

# **“Estrazione di oli essenziali e idrolati e loro valutazione dell’attività antifitovirale su tomato leaf curl New Delhi virus”.**



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Facoltà di Farmacia e Medicina**  
**Corso di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche**  
**Tesi Sperimentale in Chimica Farmaceutica**  
**a.a. 2020/2021**

**Laureanda: Di Massimo Gaia**  
**Matricola: 1529145**

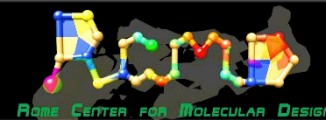
**Relatore: prof. Rino Ragno**  
**Correlatore: Dott.ssa Anna Taglienti**



- ❖ **Distillazione in corrente di vapore con metodo in continuo e idrodistillazione di piante officinali: successiva valutazione delle Rese ottenute.**
- ❖ **Valutazione dell'attività antifitovirale in vivo, di OE e idrolati, estratti da *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Rosmarinus officinalis*, nei confronti del ToLCNDV.**



# CHE COSA SONO GLI OLI ESSENZIALI?



- ❖ **Miscele di molecole organiche volatili.**
- ❖ **Insolubili o scarsamente solubili in  $H_2O$ .**
- ❖ **Liquidi a temperatura ambiente.**
- ❖ **Aroma intenso.**





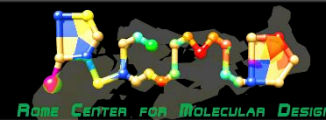
# GLI IDROLATI

- ❖ **Costituiti dall'acqua di condensazione del processo di estrazione.**
- ❖ **Contengono la maggior parte dei principi volatili presenti nella pianta da cui originano.**
- ❖ **Per anni considerati dei prodotti di scarto.**





# DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE METODO IN CONTINUO



## ❖ STRUMENTAZIONE.

### ❖ Materiale vegetale sottoposto alla metodologia estrattiva:

*Laurus nobilis, Salvia officinalis, Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis, Origanum majorana, Mentha piperita, Mentha suaveolens.*





## ❖ STRUMENTAZIONE.

### ❖ Materiale vegetale sottoposto alla metodologia estrattiva:

*Poncirus trifoliata*, *Anethum graveolens*.





# SEPARAZIONE DEI DISTILLATI IN OLI ESSENZIALI E IDROLATI

Solfato di  
sodio  
anidro  
( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

Imbuto  
separatore

Etere  
dietilico





## ❖ INOCULO DEL VIRUS:

*Macerato ToLCNDV (1:5) in  
tampone fosfato + celite.*

## ❖ INCUBAZIONE:

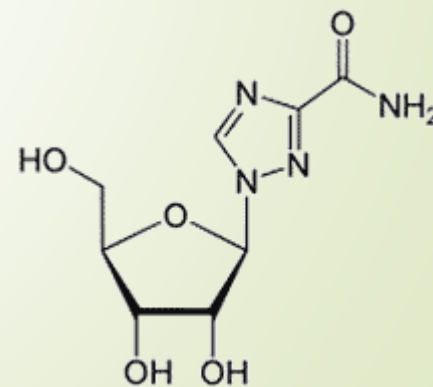
*5 h.*

## ❖ TRATTAMENTO

*con OE&Idrolati.*



**Ribavirina**





## ❖ PRELIEVO DEI DISCHETTI FOGLIARI.

### ❖ 1° prelievo.



### ❖ 4° prelievo.





- ❖ *DNeasy "Mericon" FOOD kit (Qiagen).*
- ❖ *Rottura parete cellulare vegetale.*
- ❖ *Estrazione acidi nucleici totali (DNA e RNA).*



- ❖ **Retro-trascrizione per ottenere cDNA.**
- ❖ **Termociclatore: ciclo di reazione a 42° per 45min; 94° per 3min.**
- ❖ **Infine, trattamento con RNAasi.**

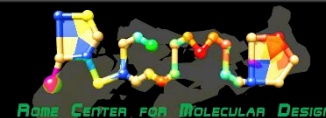
| REAGENTI         | QUANTITA' |
|------------------|-----------|
| H <sub>2</sub> O | 9,5 ul    |
| M-MLV<br>buffer  | 4,0 ul    |
| dNTPS            | 2,0 ul    |
| Random Primers   | 1,0 ul    |
| M-MLV RT         | 0,5 ul    |

| REAGENTI                                                     | QUANTITA'   |
|--------------------------------------------------------------|-------------|
| 2X TaqMan Universal PCR<br>MasterMix<br>(Applied Biosystems) | 10 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O                                             | 7,7 $\mu$ l |
| Primer F                                                     | 0,1 $\mu$ l |
| Primer R                                                     | 0,1 $\mu$ l |
| Probe (sonda)                                                | 0,1 $\mu$ l |
| DNA                                                          | 2,0 $\mu$ l |

- ❖ Termociclatore CFX96 Real-Time System.
- ❖ Ciclo termico di amplificazione: incubazione a 95°C per 10 minuti, 40 cicli da 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C.



