presente nel mezzo di reazione dopo 48 ore dell'inizio della biotrasformazione.

**SCREENING DELLA BIOTRASFORMAZIONE DI LINALOLO E CITRONELLALE CON  
BATTERI. Procedura generale**

Sono stati testati 35 ceppi di batteri sui 61 purificati e sono stati scelti sulla base dei seguenti criteri: un ceppo per ogni categoria morfologica e più ceppi della stessa categoria se provenienti da zone diverse (3A3 IB, 1B22 IIB, 1C11 IIB, 1B8 IIIB, 1C13 IIIB, 1F10 IVB, 2D16 VB, 1C15 VIB, 2D8 VIB, 1B9 VIIB, 1C1 VIIIB, 2D9 VIIIB, 1B12 IXB, 1B10 XB, 1C10 XB, 2D14 XB, 2B6 XIB, 2A7 XIIB, 1B1 XIIB, 2A3 XIIIB, 1C2 XIIIB, 2A9 XIVB, 1F12 XVB, 1F14 XVB, 1B19 XVIB, 1A14 XVIIB, 1B11 XVIIB, 1A12 XVIIIB, 2D13 XVIIIB, 1C12 XIXB, 1A4 XXB, 1F4 XXB, 1B16 XXIB, 1F12' XXIB, 1C17 XXIIIB).

Le colture vengono preparate ponendo 10 mL di Plate Count Broth in beute da 50 mL ed inoculando il microrganismo partendo da slant. Dopo 48 ore sotto agitazione a 80 rpm alla temperatura di 28-30°C si aggiunge il substrato in concentrazione di 1 g/L [100 µL di una soluzione preparata sciogliendo 0.1 g di substrato in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO)].

Le colture sono state lasciate in incubazione per 5 giorni prelevando campioni ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

Al quinto giorno è stata fatta l'estrazione totale della miscela di reazione con 5 mL di etere etilico anidrificando con sodio solfato anidro.

La miscela di reazione è stata analizzata mediante analisi gascromatografica e i prodotti sono stati riconosciuti attraverso l'analisi GC-MS.

I dati di biotrasformazione del linalolo sono i seguenti:

<b>Biotrasformazione di linalolo con batteri</b>	<b>RT (min) GC-FID</b>	<b>RT (min) GC-MS</b>	<b>KI</b>
<b>linalolo</b>	21.86	19.59	1097
<b>trans-furanlinalolo ossido</b>	18.86	16.89	1073
<b>cis-furanlinalolo ossido</b>	20.37	18.33	1087

**Tabella 12.** Tempi di ritenzione GC-FID e GC-MS dei prodotti del linalolo

I prodotti di biotrasformazione sono linalolo non reagito **1** e i due furanlinalolo ossido E e Z **6** e **7**.

**Tabella 13.** Biotrasformazioni di linalolo **1** con batteri isolati dall'epicarpo del genere Citrus (Ecuador)

microrganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)		
	1	6	7
3A3 IB	99	0.5	0.5
1B22 IB	99		1
1C11 IIB	100		
1B8 IIIB			
1C13 IIIB	100		
1F10 IVB	98	1	1
2D16 VB	99		1
1C5 VIB	100		
2D8 VIB	97	2	1
1B9 VIIB	99	0.5	0.5
1C1 VIIIB	98	1	1
2D9 VIIIB	100		
1B12 IXB	97	1.5	1.5
1B10 XB	99	1	
1C10 XB	100		
2D14 XB	100		
2B6 XIB	99	1	
2A7 XIIB	99	1	
1B1 XIIB	100		
2A3 XIIIB	100		
1C2 XIIIB	100		
2A9 XIVB	99	1	
1F12 XVB	100		
1F14 XVB	99		
1B19 XVIB	100		
1A14 XVIIB	100		
1B11 XVIIB	100		
1A12 XVIIIB	100		
2D13 XVIIIB	100		
1C12 XIXB	100		
1A4 XXB	99		1
1F4 XXB	100		
1B16 XXIB	100		
1F12' XXIIB	100		
1C17 XXIIIB	100		

<sup>a</sup> I prodotti sono inseriti in tabella secondo l'ordine di uscita in gascromatografia

I dati di biotrasformazione del citronellale sono i seguenti:

<b>Biotrasformazione di citronellale con batteri</b>	<b>RT (min) GC-FID</b>	<b>RT (min) GC-MS</b>	<b>KI</b>
<b>citronellale</b>	27.18	25.66	1153
<b>isopulegolo</b>	26.49	23.93	1150
<b>citronellolo</b>	35.60	33.14	1226
<b>acido citronellico</b>	38.48	44.97	1333
<b>cis-p-mentan-3,8-diolo</b>	38.74	46.03	1343
<b>trans-p-mentan-3,8-diolo</b>	38.12	48.14	1355

**Tabella 14.** Tempi di ritenzione GC-FID e GC-MS dei prodotti del citronellale.

I prodotti ottenuti nelle biotrasformazioni sono i il citronellale non reagito **12**, il prodotto di riduzione citronellolo **13**, il prodotto di ossidazione acido citronellico **14** e tre prodotti di chiusura ad anello di cui due idrossilati **16-18**.

**Tabella 15.** Biotrasformazioni di citronellale **12** con batteri isolati dall'epicarpo del genere Citrus (Ecuador)

microrganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)					
	12	16	13	14	17	18
<b>3A3 IB</b>	8		48	16		
<b>1B22 IB</b>	13	13		53		
<b>1C11 IIB</b>	2	8	23	51	12	4
<b>1B8 IIIB</b>	1		36	55		
<b>1C13 IIIB</b>	3	9	58	18		
<b>1F10 IVB</b>	1	3	12	80		
<b>2D16 VB</b>			35	63	2	
<b>1C15 VIB</b>	12		31	27		
<b>2D8 VIB</b>		6	1	23	6	
<b>1B9 VIIB</b>	0		11	89		
<b>1C1 VIIIB</b>	11	8	32	17		
<b>2D9 VIIIB</b>		4		39		
<b>1B12 IXB</b>	7	53		16		
<b>1B10 XB</b>	16	12		21		
<b>1C10 XB</b>	5	4	54	20		
<b>2D14 XB</b>	4	6	15		71	4
<b>2B6 XIB</b>	2	2	49	36	2	
<b>2A7 XIIB</b>	7	53		16		
<b>1B1 XIIB</b>	2	3	84			
<b>2A3 XIIB</b>	41			59		
<b>1C2 XIIB</b>				51		
<b>2A9 XIVB</b>	1	2	59	30	1	
<b>1F12 XV B</b>		19	14	33		
<b>1F14 XV B</b>			41			
<b>1B19 XVIB</b>	1		26	36	1	
<b>1A14 XVIIB</b>	2	79		19		
<b>1B11 XVIIB</b>	1		59		2	2
<b>1A12 XVIIIB</b>	3		65	18	4	
<b>2D13 XVIIIB</b>	1	1	56	25		
<b>1C12 XIXB</b>	31		17	23		
<b>1A4 XXB</b>	26		17	23		
<b>1F4 XXB</b>			45	48		
<b>1B16 XXIB</b>	10	4	28			
<b>1F12' XXIB</b>	5		26	43		
<b>1C17 XXIIIB</b>	1		31	67		

<sup>a</sup> I prodotti sono inseriti in tabella secondo l'ordine di uscita in gascromatografia

**SCREENING DELLE BIOTRASFORMAZIONI DI SABINENE E LIMONENE CON  
BATTERI. Procedura generale**

Sono stati testati 11 ceppi di batteri sui 61 purificati e sono stati scelti sulla base dei seguenti criteri:

- Ceppi che hanno biotrasformato il citronellale in rese superiori al 20%.
- Ceppi che hanno biotrasformato il linalolo in rese superiori al 15%.

I ceppi selezionati sono: 1B22 IIB, 1C11 IIB, 1F10 IVB, 2D16 IVB, 1B9 VIB, 2D14 XB, 1F12 XVB, 1F14 XVB, 1A14 XVIIB, 1A4 XXB, 1F12' XXIIB.

Le colture vengono preparate ponendo 10 mL di Plate Count Broth in beute da 50 mL ed inoculando il microrganismo partendo da slant. Dopo 48 ore sotto agitazione a 80 rpm alla temperatura di 28 a 30°C si aggiunge il substrato in concentrazione di 1 g/L [100 µL di una soluzione preparata sciogliendo 0.1 g di sabinene o di limonene in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO)].

Data la volatilità dei substrati di partenza le colture sono state divise in 3 provette con tappo a vite sigillate con parafilm ponendo in ogni provetta 3 mL di coltura corrispondente a 3 mg di prodotto inoculato.

Le colture sono state lasciate in incubazione per altri 5 giorni prelevando campioni (una provetta per prelievo) ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

I dati della biotrasformazione di sabinene sono i seguenti:

SABINENE PRODOTTI	RT (min) GC-FID	RT (min) GC-MS	KI
<b>sabinene</b>	11.26	9.58	975
<b><math>\alpha</math>-terpinene</b>	14.27	12.36	1017
<b><math>\gamma</math>-terpinene</b>	17.65	15.48	1060
<b>cis-sabinene-idrato</b>	18.85	16.57	1070
<b>trans-sabinene-idrato</b>	21.77	19.32	1098
<b>tuione</b>	23.16	20.84	1114

**Tabella 16.** Tempi di ritenzione GC-FID e GC-MS dei prodotti del sabinene

I prodotti ottenuti nelle biotrasformazioni il sabinene non reagito **19**, i prodotti di idratazione del doppio legame **20** e **21**, e due prodotti di riarrangiamento dell'anello per via ossido-riduttiva **23** e **24**.



**Tabella 17.** Biotrasformazioni di sabinene **19** con batteri isolati dall'epicarpo del genere Citrus (Ecuador)

microrganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)					
	19	23	24	20	21	22
<b>1B22 IIB</b>	100					
<b>1C11 IIB</b>	100					
<b>1F10 IVB</b>	99	0.1	0.2	0.2	0.1	
<b>2D16 VB</b>	100					
<b>1B9 VIIB</b>	100					
<b>2D14 XB</b>	100					
<b>2A7 XIIB</b>	100					
<b>1F12 XVB</b>	100					
<b>1F14 XVB</b>	100					
<b>1A14 XVIIB</b>	99					1
<b>1F12' XXIIB</b>	100					

<sup>a</sup> I prodotti sono inseriti in tabella secondo l'ordine di uscita in gascromatografia

Le biotrasformazioni con limonene sono state eseguite ma non si sono ricavati prodotti. Il limonene per la sua volatilità non era più presente nel mezzo di reazione dopo 48 ore dell'inizio della biotrasformazione.

## **BIOTRASFORMAZIONI DI LINALOLO E CITRONELLALE SU SCALA PREPARATIVA**

### ***Procedura generale***

Le colture vengono preparate ponendo 100 mL di Sabouraud in beute da 300 mL ed inoculando il microrganismo partendo da criovials. Dopo 5 giorni sotto agitazione a 80 rpm alla temperatura di 28-30°C si aggiunge il substrato in concentrazione di 1 g/L [1 mL di una soluzione preparata sciogliendo 0.1 g di linalolo o citronellale in 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO)].

Le colture sono state lasciate in incubazione per altri 5 giorni prelevando campioni ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

### ***Biotrasformazioni con linanolo.***

Sono stati utilizzati in fase preparativa tutti i ceppi che hanno dato prodotti con rese superiori al 20% per confermare rese e struttura dei prodotti: 1D4 XVF, 1B14 XVIF, 2D15 XVIIIIF.

Le analisi gascromatografiche della miscela hanno confermato i prodotti e le rese ottenute in screening. I prodotti sono stati caratterizzati tramite tecnica GC-MS.

L'isolamento di prodotti è stato eseguito per cromatografia su strato sottile (TLC) e su colonna.

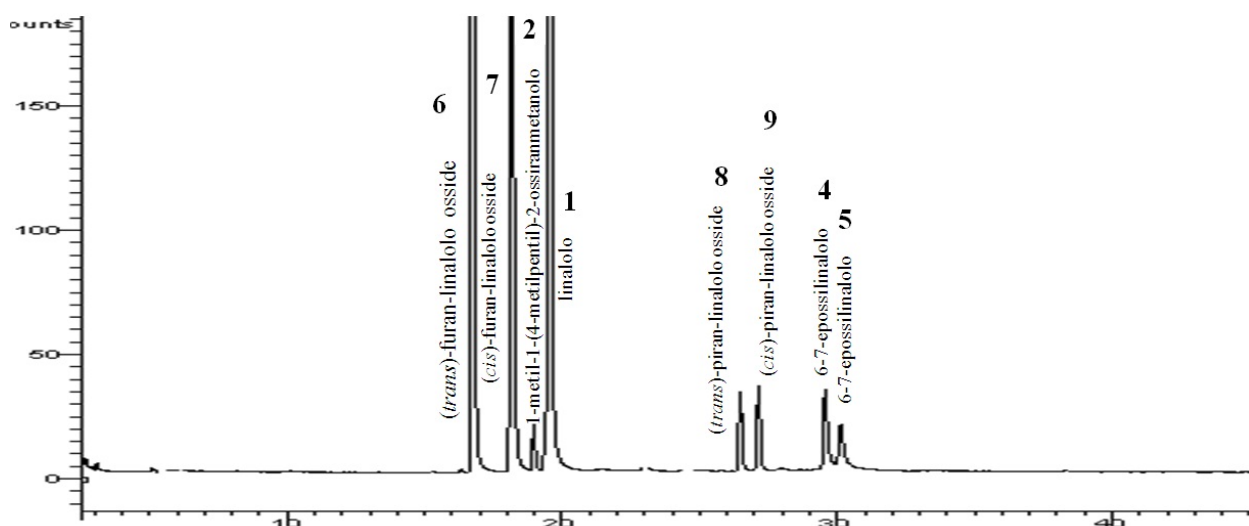
- Thin Layer Chromatography (TLC): impiegando piastre preparative Kieselgel 60 Merck con indicatore di fluorescenza a 254 nm.
- Cromatografia in colonna su gel di silice Kieselgel 60 Merck (70-230 mesh).

I ceppi considerati hanno sostanzialmente confermato le rese dei prodotti di biotrasformazione e ne hanno permesso la separazione e la conferma spettroscopica.

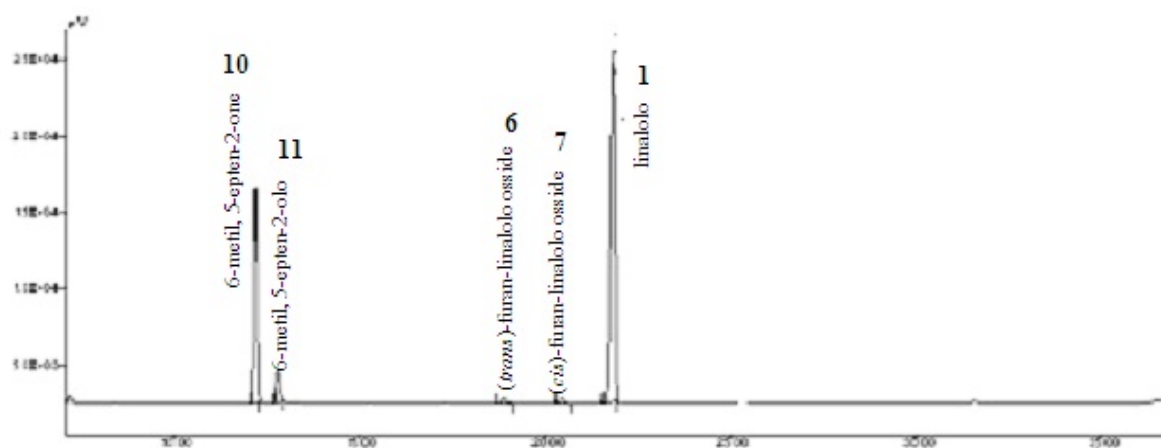
**Tabella 18.** Biotrasformazioni di linanolo 1

microrganismo	Prodotti (resa %)									
	10	11	6	2	3	7	8	9	4	5
1D4 XVF			45			45				
1B14 XVIF	63	8								
2D15 XVIIIIF				25	20					
1F2 XXF			28	1		27	1	2	2	1

**IDENTIFICAZIONE DEI PRODOTTI DELLA BIOTRASFORMAZIONE DEL LINANOLO**

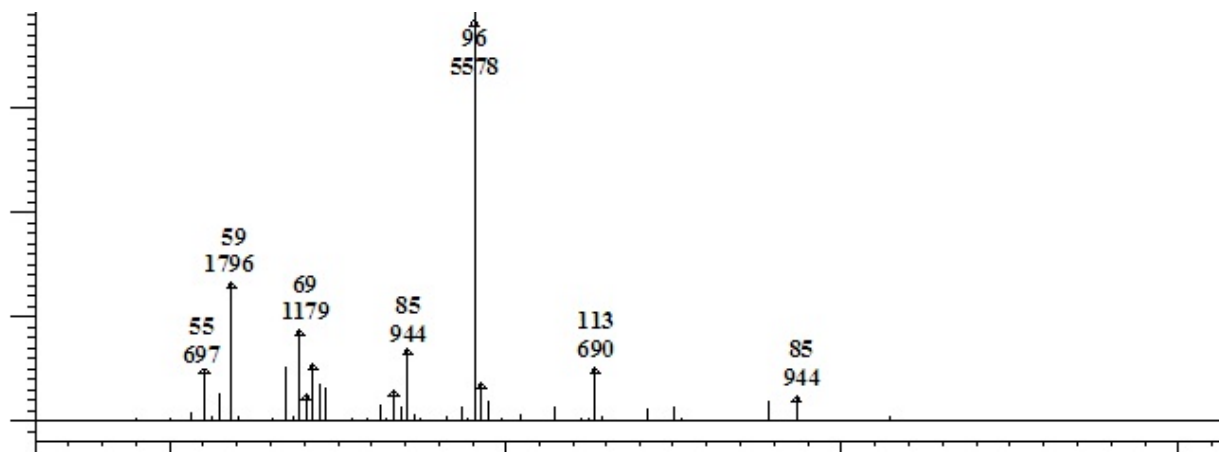


**Figura 7.** Cromatogramma (GC-MS) dei prodotti della biotrasformazione di linalolo



**Figura 8.** Cromatogramma (GC-FID) dei prodotti della biotrasformazione di linalolo con 1B14 XVIF

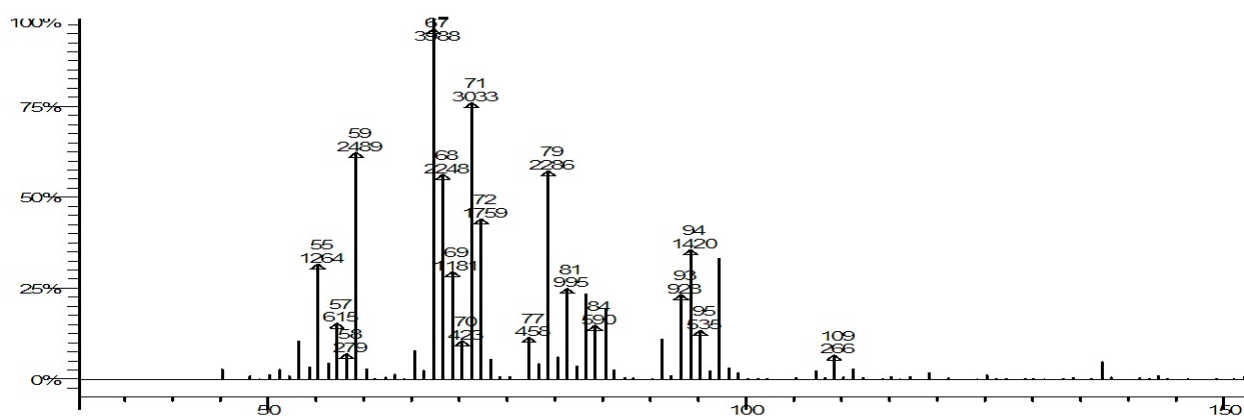
L'identificazione dei diastereoisomeri, denominati 1-metil-1-(4-metilpentil)-2-ossiranmetanolo **2** e **3**, è avvenuta tentativamente per confronto con lo spettro di massa presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library. La struttura andrebbe meglio approfondita.



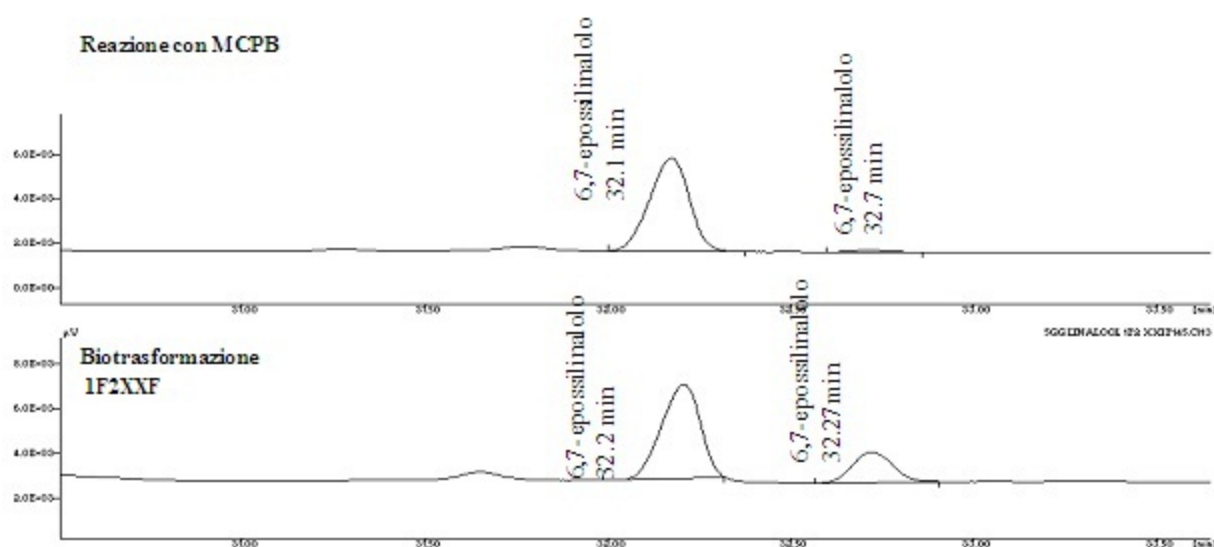
**Figura 9.** Spettro di massa dell'1-metil-1-(4-metilpentil) ossiranmetanolo **2**. Biotrasformazione con 2D15 XVIIIIF

E' stata eseguita una separazione con TLC preparativa sulle biotrasformazioni ottenute coi ceppi 2D7 IF, 2A17 IIIIF, 1F2 XXF e 1C5 XXIF utilizzando come eluente esano/etere etilico 1/1. Le frazioni ottenute sono: f.1 (Rf = 0.25); f.2 (Rf = 0.30 e 0.36); f.3 (Rf = 0.43 e 0.48); f.4 (Rf = 0.61).

La frazione f.1 è stata identificata come formata dai diastereoisomeri del **6,7-epossilinalolo** per confronto del tempo di ritenzione in gascromatografia e lo spettro dei prodotti preparati con il metodo descritto da P. Winterhalter (110) a partire da ( $\pm$ )-linalolo e identificati in gascromatografia accoppiata alla massa su colonna VF-5MS non chirale. Lo spettro di massa è in accordo con quello di letteratura. La stereochimica dei diastereoisomeri è ancora oggetto di approfondimento.

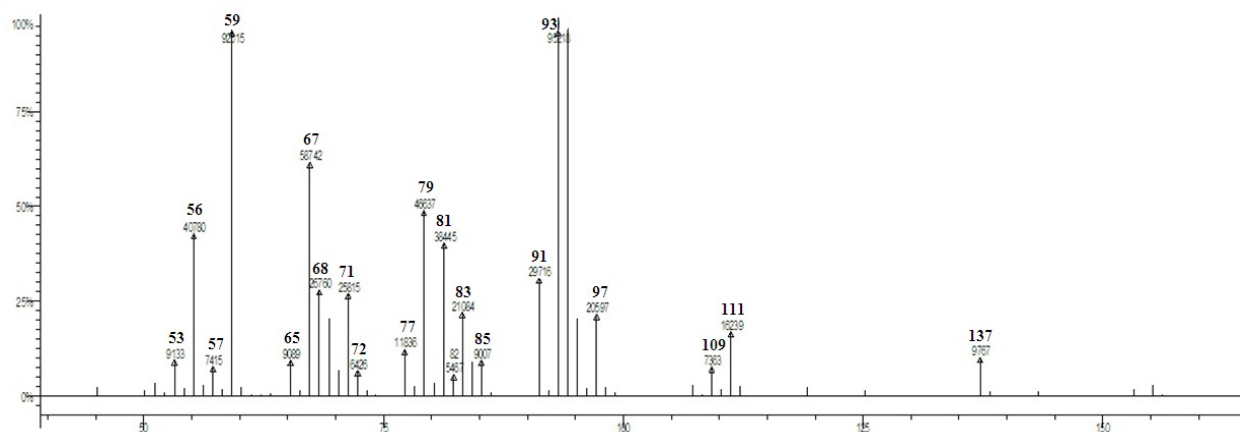


**Figura 10.** Spettro di massa del 6,7-epossilinalolo **4**. Biotrasformazione 1F2 XXF

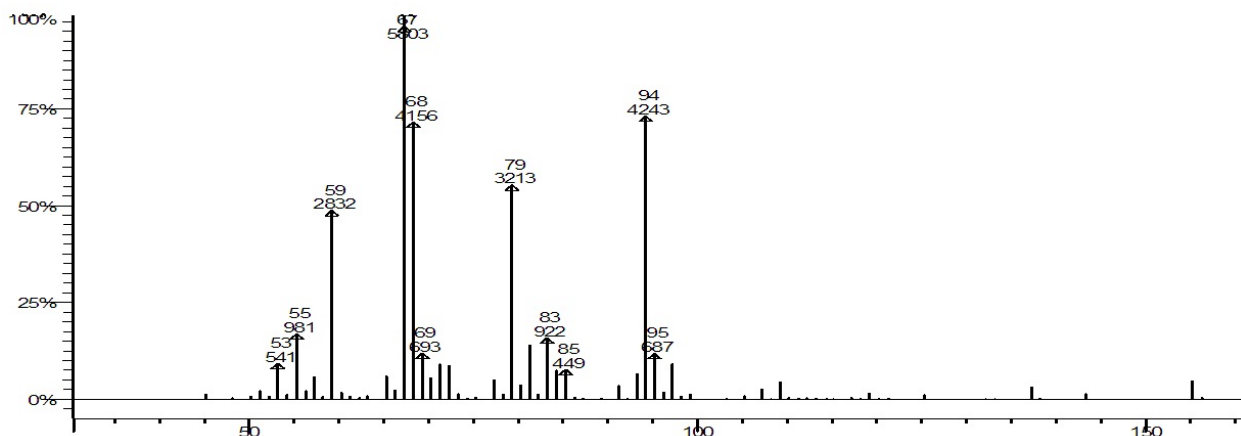


**Figura 11.** Confronto di tempi di ritenzione (GC-FID) dei diastereoisomeri **4** e **5** di 6,7-epossilinalolo nel campione di riferimento (reazione con MCPB) e biotrasformazione con 1F2 XXF

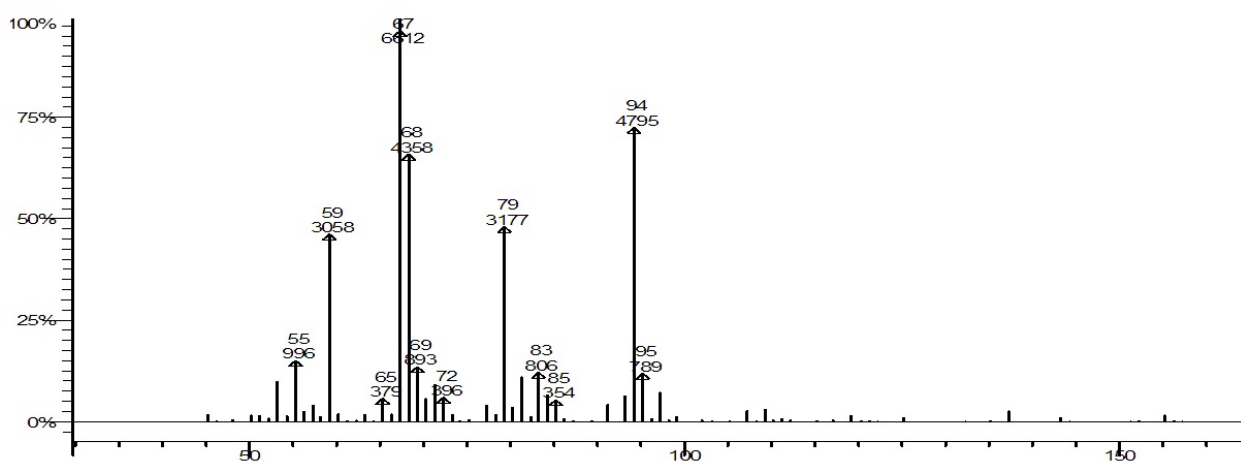
La frazione f.2 da cromatografia e GC-MS è risultata essere una miscela di *cis*- e *trans*-piranlinalolo ossido **8** e **9**; f.3, *cis*- e *trans*-furanlinalolo ossido **6** e **7**; f4 è linalolo **1** non reagito. Non è stata effettuata l'analisi  $^1\text{H-NMR}$  delle frazioni per la scarsa quantità di prodotto. L'identificazione e l'attribuzione delle configurazioni *cis* e *trans* dei furanlinalolo ossidi **6** e **7** e dei piranlinalolo ossidi **8** e **9** è stata ottenuta in gascromatografia su colonna VF-5MS non chirale accoppiata alla massa per confronto dei rispettivispettri di massa e indici di Kovats con quelli di letteratura (111, 51). Per calcolare gli Indici di Kovats sperimentali è stata iniettata una miscela commerciale, Retention Index mixture for GC (Sigma), di 24 idrocarburi alifatici.



**Figura 12.** Spettro di massa del *E*-furanlinalolo ossido **6**. Biotrasformazione con 1F2 XXF



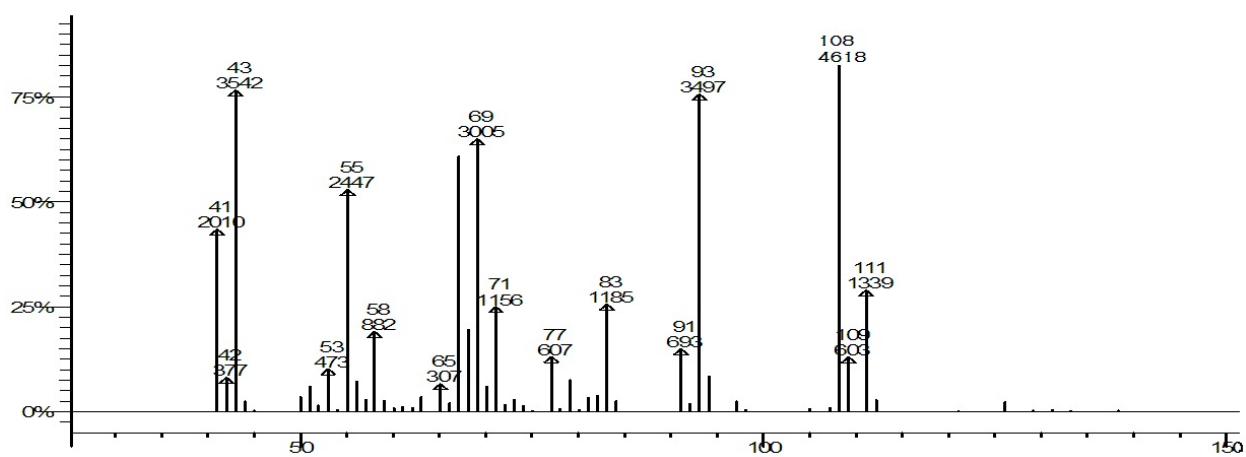
**Figura 13.** Spettro di massa del *E*-piranalinalolo ossido **8**. Biotrasformazione con 1F2 XXF



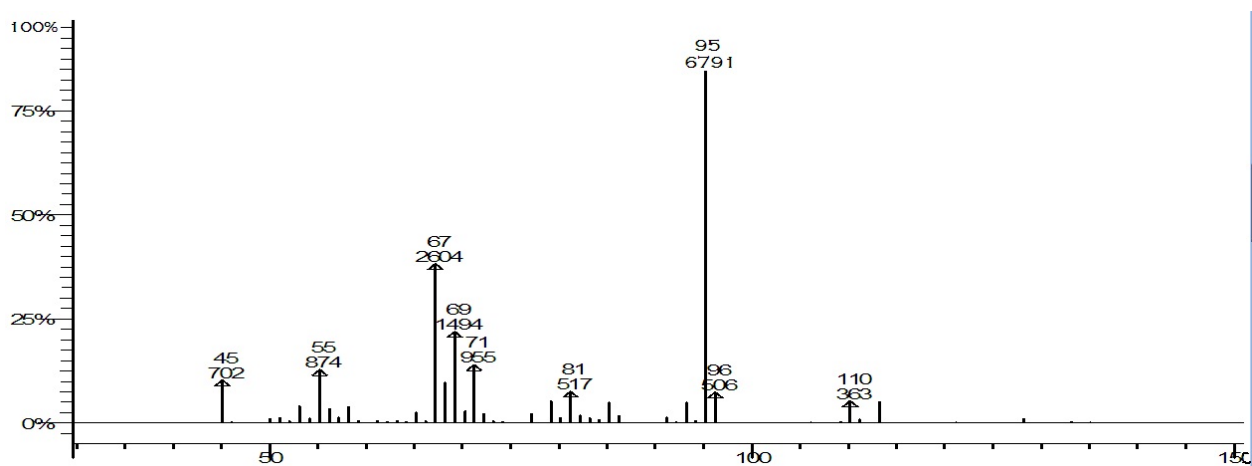
**Figura 14.** Spettro di massa del *Z*-piranalinalolo ossido **9**. Biotrasformazione con 1F2 XXF

Per l'identificazione del 2-metil-2-epten-6-one **10**, ottenuto dalla biotrasformazione con il ceppo 1B14 XVIF, dopo il quinto giorno si è fatta l'estrazione della miscela di reazione utilizzando come solvente cloroformio deuterato ( $\text{CDCl}_3$ ) e l'estratto grezzo è stato analizzato per  $^1\text{H-NMR}$ . Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  è stata confrontato con lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  di Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/spectra>) confermando l'attribuzione. Lo spettro di massa del 2-metil-2-epten-6-one **10** e del 2-metil-2-epten-6-olo **11** sono stati confermati per confronto con gli spettri presenti nella banca dati NIST 05 Mass Spectral Library.

