



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN  
BIOTECNOLOGIE AGRO-INDUSTRIALI

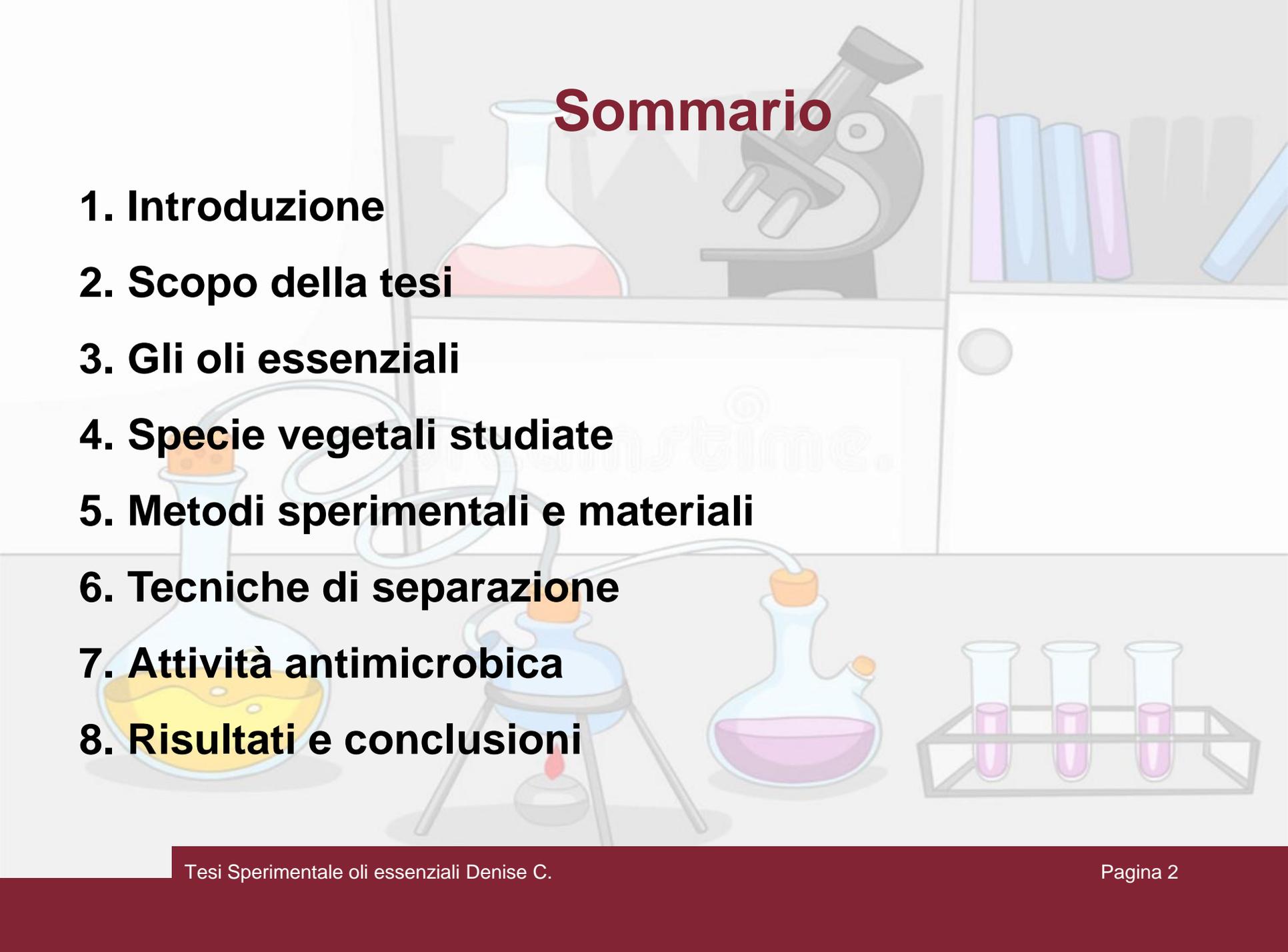
*“Estrazione degli oli essenziali: studio e confronto delle tecniche di idrodistillazione e distillazione in corrente di vapore”*

Relatore: **Marco Franceschin**

Candidata: **Denise Campagna**

Relatore Aggiunto: **Rino Ragno**

# Sommario



- 1. Introduzione**
- 2. Scopo della tesi**
- 3. Gli oli essenziali**
- 4. Specie vegetali studiate**
- 5. Metodi sperimentali e materiali**
- 6. Tecniche di separazione**
- 7. Attività antimicrobica**
- 8. Risultati e conclusioni**