# Real Time-PCR PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL GENE DI TOLLERANZA PAL.



13

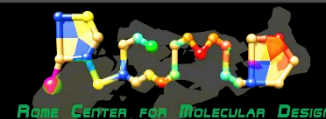
- ❖ Fenilalanina ammonia liasi (PAL).
- ❖ Saggio in SYBR Green.
- ❖ Primer Mix da 100 campioni.
- ❖ Miscela di Reazione.
- ❖ Termociclatore CFX96 Real Time System.

| Primer Mix       | Quantità |
|------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O | 3,70 ul  |
| Primer 5'        | 0,15 ul  |
| Primer 3'        | 0,15 ul  |

| Mix         | Quantità |
|-------------|----------|
| iQ supermix | 5 ul     |
| Primer mix  | 4 ul     |
| DNA         | 1 ul     |



# RISULTATI DELLA DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE METODO IN CONTINUO.

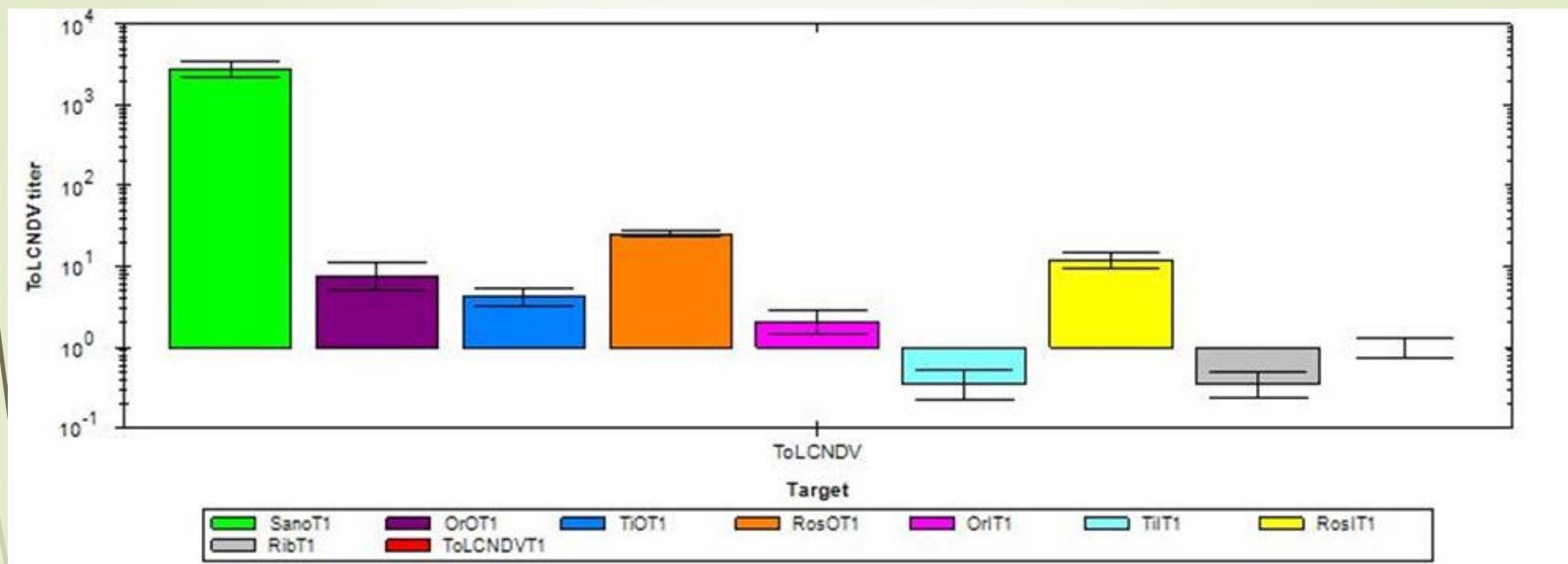


14

| PIANTA                        | PESO PIANTA g | PESO OE g | RESA % |
|-------------------------------|---------------|-----------|--------|
| <i>Laurus nobilis</i>         | 3000          | 1,37      | 0,04   |
| <i>Laurus nobilis</i>         | 3000          | 0,48      | 0,02   |
| <i>Laurus nobilis</i>         | 3000          | 0,32      | 0,01   |
| <i>Laurus nobilis</i>         | 3200          | 2,53      | 0,08   |
| <i>Laurus nobilis</i>         | 4000          | 2,31      | 0,06   |
|                               |               |           |        |
| <i>Mentha piperita</i>        | 2000          | 10,41     | 0,52   |
| <i>Mentha suaveolens</i>      | 3000          | 1,52      | 0,05   |
| <i>Mentha suaveolens</i>      | 3000          | 0,59      | 0,02   |
| <i>Origanum majorana</i>      | 2000          | 6,14      | 0,31   |
| <i>Origanum vulgare</i>       | 2000          | 6,97      | 3,48   |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 2000          | 8,68      | 0,43   |
| <i>Salvia officinalis</i>     | 2000          | 4,35      | 0,22   |
| <i>Thymus vulgaris</i>        | 2000          | 5,16      | 0,26   |

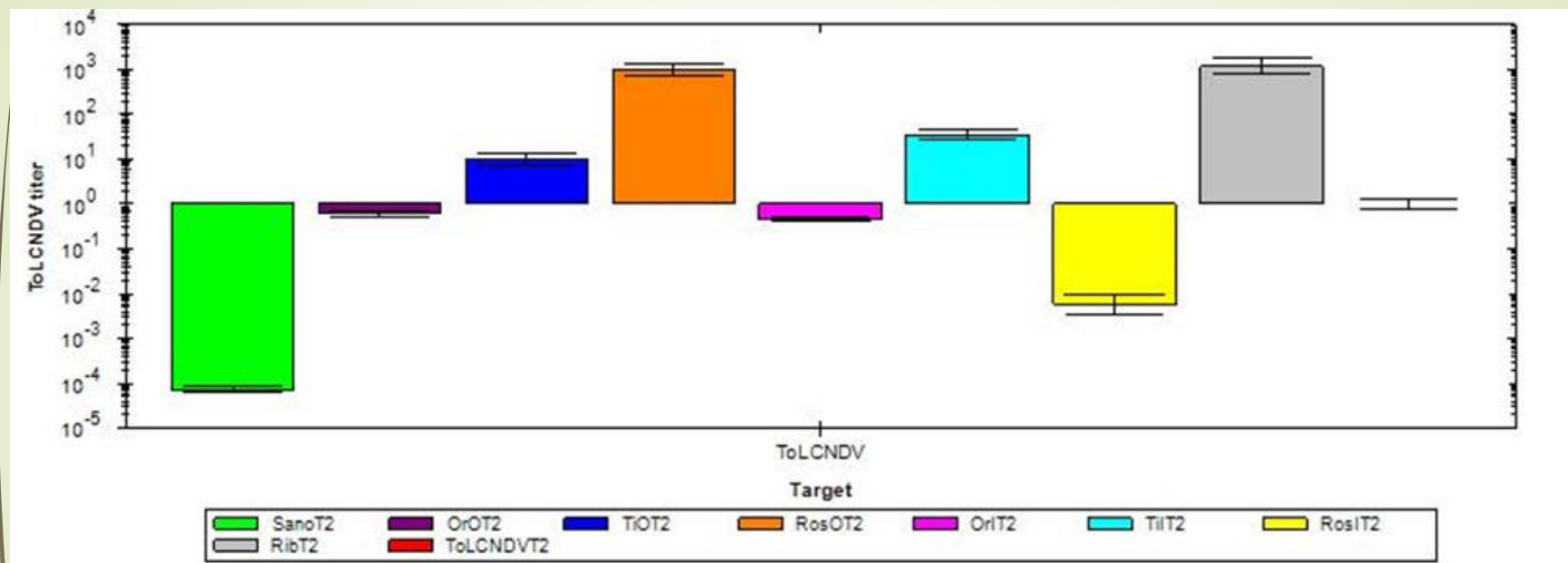
| PIANTA                     | PESO PIANTA g | PESO OE grammi | RESA % |
|----------------------------|---------------|----------------|--------|
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 50            | 0,15           | 0,30   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 50            | 0,10           | 0,20   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 75            | 0,09           | 0,12   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 100           | 0,02           | 0,20   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 150           | 0,18           | 0,12   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 200           | 0,34           | 0,17   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 200           | 0,12           | 0,10   |
| <i>Poncirus trifoliata</i> | 200           | 1,07           | 0,53   |
|                            |               |                |        |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,29           | 2,29   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,42           | 2,42   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,07           | 2,07   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 3,21           | 3,21   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,78           | 2,78   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,24           | 2,24   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,36           | 2,36   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,50           | 2,50   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,35           | 2,35   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,31           | 2,31   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,20           | 2,20   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,70           | 2,70   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 3,74           | 3,74   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 3,14           | 3,14   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 5,31           | 5,31   |
| <i>Anethum graveolens</i>  | 100           | 2,05           | 2,05   |