2-metil-2-epten-6-one **10**:  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 5.07 (t, 1H, =CH), 2.45 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.25 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.134 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.62 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).



**Figura 15.** Spettro di massa del 2-metil- 2-epten-6-one **10**. Biotrasformazione 1B14 XVIF



**Figura 16.** Spettro di massa del 2-metil- 2-epten-6-olo **11**. Biotrasformazione 1B14 XVIF

### *Biotrasformazioni con citronellale*

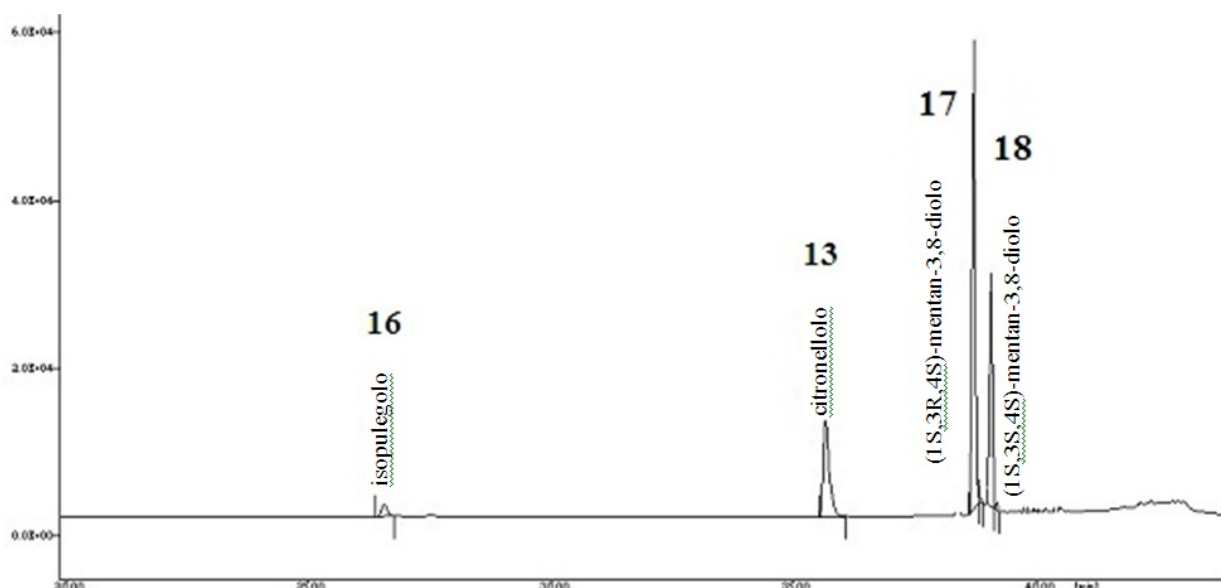
Sono state utilizzati i ceppi che hanno dato prodotti di biotrasformazione con rese superiori al 50% in fase di screening: 2D1 IIF, 1D6 VIIF, 2D4 IXF, 1B14 XVIF, 1B24 XVIIIIF, 2D15 XVIIIIF, 1C5 XXIF, 1B9 VIIB.

Le rese ottenute sono riportate nella tabella seguente.

**Tabella 19.** Biotrasformazioni di citronellale 12

<b>microrganismo</b>	<b>16</b> (resa %)	<b>15</b> (resa %)	<b>13</b> (resa %)	<b>14</b> (resa %)	<b>17</b> (resa %)	<b>18</b> (resa %)	<b>ni</b> (resa %)
<b>2D 1 IIF</b>			88	12			
<b>1D 6 VIIF</b>	3	1	0.5		64	30.5	
<b>2D 4 IXF</b>	8	1.5	6	2	56	26	
<b>1B 14 XVIF</b>			85		13		
<b>1B 24 XVIIIIF</b>							
<b>2D 15 XVIIIIF</b>			95	5			
<b>1C 5 XXIF</b>			36	22			37
<b>1B9 VIIB</b>	1		39	58			

### **IDENTIFICAZIONE DEI PRODOTTI DELLA BIOTRASFORMAZIONE DEL CITRONELLALE**

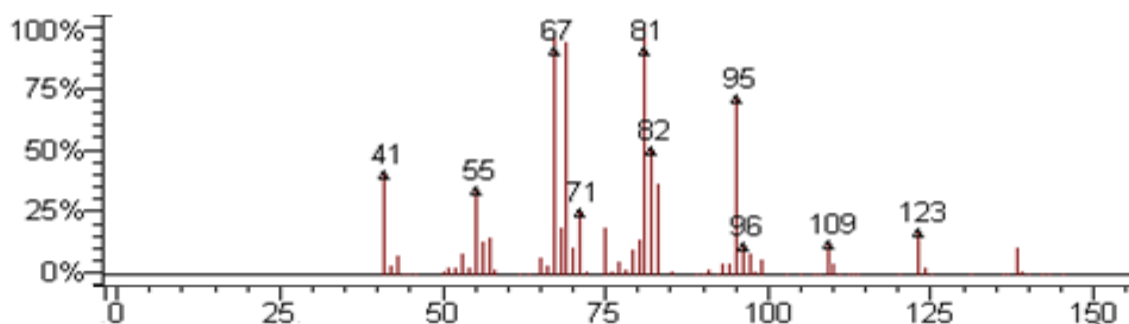


**Figura 17.** Cromatogramma (GC-FID) dei prodotti di biotrasformazione del citronellale con 1D6 VIIF

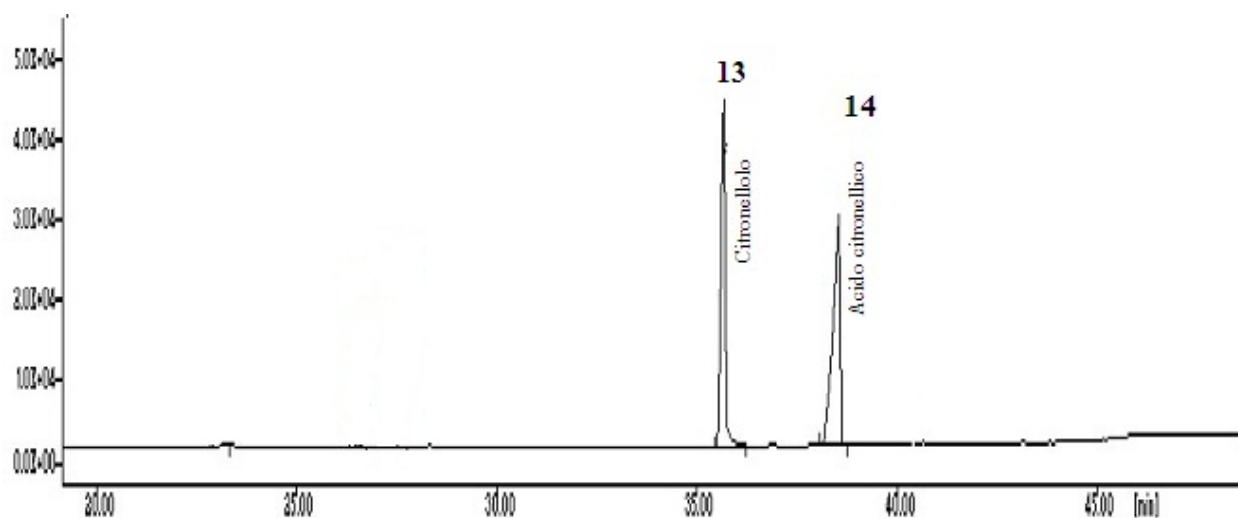


È stata eseguita la separazione dei prodotti per colonna cromatografica su gel di silice dell'estratto della biotrasformazione preparativa di 1D6 VIIIIF utilizzando come eluente etere di petrolio/etile acetato 5/2 come è stato descritto da Rahman, 1998. Sono stati isolati e identificati: (S)-citronellolo **13**, (1*S*,3*R*,4*S*)-mentan-3,8-diol **17** e (1*S*,3*S*,4*S*)-mentan-3,8-diol **18**.

L'(S)-citronellolo **13** è stato identificato per confronto con lo spettro <sup>1</sup>H-NMR dello standard Sigma-Aldrich.

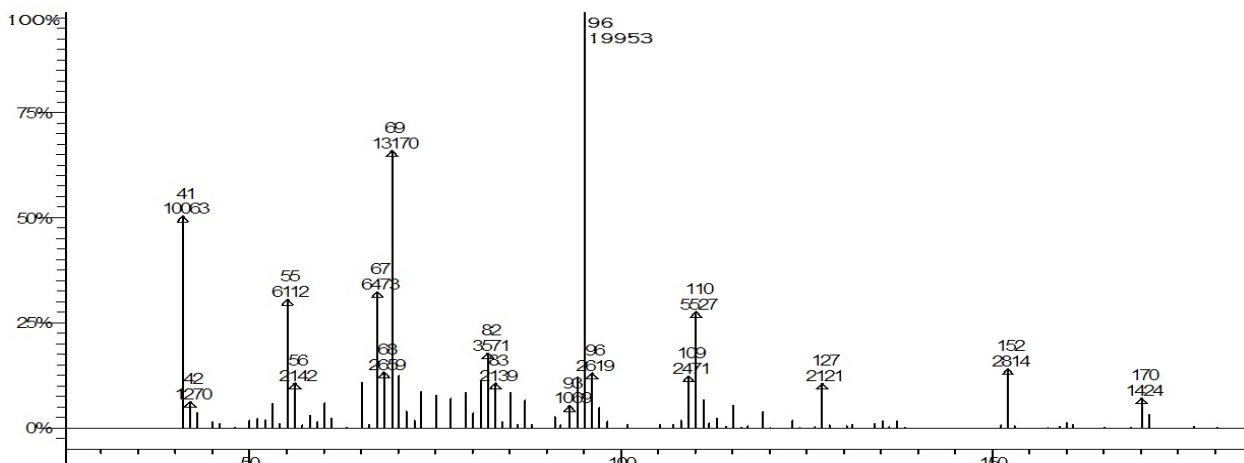


**Figura 18.** Spettro di massa del (S)-citronellolo **13**. Biotrasformazione con 1D6 VIIIIF



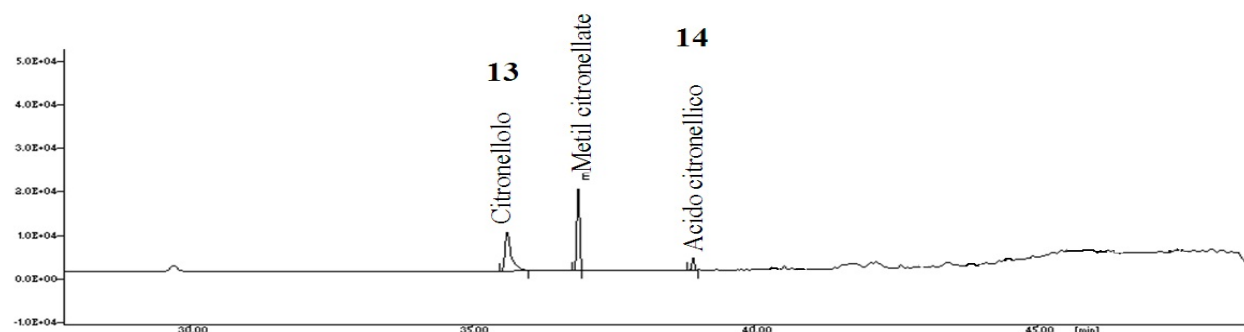
**Figura 19.** Cromatogramma (GC-FID) dei prodotti di biotrasformazione del citronellale con 1C5 XXIF

L'identificazione dell'S-(-)-acido citronellico **14** è stata eseguita per GC-MS confrontando lo spettro riportato nella NIST 05 Mass Spectral Library, Search Program.

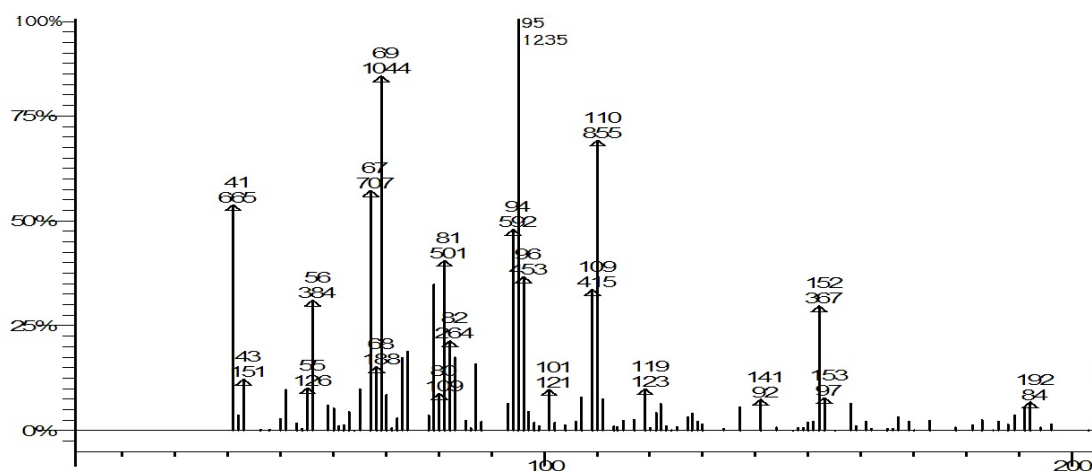


**Figura 20.** Spettro di massa dell'acido S-(-)-citronellico **14**. Biotrasformazione con 1C5 XXIF

L'identificazione è stata ulteriormente confermata per esterificazione con diazometano: il prodotto di reazione S-(-)-metil citronellato (RT = 35.84, GC-MS) è stato identificato da analisi gascromatografica e spettroscopica di massa, confrontando l'indice di Kovats e lo spettro di massa ottenuto con quello presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library.



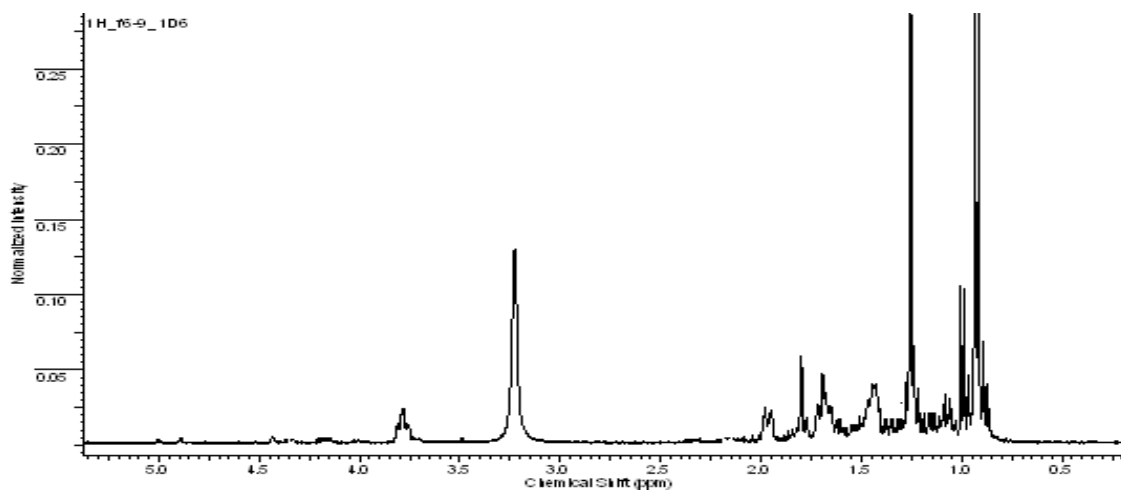
**Figura 21.** Cromatogramma GC-FID della metilazione dell'estratto della biotrasformazione di citronellale con 1C5 XXIF. Formazione di metil citronellato



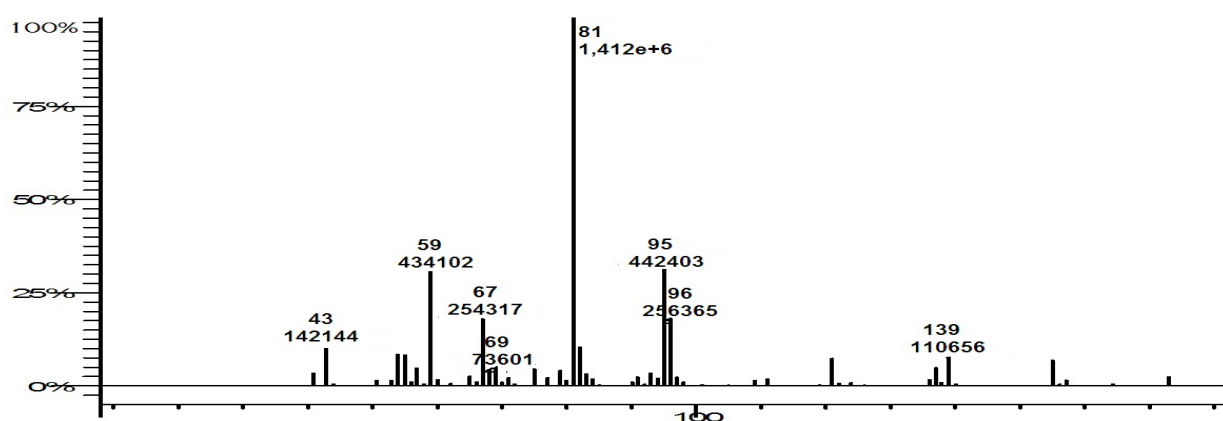
**Figura 22.** Spettro di massa di metil citronellato

I due p-mentan-3,8-dioli **17** e **18** otticamente attivi sono stati preparati da S-(-)-citronellale seguendo il metodo di ciclizzazione con acido solforico al 5%, descritto da H. E. Zimmermann et al. (112) e ripreso da H. Nishimura et al. (113). I prodotti ottenuti raffrontati con quelli di biotrasformazione con il ceppo 1D6VIIF, analizzati in GC-MS con colonna non chirale VF-5MS e con colonna chirale, hanno evidenziato una esatta sovrapposizione.

L'(1*S*,3*R*,4*S*)-mentan-3,8-diolo **17** (69)  $^1\text{H-NMR}$ : 0.87 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.92 (1H, m), 1.06 (1H, m), 1.16 (1H, m), 1.23 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.37 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.64-1.73 (2H, m), 1.75-1.88 (3H, m), 3.12 (2OH, s), 4.41 (1H, pseudoq,  $J = 2.9$  Hz, HCOH) ppm.



**Figura 23.** Spettro di  $^1\text{H-NMR}$  di (*1S*,3*R*,4*S*)-mentan-3,8-diolo **17**. Biotrasformazione con 1D6 VIIF



**Figura 24.** Spettro di massa di (*1S*,3*R*,4*S*)-mentan-3,8-diolo **17**. Biotrasformazione con 1D6 VIIF

L'(1*S*,3*S*,4*S*)-mentan-3,8-diolo **18** (113, 69)  $^1\text{H-NMR}$ : 0.93 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0.98 (1H, m), 1.00-1.10 (2H, m), 1.27 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.44 (1H, m), 1.64-1.73 (2H, m), 1.81 (1H, m) 1.97 (1H, pseudod,  $J = 12.2$  Hz), 3.24 (2OH, s), 3.72 (1H, dt,  $J = 10.6-4.0$  Hz, HCOH) ppm.

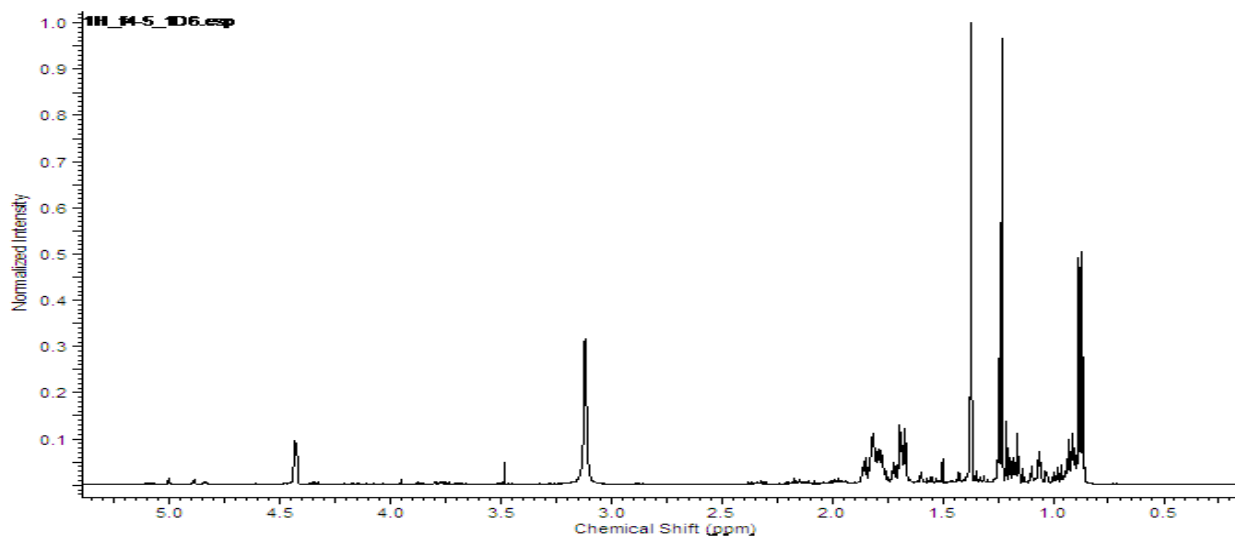


Figura 25. Spettro di  $^1\text{H-NMR}$  di  $(1S,3S,4S)$ -mentan-3,8-diolo **18**. Biotrasformazione con 1D6 VIII F

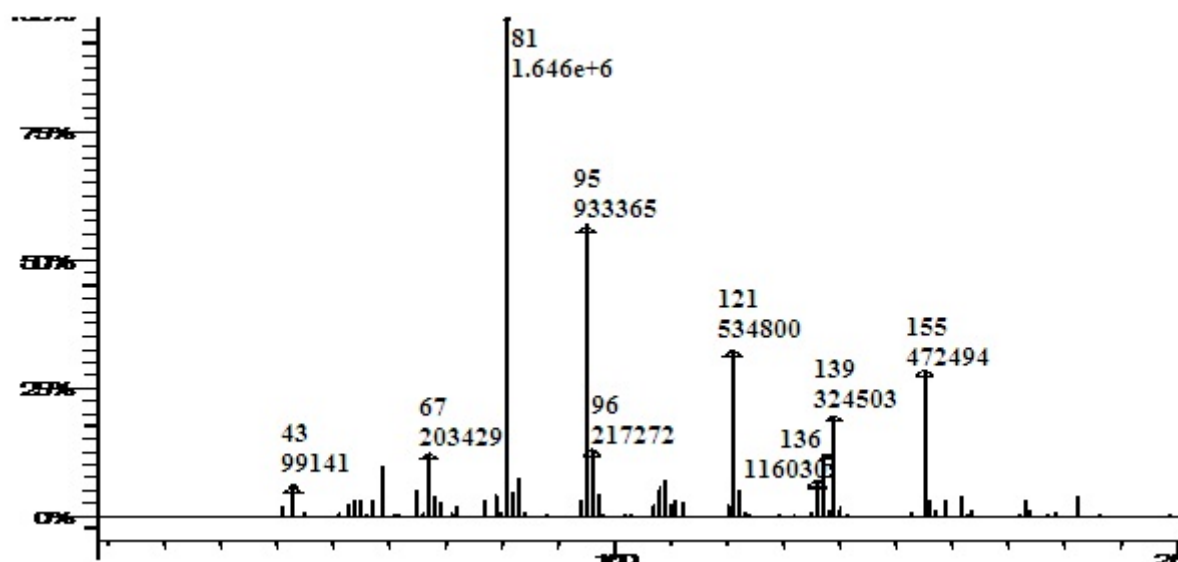


Figura 26. Spettro di massa di  $(1S,3S,4S)$ -mentan-3,8-diolo **18**. Biotrasformazione con 1D6 VIII F

L'identificazione  $(1S,3R,4R)$ -isopulegol **16** è avvenuta per confronto con lo spettro di massa presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library.

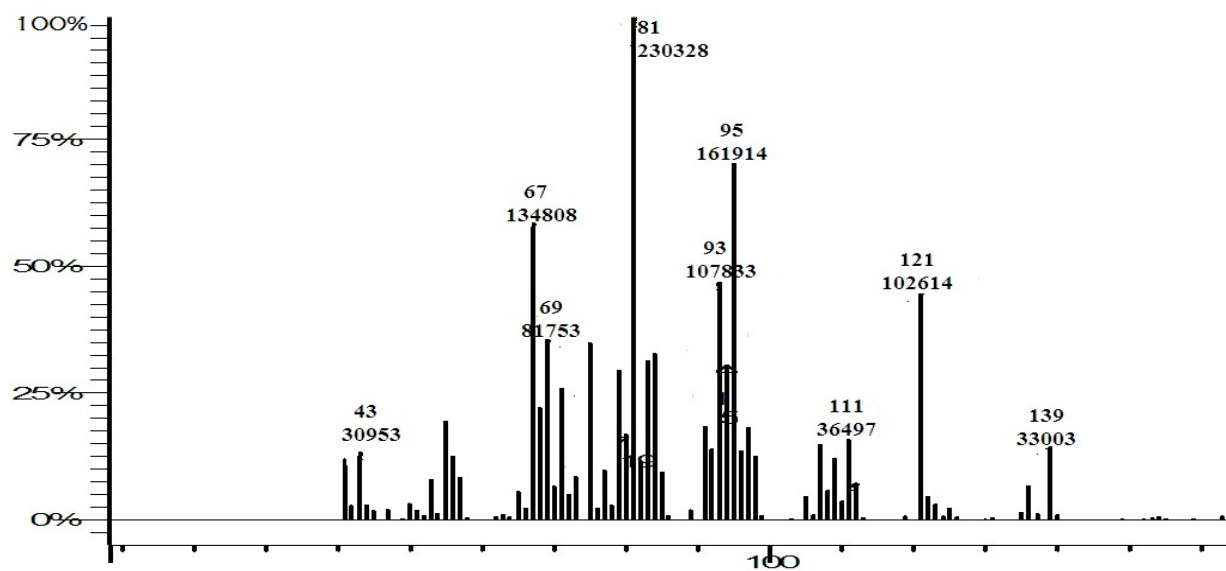


Figura 27. Spettro di massa di (1*S*,3*R*,4*R*)-isopulegol **16**. Biotrasformazione con 1D6 VIIIIF

## **BIOTRASFORMAZIONI DI SABINENE SU SCALA PREPARATIVA**

### ***Procedura generale***

E' stato utilizzato in fase preparativa l'unico ceppo che ha dato prodotti con rese superiori al 20% per confermare le rese e la struttura dei prodotti: 1C22 XIF.

La coltura viene preparata ponendo 100 mL di Sabouraud in una beuta da 300 mL ed inoculando il microrganismo partendo da criovials. Dopo 5 giorni sotto agitazione a 80 rpm alla temperatura di 28-30°C si aggiunge il substrato in concentrazione di 1 g/L [1 mL di una soluzione preparata sciogliendo 0.1 g di sabinene 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO)].

Data la volatilità della molecola utilizzata come substrato, le colture sono state divise in 3 provette con tappo a vite sigillate con parafilm ponendo in ogni provetta 30 mL di coltura corrispondente a 30 mg di prodotto inoculato.

Le colture sono state lasciate in incubazione per altri 5 giorni prelevando campioni (una provetta per prelievo) ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

Le analisi gascromatografiche hanno confermato i prodotti e le rese ottenute in screening. I prodotti sono stati caratterizzati tramite tecnica GC-MS.

L'isolamento di prodotti è stato eseguito per cromatografia su strato sottile (TLC) e su colonna.

Thin Layer Chromatography (TLC): impiegando piastre preparative Kieselgel 60 Merck con indicatore di fluorescenza a 254 nm.

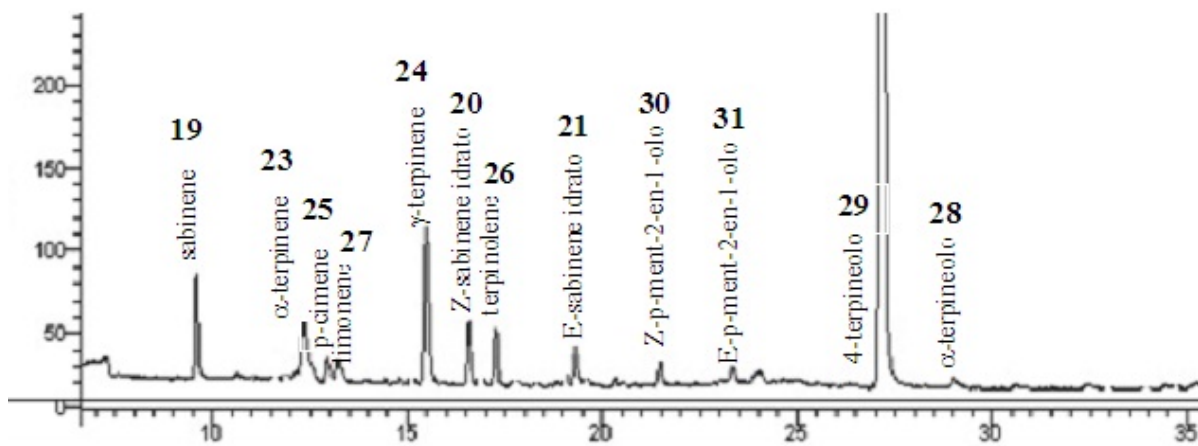
Cromatografia in colonna su gel di silice Kieselgel 60 Merck (70-230 mesh).

