

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIE
FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

ESTRAZIONE E ANALISI DI COMPOSTI VOLATILI DA MATRICI NATURALI

Relatore
Chia.mo Prof. Stefano Dall'Acqua

Laureando
Mazzucato Alberto
n. 114151

Anno accademico 2022/2023

Acronimi

MEP Via metabolica del metileritritolo fosfato

MVA Via metabolica dell'acido mevalonico farnesyl pyrophosphate

FPP Farnesyl pyrophosphate

IPP Isopentenyl pyrophosphate

DMAPP Dimethylallyl pyrophosphate

ESI Electrospray ionization

IT Ion trap - Trappola ionica

MW Molecular weight - Peso molecolare

TIC Total ion current

TQD Triple quadrupole detector - Detector triplo quadrupolo

NMR Nuclear magnetic resonance

Indice

1. INTRODUZIONE

- 1.1. Oli essenziali
- 1.2. Composizione chimica
- 1.3. Variabilità negli oli essenziali
- 1.4. Gli oli essenziali nel regno vegetale

2. MATRICI NATURALI

- 2.1. Mirra
- 2.2. Cipolla

3. CONTROLLO QUALITÀ OLI ESSENZIALI

- 3.1. Ottenimento oli essenziali
- 3.2. Analisi e controllo qualità

4. USI E TRADIZIONI OLI ESSENZIALI

- 4.1. Commiphora myrrha
- 4.2. Allium Cepa L.

5. SCOPO DELLA TESI

6. MATERIALI E METODI

- 6.1. Materiale per le analisi
- 6.2. Solventi e composti chimici
- 6.3. Strumentazioni e metodi (GC-MS; GC-FID, NMR)
- 6.4. Preparazione soluzioni standard e campioni

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

8. CONCLUSIONI

Bibliografia

Premessa

L'utilizzo delle piante come fonti di sostanze attive e medicinali è uno dei più antichi sistemi di cura e terapia noto dall'uomo. Moltissimi composti anche oggi ampiamente utilizzati in terapia derivano da fonti naturali, e molti di questi derivano dalle piante. I composti di origine vegetale che presentano significative attività biologiche sono spesso appartenenti ai cosiddetti metaboliti secondari, sostanze che le piante producono per la loro vita di relazione con altri organismi, con patogeni e fitofagi, per rispondere a stress ambientali o biologici. Fra le molte tipologie di composti sintetizzati dalle piante, gli oli essenziali si ritiene abbiano un importante ruolo di protezione. Inoltre, hanno la capacità di attrarre specifici impollinatori e scacciare insetti dannosi per i fiori o costituenti integranti del vegetale. Gli oli essenziali hanno anche un ruolo importante per l'integrazione della pianta con ciò che la circonda.(Bakkali et al., 2008) Questi metaboliti secondari, sono prodotti da piante aromatiche nei fiori, bulbi, cortecce o rami e immagazzinati nelle cellule secretorie, cavità, canali, tricomi ghiandolari o nelle cellule epidermiche. Sono una miscela variabile costituita principalmente da terpenoidi, specialmente monoterpeni (C10) e sesquiterpeni (C15) ma anche diterpeni (C20) potrebbero essere presenti. Non solamente le citate classi sono presenti, si possono trovare anche acidi, alcoli, aldeidi, idrocarburi alifatici, esteri aciclici e lattoni. Più raramente si possono trovare composti Azotati e Solforati, cumarine e omologhi dei fenilpropanoidi. Gli oli essenziali sono liquidi, volatili, limpidi e colorati solubili in solvente organico e lipidico. Generalmente vengono estratti da una grande varietà di droghe vegetali, presenti nei suoli temperati e laddove rappresentano un importante ruolo nella farmacopea tradizionale. Vengono attribuite a queste piante aromatiche attività anti-ossidanti così come attività antisettiche, e vengono utilizzate perciò come conservanti di prodotti edibili oppure in ambiente farmaceutico come sedativi, anti infiammatori, spasmolitiche e anestetici locali; oltre al utilizzo più comune di semplici aromi.(Burt & Reinders, 2003; De Martino et al., 2009; Trombetta et al., 2005)

Capitolo 1

1) Introduzione

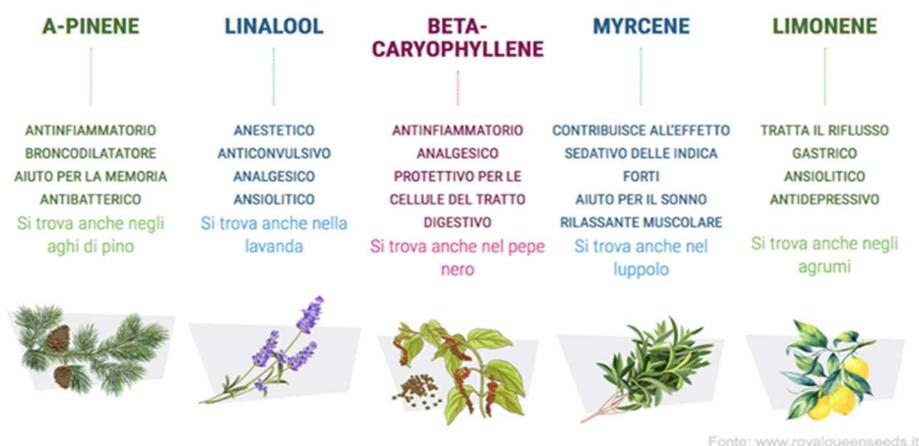
1.1. Oli essenziali

Gli oli essenziali sono sostanze odorose e altamente volatili, presenti nelle piante. Vengono ottenuti tramite distillazione in corrente di vapore, idro-distillazione di materiale vegetale aromatico. Ci sono varie definizioni di olio essenziale, ma la più accurata è quella proposta da Schilcher, Hegnauer and Cohn-Riechter: “Gli oli essenziali sono uno o insieme di sostanze, che sono formate nel citoplasma e sono presenti in forma di piccole goccioline tra le cellule. Sono volatile e aromatiche”. Possono essere composti da “tutte sostanze singolarmente odorose oppure alcune molte odore insieme ad altre molto meno”, dove la sostanza odorosa è definita come sostanza pura volatile, in condizioni normali, e il suo aroma può essere utile a scopi aromatizzanti. Per queste motivazioni, la International Organization for Standardization (ISO) ha definito gli oli essenziali come “prodotti ottenuti da matrici naturali grezze della pianta di origine, attraverso distillazione a corrente di vapore, processi meccanici su epicarpo di frutti Citrus o attraverso la distillazione secca, dopo aver separato l’acqua con processi fisici”. Fermo restante sulla definizione generale data e accolta da tutta la comunità mondiale, società e compagnie hanno stabilito i loro criteri di concezione e qualità. Per esempio, Generally Recognized As Safe, Fragrance Materials Association e International Fragrance Association. Quest’ultima, ad esempio, si basa sul GHS Labelling Manual, consultabile solo dai soci IFRA e IOFI, e tratta tematiche riguardanti la classificazione ed etichettatura dei pericoli per fragranze e materiali aromatici.(Turek & Stintzing, 2013) Come precedentemente detto, sono complesse miscele, solitamente formate da componenti liquidi oppure raramente solidi. Generalmente a temperatura ambiente, appena distillati, si presentano incolori trasparenti fino ad essere debolmente gialli e dall’odore caratteristico della pianta di partenza. Al contrario degli oli vegetali, animali o minerali una goccia di olio essenziale su di un foglio di carta viene assorbito istantaneamente. Solitamente gli oli essenziali hanno densità minore dell’acqua fatta eccezione per gli oli di sassofrasso, cannella e chiodi di garofano. Vengono caratterizzati da una bassa solubilità in acqua, ma sono molto solubili nei più comuni solventi organici come Etanolo e Metanolo. Gli oli essenziali hanno un alto indice di rifrazione e potere ottico, caratteristiche essenziali per il controllo qualità.

1.2. Composizione chimica

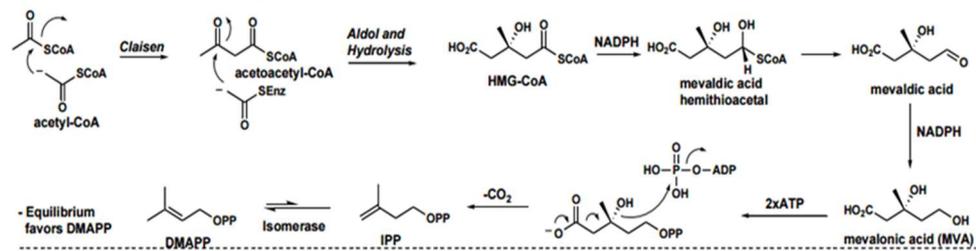
I Monoterpeni sono un gruppo di composti derivato da isoprene (isoprenoidi). Piante aromatiche, ricche in composti volatili sono da lungo tempo state utilizzate in rituali religiosi, disinfettare l’ambiente casalingo, essenze aromatiche o prime rudimentali preparazioni farmaceutiche. Per estrarli si usano per lo più solventi organici, poche volte diluiti in acqua. I veicoli più utilizzati sono: alcol etilico, etere e vino. Tali soluzioni possono dare al paziente sensazioni di “ebrezza”, caratteristica non voluta

dalle persone sottoposte a tale trattamento.(Wojtunik-Kulesza et al., 2019) Le vie di sintesi di tali metaboliti secondari sono condizionate dalla risposta, da parte della pianta, a situazioni di stress biotici e/o abiotici.(PENUELAS & MUNNEBOSCH, 2005)

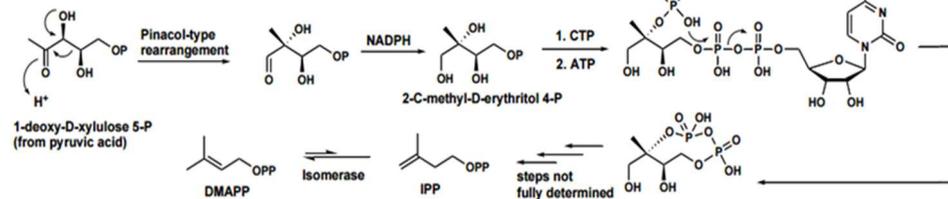


Inoltre, tutte le piante possiedono una forma di meccanismo conservativo per dissipare l'energia liberata durante il processo fotosintetico.(A. Maggio, S. Rosselli, M. Bruno, 2016) Questo meccanismo conservativo coinvolge tali isoprenoidi, come i carotenoidi ed i tocoferoli. Sesquiterpeni e mono-terpeni sono la sottoclasse dei terpeni più abbondanti negli oli essenziali, derivati da piante aromatiche, utilizzati in profumeria.(D'Onofrio et al., 2009) Questi composti aromatici-attivi sono conosciuti per essere presenti in molte specie di piante. Per esempio, *rotundone*, sesquiterpene biciclico ossigenato contenuto nel tubero del *Cyperus rotundus*, è stato anche identificato come il responsabile del caratteristico sentore di "pepe nero" nel vino *Shiraz* e dal vitigno da cui deriva.(Wood et al., 2008) La biosintesi principale, da cui derivano mono- e sesquiterpeni, è la via dell'acido mevalonico (**MVA**). I terpeni possono anche essere prodotti da una via biosintetica diversa, partendo dai triosofosfati ed è chiamata via del deossixilulosio 5-fosfato (**MEP**). Esistono diverse sottoclassi: sesquiterpeni aciclici, piccolo gruppo di molecole; sesquiterpeni monociclici, con scheletro carbonioso ricondotto al bisobolano e germacrene; sesquiterpeni biciclici, rappresenta un largo gruppo basato sullo scheletro carbonioso di eudesmane e guaiane. Questa classe di composti ha come precursore il **FPP**. **FPP** è il prodotto di condensazione di due isomeri a cinque-carboni, **IPP** e **DMAPP**, tale reazione catalizzata da **FPPS**.(Zhang et al., 2016) **IPP** e **DMAPP** possono essere sintetizzati tramite due vie: **MEP** pathway, nei plastidi, e **MVA** pathway, nel citosol della pianta.(Ikram et al., 2015) La via **MVA** è considerata la maggior produttrice di **IPP** e **DMAPP** per la produzione di sesquiterpeni. Sono considerati anche altri tre diversi pathway di sintesi: Carbocatione humulele pathway (Davis, E. M., & Croteau, R., 2000), ciclizzazione aciclica pathway,(Durairaj et al., 2019) catione germacrenedil pathway(Durairaj et al., 2019) e germacrene A pathway. (Davis, E. M., & Croteau, R.,2000) Generalmente il profumo, che i sesquiterpeni danno al vegetale, è tendente al balsamico, piccante e aroma ligneo.(Slaghenaufi, D., & Ugliano, M., 2018)

The Chemistry of the Mevalonate Pathway:



The Chemistry of the Deoxyxylulose Pathway:



1.3. Variabilità negli oli essenziali

Più di 40000 differenti oli essenziali sono stati catalogati, (Yu & Utsumi, 2009) di questi più di 300 sono usati in ambito commerciale come essenze e fragranze. La grande variabilità di composizione chimica nelle piante aromatiche, rende la produzione di tali oli una sfida difficile per le industrie di tale settore, infatti la ricerca sta progredendo verso la scoperta di quali fattori contribuiscono alla sintesi, oltre alla componente genetica, di tali molecole. Questa ricerca ha portato a distinguere diverse famiglie nella stessa specie. Alcuni esempi sono Timo (*Thymus vulgaris*), Citronella (*Melissa officinalis*), Canfora (*Cinnamomum camphora*) e la Menta (*Mentha piperita*) le quali sono state protagoniste di ricerche accurate nei diversi metaboliti secondari bioattivi. I cambiamenti chemiotipici da parte di una droga vegetale è strettamente correlato all'ambiente in cui la pianta si trova a crescere, condizioni climatiche e origine geografica. (Mockute & Bernotiene, 2001)

1.4. Oli essenziali nel regno vegetale

Gli oli essenziali sono prodotti solitamente come metaboliti secondari dagli organi predisposti delle piante. Nella maggior parte dei casi vengono confinati in cellule non differenziate o organi secretori, quali peli ghiandolari, condotti secretori o cavità. In alcuni casi la sintesi non avviene proprio dalla pianta, ma tramite idrolisi chimica dei precursori neoformati. Un esempio sono i tiosolfati presenti nella cipolla formati da idrolisi enzimatica, quando la cipolla viene tagliata o bollita, il precursore viene rilasciato ed è libero di interagire con l'enzima libero nei vacuoli delle cellule aderenti, avvenuta tale interazione si ha per idrolisi la formazione di vari intermedi reattivi che condensandosi danno origine ai tiosulfinati. (Yoshimoto et al., 2015) In funzione della loro locazione geografica, possono essere sintetizzati dal vegetale in tutte le sue parti costituenti, quali: fiori dove è più frequente trovarne la maggior quantità, foglie, steli come per camomilla e lavanda, corteccia, frutti, semi e molto spesso nelle radici e rizomi come avviene per lo zenzero e curcuma. (Hyldgaard et al., 2012) Gli oli essenziali hanno disparati ruoli nei vegetali, come ad esempio l'incentivare l'impollinazione, migliorare la difesa, agendo come repellenti, irritanti, antifungini e antibatterici. Oltretutto lo studio sull'azione antiossidante da parte di

questi come donatori di idrogeno, specialmente in presenza di luce, è ancora motivo di ricerca.(Amorati et al., 2013)



2) Matrici naturali

2.1. Cipolle, *Allium Cepa L.*

La classificazione delle cipolle avviene principalmente sulla base della colorazione esterna del bulbo, che può essere bianco, dorato-ambrato o violaceo. Questa suddivisione fa sì che le cipolle vengano classificate grossolanamente in: cipolle bianche, cipolle gialle o dorate, cipolle rosse. Oltre che per la colorazione, vengono classificate in relazione al loro periodo di semina e di raccolta. In Italia vengono coltivate circa venti varietà tra le diverse cipolle, trovando differenze in forma, dimensione, consistenza e sapori diversi. Ogni tipo di cipolla risulta quindi più o meno adatta al consumo da crudo o cotta e a differenti metodi di cottura. Le cipolle a bulbo bianco hanno generalmente un sapore più forte e pungente rispetto ad altre varietà. Cipolle a bulbo giallo o dorato sono le più versatili. Hanno sapore deciso ma meno pungente rispetto alle bianche, si possono consumare anche crude. Le cipolle rosse sono la varietà più apprezzata, sia per le proprietà date dal contenuto di antociani che per il loro sapore delicato, soprattutto da fresche. Le diverse varietà in Italia sono: cipolla rossa di Cavasso Nuovo, cipolla rossa di Tropea, cipolla di Pignone, cipolla di Acquaviva e cipolla di Chioggia.