# RISULTATI: riduzione del titolo virale



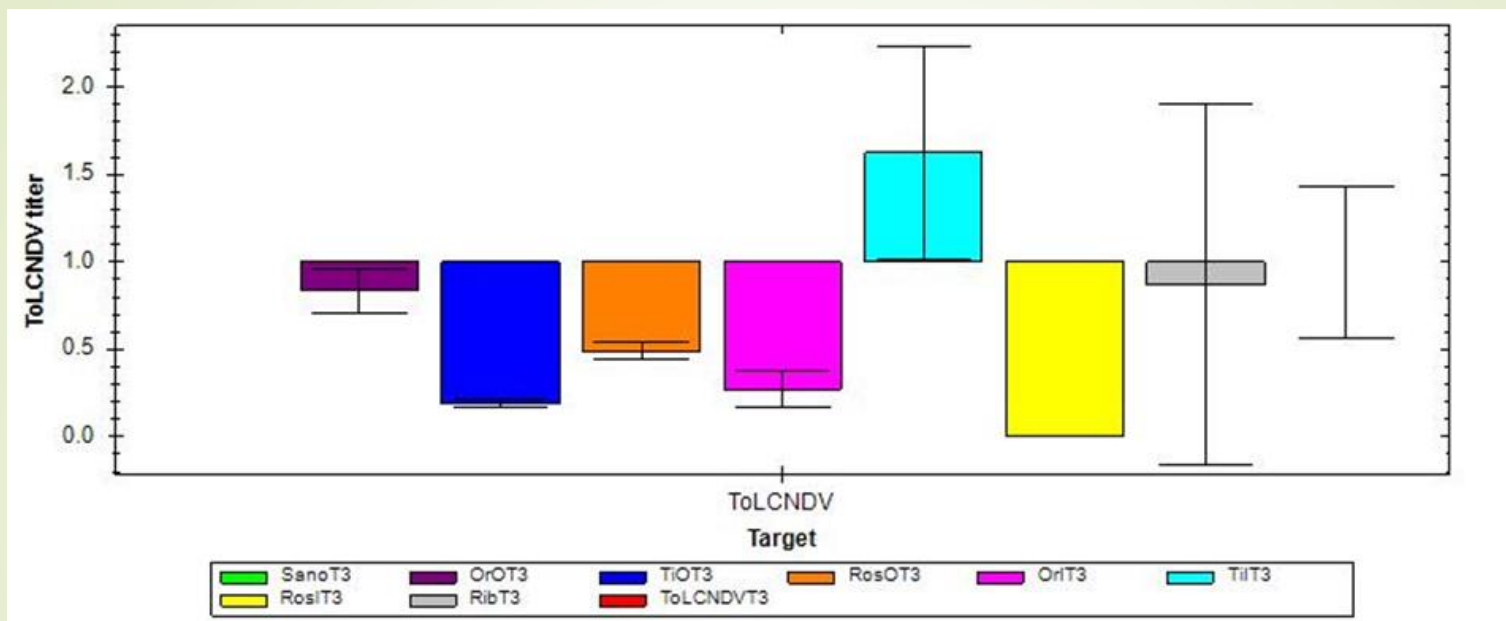
- ❖ I grafici sono stati costruiti utilizzando il metodo del  $\Delta\text{-}\Delta\text{Ct}$ .
- ❖ Tempo T1.
- ❖ Riduzione in Timo Idrolato (colonna celeste).