Nella tabella seguente sono riportati i dati della biotrasformazione

**Tabella 20.** Biotrasformazioni di sabinene 19

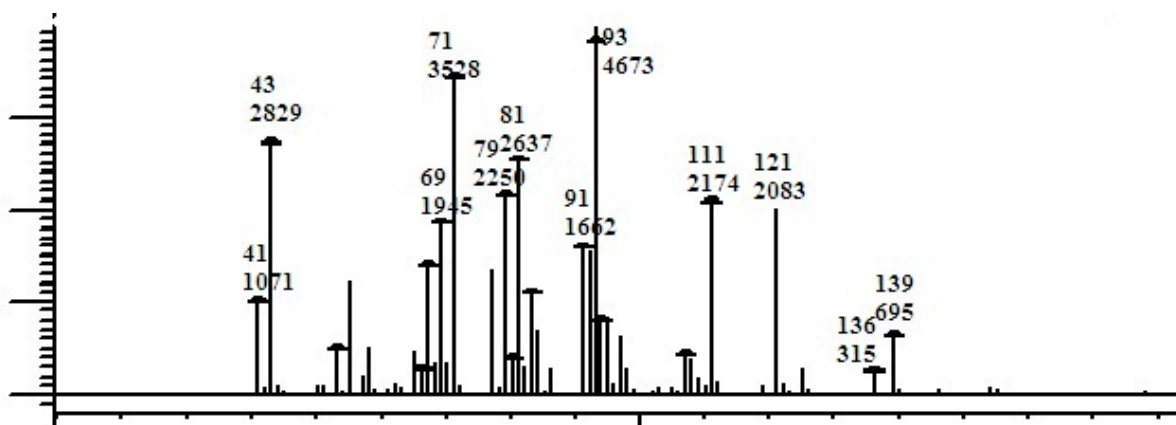
microrganismo	Prodotti (resa %)												
	19	23	25	27	24	20	26	21	22	30	31	29	28
1C22 XIF	5	3	1	1	12	3	1	2		1	1	70	1

**IDENTIFICAZIONE DEI PRODOTTI DELLA BIOTRASFORMAZIONE DI SABINENE**

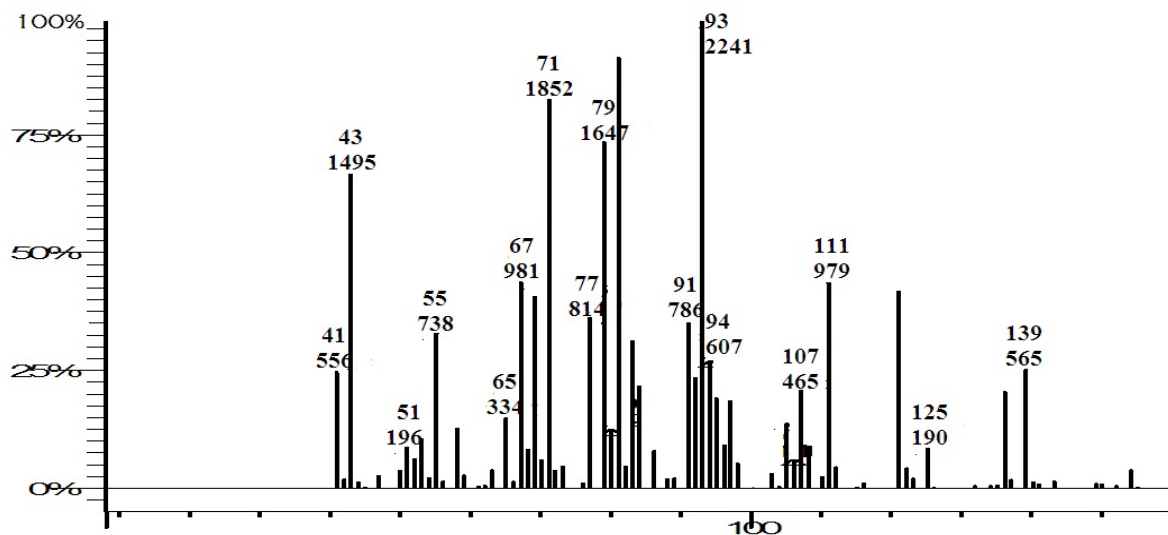


**Figura 28.** Cromatogramma (GC-MS) dei prodotti di biotrasformazione di sabinene con 1C22 XIF

L'identificazione dei prodotti del sabinene è stata eseguita con analisi GC-MS, confrontando l'indice di Kovats e gli spettri di massa ottenuti con quelli noti in letteratura. Sono stati impiegati come standard di riferimento oli essenziali (olio di malaleuca, 40% di 4-terpineolo; olio di agrumi) previamente caratterizzati in cui erano presenti i prodotti di biotrasformazione del sabinene: *Z*-sabinene-idrato **20**, *E*-sabinene-idrato **21**, tuione **22**,  $\alpha$ -terpinene **23**,  $\gamma$ -terpinene **24**, terpinolene, **26**, limonene **27**, 4-terpineolo **29**, *Z*-ment-2-en-1-olo **30**, *E*-ment-2-en-1-olo **31**. Il *Z*-sabinene-idrato **20** e *E*-sabinene idrato **21** sono stati confermati per concordanza con gli spettri riportati da Adams (114).

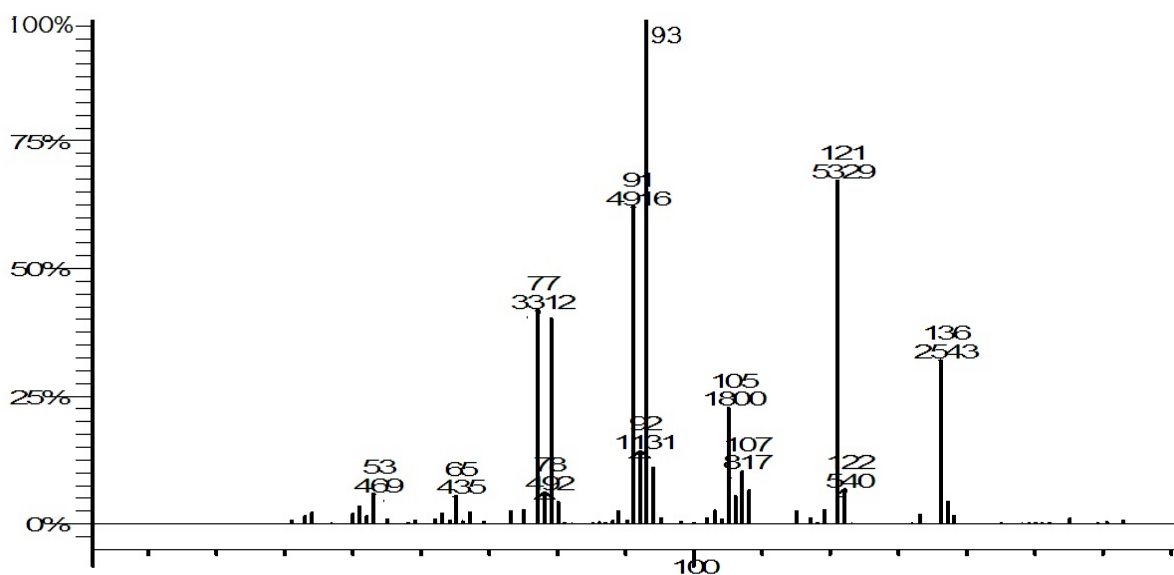


**Figura 29.** Spettro di massa del *Z*-sabinene-idrato **20**. Biotrasformazione con 1C22 XIF



**Figura 30.** Spettro di massa di *E*-sabinene-idrato **21**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

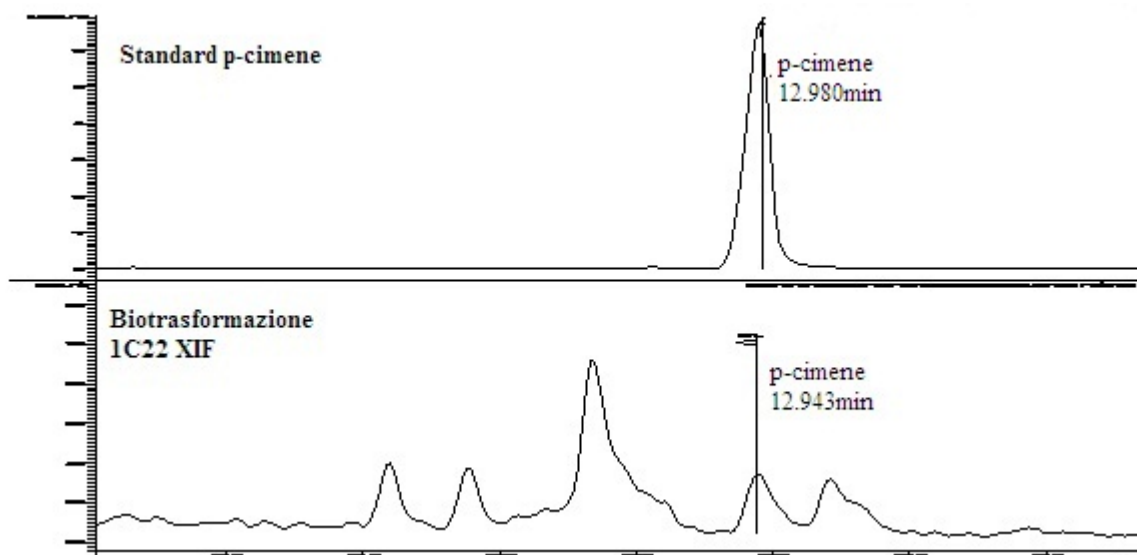
La struttura di  $\alpha$ -terpinene **23** è stata confermata confrontando lo spettro con quello presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library.



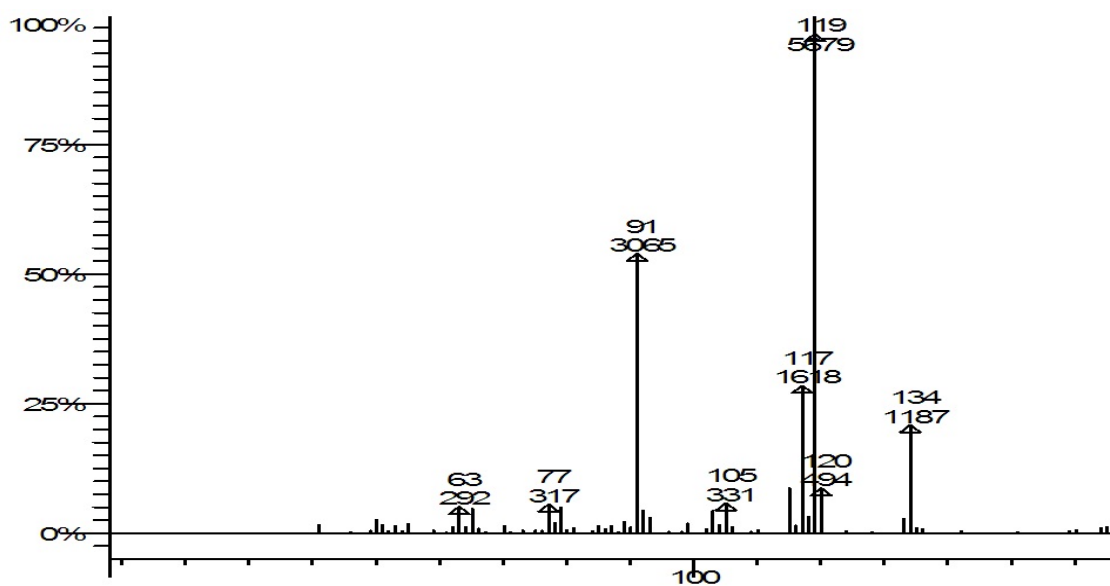
**Figura 31.** Spettro di massa di  $\alpha$ -terpinene **23**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

La struttura di *p*-cimene **25** è stata confermata per confronto con lo spettro di massa dello standard Aldrich.



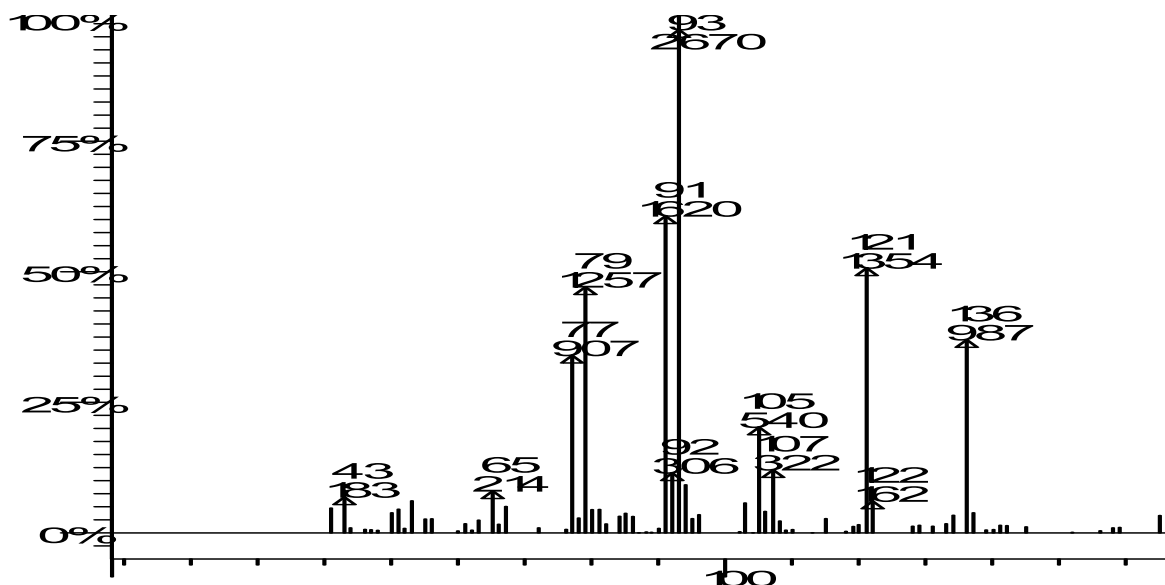


**Figura 32.** Confronto dei tempi di ritenzione (GC-MS) del p-cimene **25** tra lo standard Aldrich e la biotrasformazione con 1C22 XIF



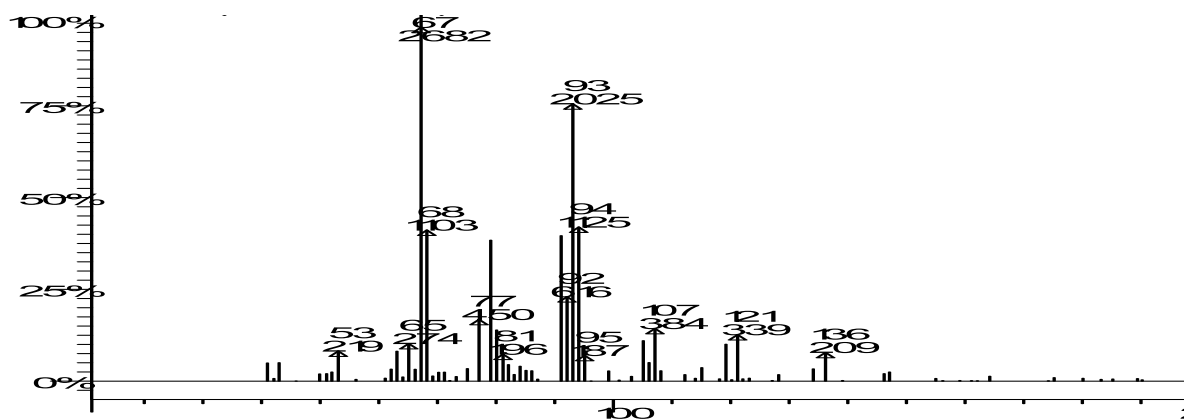
**Figura 33.** Spettro di massa di di p-cimene **25**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

Il terpinolene **26** è stato identificato per concordanza con lo spettro presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library.



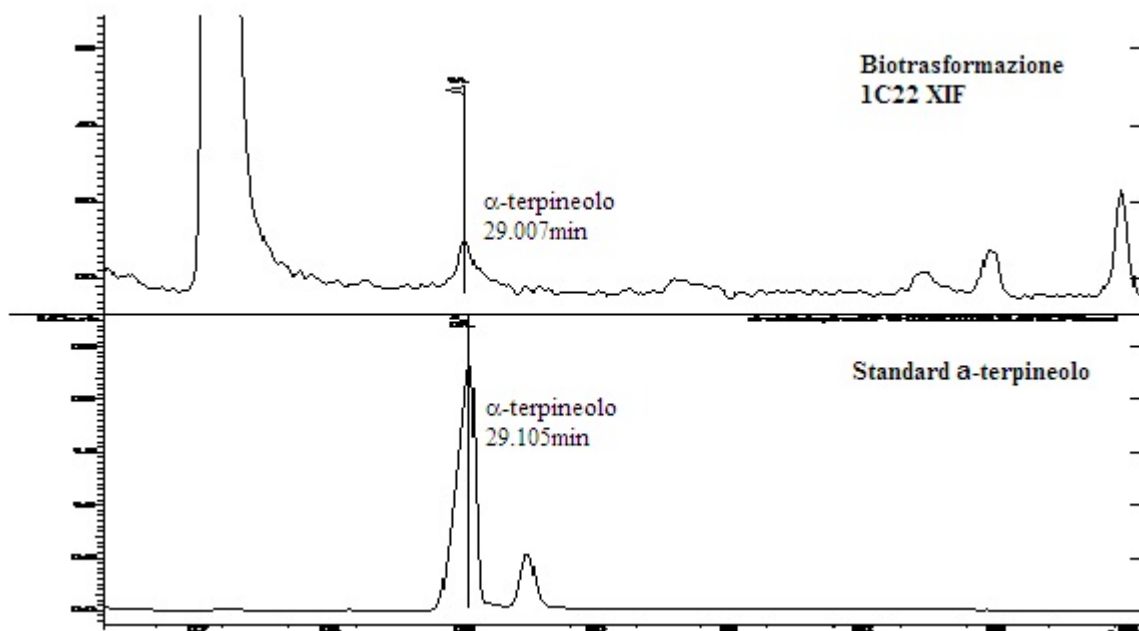
**Figura 34.** Spettro di massa di terpinolene **26**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

Il limonene **27** è stato identificato per confronto con gli spettri presenti nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library, e confronto con lo standard FLUKA.

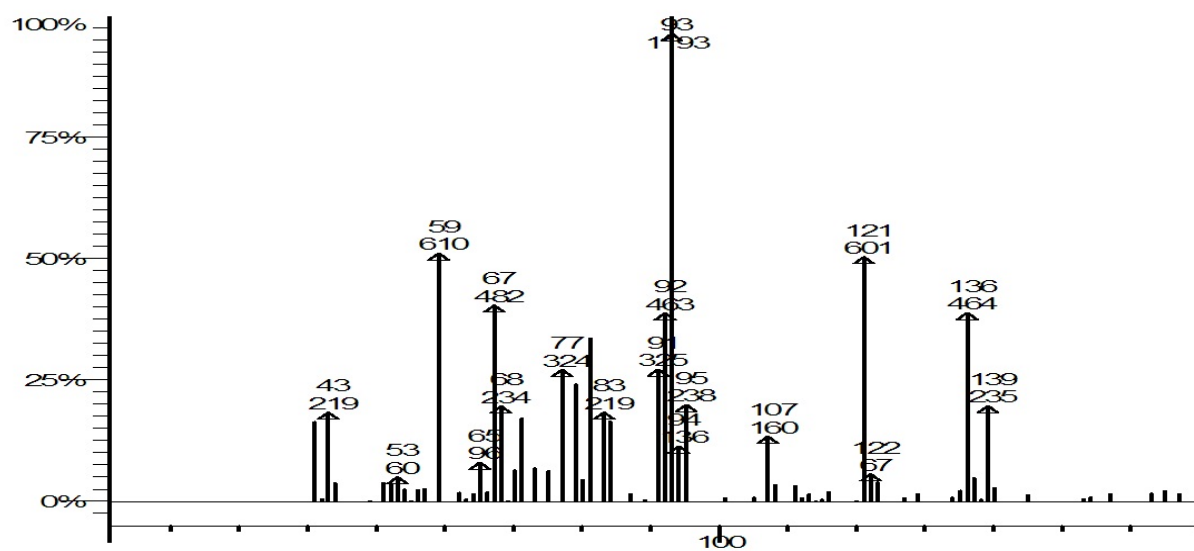


**Figura 35.** Spettro di massa del limonene **27**. Biotrasformazione con 1C22 XIF.

La struttura dell' $\alpha$ -terpineolo **28** è stata determinata con tecnica GC-MS, confrontando il prodotto con lo standard Aldrich, e anche per la corrispondenza con lo spettro di massa riportato da Demyttenaere, 1998 (49).

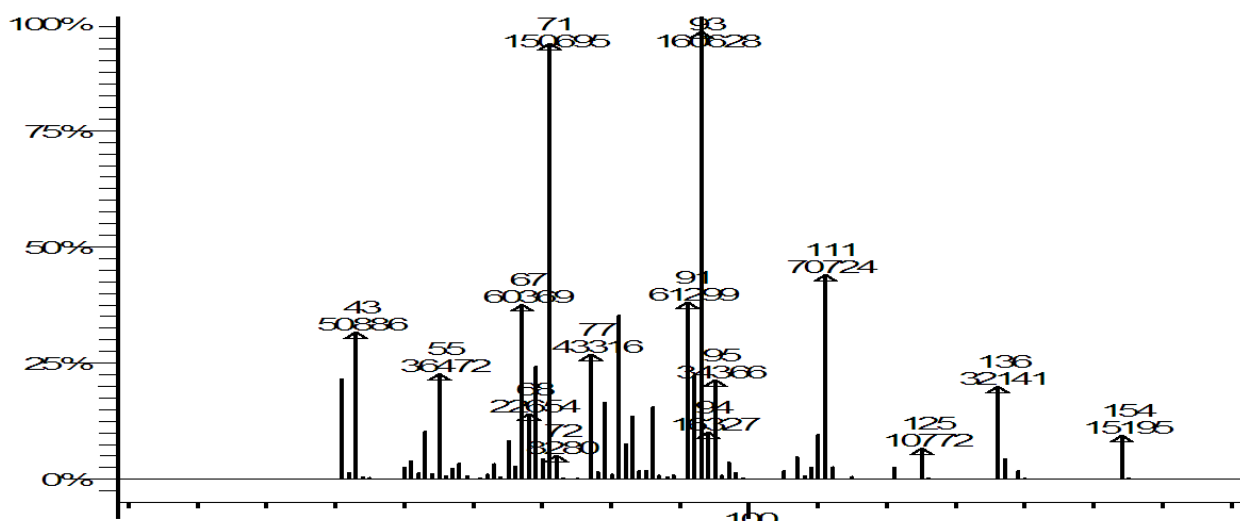


**Figura 36.** Confronto dei tempi di ritenzione (GC-MS) del  $\alpha$ -terpineolo **28** dello standard Kodak e della biotrasformazione con 1C22 XIF



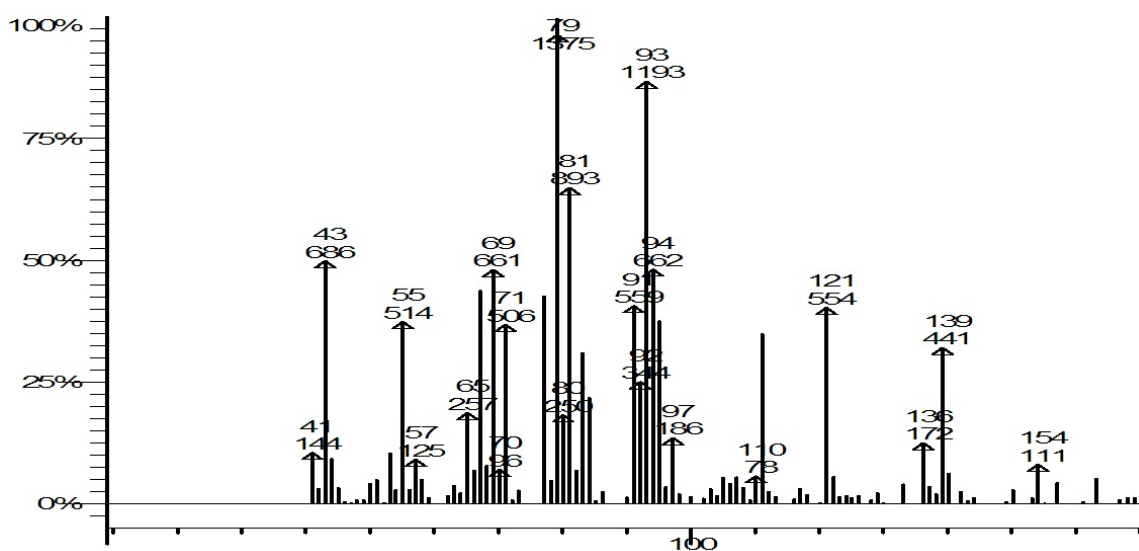
**Figura 37.** Spettro di massa del  $\alpha$ -terpineolo **28**. Biotrasformazione con 1C22 XIF.

Il 4-terpineolo **29** è stato identificato per confronto con lo spettro presente nella banca dati NIST 05 MassSpectral Library e con l'olio di malaleuca che contiene il 40% di 4-terpineolo.

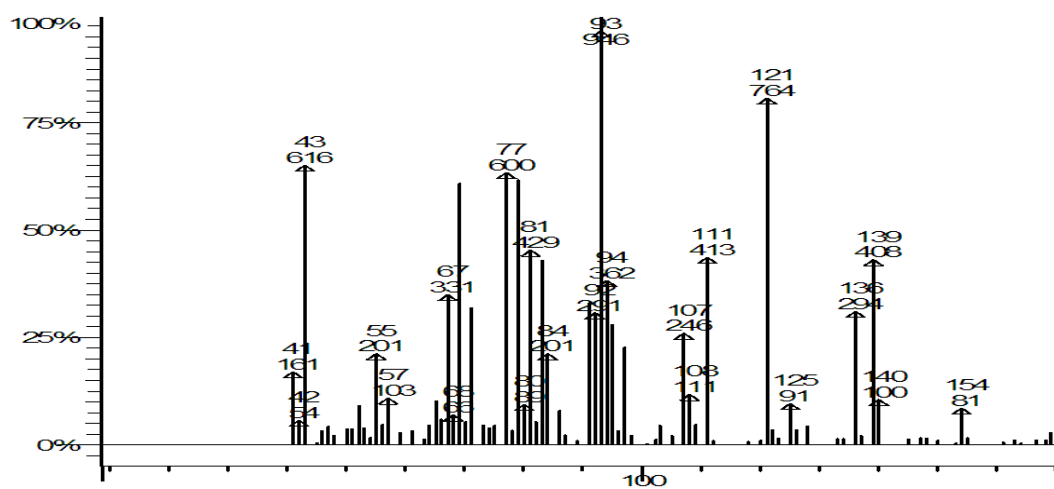


**Figura 38.** Spettro di massa del 4-terpineolo **29**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

Il *Z*-p-ment-2-en-1olo **30** e *E*-p-ment-2-en-1olo **31** sono stati confermati per confronto con gli spettri della banca dati NIST 05 MassSpectral Library.



**Figura 39.** Spettro di Massa del *Z*-p-ment-2-en-1olo **30**. Biotrasformazione con 1C22 XIF



**Figura 40.** Spettro di massa del *E*-p-ment-2-en-1-olo **31**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

### Ceppi mandati all'identificazione CBS

Sono stati spediti al Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) per la loro caratterizzazione i ceppi di funghi che si sono dimostrati attivi nelle biotrasformazioni sui terpeni modello.

Tre dei microrganismi selezionati sono stati isolati da frutti di *Citrus paradisiaca* proveniente dalla comunità di Wasakentsa.



**1D6 VIIIIF**



**2D15 XVIIIIF**



**1D2 XXIIF**

Due ceppi sono stati isolati da *Citrus limon* proveniente dalla comunità di Wasakentsa:



**1C5 XXIF**



**1C22 XIF**

Un ceppo isolato da *Citrus latifolia* proveniente da Wasakentsa.



**1B14 XVIF**

## **BIOTRASFORMAZIONI DEGLI OLI ESSENZIALI**

### ***Citrus limon e Citrus latifolia***

Sono stati utilizzati come substrati per le biotrasformazioni l'olio di *Citrus limon* e l'olio di *Citrus latifolia*, ottenuti in Ecuador presso la Fondazione Chankuap'.

Sono stati impiegati microrganismi selezionati in base ai risultati delle biotrasformazioni con citronellale, con linalolo, e con sabinene.

In base alle biotrasformazioni del linalolo è stato scelto il ceppo 1B14 XVIF in grado di produrre 6-metil-5-epten-2-one e 6-metil-5-epten-2-olo e 1D2 XXIIIF per la capacità di formare gli ossidi di linalolo.

Dalle biotrasformazioni di citronellale si sono selezionati 3 ceppi di funghi e 1 battere: 1D6 VIIF per l'ottenimento dei p-mentan,-3,8-dioli, 2D15 XVIIIIF per il citronello, 1C5 XXIF e 1B9 VIIB per la formazione di acido citronellico.

Dai risultati delle biotrasformazioni con sabinene è stato scelto il fungo 1C22 XIF per la formazione dei prodotti sopradescritti, in particolare il 4-terpineolo.

<b>FUNGHI</b>		
<b>SIGLA</b>	<b>ISOLATO DA</b>	<b>ZONA</b>
1D6 VIIF	<i>Citrus paradisiaca</i>	Wasakentsa
1C22 XIF	<i>Citrus limon</i>	Wasakentsa
1B14 XVIF (*)	<i>Citrus latifolia</i>	Wasakentsa
2D15 XVIIIIF	<i>Citrus paradisiaca</i>	Wasakentsa
1C5 XXIF	<i>Citrus limon</i>	Wasakentsa
1D2 XXIIIF	<i>Citrus paradisiaca</i>	Wasakentsa
<b>BATTERI</b>		
1B9 VIIB	<i>Citrus latifolia</i>	Wasakentsa

(\*) Non è stato testato sulla biotrasformazione con l'olio di *Citrus limon*.

Per la crescita dei microrganismi sono stati utilizzati due terreni di coltura: Sabouraud (Sigma Aldrich) per i funghi e Plate Count Broth (PCB) per i batteri.

Il terreno Sabouraud è stato preparato sciogliendo 30 g di terreno liofilizzato in 1 L di acqua distillata.

Il terreno per i batteri PCB è stato preparato con 2.5 g di yeast extract (Sigma Aldrich), 5.0 g di tryptone per batteriologia e 1.0 g di D-(+)-glucosio (Sigma Aldrich) in 1L di acqua distillata.

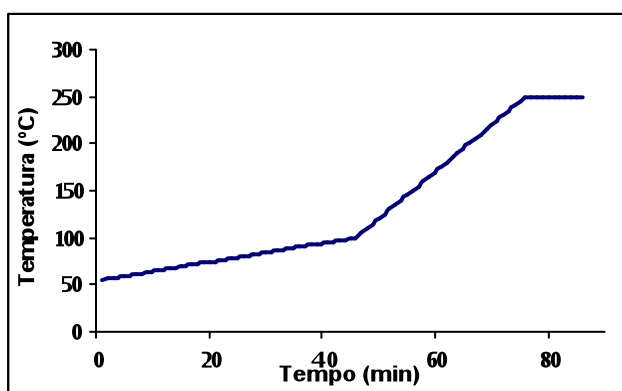
Tutti i terreni sono stati sterilizzati a 120°C per 20 minuti.

Il solvente utilizzato per estrarre le miscele di biotrasformazione è l'etere etilico (Fluka). Per anidrificare l'etere di estrazione viene utilizzato sodio solfato anidro (Fluka).

Tutte le biotrasformazioni sono state seguite per via gascromatografica (GC-FID) o con gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS).

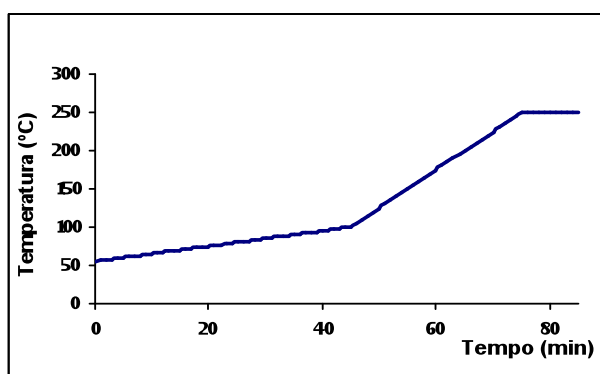
L'analisi GC-FID è stata eseguita con uno strumento GC-TRACE, con una colonna capillare Varian VF-5 con fase stazionaria di poli-5%fenil-95%dimetil-silossano (30 m X 0.25 mm, 0.15 µm film).

Sono state usate le seguenti condizioni: temperatura 55-100°C (1°C/min) e 100-250°C (5°C/min), 250°C (3 min), temp. iniettore 280°C.; He 1 mL/min.



**Grafico 5.** Programmata GC-FID per la biotrasformazione degli oli essenziali

L'analisi GC-MS è stata eseguita utilizzando uno strumento Varian SATURN 4000, dotato di gas cromatografo Varian 3800 con una colonna capillare Varian VF-5 con fase stazionaria di poli-5%fenil-95%dimetil-silossano (30 m X 0.25 mm, 0.15 µm film). L'iniettore è mantenuto a 300°C. Le condizioni: temp. 55-100°C (1°C/min) e 100-250°C (5°C/min).



