POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Studio dell'attività antimicrobica di oli essenziali

Relatori

prof. Davide Fissore
prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Diego Burdizzo

Marzo 2022

Indice

1 Introduzione 1

1.1 Gli oli essenziali 1

1.1.1 L'estrazione degli oli essenziali 2

1.1.2 La composizione chimica degli oli essenziali 4

1.1.3 Il meccanismo di azione degli oli essenziali 7

1.1.4 Metodologie di valutazione dell'attività antimicrobica 9

1.1.5 Studi sull'attività antimicrobica degli oli essenziali 10

1.2 Scopo del lavoro 11

2. Materiali e metodiche sperimentali 13

2.1 Materiali 13

2.2 Microrganismi e condizioni colturali 14

2.3 Prove sperimentali per la valutazione delle proprietà antibatteriche degli oli essenziali 15

2.3.1 Preparazione degli oli essenziali 15

2.3.2 Prove preliminari sugli oli essenziali 16

2.3.2.1 Prove con il metodo di diffusione su agar 16

2.3.2.2 Prove con il metodo di volatilizzazione dal disco 18

3 Analisi dei risultati 21

3.1 Studio dell'attività degli oli essenziali con il metodo della diffusione su agar 21

3.1.1 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 37°C 21

3.1.2 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 28°C 24

3.1.3 Confronto con *S. epidermidis* a 37°C 30

3.1.4 Effetti nei confronti di *R. mucilaginosa* 33

3.2 Studio dell'attività degli oli essenziali con il metodo della volatilizzazione dal disco 33

3.2.1 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 37°C 33

3.2.2 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 28°C 35

3.2.3 Confronto con *S. epidermidis* a 37°C 37

3.2.4 Effetti del diluente sulla diffusione dell'OE di origano in fase vapore 39

3.2.5 Effetti degli OE nei confronti di *R. mucilaginosa* 41

3.2.6 Effetti degli OE nei confronti di *A. alternata* 42

3.3 Confronto tra gli effetti della diffusione su agar e della volatilizzazione dal disco 52

4 Conclusioni **55**
5 Bibliografia **57**

1 Introduzione

L'uomo ha da sempre dovuto difendersi dai microrganismi patogeni responsabili di malattie anche gravi o letali, affinando via via le proprie conoscenze in questo settore e le metodologie impiegate per difendersi grazie al progresso tecnologico e alla ricerca scientifica.

La pandemia originata dal virus SARS-CoV-2, che da dicembre 2019 sta mietendo milioni di vittime in tutto il mondo e mettendo in crisi molti settori economici, ha costretto i Paesi ad aggiornare, e mettere in atto, i piani pandemici e i protocolli di prevenzione. Tra le misure adottate figurano il distanziamento interpersonale, l'uso di dispositivi di protezione individuale come le mascherine e la frequente disinfezione delle mani e delle superfici. Per quest'ultimo scopo, sono utilizzati per lo più gel e sanificanti a base alcolica (almeno 75% di etanolo) e, durante la prima ondata pandemica, sono andate rapidamente esaurite molte scorte di questi prodotti.

Inoltre, la sempre maggiore resistenza agli antibiotici di alcuni ceppi patogeni e la necessità di trovare prodotti sanitari sempre più ecocompatibili per limitare l'impatto sull'ambiente e contenere il riscaldamento climatico hanno spinto la ricerca a indagare nuove soluzioni.

Guardando alla natura stessa, molte piante attuano meccanismi di difesa dai microrganismi producendo o secernendo particolari sostanze, gli oli essenziali (OE), con proprietà antiossidanti e antimicrobiche. L'estrazione di queste sostanze ha permesso il loro utilizzo nell'industria farmaceutica e dei profumi, nell'industria alimentare per migliorare la conservazione di alcuni cibi e il loro sapore (Bakkali *et al.,* 2008): la fonte principale è stata infatti individuata in alcune piante ed erbe aromatiche come timo, origano e rosmarino, e in alcuni agrumi.

L'interesse verso le potenzialità antimicrobiche di questi composti naturali è cresciuto ulteriormente, trovando campo d'indagine contro batteri, lieviti, funghi e anche contro il SARS-CoV-2, contro il quale è stata testata una cura per pazienti infetti, prima della messa a punto dei vaccini (Kanyinda, 2020).

1.1 Gli oli essenziali

Gli oli essenziali sono costituiti da un insieme di sostanze volatili fortemente odorose che vengono prodotte dal metabolismo secondario di numerose piante, ovvero non si tratta di composti necessari alla vita e alla sopravvivenza delle cellule, bensì di un insieme di componenti, a basso peso molecolare, utili all'organismo vivente in quanto presentano una funzione antiossidante e protettiva contro i microrganismi potenzialmente dannosi.

Questi composti naturali vengono prodotti sotto forma di goccioline dentro cavità rotondeggianti, dette vacuoli, nei fiori, nella buccia dei frutti, nelle foglie, nelle radici, nella corteccia e nel legno di molte piante aromatiche alle quali conferiscono l'odore caratteristico. La loro secrezione può fungere sia da protezione verso agenti patogeni esterni, sia da richiamo nei confronti degli insetti impollinatori, mentre un loro accumulo nei dotti o in specifiche tasche ha un ruolo allelopatico, ovvero inibisce la crescita di piante infestanti e contiene il numero degli esemplari della stessa specie.

1.1.1 L'estrazione degli oli essenziali

La scelta della metodologia di estrazione di un olio essenziale varia in funzione dell'allocazione dell'olio stesso nelle parti della pianta ed è il processo che ne determina la composizione e la purezza finali.

Le tecniche di estrazione più utilizzate sono la distillazione con vapore, l'estrazione con solvente e la spremitura a freddo.

- Distillazione con corrente di vapore

Questo metodo è il più utilizzato e permette di estrarre gli oli essenziali sia dai vegetali freschi, sia da quelli secchi, grazie alla loro proprietà fisica di essere volatili e idrofobici, quindi facilmente vaporizzabili, trascinabili dal vapore e separabili dall'acqua.

Come schematizzato in Figura 1.1, una fonte di calore porta in ebollizione l'acqua. Nella camera di estrazione, il vapore generato passa attraverso i fori di un piatto sul quale è posta la materia vegetale precedentemente pulita; il calore rende le pareti cellulari e le sacche oleose più permeabili fino a determinarne la rottura e il rilascio dell'essenza, che vaporizza. La corrente di vapore ed olio che risale viene fatta condensare e raccolta in un separatore dove la fase oleosa, meno densa, si raccoglie nella parte superiore. L'acqua che viene spurgata dal fondo, chiamata idrolato, presenta ancora un piccolo residuo di olio e sostanze maggiormente idrofile, ed è perciò utilizzata dell'industria cosmetica e nella produzione di acque profumate.

La distillazione in corrente di vapore permette di estrarre circa il 93% degli oli essenziali, mentre per il restante 7% è necessario utilizzare altre tecniche (Masango, 2005).

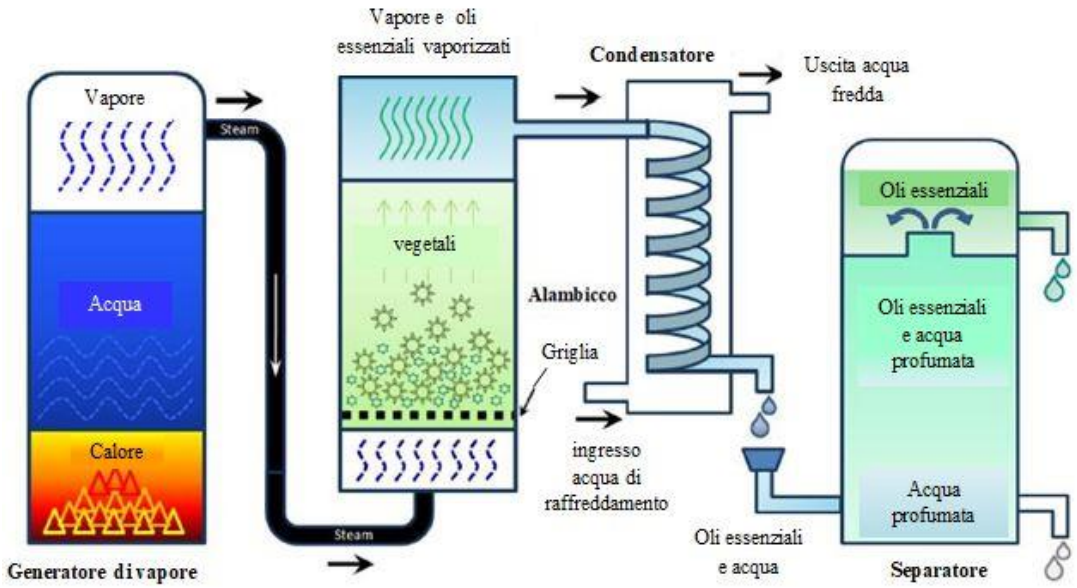

Figura 1.1: schema del processo di distillazione con vapore degli oli essenziali. *Figura tratta da Tongnuanchan e Benjakul (2014), con modifiche.*

Una variante di questa metodologia consiste nell'immergere direttamente le parti vegetali nella camera di estrazione, realizzando così l'idrodistillazione. In questo modo, si elimina in parte il problema del surriscaldamento dell'olio vaporizzato e la stessa estrazione può essere condotta anche a temperature inferiori a 100°C (Tongnuanchan e Benjakul, 2014).