2.2. Mirra, *Commyphora myrrha*

La mirra è una resina prodotta da arbusti spinosi appartenente al genere *Commyphora* varietà *mirrha*. Appartenente alla famiglia botanica delle *Burseraceae*. È presente sia nella regione orientale dell'Africa, come Somalia, Eritrea, Etiopia, sia in Sud Arabia, Yemen ed Oman. Il suo nome sembra derivi in origine dal semitico *m-r-r* che significa amaro, dal sapore che rilascia in bocca. La mirra viene raccolta nei luoghi di produzione tutto l'anno tranne che nei mesi più caldi, il periodo che va da giugno a settembre. Per aumentare la resa di produzione naturale, i raccoglitori praticano incisioni su tutta la pianta, dalle radici ai rami più alti. La resina essudata dal tronco viene raccolta dopo tre settimane, quando è ben solidificata e facilmente staccabile, successivamente viene lasciata maturare per tre mesi per completarne l'indurimento. Inizialmente di colore giallastro, con il tempo la resina assume un colore tendente al marrone scuro.

3) Controllo qualità oli essenziali

3.1. Ottenimento degli oli essenziali

Il metodo tradizionale per ottenere gli oli essenziali da materiale vegetale è la distillazione. Durante la distillazione, le piante profumate esposte ad acqua bollente o vapore acqueo, rilasciano la loro componente aromatica volatile mediante evaporazione. Il recupero dell'olio essenziale è facilitato dall'immiscibilità dei due liquidi ottenuti a fine processo. Il vapore acqueo, carico di olio essenziale, passa attraverso un condensatore, tenuto refrigerato. L'olio e l'acqua, una volta condensati e raccolti in una beuta, vengono separati e distillazione e separazione viene operata negli apparati Clevenger. La quantità di olio essenziale ottenibile è governata da quattro principali criteri: in quanto tempo avviene la distillazione, la temperatura, la pressione operativa e, la più importante, le caratteristiche della pianta di partenza. Tipicamente, la quantità di olio ottenuta è tra lo 0,005 e 10%. Storicamente, sono utilizzati tre metodi di distillazione: idro-distillazione, distillazione in corrente di vapore e distillazione combinando acqua e vapore. L'idro-distillazione è solitamente chiamata distillazione a vapore "indiretta". In questo metodo, il materiale vegetale è immerso nell'acqua e portato ad ebollizione. Il vapore risultante dall'evaporazione dell'acqua porta con sé la componente volatile della pianta. Successivamente, il raffreddamento e conseguente condensazione della miscela porta a separare fisicamente le due componenti. Esclusa la lentezza del metodo, i disavvantaggi di questa tecnica è il deterioramento della parte vegetale sottoposta a continuo riscaldamento. Nel metodo in cui si combina acqua e vapore acqueo, le foglie della pianta sottoposta a distillazione sono poste in una griglia sopra all'acqua calda, permettendo al vapore di passare attraverso la massa vegetale. Le foglie devono essere accuratamente distribuite sulla griglia per consentire una vaporizzazione uniforme e un'estrazione accurata. La distillazione "diretta" con vapore è il metodo più comune utilizzato per ottenere gli oli essenziali. In questo processo non viene utilizzata acqua come mezzo veicolante, ma vapore prodotto da una fonte esterna. L'olio essenziale viene rilasciato dalle piante quando il vapore irrompe nei compartimenti in cui è contenuto nelle parti della pianta utilizzata. Oltre ai precedenti, esistono altri metodi promossi per ottenere campioni di fragranze naturali e oli essenziali, come ad esempio: turbo-distillazione, idro-diffusione, distillazione secca e distillazione molecolare (Chemat & Boutekedjiret, 2015)

3.2. Analisi e controllo qualità

Date le numerose applicazioni topiche e orali degli oli essenziali sono fondamentali analisi approfondite per dimostrarne qualità e identità; infatti, non è detto che una pianta appartenente alla specie ricercata abbia il contenuto chemiotipico adatto all'uso che si ricerca. Molti metodi chimici e fisici sono stati applicati alle analisi di tali oli, dalla componente dell'olio appena ottenuto allo stoccaggio, dove le reazioni di ossidazione e idrolisi sono più frequenti, comportando una possibile variazione nei composti. (Christensson et al., 2010) La Farmacopea Europea ha stabilito quali siano le analisi da svolgere, ponendo dei parametri di qualità ben definiti. I parametri delineati sono: densità relativa, potere ottico, indice di rifrazione, punto di

congelamento e analisi specifiche della famiglia composti in analisi. La gascromatografia (GC) rappresenta, solitamente, il metodo di prima scelta per esaminare le miscele complesse caratteristiche degli oli essenziali. Naturalmente adatta per analisi di fragranze a causa della loro volatilità, le misurazioni in GC sono caratterizzate da un'elevata capacità separativa. (Cserhati T., n.d.) Una più alta risoluzione si può ottenere utilizzando, con gli ultimi approcci sviluppati, GC multidimensionale o enantioselettiva, mentre la gascromatografia veloce porta ad una maggiore produttività. In GC-olfactometry, la separazione gascromatografica dei composti è combinata con rilevazione sensoriale, usata per caratterizzazione sensoriale e percezione degli off-flavors. (Illahi et al., 2021; Mahattanatawee K, 2011) Nella maggior parte dei casi, tuttavia, il GC è accoppiato ai modi di rilevazione di spettrometria di massa (MS) o di ionizzazione della fiamma (FID), formanti gli strumenti adatti per la determinazione dei terpenoidi. L'uso della ionizzazione elettronica (EI) GC/MS è frequentemente riportata in letteratura. Tuttavia, l'analisi è limitata a un numero relativamente basso di composti con pressione di vapore inferiore a 350-400° C e stabili a temperature di vaporizzazione e separazione. Infatti, sono state segnalate alterazioni, e quindi il verificarsi di artefatti, su analisi GC di oli essenziali. (Mateus et al., 2010) Si è sottolineato che spesso reazioni di decomposizione e riarrangiamento possono verificarsi durante la separazione GC a cause delle alte temperature dell'iniettore, superfici di rivestimento o delle colonne calde cataliticamente attive. Inoltre, per analisi di matrici non volatili o a base d'acqua, la gascromatografia richiede per lo più lunghi passaggi di preparazione del campione. Altra tecnica di elezione per l'analisi di oli essenziali è la spettroscopia H-NMR. Questa tecnica, combinata con analisi cromatografiche, può aiutare a determinare il contenuto qualitativo degli oli essenziali. È una tecnica di primo utilizzo per le analisi quali-qualitative, potendo discriminare i diversi composti in modo chiaro e ben definito. (Freitas et al., 2018)

4) Usi e tradizioni degli oli essenziali

4.1. *Commiphora myrrha*

Il riconoscimento dei valori terapeutici e medicamentosi della Mirra avvenne 3000 anni fa, inserendo la pianta nella trazione medica ayurvedica. Conosciuta come specie *guggul* in India, è una delle erbe medicinali iscritta nel Charaka Samhitā, antico trattato di medicina ayurvedica, rivolta a contrastare l'obesità e con azione ipolipemizzante per controllare la concentrazione di colesterolo e trigliceridi nel sangue. (Sun et al., 2016) Diverse specie hanno riscontrato diversi effetti medicamentosi quali: *C myrrha* (T. Nees) in Cina, nominata *Mo Yao*, estratta come olio essenziale o estratto in etere di petrolio trova utilizzi in formulazioni indicate per ulcere della pelle, artriti e stati infiammatori. Gli utilizzi principali sono antinfiammatorio, analgesico e antiossidante. Inghilterra e Germania condividono formulazioni orali approvate, non più olii essenziali ma resina o tinture derivate da esse; *C apobalsamum* (L.) in Cina ha gli stessi usi della *C Myrrha* pocanzi descritti. In Arabia Saudita, nominata *Balessan*, viene utilizzata per disturbi gastro-epatici e calcoli renali; *C mukul* (Hook. Ex Stocks) usata in India, nominata *Guggul*, trova impiego nel trattamento di traumi ed escoriazioni ma ha effetto sistemico per patologie cardiovascolari, regolamentazione concentrazione lipidica e ipertiroidismo. (Sun et al., 2016) Utilizzata per gli effetti antibatterici, antidiabetici e antiproliferativi le formulazioni contengono oli essenziali, estratti in cloroformio, estratti tal quali e in acqua; *C Caudata* in India, chiamata *Kizhuvam*, trova il suo

utilizzo nel trattamento del dolore e sollievo dai dolori di stomaco. Terpenoidi, specialmente sesqui-triterpenoidi sono i più abbondanti in questa genetica di piante. Le specie *C. myrrha*, *C. mukul* hanno ricevuto speciali attenzioni in contenuto fitochimico. Essudati e resine sono le fonti studiate della pianta. Foglie, corteccia e rami non trovano impiego. La prima classe di composti sono i Terpenoidi, divisi in Monoterpeni, Sesquiterpeni e composti volatili. Monoterpeni identificati α -pinene, myrcene e limonene. β -Elemene, β -selinene e germacrene B sono i sesquiterpenoidi caratteristici di questa genetica di appartenente al regno vegetale. La struttura molecolare di questi sesquiterpenoidi, appartenenti alla specie *Commiphora*, è comunemente classificata in germacrene, guaiene, cadinene, elemene ed eudesmane. La presenza di furanosesquiterpenoidi è la caratteristica peculiare di questa specie vegetale. (Zhu et al., 2003). I triterpenoidi sono i maggiori componenti isolati dalla specie *Commiphora* quali dammarane, polypodane, lupane e ursane. La struttura più comune è il dammarane, comune in più di venti triterpeni appartenenti alla specie *Commiphora*. Le ultime due classi di composti sono gli Steroli e un mix di metaboliti secondari come carboidrati, flavonoidi, lignine e composti alifatici a lunga catena. Il maggior sterolo riscontrato nella specie *Commiphora* è il E-guggulsterone, sotto i riflettori per attività antitumorali, antinfiammatori e effetti ipolipemizzanti. I flavonoidi sono stati trovati principalmente nei fiori, stecchi e corteccia.

5.1. *Allium Cepa L.*

L'utilizzo delle droghe vegetali appartenenti alla famiglia vegetale *Allium*, Aglio (*Allium Sativum L.*) o Cipolla (*Allium Cepa L.*), hanno dimostrato sin dall'antichità proprietà terapeutiche degne di nota. Egizi, i primi a riconoscere le loro proprietà medicamentose iscrivendo nel *Egyptian Codex Ebers* papiro di 110 pagine in cui sono state redatte tutte le piante riconosciute utilizzabili, redato intorno al 1550 A.C. (Mansell, 2010) L'uso di quella specie riscontrò sin da subito un ventaglio di azione rivolta all'apparato cardio-circolatorio, parassiti e morsi da animali. Ippocrate e Plinio il Vecchio hanno promosso l'iscrizione di tale droga vegetale per le sue virtù nel Charak, autore del trattato che poi venne modernizzato nell'attuale medicina ayurvedica tradizionale. Le virtù riscontrate dai due filosofi erano in linea con i precedenti riscontri, considerando l'azione fluidificante del sangue e migliore il tono cardiaco. Nei recenti anni il benefit di questa droga vegetale è più mirato, formulata in integratori, ha trovato impiego con effetti pro-circolatori e benefici nel controllo dell'assetto lipidico con effetto ipolipemizzante. Chimicamente, *Allium Cepa*, è composta dal 90% in acqua con alto contenuto di fibre e zuccheri. In termini di vitamine e Sali si riscontra un alto contenuto di B₆ e acido folico ma un basso contenuto di Sodio ma alto contenuto di Calcio, Magnesio, Fosforati e Potassio. La cipolla ha un basso contenuto di lipidi al contrario, Arginina e Acido Glutammico sono amminoacidi molto presenti. I principali costituenti bioattivi sono Flavonoidi e Organosulfurici volatili (OSC_s). (Suleria et al., 2015) I flavonoidi più presenti sono la classe delle antocianine, dando il colore di viola o dorata alla cipolla, con i glucosidi della Quercetina a fare da massimi esponenti in tutte le varietà dei bulbi di cipolla. Il loro contenuto è variabile tra le diverse colorazione. Altre cianidine sono state identificate quali, cianidina-3-glucoside, cianidina 3-laminaribioside e il derivato 6''-malonico. La differenza delle antocianine presenti è imputata alla variabilità genetica. (CARIDI et al., 2007) I composti organosulfurici derivano dall'azione enzimatica da parte di allilasi che frammenta alchenil cisteina sulfossido una volta che viene tagliata o morsa. Il prodotto ottenuto dall'azione enzimatica è l'acido aminopropionico e acido alchenil cistein sulfenico. L'acido iminopropionico si idrolizza spontaneamente in ammoniaca e acido piruvico. L'acido sulfenico decompone spontaneamente, in seguito vengono prodotti acidi solfonici e tiosulfinati caratteristici. La presenza di propili e metili nella catena carboniosa, come la posizione del doppio legame è questione di ricerca per la possibile differenziazione

tra aglio e cipolla. I tiosulfinati sono particolarmente instabili al calore, frammentandosi e dando origine a *mono-*, *di-* e *tri-solfidi* stabili. Dipropile disulfide, dipropile trisulfide e propenil disulfide sono i volatili maggiormente presenti.(Calvey et al., 1998) Gli effettivi benefici di questa droga si trovano nel controllo lipidico, aggregazione piastrinica e nel prevenire rischi acuti di infarto miocardico. Sia quercetina e i composti solforati hanno dimostrato di essere bioattivi dimostrando sinergia tra le due famiglie di composti.(Tang et al., 2017) L'attività dei composti volatili organosulfurici trova impegno con proprietà antimicrobiche e antifungine,(Tang et al., 2017) specialmente contro Gram positivi, funghi dermatologi e la inibizione della crescita e sviluppo di aflatossine prodotti dal genere *Aspergillus* come *Aspergillus niger*, *Brettanomyces anomalus* e *Candida albicans*. L'olio di cipolla e estratto acquoso contrasta i batteri Gran-negativi, e l'estratto aiuta a inibire la crescita della placca dentaria. Studi in vitro per l'inibizione della crescita batterica come *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, hanno riscontrato risultati positivi con l'utilizzo di estratti acquosi o succo di cipolla. Estratti in etere ha dimostrato in vitro l'inibizione di *Staphylococcus aureus*.("Assessment of Antimicrobial Activity of Onion Extract (*Allium Cepa*) on *Staphylococcus Aureus*; in Vitro Study," 2014) L'olio essenziale di cipolla, invece, ha dimostrato un'inibizione di funghi dermatologici. I composti attivi della cipolla distruggono le cellule dei funghi e diminuiscono l'uptake dell'ossigeno, crescita cellulare, inibizione della sintesi di lipidi, proteine e acidi nucleici, inibendo anche la sintesi della parete cellulare dei funghi. I composti bioattivi sono diallil trisulfide, ajone e allicina. Successivamente all'effetto antibatterico, i composti organosulfurici, mediano il controllo glucosidico per migliorare l'effetto antidiabetico. Diverse ricerche hanno dimostrato che, come principale bioattivo, si trova la quercetina, ma secondariamente si è dimostrato che S-metil-L-cisteina sulfossido e S-Allyl-L-cisteina sulfossido in concentrazione di 200mg kg peso corporeo a giorno.(Kumari & Augusti, 2007). È dimostrato che l'uso eccessivo di cipolla nella dieta porta effetti indesiderati gastrointestinali, diarrea e sensazione di bruciato, flatulenza e cambio nella flora intestinale.



5) Scopo della tesi

Sviluppare un metodo che permetta di estrarre i costituenti volatili da matrici naturali mediante idrodistillazione e applicare approcci basati su gascromatografia per la determinazione quali-quantitativa dei costituenti. In particolare, il lavoro si focalizzerà sui composti markers di cipolla, dipropile disulfide e derivati, e di mirra con particolare attenzione ai furanoeudesmadieni. Si confronteranno i dati ottenibili con detector FID e di Massa e si evidenzieranno le differenti categorie di composti.

6) Materiali e metodi

6.1. Materiali per le analisi

Per le analisi sono stati utilizzati: *Allium Cepa L.* varietà dorata, *Zingiber officinale*, *Coriandrum sativum*, *Juniperus* e *Commiphora myrrha*. Per quanto riguarda il Coriandolo e Ginepro sono state utilizzate le bacche; la cipolla utilizzati i bulbi; la mirra l'essudato essiccato. Le analisi sono state svolte all'interno del Laboratorio di prodotti naturali del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli studi di Padova.

Le materie prime sono state acquistate nel supermercato locale eccezione fatta per la Mirra, messa a disposizione da una ditta esterna.