**Grafico 6.** Programmata GC-MS per la biotrasformazione degli oli essenziali



Le condizioni dello spettrometro di massa sono: EI, 70eV, corrente in emissione 10  $\mu$ Amp, velocità di scansione 1 scan/s, intervallo di massa 20-400 Da, temperatura della trappola ionica 150°C, temperatura della transfer line 300°C.

### ***Procedura generale***

Le colture vengono preparate partendo da 20 mL di Sabouraud come terreno di coltura per i funghi, e 10mL di Plate Count Broth per i batteri, in beute di 50 mL ed inoculando il microrganismo da criovials. Le colture di funghi si lasciano in incubazione per 5 giorni e quelle di batteri per 48 ore alla temperatura di 28-30°C e sotto agitazione (80rpm). Dopo il tempo stabilito di incubazione si aggiunge il substrato in DMSO in concentrazione di 1 g/L.

Data la volatilità di alcuni componenti degli oli essenziali le colture sono state divise in 3 provette con tappo a vite sigillate con parafilm ponendo in ogni provetta 3 mL di coltura corrispondente a 3 mg di prodotto inoculato.

Le colture sono state lasciate in incubazione per altri 5 giorni prelevando campioni (una provetta per prelievo) ad intervalli regolari (1 g, 2 g, 5 g) e analizzandoli al gascromatografo.

I dati di biotrasformazione dell'olio di *Citrus limon* sono riportati nella Tabella 21.

Le biotrasformazioni eseguite utilizzando l'olio essenziale di *Citrus limon* come substrato hanno dato la produzione di  $\alpha$ -terpineolo **28** e 4-terpineolo **29** provenienti del sabinene **19** presente nell'olio essenziale originale. È presente linalolo **1** non reagito e i suoi prodotti di trasformazione 2-metil-2-epten-6-one **10**, 2-metil-2-epten-6-olo **11**, *E*-furanlinalolo ossido **6**, *Z*-furanlinalolo ossido **7** e *Z*-piranlinalolo ossido **9**.

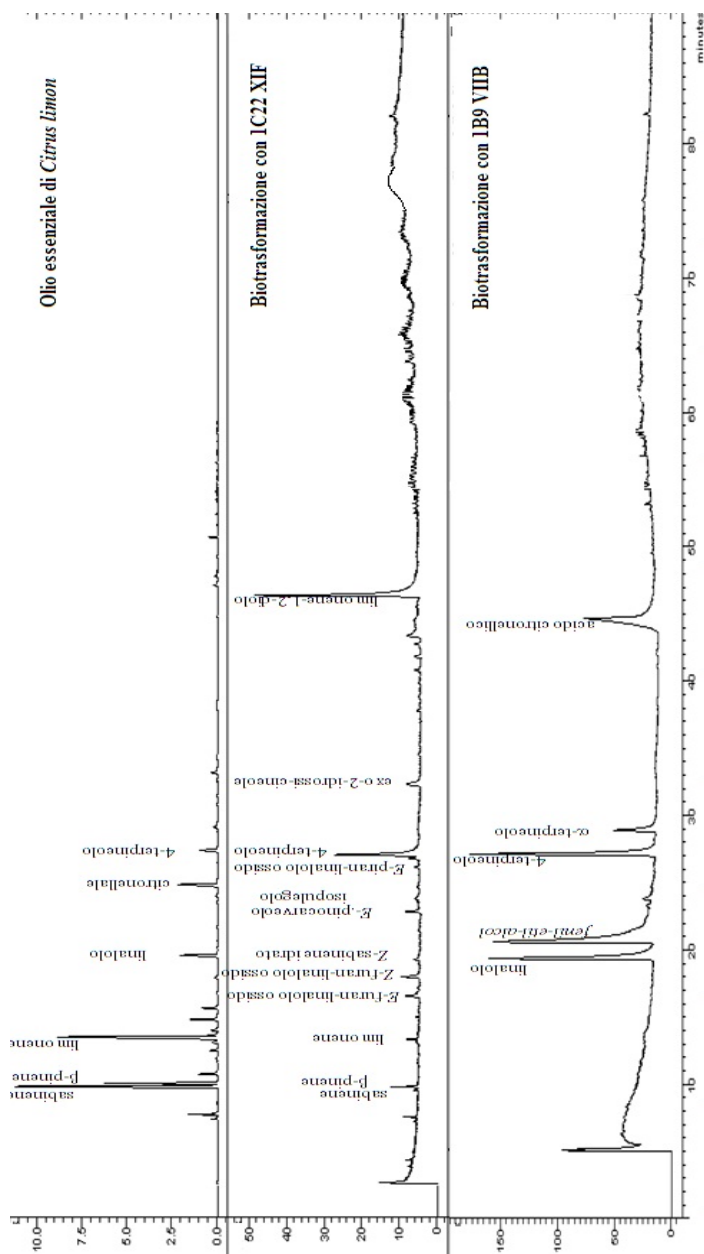
Si sono formati i prodotti di bioconversione del (*S*)-(-)-citronellale **12** (questo enantiomero presente nell'olio essenziale è stato controllato su GC-FID con colonna chirale): *1S,3R,4R*-isopulegolo **16**, *1S,3S,4R*- isopulegolo (neo-isopulegolo) **15**, acido-(*S*)-(-)-citronellico **14**, *1S,3S,4S*-mentan-3,8-diolo **18** e *1S,3R,4S*-mentan-3,8-diolo **17**.

Composti	RT (min)	OE <i>Citrus limon</i>	COMPOSIZIONE OLI BIOTRASFORMATI						
			1D6 VIII F	1C5 XXIF	1B9 VIIB	1C22 XIF	1D2 XXIIF	2D15 XVIII F	
<b>sabinene</b>	<b>11.37</b>	<b>31.2</b>	<b>0.2</b>	<b>8.6</b>				<b>14.3</b>	<b>11.3</b>
4-terpineolo	29.96	2.3	44.2	17.1	22.3	48.3		18.0	17.1
$\alpha$ -terpineolo	31.71	0.5	4.0	3.6	5.8	2.2		4.1	3.9
<i>E</i> -sabinene idrato <sup>a</sup>	21.79					1.53			
<b><math>\beta</math>-pinene</b>	<b>11.62</b>	<b>11.6</b>	<b>3.2</b>	<b>2.6</b>				<b>5.1</b>	<b>3.5</b>
<i>E</i> -pinocarveolo	25.60					2.4			
<b>limonene</b>	<b>15.38</b>	<b>27.4</b>	<b>6.6</b>	<b>7.7</b>				<b>10.1</b>	<b>13.3</b>
limonene 1,2-diolo	48.40		0.5	17.4		21.1		0.8	
<b>1,8-cineolo (eucaliptolo)</b>	<b>15.54</b>	<b>0.67</b>							
2-eso-idrossi-1,8-cineolo <sup>a</sup>	35.22					0.52			
<b>linalolo</b>	<b>21.82</b>	<b>4.8</b>	<b>19.9</b>	<b>1.9</b>	<b>24.4</b>			<b>29.7</b>	<b>28.0</b>
2-metil-2-epten-6-one	12.18								2.0
2-metil-2-epten-6-olo	12.76								2.1
<i>E</i> -furanlinalolo ossido	18.87			10.4		3.2			
<i>Z</i> -furanlinalolo ossido	20.37			18.7		4.9			
<i>E</i> -piranalinalolo ossido <sup>a</sup>	29.00					0.58			
<i>Z</i> -piranalinalolo ossido	29.64					1.7			
<b>citronellale</b>	<b>27.23</b>	<b>5.3</b>							
isopulegolo	26.46	0.2	0.9	1.1	1.2	1.8			
neo-isopulegolo	27.41		0.5						
acido citronellico	46.38		1.7		46.3			3.3	12.4
<i>1S,3S,4S</i> -mentan-3,8-diolo	47.92		0.7						
<i>1S,3R,4S</i> -mentan-3,8-diolo	49.51		1.5						
<i>Prodotti non identificati</i>			0.9	1.2		8.9		4.6	

**Tabella 21.** Prodotti e rese di biotrasformazione con funghi e batteri dell'olio essenziale di *Citrus limon*.(GC-FID, 5 giorni).

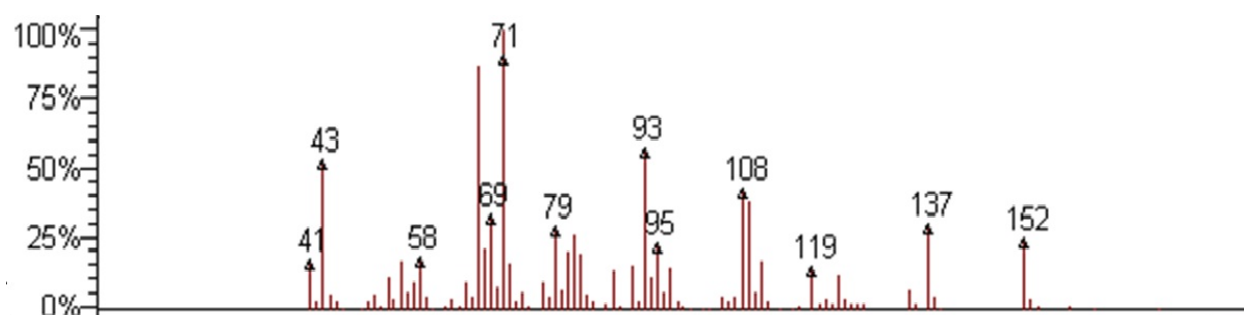
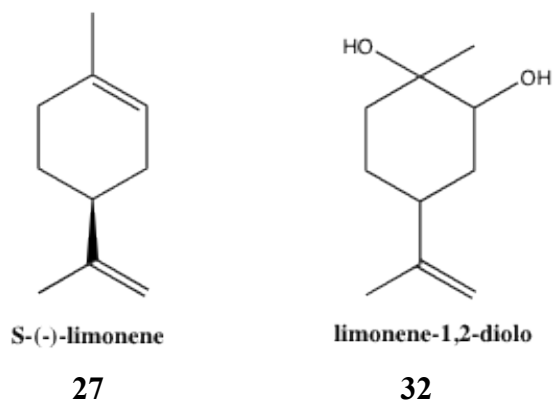
<sup>a</sup>Prodotti e rese presenti dopo 48 ore di biotrasformazione e assenti dopo 5 giorni.

I valori riportati sono relativi non assoluti (senza standard interno).

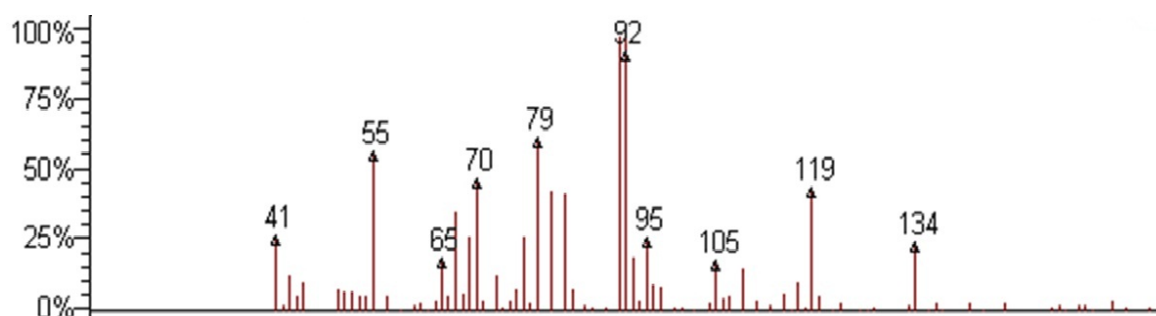
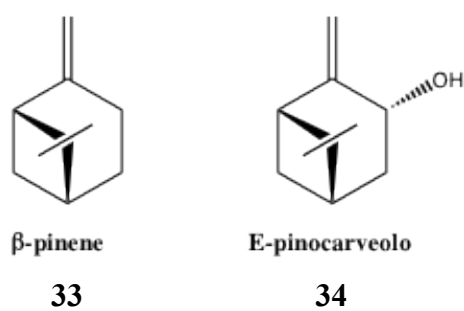


**Figura 41.** Cromatogrammi (GC-MS) dell'olio essenziale di *Citrus limon* e degli oli biotrasformati

Sono state evidenziate altre biotrasformazioni come la bioconversione del (*S*)-(-)-limonene **27** (enantiomero presente negli oli essenziali di agrumi) (**7**) in limonene-1,2-diolo **32** (**115**) e la biotrasformazione di  $\beta$ -pinene **33** in *E*-pinocarveolo **34** (**116**). Questi prodotti sono stati identificati per GC-MS in confronto con gli spettri trovati nella banca dati NIST 05 Mass Spectral Library. Di questi prodotti non è stata stabilita la configurazione stereochimica.

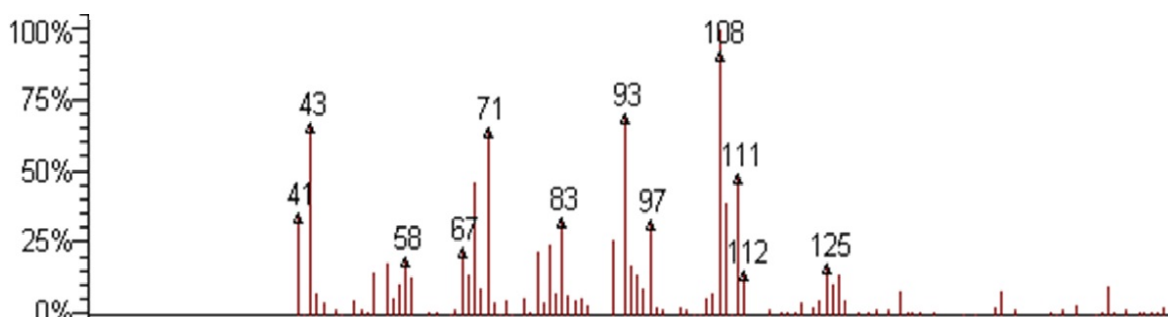
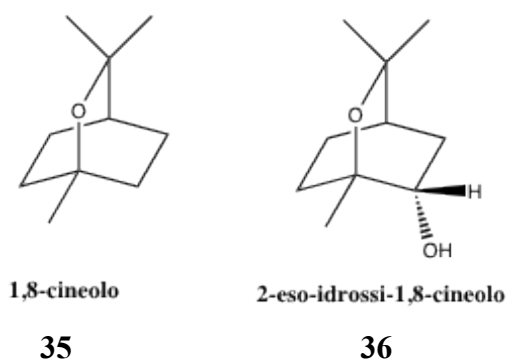


**Figura 42.** Spettro di massa del limonene-1,2-diolo **32**. Biotrasformazione con 1C22 XIF



**Figura 43.** Spettro di massa del E-pinocarveolo **34**. Biotrasformazione con 1C22 XIF (2 giorni)

Con il fungo siglato 1C22 XIF dopo 2 giorni di incubazione si è ottenuto (GC-MS confronto con la banca dati NIST 05 Mass Spectral Library) la formazione di 2-eso-idrossi-1,8-cineole **36** che è un prodotto ossigenato derivato dall'1,8-cineole (eucaliptolo) **35** (117) ed è descritto anche come un prodotto della biotrasformazione del limonene **27** (115), presente nell'olio essenziale di partenza.



**Figura 44.** Spettro di massa del 2-eso-idrossi-1,8-cineole **36**. Biotrasformazione con 1C22 XIF (2 giorni)

Con lo stesso fungo e dopo 2 giorni di reazione è stato prodotto *E*-sabinene idrato **21**, già descritto tra i prodotti provenienti dalla biotrasformazione di sabinene **19**, e *E*-piranlinalolo ossido **8** derivato dal linalolo **1**.

I risultati delle biotrasformazioni dell'olio essenziale di *Citrus latifolia* sono riportati nella **Tabella 22**.

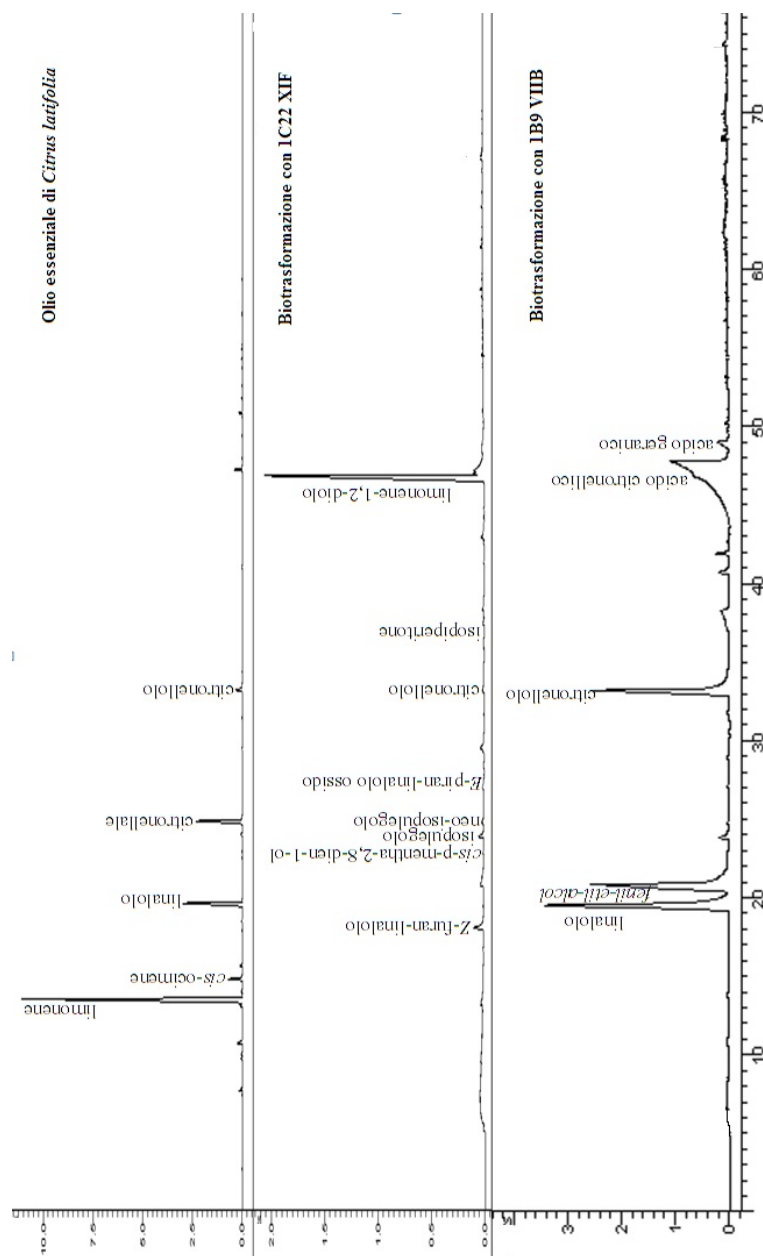
I prodotti derivanti dalla biotrasformazione di linalolo sono 2-metil-2-epten-6-one **10**, 2-metil-2-epten-6-olo **11**, *E*-furanlinalolo ossido **6**, *Z*-furanlinalolo ossido **7**, *E*-piranlinalolo ossido **8**, e *Z*-piranlinalolo ossido **9**. Dalla biotrasformazione del citronellale **12** si ottengono *1S,3R,4R*-isopulegolo **16**, *1S,3S,4R*-isopulegolo (neo-isopulegolo) **15**, (*S*)-(-)-citronello **13**, acido (*S*)-(-)-

citronellico **14**, *1S,3S,4S*-mentan-3,8-diolo **18** e *1S,3R,4S*-mentan-3,8-diolo **17**. Sono ancora presenti i prodotti di partenza che non hanno reagito (linalolo **1** e citronellale **12**) insieme al limonene **27** ed al suo derivato limonene-1,2-diolo **32**.

Composti	RT (min)	OE <i>Citrus latifolia</i>	COMPOSIZIONE OLI BIOTRASFORMATI									
			1C5 XXIF	1D6 VIIIIF	1D2 XXIIIIF	2D15 XVIIIIF	1C22 XIF	1B14 XVIIIF	1B9 VIIIB			
<b>limonene</b>	<b>15.58</b>	<b>65.9</b>	<b>6.2</b>	<b>33.3</b>	<b>1.7</b>	<b>20.6</b>	<b>2.1</b>	<b>54.1</b>				
limonene-1,2diolo	48.43		16.1	0.4	4.7	1.4	88.5	0.2				
<b>linalolo</b>	<b>22.11</b>	<b>13.1</b>	<b>36.3</b>	<b>39.9</b>	<b>55.4</b>	<b>38.0</b>		<b>3.5</b>	<b>37.7</b>			
2-metil-2-epten-6-one	12.16					8.0		11.3				
2-metil-2-epten-6-olo	15.08		0.9					5.8				
<i>E</i> -furanolinalolo ossido	19.03		1.1	0.2	0.6	0.4		0.1				
<i>Z</i> -furanolinalolo ossido	20.39		15.2	0.3	5.6	1.1	5.1	0.3				
<i>E</i> -piranalinalolo ossido	28.97		0.3									
<i>Z</i> -piranalinalolo ossido	29.60		3.3				0.5					
<b>citronellale</b>	<b>27.49</b>	<b>10.1</b>		<b>0.1</b>				<b>0.2</b>				
isopulegolo	26.66	0.3	1.9	1.9	1.7	1.8		0.8				
neo-isopulegolo	27.70	0.1	0.6	0.7	0.5			11.2				
citronello	36.05	2.0	10.0	5.1	6.6	16.0			20.7			
acido citronellico	46.37		5.0	2.8	19.4	4.7		1.7	39.6			
<i>1S,3S,4S</i> -mentan-3,8 diolo	47.96			6.6								
<i>1S,3R,4S</i> -mentan-3,8 diolo	49.67			1.5								
Altri prodotti di biotrasformazione												
cis-p-mentan-2,8-dien-1-olo	26.42						2.2					
geraniolo	38.49					4.1						
isopiperitone	38.99		0.5	0.4								
geraniale	40.47					0.5						
acido geranico	49.36											2.1
<i>Prodotti non identificati</i>			1.1		1.5	0.5	1.7	5.7				

**Tabella 22.** Prodotti e rese di biotrasformazione con funghi e batteri dell'olio essenziale di *Citrus latifolia*. (GC-FID, 5 giorni)

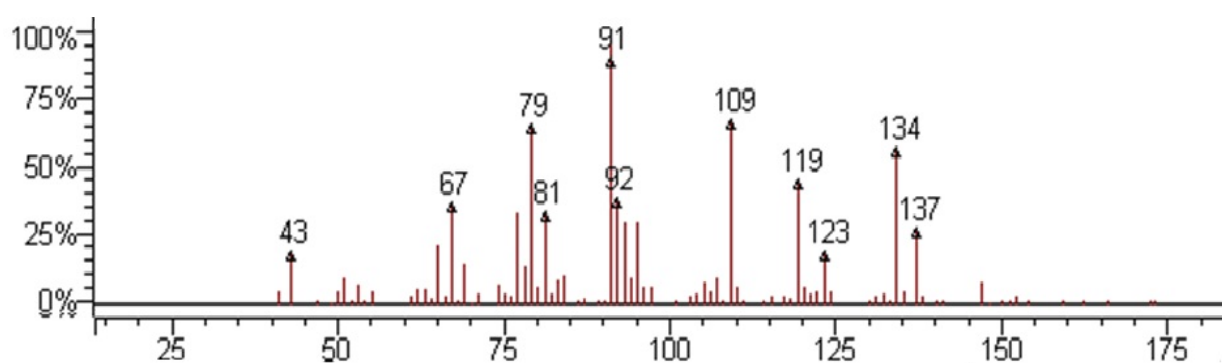
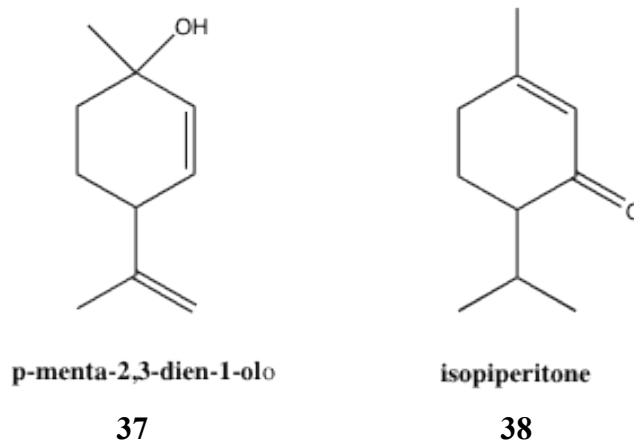
I valori riportati sono relativi non assoluti (senza standard interno).



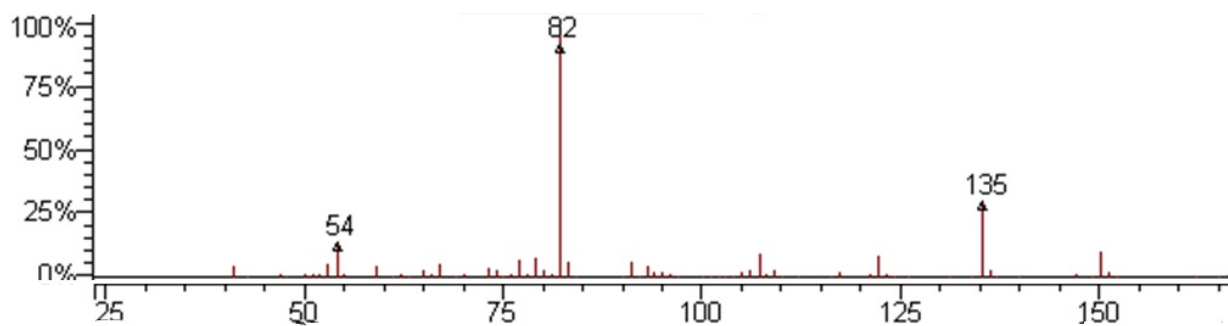
**Figura 45.** Cromatogrammi (GC-MS) dell'olio essenziale di *Citrus latifolia* e degli oli biotrasformati.

Ci sono altri prodotti di biotrasformazione di cui non sono stati identificati i precursori e che si formano in rese basse e sono p-mentha-2-8-dien-1-olo **37** isopiperitone **38**, identificati per GC-MS e confronto con gli spettri della banca dati NIST.



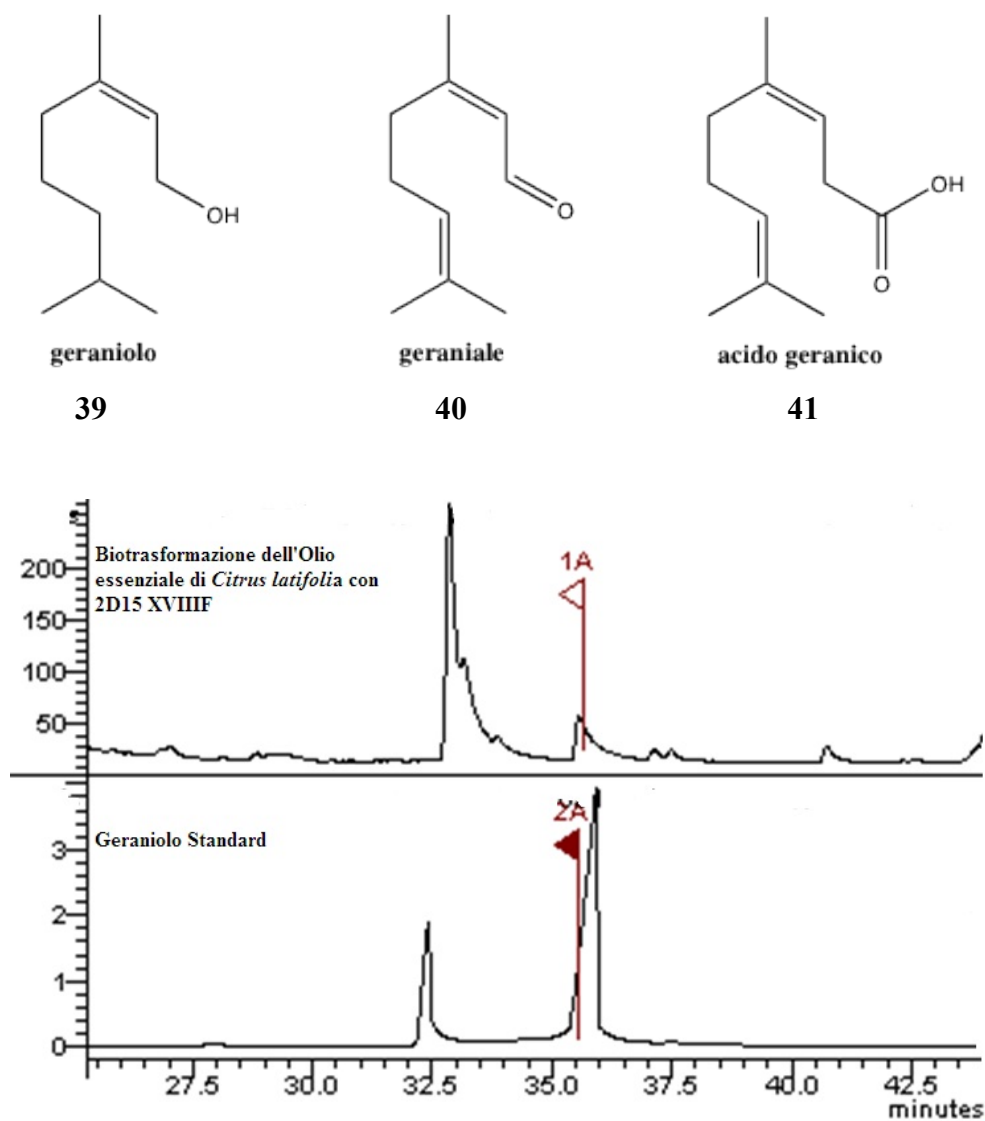


**Figura 48.** Spettro di massa di p-menta-2,8-dien-1-olo **37**. Biotrasformazione con 1C22 XIF

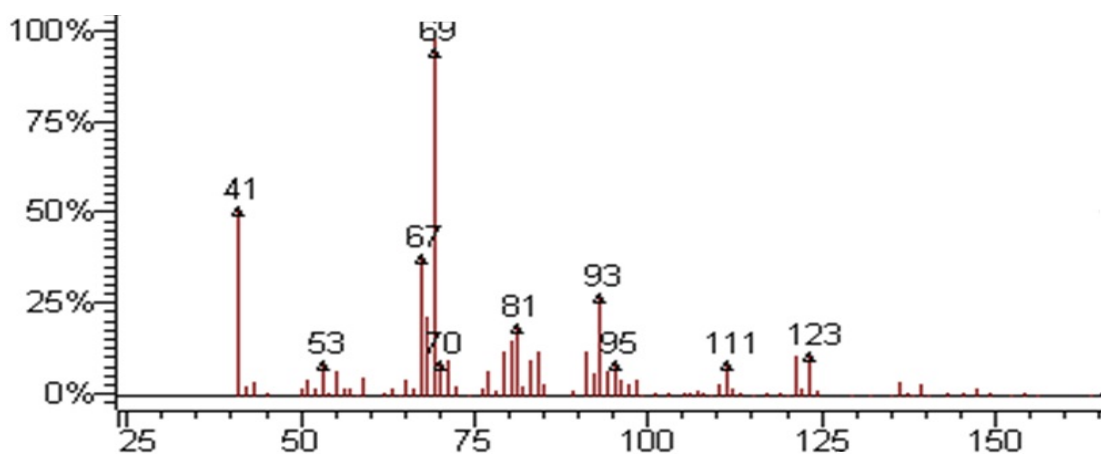


**Figura 49.** Spettro di massa dell'isopiperitone **38**. Biotrasformazione con 1C5 XXIF

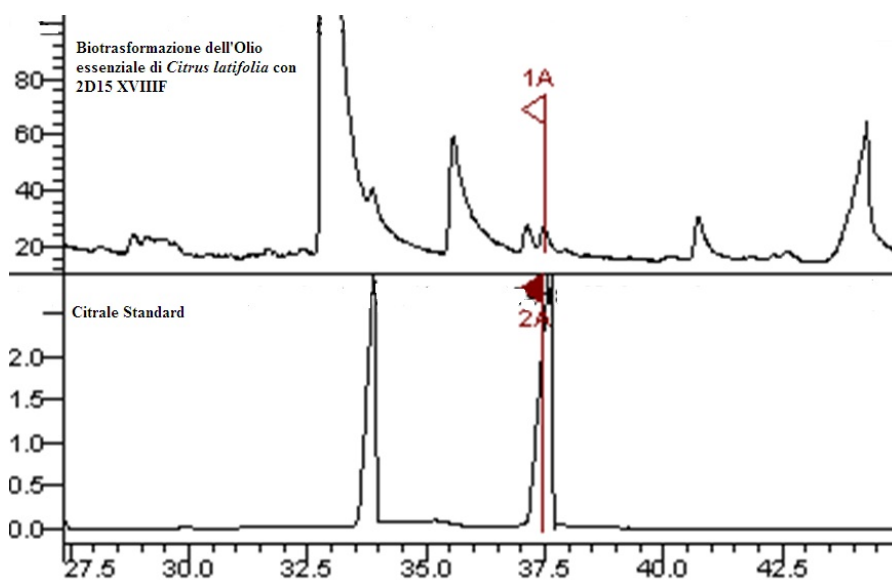
Altri prodotti di biotrasformazione sono il geraniolo **39** e geraniale **40** identificati per confronto con gli spettri di massa e i tempi di ritenzione degli standard geraniolo (Aldrich) e citrale (Aldrich). L'acido geranico **41** è stato identificato per confronto con lo spettro di massa della banca dati NIST 05 Mass Spectral Library.