- Estrazione con solvente

Per parti vegetali più delicate, come i fiori, viene spesso utilizzata l'estrazione con solventi chimici: i più comuni sono acetone, esano, metanolo ed etanolo.

Come rappresentato in Figura 1.2, la materia vegetale, precedentemente sminuzzata per favorire l'estrazione, viene bagnata o immersa nel solvente che assorbe l'olio essenziale. L'estratto, chiamato **concreta**, di consistenza cerosa, viene filtrato e separato dal solvente mediante una distillazione a bassa pressione. Un secondo solvente, generalmente alcol, è usato per eliminare le componenti non aromatiche. Segue una seconda distillazione a vuoto per eliminare il solvente (Pateiro *et al.*, 2018) e ottenere un prodotto chiamato **assoluta**, poiché non è un vero e proprio olio essenziale, essendo contaminato da tracce di solvente. Tale composto viene utilizzato perciò nell'industria di profumi e non in quella alimentare.

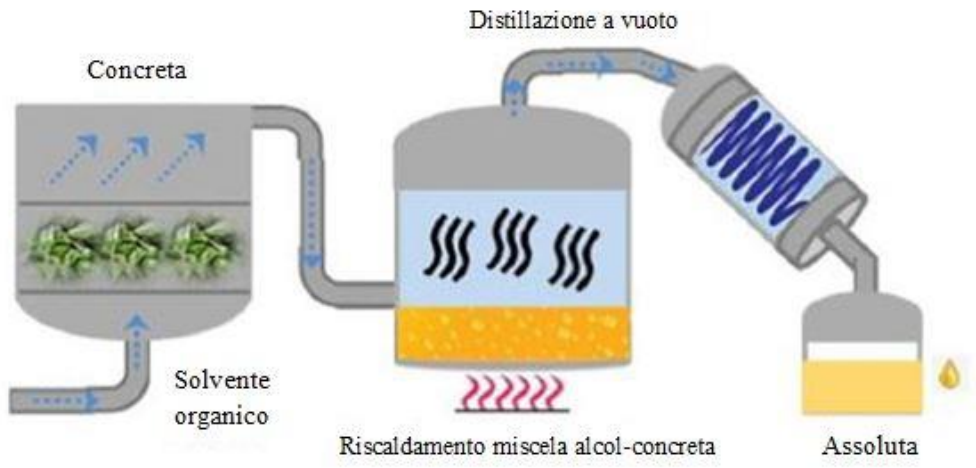

Figura 1.2: schema del processo di estrazione con solvente degli oli essenziali. *Figura tratta da Pateiro et al. (2018), con modifiche.*

Per ovviare a questa problematica, a scapito però di un costo maggiore, si può utilizzare l'estrazione con CO_2 in condizioni supercritiche: ad alta pressione, l'anidride carbonica si trasforma in un liquido inerte che riesce a separare la componente aromatica dal vegetale. Il ritorno alle condizioni di pressione ambiente consente di ottenere l'olio essenziale praticamente puro (Tongnuanchan e Benjakul, 2014).

- Spremitura a freddo

E' una tecnica utilizzata per estrarre gli oli essenziali contenuti nelle bucce degli agrumi, schematizzata in Figura 1.3. Le sacche oleifere contenute nel *flavedo*, un sottile strato della scorza degli agrumi, vengono rotte mediante l'azione meccanica di un torchio, che ne fa fuoriuscire il contenuto. Esso viene raccolto e separato dal succo e da altri componenti idrofili mediante centrifugazione.

Figura 1.3: schema del processo di spremitura a freddo degli oli essenziali. *Figura tratta da https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html e riprodotta con modifiche.*

1.1.2 La composizione chimica degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono miscele complesse costituite anche da un centinaio di composti diversi la cui concentrazione varia in funzione del tipo di pianta da cui sono estratti, dal clima, dalla stagione e dalle modalità di raccolta ed estrazione. Nonostante ciò, poche unità di componenti sono presenti in quantità rilevanti (20 - 70%), mentre i restanti vengono identificati solo in tracce (Bakkali *et al.*, 2008).

Alla prima categoria appartengono composti terpenici e loro derivati, in particolare monoterpeni (C_{10}) e sesquiterpeni (C_{15}), la cui struttura deriva dalla polimerizzazione rispettivamente di due e di tre unità isopreniche. In Figura 1.4 viene riportata la struttura chimica dell'isoprene e due esempi di terpeni da esso derivati che compongono gli oli essenziali di geranio, citronella e rosa.

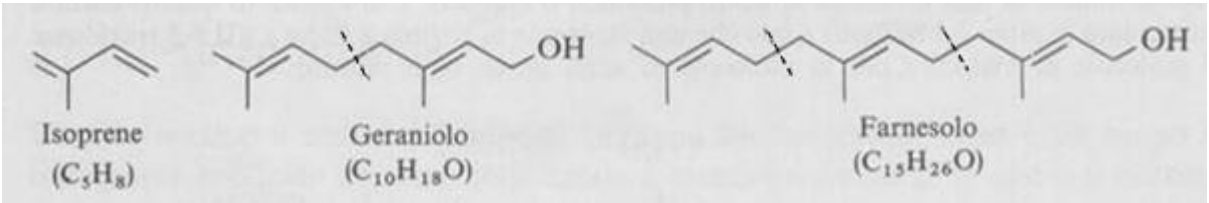

Figura 1.4: strutture dell'isoprene e di alcuni suoi derivati presenti negli oli essenziali. *Figura tratta da https://www.chimica-online.it/organica/terpeni.htm, con modifiche.*

Bakkali *et al.* (2008) classificano i monoterpeni in base ai gruppi funzionali presenti:

- idrocarburi ciclici (es. p-cimene, pinene) e aciclici (es. mircene);
- alcoli (es. geraniolo, linalolo estratto dal legno di rosa, santalolo);
- aldeidi (es. geraniale e citronellale, componenti che conferiscono l'aroma agli oli essenziali di melissa e citronella);
- chetoni (es. mentone, piperitone della pianta della menta);
- esteri (es. linalil acetato ottenuto dalla lavanda, mentil acetato);
- eteri (es. anetolo, estratto dall'anice stellato);
- fenoli (es. timolo, carvacrolo, presenti in erbe aromatiche come timo e origano);
- ossidi (es. 1,8-cineolo, principale costituente dell'olio essenziale di eucalipto).

In Figura 1.5 sono rappresentati le strutture di alcuni terpeni comunemente presenti negli oli essenziali.

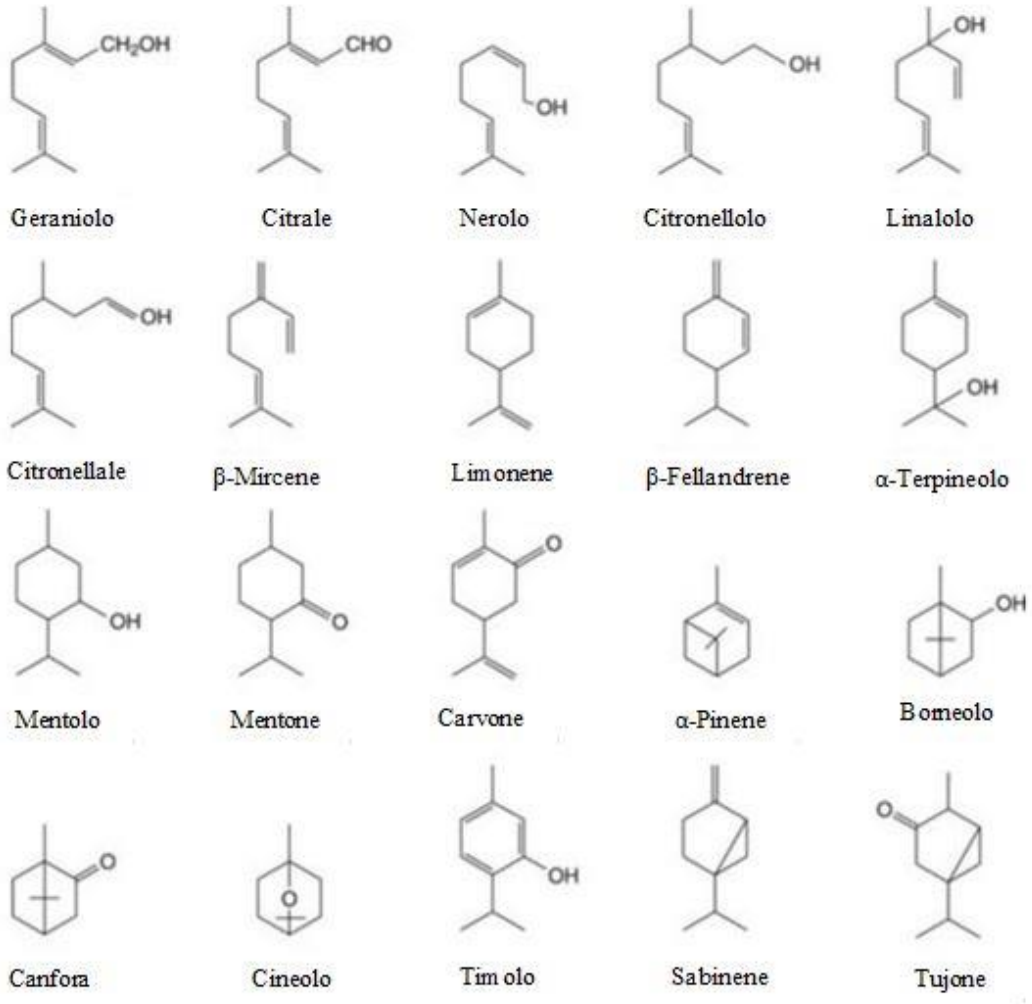

Figura 1.5: strutture dei più comuni composti terpenici presenti negli oli essenziali. *Figura tratta da https://basicmedicalkey.com/oils-and-resins/ e riprodotta con modifiche.*