# Introduzione

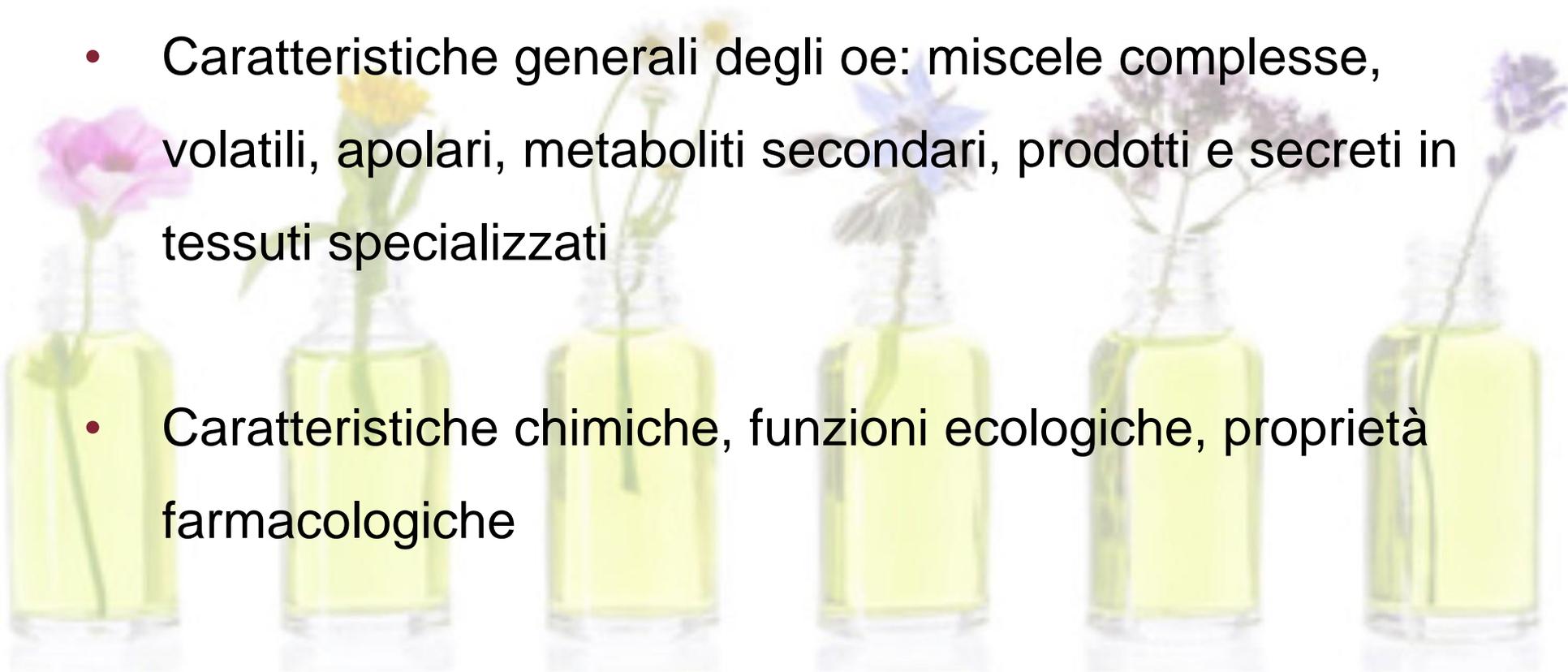
- Estrazione degli oli essenziali mediante le tecniche di idrodistillazione e distillazione in corrente di vapore continue e frazionate (fino a 24h).
- Analisi chimiche effettuate mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS).
- Test antimicrobici effettuati in vitro contro il ceppo di riferimento Candida Albicans mediante i test della MIC (determinazione della concentrazione minima inibitoria) secondo il metodo della diluizione in brodo.

## Scopo della tesi

**In quale ora del processo estrattivo bisogna estrarre l'olio essenziale, in modo da avere un olio con la massima concentrazione dei principi attivi e la migliore attività biologica?**

# Gli oli essenziali

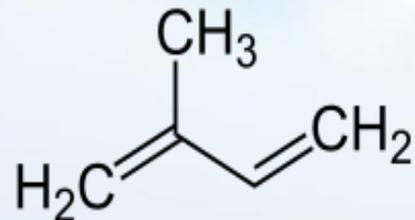
- Caratteristiche generali degli oe: miscele complesse, volatili, apolari, metaboliti secondari, prodotti e secreti in tessuti specializzati
- Caratteristiche chimiche, funzioni ecologiche, proprietà farmacologiche