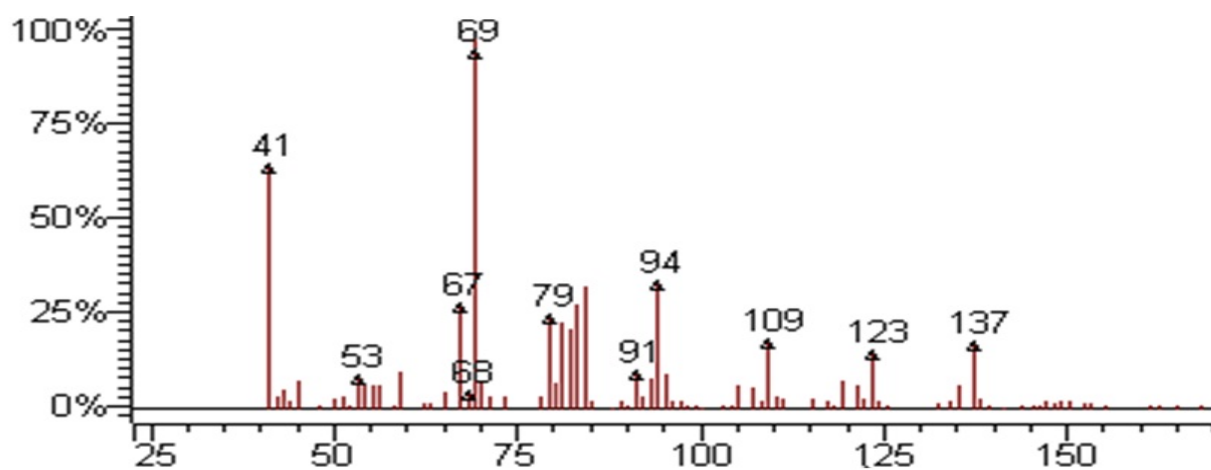
**Figura 48.** Confronto dei tempi di ritenzione (GC-MS) del geraniolo **39** derivante dalla biotrasformazione con 2D15 XVIIIIF e lo standard.



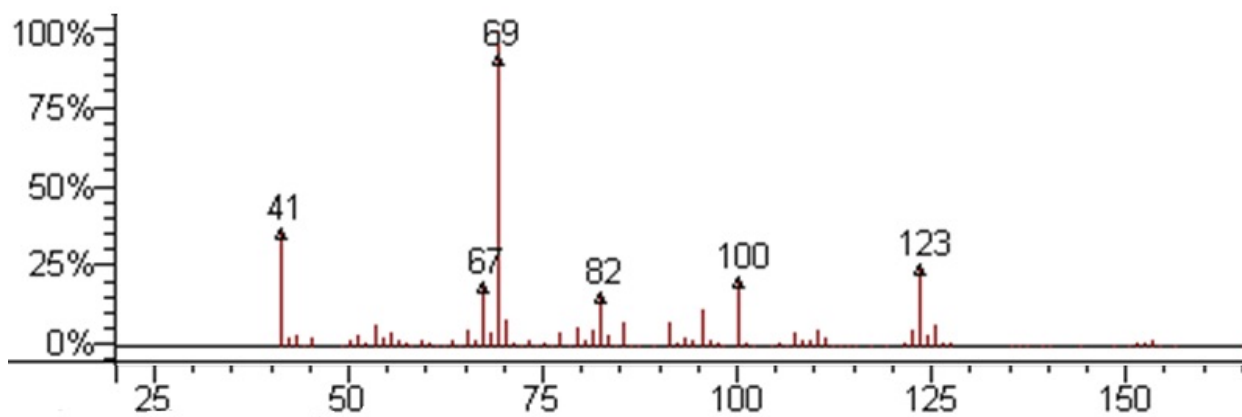
**Figura 49.** Spettro di massa del geraniolo **39**. Biotrasformazione con 2D15 XVIIIIF



**Figura 50.** Confronto dei tempi di ritenzione (GC-MS) del geraniale **40** derivante dalla biotrasformazione con 2D15 XVIIIIF e lo standard



**Figura 51.** Spettro di massa del geraniale **40**. Biotrasformazione con 2D15 XVIIIIF



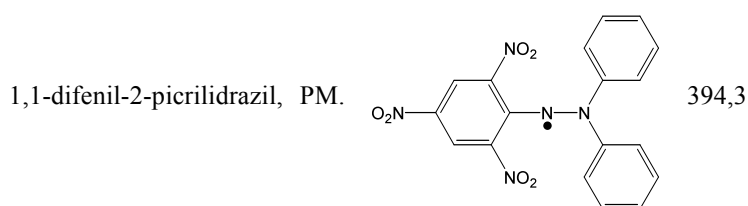
**Figura 52.** Spettro di massa dell'acido geranico **41**. Biotrasformazione con 1B9 VIIB

### **TEST DI ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DPPH**

Per valutare le potenzialità di applicazione degli oli essenziali biotrasformati, si è testata l'attività antiossidante.

Il potere antiossidante degli oli essenziali è stato valutato con il metodo dell'1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH).

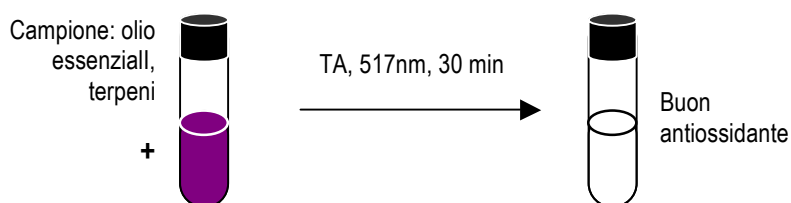
L'attività "radical scavenger" è stata valutata seguendo la procedura riportata da Choi et al. (2000). La procedura prevede la riduzione di un composto radicalico stabile, l'1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) a 517 nm in presenza di composti antiossidanti (donatori di protoni) e la formazione del rispettivo composto non radicalico DPPH-H. Normalmente il DPPH è di colore rosso porpora e l'aggiunta di un agente antiossidante ne determina una decolorazione.



Sono due le modalità di impiego di questo metodo: la determinazione della percentuale di inibizione di ossidazione e il test qualitativo di DPPH su piastra TLC.

#### ***Determinazione della percentuale di inibizione***

L'attività antiossidante è stata valutata come percentuale di inibizione registrata a concentrazione unica. L'attività "radical scavenger" è stata valutata seguendo la procedura riportata da Guerrini et al. (118). Quest'ultima è stata analizzata sugli oli essenziali e sui singoli composti, componenti iniziali e prodotti di biotrasformazione.



#### ***Percentuale di inibizione a concentrazione unica***

L'olio essenziale o i composti terpenici (12.5  $\mu$ L di campione a una concentrazione di 8.33  $\mu$ L/mL) sono stati miscelati con 37.5  $\mu$ L di etanolo e poi con 1.45 mL di soluzione alcolica di DPPH 0.1 mM.

I campioni così ottenuti sono stati agitati in modo vigoroso ed è stata misurata la loro assorbanza alla lunghezza d'onda di 517 nm con uno spettrofotometro UV-VIS (ThermoSpectronic Helios  $\gamma$ , Cambridge, UK) dopo 30 minuti di reazione. Come controllo negativo è stata usata la soluzione d'analisi descritta precedentemente senza olio essenziale.

L'attività antiradicalica di ogni campione è stata calcolata come percentuale di inibizione del DPPH secondo la seguente equazione (Yen and Duh 1994):

$$\% \text{ inibizione} = 1 - (A_A/A_B) \times 100$$

Dove  $A_A$  e  $A_B$  rappresentano rispettivamente i valori di assorbanza del DPPH con e senza estratto.

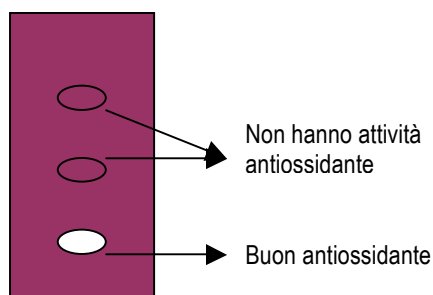
#### ***Test Qualitativo di DPPH su piastra TLC***

Come metodo analitico nella determinazione qualitativa dell'attività antiossidante degli oli essenziali non alterati e biotrasformati è stata adottata l'analisi su piastra TLC (Thin Layer Chromatography), in quanto particolarmente veloce e applicabile con quantità piccole di campioni.

Le lastre TLC utilizzate per l'analisi erano Merck gel di silice 60, 10  $\times$  20 cm, con indicatore di fluorescenza. Lo sviluppo delle lastre è stato realizzato in una camera cromatografia sigillata e satura dei vapori del solvente di sviluppo. Lo sviluppo è stato effettuato con la seguente miscela di solventi: toluene/etil acetato 93 : 7. Le lastre vengono derivatizzate con una soluzione al 50% di acido solforico etanolic 10% e 50% di vanillina etanolic 1% (Wagner, 2001) per vedere i composti terpenici e con soluzione etanolic di DPPH concentrazione 1mM (40mg/100 mL). Sulla lastra sono stati depositati sia gli oli essenziali sia gli standard commerciali o preparati. Gli standard utilizzati per la ricerca dell'attività antiossidante sono stati: linalolo, limonene, citronellale, e sabinene come componenti degli oli, e acido citronellico, ossidi di linalolo, 4-terpineolo come prodotti di biotrasformazione. L'olio essenziale di *Thymus vulgaris* è stato utilizzato come controllo positivo.

Per la deposizione dei campioni sulla lastra è stato utilizzato un microdepositore automatico Linomat IV (Camag). L'identificazione qualitativa delle bande è stata effettuata per confronto delle bande ottenute dalla separazione cromatografica dei campioni, con gli standard eluiti alle stesse condizioni, registrando e confrontando ad ogni eluizione le corrette distanze di migrazione dei campioni e degli standard. L'osservazione della lastra e l'identificazione è stata eseguita utilizzando un visore equipaggiato con lampada UV alla lunghezza d'onda di 365 nm e 254 nm (Camag Reprostar II).

L'attività antiossidante è evidenziata per la decolorazione della piastra per la riduzione del DPPH, al posto di una macchia di Rf conosciuto e identificabile per confronto con gli standard dell'analisi di identificazione.



Questo metodo, già in uso nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi, ha rivelato limiti di applicazione sugli oli essenziali con percentuali di terpeni altamente volatili (sabinene e limonene). Nel tempo necessario per l'eluizione e lo sviluppo della lastra la maggior parte di questi terpeni evapora. Il test non è quindi significativo.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**



Il centro Cooperazione allo Sviluppo dell'Università di Ferrara ha in essere da alcuni anni progetti di ricerca in collaborazione con il VIS (Volontariato Internazionale Sviluppo) riguardanti la valorizzazione della biodiversità come fonte di sviluppo delle popolazioni Achuar e Shuar della foresta amazzonica (Ecuador). L'Ecuador è un mosaico di regioni dove si concentra una grande biodiversità. Il territorio Achuar rappresenta uno delle ultime foreste primarie che collega le Ande con la foresta amazzonica di Perù e Brasile. Il progetto di ricerca svolto in questo ambito coniuga da un lato un trasferimento di saperi e di tecnologie alla Fondazione Chankuap, partner del progetto di sviluppo, e dall'altra pone le basi della nascita di piccole imprese locali di recupero e valorizzazione degli scarti.

La mia tesi di dottorato si inserisce all'interno del progetto di collaborazione dell'Università di Ferrara con la Fondazione Chankuap per la valorizzazione dei prodotti di origine amazzonica quali gli oli essenziali estratti da piante della comunità Achuar.

I microrganismi e gli oli essenziali impiegati in questo lavoro di tesi hanno la particolarità di provenire da una zona di grande biodiversità, quindi potenzialmente hanno caratteristiche diverse da quelle di altri paesi, ed essendo poco studiate costituiscono un ottimo materiale di partenza per ricerche in diversi campi come quello biotecnologico.

Il mio lavoro di tesi è stato realizzato in due fasi. Una prima fase si è svolta in Ecuador ed ha riguardato la produzione e la caratterizzazione di oli essenziali di piante della regione amazzonica e il campionamento di microrganismi adatti alle biotrasformazioni di questi ultimi. La seconda parte si è svolta a Ferrara e ha riguardato le biotrasformazioni degli oli essenziali e dei terpeni in essi contenuti con i microrganismi selezionati nella foresta amazzonica.

L'estrazione degli oli essenziali utilizzati in questa tesi è stata fatta presso la Fundación Chankuap' in Ecuador durante il periodo in cui ho lavorato presso il Dipartimento di Trasformazione.

La produzione degli oli essenziali è un'attività che è stata messa in pratica grazie a progetti svolti dalla Fundación Chankuap con partner internazionali che lavorano nella provincia di Morona Santiago dal 1996, allo scopo di commercializzare i prodotti dei piccoli produttori, dare un valore aggiunto ai prodotti stessi, trasferire le tecnologie applicate, e in questo modo migliorare le condizioni socio-economiche della popolazione locale tramite la valorizzazione delle risorse naturali.

Gli oli essenziali di foglie di agrumi quali limone (*Citrus limon*), limone dolce (*Citrus latifolia*) arancia (*Citrus aurantium*), pompelmo (*Citrus paradisiaca*) e gli oli di ishpingo (*Ocotea quixos*)

e di “anis de árbol” (*Ocotea bofo*) vengono distillati, utilizzati come componenti dei cosmetici prodotti dalla stessa fondazione e venduti in Ecuador in varie forme cosmetiche. I prodotti che vengono commercializzati in Italia sono saponi al profumo di agrumi.

Il miglioramento di questi oli essenziali per valorizzarne le potenzialità di impiego può portare un beneficio alle popolazioni indigene dell'amazzonia come gli Achuar ed è una delle motivazioni di questa tesi. In questo ambito le biotrasformazioni degli oli, utilizzando microrganismi provenienti dalla stessa foresta amazzonica, può essere il modo per ottenere nuovi prodotti con nuove caratteristiche.

Per quanto riguarda i microrganismi, l'ambiente in cui si sviluppano può influenzare il loro patrimonio enzimatico e di conseguenza determinare le capacità di utilizzare nuovi substrati che la stessa specie proveniente da altre zone non è in grado di fare. D'altra parte trattandosi di una zona scarsamente studiata la ricerca può condurre all'isolamento e caratterizzazione di nuove specie di funghi o batteri come è stato fatto dal gruppo di ricerca in cui ho lavorato. I microrganismi selezionati (*Aspergillus amazzonicus*, *A. quitensis* e *A. ecuadorensis*) (119), sono stati utilizzati successivamente in biotrasformazioni di biciclo eptenoli (120)

Inizialmente il mio interesse ha riguardato l'olio di ispingo (*Ocotea quixos* (Lam.) Kostern. (Lauraceae)) e come già ribadito nella parte introduttiva del mio lavoro di tesi quest'olio essenziale rappresenta uno dei prodotti di maggior interesse nei progetti mirati allo sviluppo sostenibile del popolo Achuar. Durante lo svolgimento del mio dottorato di ricerca ho potuto approfondirne la caratterizzazione fitochimica e, all'interno di una collaborazione esistente tra l'Università di Parma e quella di Ferrara, assistere alla fase di sviluppo delle potenzialità applicative di questo fitocomplesso.

L'olio di *Ocotea* come quelli di agrumi sono stati caratterizzati con la metodologia GC-MS per confronto con spettri di massa della banca dati NIST 05 Mass Spectral Library e Indici di Kovats riportati in letteratura (111). Gli Indici di Kovats sperimentali sono stati determinati iniettando una miscela commerciale 24 idrocarburi alifatici. La composizione dell'olio di ispingo è riportata nella **Tabella 1** (121).

Composti	% Area
trans-cinnamaldeide	27.8
metilcinnamato	21.6
limonene	4.9
p-cimene	4.8
linalolo	3.2
1,8-cineolo	3.2
$\alpha$ -pinene	3.1
benzaldeide	3.1

**Tabella1.** Composizione GC-MS dell'olio essenziale di *Ocotea quixos*

In questo lavoro oltre alla caratterizzazione dell'olio è stato fatto un approfondimento del profilo fitochimico mediante il fingerprinting metabolomico NMR del fitocomplesso per ottenere un ulteriore dato di caratterizzazione oltre al GC-MS, tale da definire la possibile frode del prodotto in oggetto. Attualmente sono disponibili differenti metodologie cromatografiche e spettroscopiche per individuare un fingerprinting di un olio essenziale: la cromatografia ad alta risoluzione come HPTLC ( che presenta limiti applicativi in presenza di composti molto volatili), la gas-cromatografia accoppiata alla massa (GC-MS), oppure la risonanza magnetica nucleare che in particolare può consentire di rilevare eventuali adulteranti non volatili e presenta il vantaggio di essere molto rapida e riproducibile. La caratterizzazione e l'approfondimento del profilo fitochimico mediante fingerprinting metabolomico sono stati oggetto di pubblicazione (V. Ballabeni, M. Tognolini, S. Bertoni, R. Bruni, A. Guerrini, G. Moreno Rueda, E. Barocelli, *Pharmacological Research* **55**, 23-30, 2007, ref. 121)

Per quanto riguarda gli oli essenziali di agrumi nel mio lavoro di tesi sono stati caratterizzati via GC e GC-MS gli oli essenziali di *Citrus limon*, *Citrus latifolia*, *Citrus aurantium*, *Citrus nobilis* (vedi Materiali e metodi). Come esempio nella **Tabella 2** è riportata la composizione dell'olio di *Citrus limon*.

Composti	KI	RT (min)	Area %	Composti	KI	RT (min)	Area %
$\alpha$ -tuiene	930	7.333	0.579	cis-piperitolo	1196	30.74	0.109
$\alpha$ -pinene	939	7.67	2.717	Nerolo	1230	32.649	0.068
canfene	954	8.475	0.082	Citronello	1226	33.148	1.159
sabinene	975	9.715	<b>27.844</b>	Nerale	1242	34.291	0.198
$\beta$ -pinene	979	9.961	<b>11.153</b>	Geraniale	1267	37.907	0.09
$\beta$ -mircene	991	10.682	2.04	citronellil formiato	1274	38.478	0.02
$\Delta^2$ -carene	1002	11.567	0.029	$\delta$ -elemene	1341	44.804	0.077
$\alpha$ -fellandrene	1003	11.73	0.088	citronellil acetato	1353	47.126	0.471
isosilvestrene	1009	11.829	0.222	neril acetato	1362	47.82	0.369
$\alpha$ -terpinene	1017	12.448	0.886	$\beta$ -elemene	1391	49.257	0.145
p-cimene	1025	13.037	0.779	$\beta$ -cariofillene	1419	50.725	0.736
limonene	1029	13.406	<b>26.155</b>	trans- $\alpha$ -bergamotene	1435	51.624	0.062
eucaliptolo	1031	13.627	0.894	$\alpha$ -cariofillene	1455	52.445	0.113
$\Delta^3$ -carene	1031	13.943	0.793	germacrene D	1485	53.559	0.116
cis-ocimene	1037	14.761	3.283	biciclogermacrene	1500	54.137	0.184
$\gamma$ -terpinene	1060	15.618	1.868	$\beta$ -guaiene	1503	54.338	0.023
cis-sabinene idrato	1070	16.695	0.158	germacrene A	1509	54.559	0.057
terpinolene	1089	17.854	0.423	$\beta$ -bisabolene	1506	54.726	0.129
linalolo	1097	19.575	<b>5.381</b>	$\delta$ -cadinene	1523	55.038	0.061
cis-p-ment-2-en-1-olo	1122	21.606	0.105	$\beta$ -sesquifellandrene	1523	55.26	0.02
cis-limonene ossido	1137	22.423	0.022	$\beta$ -vetivenene	1533	55.725	0.026
trans-limonene ossido	1142	23.156	0.089	germacrene B	1561	56.302	0.138
trans-p-ment-2-en-1-olo	1141	23.715	0.196	(-)-spatuleno	1578	56.92	0.077
citronellale	1153	24.774	<b>6.208</b>	cariofillene ossido	1583	57.05	0.042
4-terpineolo	1177	27.356	2.645	$\beta$ -atlantolo	1608	58.476	0.041
$\alpha$ -terpineol	1189	29.099	0.669	<b>TOT ID</b>			<b>99.839</b>

**Tabella 2.** Analisi GC-MS dell'olio essenziale di *Citrus limon*

Si può notare che in un olio essenziale sono presenti una grande quantità di componenti, alcuni in quantità apprezzabili ed altri in tracce. I componenti principali determinano le caratteristiche organolettiche e le funzioni degli oli.

Nella **Tabella 3** viene riportata la composizione dei principali prodotti degli oli essenziali del genere *Citrus* che sono stati studiati in questa tesi.

Composti	<i>C. latifolia</i>	<i>C. aurantium</i>	<i>C. limon</i>	<i>C. nobilis</i>
Sabinene	0.3	27	28	2
$\beta$ -pinene	0.2	3	11	3
Isosilvestrene	$\leq 0.1$	9	0.2	-
Limonene	63	6	26	12
cis-ocimene	3	6	3	5
$\gamma$ -terpinene	0.5	7	2	19
Linalolo	14	8	5	20
Citronellale	11	0.3	6	-
4-terpineol	$\leq 0.1$	8	3	0.3
metil N-metil antralinato	$\leq 0.1$	$\leq 0.1$	-	16

**Tabella 3.** Componenti principali degli oli essenziali di agrumi.

Gli oli essenziali del genere *Citrus* contengono principalmente monoterpeni e differiscono solo nelle concentrazioni dei loro componenti.

Nell'olio essenziale di *Citrus latifolia* il composto principale è il limonene (63%), ed è presente anche un'alta concentrazione di linalolo e citronellale (14% e 11%, rispettivamente).

In *Citrus aurantium* il componente principale è il sabinene (27%), ma sono presenti anche limonene, linalolo in concentrazioni basse (6%-8%), come anche isosilvestrene, cis-ocimene,  $\gamma$ -terpinene e 4-terpineolo (6-9%).

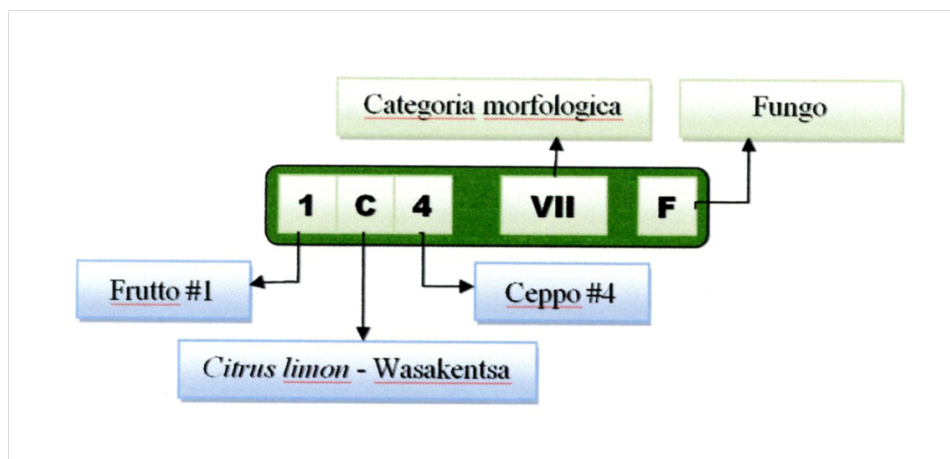
L'olio essenziale di *Citrus limon* è paragonabile a *C. aurantium* per il contenuto di sabinene (28%) ma differisce per l'alta percentuale di limonene (26%) e  $\beta$ -pinene (11%). In questo caso linalolo e citronellale sono presenti in concentrazioni tra il 5% e il 6%.

Infine l'olio essenziale di *Citrus nobilis* presenta una composizione diversa rispetto agli oli precedenti. Infatti il prodotto principale è linalolo (20%), insieme a  $\gamma$ -terpinene (19%) e N-metil metilantranilato (16%). Il contenuto di limonene in questo caso è del 12% e il sabinene ha una concentrazione del 2%.






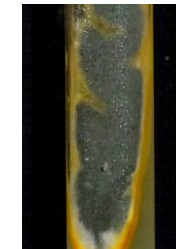

















Con lo scopo di modificare gli oli essenziali ottenuti dalle piante di agrumi ecuadoregne il mio lavoro di tesi è proseguito nell'utilizzare i frutti delle piante del genere *Citrus* come potenziali fonti di nuovi microrganismi.

Per questo ho svolto una fase di campionamento di frutti nelle comunità Achuar di Pumpuenta, Wasakentsa e Sewastian, e di isolamento di microrganismi presso il Laboratorio del CIVABI della Università Politecnica Salesiana. Sono stati isolati 55 ceppi di funghi e 61 ceppi di batteri dall'epicarpo di frutti di 4 specie di agrumi: *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium*,

*Citrus paradisiaca*. Questi microrganismi sono stati successivamente divisi in categorie a seconda della morfologia, ed etichettati con il seguente schema.



Nelle **Tabelle 4 e 5** sono riportate le diverse morfologie dei funghi e dei batteri campionati in Ecuador.

					
Categoria IF 2D7	Categoria IIF 2B4, 2D1, 1F1	Categoria IIIF 1A6, 2A14, 2A16, 2A17	Categoria IVF 1A5, 1A13, 2A1, 2A5, 2A13, 2A18, 1B20	Categoria VF 1B6, 1B17, 1B23	Categoria VIF 1B18
					
Categoria VIIF 1C4, 1C18	Categoria VIIIF 1D6	Categoria IXF 2D4	Categoria XF 1B13	Categoria XIF 1C22	Categoria XIIF 2D27, 2D6, 2D10
					
Categoria XIIIF 1B5	Categoria XIVF 2A2, 1C3	Categoria XVF 1D4	Categoria XVIIIF 1B14, 1B25	Categoria XVIIIIF 1B7, 1C21	Categoria XIXIF 1B24, 2D3, 2D15
					
Categoria XXIF 1C19, 1C20	Categoria XXIIF 2D17, 1F2	Categoria XXIIIF 1C5, 1C8, 2D2, 2D5, 1F5	Categoria XXIIIIF 1F9	Categoria XXIVIF 1D1, 1D2, 1D3, 1D5, 1D7, 1F6	

**Tabella 4.** Funghi isolati dall'epicarpo di agrumi raggruppati in categorie morfologiche

A, *Citrus aurantifolia* (Pumpuentsa); B, *Citrus aurantifolia* (Wasakentsa); C, *Citrus limon* (Wasakentsa); D, *Citrus paradisiaca* (Wasakentsa); F, *Citrus aurantium* (Sewastian).



**Tabella 5.** Batteri isolati dall'epicarpo di agrumi raggruppati in categorie morfologiche

A, *Citrus aurantifolia* (Pumpentsa); B, *Citrus aurantifolia* (Wasakentsa); C, *Citrus limon* (Wasakentsa); D, *Citrus paradisiaca* (Wasakentsa); F, *Citrus aurantium* (Sewastian).

I microrganismi così selezionati e divisi per categoria sono stati utilizzati nelle biotrasformazioni dei terpeni che sono stati individuati come componenti principali degli oli essenziali delle piante del genere *Citrus*.



In particolare come terpeni di riferimento sono stati individuati linalolo (come componente principale dell'olio di *C. latifolia* e *C. nobilis*), citronellale (componente principale dell'olio di *C. latifolia* e *C. limon*), sabinene (componente principali dell'olio di *C. limon*) e limonene (componente principale dell'olio di *C. latifolia* e *C. limon*).

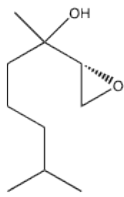
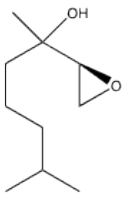
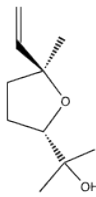
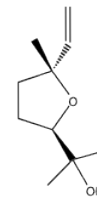
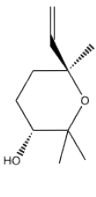
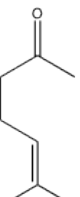
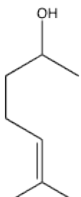
E' stato fatto quindi uno screening di biotrasformazioni di questi terpeni è stato fatto scegliendo un certo numero di batteri e funghi sulla base dei seguenti criteri:

- Un ceppo per ogni categoria morfologica
- Più ceppi della stessa categoria se provenienti da zone diverse.

I microrganismi sono stati coltivati in terreni di coltura adatti: PCB (Potato Dextrose Broth) per batteri e Sabouraud per funghi. Le condizioni di crescita sono state 28-30°C sotto agitazione (80 rpm) per un tempo di incubazione di 48 ore per i batteri e 5 giorni per i funghi. Trascorsa la fase di crescita è stato aggiunto il substrato alla concentrazione di 1 g/L e le miscele di reazione sono state tenute nelle stesse condizioni per 5 giorni. Questa procedura è stata utilizzata sia nei test di screening sia nelle prove su scala preparativa. Sono stati effettuati prelievi dopo 1, 2 e 5 giorni utilizzando come tecniche di monitoraggio la gascromatografia (GC-FID) e la gascromatografia abbinata a spettroscopia di massa (GC-MS). I prodotti di biotrasformazione sono stati identificati per confronto con gli Indici di Kovats riportati in letteratura (111), con gli spettri di massa della banca dati NIST 05 Mass Spectral Library, oppure con spettri degli standard commerciali o con quelli ottenuti da sintesi chimica. Tutte le biotrasformazioni, che hanno dato un risultato significativo a livello di screening, sono state ripetute su scala preparativa. I composti ottenuti sono stati isolati per cromatografia su colonna e su strato sottile (TLC), e poi caratterizzati con la spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ .

Nello screening biotrasformativo con linalolo sono stati usati 28 ceppi di funghi e 35 di batteri.

I dati delle biotrasformazioni sono riportati nella **Tabella 6**.

Microorganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)						
							
<b>FUNGHI</b>							
2D7 IF	1	1	47	45	2	4	
1F1 IIF			10	8	1		
1D4 XVF <sup>a</sup>			45 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	3		
1B14 XVIF <sup>a</sup>						63 <sup>b</sup>	8 <sup>b</sup>
1C21 XVIF	11	12				8	
1B24 XVIF						29	
2D15 XVIF <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>					
1F2 XXF <sup>a</sup>	1		29	25	1		
1C5 XXIF	29	1	36		16		
1F9 XXIF	11	11					
1D2 XXIF			49	46	1		
<b>BATTERI</b>							
1F10 IVB			1	1			
2D8 VIB			2	1			
1C1 VIII B			1	1			
1B12 IXB			1.5	1.5			

**Tabella 6.** Principali prodotti e rese della biotrasformazione del limonene.

<sup>a</sup> Ceppi utilizzati nelle biotrasformazioni preparative.

