



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
IN SCIENZE CHIMICHE**

CICLO XXX

COORDINATORE Prof. Carlo Alberto Bignozzi

**Caratterizzazione di una pianta tipica
peruviana *Myrcianthes discolor* (HBK) o
"Lanche canela" per una valorizzazione
salutistica e integrazione alimentare**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/10

PhD Student

Dott. Vásquez Corales Edison

Tutor

Prof. Brandolini Vincenzo

(firma)

(firma)

Anni 2015/2017

INDICE

	Pagina
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Studi etno-farmacologici di piante medicinali peruviane	2
1.2 Studi sugli effetti delle piante medicinali peruviane	5
1.3 Studio delle piante peruviane con effetto sessuale	8
1.4 <i>Myrtaceae</i> endemiche nel Perù	9
1.5 <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) “Lanche canela”	10
1.6 Le Myrtaceae	10
2. SCOPO	13
3. PARTE SPERIMENTALE	14
3.1 Materiali e metodi	14
3.1.1 Campioni	14
3.1.2 Determinazione dell’umidità	14
3.1.3 Determinazione dell’azoto organico totale	14
3.1.4 Determinazione delle ceneri	15
3.1.5 Determinazione dei metalli mediante spettroscopia di assorbimento atomico	16
3.1.6 Determinazione della fibra alimentare ed insolubile	17
3.1.7 Estrazione e determinazione della sostanza grassa	18
3.1.8 Determinazione del profilo degli acidi grassi	19
3.1.9 Estrazione dei polifenoli totali e della componente antiossidante	20
3.1.10 Determinazione dei polifenoli totali	20
3.1.11 Determinazione della capacità antiossidante totale	21
3.1.12 Cromatografia liquida ad alte prestazioni	22
3.1.13 Caratterizzazione chimica dell’olio essenziale	24
3.1.14 Attività antibatterica dell'olio essenziale	25
3.1.15 Attività antifungina	28
3.1.16 Effetto tossicologico dell'estratto idroalcolico di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) “Lanche canela”	28
3.1.17 Effetto farmacologico dell'estratto idroalcolico di	29

<i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) “Lanche canela”	
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	31
4.1 Caratterizzazione chimica	31
4.2 Caratterizzazioni bromatologica	31
4.3 Determinazione del profilo degli acidi grassi	35
4.4 Componente fenolica e capacità antiossidante	37
4.5 Identificazione e quantificazione di flavonoidi mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni	39
4.6 Caratterizzazione chimica dell’olio essenziale	43
4.7 Attività antibatterica dell'olio essenziale	46
4.8 Attività antifungina	46
4.9 Potenziali effetti tossicologici di estratti idroalcolici di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) “lanche canela”	48
4.10 Effetti farmacologici di estratti idroalcolici di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) “lanche canela” in relazione all’attività sessuale	50
5. CONCLUSIONI	54
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	56
INDICE DELLE FIGURE	64
INDICE DELLE TABELLE	66
RINGRAZIAMENTI	67

1. INTRODUZIONE

In gran parte del mondo, la medicina tradizionale rappresenta il pilastro principale nella fornitura di servizi sanitari o dei suoi complementi. In alcuni Paesi, la medicina tradizionale e/o la medicina non convenzionale vengono spesso chiamate “medicina complementare”. Gli utenti dei servizi sanitari in tutto il mondo continuano ad utilizzare la medicina tradizionale e complementare in materia di salute che svolgono anche un ruolo importante nello sviluppo economico di alcuni Paesi dove esistono forme di guarigione tradizionali o indigene fortemente radicate nelle loro rispettive culture e storie ^[1].

La medicina tradizionale del Perù, raggruppa numerose piante medicinali utili per la salute umana ed animale grazie alle conoscenze che derivano dalle esperienze empiriche fatte dai nativi. Tuttavia, questa ricchezza che il Perù ha richiede oggi contributi scientifici e sperimentali di massimo rigore che consentano di scartare gli usi tradizionali delle piante. Ciò permetterebbe di implementare le conoscenze popolari con gli aspetti scientifici per l'analisi e la valutazione di medicinali antichi e di nuova costituzione ^[2].

In Perù esistono varie pratiche di medicina tradizionale basate sulla cosmologia e credenze che vanno dai riti ai rimedi delle erbe.

Le pratiche tradizionali continuano ad essere mantenute in regioni isolate inoltre molte popolazioni indigene del Perù, come Quechuas, ritengono che vi sia un legame profondo tra l'uomo e l'ambiente.

Quando si ammalano il compito di mantenere questo equilibrio di solito viene affidato a "chamanes" o "curanderos" perché ritengono che siano importanti per aiutarli a condurre una vita equilibrata fin dal momento in cui sono nati ^[5].

La cultura “Chamánica” nell'area andina del Perù è molto antica. Le sue origini precedono la scoperta delle Americhe e da allora si è arricchita in modo continuo con relazioni interculturali e interetniche. Anche oggi, questa cultura è viva e rappresenta spesso l'unica pratica medica a cui una popolazione può riferirsi quotidianamente. Questo rende il "guaritore" l'unico medico disponibile per la popolazione andina per curare le malattie ^[4]. Le piante medicinali sono sempre state accompagnate da un'aura di mistero e per molti gruppi sociali, come soluzione per problemi di salute dell'uomo ^[5].

La flora peruviana comprende circa 25.000 specie, distribuite su diversi piani ecologici. Una parte importante della flora si è sviluppata nelle valli interne delle Ande del Perù, dove possono vegetare fino a 4.500 metri sul livello del mare ^[5]. Inoltre, esiste una grande diversità di piante e colture stagionali a causa della presenza di molte zone climatiche e nelle quali si trovano aree uniche come la foresta amazzonica o le montagne andine. Numerose sono le piante utilizzate in medicina, per curare o prevenire le malattie ^[6].

Nel nord del Perù, la diversità delle piante è particolarmente elevata, soprattutto perché le Ande diminuiscono in altezza permettendo alle persone di muoversi più facilmente dalla costa verso l'Amazzonia, consentendo uno scambio di flora tra le due regioni con importanti diversità.

Il Perù è uno dei Paesi botanicamente più ricchi del mondo ma, a causa della mancanza di sensibilizzazione e disconoscimento della biodiversità, l'utilizzo inadeguato di questa ricchezza ha escluso importanti settori rurali fuori dai benefici che la corretta gestione di questo patrimonio consentirebbe. Inoltre, molte specie indigene sono altamente a rischio di estinzione ^[7].

L'ampio territorio peruviano ha una flora ricca e varia presente in diversi ecosistemi che ha consentito di riconoscerlo all'interno delle aree di importanza mondiale. Le specie vegetali sono elementi fondamentali degli ecosistemi e costituiscono, in larga misura, la base per la sopravvivenza delle comunità biotiche in quanto tali. L'essere umano ha sempre sfruttato il suo ambiente naturale e, in particolare, la vegetazione per sopravvivere ^[8].

1.1 STUDI ETNO-FARMACOLOGICI DI PIANTE MEDICINALI PERUVIANE

In Perù sono stati condotti, in diverse parti del Paese, numerosi studi sull'uso di piante medicinali. Ad esempio, a Cusco sono state studiate le piante medicinali vendute in cinque principali mercati dove sono state registrate 152 specie, appartenenti a 45 famiglie. In particolare, erano rappresentate 36 specie di Asteraceae e 12 specie di Lamiaceae e quelle maggiormente acquistate erano: *Muehlenbeckia volcanica* “mullaca”, *Perezia virens* “valeriana”, *M. recutita* “manzanilla”, *H. taraxacoides* “pilli

– pilli”, *Taraxacum officinale* “diente de león” y *Persicaria hydropiperoides* “duraznillo”.

Anche la parte più utilizzata era generalmente l'intera pianta e le infusioni ottenibili o "mates calientes" rappresentavano il 69% delle preparazioni.

Le patologie più frequentemente trattate sono state infiammazioni renali ed epatiche, gastrointestinali e broncopolmonari. Le specie native locali rappresentavano l'83% del totale ^[9].

Allo stesso modo, nello studio condotto nella comunità nativa di Bajo Quimiriki, Junín, in Perù, i ricercatori riportano l'utilizzo di 402 piante medicinali, principalmente erbe. Le famiglie più importanti erano Asteraceae, Araceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae e Piperaceae. La maggior parte delle piante medicinali erano spontanee e raccolte nella foresta. I problemi legati al sistema dermico e al sistema digestivo hanno riguardato la maggior parte delle applicazioni medicinali effettuate ^[10].

Anche nello studio etnofarmacologico svolto a Yauyos, nella regione di Junín, in Perù sono state riportate 63 specie di piante appartenenti a 29 famiglie. Più della metà erano native ed endemiche dell'area di studio. Le foglie e le loro miscele erano la parte più utilizzata. La maggior parte dei rimedi sono stati ottenuti come infusi per somministrazioni orali. I disturbi comunemente trattati con queste piante erano quelli gastrointestinali e respiratori ^[11].

Un altro studio condotto nell'Amazzonia peruviana, nella valle Chazuta, ha raccolto e identificato 289 specie di piante, appartenenti a 202 generi, e i principali problemi di salute per i quali questi rimedi venivano utilizzati erano il trattamento di disturbi muscoloscheletrici, gastrointestinali e dermatologici ^[12]. Una ricerca condotta nella comunità El Chino della provincia di Fernando Lores, Loreto, Perù, 47 famiglie comprendevano 103 generi e 114 specie. Le specie più rappresentative utilizzate a scopo umano erano *Erythrina amazónica* (amasisa) e *Campsiandra angustifolia* (huacapurana), le foglie e la corteccia erano le parti più utilizzate per febbre, diarrea e problemi digestivi ^[13].

Contemporaneamente sono state fatte ricerche sull'uso tradizionale delle piante medicinali nel nord del Perù.

Uno studio condotto nei dipartimenti di Piura, Lambayeque, La Libertad, Cajamarca e San Martín ha permesso di raccogliere 510 specie di piante utilizzate a scopo medicinale, le famiglie più rappresentate sono le Asteraceae con 69 specie, le Fabaceae con 35, le Lamiaceae con 25, le Solanaceae con 21, le Euphorbiaceae con 12, le Apiaceae e Poaceae con 11. Il maggior numero di specie era stato usato per trattare malattie "magiche/rituale" (207 specie), seguite da disturbi respiratori (95), problemi nel tratto urinario (85), infezioni femminili (66), malattie epatiche (61), infiammazioni (59), problemi di stomaco (51) e reumatismi (45). La forma di somministrazione più utilizzata era il decotto e i cataplasmi, l'83% delle piante utilizzate erano native del Perù [14].

Un altro studio condotto nel Perù settentrionale nella provincia di Bolívar, dipartimento di La Libertad, ha consentito di identificare 140 specie appartenenti a 49 famiglie botaniche. Le dieci piante più conosciute dalla popolazione erano "Eucalipto", la "Cola de Caballo", la "Manzanilla", il "Pie de Perro", il "Matico", il "Llantén", la "Penca Sábila", il "Huiso", la "Verbena", e il "Perejil", di queste si utilizzavano soprattutto foglie, frutta, fiori, semi e radici per essere somministrate per via orale come infusioni, decotti o estratti alcoolici. In questa ricerca la maggior parte delle piante medicinali sono state utilizzate per il trattamento gastrointestinale ("Manzanilla"), del sistema nervoso ("Perejil", "Valeriana", "Muña" e "Ruda"), respiratorio ("Eucalipto" e "Matico"), renale ("Cola de Caballo" e "Pie de Perro") e dermatologico ("Llantén") [17].

Anche in un'altra indagine condotta in due comunità andine situate a diverse altitudini nella stessa provincia di Bolivar, la maggior parte delle piante conosciute erano state utilizzate per il trattamento delle malattie gastrointestinali (17%), nervose (14%), respiratorie (14%), urologiche (13%) e dermatologiche (8%). Le patologie nervose erano molto più frequenti nella comunità montana, mentre quelle dermatologiche e urologiche erano più comuni nelle comunità di valle [15].

Un'altra ricerca svolta per conoscere le piante tradizionalmente usate per trattare le problematiche riproduttive nel nord del Perù, ha evidenziato l'uso di 105 specie di piante medicinali appartenenti a 91 generi e 62 famiglie.

La maggior parte dei preparati a base di erbe impiegate per le patologie riproduttive erano realizzati con foglie di piante (22,72%), pianta intera (21,97%) e gambi (21,21%). Nel 60% dei casi i rimedi erano realizzati con materiale vegetale fresco e più del 70% di

questi erano somministrati oralmente, mentre i restanti venivano somministrati per via topica ^[16].

1.2 STUDI SUGLI EFFETTI DELLE PIANTE MEDICINALI PERUVIANE

Gli studi e le conoscenze delle piante medicinali peruviane sono aumentati nel corso degli anni favorendo in tal modo il supporto scientifico per l'uso medicinale tradizionalmente loro attribuito nelle diverse aree del Paese.

In particolare, in una recente ricerca ^[17] sono stati valutati i composti fenolici totali e l'attività antiossidante di frutti, granelli, foglie, semi, radici e tuberi di 27 piante andine peruviane utilizzate nella medicina popolare e/o come cibo dai nativi. Le specie e relative parti utilizzate con il maggiore contenuto di composti fenolici totali e con una maggiore attività antiossidante sono risultati:

- Foglie (*Alnus acuminata*, *Clinopodium bolivianum*, *Lepechinia meyenii* (Walp) e *Mutisia acuminata*);
- frutti (*Sambucus peruviana*);
- tuberi (*Tropaeolum tuberosum*);
- semi (*Lupinus mutabilis*).

La modalità più frequente con cui vengono utilizzate le piante medicinali è l'infusione acquosa o il decotto.

Sono state inoltre valutate le proprietà antiossidanti e il loro rapporto con il tenore fenolico di dieci infusi di piante peruviane: *Uncaria tomentosa*, *Lepidium meyenii* (maca), *Berberis vulgaris* L. (bérbero, agracejo), *Phyllanthus niruri* (chanca piedra), *Annona muricata* L. (graviola, guanábana), *Gentianella alborosea* (hercampure), *Geranium dielsianum* (pasuchaca), *Tabebuia ochracea* (tahuari), *Notholaena nivea* ("cuti cuti") e *Tiquilia paronychioides* ("flor de arena"). Le infusioni di tutte le piante studiate hanno mostrato attività antiossidante con i test DPPH, ABTS e FRAP, è stato quindi evidenziato una significativa correlazione con il contenuto fenolico totale mentre non è emersa alcuna correlazione con il contenuto di carotenoidi ^[18].

Sono state valutate le proprietà inibitorie della tirosinasi di 50 estratti di piante medicinali prelevate da diversi mercati di Lima. Gli estratti vegetali, che hanno mostrato

un tasso di inibizione dell'attività anti tirosinasi superiore al 50% sono stati quelli di *Hypericum laricifolium* Juss., *Taraxacum officinale* F.H.Wigg., e *Muehlenbeckia vulcanica* Meisn., e la più attiva è risultata essere l'estratto di *H. laricifolium* Juss. Negli estratti sono stati identificati mediante HPLC-DAD otto componenti bioattivi e più precisamente: acido propanoico, acido p-idrossibenzoico, acido clorogenico, acido vanilico, acido caffeico, kaempferolo 3-O-glucuronide, quercetina e kaempferolo. Inoltre, è stata valutata la concentrazione di questi composti necessaria per ottenere un'inibizione del 50% (IC₅₀), la quercetina ha evidenziato la migliore attività inibitoria nei confronti della tirosinasi (IC₅₀ 14,29 ± 0,3 µM) [19].

Presso Chiclayo (area di Lambayeque, provincia di Chiclayo) e Huaraz (area di Ancash, provincia di Huaraz) sono state raccolte 51 specie di piante medicinali utilizzate principalmente dai nativi per le problematiche di fegato e digestive.

Quattordici estratti di 13 specie (*Achyrocline alata*, *Ambrosia arborescens*, *Baccharis latifolia*, *Hypericum laricifolium*, *Krameria lappacea*, *Niphidium crassifolium*, *Ophryosporus chilca*, *Orthrosanthus chimboracensis*, *Otholobium pubescens*, *Passiflora ligularis*, *Perezia coerulescens*, *Perezia multiflora* y *Schkuhria pinnata*) hanno dimostrato di possedere un'attività antiproliferativa significativa nei confronti della linea cellulare umana Hep3B (IC₅₀ ≤ 50 µg/mL) associata ad una mancanza di tossicità verso gli epatociti umani primari *in vitro* [20]. Mentre il decotto delle foglie di *Uncaria tomentosa* è risultato essere citotossico inducendo anche lo stress ossidativo nelle cellule tumorali, ma non nelle cellule normali [21].

Uno studio realizzato per valutare alcuni effetti sulla salute con somministrazioni orali di estratti spray-dry di Maca nera o rossa (*Lepidium meyenii*) in soggetti adulti che vivono a bassa ed alta quota hanno evidenziato cambiamenti del desiderio sessuale, dell'umore, dell'energia determinando significative variazioni nelle loro valutazioni sulla qualità della vita correlata alla salute in generale e nelle malattie croniche, oltre a glicogeno, pressione sanguigna e livelli di emoglobina [22].

Gli estratti di 9 piante (*Abuta rufescens*, *Ayapana lanceolata*, *Capsiandra angustifolia*, *Citrus limon*, *Citrus paraíso*, *Minuartia guianensis*, *Potalia resinífera*, *Scoparia dulcis* y *Physalis angulata*) raccolte presso il fiume Nanay (Perù) hanno mostrato un'interessante attività antiplasmodiale (IC₅₀) < 10 µg/mL [23]. Anche le popolazioni Quechua e Mestizo che vivono in diverse aree della regione di Loreto (Perù), sono state

intervistate per capire come venivano effettuati i trattamenti tradizionali per combattere la malaria. Sono state quindi raccolte 14 piante e sono state eseguite estrazioni in esano, diclorometano e metanolo delle diverse parti raccolte, sette piante hanno mostrato un'attività antiplasmodiale (IC₅₀ de 2 a 25 µ/mL) e solitamente una bassa citotossicità, indicando la loro specificità antiplasmodiale [24].

Gli estratti di cinque piante *Maytenus macrocarpa* ("Chuchuhuasi"), *Dracontium lorentense* Krause ("Jergon Sacha"), *Tabebuia impetiginosa* ("Tahuari"), *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (eucalipto), *Uncaria tomentosa* ("Uña de gato") hanno mostrato un'azione antibatterica interessante verso la *Pseudomona aeruginosa*. L'effetto inibitorio degli estratti sui ceppi *P. aeruginosa* ha dimostrato che *Tabebuia impetiginosa* e *Maytenus macrocarpa* possiedono la maggiore attività antibatterica [25].

Gli estratti etanoliche di 51 specie di piante medicinali utilizzate nel Nord del Perù come rimedi antibatterici, hanno inibito *Escherichia coli* e, mentre 114 estratti etanoliche sono risultati attivi contro *Staphylococcus aureus*, solo 30 estratti acquosi hanno mostrato un'attività contro *Escherichia coli* e 38 contro *Staphylococcus aureus*. Le concentrazioni di MIC erano per lo più molto elevate e variavano da 0,008 a 256 mg/mL. *Hipericum laricifolium*, *Hura crepitans*, *Caesalpinia paipai*, *Cassia fistula*, *Hyptis sidifolia*, *Salvia* sp., *Banisteriopsis caapi*, *Miconia salicifolia* y *Polygonum hydropiperoides* hanno dimostrato di avere valori MIC inferiori [26].