# Caratteristiche chimiche

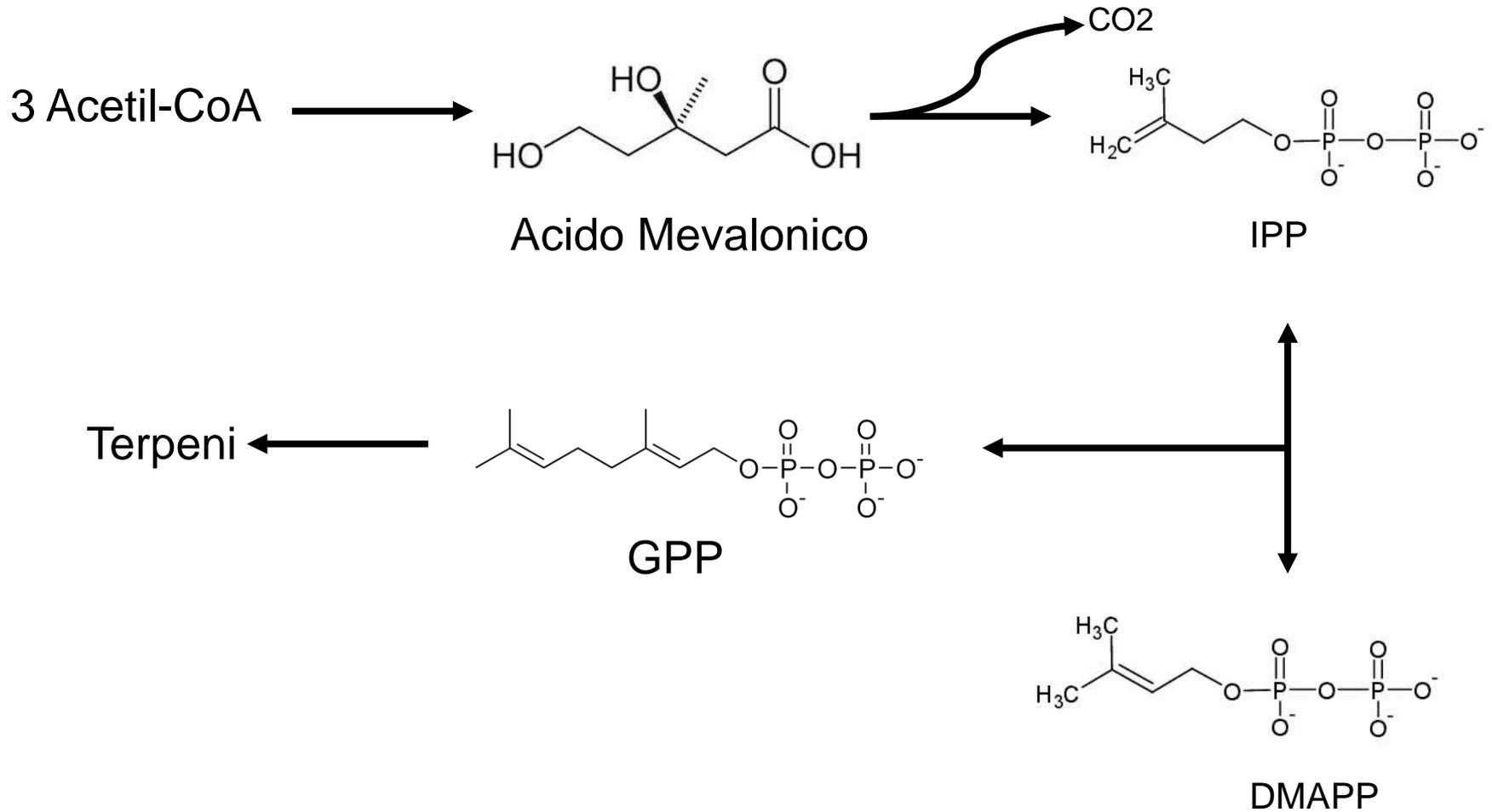
## Classe dei Terpeni

*Regola isoprenica di Ruzicka (1953):* tutti i terpeni derivano dall'unione di un numero variabile di unità a 5 atomi di carbonio, gli isopreni.



**Isoprene (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)**

# Via biosintetica dei terpeni



# Funzioni ecologiche

- Produzione, segregazione e rilascio verso l'esterno in spazi specializzati: tasche schizo-lisigene, dotti, tricomi ghiandolari
- Attrazione degli impollinatori, competizione pianta-pianta, difesa da erbivori, attività antibiotica contro patogeni



# Proprietà farmacologiche

- Attività antimicrobica
- Azione spasmolitica
- Attività carminativa e digestiva
- Attività espettorante
- Attività a livello del sistema nervoso
- Attività neurocomportamentale
- Attività antiossidante

# Specie vegetali studiate



**Achillea Millefolium**

**Asteraceae**



**Ruta Graveolens**

**Rutaceae**



**Artemisia Vulgaris**

**Asteraceae**

# Metodi sperimentali

## Idrodistillazione (HD)

## Distillazione in corrente di vapore (CV)

### Processo continuo

- Dopo 1h → Dopo 24h
- Dopo 2h → Dopo 24h
- Dopo 3h → Dopo 24h
- Dopo 6h → Dopo 24h
- Dopo 24h