<sup>b</sup> Rese dei prodotti identificati dalle biotrasformazioni preparative

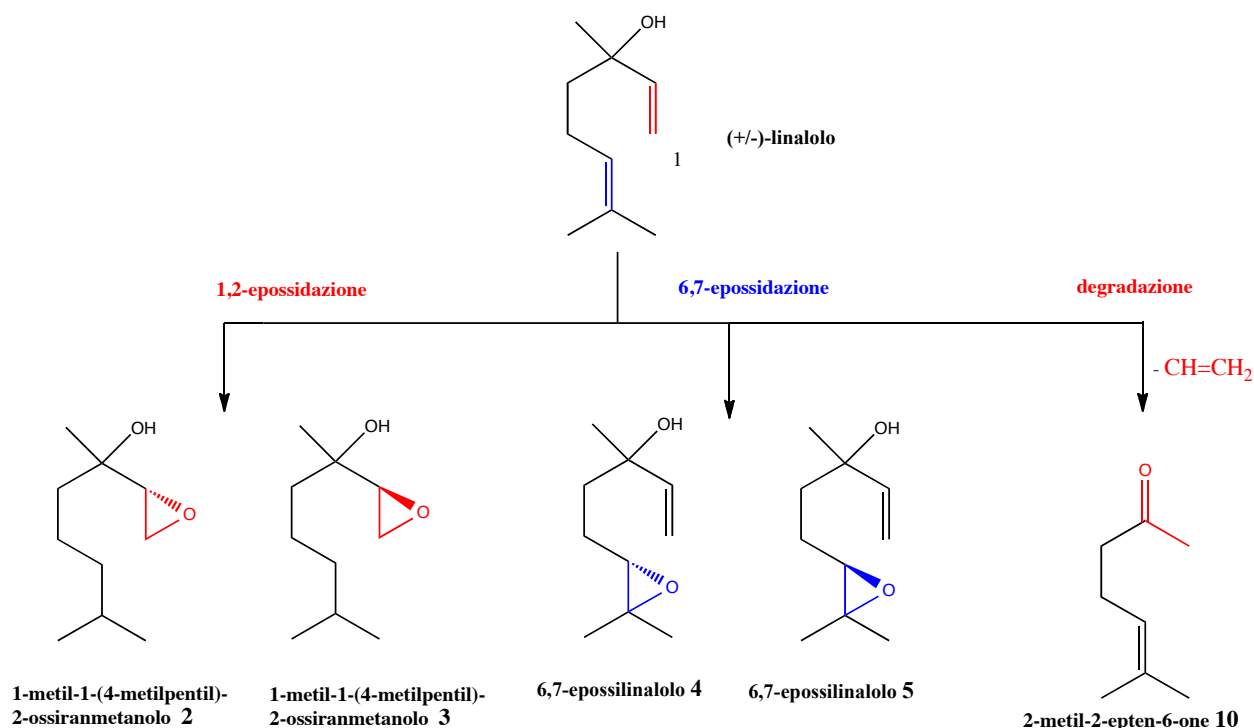
I prodotti principali della biotrasformazione del linalolo **1** sono E-furanlinalolo ossido **6** e Z-furanlinalolo ossido **7**. Tre ceppi (2D7 IF, 1D4 XVF e 1D2 XXIF) di funghi formano questi prodotti in rese superiori al 40%, e 2 ceppi (1F1 IIF e 1F2 XXF) in rese superiori al 10%. I due diastereoisomeri E-piranlinalolo ossido **8** e Z-piranlinalolo ossido **9** si formano in quantità inferiori. In tutte le biotrasformazioni si nota un leggero eccesso dell'isomero E rispetto all'isomero Z, solo in un caso con il ceppo 1C5 XXIF si ottengono selettivamente gli stereoisomeri E-furanlinalolo ossido **6** e E-piranlinalolo ossido **8**.

E-furanlinalolo ossido **6** e Z-furanlinalolo ossido **7** sono gli unici prodotti ottenuti nella biotrasformazione con batteri (rese inferiori al 2%).

Un dato molto interessante è mai riportato in precedenza è quello ottenuto con il fungo 1B14 XVIF che ha dato dopo 5 giorni 2-metil-2-epten-6-one **10**, un prodotto di degradazione della catena.

Con i ceppi 1C21 XVIIF, 2D15 XVIIIIF, 1C5 XXIF e 1F9 XXIIF si ottengono i diastereoisomeri del 1-metil-1-(4-metilpentil)-2-ossiranmetanolo **2** e **3** (rese 10%-30%) non descritti in precedenza come prodotti del linalolo. Le configurazioni di questi due diastereoisomeri non sono state determinate e sono ancora oggetto di studio.

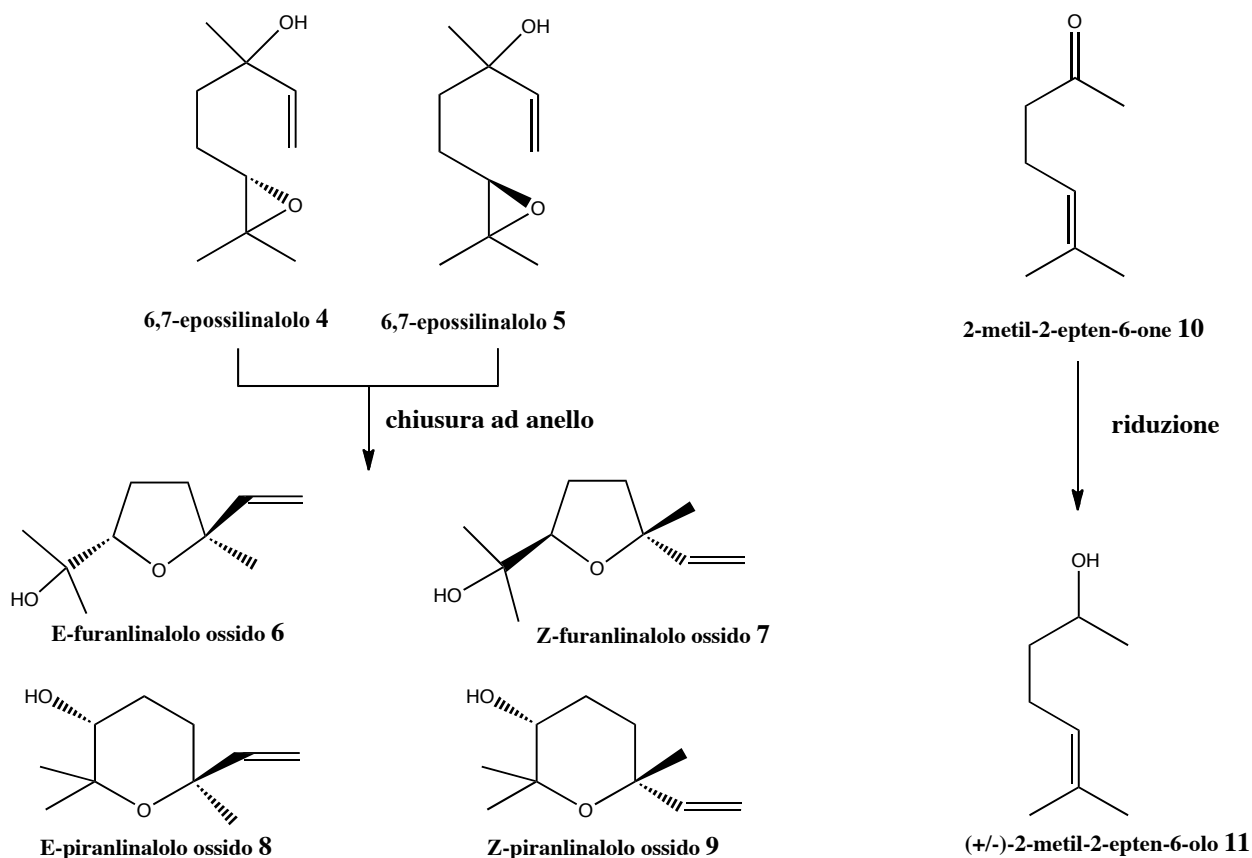
Una razionalizzazione delle reazioni che avvengono durante le biotrasformazioni sono riportate nello **Schema 1**.



**Schema 1**

L'epossidazione del doppio legame in C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> è un processo noto in letteratura mentre sia l'epossidazione in C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> sia la degradazione sono dei percorsi mai prima identificati nelle biotrasformazioni del linalolo. I composti **2**, **3**, **4** e **5** si formano per ossidazione dei doppi legami, rispettivamente tra C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, e C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>, mentre il composto **10** si ottiene per degradazione della catena.

Dai composti di 6,7-epossidazione **4** e **5** e dal composto di degradazione **10** si ottengono rispettivamente gli ossidi di linalolo **6-9** e il prodotto di riduzione **11** (**Schema 2**).



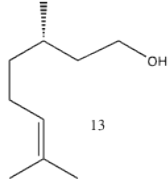
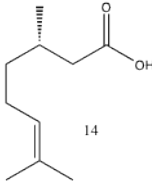
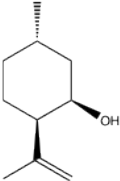
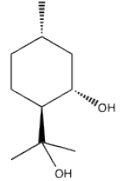
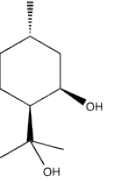
**Schema 2**

L'*E*-furanlinalolo ossido **6** e il suo diastereoisomero **7** si formano per attacco del gruppo ossidrilico in C<sub>3</sub> sul legame epossidico in C<sub>6</sub> mentre l'*E*-piranlinalolo ossido **8** e il suo diastereoisomero **9** si formano per attacco del gruppo idrossilico in C<sub>3</sub> e il legame epossidico in C<sub>7</sub>. Di questi prodotti *Z*-furanlinalolo ossido **7** e *Z*-piranlinalolo ossido **9** sono importanti in profumeria per le loro caratteristiche aromatiche (50).

Il 2-metil-2-epten-6-one **10**, formatosi per ossidazione della funzione ossidrilica in C<sub>3</sub> e la perdita del gruppo etilene in C<sub>1</sub>- C<sub>2</sub> del linalolo, viene ridotto a 2-metil-2-epten-6-olo **11**.

Le biotrasformazioni su scala preparativa hanno confermato sia la struttura dei prodotti sia le rese ottenute in screening.

Gli stessi ceppi utilizzati per le biotrasformazioni con linalolo, sono stati testati nella biotrasformazione di citronellale. Nella **Tabella 7** sono riportati i dati più interessanti di questo screening.

Microorganismi	Prodotti <sup>a</sup> (% area)				
	 13	 14	 16	 17	 18
<b>FUNGHI</b>					
2D1 IIF <sup>a</sup>	2	28	4	45	11
2A17 IIIF	98				
1B20 IVF	99				
1B23 VIF	38	62			
1C4 VIIF	23	4	4	50	19
1D6 VIIIF <sup>a</sup>			2	72	25
2D4 IXF <sup>a</sup>	11		12	53	20
1B13 XF	83	16			
1C22 XIIF <sup>a</sup>	7		4	63	25
2D10 XIIIF	81	11	2	5	
1B5 XIIIIF	64	36			
1D4 XVIF	11		13	55	21
1B14 XVIIF <sup>a</sup>	45	54			
1C21 XVIIIF	86	12			
2D15 XVIIIIF <sup>a</sup>	100				
<b>BATTERI</b>					
1B22 IB		53	13		
1C11 IIB	23	51	8	12	4
1B8 IIIB	36	55			
1F10 IVB	12	80	3		
2D16 VB	35	63		2	
1B9 VIIB	11	89			
1B12 IXB		16	53		
2D14 XB	15		6	71	4
2B6 XIB	49	36	2	2	
2A7 XIIB		16	53		
1B1 XIIIB	84		3		
2A3 XIIIIB		59			
2A9 XIVB	59	30	2	1	
1A14 XVIIIB		19	79		
1F4 XXB	45	48			
1F12' XXIIB	26	43			
1C17 XXIIIB	31	67			

**Tabella 7.** Prodotti di biotrasformazione del citronellale.

<sup>a</sup> Ceppi utilizzati nelle biotrasformazioni preparative

Nella **Tabella 7** sono riportati i funghi, che hanno ridotto citronellale a citronellolo in rese superiori al 80% e hanno trasformato il prodotto di partenza in altri prodotti in rese superiori al 35%, e i batteri che hanno biotrasformato il citronellale ad acido citronellico in rese superiori al 50% e in altri prodotti sopra il 25%.

Un grande numero di funghi e batteri hanno mostrato attività con il citronellale **12**. Dalla tabella si può notare che vi è una differenza tra i prodotti principali ricavati dalle biotrasformazioni con funghi e batteri. Infatti, il citronellolo **13** è il prodotto che si forma in maggiore quantità con i funghi mentre l'acido citronellico **14** è il prodotto principale con i batteri.

Tre ceppi di funghi (2A17 IIIF, 1B20 IVF e 2D15 XVIIIIF) danno come unico prodotto il citronellolo **13**, mentre due ceppi (1B23 VF e 1B14 XVIF) forniscono l'acido citronellico **14** in rese maggiori del 20% e altri sopra il 10%. Solo due ceppi di funghi (2D4 IXF e 1B14 XVIF) producono isopulegolo **16** in rese superiori al 10%.

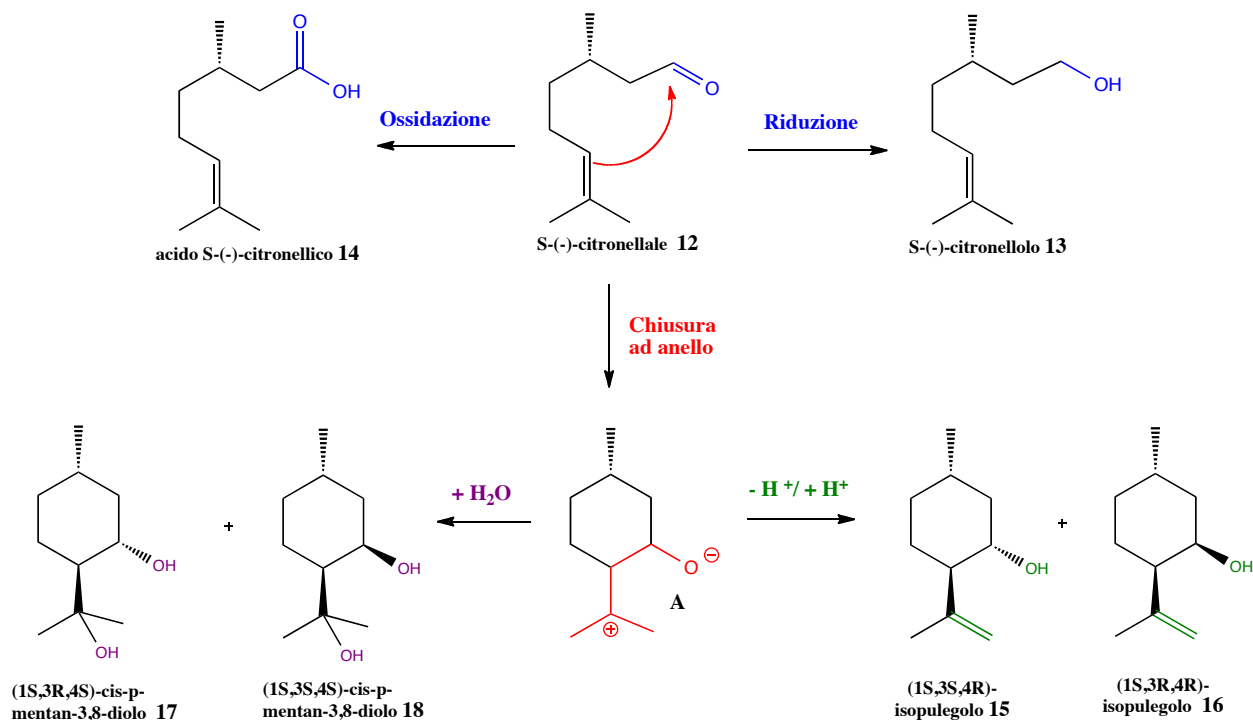
I p-mentandioli **17** e **18** sono i prodotti principali della biotrasformazione con il ceppo 1D6 VIIF (72% di Z-p-mentan-3,8-diolo **17** e 25% di E-p-mentan-3,8-diolo **18**). Altri 4 ceppi (1C4 VIIF, 2D4 IXF, 1C22 IXF e 1D4 XVF) hanno formato questi prodotti in rese superiori al 45%. In tutti i casi il diastereoisomero Z-p-mentan-3,8-diolo **17** è il prodotto principale (d.e. 70-80%).

Due ceppi di batteri (1F10 IVB e 1B9 VIIB) producono l'acido citronellico **14** con rese superiori all'80%, e 6 ceppi (1B22 IB, 1C11 IIB, 1B8 IIIB, 2D16 VB, 2A3 XIIIIB e 1C17 XXIIIB) danno rese sopra il 50%.

Un solo battere (1B1 XIIIB) trasforma il citronellale in citronellolo **13** con una resa dell'84%. Altri batteri danno il citronellolo in rese inferiori. Tre batteri (1B12 IXB, 2A7 XIIIB e 1A14 XVIIIB) producono isopulegolo **16** in rese superiori al 50%.

L'isomero Z-p-mentan-3,8-diolo **17** (71%) è invece il prodotto principale della biotrasformazione con 2D14 XB (d.e. 95%).

Nello **Schema 3** sono riportate le reazioni di biotrasformazione del citronellale **12**.



**Schema 3**

Il citronellolo **13** e l'acido citronellico **14** si ottengono dal citronellale **12** rispettivamente per riduzione e ossidazione della funzione carbonilica. Il citronellolo è un composto utilizzato nell'industria alimentare e dei profumi ed è noto anche avere un effetto neuroprotettivo nelle convulsioni indotte da pentilenetetrazolo, picrotoxin ed elettroshock in topi (78).

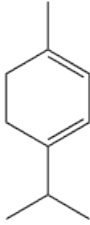
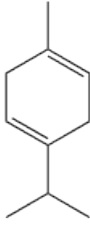
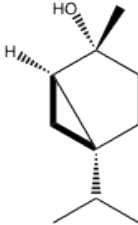
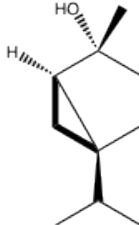
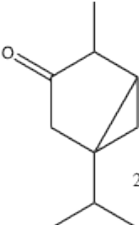
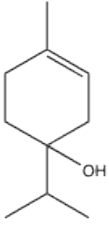
Dal citronellale per attacco nucleofilo del doppio legame sul gruppo carbonilico si ha la formazione dell'intermedio **A** il quale, per somma di acqua, produce i due diastereoisomeri (1S,3R,4S)-cis-p-mentan-3,8-diolo **17** e (1S,3S,4S)-trans-p-mentan-3,8-diolo **18**, e per perdita di un protone l'(1S,3S,4R)-isopulegolo **15** e il (1S,3R,4R)-isopulegolo **16**.

Tutti i prodotti di biotrasformazione del citronellale finora descritti tranne l'isopulegolo **15** e l'isopulegolo **16** sono noti per avere effetto repellente verso alcuni insetti. L'acido citronellico **14**, infatti, è il componente principale dell'estratto di *Callitris glaucophylla* ed è attivo contro *Coptotermes formosanus* (77), mentre i p-mentan-3,8-dioli **17** e **18** hanno effetto contro alcuni vettori della malaria afrotropicale come *Anopheles gambiae*, *A. funestus*, *A. arabiensis* (73-75), e anche contro moscerini, zecche e mosca cavallina (74).

Le biotrasformazioni su scala preparativa hanno confermato sia la struttura dei prodotti sia le rese ottenute in screening.

Per quanto riguarda lo screening dei substrati più volatili quali sabinene **19** e limonene **27** sono stati utilizzati i ceppi di funghi e di batteri che si sono mostrati attivi nelle biotrasformazioni di

linalolo **1** e citronellale **12**. A causa della volatilità dei due terpeni sono stati utilizzati contenitori chiusi per le biotrasformazioni, e anche con questa metodologia con il limonene non si sono avuti risultati significativi, probabilmente a causa della sua alta volatilità. Nella **Tabella 8** sono riportati i risultati delle biotrasformazioni del sabinene.

microorganismo	Prodotti <sup>a</sup> (% area)					
						
	23	24	20	21	22	29
<b>FUNGHI</b>						
2D7 IF	2	3	1	1		12
2D1 IIF	2	4	1	1		13
1D6 VIIIF	0.5	1		0.1	0.1	3
2D4 IXF		0.4	2	2		7
1C22 XIF <sup>a</sup>	3	8	3	2		74
1B14 XVIF			3	2		9
1B24 XVIIIIF			3	3		13
1C5 XXIF			3	3		17
1D2 XXIIF			3	5		10
<b>BATTERI</b>						
1F10 IVB	0.1	0.2	0.2	0.1		
1A14 XVIIB					1	

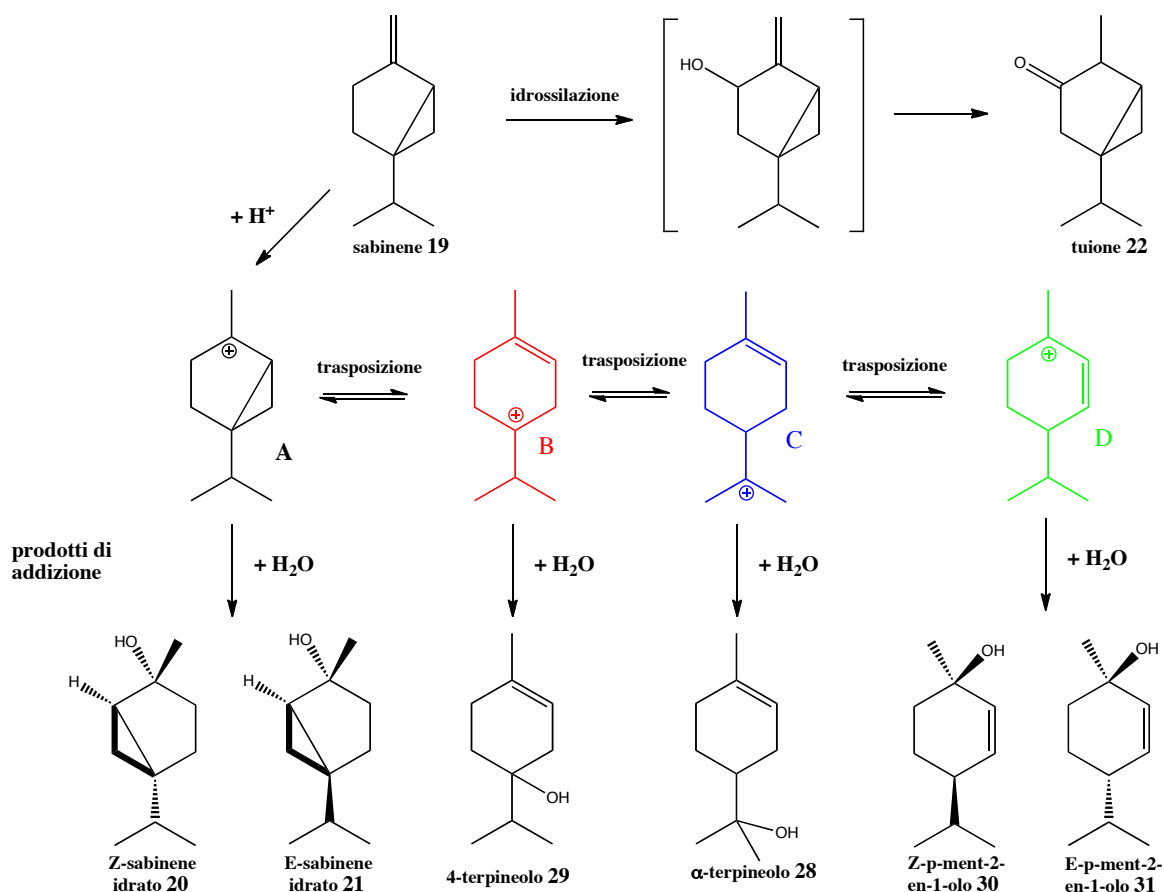
**Tabella 8.** Principali prodotti e rese della biotrasformazione del sabinene.

<sup>a</sup> Ceppi utilizzati nelle biotrasformazioni preparative.

Il fungo 1C22 XIF è l'unico microorganismo che biotrasforma il sabinene in rese significative, fornendo 4-terpineolo **29** (74%) e  $\gamma$ -terpinene **24** (8%). Il 4-terpineolo **29** è stato prodotto anche da altri 5 ceppi di funghi (2D7 IF, 2D1 IIF, 1B24 XVIIIIF, 1C5 XXIF, 1D2 XXIIF) in rese 10-20%. Gli Z- ed E-sabinene idrati **20** e **21** sono stati ottenuti in rese molto basse (1-5%).

Per quanto riguarda il sabinene in letteratura non esistono esempi di biotrasformazioni. Negli **scemi 5 e 6** sono riportati invece i percorsi metabolici che questa molecola subisce a livello cellulare.





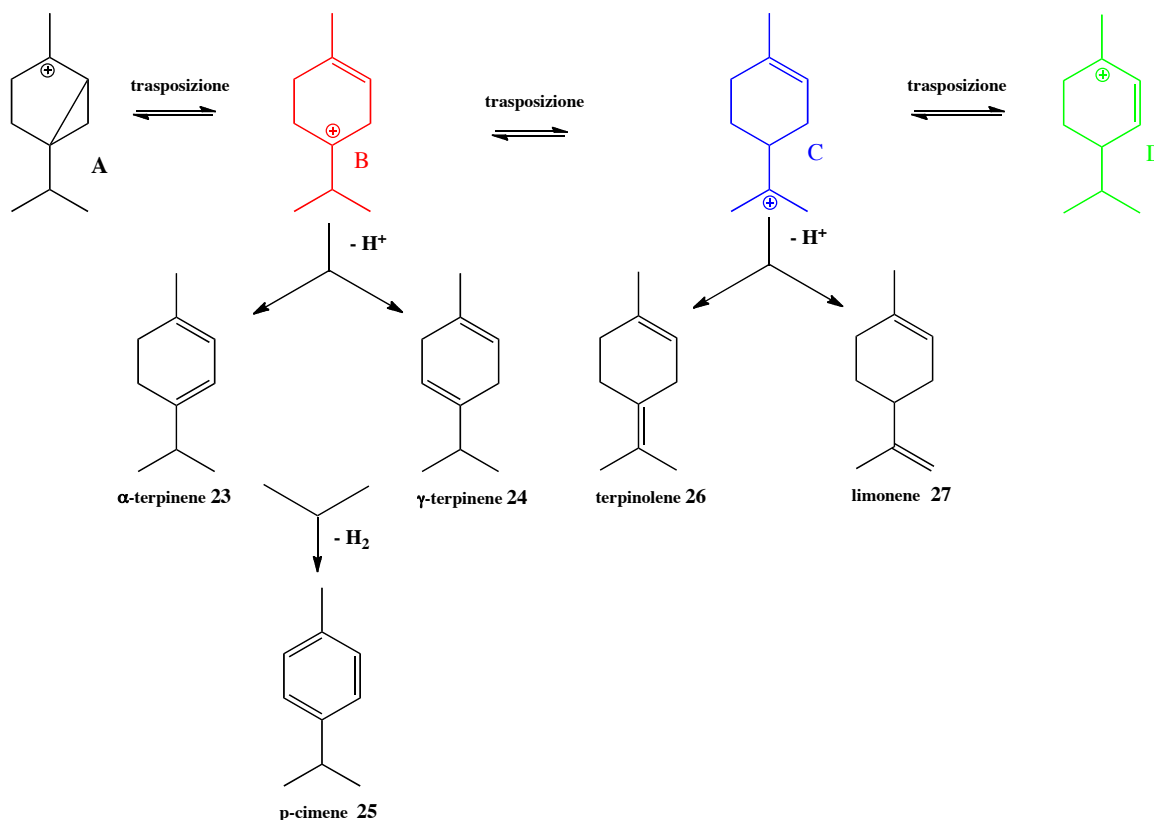
**Schema 5**

Per addizione di un protone sul doppio legame del sabinene **19** si forma il catione tuile **A** che per trasposizione di uno ione idruo è in equilibrio con il catione terpinen-4-ile **B**, il catione  $\alpha$ -terpinile **C** e il catione fellandrile **D**.

Questi carbocationi per successiva addizione di acqua portano alla formazione di Z- e E-sabinene idrati **20** e **21**, 4-terpineolo **29**,  $\alpha$ -terpineolo **28** e i diastereoisomeri Z-p-ment-2-en-1-olo **30** e E-p-ment-2-en-1-olo **31**: questi prodotti sono anche presenti nelle reazioni di biotrasformazione.

D'altra parte i carbocationi terpinen-4-ile **B** e  $\alpha$ -terpinile **C** per eliminazione danno rispettivamente il  $\alpha$ -terpinene **23**,  $\gamma$ -terpinene **24** e terpinolene **26**, limonene **27** (**Schema 6**).

Un'ulteriore eliminazione della molecola di idrogeno, porta all'aromatizzazione dell'anello dando il p-cimene **25**. Anche questi prodotti sono presenti nelle reazioni di biotrasformazione del sabinene.



**Schema 6**

Il prodotto principale che si ottiene nelle biotrasformazioni è il 4-terpineolo **29** (3-74%) mentre tutti gli altri composti sono stati ottenuti in tracce.

Solo in un caso, con il battere 1A14 XVIIIB, si ottiene per biotrasformazione, anche se in rese molto basse, il tuione **22** (1%) che deriva dall'idrossilazione in  $\alpha$  al doppio legame e la successiva tautomeria alla forma chetonica. Questo è l'unico prodotto di biotrasformazione.

Il 4-terpineolo **29** ha dimostrato di avere proprietà antiossidanti “radical scavenging” in screening su TLC utilizzando il DPPH test e il test di degradazione del desossiribosio (122). Z- e E-sabinene idrati **20** e **21** sono composti presenti negli oli essenziali di alcune specie di origano come *Origanum majorana* e *Melaleuca alternifolia*, con un rapporto tra i due isomeri di 10:1 (123). Un rapporto particolare tra E-sabinene idrato **21** e 4-terpineolo **29** è stato determinato come responsabile della migliore impressione sensoriale dell'aroma di quest'olio (124). Questi tre prodotti della biotrasformazione del sabinene stimolano inoltre l'ovoposizione della libellula *Papilio polyxenes* (125).

Dai dati ottenuti nelle biotrasformazioni sui terpeni modello abbiamo scelto i ceppi che si sono dimostrati attivi (Tabella 9) e questi ceppi sono stati utilizzati per le biotrasformazioni degli oli

essenziali. Gli stessi ceppi sono stati spediti al Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) per la loro caratterizzazione.

SIGLA	PIANTA	ZONA	SUBSTRATO	PRODOTTI PRINCIPALI
<b>1D6 VIIIIF</b>	<i>Citrus paradisiaca</i>	Wasakentsa	Citronellale	p-mentan-3,8-dioli
<b>1C22 XIF</b>	<i>Citrus limon</i>	Wasakentsa	Sabinene	4-terpineolo
<b>1B14 XVIF</b>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Wasakentsa	Linalolo	2-metil-5-epten-6-one
<b>2D15 XVIIIIF</b>	<i>Citrus paradisiaca</i>	Wasakentsa	Citronellale	citronello
<b>1C5 XXIF</b>	<i>Citrus limon</i>	Wasakentsa	Citronellale	acido citronellico
<b>1D2 XXIIIIF</b>	<i>Citrus paradisiaca</i>	Wasakentsa	Linalolo	ossidi di linalolo
<b>1B9 VIIB</b>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Wasakentsa	Citronellale	acido citronellico

**Tabella 9.** Microrganismi attivi nelle biotrasformazioni di terpeni e selezionati per i test degli oli essenziali.

Dei quattro oli di cui è stata determinata la composizione, sono stati utilizzati solo *Citrus latifolia* e *Citrus limon* per le biotrasformazioni in modo da avere oli con alte concentrazioni di citronellale (11%) e sabinene (31%).

Nella **Tabella 21** sono riportati i risultati delle biotrasformazioni con l'olio essenziale di *Citrus limon*. Le rese sono indicate solo in termini relativi in quanto determinate per gas-cromatografia senza standard interno.

Con tutti i microrganismi il sabinene **19** è stato totalmente o parzialmente biotrasformato a 4-terpineolo **29** e a  $\alpha$ -terpineolo **28**, solo in un caso, con il ceppo 1C22 XIF, si è ottenuto il sabinene idrato **21**. Per quanto riguarda il limonene **27** due ceppi (1C5 XXIF, 1C22 XIF) hanno dato come prodotto di biotrasformazione il limonene-1,2-diolo **32**. Nel caso del linalolo **1**, a differenza di quanto visto sul terpene modello, solo tre ceppi hanno dato i prodotti di biotrasformazione: in particolare 1C5 XXIF ha dato i furanlinalolo ossidi **6** e **7**, mentre il 1C22 XIF tutti i 4 diastereoisomeri di chiusura ad anello **6-9**, e il prodotto di degradazione 2-metil-2-epten-6-one **10**.