Solventi e composti chimici

I solventi per le estrazioni sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Sono stati utilizzati dietil etere, cicloesano e diclorometano. L'acqua di distillazione è stata ottenuta dall'impianto di deionizzazione del dipartimento. Sodio solfato e nonanolo sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia)

6.2. Strumenti e metodi

➤ GC-MS Varian

Per la determinazione GC-MS si è utilizzato un gascromatografo Varian 3900 operante in modalità EI (ionizzazione elettronica con un potenziale applicato di 70 eV), iniettore automatico Varian CP8410 e rilevatore di massa a trappola ionica Varian Saturn 2100T, utilizzando una colonna HP-INNOWAX (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m).

Metodo primo su colonna Wax

Il programma di temperatura utilizzato è: temperatura iniziale 50°C, mantenuta per 10 minuti. Si raggiunge la temperatura intermedia di 110°C, innalzando di 5°C al minuto. La temperatura finale raggiunta del forno è di 235°, con un rate di incremento di 20°C/minuto dalla temperatura precedente. Come gas carrier è stato utilizzato elio al flusso di 1 mL/minuto e splittaggio 1:20. Lo spettrometro di massa ha un range di acquisizione 40-650 *m/z*.

Metodo secondo con variazione della rampa di temperatura

Il programma di temperatura utilizzato è: 0,00-4,00 minuti 80°C; 4,00-21,50 min 8,00 °C/min ciascuna volta mantenuti per 5 minuti; 21,50-24,50 min 20 °C/min. Come gas carrier è stato utilizzato elio al flusso di 1 mL/minuto e splittaggio 1:20. Lo spettrometro di massa ha un range di acquisizione 40-650 *m/z*.

➤ GC-FID

Per La determinazione in GC-FID è stato utilizzato un gascromatografo Varian (manca il nome) operante con gas carrier Elio e fiamma alimentata ad idrogeno, utilizzando una colonna INNOWAX (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm), temperatura limite da 40°C a 270°C.

Metodo

Il programma di temperatura utilizzato è: 0,00-4,00 minuti 80°C; 4,00-21,50 min 8,00 °C/min ciascuna volta mantenuti per 5 minuti; 21,50-24,50 min 20 °C/min. Come gas carrier è stato utilizzato elio al flusso di 1 mL/minuto e splittaggio 1:20.

➤ H-NMR del distillato di mirra

Per la determinazione si è utilizzato uno strumento Bruker avance III dotato di probe a gradienti. Il campione è stato sciolto in cloroformio deuterato. Si sono acquisiti spettri 1 H, HSQC, HMBC per determinare la struttura dei composti principali

6.3. Preparazione campioni e soluzioni standard

Preparazione del campione: - Cipolla dorata

Per la preparazione del campione da distillare in equi corrente si è pesato circa 100 grammi di cipolla e distillati con 100 mL di acqua deionizzata, la distillazione è durata all'incirca 90' minuti. Il distillato è stato ripartito con dietil etere per 5 volte. La fase organica, precedentemente anidrificato con sodio solfato e travasata in un pallone, è stata completamente evaporata tramite corrente di azoto ottenendo l'olio essenziale. Il residuo è stato ripreso con 1 mL di dietil etere a cui è stato aggiunto 10 µL pesato di una soluzione standard di nonanolo in dietil etere di concentrazione 0,995 mg/mL e analizzato.

Per la preparazione del campione da distillare utilizzando l'apparecchiatura Clevenger si è utilizzato circa un kilogrammo di cipolle e distillati con 3 litri di acqua deionizzata, la distillazione è durata all'incirca 300' minuti. Il distillato è stato ripartito con dietil etere per 5 volte. La fase organica, precedentemente anidrificata con sodio solfato e travasata in un pallone, è stata completamente evaporata tramite corrente di azoto ottenendo l'olio essenziale.

Preparazione del campione: - Mirra

Per la preparazione del campione si è pesato e tritato circa 40 grammi di Mirra. Il sistema di distillazione è in equi corrente per la durata di circa 80 minuti. Il distillato

è stato ripartito con dietil etere per 5 volte. La fase organica, precedentemente anidrificata con sodio solfato e travasata in un pallone, è stata completamente evaporata tramite corrente di azoto ottenendo l'olio essenziale.

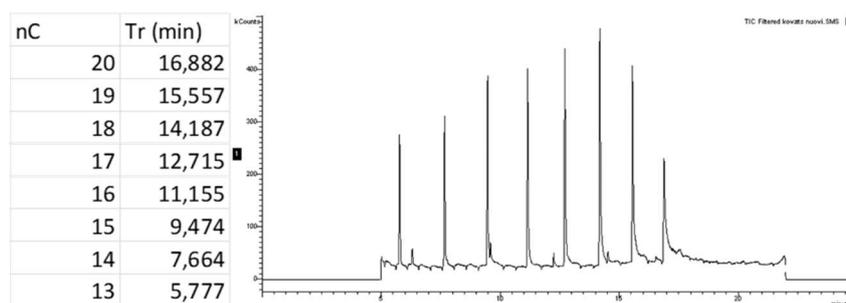
7) Risultati e discussione

Olio essenziale Mirra

Metodi cromatografici per la caratterizzazione di olio essenziale di Mirra

Per la caratterizzazione dell'olio essenziale è stata utilizzata la tecnica cromatografica GC a trappola ionica accoppiata alla spettrometria di massa per ottenere informazioni circa il contenuto dell'olio essenziale. Per la corsa cromatografica è stata utilizzata la colonna ad alta polarità HP-INNOWax, di fase stazionaria polietilene glicole (PEG). Iniezione con sistema split. Attraverso l'analizzatore a trappola ionica, simile a quello quadrupolare, costituito da un filtro quadrupolare sferico che trattiene tutti gli ioni generati. Essi vengono poi convogliati progressivamente verso il rivelatore di massa, potendo così associare a tempi di ritenzioni diversi i diversi composti. Nello specifico sono state svolte analisi di screening in un range di massa ampio fino 650 m/z grazie all'utilizzo della trappola ionica. Mediante l'utilizzo di due spettrometri di massa, trappola ionica Varian e quadrupolo Agilent, è stato possibile eseguire una comparazione dei risultati ottenuti e quindi stabilire quale sia la tecnica cromatografica più adatta per l'analisi dei "fingerprint" di un estratto dal punto di vista qualitativo. L'identificazione dei costituenti è stata eseguita con il supporto dei dati di letteratura (foglio mirra) secondo cui si può osservare che il campione contiene principalmente sesquiterpeni e terpenoidi.

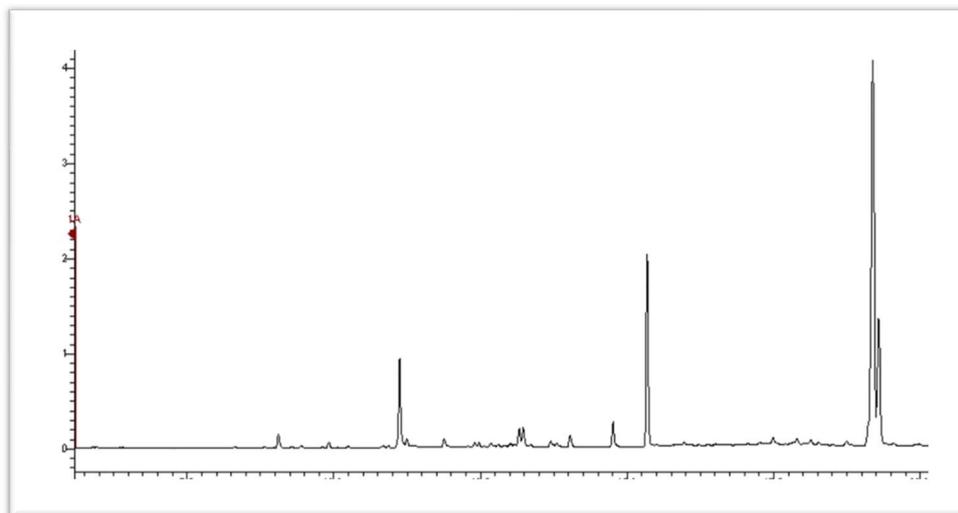
➤ Kovats GC-IT-MS



- Soluzioni alcani con metodo Mirra_Alberto

➤ Analisi in GC-IT-MS: Metodo 1

Il metodo cromatografico è stato sviluppato in un totale di 35 minuti, aumentando la temperatura da 80°C fino a 240°C. Utilizzando elio al flusso di 1 ml/minuto come gas carrier e splittaggio del campione 1:20. Lo spettrometro di massa ha un range di acquisizione 40-650 m/z .



1) Cromatogramma ottenuto con range di acquisizione 40-650 m/z

Tentative identification

Confrontando i dati di letteratura con gli indici di ritenzione e la loro frammentazione è possibile identificare i picchi. Nella tabella sottostante sono riportate le specie che sono state identificate.

Tr (min)	Ki	Ks	CAS number	MW (Da)	name	% Vol/Vtot
9,06	1477	1472	20307-84-0	204	α-Elemene	1,44
9,913	1526	1526	5208-59-3	204	Bourbonene	0,60
11,124	1598	1613	3691-11-0	204	δ-Guaiene	0,14
11,247	1606	1607	87-44-5	204	Caryophyllene	0,56
11,879	1646	1644	29873-99-2	204	γ-Elemene	0,98
13,159	1730	1727	17066-67-0	204	β-Selinene	1,93
13,222	1734	1734	87745-31-1	204	Aciphyllene	1,98
14,027	1789	1793	6813-21-4	204	Selina-3,7 (11)-diene	1,45
14,757	1842	1832	15423-57-1	204	β-Germacrene	2,68
15,336	1884	1885	17910-09-7	216	Curzerene	3,05
17,895	1976	2080	631868-96-7	214	Furanoedesma-1,4-diene	0,28
19,194	2074	2162	115526-32-4	214	Furanoedesma-1,3-diene	84,52
21,049	2214	2219	20085-85-2	230	Epicuzerenone	0,39

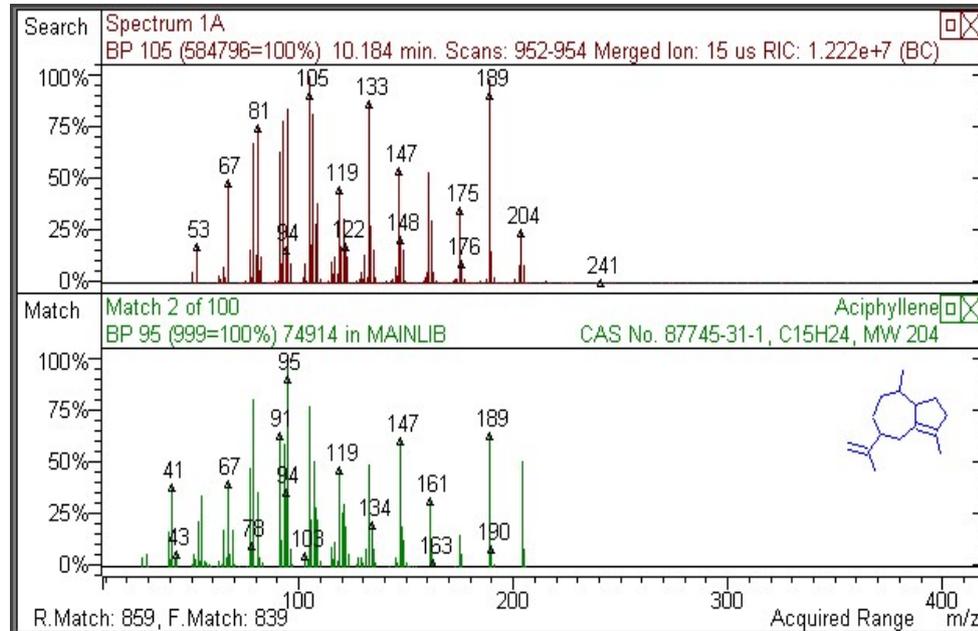
2) Tempo di ritenzione, indice di ritenzione e contenuto percentuale nei volatili totali.

Vengono riportati successivamente la frammentazione dei picchi caratteristici identificati, paragonando alla molecola ipotizzata calcolando l'indice di ritenzione.

- **Frammentazioni composti target presenti nel campione**

Frammentazione di γ -Elemene

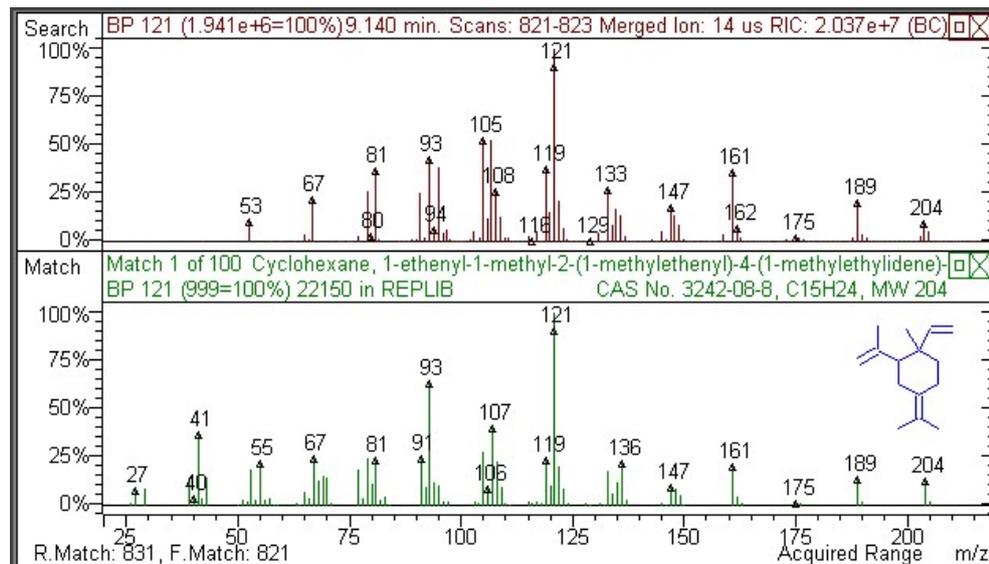
La γ -Elemene ha un peso molecolare di 204,35 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 95 m/z, 147 m/z e 189 m/z. Nell'immagine 3 è rappresentato il pathway di frammentazione di γ -Elemene paragonato a quello in libreria NIST.



3) Ion pathway di γ -Elemene.

Frammentazione di Aciphyllene

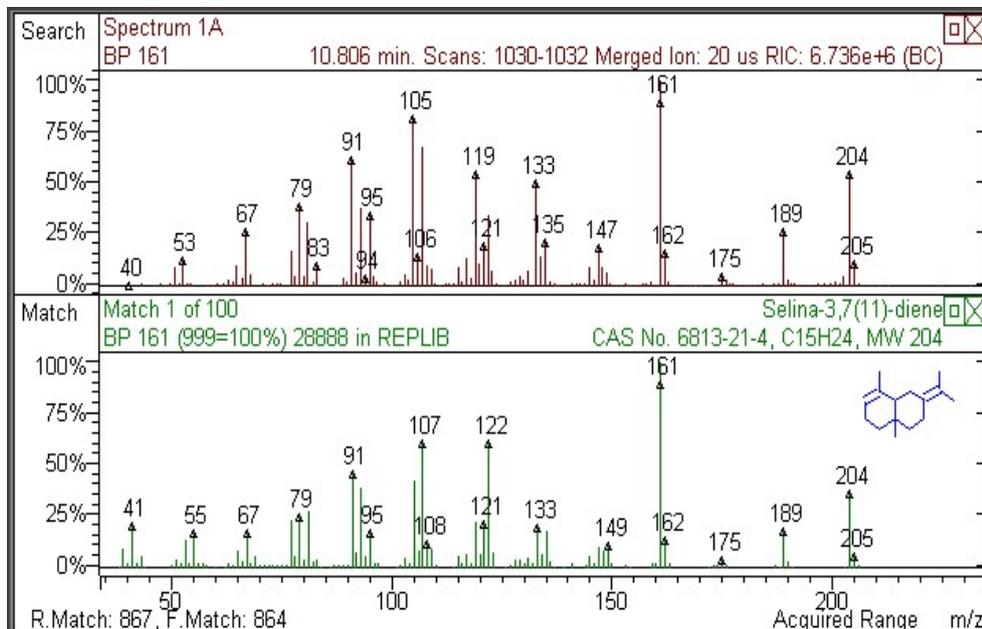
Il Aciphyllene ha un peso molecolare di 204,35 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 93 m/z, 121 m/z, 161 m/z e 189 m/z. Nell'immagine 4 è rappresentato il pathway di frammentazione di Aciphyllene paragonato a quello in libreria NIST.