Oltre ai terpenoidi, gli oli essenziali sono composti, in misura minore, anche da composti aromatici derivati dal fenilpropano, la cui struttura è riprodotta in Figura 1.6.
La loro classificazione riprende la logica precedente:

- Aldeidi (es. cinnamaldeide, estratta dall'olio di cannella);
- Alcoli (es. alcol cinnamico);
- Fenoli (es. eugenolo, presente nei chiodi di garofano);
- Metossi-derivati (es. anetolo, ottenuto dagli oli essenziali di anice e finocchio);
- Composti di metil diossile (es. apiolo, presente nell'olio essenziale di prezzemolo).

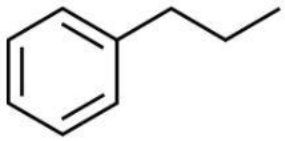

Figura 1.6: strutture dei più comuni composti terpenici presenti negli oli essenziali. *Figura tratta da http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7385.html.*

In Figura 1.7 sono rappresentati alcune delle principali componenti aromatiche che costituiscono gli oli essenziali.

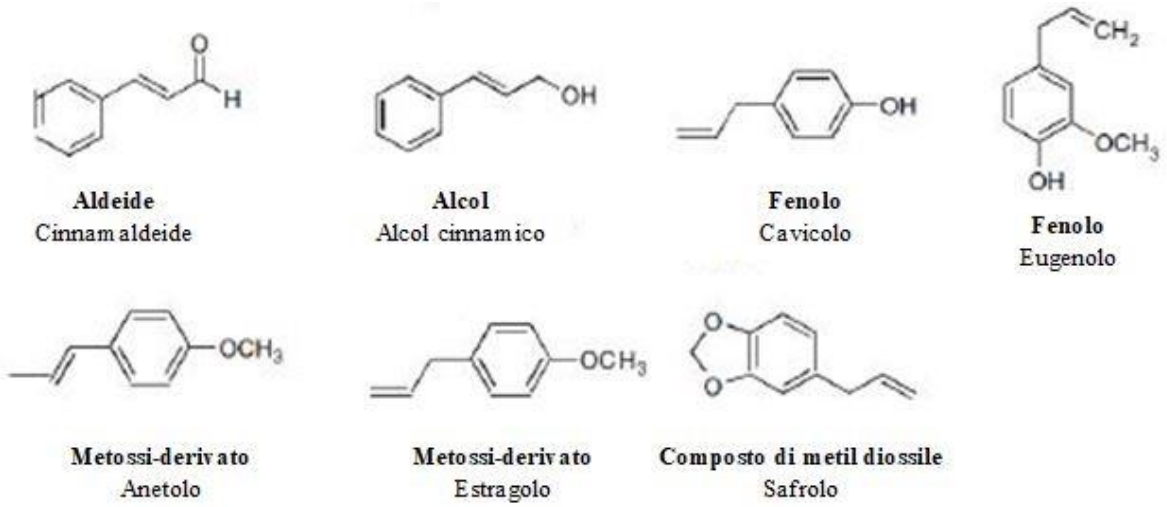

Figura 1.7: strutture di alcuni composti aromatici presenti negli oli essenziali. *Figura tratta da Solgi e Ghorbanpour (2014), con modifiche.*

La composizione degli oli essenziali è determinata solitamente mediante analisi gascromatografica accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Questa tecnica, particolarmente adatta per composti volatili (Marriott *et al.*, 2001), prevede inizialmente la separazione dei componenti trasportati dalla fase mobile gassosa inerte (comunemente elio) in una colonna cromatografica ad affinità: maggiore è l'interazione del componente con la fase stazionaria e più lungo è il tempo di eluizione. Il campione passa successivamente nello spettrometro di massa, dove viene ionizzato in una camera sotto vuoto. Gli ioni ottenuti sono separabili in base alla diversità del loro rapporto massa/carica: essi sono accelerati da un campo elettrico e fatti passare attraverso un elettromagnete, subendo un cambiamento di traiettoria proporzionale alla propria massa. I fasci di ioni raggiungono infine un analizzatore, dove la corrente prodotta dagli ioni viene amplificata e trasformata, mediante un apposito software, in uno spettro in cui ogni picco rappresenta uno ione atomico o molecolare. La Figura 1.8 schematizza l'apparecchiatura precedentemente descritta.

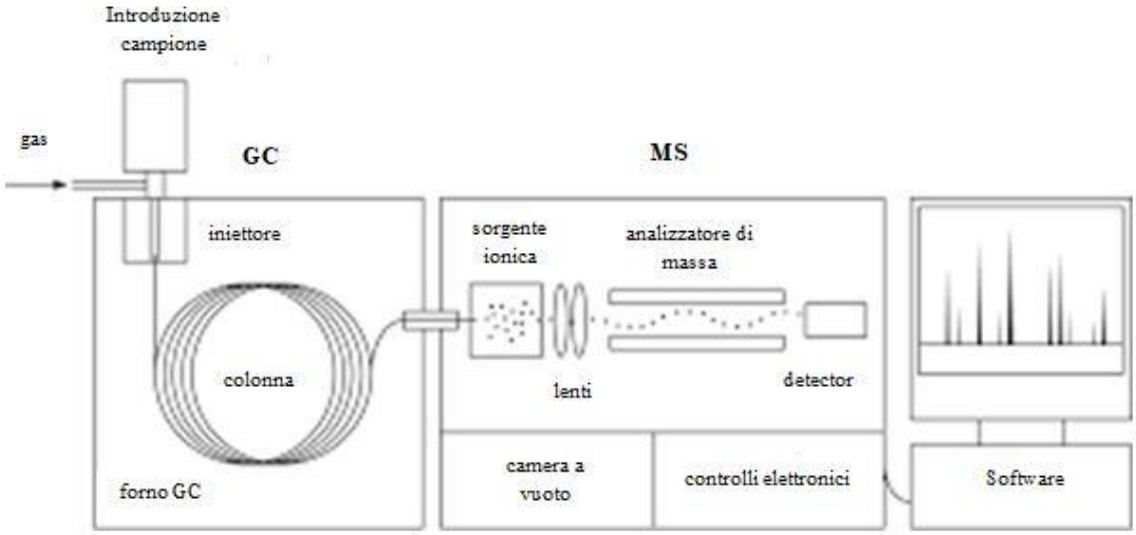

Figura 1.8: schema di un'apparecchiatura GC-MS. *Figura tratta da Sutherland (2019) e riprodotta con modifiche.*

1.1.3 Il meccanismo di azione degli oli essenziali

Nonostante gli oli essenziali siano riconosciuti da molto tempo come efficaci sostanze antimicrobiche, il loro meccanismo e i siti specifici di azione non sono ancora stati univocamente determinati e studiati a causa della loro intrinseca complessità e dell'elevato numero di componenti degli oli stessi. Resta inoltre da indagare con maggiore attenzione il probabile effetto sinergico o antagonistico che alcuni dei numerosi composti chimici presenti negli oli possono dare, piuttosto che essere utilizzati singolarmente uno alla volta.

L'ipotesi più accreditata e studiata si basa sulla capacità di alcuni composti di rompere la membrana plasmatica portando alla lisi della cellula e, conseguentemente, alla morte del microrganismo (Oussalah *et al.*, 2006).

La membrana plasmatica delimita la cellula definendone la forma e il turgore e regola i passaggi di molecole e ioni tra il citoplasma e l'ambiente extracellulare, determinando il potenziale di membrana necessario al microrganismo per svolgere diverse funzioni vitali, fra le quali la produzione dell'ATP. I terpeni degli oli essenziali, in particolare quelli con gruppi fenolici, riescono a diffondere attraverso la membrana lipidica o a posizionarsi all'interno di essa, alterandone la permeabilità e la morfologia della cellula. Di conseguenza, si verifica una marcata riduzione del potenziale di membrana dovuta allo sbilanciamento ionico rispetto alle normali condizioni fisiologiche, con possibile denaturazione di enzimi e proteine presenti nel citoplasma (Nazzaro *et al.*, 2013).

L'aumento della permeabilità di membrana influenza anche la produzione di ATP che subisce un calo a causa dell'inibizione dell'ATPasi dovuta alla riduzione del potenziale di membrana che determina una minor disponibilità di ioni H^+, mentre parte dell'ATP che si trova all'interno della cellula viene idrolizzata (Oussalah *et al.*, 2006). La Figura 1.9 riassume i fenomeni appena descritti.