50 grammi di pianta per ogni reattore

### Processo frazionato

- Dopo 1h
- Dopo 2h
- Dopo 3h
- Dopo 6h
- Dopo 24h

750 grammi di pianta totali

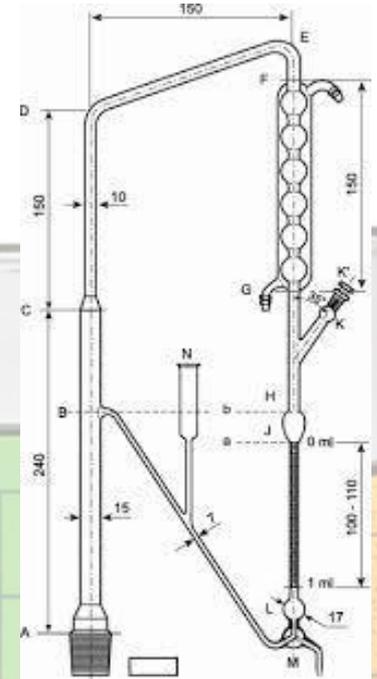
# Materiali



**Distillatore in acciaio inox  
Albrigi luigi**



**Reattore in vetro con  
coperchio e morsetto**



**Apparato clevenger**

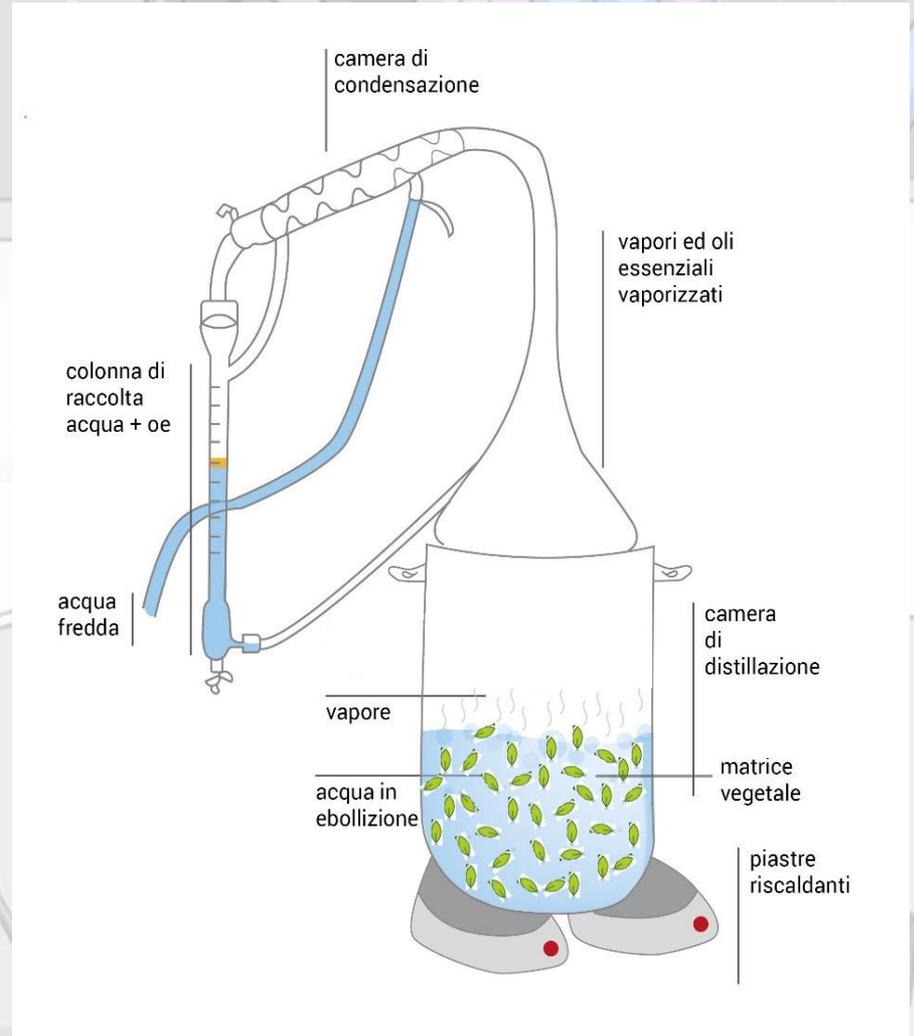
# Idrodistillazione

- La pianta è immersa in acqua
- Reazioni di idrolisi = rischio artefatti
- Rottura delle cellule facilitata