Sono stati testati 23 estratti di piante commestibili e medicinali, la *Mauritia flexuosa* Lf ha mostrato una significativa capacità antiossidante (DPPH e ORAC =1062,9 e 645,9 ± 51,4 µgTE/mg rispettivamente), *Oenocarpus bataua* Mart. (DPPH = 903.8 e ORAC=1024 µgTE/mg estratto e *Inga edulis* Mart., (DPPH=337.0 e ORAC=795,7 µgTE/mg estratto). Il contenuto fenolico è stato correlato positivamente solo con il potenziale antiossidante. Nessuno di questi estratti ha denotato tossicità verso le normali cellule polmonari fetali, suggerendo il loro possibile utilizzo nello sviluppo di nuovi agenti erboristici con azione preventiva e/o terapeutica contro le patologie collegate allo stress ossidativo [27].

Nel distretto di Calleria del dipartimento di Ucayali, in Perù; sono stati studiati 9 estratti etanoliche di *Brunfelsia grandiflora* (Solanaceae), *Caesalpinia spinosa*, *Dracontium lorentense*, *Equisetum giganteum*, *Maytenus macrocarpa*, *Phyllanthus amarus*, *Piper aduncum*, *Terminalia catappa* e *Uncaria tomentosa*, piante medicinali tradizionalmente

utilizzate per il trattamento delle patologie associate a microrganismi. Tra le piante sperimentate, *Phyllanthus amarus* e *Terminalia catappa* hanno mostrato le attività antibatteriche più promettenti, inibendo tutti i ceppi testati con MIC da 0,25 a 16 mg/mL. L'estratto di *Piper aduncum* era significativamente più attivo verso i batteri Gram-positivi (MIC da 1 a 2 mg/mL) rispetto ai Gram-negativi (MIC > 16 mg/mL) [28].

Un altro studio con estratti etanoliche di cortecce di *Abuta grandifolia*, *Dipteryx micrantha*, *Cordia alliodora*, *Naucleopsis glabra*, *Pterocarpus rohrii* e *Maytenus macrocarpa* raccolti nel Distretto di Calleria, ha evidenziato come tutte le piante abbiano mostrato un effetto antimicrobico significativo, in particolare, l'estratto di *Naucleopsis glabra* ha mostrato la maggiore attività nei confronti dei batteri Gram-positivi (MIC da 62,5 a 125 µg/mL), mentre il più ampio spettro di azione è stato dimostrato con l'estratto di *Maytenus macrocarpa*, che ha inibito tutti i ceppi testati con MIC che vanno da 125 a 250 µg/mL [29].

Maca (*Lepidium meyenii*) impiegato in quantità superiori alla dose media di 50 mg/kg/giorno potrebbe effettivamente prolungare la durata del nuoto e accelerare la velocità media di nuoto (entro i primi 5 minuti) dei topi. Rispetto al modello di controllo ad alte dosi (100 mg/kg), potrebbe aumentare significativamente le attività di glutatione perossidasi e di creatina e diminuire l'attività di lattato deidrogenasi [30].

1.3 STUDIO DELLE PIANTE PERUVIANE CON EFFETTO SESSUALE

La pianta peruviana più studiata per la potenziale attività sessuale è Maca (*Lepidium meyenii*) in quanto sembra accertato che la somministrazione a lungo termine di Maca moduli l'equilibrio ormonale endocrino nei ratti e, in particolare, diminuisca i livelli di FSH (Follicle Stimulating Hormone) e che potrebbe rappresentare un possibile nuovo impiego per le donne in post-menopausa [31]. Inoltre, è stato dimostrato che i ratti alimentati con Macadamia (a dosi di 3-30 mg/kg) hanno aumentato i livelli di ormone luteinizzante nel siero in base della dose somministrata [32]. Nei ratti maschi il maggior effetto sulla spermatogenesi è stato osservato utilizzando la frazione etilacetata dell'estratto idroalcolico di *Maca negra* [33].

Studi clinici randomizzati hanno dimostrato che il consumo di Maca ha effetti favorevoli sull'energia e l'umore, può diminuire l'ansia e migliorare il desiderio sessuale.

È stato inoltre evidenziato che Maca migliora la produzione di spermatozoi, la loro motilità e il volume di sperma. I livelli sierici di testosterone, estradiolo, LH, FSH e prolattina non sono influenzati ^[34].

Maca macinato e placebo (1,75 g/die) sono stati somministrati a 20 volontari di età compresa tra i 20 ei 40 anni in uno studio di 12 settimane. Il consumo di Maca ha dimostrato, rispetto al placebo, di migliorare la fertilità negli uomini aumentando la concentrazione e la motilità degli spermatozoi ^[35]. Risultati preliminari hanno inoltre evidenziato che somministrando *Lepidium meyenii* (3,5 g/d) alle donne in post-menopausa si riducono l'ansia e la depressione, e anche gli effetti di disfunzioni sessuali indipendentemente dall'attività estrogenica e androgenica ^[36].

In un'altra ricerca i risultati hanno dimostrato che l'alimentazione con polvere di estratto idroalcolico di Maca per 6 settimane nei ratti maschi aumenta la concentrazione sierica di testosterone associata alla stimolazione della vescicola seminale ^[37].

Sono stati studiati gli effetti di due medicinali popolari peruviani, *Lepidium meyenii* Walp e *Jatropha macrantha*, sugli ormoni sessuali nei topi e sulle percentuali di impianto degli embrioni. È stato dimostrato che i livelli di progesterone e di testosterone sono aumentati significativamente nei topi riceventi *L. meyenii* Walp, così come quelli cui hanno somministrato sia *L. meyenii* Walp, sia *J. macrantha*. Tuttavia, non sono stati notati cambiamenti significativi nei livelli ematici di 17 beta-estradiolo o nelle percentuali di impianto degli embrioni ^[38].

1.4 MYRTACEAE ENDEMICHE NEL PERÙ

La famiglia Myrtaceae è presente in Perù con 20 generi e 165 specie ^[39,40], per lo più arbusti e alberi.

Eugenia è il genere più ricco di specie endemiche peruviane, *Myrtaceae* endemiche si trovano principalmente nelle regioni della foresta pluviale Amazonas e Mesoandina, tra i 100 ei 3.600 m di altitudine dove, in particolare, sei specie endemiche si trovano esclusivamente all'interno del Sistema Nazionale di Aree Naturali Protette dallo Stato ^[41].

Brack, in un lavoro ^[42], riporta che la specie *Myrcianthes ferreyrae* (Mc Vaugh) nota come "Arrayan", è presente ad Arequipa ed è utilizzata principalmente nella

preparazione di bevande come chicha e vino. *Myrcianthes myrsinoides* (HBK) cresce nell'Alta foresta e nella Sierra sopra 2.000 msm e le foglie vengono utilizzate come tonico e i frutti sotto forma di collare per la paura. *Myrcianthes rhopaloides* (HBK) Mc Vaugh, conosciuto come "Lanche" e "Unca", è distribuito sulle pendici occidentali del nord-ovest del Perù tra 2000 e 3000 m.

1.5 *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela”

Myrcianthes discolor (HBK) "Lanche canela", appartiene alla famiglia Myrtaceae. La famiglia Myrtaceae è molto estesa formata da un gran numero di piante lignee che vanno dai boschi ai grandi alberi. La famiglia ha grande importanza economica perché è formata da numerose specie di grande interesse e utilità sia per i suoi frutti commestibili, sia fornendo spezie, oli, e boschi. Allo stesso modo, numerose specie rivestono anche una grande importanza come piante ornamentali ^[43]. *Myrcianthes discolor* (HBK) è un albero che può raggiungere i 3-4 metri di altezza. Cresce nel nord del Perù tra 2.000 e 3.000 metri sul livello del mare, nei dipartimenti Piura, La Libertad, Cajamarca e Amazonas ^[42].

1.6 LE MYRTACEAE

Il genere *Myrcianthes* appartiene a una famiglia di piante aromatiche ed è stato studiato per il contenuto di olio essenziale, particolarmente in Costa Rica. *Myrcianthes* spp. O "Frutta nera", produce oli essenziali ricchi soprattutto di α -pinene (11,81%), β -pinene (8,35%), limonene (4,25%) e 1,8-cineolo (52,77%); *Myrcianthes pungens*, *Myrcianthes cisplatensis*, presenti in Argentina producono un olio essenziale ricco di α -pinene, β -pinene, limonene e 1,8-cineolo, anche se in proporzioni diverse ^[44].

Diversi studi sugli oli essenziali hanno permesso l'identificazione di numerosi componenti in diverse specie della famiglia Myrtaceae, uno studio condotto a Monteverde, in Costa Rica, riporta che le componenti più abbondanti dell'olio essenziale di *M. fragrans* sono: 1,3,5-trimetossibenzene (15,7%), (Z)-ex-3-en-1-ol (10,0%), alfa-cadinol (10,4%), eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol (9,0%), ossido di caryophyllene (7,8%) e spathulenol (7,5%). Anche *Myrcianthes rhopaloides* contiene principalmente linalool (17,7%), alfa-cadinol (14,4%), spathulenol (11,1%), tau-cadinol (9,6%) e 1-epicubenol (6,9%). Le principali componenti dell'olio essenziale delle foglie

del frutto nero di *Myrcianthes* sono risultate essere il 1,8-cineol (38,3%), alfa-terpineol (21,2%), heptano-2-ol (15,5%), terpinen-4-ol (%) e beta-pineno (3,8%)^[45].

Tra i costituenti chimici dell'olio essenziale ottenuto per idrodistillazione dalla *Myrcianthes fragrans* (Sw) McVaught raccolta nello Stato Táchira in Venezuela, sono stati identificati quarantacinque composti che costituiscono il 91,8% dell'olio. I sette principali composti sono: β -caryolene (11,5%), micene (8,9%), β -felandren + limonene (8,7%), α -humulene (6,7%), α -copaen-8-ol (6,7%) e α -selinene (5,3%)^[46]. L'olio essenziali di *Myrcianthes osteomeloides* conteneva 1,8-cineolo (55,7%) come componente principale, seguito da α -pinene (17,9%), α -terpineol (8,5%) e β -pinene (17,1%) mentre in *M. pseudomato* sono stati identificati linalolo (11,7%), limonene (8,5%) e γ -terpinene (7,3%) come costituenti principali^[47].

L'analisi di foglie fresche di *Myrcianthes rhopaloides* (Kunt) McVaugh, ha permesso di identificare il 72,5% dei composti, in particolare sono stati identificati 11 monoterpeni (27,5%), 9 monoterpeni ossigenati (22,5%), 7 sesquiterpeni (17,5%) e 2 sesquiterpeni ossigenati (5%). Citronellale è risultato il monoterpene più abbondante con il 27,3%^[48]. Nelle foglie di otto piante di *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) provenienti da tre comuni del nord-est di Pará, in Brasile, i principali componenti sono risultati essere Dimethylxanthoxylin, selin-11-en-4 α -ol, β -elemene, germacrene D, biciclermacrene e δ -cadinene^[49].

Questa famiglia è altrettanto importante per i suoi frutti commestibili infatti, uno studio condotto sui frutti di *Myrcianthes pungens* Berg. Legr. (Myrtaceae) conosciuto come guabiju, ha analizzato i frutti di due genotipi classificati come PL2 e PL1. In totale i flavonoidi e i polifenoli totali variavano da 79,8 mg/100g a 154mg/100g e tra 2438 mg/100g e 4613mg/100 g rispettivamente. I flavonoidi identificati sono stati quercitrina, iperoside e isoquercitrina; l'attività antiossidante dell'estratto metanolico era paragonabile a quella del Trolox^[50]. Un'ulteriore indagine è stata condotta su 14 frutti della famiglia Myrtaceae, (*Eugenia aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana*, *E. reinwardtiana*, *Myrciaria cauliflora*, *M. vexator*, *Syzygium cumini*, *S. curranii*, *S. jambos*, *S. javanicum*, *S. malaccense*, *S. samarangense* e *S. samarangense* var. *Taiwán pink*). Il contenuto fenolico totale era compreso tra 3,57 e 101 mg/g e sono stati identificati mediante HPLC-PDA myricetina in 5 frutti e quercetina in 13 frutti^[51]. Il Camu-camu (*Myrciaria dudia*) è stato studiato a Pucallpa, Ucayali (Perù) e sono stati caratterizzati cinquantatré composti fenolici. Il contenuto della farina (4007,95

mg/100g) di Camu-camu era superiore a quello della polpa (48,54 mg/100g). In entrambi i prodotti sono stati rilevati myricetin, flavonol coniugati, acido ellagico e ellagitannini. Cianidina 3-glucoside e quercetina e i rispettivi glicosidi sono stati trovati solo nella polpa, mentre proanthocyanidine erano presenti solo nella farina (3,5 g/100 g). Il contenuto di vitamina C era minore nella polpa macinata (3,5%) rispetto alla farina (9,1%) inoltre la farina Camu-camu ha evidenziato una maggiore capacità antiossidante [52].

2. SCOPO

In Perù c'è una grande diversità biologica infatti esistono numerose specie di piante e animali endemici che non sono presenti in altri luoghi ^[7]. Questo è dovuto alla diversità dei climi e dei microclimi, che offrono le condizioni più favorevoli alla crescita di un'ampia varietà di piante anche per utilizzi medicinali. Sono le stesse che sono state usate dagli antenati e le cui proprietà sono state trasmesse di generazione in generazione arricchendo e migliorando l'integrazione culturale dei nativi e dei migranti ^[19, 53].

Il Perù è considerato il terzo Paese con le maggiori diversità del pianeta. Ha, in particolare, fornito importanti contributi di specie e varietà grazie ai vari piani ecologici e microclimi rappresentati da 84 aree fondamentali sulle 103 attualmente note dove sarebbero presenti almeno 50.000 specie di piante. Questa reale e potenziale ricchezza di promettenti soluzioni terapeutiche di origine vegetale supportate da una conoscenza ancestrale del loro uso etnofarmacologico rappresenta una risorsa preziosa che dovrà essere sfruttata correttamente attraverso lo sviluppo sostenibile a beneficio di tutti ma, soprattutto, delle comunità native che hanno saputo conservare queste risorse fino ad oggi ^[54].

Circa 5.000 specie di piante vengono sfruttate come alimenti e/o come medicinali e la modalità più frequente è l'infusione che i peruviani utilizzano fin dall'antichità per l'integrazione alimentare, per la prevenzione della salute e come trattamento per le malattie. Si può dire che l'infusione come il tè fa parte della vita quotidiana dei peruviani. Alcune infusioni possono servire come una buona fonte per lo sviluppo di nuovi alimenti funzionali ^[6].

Myrcianthes discolor (HBK) conosciuto come "Lanche canela", tradizionalmente utilizzato nel nord del Perù come un'infusione per stimolare dell'attività sessuale, manca di sufficienti informazioni scientifiche sulle componenti chimiche. Con questo studio si è cercato di caratterizzarne la composizione bromatologica, il contenuto dei polifenoli, la capacità antiossidante, la identificazione dei flavonoidi, il contenuto di macro e microelementi, la composizione degli oli essenziali per valutare la possibile attività antifungina e antibatterica. Inoltre, si è cercato di stimare anche l'attività farmacologica.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 MATERIALI E METODI

3.1.1 CAMPIONI

Le foglie fresche sono state raccolte nel nord del Perù del Distretto di Paimas, provincia di Ayabaca, Dipartimento di Piura in febbraio de 2016. Dopo la raccolta, i campioni sono stati portati in laboratorio di Chimica della Universidad Católica los Ángeles de Chimbote dove sono stati mantenuti in una stufa, a una temperatura costante di 45°C, fino a ottenere la perdita totale di umidità. Sono stati frantumati con l'aiuto di un tritatore, ottenendo un campione di polvere fine e omogenea. La polvere è stata portata in laboratorio di Chimica degli alimenti della Università Degli Studi Di Ferrara, per effettuare la caratterizzazione chimica.

Una parte dei campioni è stata utilizzata per la classificazione botanica nel Museo di Storia Naturale Della Univesidad Nacional Mayor de San Marcos - Perù.

3.1.2 DETERMINAZIONE DELL'UMIDITÀ

Si procede prelevando 2 g circa esattamente pesati di foglie triturate e li si adagia in pesafiltri di vetro, infine li si ripone in stufa a 110°C fino a peso costante. Il risultato dell'umidità è espresso in percentuale peso/peso (% p/p).

3.1.3 DETERMINAZIONE DELL'AZOTO ORGANICO TOTALE

Questo tipo di analisi quantitativa viene eseguita con il metodo Kjeldahl ed è articolata in tre fasi: mineralizzazione del campione, distillazione mediante l'utilizzo di un apparecchio semiautomatico e titolazione. Questo è un metodo indiretto perché non si basa sulla misurazione dell'effettivo contenuto proteico, ma sulla quantità dell'azoto organico totale di provenienza proteica presente nel campione.

In un provettone di vetro si mettono: 1 g circa esattamente pesati di campione essiccato, 0,7 g di CuO (funge da catalizzatore di reazione), 10 g K₂SO₄ (innalzatore del punto di ebollizione del solvente) e 25 mL di H₂SO₄ al 96%

(forte ossidante della reazione). Si procede con la mineralizzazione: i provettoni vengono riposti su una piastra riscaldante, sigillati con un sistema a sei cappe per aspirare i vapori emessi dall'ebollizione e impostata la temperatura di 400°C fino a completa digestione. In questa fase l'azoto organico presente nella matrice si trasforma in sali di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Una volta raffreddate le soluzioni si aggiungono 10 mL di H_2O deionizzata per diluire la soluzione e 25 mL di tiosolfato per far precipitare i composti che potrebbero interferire. Si procede quindi con la fase di distillazione mediante un apposito strumento semiautomatico che è collegato a due taniche, un contenente H_2O deionizzata, l'altra NaOH al 32%. Durante questa fase l'NaOH aggiunta fino a reazione basica sposta l' NH_4^+ dal suo sale, si forma NH_3 e tutto l' H_2SO_4 rimasto viene neutralizzato. Contemporaneamente l' H_2O deionizzata sotto forma di vapore fa risalire l' NH_3 in un condensatore e i vapori di questa, attraverso un tubo refrigerante, cadono in una beuta contenente una quantità nota e titolata di H_2SO_4 che protona nuovamente l' NH_3 a NH_4^+ . Quindi in presenza dell'ambiente acido si riforma il sale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Come ultima fase si effettua la retrotitolazione dell'acido libero con NaOH alla stessa concentrazione dell' H_2SO_4 e con rosso di metile come indicatore.

L'azoto organico di derivazione proteica è espresso in percentuale peso/peso (% p/p) e viene calcolato facendo dapprima la differenza tra i mL di H_2SO_4 e i mL di NaOH utilizzati nella titolazione, così da sapere quanti mL di H_2SO_4 si sono legati all' NH_4^+ , poi si moltiplicano per il fattore di conversione 0,007 in modo da ottenere i g di azoto presenti nel campione. Successivamente, mediante una proporzione, si calcola la percentuale di azoto presente. Per conoscere il quantitativo proteico nel campione si deve moltiplicare per 6,25, un fattore di conversione proteica corrispondente alla percentuale di azoto nella proteina.

3.1.4 DETERMINAZIONE DELLE CENERI

Serve per determinare la frazione minerale totale. Si esegue ponendo 1 g circa esattamente pesati di campione essiccato in apposite capsule di quarzo e si mettono in muffola a 570°C per 6 ore. Ciò che si verifica è la carbonizzazione del campione di cui la parte organica si ossida ad acqua e CO_2 , le quali poi evaporano, mentre la parte inorganica rimane e rappresenta la frazione minerale

totale. Il quantitativo di ceneri si ottiene rapportando a 100 il peso netto iniziale ed il peso netto dopo il trattamento in muffola.