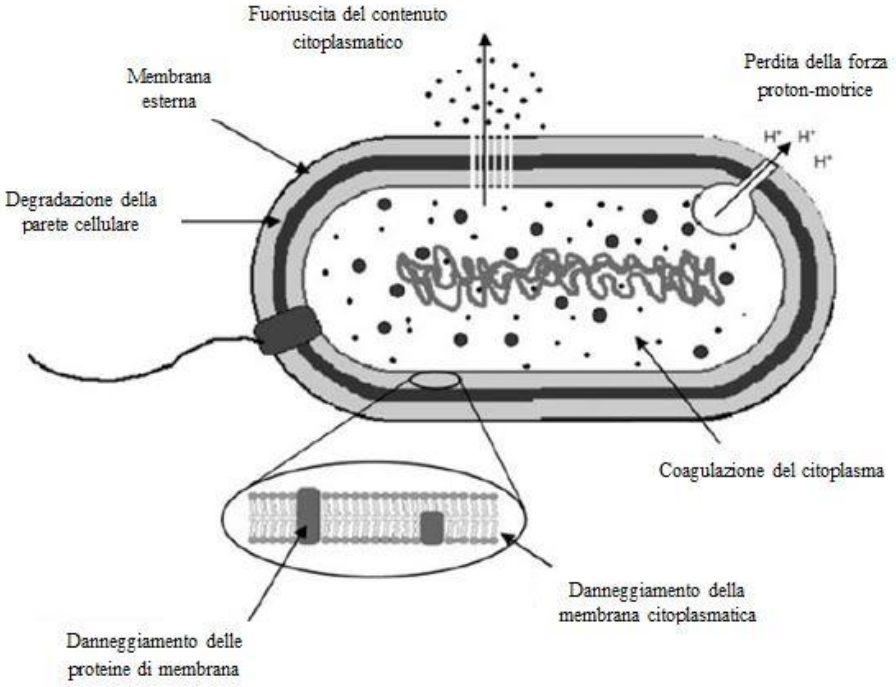

Figura 1.9: rappresentazione degli effetti degli oli essenziali su di una cellula batterica. *Figura tratta da Cetin-Karaca (2011), con modifiche.*

L'effetto degli oli essenziali sui batteri varia in funzione della composizione della parete:

- i batteri Gram positivi, come *S. epidermidis,* presentano una parete composta per oltre il 90% da peptidoglicano e altre proteine ad esso collegate che permette alle molecole idrofobiche degli oli di penetrare facilmente la cellula;
- i batteri Gram negativi, come *E. coli,* possiedono invece una parete più complessa, formata da un sottile strato di peptidoglicano e una membrana fosfolipidica esterna collegati dalla lipoproteina di Braun. Questa struttura poco permeabile li rende più resistenti all'attività antimicrobica degli oli essenziali (Nazzaro *et al.*, 2013).

In maniera del tutto simile a quanto osservato per i batteri, Mani-López *et al.* riportano che, nel caso di funghi e muffe, gli oli essenziali causano un cambiamento della morfologia della parete e della membrana dell'ifa con conseguente loro rottura, svuotamento e assunzione di una forma a bocciolo. Inoltre, anche le membrane mitocondriali possono essere permeate dai componenti degli oli essenziali, portando la cellula alla morte (2021). Questi cambiamenti possono essere facilmente visualizzati per mezzo di microscopi elettronici SEM e TEM.

Anche per i lieviti non sono riportate in letteratura certezze sul meccanismo di azione degli oli essenziali, ma alcuni studi, tra i quali quelli condotti da Konuk e Ergüden (2017) su *S. cerevisiae* misurando il pH e la conducibilità esterna alle cellule dopo essere state a contatto con oli, suggeriscono che le componenti delle essenze agiscano sulla membrana, distruggendola o aumentandone la permeabilità.

Analogamente sembra avvenire per molti virus, contro alcuni dei quali gli oli essenziali hanno una conclamata efficacia (herpes, polio, aviaria H5N1) (Wani *et al.*, 2021) e, studi recenti degli stessi autori, confermerebbero anche contro il SARS-CoV-2.

1.1.4 Metodologie di valutazione dell'attività antimicrobica

In generale, la minima concentrazione di agente antimicrobico, sia esso un antibiotico o un olio essenziale, che inibisce completamente la crescita di un microrganismo, è definita *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), solitamente espressa in mg/L.

Si definisce inoltre *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) la concentrazione minima di sostanza antimicrobica in grado di portare a morte più del 99,9% dei batteri. Analogamente, per i funghi si introduce il concetto di *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC).

Sebbene in letteratura non vi sia una standardizzazione delle metodologie per misurare l'attività antimicrobica di un olio essenziale, le tecniche più utilizzate sono il *metodo di diffusione su agar* in fase solida, il *metodo di volatilizzazione dal disco* in fase vapore, e il *metodo di diluizione su brodo o agar*.

- *Metodo di diffusione su agar*

Consiste nel porre un dischetto di carta da filtro, imbibito dell'olio essenziale da testare, sulla superficie dell'agar precedentemente inoculato con il microrganismo di interesse. Durante l'incubazione, l'olio diffonde nell'agar abbastanza uniformemente in direzione radiale, generando un gradiente di concentrazione dei componenti dell'olio stesso inversamente proporzionale alla distanza dal disco.

L'alone circolare che si viene a creare intorno al disco, oltre ad essere la prova visiva che in quella zona della piastra non è avvenuta crescita microbica, è misurato e quantificato tramite il diametro, espresso in mm: un valore maggiore indica una minor resistenza del patogeno all'olio testato.

Il metodo descritto non consente, tuttavia, di conoscere il valore della MIC, se non una sua approssimazione tramite algoritmi. Questo svantaggio si contrappone alla semplicità e al basso costo di esecuzione dei test (Saad *et al.*, 2013; Balouiri *et al.*, 2016).

Va infine fatto notare che vi sono molte variabili che possono influire sul risultato, tra cui lo spessore e la tipologia di agar, la concentrazione dell'inoculo e la temperatura di incubazione (Saad *et al.*, 2013).

In figura 1.10 è schematizzata la configurazione di una piastra preparata per la prova di diffusione su agar.

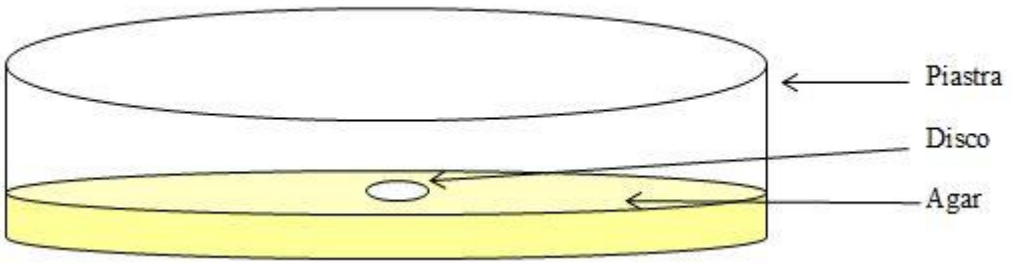

Figura 1.10: schema di una piastra per la prova di diffusione su agar.

- *Metodo di volatilizzazione dal disco*

La piastra Petri viene inoculata con il microrganismo da testare. Un dischetto di carta da filtro viene imbibito di olio essenziale e fatto aderire al coperchio della piastra.

Quest'ultima è incubata al rovescio (Figura 1.11): i vapori dell'olio diffondono nello spazio di testa fino a incontrare l'agar, creando anche in questo caso un gradiente di concentrazione decrescente dalla zona sopra il disco verso il bordo della piastra, fino a raggiungere una concentrazione uniforme per tempi sufficientemente lunghi.

Analogamente al metodo di diffusione su agar, l'alone di inibizione che si crea nella zona soprastante il disco viene misurato tramite il suo diametro.

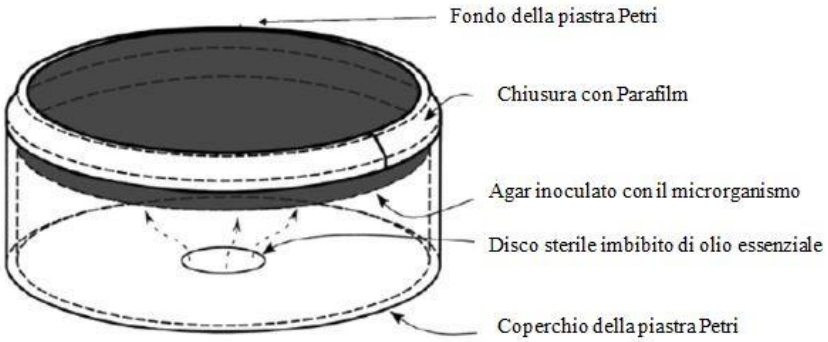

Figura 1.11: configurazione di una piastra nell'allestimento di una prova di volatilizzazione dal disco. *Figura tratta da Tyagi et al. (2012), con modifiche.*

- *Metodo di diluizione su brodo o agar*

Il metodo di diluizione può essere effettuato in un terreno di coltura liquido o solido. E' adatto per batteri e funghi e in particolare per determinare il valore della MIC.