## HD continua



# HD frazionata



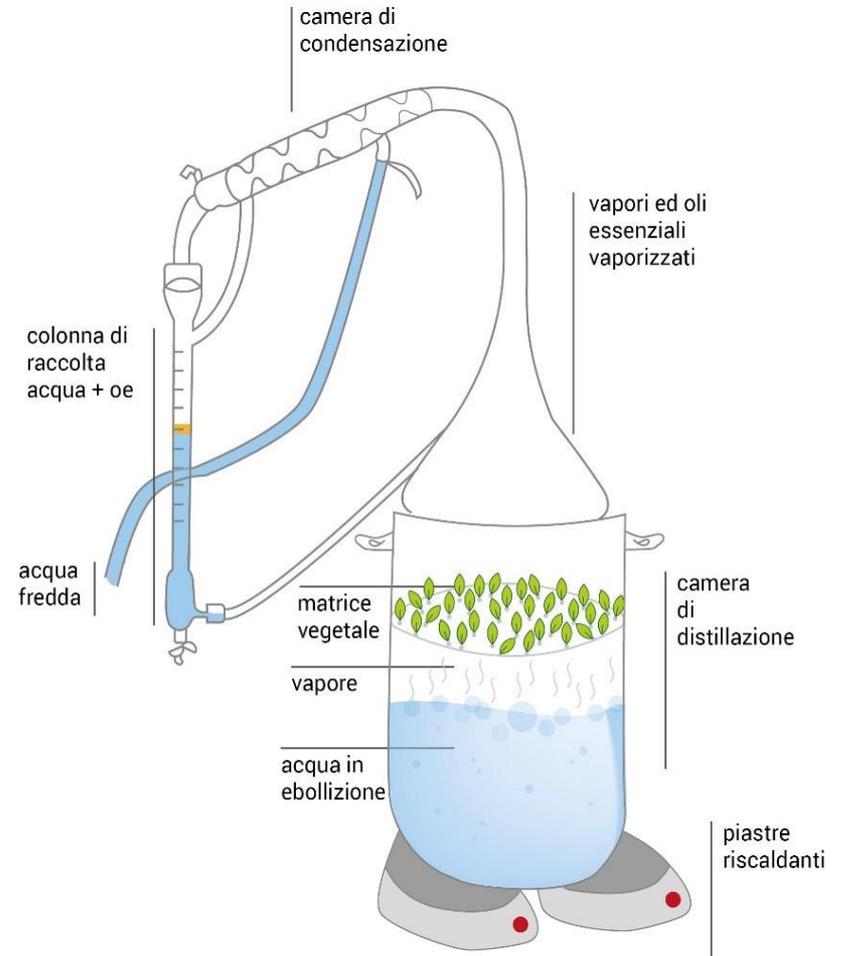
# Distillazione in corrente di vapore

- La pianta è adagiata su una griglia
- La pianta è investita dal vapore acqueo

## CV continua



# CV frazionata

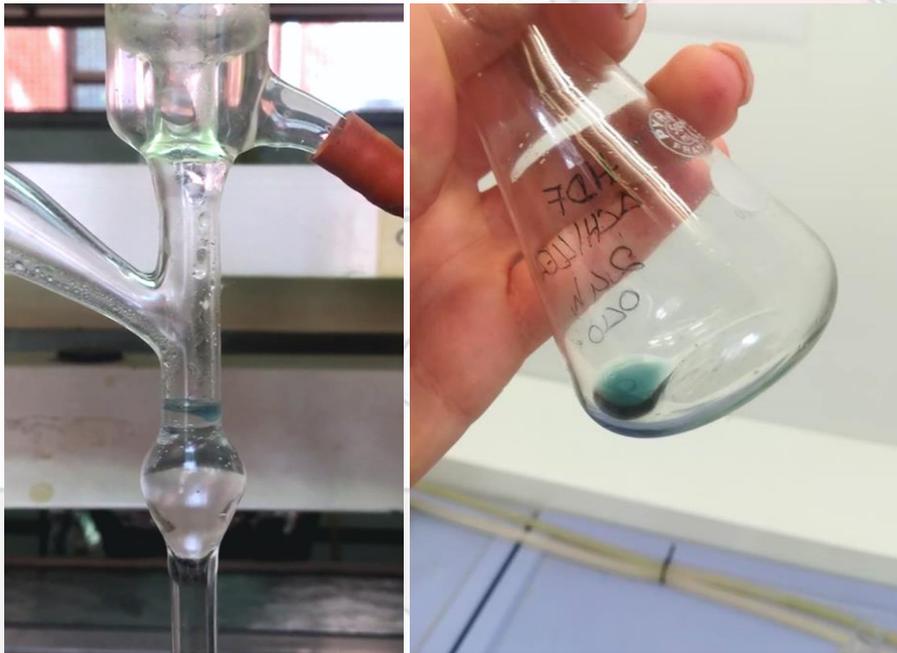


*Olio essenziale  
di Achillea  
Millefolium*

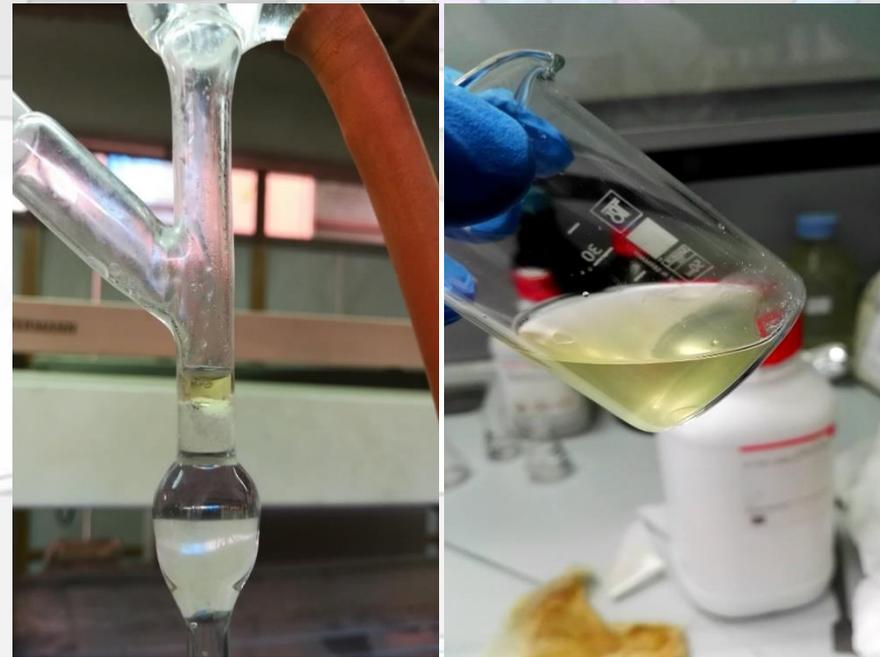


# Oli essenziali

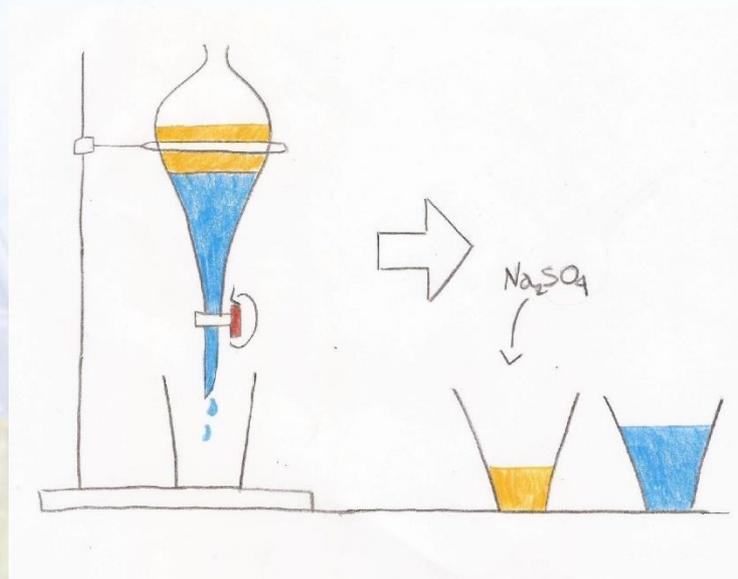
**Olio essenziale di Achillea  
Millefolium**