3.1.5 DETERMINAZIONE DEI METALLI MEDIANTE SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO

✓ Mineralizzazione del campione

La presenza dei metalli viene rivelata mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico, ma prima di procedere con l'analisi è necessario che il campione venga mineralizzato.

Si mettono 1 g circa esattamente pesati di campione in provettoni di vetro e si aggiungono 5 mL di HNO₃ concentrato. Si utilizza questo tipo di acido forte perché i sali che si formano sono solubili. I provettoni vengono posti su una piastra riscaldante (digestore) e sigillati con refrigeranti a ricaduta per condensare i vapori e recuperare eventuali tracce di metalli trascinate via dai fumi. Al digestore viene quindi impostato un programma di riscaldamento articolato in quattro diversi intervalli di temperatura.

Step	1°	2°	3°	4°
Temperatura (°C)	50	90	140	200
Tempo (minuti)	20	20	20	80

Step di temperature e tempi impostati alla piastra riscaldante.

Terminato il processo di mineralizzazione, tutte le molecole organiche sono ossidate a H₂O e CO₂, tutti i metalli si sono convertiti a sali nitrati e contemporaneamente l'HNO₃ in eccesso a vapori nitrosi che fuoriescono dai refrigeranti sotto forma di fumi giallo-rossastri.

Si lascia scendere un po' la temperatura e poi si prosegue con l'operazione di strippaggio, cioè viene aggiunto 1 mL di H₂O₂, che serve per completare l'ossidazione della sostanza organica e per eliminare l'eccesso di vapori nitrosi, e si fa partire un nuovo programma di riscaldamento che prevede un solo step di 20 minuti a 200°C. Terminato quest'ultima fase di digestione, si lascia raffreddare bene il sistema. Ciascun campione mineralizzato viene trasferito in

un matraccio da 20 mL. Per rendere la soluzione ancora più limpida e senza tracce solide si filtra la soluzione del matraccio in una provetta utilizzando un filtro Whatman senza ceneri (filtri di cellulosa pura al 100%).

A fianco dei campioni, con lo stesso procedimento, si prepara il bianco, cioè una soluzione di controllo contenente i reagenti ma non il campione. Serve per escludere dalla misurazione la presenza di interferenze dovute ai metalli eventualmente presenti nei reagenti.

Questa fase preliminare è necessaria per avere metalli in forma libera e non legati a sostanze organiche presenti nella matrice perché lo spettrofotometro è in grado di leggere solo quelli liberi disciolti in soluzione acquosa.

✓ **Analisi con spettrofotometro ad assorbimento atomico (AAS)**

I campioni preparati sono pronti per essere analizzati. Lo strumento utilizzato per quest'analisi è uno spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin Elmer 1100B in configurazione fiamma ad aria/acetilene. Prima di tutto occorre costruire una retta di taratura con gli opportuni standard a titolo noto del metallo che si va ricercando. La retta di taratura è costruita secondo la legge di Lambert-Beer poiché associa a determinati valori di assorbanza i rispettivi valori di concentrazione. Per calcolare la retta sono necessari almeno tre standard in concentrazione crescente. La retta sarà tanto più precisa quanto il coefficiente di correlazione (r^2) si avvicina ad 1, cioè tanto più i punti sono allineati tra loro. Una volta costruita la retta si procede con la lettura dei campioni mineralizzati opportunamente diluiti. Lo spettrofotometro fornisce automaticamente il valore della concentrazione del metallo nella soluzione. La concentrazione del metallo nei campioni si esprime in $\mu\text{g/g}$ e si ottiene applicando una formula apposita e rapportando il valore ottenuto ai grammi di campione pesati inizialmente.

3.1.6 DETERMINAZIONE DELLA FIBRA ALIMENTARE ED INSOLUBILE

La determinazione della fibra alimentare è stata eseguita utilizzando un kit enzimatico (Total Dietary Fiber Assay Kit, Megazyme). 1 grammo circa esattamente pesato di campione viene addizionato con 40 mL di MES/TRIS e 50 μL di α -amilasi (per gelatinizzare, idrolizzare e depolimerizzare l'amido), posto in bagno termostato a 95 °C per 35 minuti. Terminata l'incubazione si

lasciano raffreddare i campioni fino a 60 °C e si aggiungono 10 ml di acqua deionizzata e 100 µl di proteasi (per solubilizzare e depolimerizzare le proteine), si lascia nuovamente incubare a 60°C per 30 minuti. Si aggiungono 5 ml di HCl 0,561 M; si modifica il pH con NaOH 4 M fino ad un valore compreso tra 4.1 e 4.8, e si aggiungono 200 µl di amiloglicosidasi (per idrolizzare frammenti di amido in glucosio), si pone in incubazione e agitazione per altri 30 minuti. La fibra insolubile si ottiene filtrando su un crogiolo contenente 1g di celite. La soluzione rimanente è recuperata con etanolo al 96% (in quantità 4 volte superiore al volume di partenza) per far precipitare la fibra solubile, che verrà successivamente filtrata anch'essa su celite. Il quantitativo di fibra solubile e insolubile si ottiene per differenza con la tara iniziale dei singoli crogioli e riportando a 100.

3.1.7 ESTRAZIONE E DETERMINAZIONE DELLA SOSTANZA GRASSA

È un'analisi di tipo quantitativo e viene effettuata mediante metodo Soxhlet. Questo processo si basa sull'estrazione ponderale della frazione lipidica dal campione con etere etilico utilizzando un apparecchio distillatore semiautomatico (VELP SCIENTIFICA, Usmate, Milano).

Si effettua la pesata dei bicchieri di vetro e si segna la tara, si pesa poi una quantità di campione essiccato macinato finemente 3 g e si ripone in appositi ditali di cellulosa. Questi ultimi vengono agganciati allo strumento. Si versano nei bicchieri 50 mL di etere etilico e si ripongono sotto i ditali di cellulosa. Si procede quindi con l'accensione dello strumento che provvederà ad estrarre la porzione lipidica tramite tre fasi:

- **fase estrattiva:** comprende la fase di immersione e la fase di lavaggio. Entrambe queste fasi prevedono 30 minuti di tempo, ma nella prima il ditale di cellulosa contenente il campione è immerso nel bicchiere con l'etere etilico, mentre nella seconda il ditale è sollevato ed è sottoposto ad un flusso a ricadere con solvente puro;
- **fase di recupero:** dura 10 minuti e serve per far evaporare completamente il solvente. L'etere etilico utilizzato viene raccolto nella serpentina refrigerante e trattandosi di solvente puro, può essere utilizzato per una successiva analisi.

Si procede con la pesata dei bicchieri di vetro da cui si ricava, per differenza con la tara iniziale, il netto in grammi dei lipidi estratti. Si calcola poi la percentuale lipidica impostando una proporzione che correla i grammi di campione essiccati con i grammi di lipidi estratti a 100.

3.1.8 DETERMINAZIONE DEL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI

Successivamente alla determinazione quantitativa della frazione lipidica si procede con la caratterizzazione degli acidi grassi presenti nel campione, ovvero un'analisi qualitativa.

Il contenuto lipidico estratto con metodo Soxhlet viene recuperato con 3 mL di esano e messo in una provetta. Viene poi aggiunto 1,5 mL di metanolo con idrossido di sodio 5% che consente la transesterificazione degli acidi grassi cioè idrolizza gli acidi grassi dalla molecola di glicerolo, causando quindi la rottura del legame estere tra la molecola di glicerolo e gli acidi grassi con formazione di un nuovo legame estere tra il gruppo metilico e gli acidi grassi. Il tutto viene agitato per qualche minuto e dopo che si è verificata la separazione di fase, si preleva quella superiore contenente gli acidi grassi metilati che viene trasferita in un'apposita vial per GC per essere analizzata.

Lo strumento utilizzato è un Gascromatografo VARIAN 3900 con iniettore split-splitless e rivelatore spettrometro di massa VARIAN 2100 ad impatto elettronico che consente di effettuare l'analisi in tempo reale dei singoli picchi in uscita dalla colonna, permettendo una determinazione quali-quantitativa mediante il confronto dello spettro registrato con spettri memorizzati in libreria.

Le condizioni sperimentali sono:

- Colonna capillare Zebron ZB-WAX Phenomenex (60 m x 0,25 mm), fase stazionaria polare di polietilenglicole (0,25 μ m), temperatura massima 200°C;
- Iniettore automatico split-splitless, temperatura massima 260°C;
- Gas vettore: elio, pressione di ingresso 10 psi;
- Rivelatore spettrometro di massa a trappola ionica con sorgente ad impatto elettronico, temperatura massima 200°C.
- Per la determinazione del profilo degli acidi grassi è stato impostato il metodo "WAX LIPIDI" con le seguenti condizioni sperimentali:

- Temperatura iniettore 250°C, modalità split, rapporto splittaggio 1:20, quantità di campione iniettata in colonna 1 µl;
- Temperatura iniziale 100°C mantenuta per 2 minuti;
- Aumento della temperatura di 10°C al minuto fino a 200°C e poi isoterma per 108 minuti;
- Solvent delay: 3 minuti;
- Modalità di acquisizione: scan;
- Durata totale della corsa 120 minuti.

Lo strumento fornisce un cromatogramma in cui sono presenti i picchi corrispondenti agli esteri metilici degli acidi grassi presenti nel campione. Attraverso l'area sottesa ai picchi è possibile eseguire la quantificazione degli acidi grassi, mentre l'identificazione avviene attraverso la valutazione dello spettro di massa fornito dalla libreria NIST dello strumento.

3.1.9 ESTRAZIONE DEI POLIFENOLI TOTALI E DELLA COMPONENTE ANTIOSSIDANTE

Attraverso questa metodica si ottiene un estratto che contiene polifenoli totali. Esso viene utilizzato per le analisi miranti alla quantificazione dei polifenoli totali e composti antiossidanti.

Per realizzare questo estratto si utilizza il campione secco e macinato, in peso 0.25 g circa esattamente pesati, poi lo si mette all'interno di una beuta e si aggiungono 15 mL di metanolo 80% + 0.1% acido formico. Si avvolge la beuta con uno strato di alluminio poi si sottoposta a agitazione sull'aggregatore magnetico per 30 minuti, poi centrifugata a 9000 rpm per 5 minuti, quindi il surnatante viene separato e messo in un matraccio da 50 mL (avvolto con uno strato di alluminio), questo processo di estrazione è stato eseguito 3 volte, infine viene portato a volume con il solvente. Fino al momento dell'analisi si mette l'estratto in freezer a -20°C.

3.1.10 DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI TOTALI

L'analisi dei polifenoli totali è eseguita utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu, formato da una miscela di acido molibdico e acido tungstico che legano i gruppi -OH presenti, e in particolare i gruppi fenolici grazie all'aggiunta di una

soluzione di carbonato di sodio al 10%. Il legame tra i due componenti forma un complesso che acquisisce una colorazione blu che può essere dosato spettrofotometricamente mediante UV.

Si preleva un'aliquota di estratto metanolico al 80% + 0.1% acido formico, variabile da 50 ai 100 μ L e si trasferisce in un matraccio della capacità di 10 mL. Si aggiungono 500 μ L di reattivo di Folin, e si lascia al buio per 5 minuti affinché il reattivo reagisca con i polifenoli presenti nel campione. Poi si aggiungono 2 mL di carbonato di sodio al 10% e si porta a volume con acqua deionizzata. Contemporaneamente ai campioni si preparano un bianco e la retta di taratura utilizzando come standard la (+) catechina in concentrazioni crescenti 0,5, 1, 2,5, 5 e 7,5 ppm. Si lasciano al buio per 90 minuti e poi si procede con la lettura spettrofotometrica a 700 nm. Il contenuto di polifenoli nel campione viene espresso in μ g di catechina per g di campione.

3.1.11 DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE

✓ Metodo DPPH'

Questo procedimento consente di valutare la capacità antiossidante complessiva degli estratti metanolici ottenuti precedentemente. Il principio su cui si basa è l'inibizione del radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH') da parte delle sostanze antiossidanti presenti nel campione.

Questo metodo prevede due fasi antecedenti l'analisi:

1. Preparazione del radicale DPPH'. In una beuta di volume appropriato si prepara una soluzione 0,06 mM di DPPH' in metanolo ottenendo una soluzione di colore viola. Essendo il radicale sensibile alla luce, è necessario avvolgere la beuta con uno strato di stagnola e poi metterla in congelatore così da prolungare la conservabilità della soluzione di DPPH'.
2. Preparazione dello standard di riferimento Trolox in metanolo. Questo standard serve per ottenere la retta di taratura che relaziona la percentuale di inibizione del Trolox nei confronti del radicale DPPH'. Per ottenere misurazioni precise si prepara una soluzione madre 20 mM di Trolox, da essa si effettua una serie di diluizioni in modo decrescente partendo sempre dall'ultima diluizione per ottenere concentrazioni finali 0,8 mM, 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM e 0,05 mM.

Si procede quindi con l'analisi degli estratti metanolici dei campioni. Si prelevano 1450 μL di radicale DPPH', si immettono in cuvette di quarzo di 1 cm di cammino ottico e si effettua la lettura a 515 nm, ottenendo così il valore dell'assorbanza al tempo zero. Poi si aggiungono 50 μL delle differenti concentrazioni di standard prima, e di campione opportunamente diluito poi, e si misura l'assorbanza dopo 15 minuti. Si ottengono dei valori di assorbanza che vengono utilizzati per calcolare la percentuale di inibizione secondo la formula seguente:

$$\text{(a) \% inibizione DPPH'} = [(A_{t=0 \text{ min}} - A_{t=15 \text{ min}}) / A_{t=0 \text{ min}}] * 100$$

$A_{t=0 \text{ min}}$ è il valore di assorbanza misurata prima dell'aggiunta dello standard o del campione.

$A_{t=15 \text{ min}}$ è il valore di assorbanza misurata dopo 15 minuti dall'aggiunta dello standard o campione.

Calcolata la percentuale di inibizione, si risale alla capacità antiossidante dei campioni nei confronti del radicale DPPH', espressa in mM di Trolox equivalenti. Successivamente, mediante opportuni calcoli, si valuta la reale capacità antiossidante totale relativa a ciascun campione che viene indicata come mMoli su grammo di campione utilizzato.

3.1.12 CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI

L'HPLC, High Performance Liquid Chromatography, è una tecnica di separazione cromatografica basata su una fase mobile liquida che, grazie ad un sistema di pompe, viene fatta fluire ad alte pressioni attraverso una fase stazionaria solida impaccata in una colonna. Per garantire la separazione, fase mobile e fase stazionaria devono avere caratteristiche chimiche opposte; quando la fase mobile è apolare e la fase stazionaria è polare l'analisi è detta in fase tradizionale, mentre quando la fase mobile è apolare e la fase stazionaria è apolare l'analisi è detta in fase inversa. Quando la composizione della fase mobile è mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi si ha un'eluizione isocratica, mentre se la composizione varia nel tempo si ha un'eluizione a gradiente. La miscela di analiti iniettata nel sistema viene trasportata dalla fase mobile e le molecole che la compongono usciranno dalla colonna a tempi diversi, a seconda della loro

maggiore affinità alla fase mobile o alla fase stazionaria: più una molecola è affine alla fase mobile, minore sarà il tempo di ritenzione in colonna. All'uscita della colonna si trova un rivelatore (spesso uno spettrofotometro UV a lunghezza d'onda fissa o diode array) che rileva il passaggio delle molecole ed invia i dati ad un software. Questo elabora i dati e crea un grafico (cromatogramma), con il tempo in ascissa, in cui per ogni molecola rilevata compare un picco in corrispondenza del tempo di uscita dalla colonna. Maggiore è la concentrazione di una molecola nel campione, più alto sarà il suo picco.

L'analisi dei principali flavonoidi è stata eseguita utilizzando un apparecchio HPLC Shimadzu serie VP dotato di forno termostato, autocampionatore refrigerato, pompa quaternaria e detector UV a lunghezza d'onda fissa. Per la separazione è stata utilizzata una colonna cromatografica Kinetex C18 150 x 4,6 mm (Phenomenex), con un diametro delle particelle interne di 5µm.

Prima dell'iniezione in HPLC i campioni sono stati filtrati con filtri Minisart RC 20 con diametro dei pori di 0.20 µm.

Le condizioni cromatografiche sono state sviluppate partendo da indicazioni di letteratura.

I dati cromatografici sono stati elaborati con il software Shimadzu Class-VP versione 7.2.1 SP1.

L'analisi qualitativa è stata condotta per confronto dei tempi di ritenzione con quelli degli standard analitici corrispondenti di mirycetina e quercetina, mentre l'analisi quantitativa è stata condotta confrontando le aree dei picchi di interesse con le rette di taratura degli stessi standard.

CONDIZIONI ANALITICHE

- Fase mobile:
 - B: Acetonitrile + 0.1% Acido formico
 - D: Acqua MilliQ + 0.1% Acido formico
- Gradiente
 - 0': B 5%; D 95%
 - 0' - 27': B 30%; D 70%
 - 27' - 28': B 95%; D 5%
 - 28' - 33': B 95%; D 5%
 - 33' - 34': B 5%; D 95%

- Tempo di ricondizionamento 6'
- Durata corsa 40'
- Flusso 0,700 mL/min
- Temperatura 30°C
- λ detector 352 nm
- Iniezione 10 μ L

3.1.13 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELL'OLIO ESSENZIALE

✓ Isolamento di olio essenziale

L'olio essenziale è stato ottenuto da foglie secche mediante corrente di vapore di acqua (pressione 3.5 bar) per 3 ore in un distillatore in acciaio inox. L'olio era conservato in flaconi ambrati sigillati a 4 °C per ulteriori analisi.

✓ Analisi GC e GC/MS dell'olio essenziale

L'olio essenziale è stato analizzato e le relative aree di picco per singoli composti sono state calcolate in media. Per l'analisi, un gas-cromatografo ThermoQuest GC-Trace dotato di un rilevatore FID e di una colonna Varian FactorFour VF-5ms polifenilico-95% -dimetilsilossano (id, 0,25 mm, lunghezza 30 m, spessore film, 0,15 μ m) erano abituati. Le condizioni di funzionamento erano le seguenti: temperatura dell'iniettore 300°C, temperatura FID 300°C, portata portante (Helium) 1 mL/min, rapporto split 1:50.

La temperatura iniziale del forno è stata di 55°C e poi è salita a 100°C ad una velocità di 1°C/min, poi è salita a 250°C ad una velocità di 5°C/min e quindi mantenuta costante a 250°C per 15 minuti. Un microlitro per ogni replica viene sciolto in CH₂Cl₂ e iniettato. La composizione percentuale dell'olio è stata calcolata dal metodo di normalizzazione dalle aree di picco del GC, senza utilizzare fattori di correzione. La caratterizzazione chimica dei composti oleari essenziali è stata eseguita da un gas-cromatografo Varian GC-3800 equipaggiato con uno spettrometro di massa Varian MS-4000 utilizzando impatto elettronico e agganciato alla libreria NIST. Le condizioni erano identiche a quelle descritte per l'analisi GC e anche la stessa colonna è stata utilizzata. Le condizioni di spettroscopia di massa erano le seguenti: tensione di ionizzazione, 70 eV; corrente di emissione, 10 μ Amp; velocità di scansione, 1 scansione/s; gamma di massa, 29-400 Da; temperatura di trappola, 150°C; e temperatura della linea di trasferimento, 300°C. I composti olio essenziali sono stati caratterizzati confrontando il loro tempo di

ritenzione relativo, KI e il pattern di frammentazione MS con quelli di altri oli essenziali noti e con composti puri e corrispondendo i pattern di frammentazione MS e indici di ritenzione con le suddette librerie di spettro di massa e con quelli della letteratura ^[55]. L'indice Kovats dei componenti è stato determinato con l'aggiunta di n-alcani C8-C32 (Sigma-Aldrich) all'olio essenziale prima dell'iniezione nell'apparecchiatura GC-MS e analizzata nelle stesse condizioni sopra riportate ^[56].