La diluizione su brodo prevede l'utilizzo di piastre con più pozzetti (*multiwell*) all'interno di ognuno dei quali viene aggiunto il terreno di coltura, l'olio essenziale via via diluito alle concentrazioni da testare e l'inoculo.

Le piastre vengono incubate alla temperatura più idonea alla crescita del microrganismo e l'azione inibente e la MIC vengono determinate tramite lettura della densità ottica con lo spettrofotometro: maggiore è la torbidità e più elevata è la crescita microbica.

Per determinare la MBC si piastrano i contenuti di ogni singolo campione e, dopo 24 ore di incubazione, si procede con la conta delle colonie (CFU) a partire dalle concentrazioni di olio più basse, fino a quando non si osserva alcuna crescita (Balouiri *et al.*, 2016).

1.1.5 Studi sull'attività antimicrobica degli oli essenziali

In letteratura, sono numerosi gli studi effettuati per testare l'attività antimicrobica degli oli essenziali su diversi microrganismi con le diverse metodologie in precedenza descritte e per la determinazione della MIC.

Bozin *et al*. (2006) hanno testato alcuni oli essenziali contro tredici ceppi batterici e sei fungini con il metodo di diffusione su agar, constatando che gli oli di origano e timo sono risultati i più efficaci. In particolare, il primo ha mostrato una particolare efficacia anche contro il batterio *Escherichia coli*, noto per essere più resistente in quanto Gram negativo.

Anche Rusenova e Parvanov (2009) confermano un'ottima efficacia di quegli oli su diversi batteri e funghi utilizzando la diffusione su agar; tuttavia, in questo caso, l'olio essenziale di timo è risultato avere un potere inibente maggiore dell'olio di origano.

Questo *trend* è confermato da Ghabraie *et al.* (2016), i quali hanno effettuato delle prove anche con il metodo della volatilizzazione del disco. Seppur *E. coli* sia nuovamente risultato maggiormente inibito dall'olio di timo, i diametri misurati da Ghabraie *et al.* non sono direttamente confrontabili a causa della diversa quantità di olio testato con le due metodologie (rispettivamente 4 µL e 30 µL).

Dalla letteratura, tutte le prove che coinvolgono *E. coli* sono state effettuate incubando il batterio a 35-37°C: non sono stati infatti trovati studi sugli oli essenziali testati contro quel microrganismo condotti ad una temperatura di incubazione inferiore, quindi non è stata ancora trovata una possibile correlazione tra la velocità di diffusione degli oli e la velocità di crescita della popolazione microbica, fattori che dipendono entrambi dalla temperatura.

Studiando l'effetto dell'olio essenziale di timo in fase vapore contro il fungo filamentoso *Alternaria alternata*, Feng *et al.* (2011) hanno osservato un'azione inibente proporzionale alla concentrazione dell'olio. In particolare, con 3 µL di olio è stata osservata un'inibizione dell'80%, mentre dai 4 µL in su, superiore al 90%. E' stata inoltre dimostrata una buona efficacia anche in test *in vivo* condotti sui frutti di pomodori, sebbene con valori inferiori, e testando l'olio anche con il metodo a contatto su agar.

Testando sessantanove oli essenziali contro tre batteri e tre funghi, Kloucek *et al.* (2012), con una variante del saggio in fase vapore, hanno evidenziato come *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger* siano particolarmente sensibili a molti degli oli testati (rispettivamente 39 e 36), tra cui gli oli di timo e origano, e come in generale i funghi filamentosi siano meno resistenti agli oli in fase vapore rispetto ai batteri.

L'efficacia degli oli essenziali è stata dimostrata anche contro i lieviti, sebbene vi siano pochi studi in letteratura. Konuk e Ergüden (2017) hanno effettuato delle prove su *S. cerevisiae* con alcuni oli essenziali, tra i quali timo e origano, con il metodo della diffusione su agar, verificandone l'azione inibente, mentre Butzge *et al.* (2020) hanno sperimentato l'antimicrobicità di tre oli essenziali contro il lievito *Rhodotorula mucilaginosa* con la diffusione su agar. In quest'ultimo lavoro sono stati testati 15 µL di olio essenziale per ogni dischetto, per i quali sono risultati diametri di inibizione che variano tra i 10 mm dell'olio di *Myristica fragrans* ai 40 mm dell'olio di *Cinnamomum cassia*.

Occorre però tenere in considerazione che la diversificazione, anche lieve, nel procedurale delle prove, dei ceppi di microrganismi, degli oli e delle loro concentrazioni e quantità e della temperatura di incubazione, influenzano molto i risultati ottenuti, poiché portano ad un cambiamento della concentrazione e della diffusione delle componenti antimicrobiche.

1.2 Scopo del lavoro

Lo scopo di questa Tesi è valutare l'efficacia antimicrobica degli oli essenziali al fine di inibire o rallentare la crescita di microrganismi.

Gli oli essenziali testati sono l'olio essenziale di origano spagna (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375) e l'olio essenziale di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970).

I microrganismi utilizzati sono il batterio Gram- *Escherichia coli* LMG 08063, il lievito *Rhodotorula mucilaginosa* e il fungo filamentoso *Alternaria alternata* ceppo BNR.

Inizialmente sono state condotte prove con *E. coli*, utilizzando i metodi di diffusione su agar e di volatilizzazione dal disco variando la temperatura di incubazione al fine di confrontare l'azione inibente, dal momento che la temperatura influenza sia la velocità di

crescita del batterio, sia la volatilità dei composti degli oli. A parità di temperatura, l'efficacia degli oli essenziali è stata poi confrontata con i risultati ottenuti nel lavoro di Tesi di Gallo (2021), condotta presso il DISAT (Politecnico di Torino), dove era stato testato nelle medesime condizioni *S. epidermidis,* batterio Gram+.

In seguito è stata testata, sempre contro *E. coli*, l'azione dell'olio essenziale di origano a diverse concentrazioni e in diverse quantità con il metodo di volatilizzazione dal disco.

Gli oli essenziali sono stati poi testati contro il lievito *R. mucilaginosa*, sia con il metodo di diffusione su agar, sia in fase vapore.

Infine, si è proceduto ad effettuare alcune prove con il fungo filamentoso *A. alternata* utilizzando il metodo della volatilizzazione dal disco, testando gli oli in diverse concentrazioni e quantità.

2. Materiali e metodiche sperimentali

2.1 Materiali

In questo lavoro, sono stati utilizzati gli oli essenziali di origano (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375) e di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970), entrambi forniti dall'azienda Witt Italia Spa (Figura 2.1).

Dalla letteratura scientifica (Memar *et al*., 2017; Tullio *et al*., 2007) questi oli essenziali sono risultati essere tra i più efficaci nell'inibire la crescita batterica e fungina grazie alle proprietà antimicrobiche del timolo e del carvacrolo, i composti fenolici presenti in maggior concentrazione.

Figura 2.1: oli essenziali testati nel lavoro di Tesi.

Si riportano in Tabella 2.1 le informazioni di pericolo degli OE utilizzati durante le prove, reperite sulle schede di sicurezza fornite dall'azienda produttrice.

Tabella 2.1: frasi di pericolo degli oli essenziali utilizzati nelle prove.

O.E. ORIGANO SPAGNA	H302	Nocivo se ingerito
	H304	Può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie
	H315	Provoca irritazione cutanea
	H317	Può provocare reazione allergica cutanea
	H319	Provoca grave irritazione oculare
	H413	Può essere nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata
O.E. TIMO ROSSO	H226	Liquido e vapori infiammabili
	H304	Può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie
	H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari
	H411	Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata

Durante la conduzione delle prove, gli oli essenziali sono stati testati puri oppure diluiti, utilizzando come solvente una soluzione acquosa di TEGO SML 20, un tensioattivo non ionico di origine vegetale, liquido e di colore ambrato, detto anche *polisorbato* 20 (Figura 2.2).

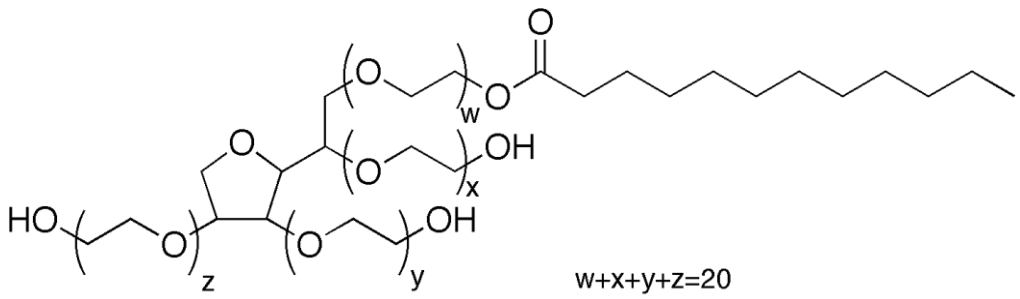

Figura 2.2: struttura chimica del polisorbato 20.
Figura tratta da https://www.zenstore.it/Tego-SML-20--Polysorbate-20-/.

2.2 Microrganismi e condizioni colturali

I microrganismi utilizzati durante le prove e illustrati in Figura 2.3 sono stati:

1. *Escherichia coli* LMG 08063, un batterio Gram negativo;
2. *Alternaria alternata* ceppo BNR, un fungo ascomicete potenziale causa di allergie e asma (Kustrzeba-Wójcicka *et al.*, 2014);
3. *Rhodotorula mucilaginosa*, un lievito pigmentato unicellulare, ubiquitario, caratterizzato da colonie arancioni/rosa.