# RISULTATI: riduzione del titolo virale



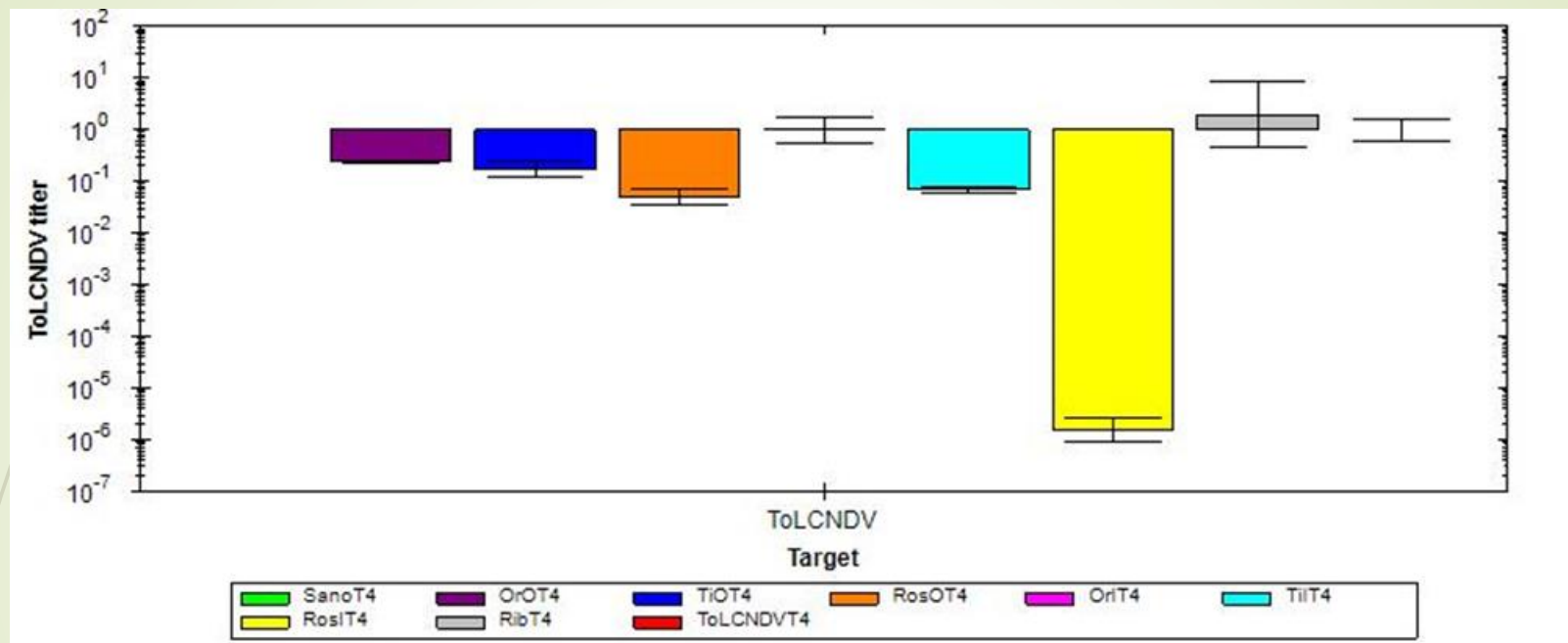
- ❖ Tempo T2.
- ❖ Rosmarino Idrolato (colorato in giallo).
- ❖ Origano olio (viola scuro).
- ❖ Origano idrolato (colorato in rosa).