Composti	RT (min)	OE <i>Citrus limon</i>	COMPOSIZIONE OLI BIOTRASFORMATI						
			1D6 VIII F	1C5 XXIF	1B9 VII B	1C22 XIF	1D2 XXIIF	2D15 XVIII F	
<b>sabinene</b>	<b>11.37</b>	<b>31.2</b>	<b>0.2</b>	<b>8.6</b>		<b>14.3</b>		<b>11.3</b>	
4-terpineolo	29.96	2.3	44.2	17.1	22.3	18.0	48.3	17.1	
$\alpha$ -terpineolo	31.71	0.5	4.0	3.6	5.8	4.1	2.2	3.9	
<i>E</i> -sabinene idrato <sup>a</sup>	21.79						1.53		
<b><math>\beta</math>-pinene</b>	<b>11.62</b>	<b>11.6</b>	<b>3.2</b>	<b>2.6</b>		<b>5.1</b>		<b>3.5</b>	
<i>E</i> -pinocarveolo	25.60						2.4		
<b>limonene</b>	<b>15.38</b>	<b>27.4</b>	<b>6.6</b>	<b>7.7</b>		<b>10.1</b>		<b>13.3</b>	
limonene 1,2-diolo	48.40		0.5	17.4		0.8	21.1		
<b>1,8-cineolo (eucaliptolo)</b>	<b>15.54</b>	<b>0.67</b>							
2-eso-idrossi-1,8-cineolo <sup>a</sup>	35.22						0.52		
<b>linalolo</b>	<b>21.82</b>	<b>4.8</b>	<b>19.9</b>	<b>1.9</b>	<b>24.4</b>	<b>29.7</b>		<b>28.0</b>	
2-metil-2-epten-6-one	12.18							2.0	
2-metil-2-epten-6-olo	12.76							2.1	
<i>E</i> -furanlinalolo ossido	18.87			10.4			3.2		
<i>Z</i> -furanlinalolo ossido	20.37			18.7			4.9		
<i>E</i> -piranlinalolo ossido <sup>a</sup>	29.00						0.58		
<i>Z</i> -piranlinalolo ossido	29.64						1.7		
<b>citronellale</b>	<b>27.23</b>	<b>5.3</b>							
isopulegolo	26.46	0.2	0.9	1.1	1.2		1.8		
neo-isopulegolo	27.41		0.5						
acido citronellico	46.38		1.7		46.3			12.4	
<i>1S,3S,4S</i> -mentan-3,8-diolo	47.92		0.7						
<i>1S,3R,4S</i> -mentan-3,8-diolo	49.51		1.5						
<i>Prodotti non identificati</i>			0.9	1.2			8.9	4.6	

**Tabella 21.** Prodotti e rese di biotrasformazione con funghi e batteri dell'olio essenziale di *Citrus limon*.(GC-FID, 5 giorni).

<sup>a</sup>Prodotti e rese presenti dopo 48 ore di biotrasformazione e assenti dopo 5 giorni.

I valori riportati sono relativi non assoluti (senza standard interno).

Il citronellale **12** è stato completamente biotrasformato da tutti i ceppi e solamente il ceppo 1D6 VIIF ha dato tutti i prodotti ottenuti dalla biotrasformazione del prodotto modello, mentre gli altri ceppi sono stati molto più selettivi: il composto di biotrasformazione più comune è l'acido citronellico **14**.

Da questi dati si può notare che la presenza di altri substrati ha variato in maniera sostanziale l'attività dei microrganismi in esame.

Nella **Tabella 22** sono riportati i dati delle biotrasformazioni dell'olio essenziale di *Citrus latifolia* con i ceppi selezionati precedentemente.

L'olio contiene un'alta percentuale di limonene (66%), linalolo (13%) e citronellale (10%). In questo caso l'attività di questi microrganismi sui terpeni sull'olio essenziale è stata molto simile a quella avuta con i composti singoli. Quasi tutti i microrganismi hanno dato prodotti di biotrasformazione di linalolo **1** e citronellale **12** con andamenti analoghi a quelli ottenuti con i prodotti puri. In questo caso si sono ottenuti altri prodotti di biotrasformazione non presenti nell'olio di partenza quali l' isopiperitone **38**, il geraniolo **39**, il geraniale **40** e l'acido geranico **41**.

Tutti i microrganismi utilizzati per la biotrasformazione degli oli essenziali hanno ripetuto e confermato la formazione dei prodotti principali riscontrati nelle fasi precedenti di biotrasformazione dei terpeni. Sono stati trovati alcuni nuovi prodotti provenienti dalla biotrasformazione del limonene probabilmente per l'azione elicitoria esercitata dagli altri componenti dell'olio essenziale sugli enzimi dei microrganismi impiegati.

Gli oli sottoposti a biotrasformazione hanno quindi una composizione diversa rispetto agli oli essenziali di partenza, e questa nuova composizione potrebbe portare ad un utilizzo di questi ultimi in campi diversi da quelli noti.

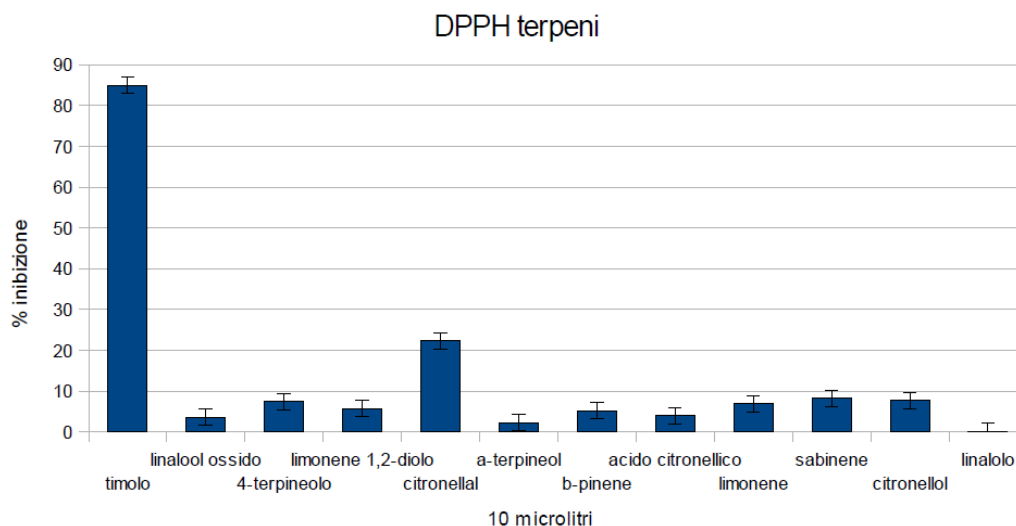
Composti	RT (min)	OE <i>Citrus latifolia</i>	COMPOSIZIONE OLI BIOTRASFORMATI									
			1C5 XXIF	1D6 VIII	1D2 XXIII	2D15 XVIII	1C22 XIF	1B14 XVIF	1B9 VIIB			
<b>limonene</b>	<b>15.58</b>	<b>65.9</b>	<b>6.2</b>	<b>33.3</b>	<b>1.7</b>	<b>20.6</b>	<b>2.1</b>	<b>54.1</b>				
limonene-1,2diolo	48.43		16.1	0.4	4.7	1.4	88.5	0.2				
<b>linalolo</b>	<b>22.11</b>	<b>13.1</b>	<b>36.3</b>	<b>39.9</b>	<b>55.4</b>	<b>38.0</b>		<b>3.5</b>	<b>37.7</b>			
2-metil-2-epten-6-one	12.16					8.0		11.3				
2-metil-2-epten-6-olo	15.08		0.9					5.8				
<i>E</i> -furanolinalolo ossido	19.03		1.1	0.2	0.6	0.4		0.1				
<i>Z</i> -furanolinalolo ossido	20.39		15.2	0.3	5.6	1.1	5.1	0.3				
<i>E</i> -piranilinalolo ossido	28.97		0.3									
<i>Z</i> -piranilinalolo ossido	29.60		3.3				0.5					
<b>citronellale</b>	<b>27.49</b>	<b>10.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>
isopulegolo	26.66	0.3	1.9	1.9	1.7	1.8		0.8				
neo-isopulegolo	27.70	0.1	0.6	0.7	0.5			11.2				
citronellolo	36.05	2.0	10.0	5.1	6.6	16.0					20.7	
acido citronellico	46.37		5.0	2.8	19.4	4.7		1.7			39.6	
<i>1S,3S,4S</i> -mentan-3,8 diolo	47.96			6.6								
<i>1S,3R,4S</i> -mentan-3,8 diolo	49.67			1.5								
Altri prodotti di biotrasformazione												
<i>cis-p</i> -mentan-2,8-dien-1-olo	26.42								2.2			
geraniolo	38.49					4.1						
isopiperitone	38.99		0.5	0.4								
geraniale	40.47											
acido geranico	49.36											2.1
<i>Prodotti non identificati</i>			1.1		1.5	0.5	1.7	5.7				

**Tabella 22.** Prodotti e rese di biotrasformazione con funghi e batteri dell'olio essenziale di *Citrus latifolia*.(GC-FID, 5 giorni)

I valori riportati sono relativi non assoluti (senza standard interno).

Per indagare le possibili proiezioni salutistiche degli oli essenziali e dei componenti biotrasformati è necessario sottoporre gli oli a test biologici. In questa tesi è stato fatto il test dell'attività antiossidante.

Nel grafico seguente sono riportati le concentrazione di inibizione di vari componenti degli oli essenziali.

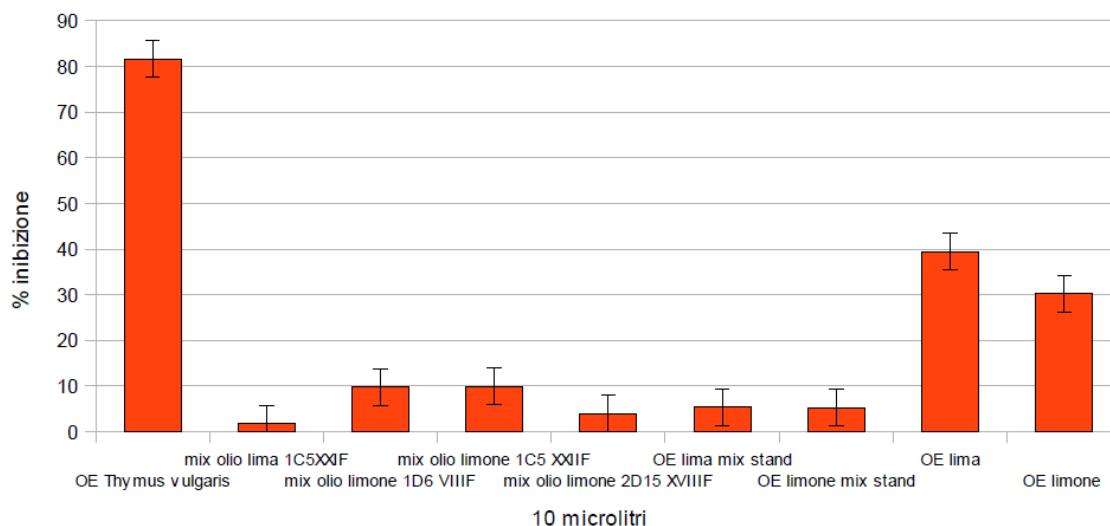


Tra gli standard terpenici l'unico terpene presente negli oli essenziali che ha dimostrato possedere attività antiossidante rilevante rispetto agli altri componenti è il citronellale, con una percentuale di inibizione pari al 22.29%, comunque, molto inferiore rispetto a timolo (84.92%) di cui è nota l'attività antiossidante (126).

Sono stati testati anche gli oli essenziali di *Citrus limon* e *Citrus latifolia* e miscele costruite ad hoc dei componenti principali di tali oli. Non sono stati testati gli oli essenziali biotrasformati perchè contenevano anche una serie di impurezze derivanti dal brodo di coltura e pertanto sarebbe stato necessario un procedimento di purificazione che sarà oggetto di ulteriore sviluppo del lavoro di tesi. Per valutare la capacità antiossidante degli oli biotrasformati sono state dunque ricostruite in laboratorio miscele opportune di terpeni che riproducessero la composizione degli stessi.

Le percentuali di inibizione sono riportate nel grafico seguente.

## DPPH OLII E MISCELE DI TERPENI



PRODOTTI	MIX OE "LIMA" <i>Citrus latifolia</i>		MIX OE LIMONE <i>Citrus limon</i>			
	1C5XXIF		1D6VIIIIF	1C5XXIF	2D15	
Sabinene				9	11	28
4-terpineolo			44	17	17	
a-terpineolo				4	4	
b-pinene						11
limonene-1,2-diolo	16			17		
(±)-limonene	6	63	7	8	13	26
(±)-linalolo	36	14	20		28	5
Z/E-furanlinalolo ossido	15			29		
S-(-)-citronellale		11				6
citronellolo	10		4			
acido citronellico	5				12	

**Tabella 34.** Composizione dei mix di terpeni utilizzati nel DPPH test.

Tra gli oli scelti da sottoporre a biotrasformazione l'olio essenziale di *Citrus latifolia* "lima" è quello che presenta la maggior attività antiossidante rispetto al *Thymus vulgaris*, che essendo di chemotipo al timolo ha un'elevata attività antiossidante.

La misura della % di inibizione del DPPH su miscele di terpeni che riproducono la composizione presente negli oli essenziali di "lima" e limone (**Tabella 34**) non ha evidenziato riproducibilità del dato, ma l'attività sulle miscele è molto inferiore. Questo dato potrebbe forse essere spiegato per l'olio di "lima" dalla presenza di componenti non terpenici, come le cumarine (RF= 0,8 vedi foto) che in lastra HPTLC sono visibili a lunghezza d'onda di 366nm di cui è nota l'attività antiossidante, non rivelata in gas-cromatografia ed oggetto di ulteriori indagini per indagarne la struttura chimica.





Per quanto riguarda la valutazione della possibile attività antiossidante degli oli biotrasformati, come detto precedentemente, si è lavorato su miscele dei principali monoterpeni biotrasformati. I risultati ottenuti non sono stati scientificamente rilevanti.

Si potrà procedere in futuro a valutare l'attività antiossidante con altri test *in vitro* (beta-carotene bleaching test) o strumentali (fotochemiluminescenza) per confermare o smentire questo dato. Si svilupperà altresì la valutazione di altre tipologie di bioattività: antimicrobica, antifungina, ecc. per poter valutare gli impieghi dei substrati e degli oli biotrasformati.

**APPENDICE**

## Approfondimenti fitochimici e di bioattività su oli essenziali del genere *Ocotea* (Lauraceae)

Il genere *Ocotea* include più di 350 specie tropicali e subtropicali, principalmente distribuite nelle Americhe e nel Sud Africa e costituisce una grande fonte di oli essenziali, includendo quelli di *O. pretiosa*, *O. cymbarum*, *O. sassafras*, *O. caudata* che riscuotono un forte interesse sul mercato (127).

Come già ribadito nella parte introduttiva del mio lavoro di tesi l'olio essenziale di Ispingo (*Ocotea quixos* (Lam.) Kostern.(Lauraceae)) rappresenta uno dei prodotti di maggior interesse nei progetti mirati allo sviluppo sostenibile del popolo Achuar. Durante lo svolgimento del mio dottorato di ricerca ho potuto approfondirne la caratterizzazione fitochimica e, all'interno di una collaborazione esistente tra l'università di Parma e quella di Ferrara, assistere alla fase di sviluppo delle potenzialità applicative di questo fitocomplesso.

*Ocotea quixos* (Lam.) Kostern.(Lauraceae) è un piccolo albero con verdi boccioli floreali, fiori bianchi, frutti dimorfi, foglie coriacee con venature brune, superficie adassiale lucida e di colore verde acceso e quella abassiale gialla. Una volta era considerata specie endemica della foresta pluviale dell'Ecuador, più recentemente è stata scoperta anche nel sud della Colombia e del Perù<sup>1</sup>.

Ha un uso tradizionale stimato per le sue proprietà aromatiche sin dai tempi degli Inca e apprezzato come aperitivo, eupeptico, disinfettante, e anestetico locale. Le sue foglie sono usate anche per infusi antidiarroici (128). Ogni 2 anni l'albero produce grandi e legnosi calici floreali, localmente denominati Ispingo. Grazie al loro aroma tipico di cannella i calici di Ispingo sono tradizionalmente utilizzati dalle popolazioni indigene come succedanei della cannella. L'olio essenziale ottenuto dai calici floreali, caratterizzato per il profilo fitochimico e di bioattività (antiossidante, antimicrobica) dal gruppo di ricerca di Ferrara (129) è infatti composto principalmente da fenilpropanoidi come *trans*-cinnamaldeide e metilcinnamato, che conferiscono l'aroma caratteristico.

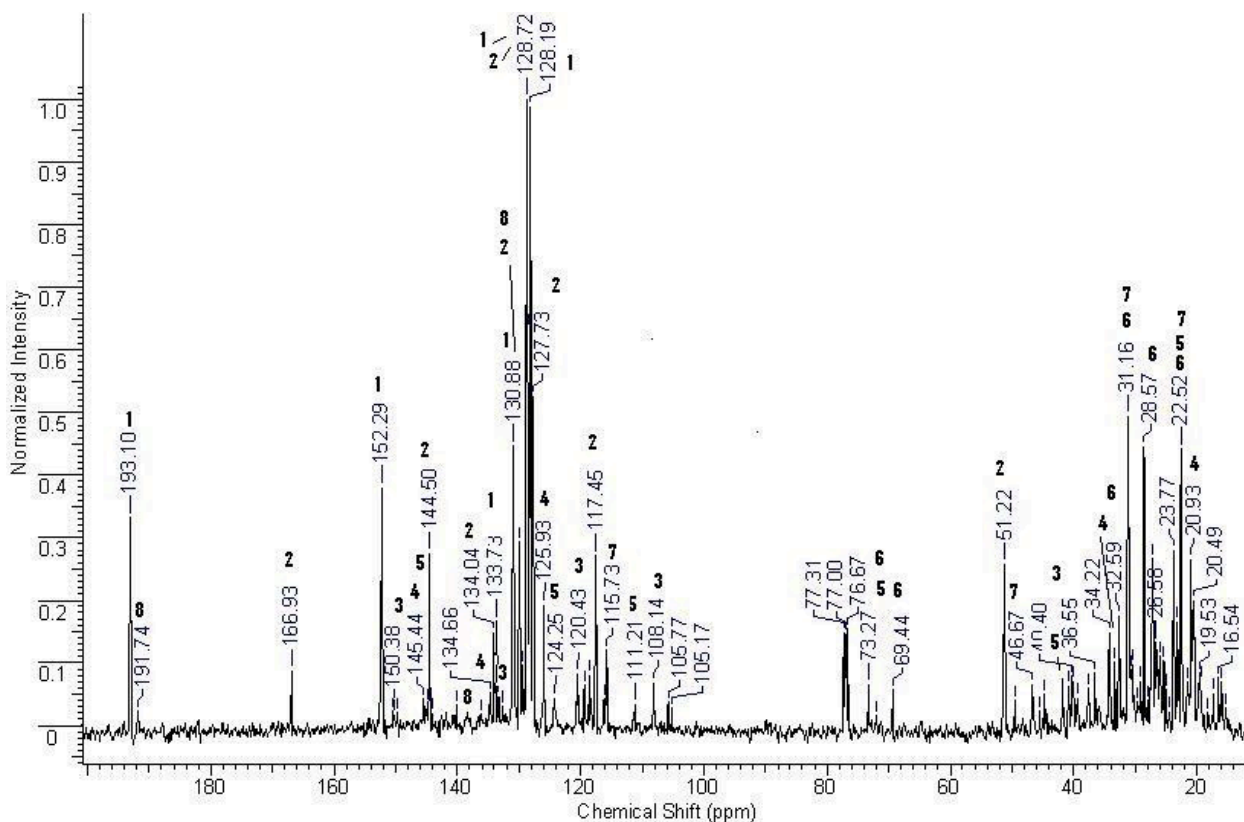
Nel lavoro di ricerca (121) di approfondimento del profilo fitochimico è stato studiato il fingerprinting metabolomico NMR del fitocomplesso con lo scopo di suggerire un'ulteriore analisi, oltre al GC-MS già discusso nella pubblicazione sopra citata del 2004, per definire la

---

<sup>1</sup> Tropicos ®- Specimen Database- <http://www.tropicos.org/Name/17805788>

qualità e la possibile frode del prodotto in oggetto. Attualmente sono disponibili differenti metodologie cromatografiche e spettroscopiche per individuare un fringerprinting di un olio essenziale utile a definirne la qualità e la adulterazione: le tecniche di cromatografia ad alta risoluzione come la HPTLC (che presenta limiti applicativi in presenza di composti molto volatili), la gas-cromatografia (GC) accoppiata alla massa oppure la risonanza magnetica nucleare che in particolare può consentire di rivelare eventuali adulteranti non volatili e presenta il vantaggio di essere molto rapida e riproducibile.

Di seguito viene riportato il fringerprinting metabolomico  $^{13}\text{C}$  NMR e la relativa interpretazione presentato nella pubblicazione.



**Figura 1.** Spettro  $^{13}\text{C}$  NMR dell'olio essenziale di calici di *Ocotea quixos* in  $\text{CDCl}_3$  (cloroformio deuterato)

Per quanto concerne le potenzialità bioattive dell'olio essenziale di Ispingo sono stati effettuati test in vitro ed in vivo mirati a determinare l'attività antiaggregante piastrinica e antitrombotica. In particolare sono stati effettuati i seguenti saggi:

- in vitro sia sull'olio essenziale che sui principali costituenti dell'olio (*trans*-cinnamaldeide e metilcinnamato): 1) attività di retrazione del coagulo e aggregante piastrinica su plasma di ratto e plasma umano, 2) attività vasorilassante su preparazioni di anello di aorta di ratto con e

senza endotelio (per comprendere gli effetti sulla funzione vascolare) e 3) effetti citotossici sulle piastrine,

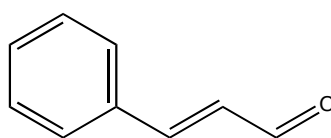
- in vivo sull'olio essenziale: effetti antitrombotici e proprietà proemorragiche (come effetto collaterale) in trattamento subacuto su topi.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

- *in vitro*: 1) l'olio essenziale di *Ocotea quixos* e la *trans*-cinnamaldeide hanno dimostrato possedere significativa attività inibitoria antiaggregante piastrinica e di retrazione del coagulo nel plasma di ratto, consistente con i risultati ottenuti su plasma umano ove la potenza di inibizione è leggermente inferiore, 2) l'olio essenziale di *Ocotea quixos* e la *trans*-cinnamaldeide hanno proprietà vasodilatorie, spasmolitiche sull'aorta di ratto, 3) l'olio essenziale di *Ocotea quixos* non ha effetti sulla vitalità delle piastrine incubato a concentrazioni fino a 300 mg/mL, concentrazione alla quale invece *trans*-cinnamaldeide e metilcinnamato riducono significativamente la vitalità cellulare.
- *in vivo*: l'olio essenziale di *Ocotea quixos* ha dimostrato possedere un'elevata e dose dipendente attività antitrombotica e effetti proemorragici non significativi.

In conclusione l'olio essenziale di *Ocotea quixos* è un fitocomplesso antitrombotico privo di effetti collaterali proemorragici e di tossicità sistemica quando somministrato in trattamento sub acuto.

L'attività antitrombotica può essere collegata alla capacità di bloccare l'aggregazione piastrinica e la retrazione del coagulo e di inibire la vasocostrizione. La *trans*-cinnamaldeide sembra essere il componente maggiormente responsabile di queste attività.



**aldeide cinnamica**

Un'ulteriore linea di ricerca sul genere *Ocotea* ha riguardato la caratterizzazione chimica e le proprietà conservative applicabili al settore alimentare (antimicrobica e antiossidante) di un olio essenziale ottenuto dai calici di *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae), una spezia amazzonica ancora scarsamente studiata (130). E' stato inoltre condotto un confronto con oli commerciali ricchi in isomeri dell'anelolo con lo scopo di rendere disponibile un approccio chimico metabolomico per l'identificazione degli oli tramite NMR mono e bidimensionale, utile a discriminare gli oli essenziali di *O. bofo*, *Illicium verum*, *Artemisia dracuncululus*, *Foeniculum vulgare*.

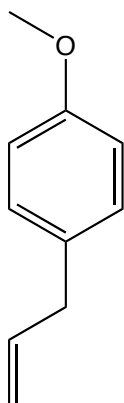
*Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) è un albero di media altezza con foglie semplici, lanceolate,

acuminate con peduncolo rosa, piccoli fiori bianchi riuniti in cime e calici bruni persistenti. Il frutto è una piccola bacca rosa e l'intera pianta possiede un forte odore aromatico. Nel suo areale di distribuzione è conosciuto come “anis de arbol” (Ecuador), “moena rosa” (Perù settentrionale) o “pau de quiabo” (Brasile) (131). Questo albero è frequentemente diffuso nell'Amazzonia Orientale, dove i suoi calici legnosi raccolti da frutti maturi sono tradizionalmente usati per aromatizzare infusi nei gruppi etnici Shuar e Achuar.

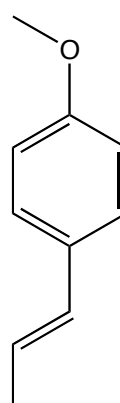
Come suggerito dal suo nome comune, la pianta possiede un'aroma tipico simile all'anice e perciò rappresenta un potenziale succedaneo o adulterante di anice, finocchio e dragoncello.

Con lo scopo di evidenziare il fingerprinting metabolomico dell'olio di *Ocotea bofo* e poterlo distinguere dagli altri tre succedanei o possibili adulteranti è stato studiato il profilo GC-MS,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR dei 4 oli.

I principali componenti degli oli sono isomeri dell'anelolo.



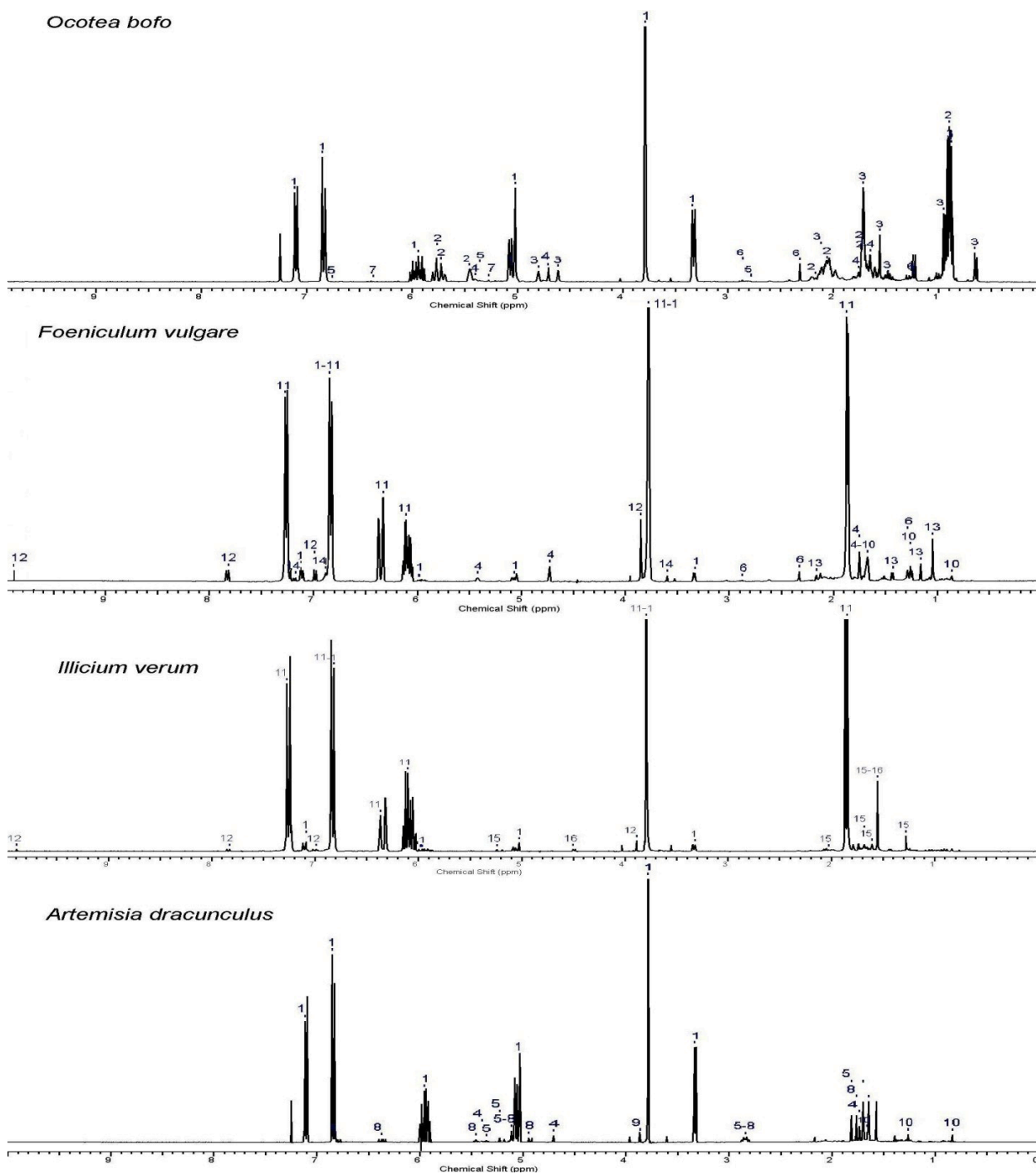
**estragolo**



**trans-anetolo**

N°	COMPOSTO	ID Method	KI <sup>a</sup> - polar <sup>b</sup>	Area % <sup>b</sup>			
				<i>F.</i> <i>vulgare</i>	<i>A.</i> <i>dracunculus</i>	<i>I.</i> <i>verum</i>	<i>O. bofo</i>
	$\alpha$ -Tuiene	GCMS	930	-	-	-	0.10
10	$\alpha$ -Pinene	GCMS, NMR	939	0.81	1.32	0.42	0.42
	Canfene	GCMS	954	-	0.10	-	-
3	Sabinene	GCMS, NMR	975	0.37	-	-	10.4
	$\beta$ -Pinene	GCMS	979	-	0.32	-	-
7	$\beta$ -ircene	GCMS, NMR	991	0.14	0.22	0.11	1.57
2	$\alpha$ -Fellandrene	GCMS, NMR	1003	0.05	-	0.37	19.62
	$\alpha$ -Terpinene	GCMS	1017	-	-	-	0.96
6	<i>p</i> -Cimene	GCMS, NMR	1025	1.21	0.06	0.11	4.84
	$\beta$ -Fellandrene	GCMS	1026	-	-	0.77	-
4	Limonene	GCMS, NMR	1029	5.67	4.60	-	5.00
5	<i>cis</i> -Ocimene	GCMS, NMR	1037	0.15	8.60	-	1.81
8	<i>trans</i> -Ocimene	GCMS, NMR	1050	-	9.41	-	0.21
	$\gamma$ -Terpinene	GCMS	1060	0.60	-	-	0.29
13	Fencone	GCMS, NMR	1087	2.82	-	-	-
15	Linalolo	GCMS, NMR	1092	-	-	2.34	-
	<i>allo</i> -Ocimene	GCMS	1144	0.24	0.72	-	0.32
	Canfora	GCMS	1146	0.12	-	-	-
	4-Terpineolo	GCMS	1177	0.06	-	0.32	0.15
	$\alpha$ -Terpineolo	GCMS	1180	-	-	0.28	-
	<i>iso</i> -Mentolo	GCMS	1183	-	0.34	-	-
1	Estragolo	GCMS, NMR	1196	4.56	70.12	6.58	48.71
	<i>eso</i> -Fencilacetato	GCMS	1233	0.05	-	-	-
12	<i>p</i> -Anisaldehyde	GCMS, NMR	1247	3.99	-	1.77	-
11	<i>trans</i> -Anetolo	GCMS, NMR	1253	75.83	0.10	78.8	0.20
	Isobornilacetato	GCMS	1287	-	0.38	-	-
	$\delta$ -Elemene	GCMS	1338	-	-	-	0.89
	Eugenolo	GCMS	1359	-	0.21	-	-
	$\alpha$ -Copaene	GCMS	1377	-	-	-	0.12
	<i>p</i> -Acetonilansolo	GCMS	1381	-	-	-	-
	$\beta$ -Elemene	GCMS	1391	-	-	-	0.11
9	Metileugenolo	GCMS, NMR	1404	-	1.18	-	0.08
14	4-Metossifenilacetone	GCMS, NMR	1408	1.97	-	0.41	-
	Cariofillene	GCMS	1419	-	0.16	-	0.87
	$\beta$ -Copaene	GCMS	1432	-	-	0.53	0.05
	$\gamma$ -Elemene	GCMS	1437	-	-	-	0.05
	$\alpha$ -Umulene	GCMS	1455	-	-	-	0.14
	<i>trans</i> -Bergamotene	GCMS	1479	-	-	0.47	-
	Germacrene D	GCMS	1485	-	-	-	0.06
	$\beta$ -Selinene	GCMS	1490	-	-	-	0.23
	<i>cis</i> -Nerolidolo	GCMS	1498	-	-	0.16	-
	Biclogermacrene	GCMS	1500	-	-	-	0.56
	<i>p</i> -Metossi cinnamaldehyde	GCMS	1564	-	0.12	-	-
16	Feniculin	GCMS, NMR	1567	-	-	2.25	-
	Spatulenolo	GCMS	1578	-	0.34	-	-
	Esatriacantano	GCMS	1611	-	-	1.18	-
	<b>Total</b>			<b>98.64</b>	<b>98.49</b>	<b>96.87</b>	<b>97.76</b>

**Tabella 1.** Composizione comparativa di oli essenziali



**Figura 2.** Fingerprinting metabolomico <sup>1</sup>H NMR

L'olio essenziale di *Ocotea bofo* ha una composizione chimica simile a quella di *Artemisia dracunculus* perciò è possibile suggerirne l'utilizzo come sucedaneo.