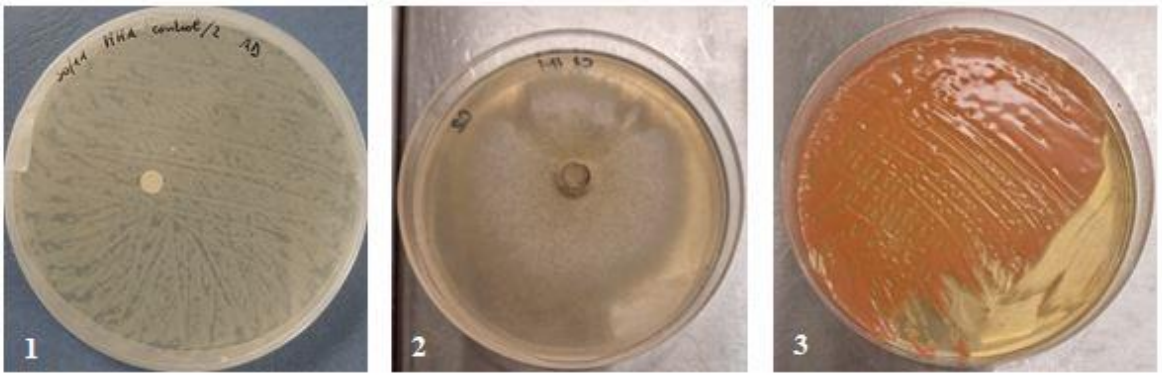

Figura 2.3: microrganismi utilizzati in questo lavoro di Tesi: 1. *E. coli*, 2. *Altrernaria alternata* 3. *Rhodotorula mucilaginosa*.

Tutti i microrganismi sono stati mantenuti a +4°C fino al momento del loro utilizzo.

Il batterio *E. coli* è stato coltivato su terreno nutritivo Mueller Hinton Agar, MHA, (prodotto da OXOID, Ltd., cod. CM0337) a una temperatura di 37°C oppure di 28°C a seconda della prova effettuata. Il terreno MHA è costituito da:

- estratto di carne, 300.0 g/L;
- digerito di caseina, 17.5 g/L;
- amido, 1.5 g/L;
- agar, 17.0 g/L.

Il fungo filamentoso *A. alternata* è stato coltivato a 30°C, su terreno solido Czapeck Dox Agar (CZ), la cui composizione è la seguente:

- $NaNO_3$, 3 g/L;
- K_2HPO_4, 1 g/L;
- $MgSO_4$, 0.5 g/L;
- KCl, 0.5 g/L;
- $FeSO_4$, 0.01 g/L;
- glucosio, 30 g/L;
- agar, 20 g/L.

Il lievito *R. mucilaginosa* è stato coltivato a 30°C su terreno solido Malt Extract Agar (MEA), avente la seguente composizione:

- estratto di malto, 20 g/L;
- peptone, 2 g/L;
- glucosio, 20 g/L;
- agar, 20 g/L.

2.3 Prove sperimentali per la valutazione delle proprietà antibatteriche degli oli essenziali

2.3.1 Preparazione degli oli essenziali

Come anticipato nella sezione 2.1, durante l'attività sperimentale gli oli essenziali sono stati utilizzati puri o opportunamente diluiti con una soluzione acquosa di TEGO SML 20 all'1,5% v/v, sterilizzata mediante microfiltrazione; è stato dunque necessario valutare se il solvente utilizzato nelle diluizioni influenzasse la crescita microbica.

Sono state testate tre diverse diluizioni, riportate in Tabella 2.2, realizzate tutte in condizioni di sterilità.

Tabella 2.2: concentrazioni degli oli essenziali utilizzate.

	Concentrazione di olio essenziale, %
1	100
2	75
3	50

2.3.2 Prove preliminari sugli oli essenziali

Tutti i tipi di microrganismi scelti sono stati testati con il metodo della volatilizzazione dal disco, mentre *E. coli* e *R. mucilaginosa* sono stati testati anche con il metodo della diffusione su agar.

2.3.2.1 Prove con il metodo di diffusione su agar

- *E. coli*

Per la valutazione della capacità antimicrobica degli OE a diretto contatto con il batterio scelto, sono state effettuate diverse prove con il metodo di *diffusione su agar* o *agar diffusion* test (AD).

Nelle prove sono state utilizzate delle piastre di Petri di diametro 90 mm e altezza 15 mm in polistirene. In ciascuna piastra sono stati versati in fase liquida, e successivamente fatti gelificare, 20 mL di terreno MHA, ottenendo un'altezza di circa 5 mm di terreno agarizzato.

In Figura 2.4 è riportata una schematizzazione della geometria della piastra di Petri utilizzata nelle prove.

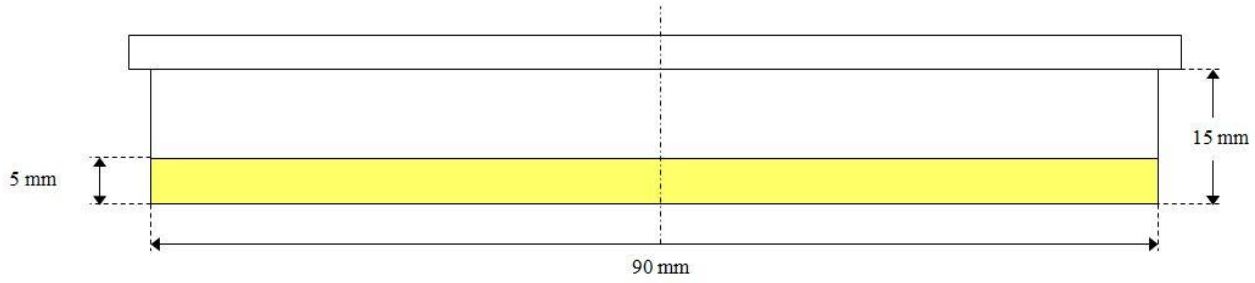

Figura 2.4: geometria delle piastre di Petri utilizzate nelle prove.

Ogni piastra è stata poi inoculata con 100 µL di una sospensione 10^5 CFU/mL dei microrganismi da testare, preparata con il *metodo della sospensione diretta delle colonie*: sono state prelevate tre colonie distinte da una coltura batterica cresciuta per 24 ore su terreno MHA alla temperatura stabilita dalla prova, e sospese in 5 mL di una soluzione salina allo 0,85% di NaCl, ottenendo una sospensione di microrganismi di 10^8 CFU/mL; questa è stata

poi progressivamente diluita con la stessa soluzione salina fino alla concentrazione di 10^5 CFU/mL. La preparazione dell'inoculo è avvenuta in condizioni di sterilità.

E' stato ritagliato un dischetto di carta da filtro di tipo qualitativo, Whatman n°1, di 5 mm di diametro; avvenuta la sua sterilizzazione in autoclave, è stato appoggiato sull'agar al centro della piastra inoculata e imbibito con 3 µL di olio essenziale alle diverse concentrazioni.

Per valutare se il solvente utilizzato per le diluizioni influenzasse la crescita microbica, sono state realizzate delle piastre di controllo nelle quali il dischetto è stato imbibito con 3 µL di soluzione acquosa di TEGO 1,5% v/v.

Le piastre sono state chiuse con Parafilm e avvolte in uno strato di pellicola trasparente per limitare la fuoriuscita dei vapori degli oli essenziali e infine incubate alla temperatura di incubazione stabilita per 48 ore. Ciascuna prova è stata eseguita in triplicato.

Nell'esposizione dei risultati, l'esito delle prove verrà espresso come valore del diametro medio dell'alone di inibizione, ovvero della zona creatasi intorno al dischetto imbibito di OE in cui non si è verificata crescita batterica.

La misura del diametro è stata effettuata utilizzando un righello millimetrato lungo due direzioni perpendicolari. I risultati saranno espressi in mm.

- *R. mucilaginosa*

In ciascuna piastra sono stati versati in fase liquida, e successivamente fatti gelificare, 20 mL di terreno MEA, ottenendo un'altezza di circa 5 mm di terreno agarizzato.

Ogni piastra è stata poi inoculata con 100 µL di una sospensione 10^5 CFU/mL del lievito, preparata con il *metodo della sospensione diretta delle colonie*: sono state prelevate cinque colonie distinte da una coltura cresciuta su terreno MEA ad una temperatura di incubazione di 30°C nelle 72 ore precedenti l'allestimento della prova stessa e sospese in 5 mL di acqua, ottenendo una sospensione di microrganismi di 10^8 CFU/mL; questa è stata poi progressivamente diluita con acqua fino alla concentrazione di 10^5 CFU/mL.

La preparazione dell'inoculo è avvenuta in condizioni di sterilità.

L'allestimento delle prove ha poi seguito il procedimento già illustrato per *E. coli*, incubando però il lievito a 30°C.

In Figura 2.5 è riportata la schematizzazione di una generica piastra coltivata con batteri o lieviti dopo prova di diffusione su agar.