# RISULTATI: riduzione del titolo virale



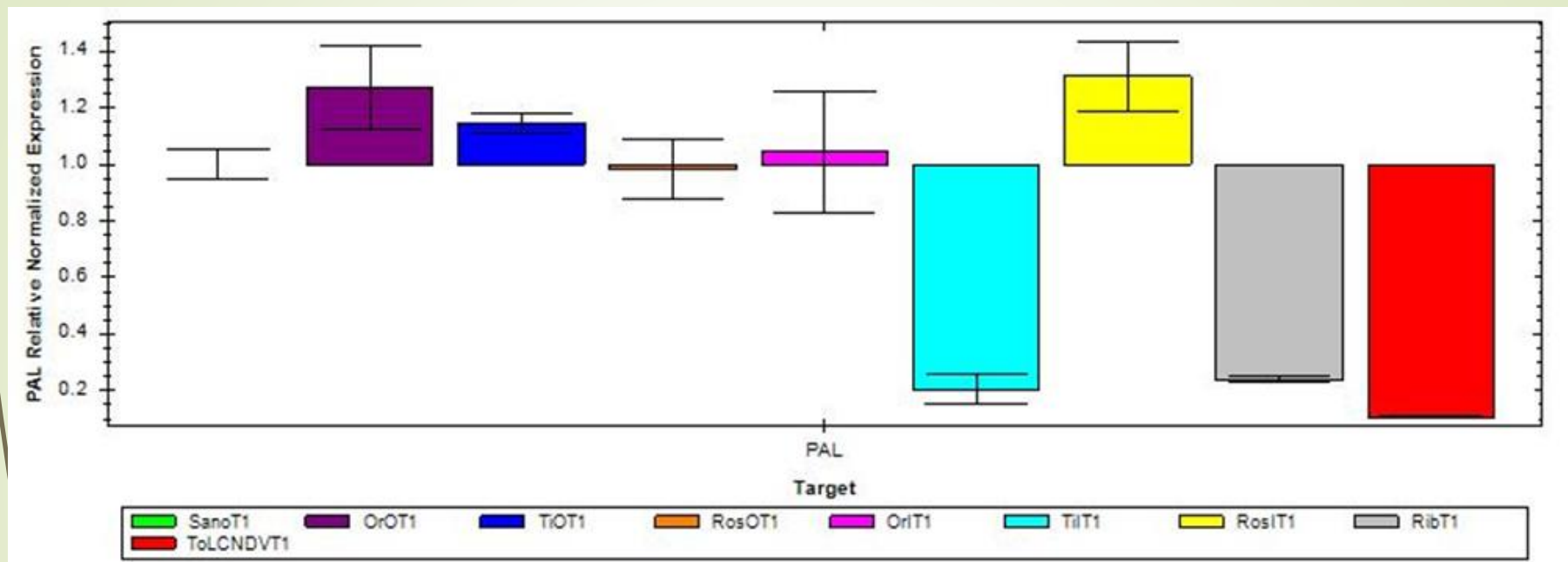
- ❖ Tempo T3.
- ❖ Origano Olio → riduzione lieve.
- ❖ Timo Olio, Rosmarino Olio, e Origano Idrolato, Rosmarino Idrolato → riduzioni più marcate.

# RISULTATI: riduzione del titolo virale



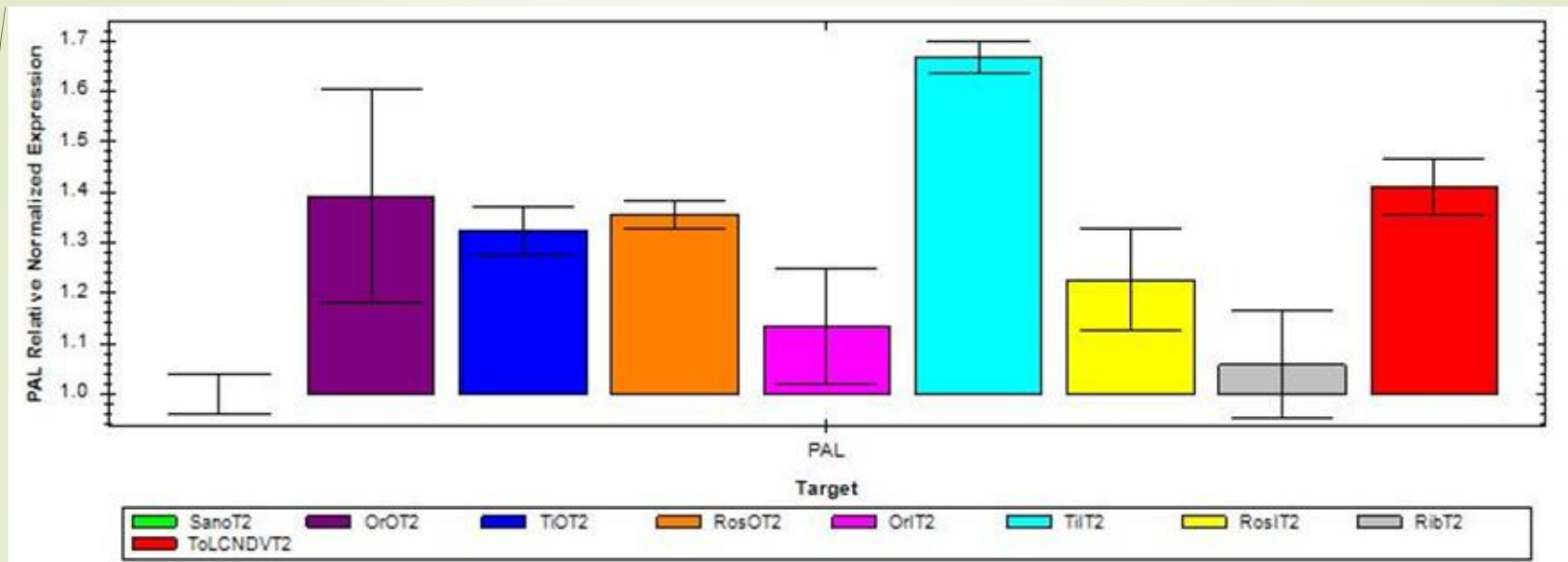
- ❖ **Tempo T4.**
- ❖ **Rosmarino Idrolato riduzione ancora presente.**
- ❖ **Altre riduzioni sono di minore entità.**