**Olio essenziale di Ruta Graveolens**



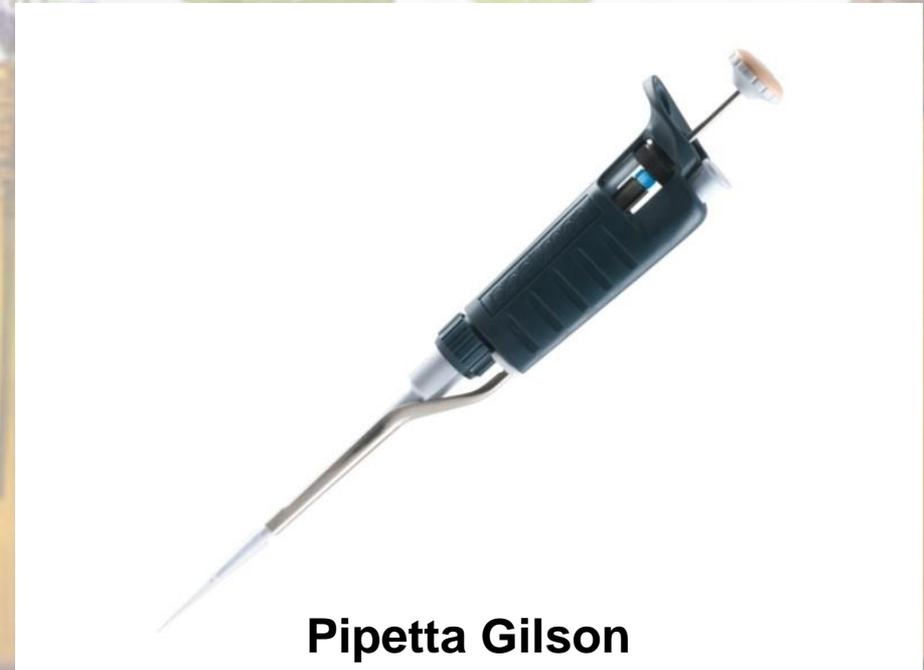
# Estrazione con etere dietilico e successiva anidrifcazione con $\text{Na}_2\text{SO}_4$



# Evaporazione del solvente e campionamento



**Flaconi vetro scuro**



**Pipetta Gilson**

# Tecniche di separazione

## Gas Cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS)

Rilevamento dei picchi la cui area corrisponde alla composizione chimica



**Agilent 7890A**  
Gas cromatografo/ Spettrometro di massa

9610453.00

5794305.50

3570401.25 4290116.00

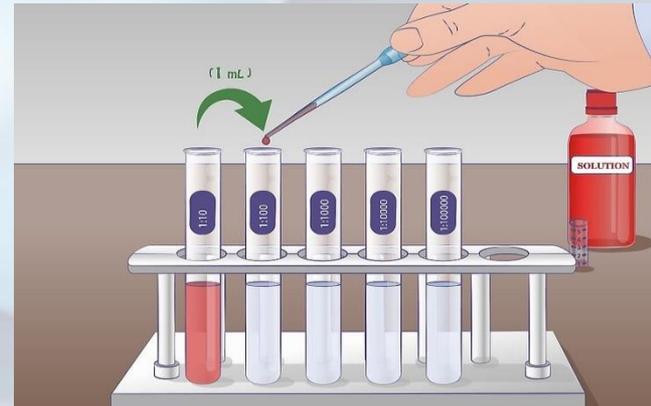
14

# Attività antimicrobica

- Attività anti-Candida albicans
- Valori di MIC ( Minimal Inhibitory Concentration) dopo 24 e 48 ore d'incubazione (range 12,48 – 0,0244 mg/ml)
- Diluizioni seriali a concentrazioni di 10%, 5%, 2,5%, 1,25% e 0,625%