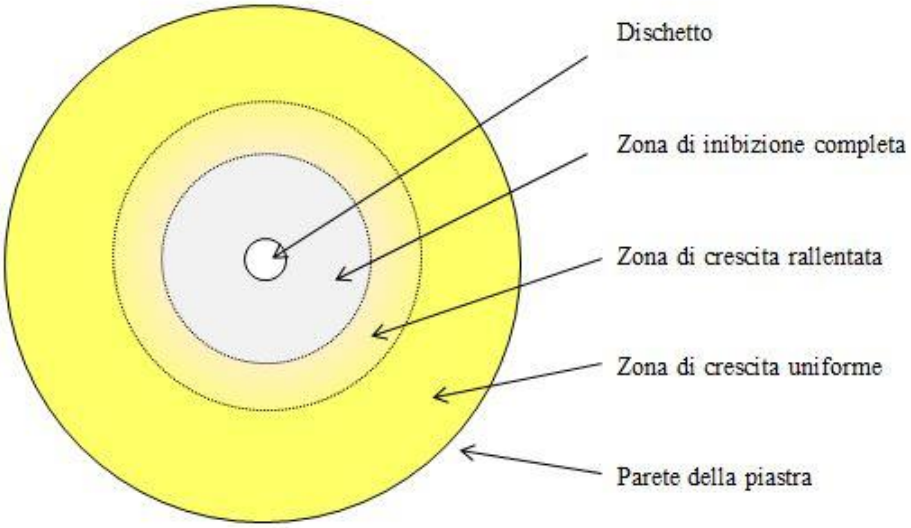

Figura 2.5: schema di una piastra inoculata con batteri o lieviti dopo prova di diffusione su agar

In Tabella 2.3 è riportato uno schema riassuntivo delle prove di diffusione su agar effettuate.

Tabella 2.3: schema riassuntivo delle prove di diffusione su agar.

	Oli essenziali testati	**Microrganismi testati**	**Concentrazioni testate, %**	**Quantità di OE testate, µL**	**Temperatura di incubazione, °C**
prova 1	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*E. coli*	100 75 50	3	37
prova 2	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*E. coli*	100 75 50	3	28
prova 3	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*R. mucilaginosa*	100 75 50	3	30

2.3.2.2 Prove con il metodo di volatilizzazione dal disco

- *E. coli*

La preparazione delle piastre è la medesima allestita per le prove di diffusione su agar e descritta in precedenza nel capitolo 2.3.2.1; l'unica variazione consiste nel posizionare il dischetto di carta da filtro di tipo qualitativo, Whatman n°1, al centro del coperchio della piastra, utilizzando un quadratino di nastro biadesivo. Le piastre di controllo sono state realizzate imbibendo il dischetto con 3 µL di soluzione acquosa di TEGO 1,5% v/v. In alcune prove, sono stati utilizzati dischetti da 10 mm di diametro; in tal caso il volume applicato è stato di 10 µL.

Le piastre sono state chiuse con Parafilm e avvolte in uno strato di pellicola trasparente per limitare la fuoriuscita dei vapori degli oli essenziali e infine incubate capovolte alla temperatura di incubazione stabilita per 48 ore.
Ciascuna prova è stata eseguita in triplicato.

I risultati saranno espressi come già descritto nel paragrafo 2.3.2.1.

- *R. mucilaginosa*

La preparazione delle piastre è analoga a quella dello stesso lievito descritto nel capitolo 2.3.2.1, nelle quali però il dischetto è stato applicato al coperchio e le piastre sono state incubate capovolte.

Lo schema riassuntivo delle prove effettuate con questa metodologia è riportato nella tabella 2.4.

Tabella 2.4: schema riassuntivo delle prove di volatilizzazione dal disco.

	Oli essenziali testati	**Microrganismi testati**	**Concentrazioni testate, %**	**Quantità di OE testate, µL**	**Temperatura di incubazione, °C**
prova 1	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*E. coli*	100 75 50	3	37
prova 2	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*E. coli*	100 75 50	3	28
prova 3	*Origanum vulgaris*	*E. coli*	100	1,5; 3; 5; 10	37
			50	3; 10	
prova 4	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*R. mucilaginosa*	100 75 50	3	30
prova 5	*Origanum vulgaris; Thymus vulgaris*	*A. alternata*	100 75 50	3; 10	30

- *A. alternata*

In ogni piastra, dello stesso tipo di quelle descritte nel capitolo 2.3.2.1, sono stati versati, in fase liquida, 20 mL di terreno CZ, poi fatti gelificare.

Come inoculo, è stato prelevato un disco di 5 mm di diametro, realizzato tramite un foratappi sterile, dalla zona periferica di una colonia del fungo da testare cresciuto su terreno CZ per 7 giorni ad una temperatura di 30°C. Il disco è stato posto al centro della piastra da inoculare con il micelio rivolto verso l'alto. Ogni piastra è stata posta in incubatore a 30°C per 16 ore per far aderire il disco d'inoculo all'agar. La preparazione dell'inoculo è avvenuta in condizioni di sterilità.

I dischetti da imbibire con gli oli essenziali sono gli stessi descritti in precedenza, da 5 mm e 10 mm, sui quali sono stati utilizzati, rispettivamente, 3 µL e 10 µL delle diverse concentrazioni dei due oli.

Nelle piastre di controllo i dischetti sono stati imbibiti con un ugual volume di soluzione TEGO 1,5% in base alla dimensione del dischetto.

Le piastre sono state parzialmente chiuse con Parafilm per evitarne l'apertura e avvolte in uno strato di pellicola trasparente per limitare la fuoriuscita dei vapori degli oli essenziali e infine incubate alla temperatura di 30°C per 10 giorni.

Ciascuna prova è stata eseguita in triplicato.

Nell'esposizione dei risultati, l'esito delle prove verrà espresso come valore del diametro medio della colonia fungina in presenza dei vapori dell'olio e sarà poi confrontato con il valore del diametro medio delle colonie di controllo.

La misura del diametro è stata effettuata utilizzando un righello millimetrato lungo due direzioni perpendicolari. I risultati saranno espressi in mm.

3 Analisi dei risultati

3.1 Studio dell'attività degli oli essenziali con il metodo della diffusione su agar

In queste prove è stata indagata l'efficacia degli oli essenziali di origano (*Origanum vulgaris* oil OE0375) e di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970), nei confronti del batterio *E. coli* e del lievito *R. mucilaginosa*, su terreno solido con il metodo dell'*agar diffusion*, al fine di determinare quale fosse l'olio, e la sua concentrazione, con il maggiore effetto inibente.

3.1.1 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 37°C

I primi test sono stati effettuati posizionando in ogni piastra un dischetto con diametro di 5 mm imbibito con 3 µL di OE alle diverse concentrazioni oggetto di studio e incubando le piastre alla temperatura, comunemente utilizzata negli studi in letteratura, di 37°C.

Nelle prove, sono stati osservati quasi sempre due aloni di inibizione: il primo, nella zona più prossima al disco, di inibizione completa; il secondo, più esterno, di crescita rallentata. Nei dati si è scelto di riportare i diametri relativi all'alone di inibizione completa e a quello totale (inibizione completa più crescita rallentata).

La Tabella 3.1 riporta i valori del diametro medio di inibizione misurati a 24 ore dall'inoculo.

Tabella 3.1: diametro medio alone di inibizione misurato testando 3 µL di OE alle diverse concentrazioni nei confronti di *E. coli* incubato per 24 h a 37°C.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		**OE 75%**		**OE 50%**	
OE	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
Origano	46,0 ± 5,5	38,0 ± 5,3	27,7 ± 2,6	20,6 ± 2,7	20,3 ± 3,9	8,5 ± 1,4
Timo	32,0 ± 1,8	22,7 ± 3,4	29,5 ± 3,1	23,8 ± 1,7	27,7 ± 1,2	17,7 ± 0,8

Dal momento che gli aloni di inibizione dopo 48 ore sono rimasti, nei limiti della riproducibilità delle prove, invariati rispetto agli stessi dopo 24 ore, si è scelto di effettuare la comparazione dell'effetto dei due oli dopo 48 ore in quanto si è maggiormente interessati a valutarne l'azione nel tempo.

La Figura 3.1 mostra le immagini degli aloni di inibizione dopo un periodo di incubazione di 48 ore, nelle quali si può osservare distintamente anche la zona di crescita rallentata.