3.1.14 ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DELL'OLIO ESSENZIALE

Materiali usati

In questa prova sono stati utilizzati rispettivamente due ceppi batterici Gram positivi, due Gram negativi e un lievito *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) and *Candida albicans* (ATCC 10231).

Metodo delle microdiluzioni per i batteri

Inizialmente, uno screening è stato eseguito usando una sola concentrazione (2000 µg/mL) su micropiastra a 96 pozzetti. Per ogni campione è stata preparata una soluzione di lavoro di 200 mg/mL in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), di cui sono stati trasferiti 2 µL per micropozzetti. Successivamente sono stati aggiunti 198 µL di inoculo batterico a concentrazione di 5×10^5 CFU/mL in Muller Hinton Broth (MHB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le micropiastre sono state incubate per una notte a 37°C in agitazione (110 rpm). Il controllo positivo è stato rappresentato da cloramfenicolo (Sigma, St. Louis, MO, USA) e itraconazolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e il controllo negativo era DMSO (2 µL/pozzetto). Per verificare eventuali contaminazioni, alcuni pozzi con l'unica MHB erano stati impostati. Dopo l'incubazione la crescita batterica è stata stabilita mediante osservazione diretta della torbidità del mezzo.

Terminata la fase di screening, gli studi di sostanze attive sono stati approfonditi attraverso il metodo delle microdiluzioni. In accordo con "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) i campioni attivi sono stati serialmente duplicati e diluiti in un range di 2000 -15.6 µg/mL in MHB. Il volume delle diluizioni è stato di 100 µL/pozzetto e sono stati aggiunti altri 100 µL di un inoculo (10^6 CFU/mL). Le

micropiastre sono state incubate per una notte a 37°C in agitazione (110 rpm). Il controllo positivo è stato rappresentato da cloramfenicolo o itraconazolo per *P. aeruginosa* (range di concentrazioni 20-0,16 µg/mL e 100-0,28 µg/mL rispettivamente) e controllo negativo era DMSO (diluizioni a partire da 2 µL/pozzetto). Dopo l'incubazione è stata determinata la concentrazione minima inibitoria (MIC) come concentrazione minima di sostanza che impedisce la crescita visibile dei batteri.

I test sono eseguiti in duplicato in tre esperimenti indipendenti.

Metodo delle microdiluzioni per *Candida albicans*

Inizialmente, tutti i campioni vengono sottoposti a screening a una concentrazione (2000 µg/mL), mettendo 2 µL per pozzetto di una soluzione madre (200 mg/mL in DMSO). Per ogni pozzetto sono stati aggiunti 198 µL di inoculo *C. albicans* a concentrazione di $2,5 \times 10^3$ CFU/mL in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), con 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS 0,165 mol/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e regolati a pH 7,0. Le micropiastre sono state incubate per 48 ore a 35°C. Il controllo positivo era il fluconazolo (Fluka, Sigma-Aldrich, USA), il controllo negativo era DMSO e si preparava un vuoto con l'unico mezzo di coltura. Dopo l'incubazione, la crescita cellulare è stata determinata per osservazione visiva della torbidità dei pozzi.

Campioni attivi sono stati analizzati con il metodo delle microdiluzioni. In accordo con "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) i campioni sono stati seriamente duplici diluiti in un range di 2000 -15.6 µg/mL in RPMI-1640. Il volume delle diluizioni è stato di 100 µL/pozzetto e sono stati aggiunti altri 100 µL di un inoculo (5×10^3 CFU/mL). Le microplates sono state incubate per 48 ore a 35°C. Il controllo positivo è stato rappresentato dal fluconazolo (range 20-0,16 µg/mL) e il controllo negativo era DMSO (diluizioni a partire da 2 µL/pozzetto). Dopo l'incubazione è stata determinata Concentrazione Minima Inibitoria (MIC) come concentrazione minima di sostanza che impedisce la crescita cellulare visibile.

I test sono eseguiti in duplicato in tre esperimenti indipendenti.

Attività antimicrobica con il metodo delle microdiluzioni

Inizialmente è stato eseguito uno screening con una sola concentrazione (2.000 µg/mL su micropiastra a 96 pozzetti) per ciascuna sostanza è stata preparata una soluzione di lavoro di 200 mg/mL in dimetilsolfossido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), di cui sono stati trasferiti 2 µL per micropozzetto, poi sono stati aggiunti 198 µL di inoculo batterico a concentrazione di 5×10^5 CFU/mL in brodo Muller Hinton (MHB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per i ceppi batterici e $2,5 \times 10^3$ CFU/mL in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), con 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS 0,165 mol/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a pH 7,0 per il ceppo *Candida*. Le micropiastre sono state incubate per una notte a 37°C (48 ore a 35°C per *Candida*) in agitazione (110 rpm), il controllo positivo è rappresentato da cloramfenicolo (Sigma, St. Louis, MO, USA) e itraconazolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per i batteri e fluconazolo (Fluka, Sigma-Aldrich, USA) per *Candida* e il controllo negativo era DMSO (2 µL/pozzetto) Per verificare eventuali contaminazioni sono stati istituiti alcuni pozzetti con l'unico MHB (o RPMI-1640 per *Candida*). Dopo l'incubazione la crescita batterica è stata stabilita mediante osservazione diretta della torbidità del mezzo.

Terminata la fase di screening, gli studi sulle sostanze attive sono stati approfonditi attraverso il metodo di microdiluzioni. In accordo con "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) i campioni attivi sono stati seriamente duplicati e diluiti in una gamma di 2000-15,6 µg/mL in MHB (RPMI-1640 per *Candida*). Il volume delle diluizioni è stato di 100 µL/pozzetto e sono stati aggiunti altri 100 µL di un inoculo (106 CFU/mL per i batteri e 5×10^3 CFU/mL per *Candida*). Le microplates sono state incubate per una notte a 37°C (48 ore a 35°C per *Candida*) in agitazione (110 rpm). Il controllo positivo è stato rappresentato da Cloramfenicolo per batteri o itraconazolo per *P. aeruginosa* (range di concentrazioni 20 - 0,16 µg/mL e 100 - 0,28 µg/mL rispettivamente) e fluconazolo (range 20 - 0,16 µg/mL) per *Candida*. Il controllo negativo era DMSO (diluizioni a partire da 2 µL/pozzetto). Dopo l'incubazione è stata determinata Concentrazione Minima Inibitoria (MIC) come concentrazione minima di sostanza che impedisce la crescita cellulare visibile.

I test sono eseguiti in duplicato in tre esperimenti indipendenti.

3.1.15 ATTIVITÀ ANTIFUNGINA

Preparazione dei campioni di Lanche canela

2,5 g di foglie di Lanche canela sono stati tritati e lasciati macerare in 100 mL di etanolo al 10%. Per la prova si preleva il surnatante. 3 g di foglie tritate e introdotte in 200 mL di acqua deionizzata bollente e lasciate 5 minuti per ottenere l'infuso. L'olio essenziale è stato ottenuto in corrente di vapore d'acqua.

Funghi utilizzati nel test

Rhizoctonia solani, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Monilia laxa* (ciliegia), *Trichoderma asperellum* TVI, *Pythium splendens*, *Fusarium solani* (patata), *Stemphylium vesicarium*.

Preparazione del terreno di coltura

Le piastre di crescita dei funghi vengono preparate con 10 mL ciascuna di terreno PDA (Potato Destrose Agar) al 4% in acqua. I terreni trattati contengono invece 9 mL di terreno PDA e 1 mL di estratto alcolico al 10% di Lanche canela o di una soluzione di etanolo al 10% come controllo, mentre il terreno per l'infuso si prepara al 8% e per la prova si mescolano 5 mL di terreno e 5 mL di infuso o di 5 mL di acqua distillata come controllo. Per il test con l'olio essenziale, le piastre vengono preparate con 10 mL di terreno cui vengono aggiunti 10 microlitri di campione.

L'inoculazione del fitopatogeno è stata effettuata in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare orizzontale. Ciascuna prova è stata ripetuta in triplo e la crescita del fungo è stata misurata ogni 24 ore.

3.1.16 EFFETTO TOSSICOLOGICO DELL'ESTRATTO IDROALCOLICO DI *Myrcianthes discolor* (HBK) "Lanche canela"

Sono stati utilizzati i topi Balb/C albino, acquisiti nel Bioterium dell'Istituto Nazionale di Salute di Lima. Per lo studio tossicologico, 24 topi albini di 18-26 g, 12 per ciascun sesso. Le foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) "Lanche canela" sono state raccolte nel distretto di Santo Domingo (1475 m.sn.m.), reparto di Piura.

Tossicità acuta

È stato utilizzato il metodo della dose limite, sono stati impiegati 12 topi albini di entrambi i sessi con peso di circa 20 g e il mangime è stato ritirato 4 ore prima della prova. Sono stati suddivisi in 4 gruppi di 3 animali ciascuno, che sono stati conservati in un ambiente a temperatura controllata di 20°C, con un ciclo di 12 ore di luce e 12 ore di buio. L'alimentazione consisteva di ratonine (rat food) e acqua a volontà. L'estratto di Lanche canela è stato preparato in dosi di 2000 mg/Kg, 200 mg/Kg e 50 mg/Kg in 0.1% di carbossimetilcellulosa (0.1% di CMC), usando lo/ 0.1% di CMC come controllo. Le dosi sono state somministrate per via orale da un tubo intragastrico. Gli animali sono stati osservati costantemente durante le prime 24 ore e giornalmente durante un periodo di quattordici giorni, registrando eventuali sintomi tossici. Alla fine del periodo di trattamento ciascun animale sperimentale è stato sacrificato e sottoposto a necropsia. Sono stati eseguiti gli esami macroscopici dei seguenti organi: cuore, rene, fegato e polmoni. Il peso corporeo è stato monitorato all'inizio e alla fine della prova.

Analisi dei dati

Il confronto statistico tra controllo e gruppi trattati è stato effettuato utilizzando l'analisi del metodo della varianza (ANOVA) con il livello di confidenza del 95% ($P < 0,05$).

3.1.17 EFFETTO FARMACOLOGICO DELL'ESTRATTO IDROALCOLICO DI *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela”

Sono stati utilizzati 30 ratti maschi Wistar tra 200-280 g e 30 ratti femminili Wistar con peso compreso tra 200-240 g.

Prove farmacologiche

Sono stati utilizzati ratti adulti di entrambi i sessi, gli animali sono stati alimentati con ratonina e acqua, in un ambiente a 25 °C con un ciclo di luce scura di 12 ore, in modo da acclimatarsi in condizioni di laboratorio. Per fornire un'esperienza sessuale ai ratti maschi, sono stati posti in una scatola per 30 minuti con un femmina di estrusione a fase (utilizzato come stimolo di accoppiamento), diversi giorni prima della prova di copulazione. Gli animali sono stati sperimentati tre volte in un periodo di 10 giorni per superare la mancanza di risposta sessuale alla presenza di osservatori. Sono stati

selezionati animali sessualmente attivi. I ratti femminili sono stati mantenuti in fase estrusiva, somministrati 12 µg di estradiolo benzoato in olio d'oliva, sottocutanea, 56 ore prima di accoppiamento e progesterone 0,5 mg in olio d'oliva sottocutanea, 8 ore prima dell'accoppiamento. Ratti maschi sono stati selezionati e divisi in tre gruppi di otto animali ciascuno.

Sono stati presi in considerazione i seguenti criteri: i maschi sono stati tenuti in scatole individuali, mentre le femmine sono state tenute in gruppo. Il comportamento sessuale di ogni maschio è stato osservato per 15 minuti prima di mettere la femmina nella scatola. Lo studio è stato condotto in un ambiente tranquillo. La pulizia dell'area copula è stata eseguita dopo ogni prova, perché i resti rimasti da un ratto possono alterare il comportamento sessuale del ratto successivo.

Dosaggi

Gruppo I: Controllo, viene somministrato il veicolo (carbossimetilcellulosa 2%)

Gruppo II: Trattato con estratto idroalcolico ad una dose di 250 mg/ Kg.

Gruppo III: Trattato con estratto idroalcolico ad una dose di 500 mg/ Kg.

Parametri

- Latenza dei tempi di accoppiamento: Tempo tra l'introduzione del ratto femmina alla gabbia dove si trova il ratto maschio e la prima monta del maschio.
- Latenza di penetrazione: Tempo della prima penetrazione dopo la prima monta.
- Latenza dell'eiaculazione: Tempo tra la prima penetrazione e la prima eiaculazione.
- Frequenza delle monte.
- Frequenza delle penetrazioni.
- Frequenza delle eiaculazioni.

Analisi dei dati

Il confronto statistico tra controllo e gruppi trattati è stato effettuato utilizzando l'analisi del metodo di varianza (ANOVA) con il livello di confidenza del 95% ($P < 0,05$).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

I campioni di foglie di *Myrcianthes discolor* HBK (Lanche canela), sono stati raccolti nel distretto di Paimas ad un'altezza di 574 metri sul livello del mare.

La temperatura media a Paimas è 23,9°C. La precipitazione media è di 421 mm. Le temperature medie variano durante tutto l'anno di circa 3°C. Il mese di febbraio è il mese più caldo dell'anno. Marzo è il mese più piovoso dell'anno.

La composizione chimica delle foglie di Lanche canela è influenzata dall'altitudine dalle condizioni pedoclimatiche e anche dal tipo di nutrienti presenti nel suolo.

4.2 CARATTERIZZAZIONI BROMATOLOGICA

Per la caratterizzazione *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela” sono state inizialmente studiate umidità, sostanza secca, proteine totali, composizione lipidica e contenuto in minerali come riportato nella tabella 1.

Campione	Umidità (g/100g di foglie)	Sostanza secca (g/100g di foglie essiccate)	Proteine (g/100g s.s.)	Frazione minerale totale (g/100g s.s.)
LC 2016	94,8 ± 0,4	5,2 ± 0,4	7,0 ± 0,0	10,5 ± 0,2
LC 2017	91,0 ± 0,7	9,0 ± 0,7	6,5 ± 0,4	8,8 ± 0,7

Tabella 1. Contenuti medi di umidità, sostanza secca, proteine totali e frazione minerale totale. (s.s.=sostanza secca). LC: Lanche canela (*Myrcianthes discolor* (HBK))

Il contenuto di sostanza secca delle foglie varia sensibilmente tra i campioni raccolti nel 2016 (LC 2016=5,2%) e quelli del 2017 (LC 2017=9,0%) nonostante siano stati prelevati nel medesimo periodo dell'anno. Il contenuto di proteine totali tuttavia rimane compreso tra il 7% e il 6,5% che per i vegetali rappresentano un buon valore alimentare.

La frazione minerale totale media varia tra il 10,5% e l'8,8% e rappresenta un apporto importante dal punto di vista nutrizionale. In particolare, vale la pena segnalare il buon contenuto di macroelementi (Tabella 2) e oligoelementi (Tabella 3).

Campione	Ca	Mg	Na	K
	mg/g s.s.	mg/g s.s.	mg/g s.s.	mg/g s.s.
LC 2016	21,5 ± 3,5	3,6 ± 0,2	0,05 ± 0,0	8,0 ± 0,1
LC 2017	15,2 ± 0,8	2,9 ± 0,1	0,1 ± 0,0	10,7 ± 0,6

Tabella 2. Contenuto medio di macroelementi in campioni di foglie secche di Lanche canela (media±ds, sostanza secca=s.s.).

Il contemporaneo apporto di calcio, potassio e magnesio, può svolgere un ruolo importante nelle funzioni fisiologiche infatti il corpo umano contiene circa 1 kg di calcio come deposito di oltre il 99% nell'osso sotto forma di fosfato di calcio ^[57]. Attraverso l'interazione con numerose proteine distribuite in diversi compartimenti cellulari, il calcio è coinvolto in una grande quantità di aspetti funzionali, come la contrazione muscolare, l'attivazione degli enzimi, la differenziazione cellulare, la risposta immunitaria, la morte cellulare programmata e l'attività neuronale ^[58]. Anche il magnesio, un minerale essenziale per l'organismo umano, influenza molte funzioni cellulari, tra cui la trasduzione del segnale, il metabolismo energetico e la proliferazione cellulare. Agisce come coenzima in reazioni ATP-dipendenti e nella produzione e nel trasporto di energia e proteine, regola diverse reazioni biochimiche, compresa la sintesi proteica, la funzione muscolare e nervosa, il controllo del glucosio nel sangue e la regolazione della pressione sanguigna ^[59].

Come riportato nella tabella 2 il contenuto di potassio è superiore al sodio, Questo è vantaggioso nella regolazione della pressione sanguigna. Gli studi epidemiologici, sperimentali e clinici hanno dimostrato che il potassio, purché non in eccesso, è un regolatore positivo della pressione mentre il sodio stato direttamente correlato al danno cardiovascolare, ipertensione, ictus e morte ^[60].

Campione	Mn	Fe	Cu	Zn
	mg/g s.s.	mg/g s.s.	mg/g s.s.	mg/g s.s.
LC 2016	31,5 ± 1,1	193,3 ± 16,1	4,0 ± 0,5	10,1 ± 0,2
LC 2017	20,5 ± 1,4	131,8 ± 22,4	3,6 ± 0,4	13,2 ± 4,5

Tabella 3. Contenuto medio di oligoelementi in campioni di foglie secche di Lanche canela (media±ds, sostanza secca=s.s.).

Nella tabella 3 sono riportati i risultati relativi ad alcuni oligoelementi presenti nelle foglie. Tra questi in particolare va evidenziata la ricchezza di ferro in quanto costituente fondamentale dell'emoglobina e della mioglobina. Inoltre, è deputato al trasporto di ossigeno e biossido di carbonio, ed è essenziale per gli enzimi che hanno un ruolo chiave nella produzione di energia, nella sintesi di DNA, di collagene, nella produzione di anticorpi e nella conversione del β -carotene in vitamina A ^[61].

Come metalli di transizione, essi partecipano a molte reazioni di ossidazione/riduzione nel metabolismo umano. L'assorbimento del ferro viene migliorato dalla presenza dall'acido ascorbico (vitamina C) ^[62]. La carenza di ferro compromette le prestazioni riproduttive, lo sviluppo cognitivo e la capacità lavorativa ^[63]. Il manganese è un elemento essenziale necessario per la normale crescita, sviluppo e omeostasi cellulare, è importante nella formazione dell'osso, nel metabolismo dei grassi e nei carboidrati ^[64]. Esso è legato a molti enzimi coinvolti nel controllo della glicemia, nel metabolismo energetico e nella funzione degli ormoni tiroidei e nell'assorbimento del calcio. è necessario per il funzionamento di enzimi, come arginasi, superossidodismutasi (SOD), glutammina sintetasi, piruvato decarbossilasi e serina/treonina fosfatasi ^[61, 64].

Lo zinco è un elemento di grande importanza funzionale. Molti processi biochimici non possono verificarsi senza la presenza dello zinco. Lo zinco svolge un ruolo importante per il normale funzionamento del sistema immunitario e funge da segnale ionico in un elevato numero di cellule. Altre funzioni come lo stimolo sensoriale, le abilità cognitive, gli enzimi e i fattori di trascrizione della proteina dipendono dallo zinco per il loro corretto funzionamento. Aiuta nel trattamento di un gran numero di malattie, comprese le infezioni batteriche e virali ^[65].