# RISULTATI: ESPRESSIONE DEL GENE DI TOLLERANZA PAL.



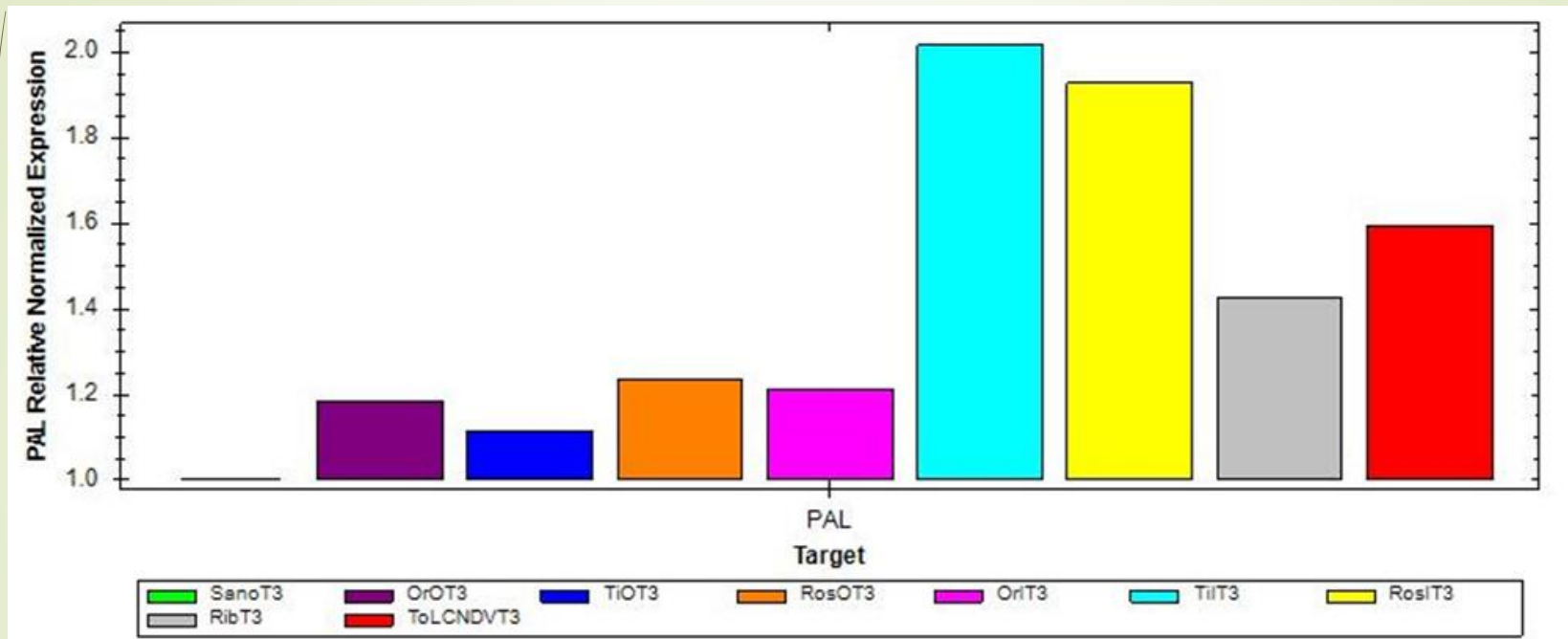
- ❖ Tempo T1.
- ❖ Origano Olio → 20%
- ❖ Rosmarino Idrolato → 30%