**Terreno Sabouraud**



**Diluizioni seriali**

# Risultati e conclusioni



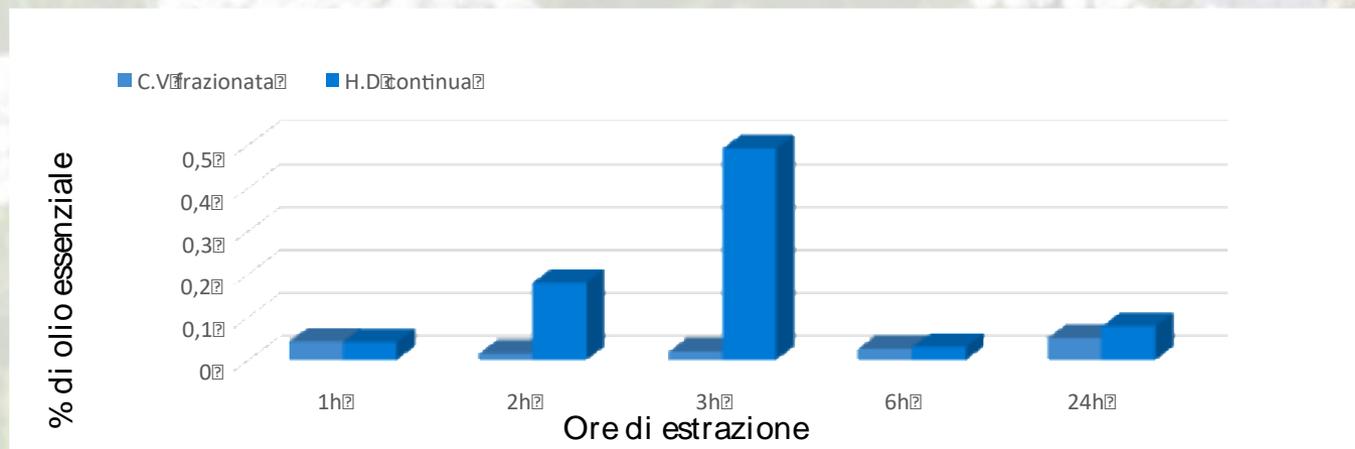
# Achillea Millefolium

## Rese %

### C.V frazionata

### H.D continua

h	g OE/g di pianta	resa %	h	g OE/g di pianta	resa %
0-1	0,0004400	0,044	0-1	0,000422	0,0422
1-2	0,0001640	0,0164	0-2	0,001814	0,1814
2-3	0,0002030	0,0203	0-3	0,004930	0,4930
3-6	0,0002716	0,02716	0-6	0,000312	0,0312
6-24	0,0005220	0,0522	0-24	0,000798	0,0798



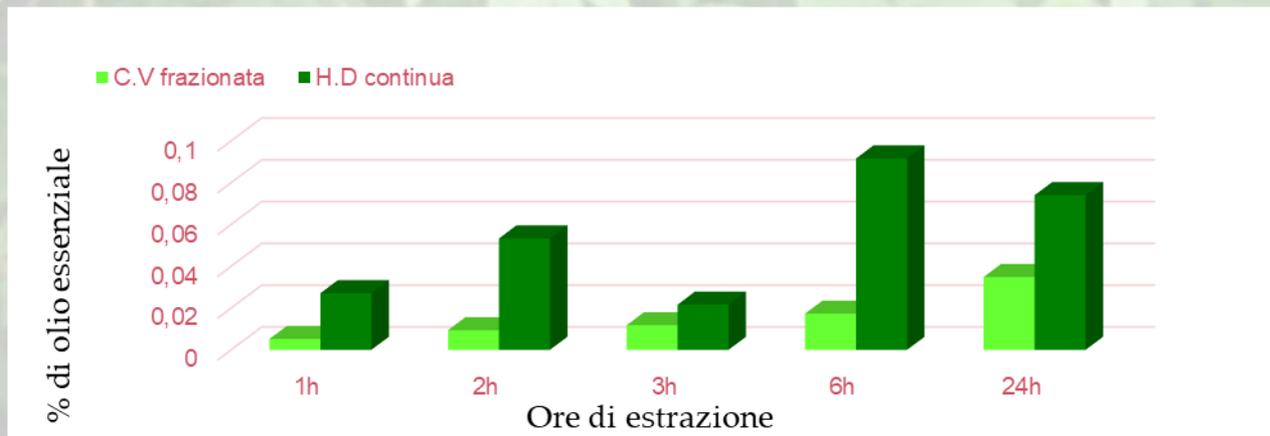
# Artemisia Vulgaris

## Rese %

### C.V frazionata

### H.D continua

h	g OE/g di pianta	resa %	h	g OE/g di pianta	resa %
0-1	0,000052	0,005207	0-1	0,000271	0,027100
1-2	0,000094	0,009367	0-2	0,000533	0,053300
2-3	0,000118	0,011753	0-3	0,000216	0,021600
3-6	0,000173	0,017307	0-6	0,000916	0,091600
6-24	0,000348	0,034813	0-24	0,000740	0,074000



# Rese %

# Ruta Graveolens

## C.V frazionata

## H.D continua

h	g OE/g di pianta	resa %	h	g OE/g di pianta	resa%
0-1	0,000109	0,0109	0-1	0,000059	0,0059
1-2	0,000169	0,0169	0-2	0,000109	0,0109
2-3	0,000201	0,0201	0-3	0,000610	0,0610
3-6	0,000284	0,0284	0-6	0,001238	0,1238
6-24	0,000466	0,0466	0-24	0,000719	0,0719



# Artemisia Vulgaris (144 composti ritrovati)

## Dati GC/MS

### Idrodistillazione continua

#	Compound Name	KI	0h	1h	0h	2h	0h	3h	0h	6h	0h
			↓ 1h	↓ 24h	↓ 2h	↓ 24h	↓ 3h	↓ 24h	↓ 6h	↓ 24h	
1	$\alpha$ -thujene	926									t
2	sabinene	969									t
3	<i>cis</i> -sabynene hydrate	1065	0.1			0.2	t	t	0.1	0.1	0.1
4	<i>trans</i> -sabynene hydrate	1098	0.5		0.4		t		0.6	0.3	0.3
5	<i>cis</i> -thujone	1101	3.1	0.9	1.7	0.7	t		1.7	0.2	1.1
46	$\alpha$ -copaene	1374	0.1	0.7	0.4	0.6	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3
47	$\beta$ -bourbonene	1387			0.1		t	0.1	0.1		0.1
48	$\beta$ -elemene	1389	0.1		0.2	0.2	t	0.1	0.2		0.2
49	$\beta$ -longipinene	1400				0.3					t
50	( <i>Z</i> )-caryophyllene	1408					t				
51	( <i>E</i> )-caryophyllene	1417	1.5	21.1	13.9	27.0	4.0	11.7	15.1	5.6	13
56	$\alpha$ -humulene	1452	0.3	3.9	2.8	4.9	0.9	3.8	2.8	1.9	2.6
79	spathulenol	1577	4.1	25.7	10.6	25.1	4.4	6.5	29.8	15.5	37.2
80	caryophyllene oxide	1582	19.5		17.7		11.6	21.2		25.8	
134	oleic acid	2141	T	t	t			0.1		t	t