4) Ion pathway di Aciphyllene

Frammentazione di Selina-3,7-diene

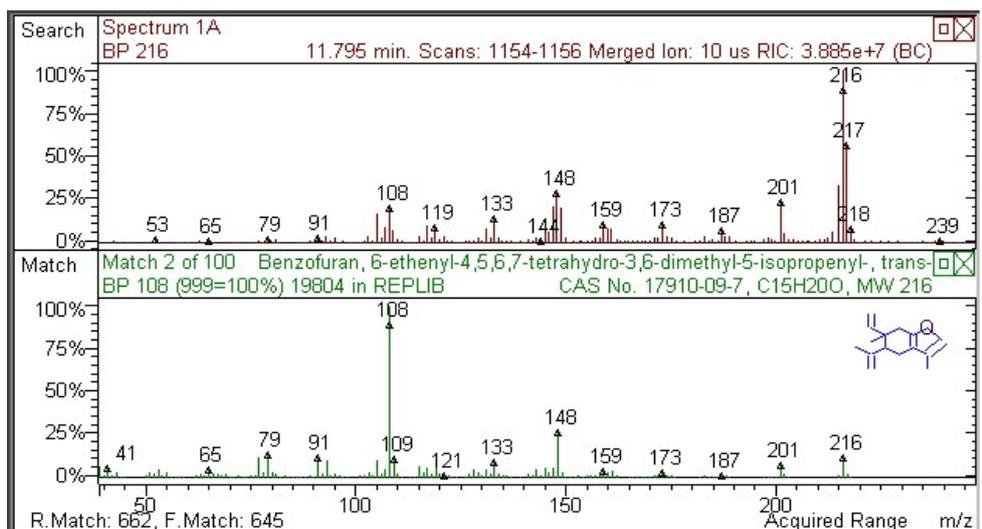
La Selina-3,7-diene ha un peso molecolare di 204,35 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 161 m/z, 189 m/z, 161 m/z e 204 m/z. Nell'immagine 5 è rappresentato il pathway di frammentazione di Selina-3,7-diene paragonato a quello in libreria NIST.



5) Ion pathway di Selina-3,7-diene

Frammentazione di Curzerene

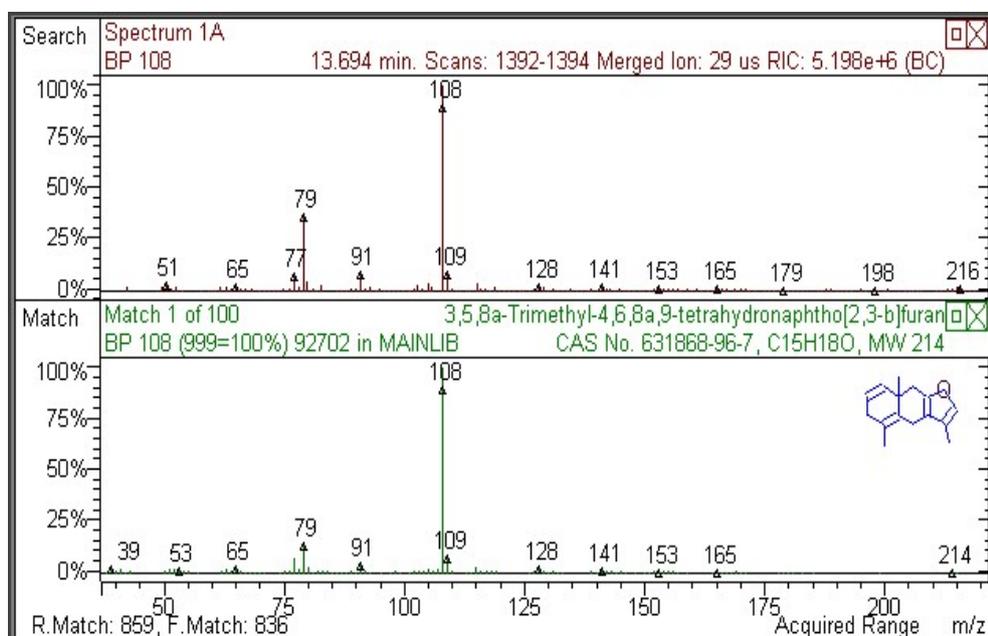
Il curzerene ha un peso molecolare di 204,35 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 108 m/z, 148 m/z, 201 m/z e 216 m/z. Nell'immagine 6 è rappresentato il pathway di frammentazione di Curzerene paragonato a quello in libreria NIST.



6) Ion pathway di Curzerene

Frammentazione di Furaneudesma-1,4-diene

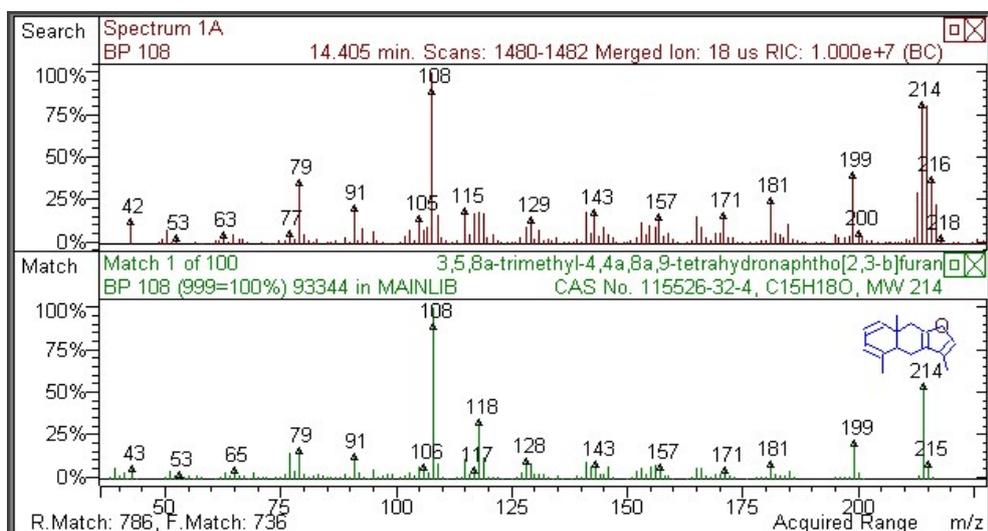
Il Furaneudesma-1,4-diene ha un peso molecolare di 204,35 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 79 m/z, 108 m/z. Nell'immagine 7 è rappresentato il pathway di frammentazione di Furaneudesma-1,4-diene paragonato a quello in libreria NIST.



7) Ion pathway di Furaneudesma-1,4-diene

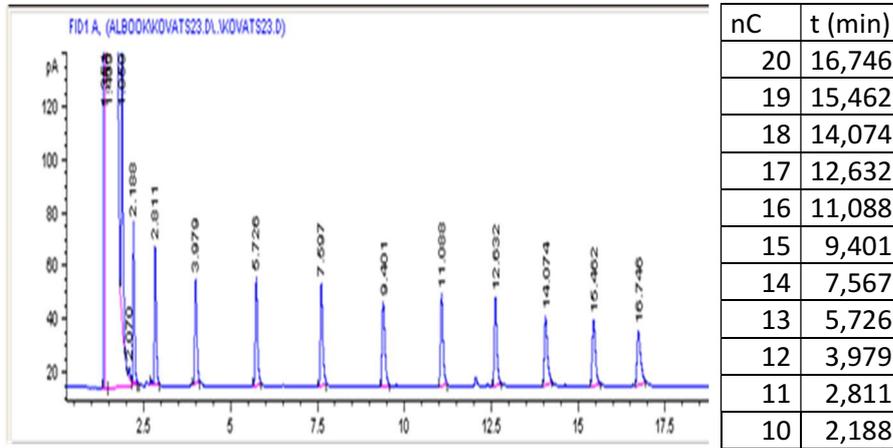
Frammentazione di Furanoedesma-1,3-diene

Il Furanoedesma-1,3-diene ha un peso molecolare di 204,35 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 108 m/z, 199 m/z, 214 m/z e 215 m/z. Nell'immagine 8 è rappresentato il pathway di frammentazione di paragonato Furanoedesma-1,3-diene a quello in libreria NIST.



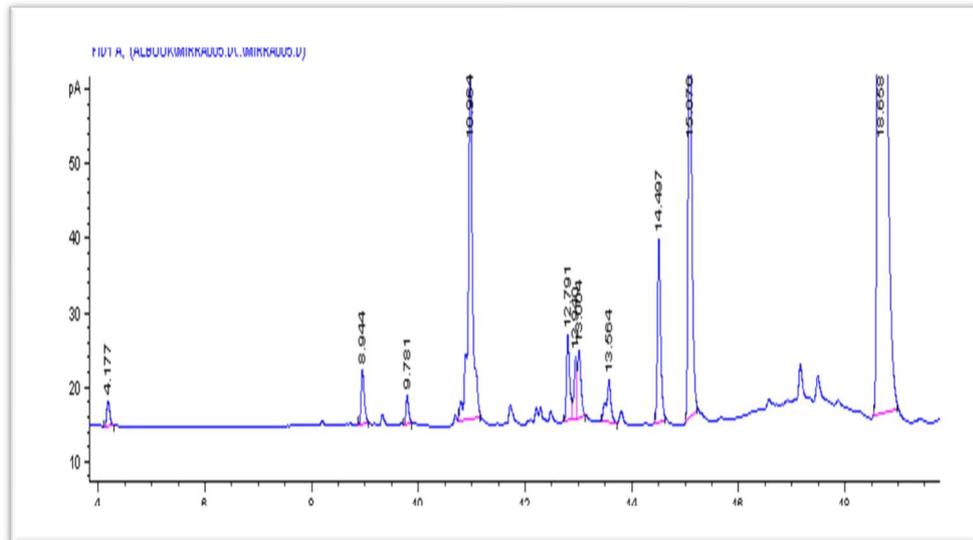
8) Ion pathway di Furanoedesma-1,3-diene

➤ Kovats metodo Mirra_Alberto GC-FID



1) Analisi in GC-FIDS: Metodo Mirra_Alberto

Il metodo cromatografico è stato sviluppato in un totale di 35 minuti, aumentando la temperatura da 80°C fino a 240°C. Utilizzando elio al flusso di 1 ml/minuto come gas carrier e splittaggio del campione 1:20. Lo spettrometro di massa ha un range di acquisizione 40-650 *m/z*.



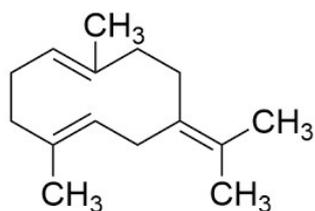
9) Cromatogramma ottenuto mediante il metodo Mirra_Alberto con range di acquisizione 40-650 *m/z*

Tentative identification

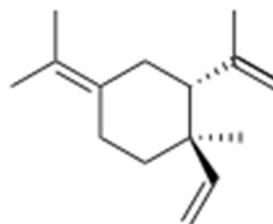
Confrontando i dati di letteratura con gli indici di ritenzione e la loro frammentazione è possibile identificare i picchi. Nella tabella sottostante sono riportate le specie che sono state identificate.

t (min)	ki	ks	CAS number	MW (Da)	name
8,944	1475	1472	20307-84-0	204	σ-Elemene
9,781	1523	1526	5208-59-3	204	Bourbonene
10,964	1593	1613	3691-11-0	204	δ-Guaiene
12,791	1711	1644	29873-99-2	204	γ-Elemene
13,004	1726	1727	17066-67-0	204	β-Selimene
14,497	1830	1832	15423-57-1	204	β-germacrene
15,076	1872	1885	17910-09-7	216	Curzerene
18,658	2049	2162	115526-32-4	214	Furanoeudesma-1,3-diene

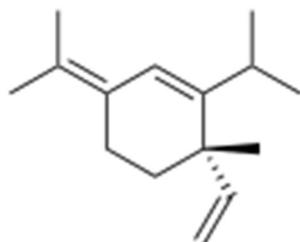
10) Tempo di ritenzione e indice di ritenzione dei composti identificati



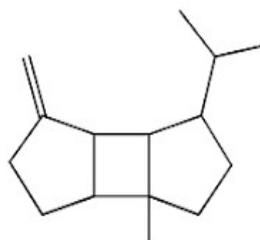
Beta-germacrene



gamma-elemene



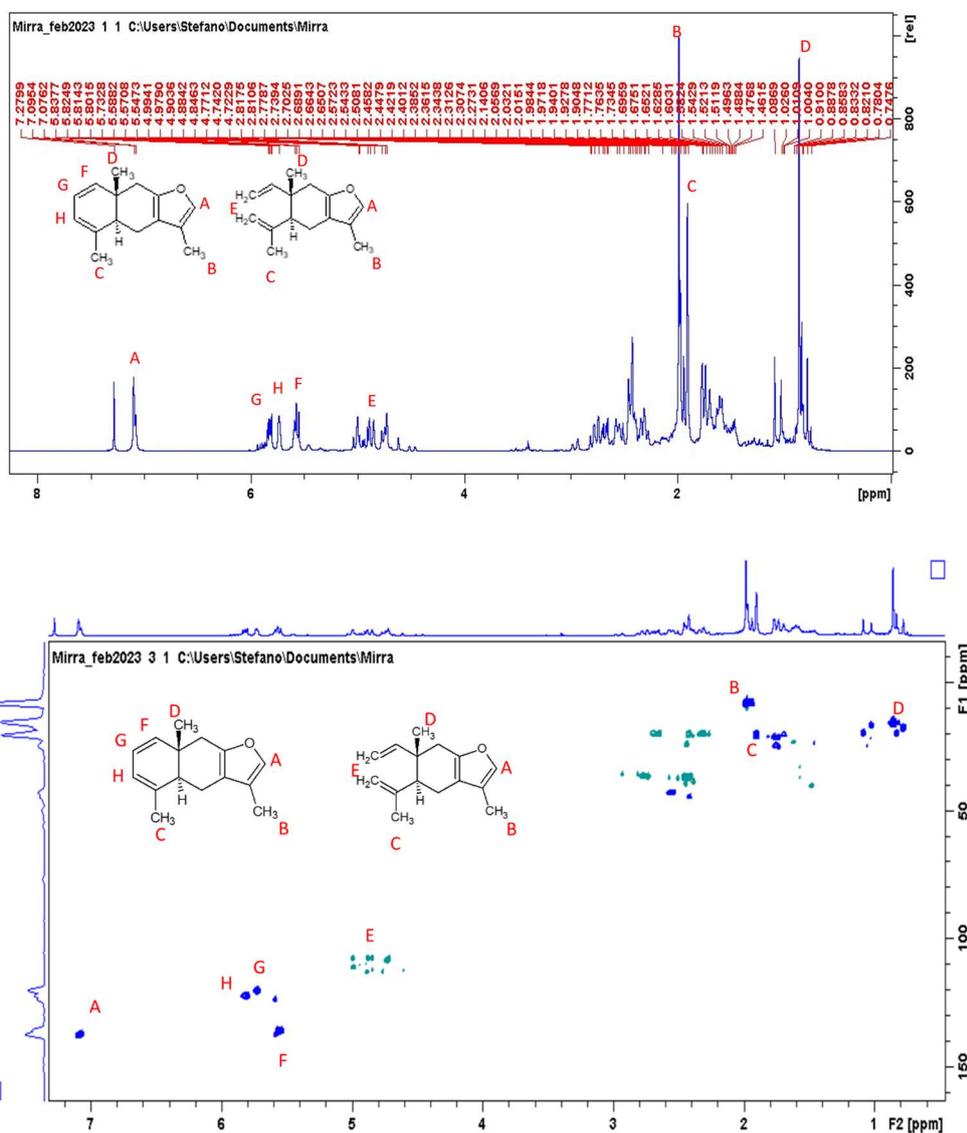
Alfa-elemene

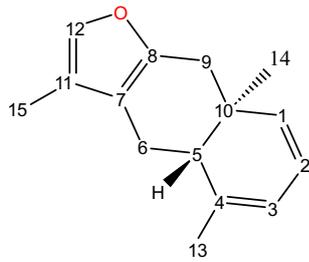


Bourbonene

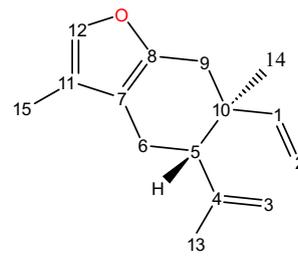
➤ Analisi in H-NMR

L'analisi in NMR ha mostrato l'effettiva presenza di due molecole target, Furanoedesma-1,3-diene e Curzerene. La presenza del furano è testimoniata dal segnale a δ 7.86-7.09 ascrivibile al protone in posizione 12, altri due segnali diagnostici sono i singoletti ascrivibili ai metili 14, 15 e 13 che si rilevano rispettivamente a δ 1.90, 0.86, 1.99. Ulteriori segnali diagnostici sono i multipletti osservabili nella zona di spettro fra δ 5.50-5.90 ascrivibili ai metileni esociclici ed al protone olefinico del curzerene. Per confermare la presenza di questi costituenti è stato acquisito lo spettro HSQC-DEPT. Si allegano gli spettri con evidenziati i segnali diagnostici per i principali composti markers che risultano essere il furanoedesma-1,4-diene ed il curzerene che risultano essere i segnali dei protoni aromatici per il furanoedesma-1,4-diene ed i tre metili quaternari, i segnali dei metileni sp² esociclici ed i metili quaternari per il curzerene.