Lo zinco interviene in oltre 200 complessi enzimatici ed è necessario per il corretto funzionamento di molti ormoni, inclusa l'insulina, l'ormone della crescita e gli ormoni sessuali. Lo zinco presente nei vegetali è poco biodisponibile in quanto può essere complessato dall'acido fitico che lo rende indisponibile per l'assorbimento ^[61].

Gli effetti clinici avversi più gravi della carenza di zinco sono il ritardo nella crescita, la diminuzione dell'immunità cellulare-mediata, la diminuzione delle funzioni cognitive, lo stress ossidativo aumentato e l'allungamento delle citochine infiammatorie ^[66].

Il rame è un elemento in tracce essenziale sia negli esseri umani che negli animali, il corpo umano contiene circa 100 mg di rame. Come metallo di transizione è un cofattore di molti enzimi redox. La Ceruloplasmina è la principale proteina di trasporto del rame nel sangue e, in più, ha un ruolo nel metabolismo del ferro, risulta simile a un'altra proteina scoperta più recentemente, l'efestina, coinvolta anch'essa nel metabolismo del ferro e del rame. Oltre al suo ruolo nel metabolismo del ferro, la necessità di rame deriva anche dal suo coinvolgimento in molti processi biologici, tra cui la difesa antiossidante e la funzione immunitaria ^[67]. Il rame si trova diffusamente in tutti gli alimenti, principalmente nei legumi. Una carenza di questo elemento può provocare anemia da carenza di ferro poiché interviene nell'assorbimento del ferro per il trasporto nel sangue e il relativo utilizzo ^[61].

Campione	Fibra Solubile (g/100 g s.s.)	Fibra Insolubile (g/100 g s.s.)	Fibra Totale (g/100 g s.s.)
LC 2016	5,3 ± 1,8	72,2 ± 0,8	77,5 ± 1,3
LC 2017	5,0 ± 1,0	72,5 ± 0,3	77,5 ± 1,2

Tabella 4. Contenuti medi di fibra solubile e insolubile

Dai risultati riportati in tabella 4 emerge un interessante apporto di fibra solubile (5%) e insolubile (72%) per 100 grammi di foglie di Lanche canela, con valori che si sono mantenuti costanti nei campioni raccolti nei diversi anni.

La fibra alimentare è stata da tempo riconosciuta importante per le qualità prebiotiche di quella solubile e come fibre dietetiche, in particolare è stata indicata per abbassare i livelli di colesterolo LDL circolante ^[68].

Diversi studi epidemiologici indicano che i cambiamenti nello stile di vita, come l'assunzione di vegetali integrali, frutta e verdura, siano associati ad una diminuzione dell'incidenza di malattie cardiovascolari o di fattori di rischio come ad esempio, obesità, resistenza all'insulina, tolleranza al glucosio, livelli elevati di trigliceridi e colesterolo nel sangue. Inoltre, gli studi epidemiologici suggeriscono anche che l'assunzione di probiotici, che comprendono alcune specie di batteri commensali, migliora il profilo lipidico e l'apparato cardiovascolare [69].

La percentuale di lipidi totali è stata determinata mediante metodo Soxhlet, con estrattore automatico ed è risultata pari al 1,4%.

Campione	Frazione lipidica (g/100g s.s.)
LC 2016	1,4 ± 0,1

Tabella 5. Contenuto di lipidi totali

4.3 DETERMINAZIONE DEL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI

Gli estratti lipidici ottenuti dalle foglie di Lanche canela mediante estrazione con Soxhlet sono stati sottoposti al processo di transesterificazione degli acidi grassi per poterli analizzare mediante gascromatografia (GC-MS). In Figura 1 è riportato un esempio del tracciato ottenuto mentre le percentuali relative dei diversi acidi grassi identificati in massa sono riportate nella tabella 6. Gli acidi grassi insaturi rappresentano più del 50% della composizione della frazione lipidica estratta dalle foglie. Tra questi il più abbondante è l'acido linolenico (omega 3) con 37%. Quest'ultimo assieme all'acido linoleico (omega 6) è un acido grasso polinsaturo che fa parte degli acidi grassi essenziali, ovvero quegli acidi grassi che l'organismo umano non è in grado di sintetizzare e che devono essere introdotti con la dieta. L'acido a linolenico (ALA) è il precursore dell'acido eicosapentaenoico (EPA) e dell'acido docosoesaenoico (DHA) [70].

L'acido linoleico come acido grasso essenziale svolge diverse funzioni tra le quali: costituente delle membrane biologiche in quanto costituente dei fosfolipidi, precursore di mediatori chimici quali gli eicosanoidi e interviene nella regolazione dei lipidi ematici soprattutto il colesterolo e anche viene utilizzato nella biosintesi di

prostaglandine ^[71]. Nelle foglie di Lanche canela, l'acido linoleico è presente con il 26%. L'acido oleico (omega 9) con l'8,5% è stato associato ad un rischio ridotto di malattie neurodegenerative ^[72] ed è un costituente principale della maggior parte degli oli di origine vegetale. Tra gli acidi grassi saturi identificati quello presente a maggiori concentrazioni è l'acido palmitico presente con circa il 31%. Il palmitico è il primo acido grasso prodotto dall'uomo durante la lipogenesi partendo dal quale vengono sintetizzati acidi grassi a catena più lunga. Segue l'acido stearico con il 2%.

Campione	Palmitico (%)	Stearico (%)	Oleico (%)	Linoleico (%)	Linolenico (%)
LC 2016	31,9 ± 5,4	2,0 ± 0,9	8,5 ± 3,1	26,0 ± 2,2	37,1 ± 0,7

Tabella 6. Profilo degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da Lanche canela

Chromatogram Plot

File: c:\arianw\data\prova\2016\lanche\carla 1.ms
Sample: Lanche canela 1
Scan Range: 1 - 7694 Time Range: 0.00 - 119.98 min

Operator: MER
Date: 4/6/2016 11:57 AM

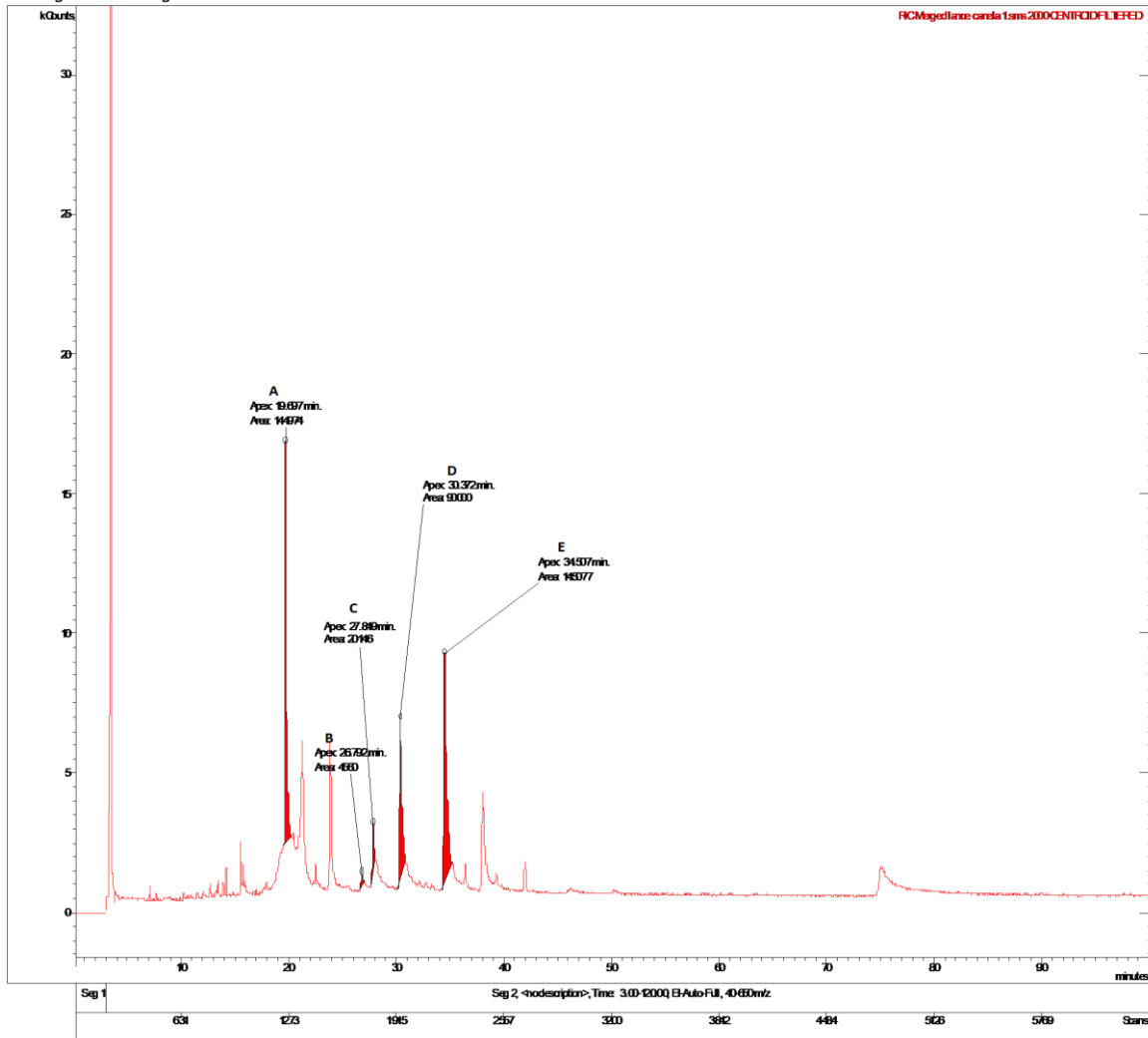


Figura 1. Profilo gascromatografico di olio di Lanche canela estratto mediante Soxhlet. Picco A: Palmitico, B: Stearico, C: Oleico, D: Linoleico, E: Linolenico

4.4 COMPONENTE FENOLICA E CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE

Essendo metaboliti secondari, i polifenoli svolgono nelle piante diverse funzioni. Per esempio sono responsabili della pigmentazione dei fiori, frutti e semi, attirando in questo modo gli impollinatori e i dispersori di semi; promuovono la fertilità della pianta e la germinazione del polline; agiscono come molecola-segnale nell'interazione tra pianta e microrganismo; proteggono contro la luce ultravioletto e altre funzioni difensive, tra cui la difesa contro i microrganismi patogeni (i polifenoli interagiscono con le proteine di membrana, gli enzimi e i lipidi dei microrganismi, attraverso diversi modi, alterando la permeabilità delle loro cellule e determinando la perdita di protoni,

ioni e macromolecole) e i predatori delle piante (i polifenoli disturbano la digestione, il metabolismo degli animali e l'assorbimento degli amminoacidi, amido e lipidi attraverso diversi meccanismi) [73].

Prima della valutazione della componente fenolica, le foglie essiccate e macinate sono state sottoposte ad una estrazione esaustiva con metanolo-acqua 80-20% più 0.1% di acido formico. Le concentrazioni in polifenoli totali presenti negli estratti ottenuti dai campioni di Lanche canela sono state determinate utilizzando il metodo Folin-Ciocalteu e i risultati sono riportati nella tabella 7.

Campioni	mg±ds di catechina Eq/g di foglie essiccate (s.s.)	mM±ds Trolox Eq/g di foglie essiccate (s.s.)
LC 2016	88,0 ± 3,4	729,3 ± 94,1
LC 2017	163,6 ± 29,0	622,4 ± 194,3
LC Infuso	73,8 ± 9,9	282,7 ± 10,2

Tabella 7. Contenuti totali medi in polifenoli (calcolati come catechina) e capacità antiossidante totale (calcolata come Trolox nei confronti del radicale DPPH) determinati negli estratti di foglie di Lanche canela.

I risultati ottenuti mostrano concentrazioni medie di polifenoli totali nei campioni raccolti nel 2016 e nel 2017 rispettivamente di 88,0 e 163,6 mg di catechina equivalente per grammo di foglie essiccate. Tali differenze sembra siano state influenzate da alcuni fenomeni climatici che si sono diversificati nei due anni di ricerca.

Il contenuto medio di polifenoli totali presenti nell'infuso di foglie secche è invece risultato pari a 73,8 mg di catechina equivalenti per grammo di foglie secche. Gli infusi sono stati ottenuti a partire di 3 grammi circa esattamente pesati di foglie essiccate e posti in 200 mL di acqua bollente e lasciati a macerare per 5 minuti.

Nei medesimi estratti è stata determinata la capacità antiossidante totale mediante il saggio DPPH (Tabella 7).

Il radicale DPPH* è uno dei radicali più stabili dell'azoto in commercio e presenta un massimo di assorbanza nell'UV-Vis. Questa metodica consente di valutare l'attività riducente di molecole antiossidanti nei confronti del DPPH*: durante la riduzione da parte degli antiossidanti la soluzione si decolora, il radicale si trasforma nell'idrazina corrispondente come mostrato nella Figura 2.

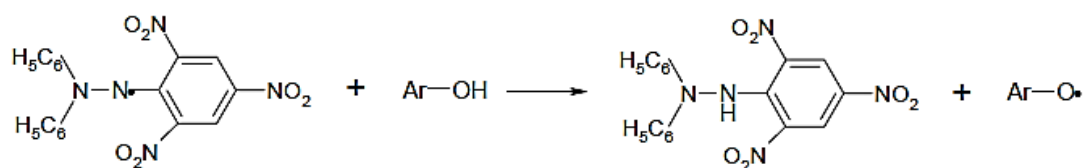


Figura 2. Reazione del DPPH* con un fenolo generico

Il decremento dell'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di antiossidanti presenti negli estratti ottenuti. Il punto finale della reazione si raggiunge quando l'assorbanza rimane costante. I campioni analizzati hanno dimostrato una interessante capacità di neutralizzare il radicale DPPH*; come riportato in tabella 7 i valori medi riscontrati sono pari a 729,3, 622,4 e 282,7 millimoli di Trolox equivalenti rispettivamente per LC 2016, LC 2017 e l'infuso.

4.5 IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI FLAVONOIDI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI

Gli estratti utilizzati per le valutazioni dei polifenoli e capacità antiossidante sono stati anche analizzati in HPLC. Il metodo cromatografico HPLC messo a punto ha permesso di separare ed identificare alcune sostanze caratteristiche delle foglie di Lanche canela e nell'infuso.

Come si può vedere nelle Figure 3 e 4 i cromatogrammi relativi presentano diversi picchi che purtroppo non risultavano ben separati e che in questa fase non ne hanno permesso una identificazione certa. È stato quindi necessario sottoporre i campioni ad una idrolisi acida utile per l'identificazione.

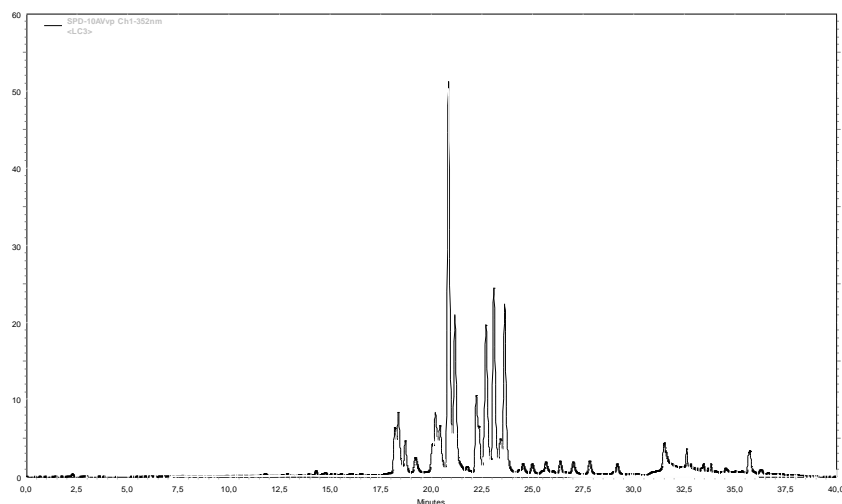


Figura 3. Cromatogramma dell'estratto di foglie secche di *Myrcianthes discolor* (HBK)

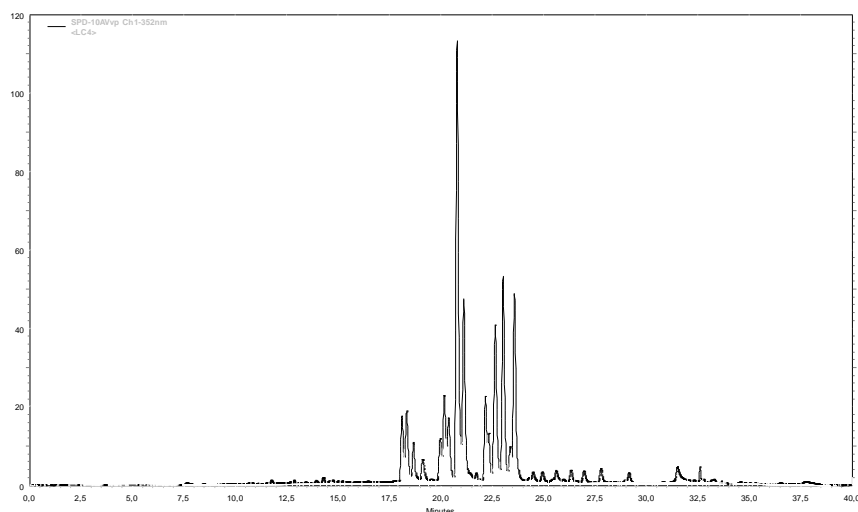


Figura 4. Cromatogramma dell'infuso di foglie secche di *Myrcianthes discolor* (HBK)

Flavonoli e flavoni possono legare degli zuccheri, preferibilmente in posizione C3 e, meno frequentemente, C7 dell'anello A, in modo che questi composti siano comunemente riconducibili ad O-glicosidi e il D-glucosio è il più presente. Sono possibili anche legami con D-galattosio, L-ramnosio, L-arabinosio, D-xilosi, nonché acido D-glucuronico. La parte senza zucchero della molecola flavonoidica è conosciuta come aglicone. I composti glicosidici sono più solubili in acqua e meno reattivi nei confronti dei radicali liberi rispetto al rispettivo aglicone [74].

Dopo l'idrolisi degli estratti dei campioni è stata messa a punto ed eseguita l'analisi HPLC ottenendo una migliore separazione e che ha permesso l'identificazione e la quantificazione di alcuni dei costituenti principali (Figura 5 e 6).

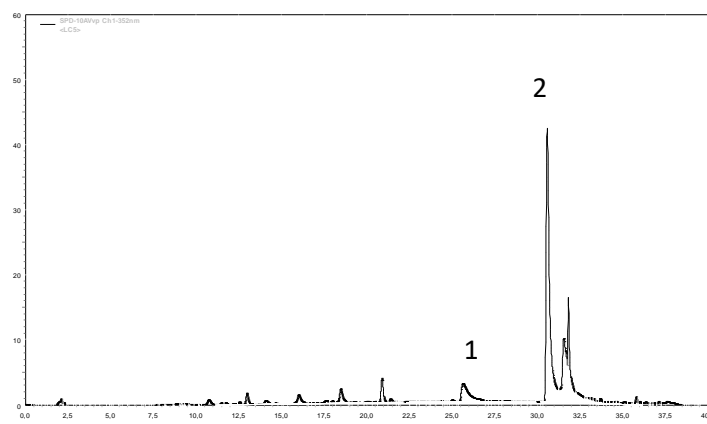


Figura 5. Separazione cromatografica dei composti fenolici dell'estratto idrolizzato. (1: mirycetina; 2: quercetina)

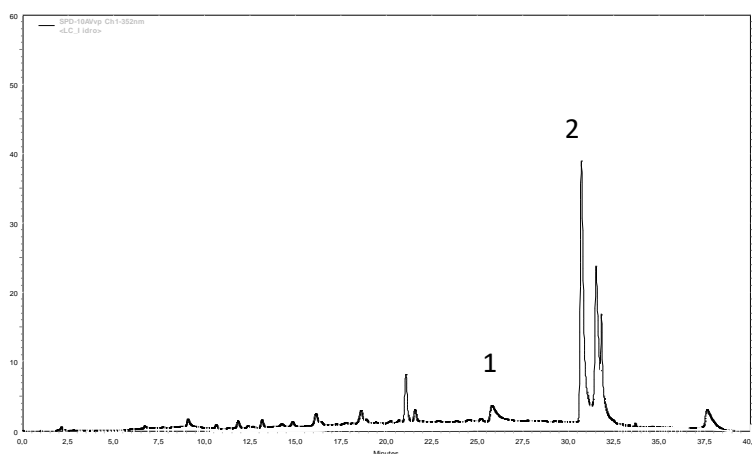


Figura 6. Separazione cromatografica dei composti fenolici dell'infuso idrolizzato (1: mirycetina; 2: quercetina)

Nelle Figure 5 e 6 sono riportati i cromatogrammi degli estratti e dell'infuso idrolizzati. È stato quindi possibile identificare due picchi confrontandoli con gli standard analitici di riferimento, corrispondenti a mirycetina e quercetina standard come riportato in Figura 7.