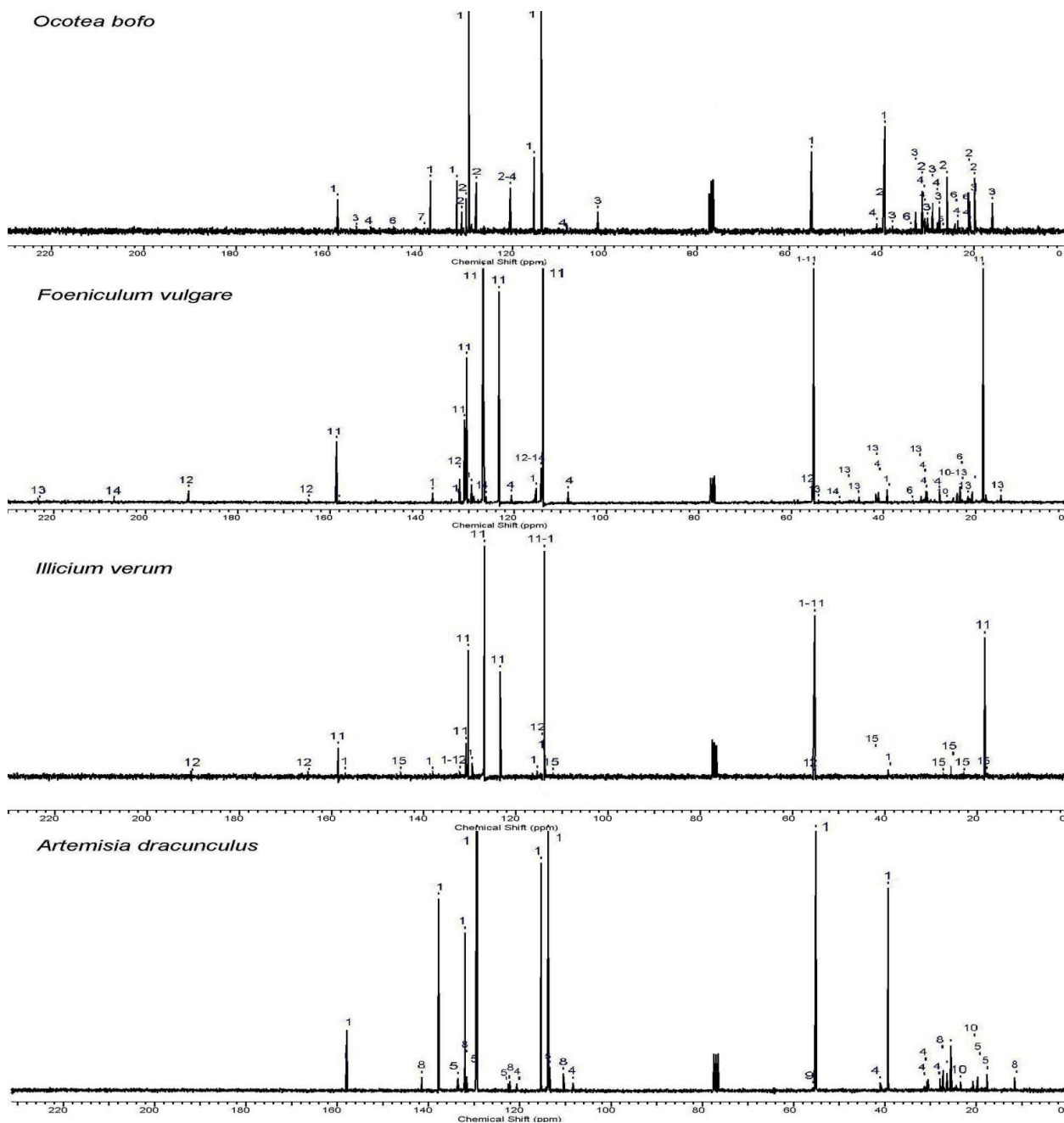
Per quanto concerne il profilo di bioattività sono state studiate:

- attività antiossidante con il metodo del DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), della decolorazione del  $\beta$ -carotene utilizzando come controllo positivo sia un antiossidante sintetico, il BHA



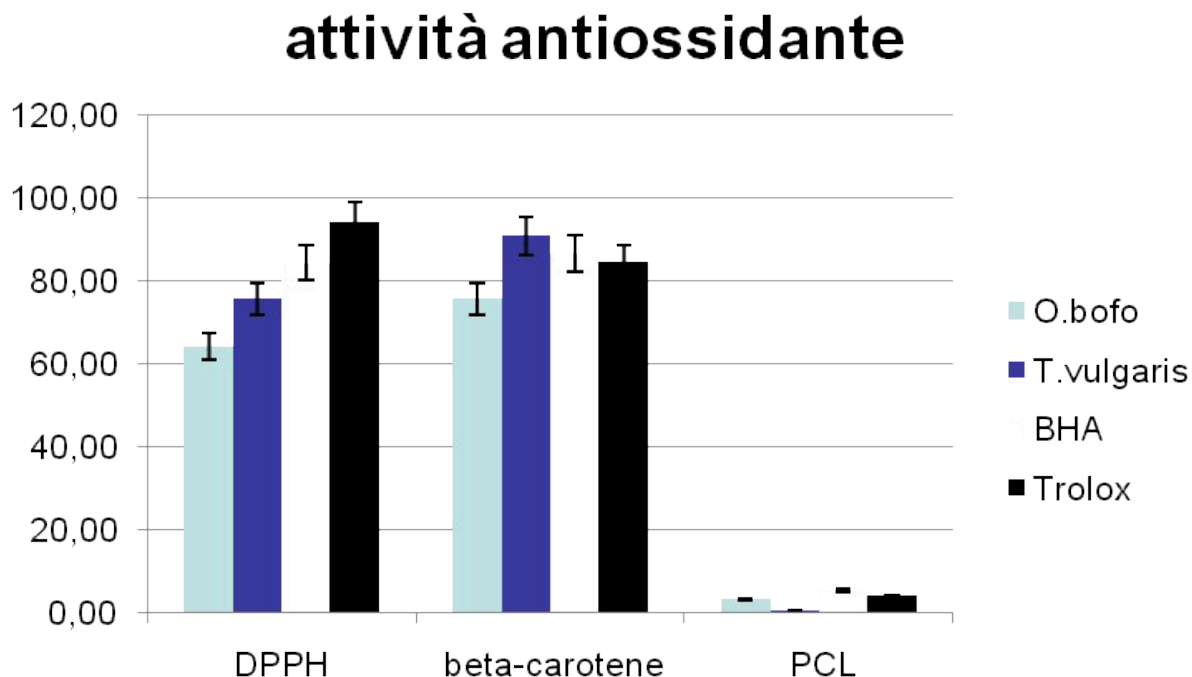
(butilidrossianisolo) che un antiossidante naturale, l'olio essenziale di *Thymus vulgaris* (chemotipo al timolo), e con un metodo strumentale, fotochemiluminescenza, in cui il controllo positivo di sintesi è invece il Trolox

- attività antimicrobica su batteri e lieviti con il metodo della diffusione su dischetto, utilizzando rispettivamente come controllo positivo rispettivamente ampicillina per i batteri e fluconazolo per i lieviti.



**Figura 3.** Fingerprinting metabolomico  $^{13}\text{C}$  NMR

I risultati ottenuti sono schematizzati dai seguenti istogrammi:

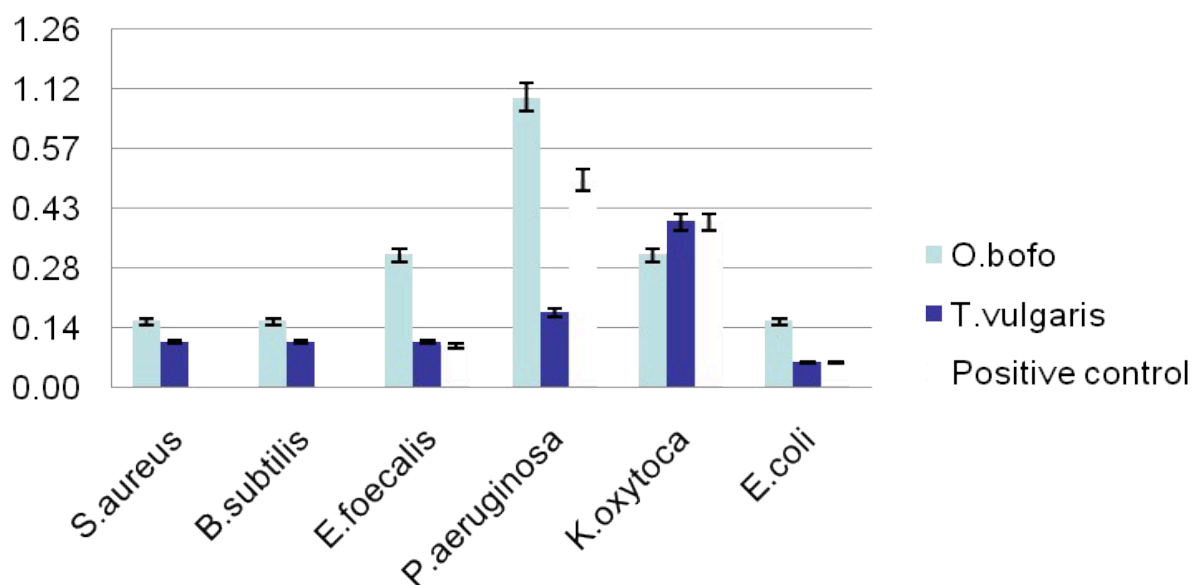


Nel test del DPPH la capacità antiossidante viene misurata come la capacità antiradicalica di un antiossidante nel favorire la reazione di riduzione del radicale DPPH. Nel saggio del  $\beta$ -carotene si valuta l'azione protettiva dell'antiossidante sulla reazione di perossidazione dell'acido linoleico. L'acido linoleico infatti tende a formare radicali e a propagare la reazione a catena sul  $\beta$ -carotene. Se interviene un antiossidante il carotene non reagisce e resta colorato. In particolare questo saggio si presta per essere testato su composti lipofili oltre che idrofili.

Il test strumentale della fotochemiluminescenza è particolarmente adatto per determinare l'attività antiradicalica di antiossidanti liposolubili come gli oli essenziali.

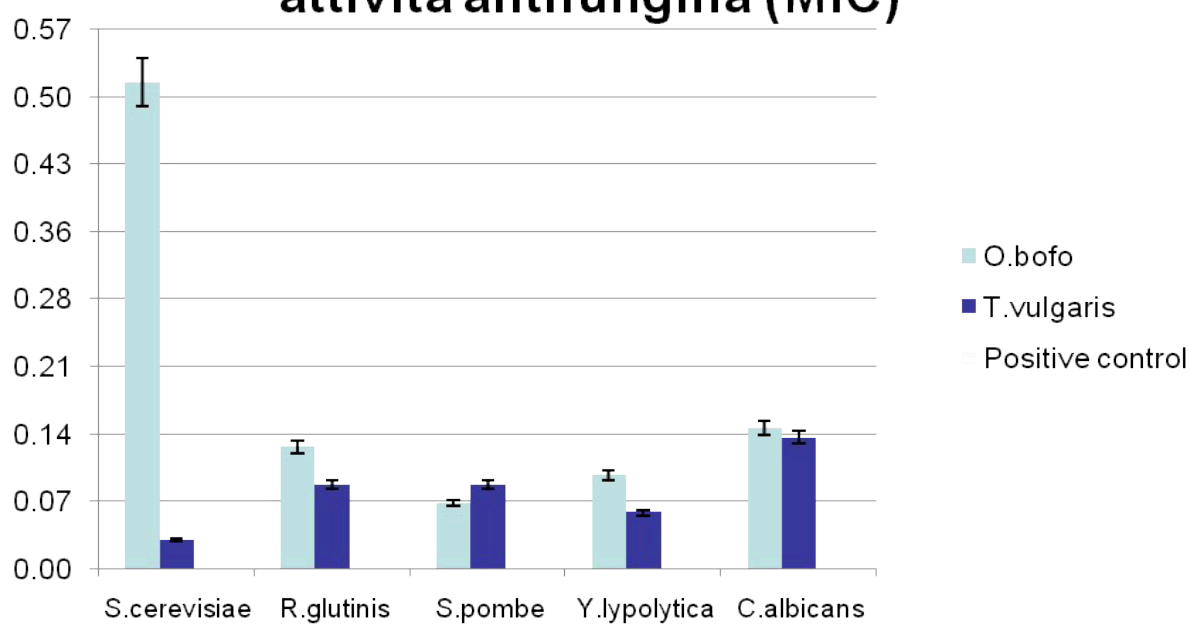
Tutti e tre i test testimoniano una significativa capacità attività antiossidante dell'olio essenziale sia rispetto al riferimento naturale, olio essenziale di *Thymus vulgaris*, sia rispetto agli antiossidanti sintetici.

## attività antibatterica (MIC)



L'attività antibatterica dell'olio essenziale, espressa come concentrazione minima inibente, su *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. oxytoca* è simile a quella del riferimento naturale *Thymus vulgaris* e rivela una rilevante capacità antibatterica.

## attività antifungina (MIC)



L'attività antifungina su lieviti, espressa come concentrazione minima inibente, su *R.glutinis*, *S.*

*pombe*, *Y. lipolytica*, *C.albicans* è simile a quella del riferimento naturale *Thymus vulgaris* e rivela una rilevante capacità antibatterica. Solo *S. cerevisiae* fa eccezione.

In base ai risultati ottenuti è pertanto possibile suggerire l'impiego di questo olio essenziale come conservante nel campo alimentare.

Per materiali e metodi si rimanda alle pubblicazioni citate.

## Bibliografia

1. A. Rutigliano, G. Morán. *Aves y Mamíferos del cantón Cotacachi*. Asamblea de la Unidad Cantonal de Cotacachi (AUC) 2006.
2. L. de la Torre, H. Navarrete, M. Muriel, P. M. J. Macía, H. Balslev (eds.). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus, 2008.
3. C. Quagliarini, M. Vannini, E. Paladino, *Chimica delle Fermentazioni e Laboratorio*. Zanichelli Editore S.p.A., Bologna, 1995.
4. A. Motta, F. Cladera Olivera, A. Brandelli, *Braz. J. Microbiol.* **35**, 307-310 (2004).
5. A. Ribeiro Bastos, D. H. Moon, A. Rossi, J. Trevors, S. M. Tsai, *Arch. Microbiol.* **174**, 346-352 (2000).
6. S. Latouche, *La scommessa della decrescita*, Feltrinelli 2003.
7. A. Bruni, M. Nicoletti, *Dizionario Ragionato di Erboristeria e di Fitoterapia*. Piccin, 2003.
8. M. Cerón, E. Carlos, *Manual de Botànica Sistemàtica, Etnobotànica y Mètodos de Estudio en el Ecuador*. Herbario “Alfredo Paredes” QAP, Escuela de Biología de la Universidad Central del Ecuador, 2005.
9. *Medicina Tradicional. Curso para promotores de salud*. Fundación Chankuap-Castilla La Mancha-Enfermeras para el Mundo, 2007.
10. J. Morton, Tahiti Lime. p. 172–175. In: *Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL, 1987.
11. R. Csuk, B. I. Glanzer, *Chem. Rev.* **91**, 49 (1991).
12. D. Green, K. Roberts, *Biotrasformation in preparative organic chemistry*, Accademic press, Londra (1989).
13. H. Yamada, S. Shimizu, *Angew. Chem. Int., Ed. Engl.* **27**, 622 (1988).
14. N. J. W. Kreger-van-Rij In: *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Elsevier (1984).
15. M. La Placa, *Principi di Microbiologia Medica*, V ed., Esculapio, Bologna, 1988.
16. M. Ticca, G. Tomassi, *Principi di tecnologia alimentari*, Roma (1972).
17. G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, F. Gardini, *Tetrahedrom Asymm.*, **4**, 1607 (1993).
18. P.V. Batelli, *Dizionario delle Scienze Naturali*. Vol. 11. Parte II, 1237 Firenze, 1841.
19. D. L. Hawksworth, P. M. Kirk, B. C. Sutton, D. N. Pegler, Ainsworth & Bisby's *Dictionary of the fungi*, Wallingford, International Mycological Institute, 1995.

20. F. M. Gerola, *Biologia Vegetale*, UTET, Torino, 1988.
21. G. Fantin, M. Fogagnolo, P. Giovannini, A. Medici, E. Pagnotta, P. Pedrini, A. Trincone, *Tetrahedrom Asymm.*, **5**, 1631 (1994).
22. J. W. Eckert, I. L. Eaks, In: *The Citrus Industry*. W. Reuter, E. C. Calavan, G.E. Carman (eds.), University of California Press. Berkeley, CA, EE UU, Vol. 5. 1989.
23. L. Palou, J. Usall, J. Pons, I. Viñas. *Microflora epifita de los frutos y ambiental en campos de mandarino «Clemenules» en Tarragona*. Àrea de Postcollita, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Estació Experimental de l'Ebre, IRTA, Ctra. Balada s/n, 43870 Amposta (Tarragona), 2000.
24. J. J. Tuset, *Podredumbres de los frutos cítricos*. Conselleria d'Agricultura i Pesca. Generalitat Valenciana. Valencia, 206 (1987).
25. E. Gallego, J. G. Pedreño, M. Honrubia, *Anales De Biología*, **9**, 21-34 (1986).
26. N. Teixidò, J. Usall, N. Magan, I. Vinas, *Ann. Appl. Biol.* **134**, 109-116 (1999).
27. R. Barkai-Golan, *Isr. J. Agr. Res.* **16**, 133-138 (1966).
28. G. Roth, *Phytopathol. Z.* **58**, 383-396 (1967).
29. A. Ippolito, *Mezzi e strategie di lotta contro i marciumi post-raccolta delle clementine*. Progetto Interregionale Frutticoltura Postraccolta. Università di Bari.
30. M. Pedretti, *Chimica e Farmacologia delle Piante Medicinali*, Studio editore, Milano.
31. M. R. Jr. Maróstica, G.M. Pastore, *Food Chemistry* **101**, 34-35 (2007).
32. M. R. Jr. Maróstica, T.A.A Rocha e Silva, G.C. Franchi, A. Nowill, G.M. Pastore, S. Hyslop, *Food Chemistry* **116**, 8-12 (2009).
33. G. Divya, A. Mohd, S. R. Mir, *J. Med. Arom. Plant Sciences* **26**, 500-502 (2004).
34. J. U. Chowdhury, M. Yusuf, N. C. Nandi, *Indian Perfumer* **51**, 19-21 (2007).
35. S. A. Vekiari, E. E. Protopapadakis, N. Gianovits-Argyriadou, *Journal of Essential Oil Research* **16**, 528-530 (2004).
36. A. Guerrini, M. Muzzoli, S. Maietti, K. Saro, M. Radice, S. Vertuani, R. Bruni, E. Andreotti, F. Poli, F. Antognoni, G. Sacchetti. *Oli essenziali da foglie del genere Citrus (Rutaceae) provenienti dalla foresta amazzonica ecuadoriana: un profilo fitochimico e funzionale*. Fitomed 2008 III Congresso Intersocietà sulle Piante Medicinali, p.72 (2008).
37. S. R. Fuselli, S. B. García de la Rosa, M. J. Eguaras, R. Fritz. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2067–2072 (2008).
38. J. U. Chowdhury, N. C. Nandi, M. Uddin, *Indian Perfumer* **50**, 54-55 (2006).

39. F. Tomi, M. Barzalona, J. Casanova, F. Luro. *Flavour Fragr. J.* **23**, 152–163 (2008).
40. F. De Pasquale, M. Siragusa, L. Abbate, N. Tusa, C. De Pasquale, G. Alonzo. *Scientia Horticulturae* **109**, 54–59 (2006).
41. M. Rossi, *Erboristeria Domani* **11**, 50-56 (1993).
42. A. Bruni, *Farmacognosia Generale e Applicata. I Farmaci Naturali*, Piccin 1999.
43. P. J. Crowell, *Nutr.* **129**, 775S (1999).
44. M. Jun, W.-S. Jeong, C.-T. Ho, *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 329 (2006).
45. M. Burits, F. Bucar, *Phytotherapy Research* **14**, 323–328 (2000).
46. Y. H. Hui, R. C. Chandan, S. Clark, N. A. Cross (eds.). *Handbook of Food Products Manufacturing*, Wiley, 2007.
47. I. Fichan, C. Larroche, J. B. Gros, *J. Chem. Eng. Data* **44**, 56-62 (1999).
48. Y. Ikushima, *Adv. Colloid Interface Sci.* 71-72, 259–80 (1997).
49. J. C. R. Demyttenaere, Nd. Hendra, M. Willemen, *Phytochemistry*, **47**, 1029-1036 (1998).
50. J. C. R. Demyttenaere, A. Adams, J. Vanoverschelde, N. De Kimpe. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5895-5901 (2001).
51. M. A. Mirata, M. Wüst, A. Mosandl, J. Schrader, *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3287–3296 (2008).
52. K. Kieslich, *Transformation of terpenoids. In Progress in Essential Oil Research*; E.-J. Brunke, ed.; Walter de Gruyter & Co.: Berlin, 1986.
53. W.-R. Abraham, B. Stumpf, H.-A. Arfmann, *J. Essent. Oil Res.* **2**, 251-257 (1990).
54. C. Ponzoni, *Chemistry & Biodiversity* **5**, 471-483 (2008).
55. J. Rama Devi, P. K. Bhattacharyya, *J. Indian Chem. Soc.* **55**, 1131 (1978).
56. K. M Madyastha, N. S. R. K Murthy, *Tetrahedron Letters* **29**, 579 (1988).
57. K. M. Madyastha, N. S. R. K. Murthy, *Appl. Microbial. Biotechnol.* **28**, 324 (1988).
58. O.P. Ward, C.S. Young, *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1280-1284 (1991).
59. T. Chatterjee, B. K. De, D.K. Bhattacharyya, *Indian Journal of Chemistry. Section B, Organic including Medicinal* **38**, 1025-1029 (1999).
60. S. S. Joglekar, R. S. Dhavalikar, *Applied Microbiology* **18**, 1084-1087 (1969).
61. TAKASAGO Perfumery K K, Japan Patent, 1974, No. 106767 and No. J 5-1035-491.
62. H. R. Velankar, M. R. Heble, *Electronic Journal of Biotechnology* **6**, 90-96 (2003).

63. H.G.W. Leuenberger, *Methodology In Biotransformations*. K. Kieslich, ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1984, vol. 6A.
64. G. J. Salter, D.B. Kell, *Critical Reviews in Biotechnology* **15**, 139-177 (1995).
65. L.V. Schneider, *Biotechnology and Bioengineering* **37**, 627-638 (1991).
66. A.A. Gbolade, G.B. Lockwood, *J. Plant Physiol.* **136**, 198-202 (1990).
67. T. Uchiyama, M. Suzuki, M. Numata, S. Naitou, T. Hoshino, *Shokubutsu Soshiki Baiyo* **8**, 9-13 (1992); CA 115: 155116J.
68. N. Dudai, O. Larkov, E. Putievsky, H. R. Lerner, U. Ravid, E. Lewwinoohn, A.M. Mayer, *Phytochemistry* **55**, 375-382 (2000).
69. T. Vanek, M. Novotny, R. Podlipna, D. Sýaman, I. Valterova, *J. Nat. Prod.* **66**, 1239-1241 (2003).
70. N. Hiroyuki, K. Koichiro, N. Takemichi, F. Yoshihiko, M. Junya, *Agric. Biol. Chem.* **46**, 319 – 320 (1982).
71. S. Barasa, I. Ndiege, W. Lwande, A. Hassanali, *J. Med. Entomol.* **39**, 736-741 (2002).
72. Y. Yuasa, H. Tsuruta, Y. Yuasa, *Organic Process Research & Development* **4**, 159-161 (2000).
73. J. K. Trigg, *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **12**, 243 (1996).
74. J. K. Trigg, N. Hill, *Phytother. Res.* **10**, 43-46 (1996).
75. J. Govere, D.N. Durrheim, L. Baker, R. Hunt, M. Coetzee, *Med. Vet. Entomol.* **14**, 441-444 (2000).
76. B.D. Lett, H.S. Kraus, PCT Int. Appl. WO9202136, 1992; Chem. Abstr. 1992, 117, 2827h.
77. Y. Watanabe, · R. Mihara, · T. Mitsunaga, T. Yoshimura. *J. Wood Sci.* **51**, 514–519 (2005).
78. D. Pergentino de Sousa, J. C. Ramos Goncalves, L. Quintans-Junior, J. Santos Cruz, D. A. Machado Araújo, R. Nóbrega de Almeida, *Neuroscience Letters* **401**, 231–235 (2006).
79. W. A. Duetz · H. Bouwmeester · J. B. van Beilen · B. Witholt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 269–277 (2003).
80. R. S. Dhavalikar, P. N. Rangachari, P. K. Bhattacharyya, *Indian J. Biochem.* **3**, 158-164 (1966).
81. E. R. Bowen, *Potential by-products from microbial transformation of d-limonene*. Florida State Horticultural Society, Florida, p 304 (1975).
82. Y. Noma, S. Yamasaki, Y. Asakawa, *Phytochemistry* **31**, 2725–2727 (1992).



83. J. Onken, R.G. Berger, *J. Biotechnol.* **69**, 163–168 (1999).
84. T. K. Cheong, P. J. Oriel, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84**, 903-915 (2000).
85. W. A. Duetz, A. H. M. Fjallman, S. Y. Ren, C. Jourdat, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2829–2832 (2001).
86. N. Yoshiaki, A. Yoshinori, *Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku ni kansuru Toronkai Koen Yoshishu* **50**, 431-433 (2006).
87. M. P. Menéndez, C. Rossini, H. Heinzen, S. O'Neill, M. Soubes, P. Moyna, *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* **88**, 79-82 (2000).
88. G. Toniazzo, L. Lerin, D. De Oliveira, C. Dariva, R. L. Cansian, F. Ferreira Padilha, O. A. C. Antunes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129-132**, 1023-1033 (2006).
89. H. C. Chang, P. J. Oriel, *J. Food Sci.* **59**, 660-662 (1994).
90. H. C. Chang, D. A. Gage, P. J. Oriel, *J. Food Sci.* **60**, 551-553 (1995).
91. W. A. Duetz, C. Jourdat, B. Witholt, Process for the preparation of perillyl alcohol. EP1236802 (2001).
92. T. Chatterjee, D. K. Bhattacharyya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 541-546 (2001).
93. M. Trytek, J. Fiedurek, *Biotechnology Letters* **27**, 149–153 (2005).
94. J. Rama Devi, P. K. Bhattacharyya, *Indian J. Biochem. Biophys.* **14**, 288–291 (1977).
95. K. R. Cadwallader, R. J. Braddock, M. E. Parish, D. P. Higgins, *J. Food Sci.* **54**, 1241-1245 (1989).
96. G. Speelmans, A. Bijlsma, G. Eggink, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 538–544 (1998).
97. A. E. Mars, J. P. L. Gorissen, I. Van den Beld, G. Eggink, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 101–107 (2001).
98. E. Van Rensburg, *Biotechnology Letters* **19**, 779–782 (1997).
99. P. Menéndez, C. García, P. Rodríguez, P. Moyna, H. Heinzen, *Braz. Arch. Biol. Technol.* **45**, 111-114 (2002).
100. B. H. De Oliveira, *Phytochemistry* **57**, 199-208 (2001).
101. M. S. Van Dyk, E. Van Rensburg, N. Moleki, *Biotechnol. Lett.* **20**, 431-436 (1998).
102. G. Kraidman, B. B. Mukherjee, I. D. Hill, *Bacteriol. Proc.* **63** (1969).
103. W.R. Abraham, H. M. R. Hoffmann, K. Kieslich, G. Reng, B. Stumpf, In: *Enzymes in organic chemistry*. Ciba Foundation Symposium III. Pitman, London, 146-160 (1986).
104. L. B. Draczynska, *J. Basic Microbiol.* **27**, 191–196 (1987).
105. Q. Tan, D. F. Day, K. R. Cadwallader, *Process Biochem.* **33**, 29–37 (1998).

106. J. C. R. Demyttenaere, K. Van Belleghem, N. De Kimpe, *Phytochemistry* **57**, 199–208 (2001).
107. W. R. Abraham, B. Stumpf, K. Kieslich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 24-30 (1986).
108. M. J. Van der Werf, P. M. Keijzer, P. H. Van der Schaft, *J. Biotechnol.* **84**, 133–143 (2000).
109. B. B. Mukherjee, G. Kraidman, I. D. Hill, *Appl. Microbiol.* **25**, 447-453 (1973).
110. P. Winterhalter, D. Katzeberger, P. Shreier, *Phytochemistry* **25**, 1347-1350 (1996).
111. R. P. Adams, In: *Identification of Essential Oil Components by Gaschromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*. Allured, Carol Stream, IL, USA, 2001.
112. H. E. Zimmerman, J. English, *J. Chem. Soc.* **75**, 2367-2370 (1953).
113. H. Nishimura, K. Kaku, T. Nakamura, Y. Fukazawa, J. Mizutani, *Agric. Biol. Chem.* **46**, 319-320 (1982).
114. R. P. Adams, P. Weyerstahl, *Journal of Essential Oil Research* **4**, 197-200 (1992).
115. J. Demyttenaere, K. Van Belleghem, R. De Kimpe, *Phytochemistry* **57**, 199-208 (2001).
116. M. Lindmark-Henriksson, D. Isaksson, T. Vaněk, I. Valterová, H. Högberg, K. Sjödin, *Journal of Biotechnology* **107**, 173-184 (2004).
117. C. García, P. Rodríguez, E. Días, H. Heinzen, P. Menéndez, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59**, 173–176 (2009).
118. A. Guerrini, G. Sacchetti, M. Muzzoli, G. Moreno-Rueda, A. Medici, E. Besco, R. Bruni *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7778-7788 (2006).
119. D. Mares, E. Andreotti, M. E. Maldonado, P. Pedrini, C. Colalongo, C. Romagnoli, *Current Microbiology* **57** 222-229 (2008).
120. G. Fantin, P. P. Giovannini, A. Guerrini, S. Maietti, A. Medici, P. Pedrini. *Biotechnology Letters* **28**, 803-810 (2006).
121. V. Ballabeni, M. Tognolini, S. Bertoni, R. Bruni, A. Guerrini, G. Moreno Rueda, E. Barocelli, *Pharmacological Research* **55**, 23-30 (2007).
122. M. Bruits, F. Bucar, *Phytoterapy Research* **14**, 323-328 (2000).
123. J. Novak, C. Bitsch, J. Langbehn, F. Pank, M. Skoula, Y. Gotsiou, C. M. Franz, *Biochemical Systematics and Ecology* **28**, 697-704 (2000).
124. R. Oberdieck, *Deutsche Lebensmittel Rundschau* **77**, 63–74 (1981).
125. R. Baur, P. Feeny, E. Stadler, *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 919 (1993).

126. S. Cavar, M. Maksimovic, M. E. Solic, A. Jerkovic-Mujkic, R. Besta, *Food Chemistry*, **111**, 648-653 (2008).
127. E. A Weiss, *Lauraceae-In essential oil crops*, 1st ed.; Oxfors University Press Inc. 1997, 195-200.
128. P. Naranjo, A. Kijjoa, A. M. Giesbrecht, O. R. Gottlieb, *J. Ethnopharmacol.* **4**, 233-236 (1981).
129. R. Bruni A. Medici, E. Andreotti, C. Fantin, M. Muzzoli, M. Dehesa, *Food Chem.* **85**, 415-421 (2004).
130. A. Guerrini, G. Sacchetti, M. Muzzoli, G. Moreno Rueda, A. Medici, E. Besco, R. Bruni, *J. Agricul. Food Chem.* **54**, 7778-7788 (2006).
131. A. Duque, M. Sanchez, J. Cavelier, J. Duivenvoorden, *J. Trop: Ecol.* **18**, 499-525 (2002).