Furanoeudesma-1,3-diene



Curzerene



Come si presenta la mirra, una volta raccolta ed essiccata tramite tradizione

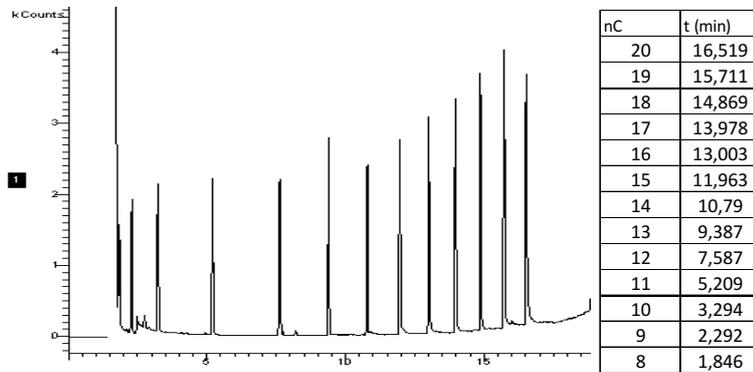
Olio essenziale Cipolla

Metodi cromatografici per la caratterizzazione di olio essenziale di Cipolla

Per la caratterizzazione dell'olio essenziale è stata utilizzata la tecnica cromatografica GC a trappola ionica accoppiata alla spettrometria di massa per ottenere informazioni circa il contenuto dell'olio essenziale. Per la corsa cromatografica è stata utilizzata la colonna ad alta polarità HP-INNOWax, di fase stazionaria polietilene glicole (PEG). Iniezione con sistema split. Attraverso l'analizzatore a trappola ionica, simile a quello quadrupolare, costituito da un filtro quadrupolare sferico che trattiene tutti gli ioni generati. Essi vengono poi convogliati progressivamente verso il rivelatore di massa, potendo così associare a tempi di ritenzioni diversi i diversi composti. Nello specifico sono state svolte analisi di screening in un range di massa ampio fino 650 m/z grazie all'utilizzo della trappola ionica. Mediante l'utilizzo di spettrometro di massa, trappola ionica, è stato possibile eseguire una comparazione dei risultati ottenuti e quindi stabilire quale sia la tecnica cromatografica più adatta per l'analisi dei "fingerprint" di un estratto dal punto di vista qualitativo. L'identificazione dei costituenti è stata eseguita con il supporto dei dati di letteratura, secondo cui si può osservare che il campione contiene principalmente organosulfurici, ciclici e lineari. L'ottenimento del campione è stato realizzato tramite Clevenger e Idro-distillazione semplice.

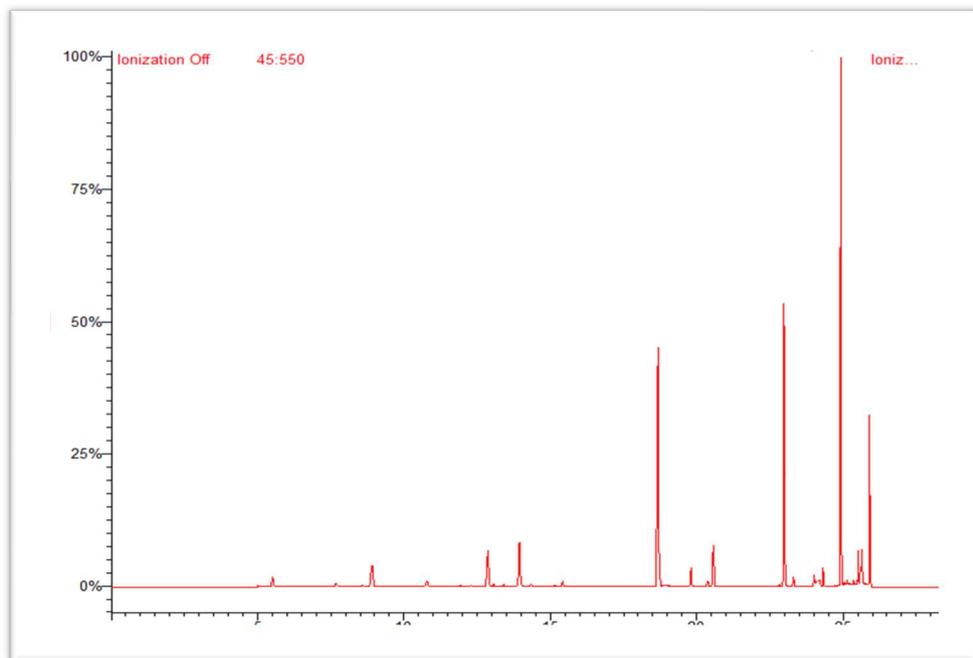
1. Olio Essenziale mediante Clevenger

➤ Kovats Metodo VolatiliWax GC-IT-MS



➤ Analisi in GC-IT-MS: Metodo VolatiliWax

Il programma di temperatura utilizzato è: temperatura iniziale 50°C, mantenuta per 10 minuti. Si raggiunge la temperatura intermedia di 110°C, innalzando di 5°C al minuto. La temperatura finale raggiunta del forno è di 235°, con un rate di incremento di 20°C/minuto dalla temperatura precedente. Come gas carrier è stato utilizzato elio al flusso di 1 mL/minuto e splittaggio 1:20. Lo spettrometro di massa ha un range di acquisizione 40-650 *m/z*.



11) Cromatogramma ottenuto mediante il metodo VolatiliWax con range di acquisizione 40-650 *m/z*

Tentative identification

Confrontando i dati di letteratura con gli indici di ritenzione e la loro frammentazione è possibile identificare i picchi. Nella tabella sottostante sono riportate le specie che sono state identificate.

Tr (min)	Ki	Ks	CAS number	MW (Da)	name	% Vol/Vtot
5,521	1074	1086	624-92-0	94,199	Disulfide, dimethyl	0,82
7,688	1129	1099	27817-67-0	116,224	Allyl-n-propyl sulfide	0,41
10,79	1190	1190	638-02-8	112,193	Thiophene, 2,5-dimethyl-	0,57
12,857	1233	1242	2179-60-4	122,252	Disulfide, methyl propyl	3,20
13,949	1256	1253	632-15-5	112,193	Thiophene, 3,4-dimethyl-	4,66
18,678	1376	1387	629-19-6	150,305	Disulfide, dipropyl	18,69
19,808	1382	1406	23838-20-2	148,289	(Z)-1-Propenyl propyl disulfide	2,67
20,566	1436	1430	23838-21-3	148,289	(E)-1-Propenyl propyl disulfide	5,20
22,981	1533	1531	17619-36-2	154,317	Trisulfide, methyl propyl	21,56
24,926	1678	1672	6028-61-1	182,37	Trisulfide, dipropyl	21,94
25,907	1793	1781	23838-27-9	180,354	(E)-1-Propenyl propyl trisulfide	13,48

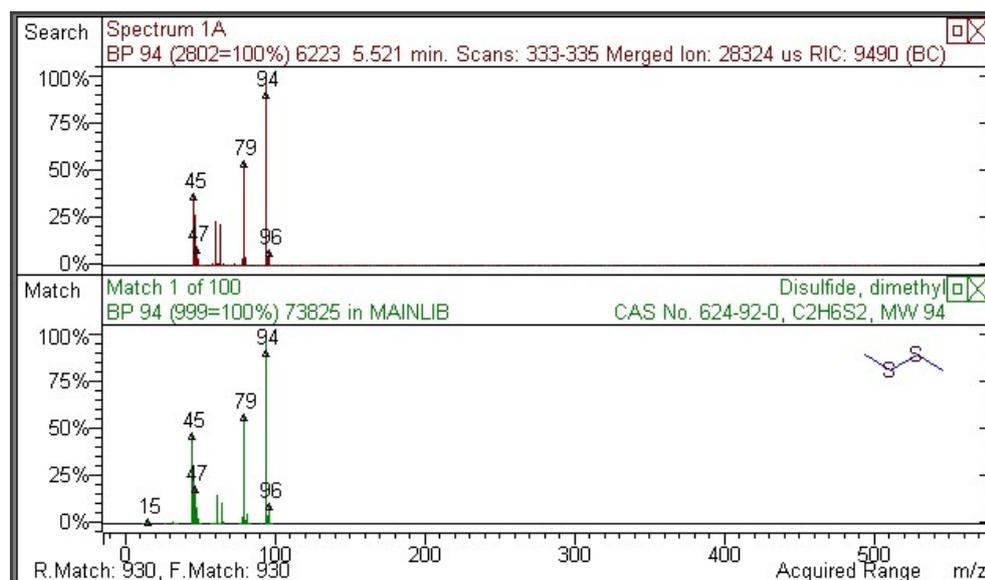
12) Tempo di ritenzione, indice di ritenzione e contenuto percentuale nei volatili totali.

Vengono riportati successivamente la frammentazione dei picchi caratteristici identificati, paragonando alla molecola ipotizzata calcolando l'indice di ritenzione.

- **Frammentazioni composti target presenti nel campione**

Frammentazione di Dimetil disulfide

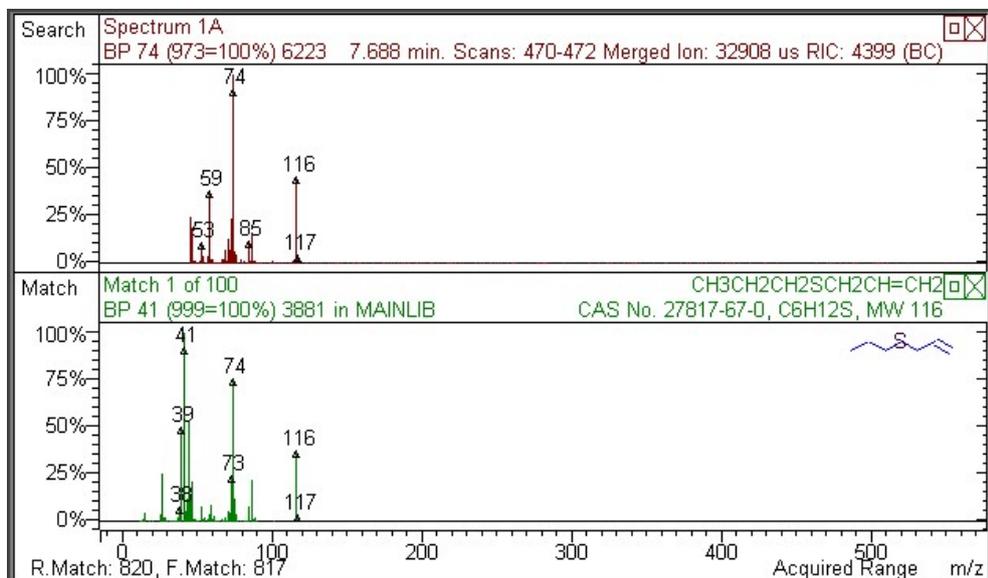
Il Dimetil disulfide ha un peso molecolare di 94,20 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 45 m/z, 94 m/z, 79 m/z e 47 m/z. Nell'immagine 13 è rappresentato il pathway di frammentazione di Dimetil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



13) Ion pathway Dimetile Disulfide

Frammentazione di Allil-n-propil sulfide

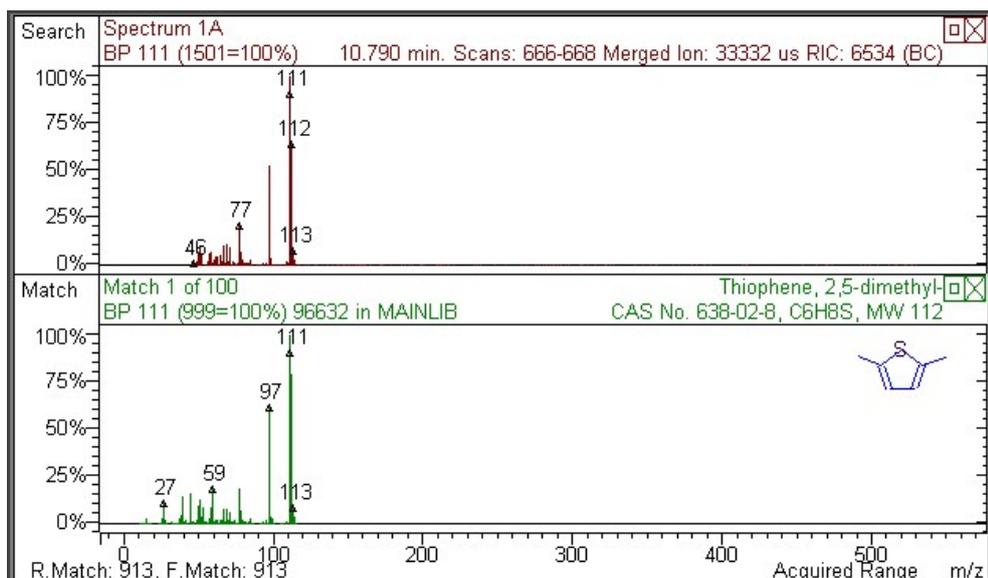
Il Allil-n-propil sulfide ha un peso molecolare di 116,23 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 41 m/z, 74 m/z, 39 m/z e 116 m/z. Nell'immagine 14 è rappresentato il pathway di frammentazione di Allil-n-propil sulfide paragonato a quello in libreria NIST.



14) Ion pathway di Allil-n-propil sulfide

Frammentazione di 2,5-dimetil-tiofene

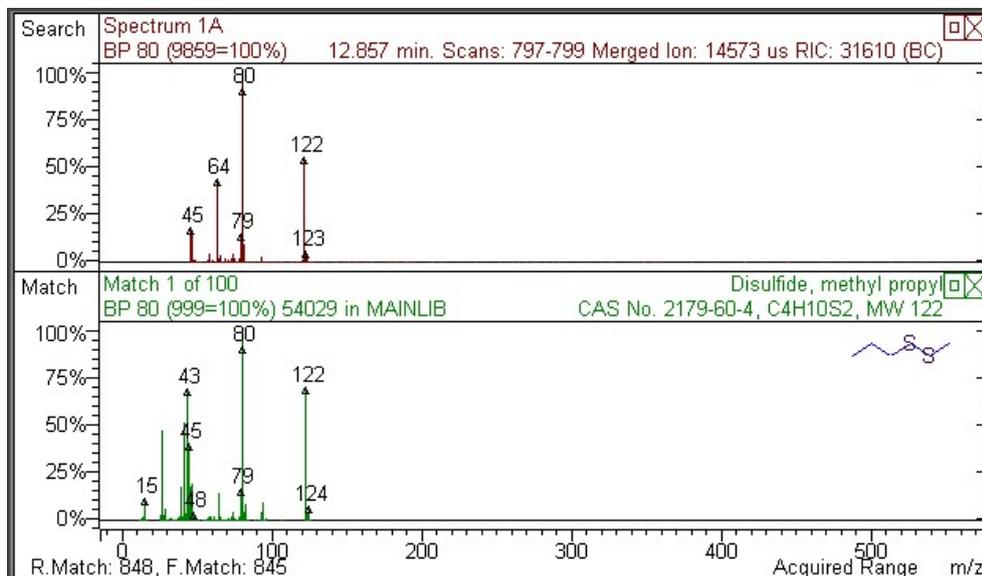
Il 2,5-dimetil-tiofene ha un peso molecolare di 112,19 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 111 m/z, 112 m/z e 97 m/z. Nell'immagine 15 è rappresentato il pathway di frammentazione di 2,5-dimetil-tiofene paragonato a quello in libreria NIST.