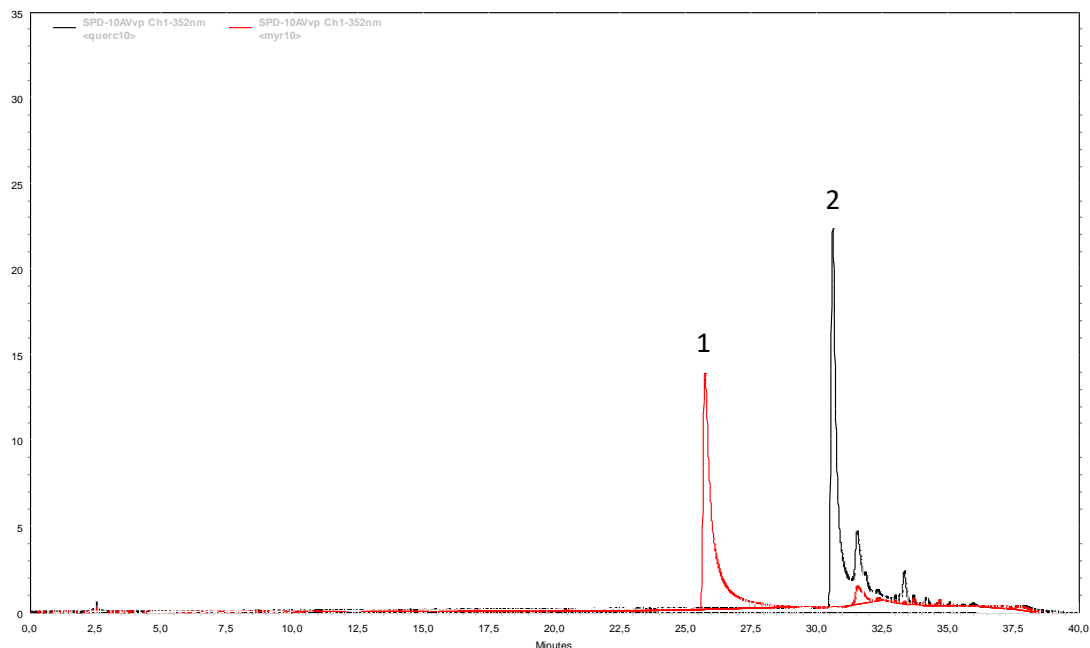


Figura 7. Cromatogramma degli standard analitici (1: mirycetina 10 ppm; 2: quercetina 10 ppm)

Dopo l'identificazione sono state effettuate le quantificazioni relative predisponendo le opportune rette di taratura a diverse concentrazioni.

Nella Tabella 8 sono riportate le concentrazioni medie di mirycetina e quercetina presenti in un grammo di foglie essiccate sia negli estratti, sia negli infusi oggetto della sperimentazione.

Campioni	Mirycetina mg/g di foglie essiccate (s.s.)	Quercetina mg/g di foglie essiccate (s.s.)
Estratti	1,6	7,2
Infusi	0,7	2,3

Tabella 8. Contenuti medi di mirycetina e quercetina presenti negli estratti e negli infusi idrolizzati delle foglie essiccate di Lanche canela. (CV%≤5)

4.6 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELL'OLIO ESSENZIALE

Gli oli essenziali sono miscele di sostanze complesse e fragranti, impiegate in molti campi quali l'aromaterapia, la medicina, la farmacia, nonché l'industria agroalimentare e la fitoterapia [75].

In Figura 8 è riportato un esempio di cromatogramma ottenuto in GC-MS dell'olio essenziale di *M. discolor*.

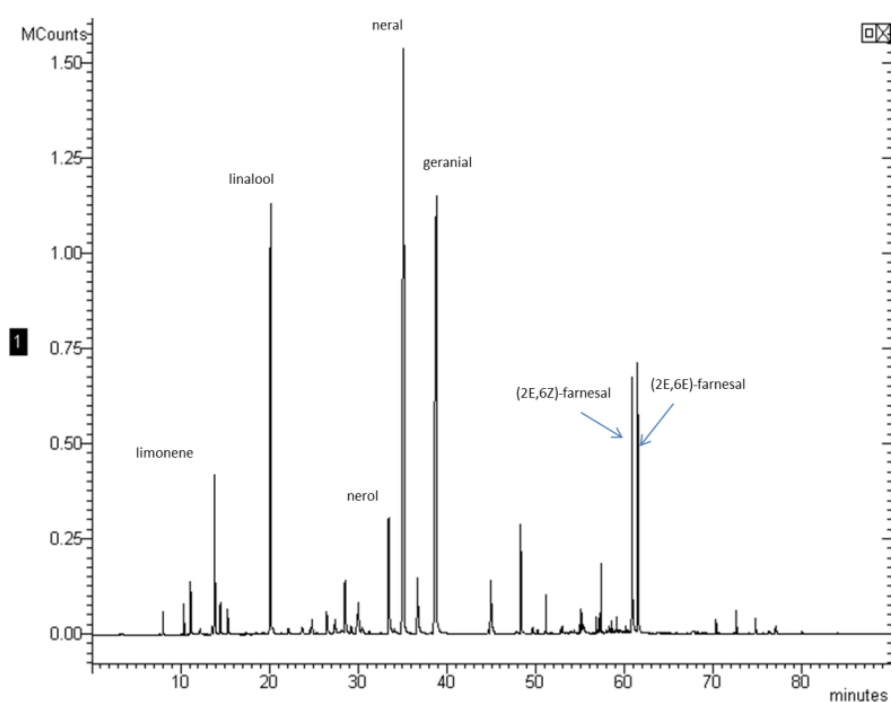


Figura 8. Cromatogramma dell'olio essenziale di un campione di *Myrcianthes discolor* (HBK)

La composizione media dell'olio essenziale di *Myrcianthes discolor* (HBK) è riportata nella Tabella 9.

N°	Area% ¹	Compound ²	KI ³
1	0.34	a-pinene	929
2	0.58	b-pinene	974
3	1.22	myrcene	987
4	0.13	a-phellandrene	1005
5	0.25	p-cymene	1021
6	3.77	limonene	1025
7	0.76	cis-ocimene	1033
8	0.67	trans-ocimene	1043
9	12.29	linalool	1102
10	0.22	trans-p-Mentha-2,8-dienol	1121
11	0.21	cis-p-Mentha-2,8-dienol	1135
12	0.34	trans-chrysanthemal	1146
13	0.80	(Z)-isoneal	1161
14	0.49	p-mentha-1,5-dien-8-ol	1170
15	1.63	(E)-isoneal	1181
16	0.48	a-terpineol	1193
17	0.94	p-mentha-1(7),2-dien-8-ol	1195
18	4.21	nerol	1224
19	25.38	neral	1239
20	2.25	geraniol	1252
21	25.34	geranial	1270
22	2.31	methyl geranate	1331
23	0.12	eugenol	1365
24	2.48	neryl acetate	1371
25	0.19	geranyl acetate	1387
26	0.71	b-caryophyllene	1410
27	0.14	a-caryophyllene	1455
28	0.15	a-farnesene	1503
29	0.26	trans-nerolidol	1563
30	0.94	caryophyllene oxide	1581
31	0.13	(2Z,6Z)-farnesal	1685
32	3.50	(2E,6Z)-farnesal	1713
33	0.86	(2E,6E)-farnesol	1719
34	3.73	(2E,6E)-farnesal	1741
Totale identificati	97.79		

Tabella 9. Composizione chimica dell'olio essenziale di *M. discolor* (HBK).

¹Area del picco relativa calcolata con GC-FID; ²I componenti sono elencati in ordine di eluizione e la loro nomenclatura è conforme alla biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology); ³Indici aritmetici calcolati su una colonna Varian VF-5ms.

Il lavoro svolto sui campioni di *M. discolor* ha permesso di identificare trentaquattro composti corrispondenti al 97,79% del totale. I componenti presenti in maggior quantità sono risultati neral (25,38%), geranial (25,34 %), linalool (12,29 %). Per

l'identificazione di ogni composto lo spettro di massa ottenuto sperimentalmente è stato confrontato con quello presente nella libreria NIST e l'indice di Kovats di letteratura.

Gli oli essenziali sono miscele complesse isolate da piante aromatiche che possono possedere attività antiossidanti e antinfiammatorie di interesse per le industrie alimentari, cosmetiche e della salute umana ^[76]. Neral, geranial e linalool appartengono alla famiglia dei monoterpeni ossigenati ^[77].

Sia il citrale naturale che quello sintetico sono composti da una miscela isomerica di geranial e neral, Si trova naturalmente negli oli essenziali di agrumi e in una varietà di erbe e piante come *Melissa officinalis*, citronella ed eucalipto ^[75]. Il citral è un composto che ha mostrato effetti citotossici e antiproliferativi sulle cellule tumorali mammarie e ematopoietiche ^[78].

Neral e geranial in forme pure e dimostrato la loro attività antiinfiammatoria, e neral ha mostrato una maggiore attività antiinfiammatoria, tra cui significativa inibizione della secrezione di citochine e espressione di molecole infiammatorie di macrofagi stimolati con LPS (Lipopolysaccharid) ^[79].

Il linalool puro possiede un odore fresco, pulito, delicato e leggero con una leggera impronta di agrumi e viene utilizzato in grandi quantità in sapone e prodotti detergenti. Anche se linalool viene usato in grandi quantità nel settore dei profumi, non ci sono dati disponibili circa la sua biotrasformazione negli esseri umani ^[75].

4.7 ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DELL'OLIO ESSENZIALE

Secondo Baser e Buchbauer, l'attività degli oli essenziali è classificata in base alla MIC (Concentrazione Minima Inibente):

MIC > 20000 µg/mL = privo di attività;

5000 < MIC < 20000 µg/mL = attività debole;

500 < MIC < 5000 µg/mL = attività moderata;

MIC < 500 µg/mL = attività elevata ^[75].

Campioni	Minima Concentrazione Inibente (MIC µg/mL)				
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
8) OE <i>L. canela</i>	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
13) limonene	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
15) linalool	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
16) <i>cis+trans</i> -citral	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
Controllo positivo	2.5	10	5	> 100	10

Tabella 10. Attività antibatterica di olio essenziale di *Myrcianthes discolor* (HBK) espresso come MIC. (Cis+trans-citral: miscela di geranial e neral 50%/50%)

Per la ricerca dell'attività di nuovi oli essenziali è necessario dimostrare che siano attivi a concentrazioni superiori a 2.000 µg/mL perché diversamente sono considerati di effetto trascurabile o nullo. In questa ricerca oltre all'olio essenziale sono stati sperimentati le singole sostanze come standard analitici per poter identificare quelli responsabili dell'eventuale maggiore attività. I risultati ottenuti e riportati in tabella 10 non hanno dimostrato attività antibatteriche interessanti.

4.8 ATTIVITÀ ANTIFUNGINA

Per la valutazione dell'attività antifungina sono stati esaminati gli estratti etanoliche al 10% in acqua e gli infusi ottenuti con 3 grammi di foglie essiccate in 200 mL di acqua. Tutti i campioni esaminati sono stati impiegati a diverse concentrazioni mettendoli a contatto con 8 funghi fitopatogeni di piante coltivate (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Monilia laxa* (ciliegia), *Trichoderma asperellum* TVI, *Pythium splendens*, *Fusarium solani* (patata), *Stemphylium vesicarium*.). I risultati medi

ottenuti sono riportati in figura 9, mentre nelle figure 10 e 11 sono riportati due esempi di come sono state realizzate le prove biologiche.

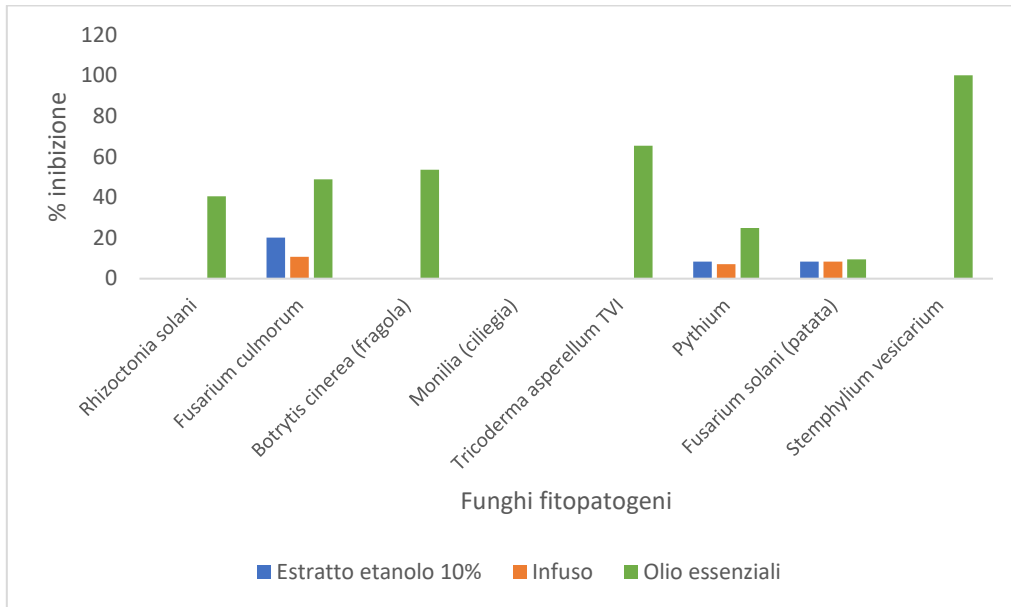


Figura 9. Attività antifungina di estratti etanolic, infusi e oli essenziali di Lanche canela espressa come percentuale di inibizione.

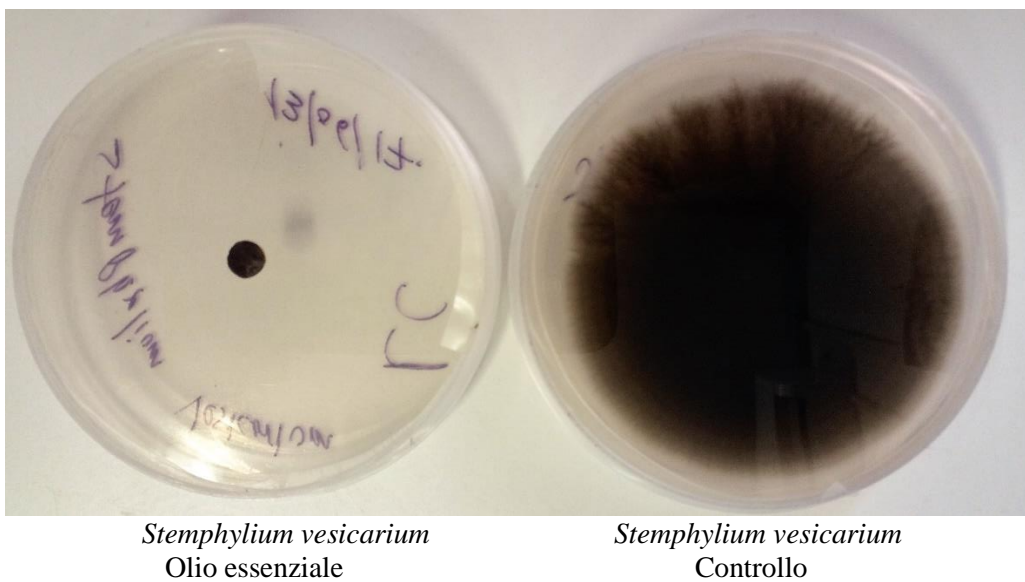


Figura 10. Inibizione di *Stemphylium vesicarium* con olio essenziale di Lanche canela

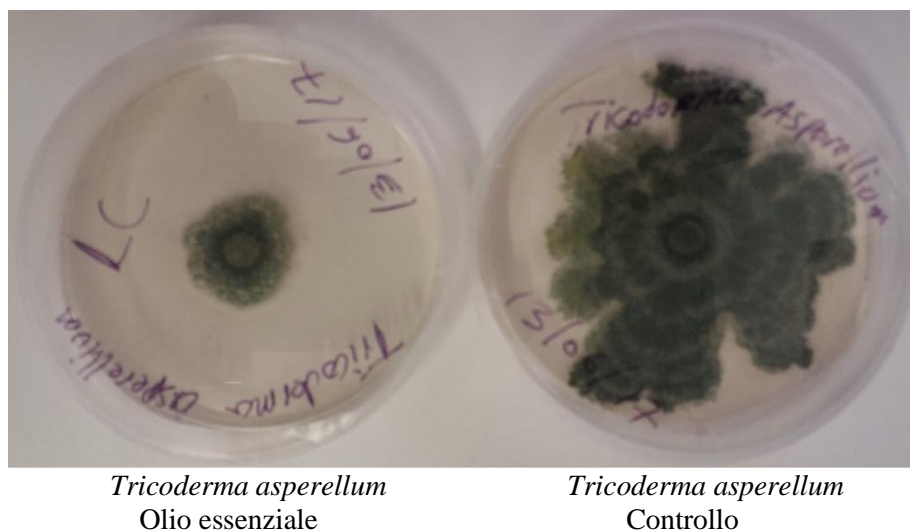


Figura 11. Inibizione di *Tricoderma asperellum* TVI con olio essenziale di Lanche canela

Le prove biologiche ripetute (figura 9) hanno dimostrato interessanti attività antifungine da parte dell'olio essenziale verso *Stemphylium vesicarium* (100%), *Tricoderma asperellum tvi* (65%), *Botrytis cinerea* (fragola) (54%) e *Fusarium culmorum* (49%), e, seppure con minore interesse in quanto solo fungistatica, anche nei confronti di *Rhizoctonia solani* (40%), *Pythium* (25%) e *Fusarium solani* (patata) (10%).

Per quanto riguarda i campioni ottenuti come estratti etanolici l'attività è risultata modesta e di tipo fungistatico nei confronti di *Fusarium culmorum* (20%) e *Fusarium solani* e *Pythium* (8%). Mentre per gli infusi solo nei confronti di *Fusarium culmorum* (11%), *Fusarium solani* (8%) e *Pythium* (7%). Nessuna attività è stata evidenziata nei confronti di *Monilia laxa*.