### Corrente di vapore frazionata

0h	1h	2h	3h	6h
↓ 1h	↓ 2h	↓ 3h	↓ 6h	↓ 24h
0.1	t			
0.9	t	0.9		
5.1	t	4.8	0.6	2.1
0.9	0.4	0.8	0.5	0.6
0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
0.3	0.2	0.3	0.2	0.3
				0.3
	0.1			7.1
27.1	15.7	32.2	25.3	27.3
4.4	3.3	4.8	4.3	5.1
17.7	10.8	15.2	18.9	20.8
	14.9			
			t	



# Ruta Graveolens (110 composti ritrovati)

## Dati GC/MS

### Idrodistillazione continua

#	Compound Name	KI	0h	1h	0h	2h	0h	3h	0h	6h	0h
			↓ 1h	↓ 24h	↓ 2h	↓ 24h	↓ 3h	↓ 24h	↓ 6h	↓ 24h	
18	(E)-anethole	1282	0.1	0.1	t	t	t		0.1		
20	2-undecanone	1293	3.5	8.9	9.7	8.1	7.2	1.6	7.5	6.4	7.4
21	carvacrol	1298	0.5								
22	2-undecanol	1301	22.4	12.1	15.5	11.7	12.3	4	20.2		19.5
35	dodecanal	1420	7.5	16	17.2	17.9	17.8	14.1	8.9	7.7	18.6
36	dictamnol	1428	1.9	0.6	0.7	t	t	t	1		0.8
37	geranyl acetone	1459	3.1	6.8	7.2	7.6	8.4	8.5	4	1.9	7.7
38	γ-decalactone	1465	2.2	4	4	4.2	4.2	4.4	2.6	3.9	4.5
65	geranyl valerate	1640	6.1	9.6	10.9	13.2	15.3	25.4	6.4	25.1	9.5
66	3-butyl phthalide	1647	1.9						1.9		
67	β-eudesmol	1649		t	t	0.2	t	t			t
68	(Z)-dodecan-γ-lactone	1651	3	6.6	7	8.4	7.1	12.5	2.9	35.6	7.5

### Corrente di vapore frazionata

0h	1h	2h	3h	6h
↓ 1h	↓ 2h	↓ 3h	↓ 6h	↓ 24h
0.3	t	0.2	0.1	0.1
14.3	10.3	14.4	12.3	14
25.8	11.8	19.1	14.7	10.9
8.6	20.6	14.2	17.9	21.8
0.2	t	0.4	0.6	0.3
7.4	7.7	6.3	6.3	7.1
4.4	4.2	3.6	3.6	3.6
5.6	10.2	7.5	9.1	7.9
t	t			
4.5	6.2	4.8	5.1	4.3

# Attività anti-candida albicans

CAMPIONE	MIC mg/ml	MIC mg/ml
<b>Achillea Millefolium (AM)</b>	24h	48h
AM frazionato 1h	12,48	12,48
AM frazionato 2h	12,48	12,48
AM frazionato 3h	12,48	12,48
AM frazionato 6h	12,48	12,48
AM frazionato 24h	-	-
AM continuo 1h di 24h	12,48	12,48
AM continuo 2h di 24h	12,48	12,48
AM continuo 3h di 24h	12,48	-
AM continuo 6h di 24h	12,48	-
AM continuo 24h di 24h	12,48	12,48
AM continuo 24h di 1h	-	-
AM continuo 24h di 2h	12,48	12,48
AM continuo 24h di 3h	-	-
AM continuo 24h di 6h	-	-

CAMPIONE	MIC mg/ml	MIC mg/ml
<b>Artemisia Vulgaris L. (AV)</b>	24h	48h
AV frazionato 1h	12,48	12,48
AV frazionato 2h	12,48	12,48
AV frazionato 3h	12,48	12,48
AV frazionato 6h	12,48	-
AV frazionato 24h	-	-
AV continuo 1h di 24h	3,12	3,12
AV continuo 2h di 24h	12,48	-
AV continuo 3h di 24h	12,48	12,48
AV continuo 6h di 24h	12,48	12,48
AV continuo 24h di 24h	12,48	-
AV continuo 24h di 1h	-	-
AV continuo 24h di 2h	-	-
AV continuo 24h di 3h	-	-
AV continuo 24h di 6h	-	-

# Conclusioni

- **Apprendimento delle due tecniche**
- **Rese e durate di un' estrazione ottimale diverse da pianta a pianta**
- **Composizione chimica e attività antimicrobica variabili in base agli intervalli di separazione**
- **Le due tecniche utilizzate in modo continuo e frazionato non sono sovrapponibili**

# Ringraziamenti

- Professore Rino Ragno
- Professore Marco Franceschin
- Dottoressa Manuela Sabatino e il Dottor Mijat Bozovic
- Professore Andrea D' Annibale e Professor Armandodoriano Bianco
- Professoressa Alessandra Oliva, Università La Sapienza
- Professoressa Stefania Garzoli, Università La Sapienza
- Professoressa Vanja Tadic, Belgrado
- Professore Stefano Manfredini, Università di Ferrara
- Azienda Minardi & figli s.r.l

A row of six clear glass bottles sits on a light-colored wooden surface. Each bottle contains a different fresh herb. From left to right: the first bottle has a sprig of sage; the second has rosemary; the third has basil; the fourth has lavender with small purple flowers; the fifth has another variety of basil with a purple stem; and the sixth has a leafy green herb, possibly parsley. The background is a blurred wooden wall.

**Grazie per l'attenzione**