15) Ion pathway di 2,5-dimetil-tiofene

Frammentazione di Metil propil disulfide

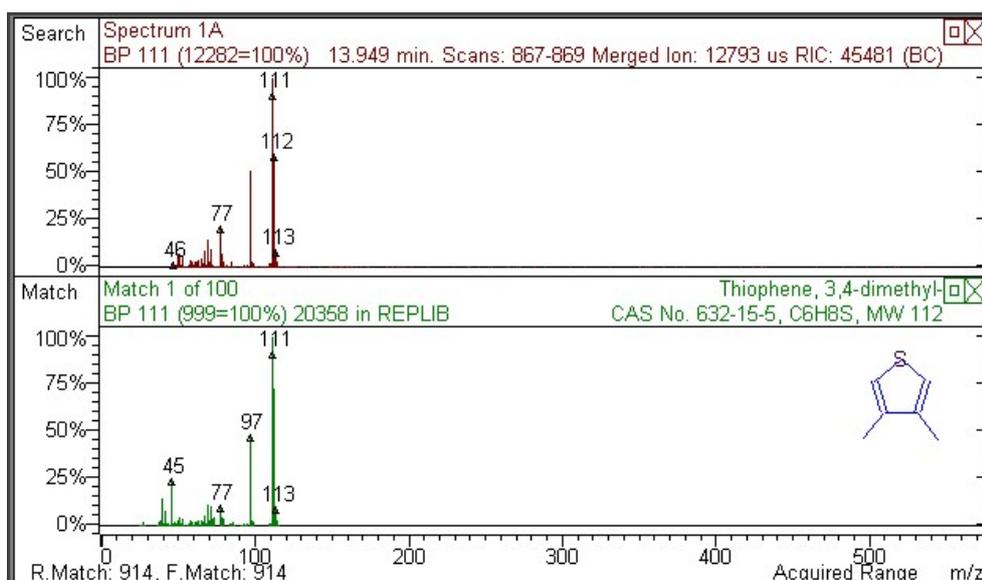
Il Metil propil disulfide ha un peso molecolare di 112,19 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 111 m/z, 77 m/z e 80 m/z. Nell'immagine 16 è rappresentato il pathway di frammentazione di Metil propil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



16) Ion pathway di Metil propil disulfide

Frammentazione di 3,4-Dimetil-tiofene

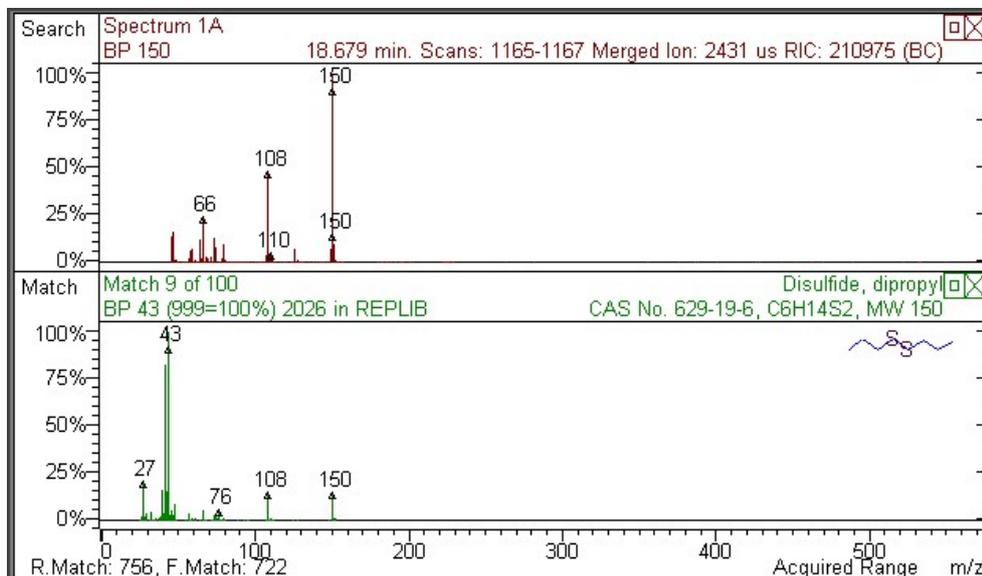
Il 3,4-Dimetil-tiofene ha un peso molecolare di 112,19 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 111 m/z, 112 m/z e 97 m/z. Nell'immagine 17 è rappresentato il pathway di frammentazione di 3,4-Dimetil-tiofene paragonato a quello in libreria NIST.



17) Ion pathway di 3,4-Dimetil-tiofene

Frammentazione di Dipropile disulfide

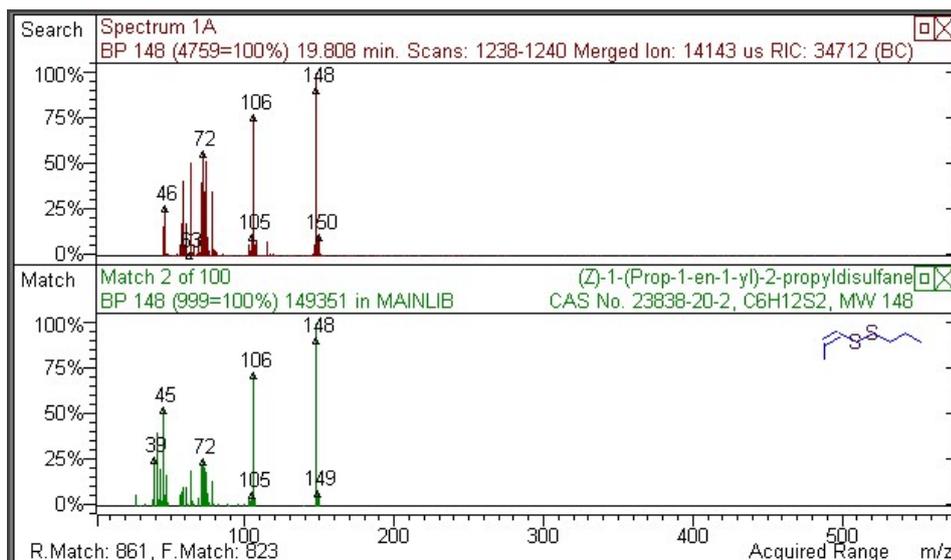
Il Dipropile disulfide ha un peso molecolare di 150,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 43 m/z, 150 m/z e 108 m/z. Nell'immagine 18 è rappresentato il pathway di frammentazione di Dipropile disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



18) Ion pathway di Dipropile disulfide

Frammentazione di (Z)-Propenil propil disulfide

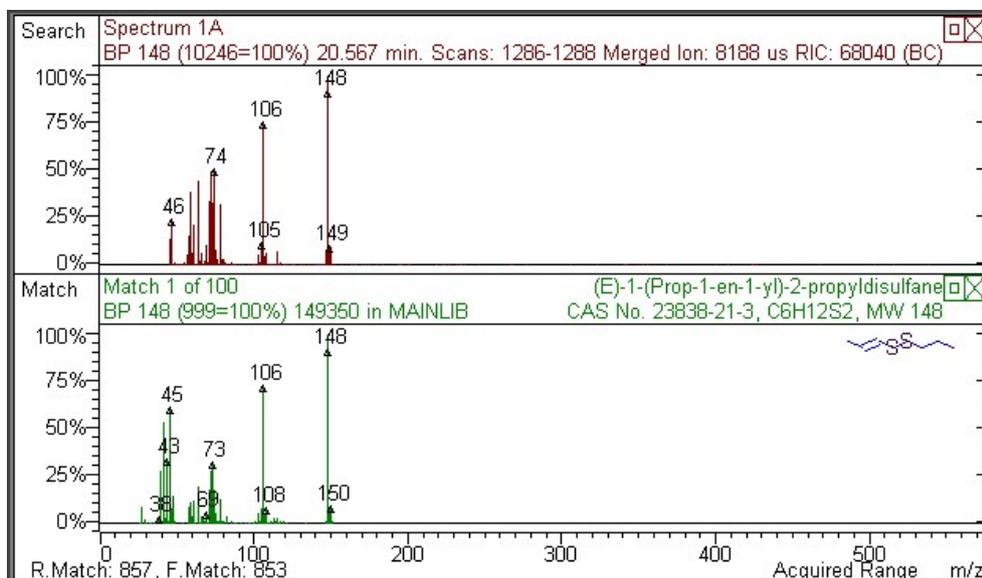
Il (Z)-Propenil propil disulfide ha un peso molecolare di 148,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 148 m/z, 106 m/z e 45 m/z. Nell'immagine 19 è rappresentato il pathway di frammentazione di (Z)-Propenil propil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



19) Ion pathway di (Z)-Propenil propil disulfide

Frammentazione di (E)-Propenil propil disulfide

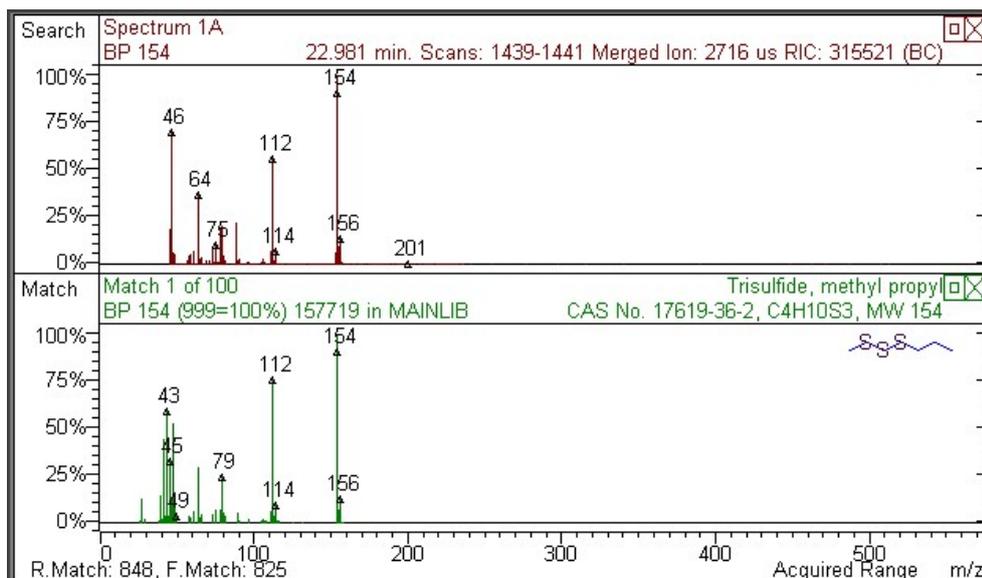
Il (E)-Propenil propil disulfide ha un peso molecolare di 148,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 148 m/z, 106 m/z e 45 m/z. Nell'immagine 20 è rappresentato il pathway di frammentazione di (E)-Propenil propil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



20) Ion pathway di (E)-Propenil propil disulfide

Frammentazione di Metil propil trisulfide

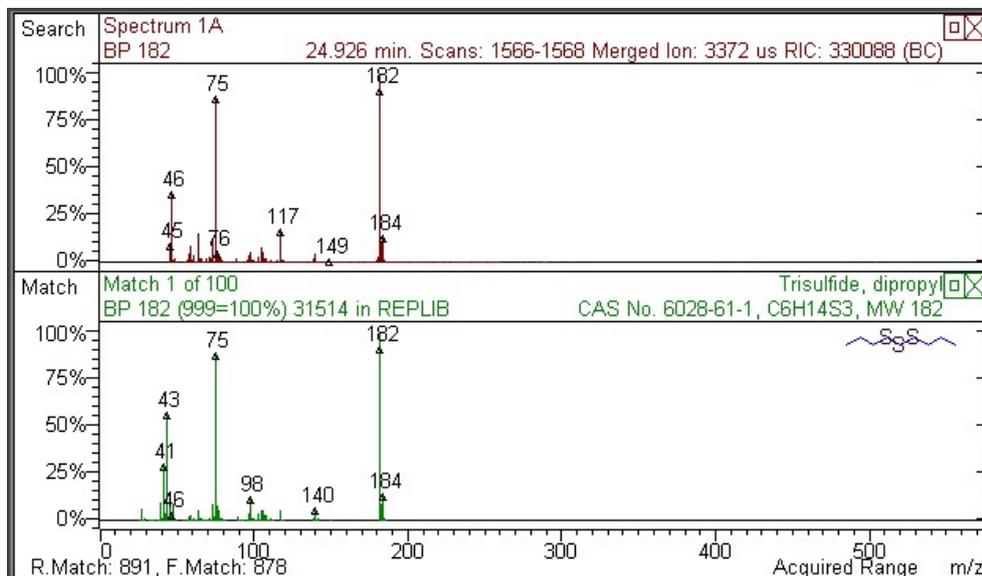
Il Metil propil trisulfide ha un peso molecolare di 154,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 154 m/z, 112 m/z e 43 m/z. Nell'immagine 21 è rappresentato il pathway di frammentazione di Metil propil trisulfide paragonato a quello in libreria NIST.



21) Ion pathway di Metil propil trisulfide

Frammentazione di Dipropile trisulfide

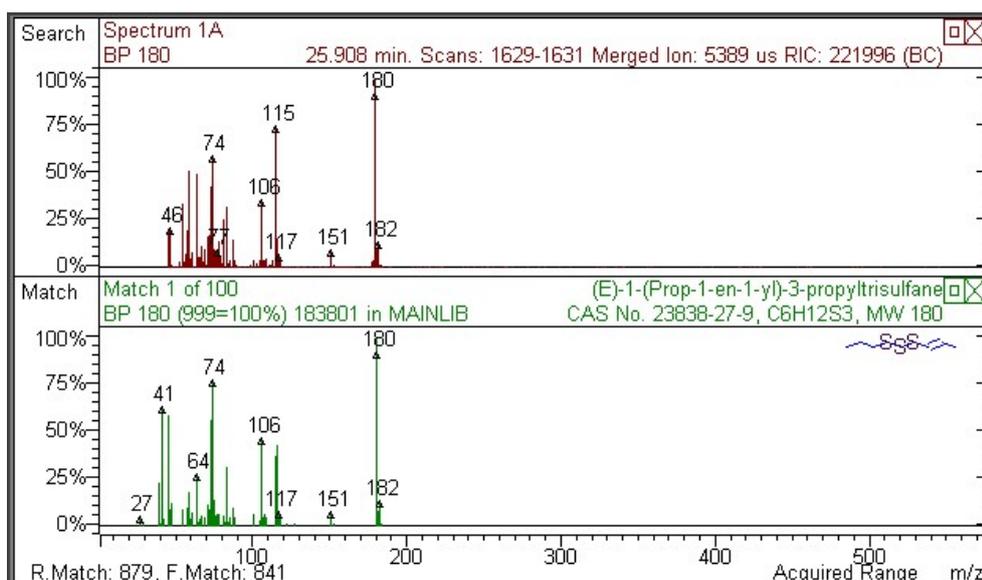
Il Dipropile trisulfide ha un peso molecolare di 182,4 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 43 m/z, 182 m/z e 75 m/z. Nell'immagine 22 è rappresentato il pathway di frammentazione di Dipropile trisulfide paragonato a quello in libreria NIST.



22) Ion pathway di Dipropile trisulfide

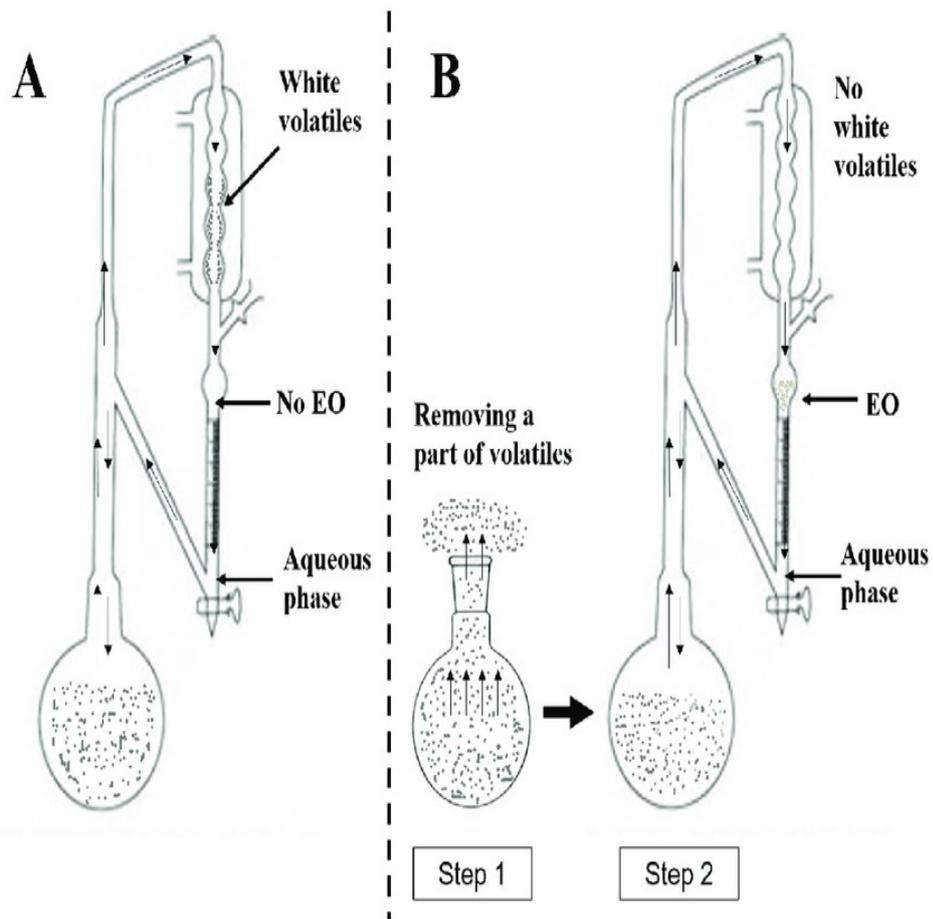
Frammentazione di (E)-1-Propenil propil trisulfide

Il (E)-1-Propenil propil trisulfide ha un peso molecolare di 180,4 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 180 m/z, 74 m/z e 41 m/z. Nell'immagine 23 è rappresentato il pathway di frammentazione di (E)-1-Propenil propil trisulfide paragonato a quello in libreria NIST.