4.9 POTENZIALI EFFETTI TOSSICOLOGICI DI ESTRATTI IDROALCOLICI DI *Myrcianthes discolor* (HBK) "Lanche canela"

I principali potenziali effetti tossicologici dell'estratto idroalcolico di *M. discolor* sono stati studiati nei topi seguendo il metodo della dose limite e la valutazione del peso corporeo e degli organi relativi che potrebbero essere compromessi dall'azione tossica dei componenti l'estratto.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il limite superiore di dosaggio pari a 2000 mg/Kg di peso corporeo vivo, non hanno determinato mortalità negli animali sperimentali. Come riportato nella Figura 12 i pesi medi non hanno evidenziato variazioni statisticamente significative ($p=0,748$) quindi l'aumento del peso in tutti i topi è relativo al loro metabolismo della crescita e non è stato influenzato dal trattamento con l'estratto di Lanche canela.

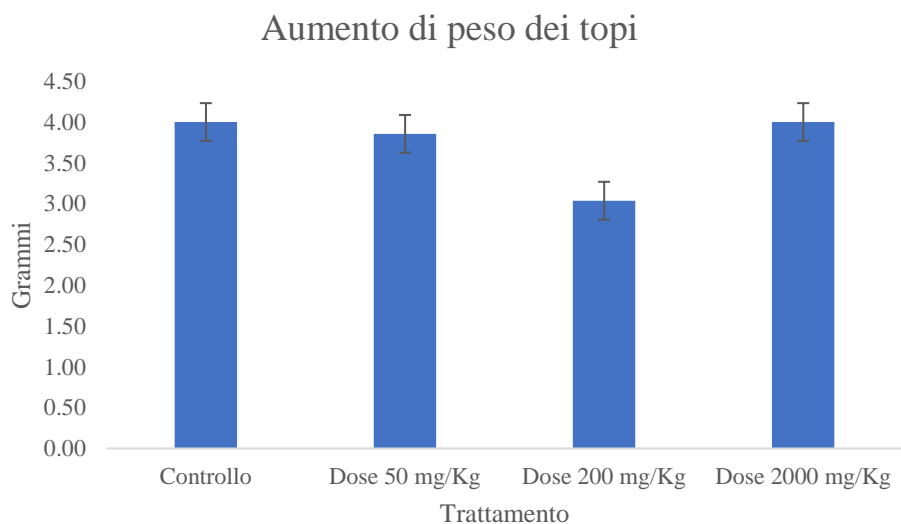


Figura 12. Variazione di peso nei topi sottoposti al test di tossicità dell'estratto idroalcolico di *Myrcianthes discolor* (HBK)

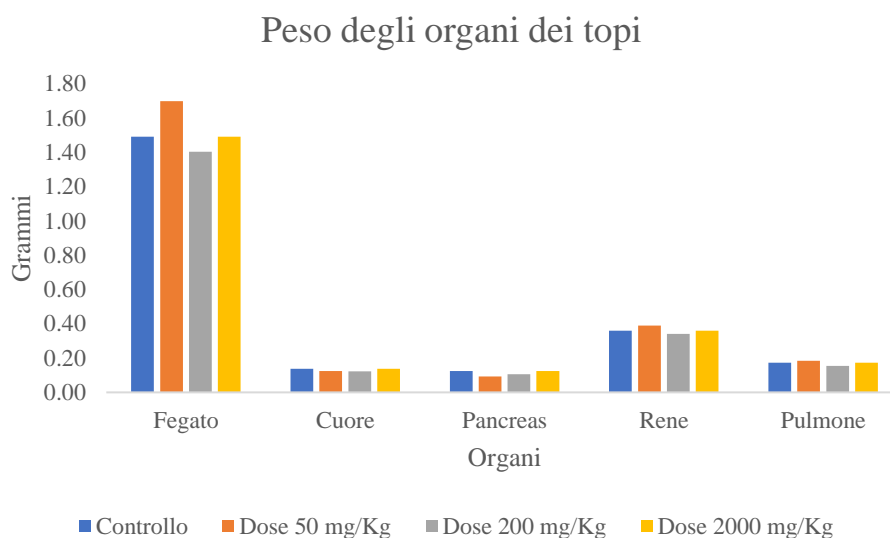


Figura 13. Variazione di peso degli organi di topi sottoposti al test di tossicità dell'estratto idroalcolico di *Myrcianthes discolor* (HBK)

Esaminando i risultati della figura 13 in cui sono riportati i pesi degli organi dopo aver sacrificato gli animali oggetto dello studio, non appaiono differenze statisticamente significative ($p > 0,05$) per cui si potrebbe affermare che alle dosi sperimentate nonostante le elevate concentrazioni utilizzate siano esclusi effetti tossici evidenti.

4.10 EFFETTI FARMACOLOGICI DI ESTRATTI IDROALCOLICI DI *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela” IN RELAZIONE ALL’ATTIVITÀ SESSUALE

La valutazione dell’attività farmacologica di estratti idroalcolici di Lanche canela, stata realizzata su ratto maschi. Uno dei parametri valutati è stato la latenza di monta (LM) che rappresenta l'intervallo di tempo tra l'introduzione del ratto femmina alla gabbia dove si trova il ratto maschio e la prima monta. Nella Figura 14 sono riportati i tempi medi di attività. In particolare, il gruppo trattato con estratto idroalcolico alla dose di 250 mg/Kg ha un tempo medio di attesa di 4,9 minuti, il gruppo trattato con estratto idroalcolico ad una dose di 500 mg/Kg ha un tempo medio di attesa di 5,5 minuti mentre il gruppo di controllo che ha ricevuto solo il placebo ha presentato tempi di attesa di 7,3 minuti. La varianza è statisticamente significativa solo verso il controllo ($p = > 0,05$).

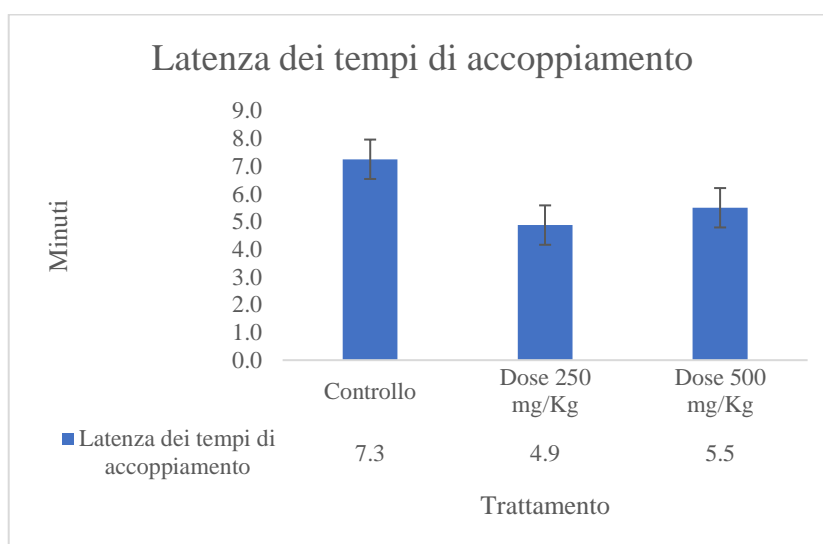


Figura 14. Latenza dei tempi di accoppiamento nei ratti maschi per effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela”

Un altro dei parametri studiati è stata la latenza di penetrazione (LP) che rappresenta l'intervallo di tempo tra il momento in cui il ratto femmina viene introdotto nella gabbia fino alla prima penetrazione del maschio. Nella Figura 15, si può osservare come il trattamento con 500 mg e 250 mg di estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK), abbia accelerato i tempi di penetrazione che sono risultati pari a 1,6 e 2,8 minuti rispettivamente mentre erano statisticamente maggiori quelli relativi al controllo con 6,5 minuti di latenza. Si potrebbe quindi supporre che alla dose maggiore il tempo di LP diminuisca e quindi ci sia un aumento della libido e della potenza sessuale. Anche in questo esperimento la varianza è statisticamente significativa solo verso il controllo ($p=0,004$).

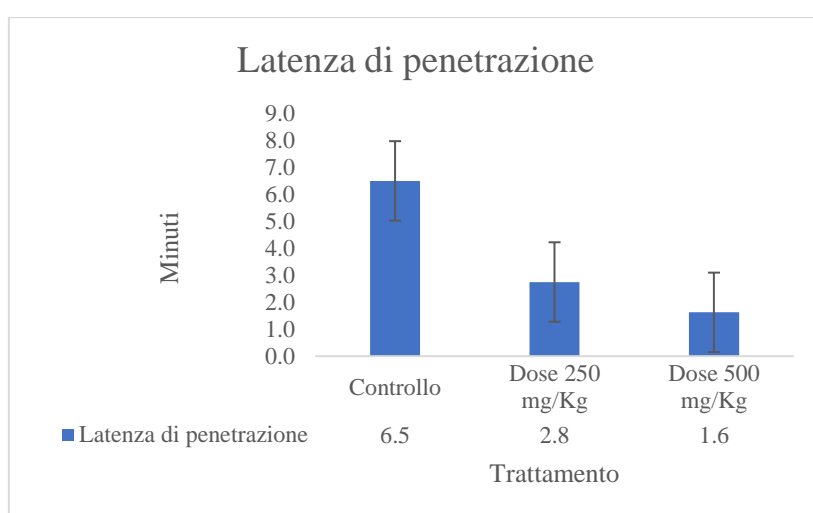


Figura 15. Latenza dei tempi di penetrazione nei ratti maschi per effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela”

In Figura 16 sono riportati i risultati relativi alla latenza dei tempi dell'eiaculazione, come si può notare il gruppo di controllo ha denotato tempi medi di 11,8 minuti mentre i gruppi che hanno ricevuto un trattamento di 250 mg e 500 mg dell'estratto presentavano 6,6 e 7,1 minuti di latenza tra la prima penetrazione e la prima eiaculazione. Anche in questo esperimento la varianza è statisticamente significativa solo verso il controllo ($p>0,001$).

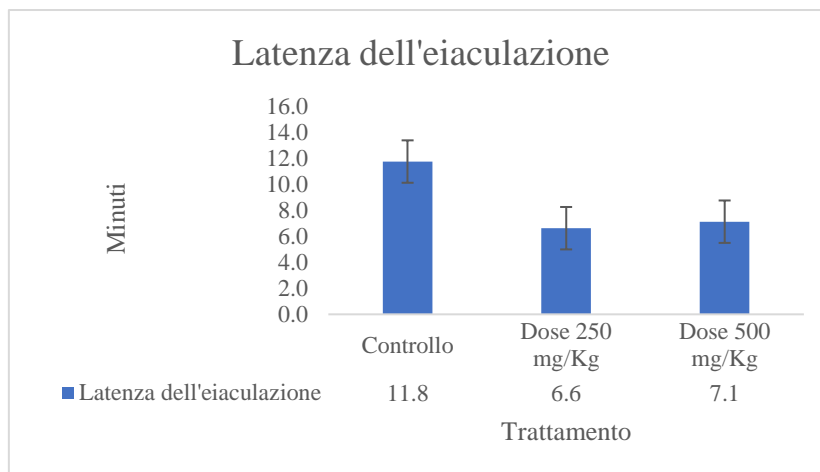


Figura 16. Latenza dei tempi di eiaculazione nei ratti maschi per effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) “Lanche canela”

La numerosità degli accoppiamenti è stata valutata entro i primi 30 minuti. I risultati sono riportati in Figura 17. I ratti maschi che avevano ricevuto il trattamento alle dosi di 500 mg di estratto idroalcolico hanno effettuato un numero medio di accoppiamenti di 50,5 mentre nelle dosi di 250 mg il numero è stato pari a 33,9, mentre per il gruppo di controllo gli accoppiamenti sono risultati pari a 30,1 nello stesso tempo. Anche in questo esperimento i risultati sono statisticamente significativi per la dose maggiore solo verso la dose minore e il controllo ($p > 0,001$).

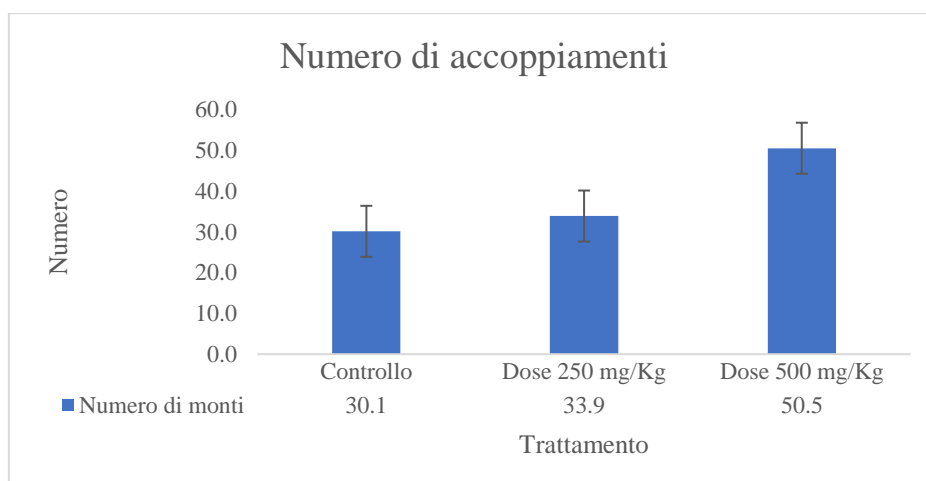


Figura 17. Effetti degli estratti idroalcolici di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) sul numero di accoppiamenti realizzati dai ratti maschi.

La variabile numero di penetrazioni nei ratti maschi ha mostrato che a dosi di 500 mg avevano 94,6 penetrazioni in media, mentre a dosi di 250 mg 89,1 e gruppo di controllo

avevano 42,1 penetrazioni. Quelle che mostrano un'alta rilevanza statistica tra le medie di penetrazione secondo il trattamento considerato nell'analisi ($p < 0,001$).

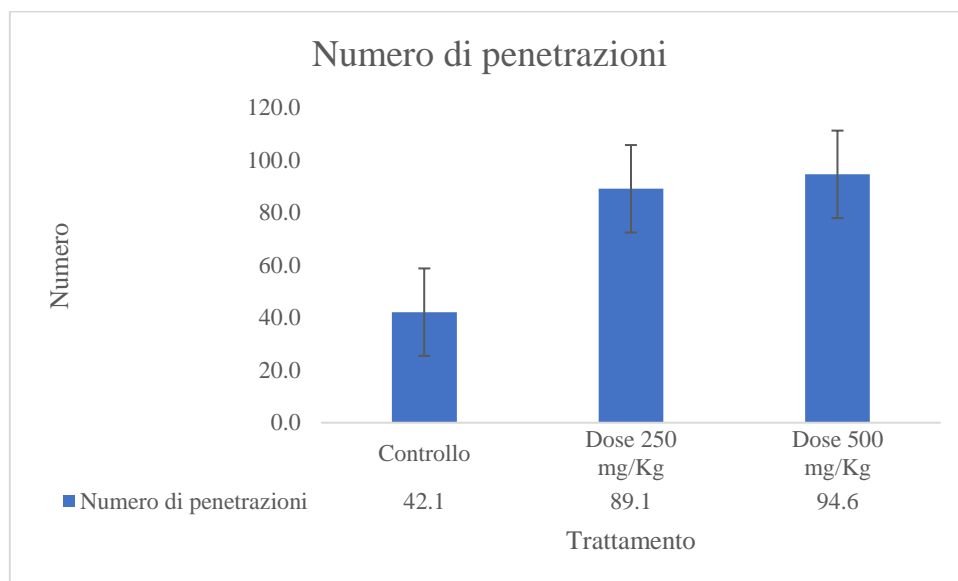


Figura 18. Effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) sul la penetrazione dei ratti maschi.

Per ciò che concerne il numero di eiaculazioni gli animali che hanno ricevuto il trattamento con estratto idroalcolico e il gruppo di controllo, è riportato nella Figura 19. Le somministrazioni con la dose di 500 mg e con 250 mg generavano in media 9,13 e 6,23 eiaculazioni rispettivamente, mentre per il gruppo di controllo i valori medi erano di 3,25 eiaculazioni. Anche in questi esperimenti i valori ottenuti risultavano statisticamente significativi tra gli animali trattati e il controllo ($p < 0,001$).

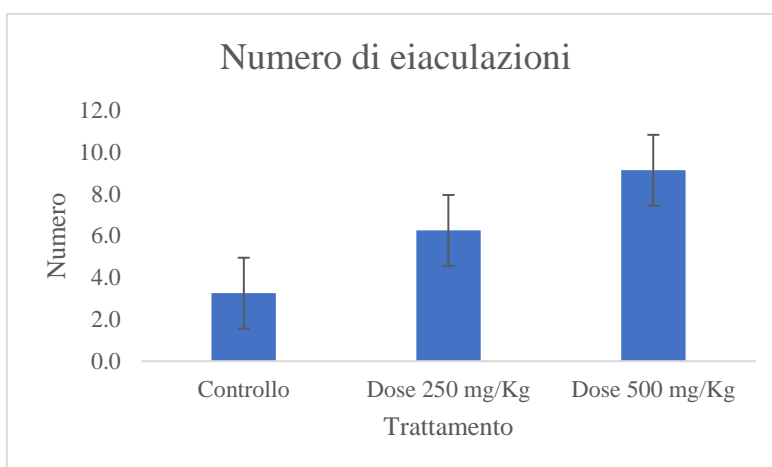


Figura 19. Effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) sull'eiaculazione dei ratti maschi.

5. CONCLUSIONI

L'uso delle piante medicinali in Perù come parte della medicina tradizionale per il trattamento dei molti problemi di salute è ancora molto frequente, è quindi avere il supporto scientifico e assicurarsi che le persone che usano frequentemente piante diverse non soffrano di alcuni effetti avversi o intossicazione acuta o cronica. Questo studio ha permesso di fare una prima verifica della caratterizzazione chimica dei principali componenti bioattivi delle foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK) proponibili come materie prime o come semilavorati alle industrie alimentari, nutraceutiche, farmaceutiche e cosmetiche che richiedono sempre prodotti innovativi.

Le analisi condotte inizialmente dimostrano una quantità interessante di proteine, di elementi come il calcio, magnesio e potassio e oligoelementi come il ferro, manganese, zinco e rame. Inoltre, contiene fibra solubile e insolubile e acidi grassi essenziali come l'acido linolenico e linoleico.

La ricerca è proseguita con lo studio delle capacità antiossidanti; le foglie analizzate hanno dimostrato elevati contenuti in polifenoli totali e una buona capacità antiossidante, quindi Lanche canela potrebbe essere utilizzato come nuovo integratore alimentare o un ingrediente attivo nell'industria cosmetica. Lo studio è proseguito con la ricerca di flavonoidi mediante HPLC che ha permesso di identificare e quantificare la presenza di mirycetina e quercetina importanti flavonoidi che hanno dimostrato di possedere effetti sulla la salute.

Lo studio della composizione chimica dell'olio essenziale ha permesso di identificare 34 tipi di sostanze e le più abbondanti sono neral, geranial e linalool. In tanto L'attività antibatterica dell'olio essenziali di Lanche canela non ha dato risultati importanti, mentre è emerso un effetto interessante contro funghi fitopatogeni come il *Stemphylium vesicarium* e *Trichoderma asperellum*.

Il saggio sull'effetto tossicologico dell'estratto idroalcolico di foglie di *Myrcianthes discolor* (HBK), non ha mostrato tossicità orale acuta alla dose limite garantendo quindi anche un possibile utilizzo per le persone.

La ricerca sugli effetti farmacologici e relativi all'attività sessuale è stata valutata mediante la frequenza degli accoppiamenti che rappresenta un parametro che misura il desiderio sessuale comunemente conosciuto come libido sessuale, mentre la frequenza delle penetrazioni indicherebbe la potenza sessuale.