# RISULTATI: ESPRESSIONE DEL GENE DI TOLLERANZA PAL.



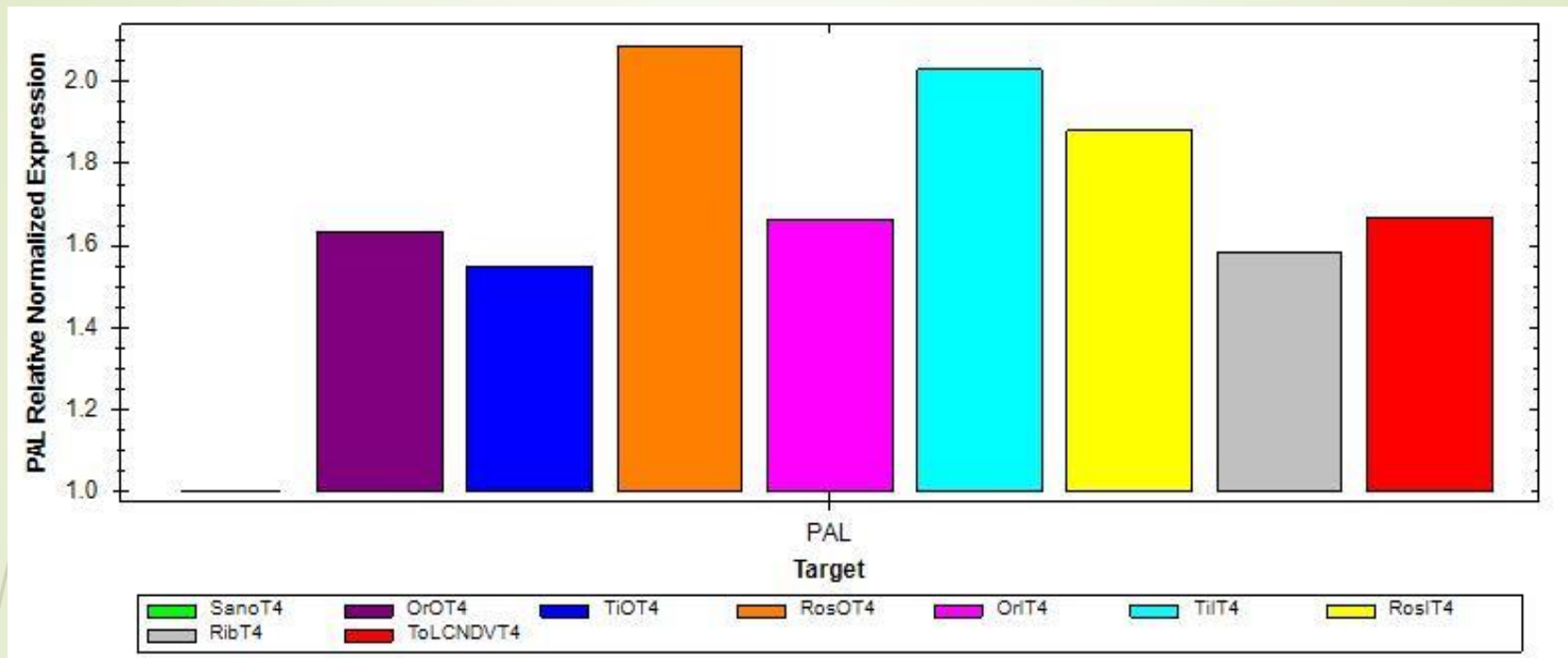
- ❖ Tempo T2.
- ❖ Timo Idrolato registra l'aumento di espressione maggiore (60%).

# RISULTATI: ESPRESSIONE DEL GENE DI TOLLERANZA PAL.



- ❖ Tempo T3.
- ❖ Andamento ancora crescente dell'espressione di PAL: in particolare per Timo Idrolato e Rosmarino Idrolato.

# RISULTATI: ESPRESSIONE DEL GENE DI TOLLERANZA PAL.



- ❖ Tempo T4.
- ❖ Espressione aumentata in tutte le tesi.
- ❖ «Rimonta» della tesi trattata con Rosmarino Olio



- ❖ **Distillazione in corrente di vapore in continuo è una tecnica di estrazione più efficiente rispetto a quella a ricircolo.**
- ❖ **Potenziale efficacia di Oli e Idrolati.**
- ❖ **PROSPETTIVE FUTURE: individuare un target (proteina o gene) su cui Oli e Idrolati agiscano in maniera specifica e dunque ipotizzare un meccanismo di azione.**

25

- ❖ Il Prof. Rino Ragno
- ❖ La Dott.ssa Anna Taglienti
- ❖ La Dott.ssa Livia Donati
- ❖ Il Dott. Filippo Sapienza
  
- ❖ CREA-DC
- ❖ Centro Appenninico Carlo Jucci
- ❖ Tutti i miei colleghi e amici.

## Welcome To PyEO

Explore thousand of essential oils based on  
hundreds of publications

Explore

[eo.3d-qsar.com](http://eo.3d-qsar.com)