23) Ion pathway di (E)-1-Propenil propil trisulfide

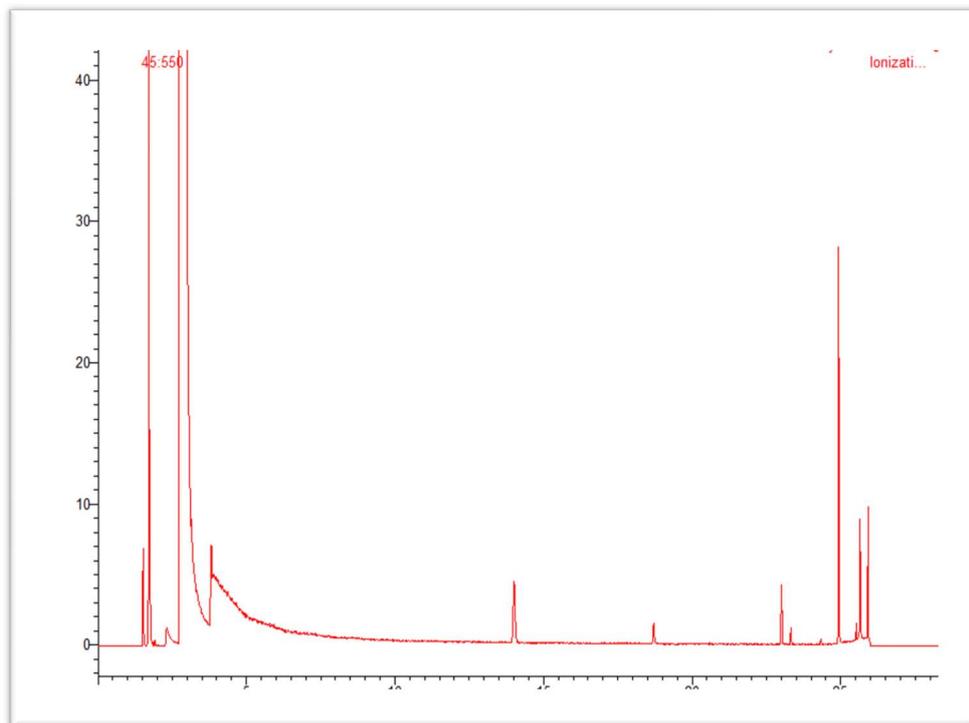
- **Apparato Clevenger**



2. Olio Essenziale mediante Idro-distillazione

➤ Analisi in GC-IT-MS: Metodo VolatiliWax

Il programma di temperatura utilizzato è: temperatura iniziale 50°C, mantenuta per 10 minuti. Si raggiunge la temperatura intermedia di 110°C, innalzando di 5°C al minuto. La temperatura finale raggiunta del forno è di 235°, con un rate di incremento di 20°C/minuto dalla temperatura precedente. Come gas carrier è stato utilizzato elio al flusso di 1 mL/minuto e splittaggio 1:20. Lo spettrometro di massa ha un range di acquisizione 40-650 *m/z*.



24) Cromatogramma ottenuto mediante il metodo VolatiliWax con range di acquisizione 40-650 m/z

Tentative identification

Confrontando i dati di letteratura con gli indici di ritenzione e la loro frammentazione è possibile identificare i picchi. Nella tabella sottostante sono riportate le specie che sono state identificate.

Tr (min)	Ki	Ks	CAS number	MW(Da)	Nome	%Vol/Vtot
7,755	1131	1130	33922-70-2	116	Allylpropylsulfide	1,16
10,885	1191	1190	638-02-8	112	2,5-dimethyl-thiophene	1,32
12,938	1235	1242	2179-60-4	122	Methyl propyl disulfide	0,74
14,016	1258	1253	632-15-5	112	3,4-Dimethylthiophene	18,78
18,715	1377	1387	629-19-6	150	Dipropyl disulfide	6,22
19,849	1411	1406	23838-20-2	148	(Z)-Propenyl propyl disulfide	0,77
20,598	1437	1430	23838-21-3	148	(E)-Propenyl propyl disulfide	1,37
23,015	1535	1531	17619-36-2	154	Methyl propyl trisulfide	16,91
24,944	1679	1672	6028-61-1	182	Dipropyl trisulfide	52,73

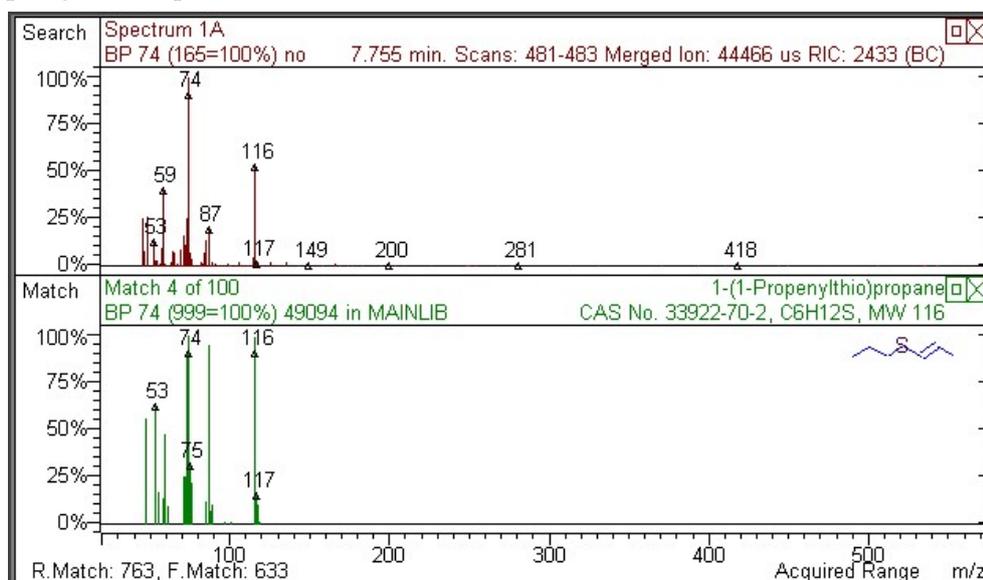
25) Tempo di ritenzione, indice di ritenzione e contenuto percentuale nei volatili totali.

Vengono riportati successivamente la frammentazione dei picchi caratteristici identificati, paragonando alla molecola ipotizzata calcolando l'indice di ritenzione.

- **Frammentazioni composti target presenti nel campione**

Frammentazione di Allil-n-propil sulfide

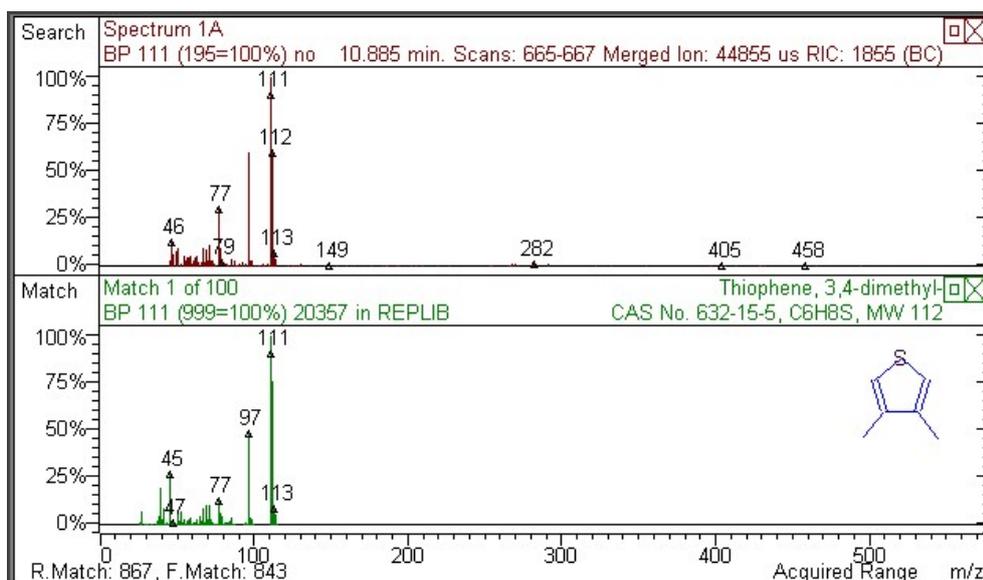
Il Allil-n-propil sulfide ha un peso molecolare di 116,23 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 74 m/z, 116 m/z, 214 m/z e 87 m/z. Nell'immagine 26 è rappresentato il pathway di frammentazione di Allil-n-propil sulfide paragonato a quello in libreria NIST.



26) Ion pathway di Allil-n-propil sulfide

Frammentazione di 2,5-dimetil-tiofene

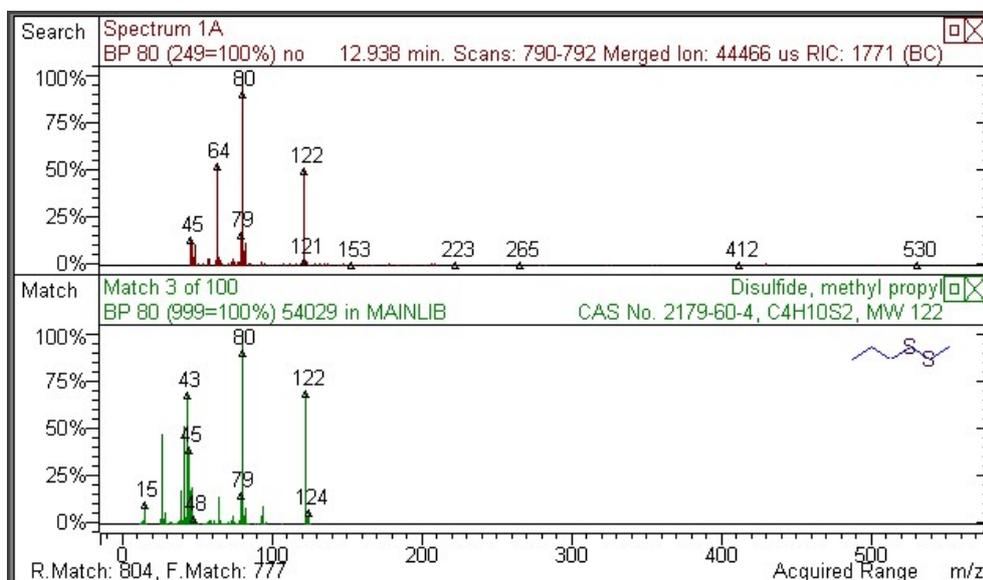
Il 2,5-dimetil-tiofene ha un peso molecolare di 112,19 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 111 m/z, 112 m/z e 97 m/z. Nell'immagine 27 è rappresentato il pathway di frammentazione di 2,5-dimetil-tiofene paragonato a quello in libreria NIST.



27) Ion pathway di 2,5-dimetil-tiofene

Frammentazione di Metil propil disulfide

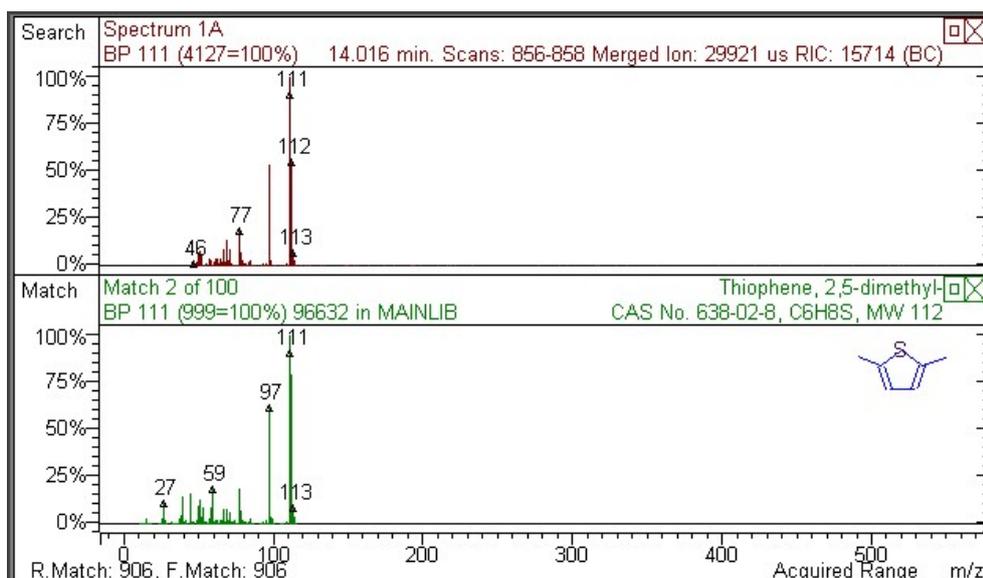
Il Metil propil disulfide ha un peso molecolare di 112,19 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 111 m/z, 77 m/z. Nell'immagine 28 è rappresentato il pathway di frammentazione di Metil propil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



28) Ion pathway di Metil propil disulfide

Frammentazione di 3,4-Dimetil-tiofene

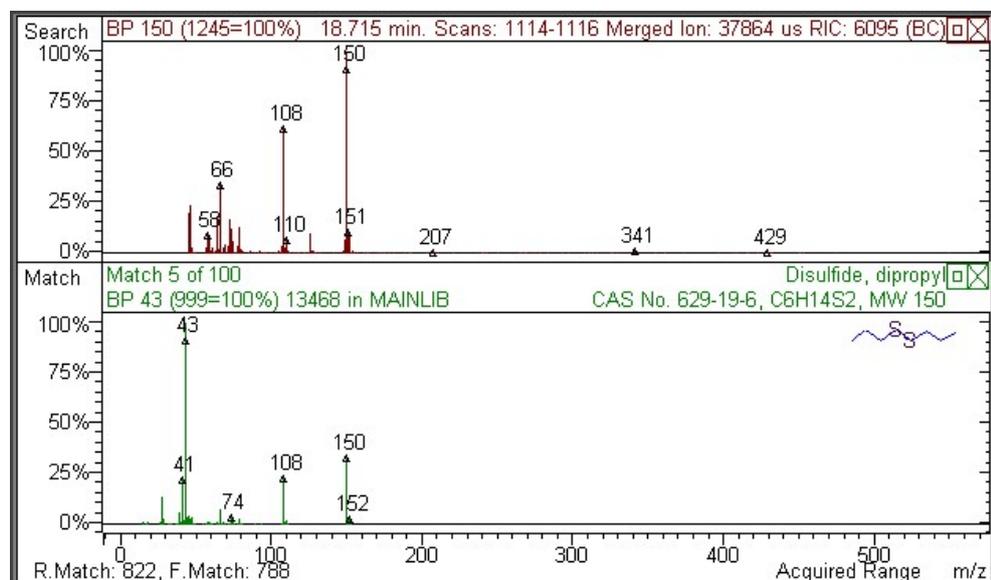
Il 3,4-Dimetil-tiofene ha un peso molecolare di 112,19 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 111 m/z, 112 m/z e 97 m/z. Nell'immagine 29 è rappresentato il pathway di frammentazione di 3,4-Dimetil-tiofene paragonato a quello in libreria NIST.