I risultati ottenuti dimostrerebbero come sia stato possibile stimolare il desiderio sessuale aumentandolo significativamente rispetto agli animali controllo. I valori più elevati relativi alla frequenza con cui sono avvenute le penetrazioni indicano che l'erezione è stata mantenuta più a lungo. Pertanto, l'aumento di tutti e due i parametri avuto con i dosaggi degli estratti di *Myrcianthes discolor* (HBK) somministrati ai diversi gruppi di animali sottoposti agli esperimenti fa supporre un effetto positivo sul comportamento sessuale dei ratti ^[80].

Nel prosieguo di questa ricerca si cercherà di individuare le sostanze e/o i fitocomplessi attivi coinvolti nelle diverse attività dimostrate e che potrebbero quindi diventare oggetto di brevettazione.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1]. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. China 2013
- [2]. Gonzales G. Maca de lo tradicional a la Ciencia. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Concytec. 2006 (1):91 – 121
- [3]. Borja A. Medical Pluralism in Peru - Traditional Medicine in Peruvian Society. Brandeis University. EE.UU. 2010.
- [4]. De Feo V. Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology* 85 (2003) 243–256.
- [5]. Puelles M., Gómez V., Gabriel J. Moris G. Las plantas medicinales de Perú. Etnobotánica y viabilidad comercial. Los Libros de la Catarata. Madrid, España 2010.
- [6]. Berłowski A., Zawada K., Wawer I., Paradowska K. Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 4, 71-77. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.48A009>.
- [7]. Monigatti M. Uso de plantas medicinales en los andes norte del Perú. Primera edición. Trujillo, Perú 2013.
- [8]. León B. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas, Lima 2006.
- [9]. Huamantupa I., et al. Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Rev. peru. biol.* 18(3): 283 – 291.
- [10]. Luziatelli G. et al. Asháninka medicinal plants: a case study from the native community of Bajo Quimiriki, Junín, Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2010, 6:21
- [11]. Rehecho S. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2011) 75–85
- [12]. Sanz J. et al. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology* 122 (2009) 333–362

- [13]. Huaranca R., Armas J., Vigo R. Uso de las plantas medicinales en la comunidad El Chino del área de conservación regional comunal Tamshiyacu-Tahuayo, Loreto, Perú. *Conoc. amaz.* 4(2): [2013]
- [14]. Bussmann R.W., Sharon D. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 2006;2:47. doi:10.1186/1746-4269-2-47.
- [15]. Monigatti M., Bussmann R.W., Weckerle C.S. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. *J Ethnopharmacol.* 2013 Jan 30;145(2):450-64. doi: 10.1016/j.jep.2012.10.066.
- [16]. Bussmann R.W., Glenn A. Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2010, 6:30.
- [17]. Chirinos R., et al. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean región. *Industrial Crops and Products* Volume 47, May 2013, Pages 145-152
- [18]. Berłowski A., et al. Antioxidant Properties of Medicinal Plants from Peru. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 4, 71-77.
- [19]. Quispe Y.N., Hwang S.H., Wang Z, Lim S.S. Screening of Peruvian Medicinal Plants for Tyrosinase Inhibitory Properties: Identification of Tyrosinase Inhibitors in *Hypericum laricifolium* Juss. *Molecules* 2017, 22, 402; doi:10.3390.
- [20]. Carraz M., et al. Antiproliferative activity and phenotypic modification induced by selected Peruvian medicinal plants on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *J Ethnopharmacol.* 2015 May 26;166:185-99. doi: 10.1016/j.jep.2015.02.028.
- [21]. Kośmider A., et al. *Uncaria tomentosa* Leaves Decoction Modulates Differently ROS Production in Cancer and Normal Cells, and Effects Cisplatin Cytotoxicity. *Molecules.* 2017 Apr 12;22(4). pii: E620. doi: 10.3390/molecules22040620.
- [22]. Gonzales-Arimborgo C., et al. Acceptability, Safety, and Efficacy of Oral Administration of Extracts of Black or Red Maca (*Lepidium meyenii*) in Adult Human Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled

- Study. Pharmaceuticals (Basel). 2016 Aug 18;9(3). pii: E49. doi: 10.3390/ph9030049.
- [23]. Ruiz L., et al. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. *J Ethnopharmacol.* 2011 Jan 27;133(2):917-21. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.039.
- [24]. Roumy V., et al. Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jul 25;112(3):482-9.
- [25]. Ulloa-Urizar G., et al. Antibacterial activity of five Peruvian medicinal plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Volume 5, Issue 11, November 2015, Pages 928-931.
- [26]. Bussmann R.W., et al Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J Ethnopharmacol.* 2010 Oct 28;132(1):101-8. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.048.
- [27]. Tauchen J., et al. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia* Volume 26, Issue 6, November–December 2016, Pages 728-737
- [28]. Kloucek P., et al. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *J Ethnopharmacol.* 2005 Jun 3;99(2):309-12.
- [29]. Kloucek P., et al. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *J Ethnopharmacol.* 2007 May 4;111(2):427-9.
- [30]. Tang W., Structural Characterization and Antifatigue Effect In Vivo of Maca (*Lepidium meyenii* Walp) Polysaccharide. *J Food Sci.* 2017 Mar;82(3):757-764. doi: 10.1111/1750-3841.13619.
- [31]. Zhang Y., Yu L., Jin W., Ao. M2. Effect of ethanolic extract of *Lepidium meyenii* Walp on serum hormone levels in ovariectomized rats. *Indian J Pharmacol.* 2014 Jul-Aug;46(4):416-9. doi: 10.4103/0253-7613.135955.
- [32]. Uchiyama F., Jikyo T., Takeda R., Ogata M. *Lepidium meyenii* (Maca) enhances the serum levels of luteinising hormone in female rats. *J Ethnopharmacol.* 2014 Feb 3;151(2):897-902. doi: 10.1016/j.jep.2013.11.058.

- [33]. Yucra S., et al. Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5 Suppl):1461-7.
- [34]. Gonzales G., Gonzales C., Gonzales-Castañeda C. *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru-from tradition to science. *Forsch Komplementmed*. 2009 Dec;16(6):373-80. doi: 10.1159/000264618.
- [35]. Melnikovova I., et al. Effect of *Lepidium meyenii* Walp. on Semen Parameters and Serum Hormone Levels in Healthy Adult Men: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015 (2015)*, Article ID 324369, 6 pages.
- [36]. Brooks N., et al. Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content. *Menopause*. 2008 Nov-Dec;15(6):1157-62. doi: 10.1097/gme.0b013e3181732953.
- [37]. Ohta Y., et al. Feeding hydroalcoholic extract powder of *Lepidium meyenii* (maca) increases serum testosterone concentration and enhances steroidogenic ability of Leydig cells in male rats. *Andrologia*. 2016 Apr;48(3):347-54. doi: 10.1111/and.12453.
- [38]. Oshima M., Gu Y., Tsukada S. Effects of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of estradiol-17 beta, progesterone, testosterone and the rate of embryo implantation in mice. *J Vet Med Sci*. 2003 Oct;65(10):1145-6.
- [39]. Brako, L. Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants angiosperms and gymnosperms of Peru. (Monographs in Systematic Botany Vol. 45.) Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. 1286 pp.
- [40]. Ulloa Ulloa, C., J. L. Zarucchi y B. León. Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993-2003. *Arnaldoa Edición Especial Nov*. 2004: 1–242.
- [41]. Kawasaki L., Holst B. Myrtaceae endémicas del Perú. *Rev. peru. biol*. Número especial 13(2): 463s - 468s (Diciembre 2006)
- [42]. Brack, A. Diccionario enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de Las Casas”. Cusco. 1999.
- [43]. Missouri Botanical Garden. <http://www.missouribotanicalgarden.org/>

- [44]. Setzer, W. Biological activity of the Essential Oil of *Myrcianthes* sp. nov. “Black Fruit” from Monteverde, Costa Rica. *Planta Medica*. 1999. 65:468-469
- [45]. Cole R.A., Haber W.A., Lawton R.O., Setzer W.N. Leaf essential oil composition of three species of *Myrcianthes* from Monteverde, Costa Rica. *Chem Biodivers*. 2008 Jul;5(7):1327-34. doi: 10.1002/cbdv.200890120.
- [46]. Mora V., et al. Composición química del aceite esencial de *Myrcianthes fragrans* (Sw.) Mc Vaugh de los Andes venezolanos. *Rev Fac Farm*. 2009; 51 (1): 20-23
- [47]. Lopez J., et al. Essential Oils from Bolivia. VII. Myrtaceae: *Myrcianthes osteomeloides* (Rusby) McVaugh and *Myrcianthes pseudomato* (Legrand) McVaugh. *Journal of Essential Oil Research* 17(1):64-65. January 2005.
- [48]. Silva D., Matulevich J., Devia B. Composición química del aceite esencial de hojas de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunt) McVaugh (MYRTACEAE). *Revista Facultad Ciencias Básicas*. 12(1) Páginas 84-91.2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1857>
- [49]. Zoghbi M.G.B., et al. Chemical variability of the volatiles from the leaves of *Eugenia protenta* McVaugh (Myrtaceae) growing wild in the North of Brazil. *Biochem. Systematics and Ecology*, Vol. 39, Issues 4–6, Aug.–Dec. 2011, Pag.660-665. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.05.019>
- [50]. Andrade J.M., et al. Phenolic composition in different genotypes of Guabiju fruits (*Myrcianthes pungens*) and their potential as antioxidant and antichemotactic agents. *J Food Sci*. 2011 Oct;76(8):C1181-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02375.x.
- [51]. Reynertson K., et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chem*. 2008 Aug 15; 109(4): 883–890. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.01.021
- [52]. Fracassetti D., Costa C., Moulay L., Tomás-Barberán F.A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, roanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chem*. 2013 Aug 15;139(1-4):578-88. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.121.
- [53]. Mejía K., Rengifo E. *Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana*. Segunda edición. Lima, Perú 2000.

- [54]. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial. El Futuro de las Plantas Medicinales del Altiplano y los Valles Centrales de los Andes. 2006.
- [55]. Adams R. Identification of Essential Oil Components by Gaschromatography/Masspectrometry, Allured Publishing, Carol Stream, Ill, USA, 4th edition, 2007.
- [56]. Guerrini A., Rossi D., Grandini A., et al., “Biological and chemo-diverse characterization of Amazonian (Ecuador) Citrus petitgrains,” *Journal of Applied Botany and Food Quality*, vol. 87, pp. 108–116, 2014
- [57]. Zhou Y., et al. Calciomics: integrative studies of Ca²⁺-binding proteins and their interactomes in biological systems. *Metallomics*. 2013 January; 5(1): 29–42. doi:10.1039/c2mt20009k.
- [58]. Pu F., et al. Calcium intake, calcium homeostasis and health. *Food Science and Human Wellness* 5 (2016) 8–16. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2016.01.001>
- [59]. Fang X., et al. Dose-response relationship between dietary magnesium intake and cardiovascular mortality: A systematic review and dose-based meta-regression analysis of prospective studies. *J Trace Elem Med Biol* (2016). Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.014>
- [60]. Kanbay M., et al. Dietary potassium: A key mediator of the cardiovascular response to dietary sodium chloride. *Journal of the American Society of Hypertension* 7(5) (2013) 395–400. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2013.04.009>
- [61]. Tedeschi P., et al. Un antico alimento funzionale: l’ortica. *Natural1* N° 169 (2018) 46-54.
- [62]. Wessling-Resnick M. Chapter 14 - Iron: Basic Nutritional Aspects. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals* 2017, Pages 161–173. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00014-2>
- [63]. Lönnerdal B., Hernell O. Iron: Physiology, Dietary Sources, and Requirements. *Encyclopedia of Human Nutrition, Volume 3*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00164-1>

- [64]. Bowman A., et al. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 25 (2011) 191–203. Doi: 10.1016/j.jtemb.2011.08.144
- [65]. Wani A., et al. Zinc: An element of extensive medical importance. *Current Medicine Research and Practice* 7 (2017) 90–98. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmrp.2017.02.006>
- [66]. Prasad A. Chapter 20 – Discovery of Zinc for Human Health and Biomarkers of Zinc Deficiency. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals 2017*, Pages 241–260. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00020-8>
- [67]. Bost M., et al. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 35 (2016) 107–115. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>
- [68]. Mackie A., et al. Roles for dietary fibre in the upper GI tract: The importance of viscosity. *Food Research International* (2015). Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.011>
- [69]. Prasad P., et al. Chapter 5 – The Relationship Between Probiotics and Dietary Fiber Consumption and Cardiovascular Health. *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease* (2017). Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00005-7>
- [70]. Mason-Ennis J., et al. Exploration of mechanisms of α -linolenic acid in reducing the growth of oestrogen receptor positive breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Functional Foods* 24 (2016) 513–519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.037>
- [71]. Gocen T., et al. Linoleic acid and its potassium and sodium salts: A combined experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure* 1150 (2017) 68-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.065>
- [72]. Debbabi M., et al. Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chem Phys Lipids*. 2017 Oct;207(Pt B):151-170. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2017.04.002.

- [73]. Petti S., Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry* 37 (2009) 413–423. doi:10.1016/j.jdent.2009.02.003
- [74]. Martínez-Flórez S., et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* (2002) 17 (6) 271-278.
- [75]. Başer, K. H. C.; Buchbauer, G. *Handbook of essential oils: science, technology and applications*, 1st ed.; CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, USA: 2010, 1-2.
- [76]. Graça M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules* 2010, 15, 9252-9287; doi:10.3390/molecules15129252.
- [77]. Demuner A., et al. Seasonal Variation in the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Volatile Oils of Three Species of *Leptospermum* (Myrtaceae) Grown in Brazil. *Molecules* 2011, 16, 1181-1191; doi:10.3390/molecules16021181.
- [78]. Sanches L., et al. Cytotoxicity of citral against melanoma cells: The involvement of oxidative stress generation and cell growth protein reduction. *Tumour Biol.* 2017 Mar;39(3):1010428317695914. doi: 10.1177/1010428317695914.
- [79]. Liao P., et al. Anti-inflammatory activity of neral and geranial isolated from fruits of *Litsea cubeba* Lour. *Journal of Functional Foods.* 19. 248-258; doi 10.1016/j.jff.2015.09.034.
- [80]. Tajuddin, Shamshad A. Aphrodisiac activity of 50% ethanolic extracts of *Myristica fragrans* Houtt (nutmeg) and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry (clove) in male mice: a comparative study. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2003; 3:1-6

INDICE DELLE FIGURE

	Pagina
Figura 1. Profilo gascromatografico di olio di Lanche canela estratto mediante Soxhlet. Pico A: Palmitico, B: Stearico, C: Oleico, D: Linoleico, E: Linolenico	37
Figura 2. Reazione del DPPH* con un fenolo generico	39
Figura 3. Cromatogramma dell'estratto di foglie secche di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK)	40
Figura 4. Cromatogramma dell'infuso di foglie secche di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK)	40
Figura 5. Separazione cromatografica dei composti fenolici dell'estratto idrolizzato. (1: miryctina; 2: quercetina)	41
Figura 6. Separazione cromatografica dei composti fenolici dell'infuso idrolizzato (1: miryctina; 2: quercetina)	41
Figura 7. Cromatogramma degli standard analitici (1: miryctina 10 ppm; 2: quercetina 10 ppm)	42
Figura 8. Cromatogramma dell'olio essenziale di un campione di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK)	43
Figura 9. Attività antifungina di estratti etanolici, infusi e oli essenziali di Lanche canela espressa come percentuale di inibizione.	47
Figura 10. Inibizione di <i>Stemphylium vesicarium</i> con olio essenziale di Lanche canela	47
Figura 11. Inibizione di <i>Trichoderma asperellum</i> TVI con olio essenziale di Lanche canela	48
Figura 12. Variazione di peso nei topi sottoposti al test di tossicità dell'estratto idroalcolico di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK)	49

Figura 13. Variazione di peso degli organi di topi sottoposti al test di tossicità dell'estratto idroalcolico di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK)	49
Figura 14. Latenza dei tempi di accoppiamento nei ratti maschi per effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) "Lanche canela"	50
Figura 15. Latenza dei tempi di penetrazione nei ratti maschi per effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) "Lanche canela"	51
Figura 16. Latenza dei tempi di eiaculazione nei ratti maschi per effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) "Lanche canela"	52
Figura 17. Effetti degli estratti idroalcolici di foglie di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) sul numero di accoppiamenti realizzati dai ratti maschi.	52
Figura 18. Effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) sul la penetrazione dei ratti maschi.	53
Figura 19. Effetto dell'estratto idroalcolico di foglie di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) sul l'eiaculazione dei ratti maschi.	53

INDICE DELLE TABELLE

	Pagina
Tabella 1. Contenuti medi di umidità, sostanza secca, proteine totali e frazione minerale totale. (s.s.=sostanza secca). LC: Lanche canela (<i>Myrcianthes discolor</i> (HBK))	31
Tabella 2. Contenuto medio di macroelementi in campioni di foglie secche di Lanche canela (media±ds, sostanza secca=s.s.).	32
Tabella 3. Contenuto medio di oligoelementi in campioni di foglie secche di Lanche canela (media±ds, sostanza secca=s.s.).	33
Tabella 4. Contenuti medi di fibra solubile e insolubile	34
Tabella 5. Contenuto di lipidi totali	35
Tabella 6. Profilo degli acidi grassi identificati nell'estratto lipidico ottenuto mediante Soxhlet da Lanche canela	36
Tabella 7. Contenuti totali medi in polifenoli (calcolati come catechina) e capacità antiossidante totale (calcolata come Trolox nei confronti del radicale DPPH) determinati negli estratti di foglie di Lanche canela.	38
Tabella 8. Contenuti medi di mirycetina e quercetina presenti negli estratti e negli infusi idrolizzati delle foglie essiccate di Lanche canela. (CV%≤5)	42
Tabella 9. Composizione chimica dell'olio essenziale di <i>M. discolor</i> (HBK).	44
Tabella 10. Attività antibatterica di olio essenziale di <i>Myrcianthes discolor</i> (HBK) espresso come MIC. (Cis+trans-citral: miscela di geranial e neral 50%/50%)	46

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione della ricerca è stata possibile grazie alla Convenzione per l'attivazione di linee dottorali di ricerca in Cooperazione allo Sviluppo Internazionale fra L'Università degli Studi di Ferrara, con sede in Ferrara – Italia, e La Universidad Católica los Ángeles de Chimbote – Perù

Gli studi della Caratterizzazione Chimica di *Myrcianthes discolor* (HBK) o "Lanche canela" sono stati condotti presso il "Laboratorio di Chimica degli Alimenti dell'Università di Ferrara". Il ringraziamento maggiore è riservato al Prof. Vincenzo Brandolini, che mi ha concesso il privilegio di affrontare il percorso di PhD student nel gruppo di Chimica degli Alimenti dell'Università di Ferrara. Ringrazio inoltre alle Dott.sse Paola Tedeschi ed Annalisa Maietti preziose collaboratrici, per il supporto tecnico e scientifico, per l'ospitalità ricevuta, per la pazienza e i consigli durante tutto il periodo di ricerca. Durante il progetto hanno collaborato in maniera fondamentale le Dott.ssa Alessandra Guerrini e PhD Caterina Bergantin. Infine, ringrazio chi ha sopportato il sottoscritto durante tutti questi anni fuori di casa: la mia moglie Judit presente e futuro della mia vita e le mie figlie Daniela e Antonella sono una motivazione molto sublime che mi ha permesso di portare avanti questa ricerca. Ringrazio inoltre la famiglia, gli amici di lunga data, i compagni di avventure di Ferrara e tutte le persone da cui, positivamente o negativamente, ho imparato qualcosa nella vita.