29) Ion pathway di 3,4-Dimetil-tiofene

Frammentazione di Dipropile disulfide

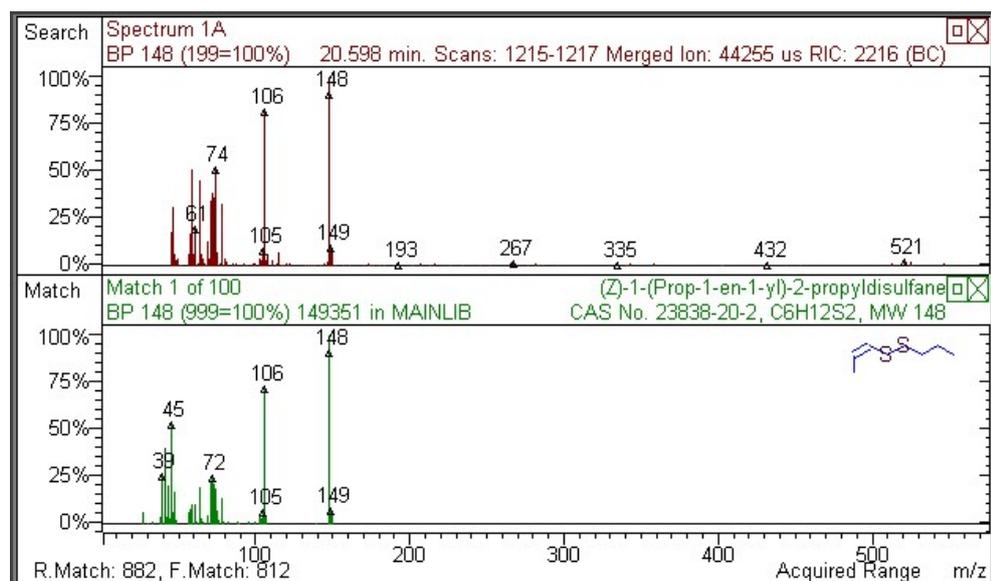
Il Dipropile disulfide ha un peso molecolare di 150,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 43 m/z, 150 m/z e 108 m/z. Nell'immagine 30 è rappresentato il pathway di frammentazione di Dipropile disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



30) Ion pathway di Dipropile disulfide

Frammentazione di (Z)-Propenil propil disulfide

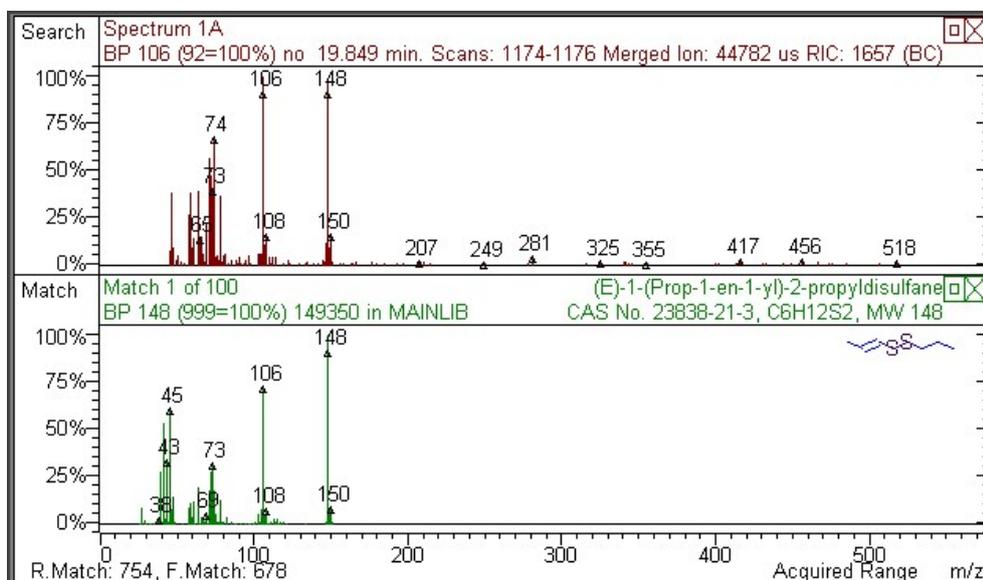
Il (Z)-Propenil propil disulfide ha un peso molecolare di 148,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 148 m/z, 106 m/z e 45 m/z. Nell'immagine 31 è rappresentato il pathway di frammentazione di (Z)-Propenil propil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



31) Ion pathway di (Z)-Propenil propil disulfide

Frammentazione di (E)-Propenil propil disulfide

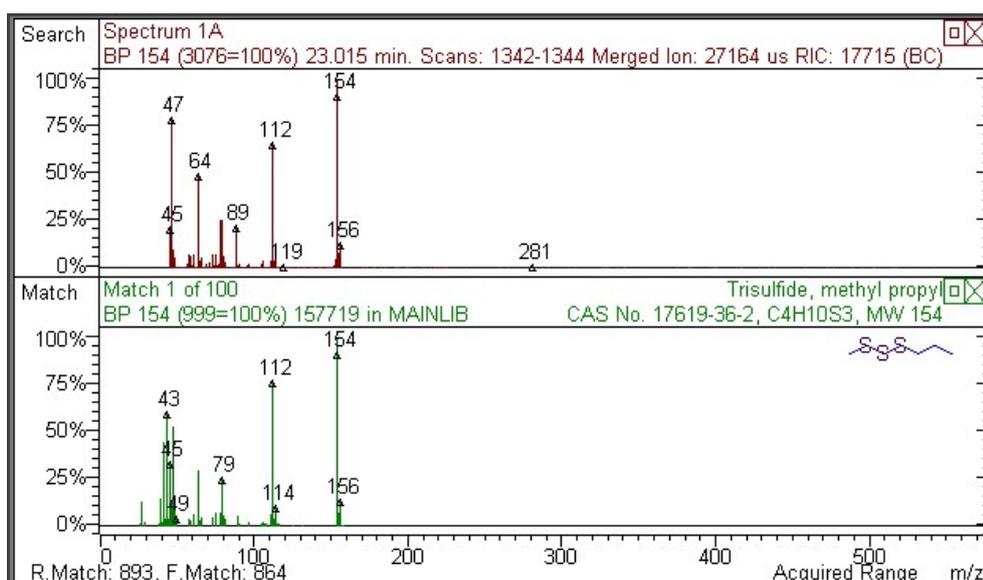
Il (E)-Propenil propil disulfide ha un peso molecolare di 148,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 148 m/z, 106 m/z e 45 m/z. Nell'immagine 32 è rappresentato il pathway di frammentazione di (E)-Propenil propil disulfide paragonato a quello in libreria NIST.



32) Ion pathway di (E)-Propenil propil disulfide

Frammentazione di Metil propil trisulfide

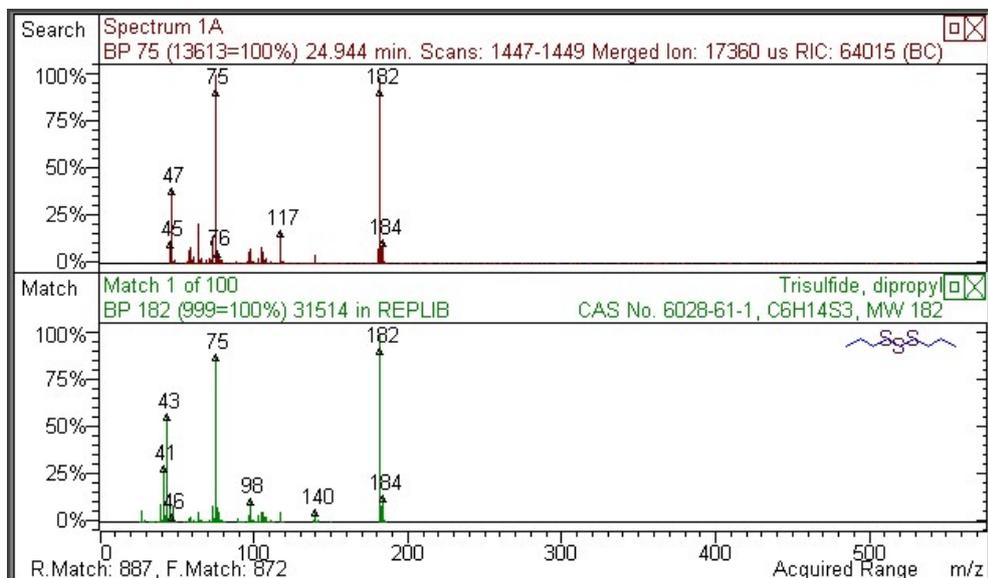
Il Metil propil trisulfide ha un peso molecolare di 154,3 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 154 m/z, 112 m/z e 43 m/z. Nell'immagine 33 è rappresentato il pathway di frammentazione di Metil propil trisulfide paragonato a quello in libreria NIST.



33) Ion pathway di Metil propil trisulfide

Frammentazione di Dipropile trisulfide

Il Dipropile trisulfide ha un peso molecolare di 182,4 g/mol e appare con i frammenti caratteristici a 43 m/z, 182 m/z e 75 m/z. Nell'immagine 34 è rappresentato il pathway di frammentazione di Dipropile trisulfide paragonato a quello in libreria NIST.



34) Ion pathway di Dipropile trisulfide



8) CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha avuto come oggetto lo sviluppo di metodi analitici cromatografici, spettrografici e ottenimento di oli essenziali da matrici vegetali. Ottenere tramite distillazione, sia semplice che in continuo, ha avuto inizialmente problematiche legate alla temperatura ma, in conclusione, sperimentato il modo corretto si è riuscito ad avere una quantità apprezzabile di distillato. Ottenuta la frazione arricchita in volatili mediante estrazione con solvente organico la procedura di analisi è finalizzata con utilizzo di tecniche cromatografiche, GC-FID e GC-MS, e NMR come tecnica spettroscopica. Lo sviluppo del metodo Mirra_Alberto è stato frutto di continue analisi, ponendo il focus sulle caratteristiche lavorative della colonna e la temperatura con cui i composti target eluiscono meglio. L'assenza di metodi analitici verificati e metodi specifici ha spinto a sviluppare metodi cromatografici sensibili con tempi di analisi contenuti per limitare costi ed impatto ambientale. I metodi utilizzati hanno permesso di eseguire la caratterizzazione di oli essenziali ottenendo il "fingerprint", svolgere analisi quali-quantitative dei volatili presenti nelle materie prime. Il mercato, a fronte di interesse sia farmaceutico ma soprattutto cosmetico, richiede studi corredati da dati solidi e ripetibili per garantire la standardizzazione dei prodotti e conformità tra titolo di attivi presenti e riportato in indicazione del prodotto. Con questo elaborato è stato possibile conoscere, risolvendo nei casi specifici, i diversi approcci in relazione alla matrice da distillare, impostare metodi diversi per permettere una buona efficienza e separazione "fingerprint" nei cromatogrammi. Le problematiche più evidenti sono state riscontrate nelle prime distillazioni e nelle analisi iniziali, quando ancora sia l'estratto ottenuto che i parametri strumentali non coincidevano con i risultati voluti.

Bibliografia

Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46)

Assessment of Antimicrobial Activity of Onion Extract (*Allium cepa*) on *Staphylococcus aureus*; in vitro study. (2014). *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences*, 1.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*,

Batiha, G. E.-S., Wasef, L., Teibo, J. O., Shaheen, H. M., Zakariya, A. M., Akinfe, O. A., Teibo, T. K. A., Al-kuraishy, H. M., Al-Garbee, A. I., Alexiou, A., & Papadakis, M. (2023). Commiphora myrrh: a phytochemical and pharmacological update. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 396(3)

Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkula, W., & No, H. K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25(3)

Block, E. (1985). The Chemistry of Garlic and Onions. *Scientific American*, 252(3), 114–118.

Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*,

Calvey, E. M., White, K. D., Matusik, J. E., Sha, D., & Block, E. (1998). *Allium* chemistry: identification of organosulfur compounds in ramp (*Allium tricoccum*) homogenates. Dedicated with best wishes to Professor G. H. Neil Towers on the occasion of his 75th birthday. *Phytochemistry*, 49(2)

CARIDI, D., TRENERRY, V., ROCHFORD, S., DUONG, S., LAUGHER, D., & JONES, R. (2007). Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105(2)

Chemat, F., & Boutekedjiret, C. (2015). Extraction // Steam Distillation ☆. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*.

Christensson, J. B., Matura, M., Gruvberger, B., Bruze, M., & Karlberg, A.-T. (2010). Linalool - a significant contact sensitizer after air exposure. *Contact Dermatitis*, 62(1)

Cserháti, T. (2010). *Chromatography of aroma compounds and fragrances*. Springer Science & Business Media.

- Cserhati T. (n.d.). *Chromatography of aroma compounds and fragrances*.
- De Martino, L., de Feo, V., & Nazzaro, F. (2009). Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial and Mutagenic Activities of Seven Lamiaceae Essential Oils. *Molecules*.
- D'Onofrio, C., Boss, P. K., & Cox, A. (2009). FLAVOUR BIOSYNTHESIS PATHWAYS IN GRAPE CELL CULTURES: SESQUITERPENES BIOSYNTHESIS. *Acta Horticulturae*
- Durairaj, J., di Girolamo, A., Bouwmeester, H. J., de Ridder, D., Beekwilder, J., & van Dijk, A. DJ. (2019). An analysis of characterized plant sesquiterpene synthases. *Phytochemistry*.
- Fonseca, C. O. da, Teixeira, R. M., Ramina, R., Kovaleski, G., Silva, J. T., Nagel, J., & Quirico-Santos, T. (2011). Case of Advanced Recurrent Glioblastoma Successfully Treated with Monoterpene Perillyl Alcohol by Intranasal Administration. *Journal of Cancer Therapy*.
- Freitas, J. V. B., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., Zocolo, G. J., de Brito, E. S., & Gramosa, N. v. (2018). Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of *Ocimum*. *Talanta*, 180, 329–336.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Ikram, N. K. B. K., Zhan, X., Pan, X.-W., King, B. C., & Simonsen, H. T. (2015). Stable heterologous expression of biologically active terpenoids in green plant cells. *Frontiers in Plant Science*.
- Illahi, A. A. C., Dadios, E. P., Bandala, A. A., & Vicerra, R. R. P. (2021). Electronic Nose Technology and Application: A Review. *2021 IEEE 13th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment, and Management (HNICEM)*
- Janbee shaik, V. K. R. D. (n.d.). *Commiphora myrrh: a phytochemical and pharmacological update*.
- Kumari, K., & Augusti, K. T. (2007). Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 109.
- Li, Z., Howell, K., Fang, Z., & Zhang, P. (2020). Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Mahattanatawee K, R. R. (2011). *Gas chromatography/olfactometry (GC/O)*.

Mansell, T. J. (2010). A Review of “Garlic and Other Alliums: The Lore and the science.” *Food and Foodways*, 18(3)

Mateus, E., Barata, R. C., Zrostlíková, J., Gomes da Silva, M. D. R., & Paiva, M. R. (2010). Characterization of the volatile fraction emitted by *Pinus* spp. by one- and two-dimensional chromatographic techniques with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1217(11)

Mockute, D., & Bernotiene, G. (2001). The α -terpenyl acetate chemotype of essential oil of *Thymus pulegioides* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(1)

PENUELAS, J., & MUNNEBOSCH, S. (2005). Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science*.

Suleria, H. A. R., Butt, M. S., Anjum, F. M., Saeed, F., & Khalid, N. (2015). Onion: Nature Protection Against Physiological Threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(1)

Sun, N.-N., Wu, T.-Y., & Chau, C.-F. (2016). Natural Dietary and Herbal Products in Anti-Obesity Treatment. *Molecules*, 21(10)

Tang, G.-Y., Meng, X., Li, Y., Zhao, C.-N., Liu, Q., & Li, H.-B. (2017). Effects of Vegetables on Cardiovascular Diseases and Related Mechanisms. *Nutrients*, 9(8)

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1)

Wojtunik-Kulesza, K. A., Kasprzak, K., Oniszczyk, T., & Oniszczyk, A. (2019). Natural Monoterpenes: Much More than Only a Scent. *Chemistry & Biodiversity*

Wood, C., Siebert, T. E., Parker, M., Capone, D. L., Elsey, G. M., Pollnitz, A. P., Eggers, M., Meier, M., Vössing, T., Widder, S., Krammer, G., Sefton, M. A., & Herderich, M. J. (2008). From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Yoshimoto, N., Onuma, M., Mizuno, S., Sugino, Y., Nakabayashi, R., Imai, S., Tsuneyoshi, T., Sumi, S., & Saito, K. (2015). Identification of a flavin-containing *S*-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic. *The Plant Journal*, 83(6)

Yu, F., & Utsumi, R. (2009). Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono- and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*

Zhang, P., Fuentes, S., Siebert, T., Krstic, M., Herderich, M., Barlow, E. W. R., & Howell, K. (2016). Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chemistry*.

Zhu, N., Sheng, S., Sang, S., Rosen, R. T., & Ho, C.-T. (2003). Isolation and characterization of several aromatic sesquiterpenes from *Commiphora myrrha*. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(4)