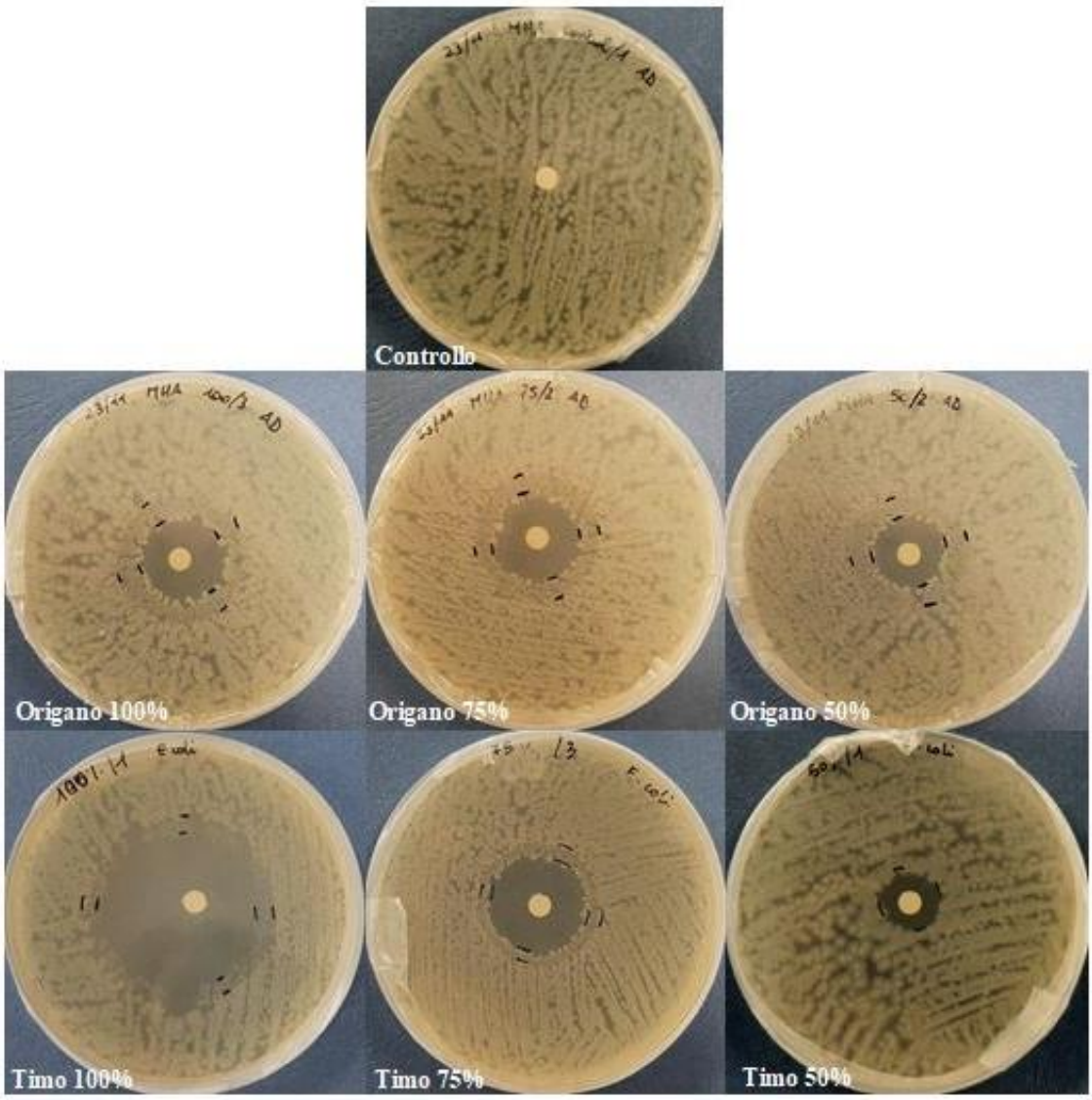

Figura 3.1: crescita di *E. coli* dopo trattamento con OE di origano e timo alle diverse concentrazioni e dopo 48 ore di incubazione.

Nella Tabella 3.2 sono riportati i valori numerici del diametro degli aloni di inibizione dopo 48 ore, mentre l'istogramma di Figura 3.2 li confronta in forma grafica.

Tabella 3.2: diametro medio alone di inibizione misurato testando 3 µL di OE alle diverse concentrazioni nei confronti di *E. coli* incubato per 48 h a 37°C.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		OE 75%		OE 50%	
OE	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
Origano	46,0 ± 5,5	38,0 ± 5,3	27,7 ± 2,6	20,6 ± 2,7	20,3 ± 3,9	8,5 ± 1,4
Timo	32,0 ± 1,8	22,7 ± 3,4	28,2 ± 5,2	22,5 ± 1,4	27,7 ± 1,2	17,7 ± 0,8

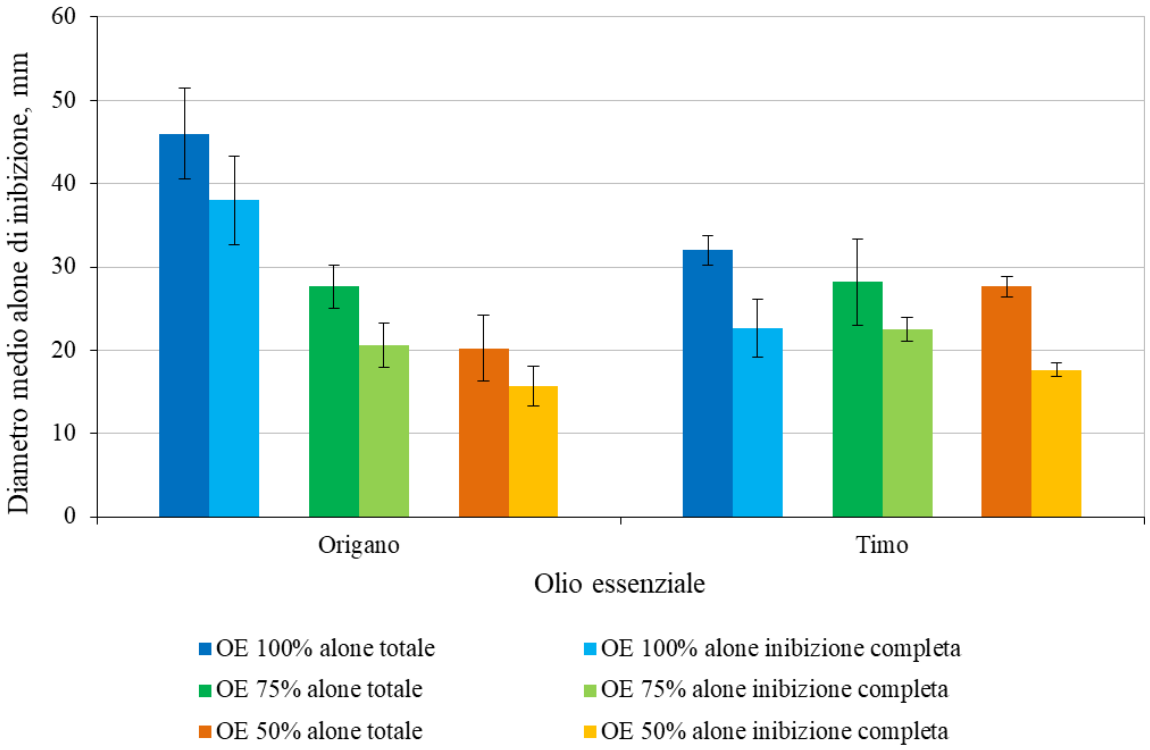

Figura 3.2: diametro medio dell'alone di inibizione degli OE di origano e timo, misurato testando 3 µL di OE alle diverse concentrazioni nei confronti di *E. coli* incubato per 48 h a 37°C.

Dall'analisi dei dati, è stata osservata la maggior efficacia degli oli testati puri rispetto alle loro soluzioni diluite, sebbene solamente per l'OE di origano si possa osservare un *trend* della dimensione degli aloni direttamente proporzionale alla concentrazione di olio.

A parità di concentrazioni, si è notata una maggiore efficacia dell'olio di origano rispetto a quello di timo quando testato puro, mentre i diametri degli aloni di inibizione ottenuti con le

soluzioni diluite sono risultati confrontabili, in particolare se si paragonano quelli relativi all'inibizione completa. Nel caso dell'OE di timo, inoltre, questi ultimi con la diluizione al 75% assumono valori simili a quelli dello stesso olio testato puro.

Alcune delle deviazioni standard calcolate evidenziano un margine di errore piuttosto elevato a causa della variabilità intrinseca nella riproducibilità delle prove, nonché a causa dell'elevata immiscibilità degli oli con il diluente TEGO.

3.1.2 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 28°C

Come già anticipato, le prove effettuate con *E. coli* nello stato dell'arte sono state condotte incubando il batterio ad una temperatura di 35-37°C. Il ceppo utilizzato in questo lavoro di Tesi ha, tuttavia, una temperatura ottimale di crescita di circa 28°C, perciò si è voluta valutare l'azione di 3 µL degli oli essenziali alle diverse concentrazioni anche in queste condizioni più vantaggiose per la crescita del microrganismo.

Nella Tabella 3.3 sono riportati i valori del diametro medio di inibizione misurati a 24 ore dall'inoculo.

Tabella 3.3: diametro medio alone di inibizione misurato testando 3 µL di OE alle diverse concentrazioni nei confronti di *E. coli* incubato per 24 h a 28°C.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		**OE 75%**		**OE 50%**	
OE	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
Origano	28,0 ± 1,4	20,8 ± 1,0	27,0 ± 1,3	20,8 ± 1,3	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0
Timo	28,3 ± 1,8	19,5 ± 3,1	27,8 ± 4,1	19,8 ± 4,8	24,3 ± 2,1	17,8 ± 2,1

Sono state osservate alcune variazioni tra i diametri medi degli aloni dopo 24 e dopo 48 ore, in particolare testando l'olio di timo, ma esse non sono particolarmente rilevanti se confrontate con l'errore che caratterizza le misure.

La Figura 3.3 mostra le immagini degli aloni di inibizione dopo un periodo di incubazione di 48 ore.

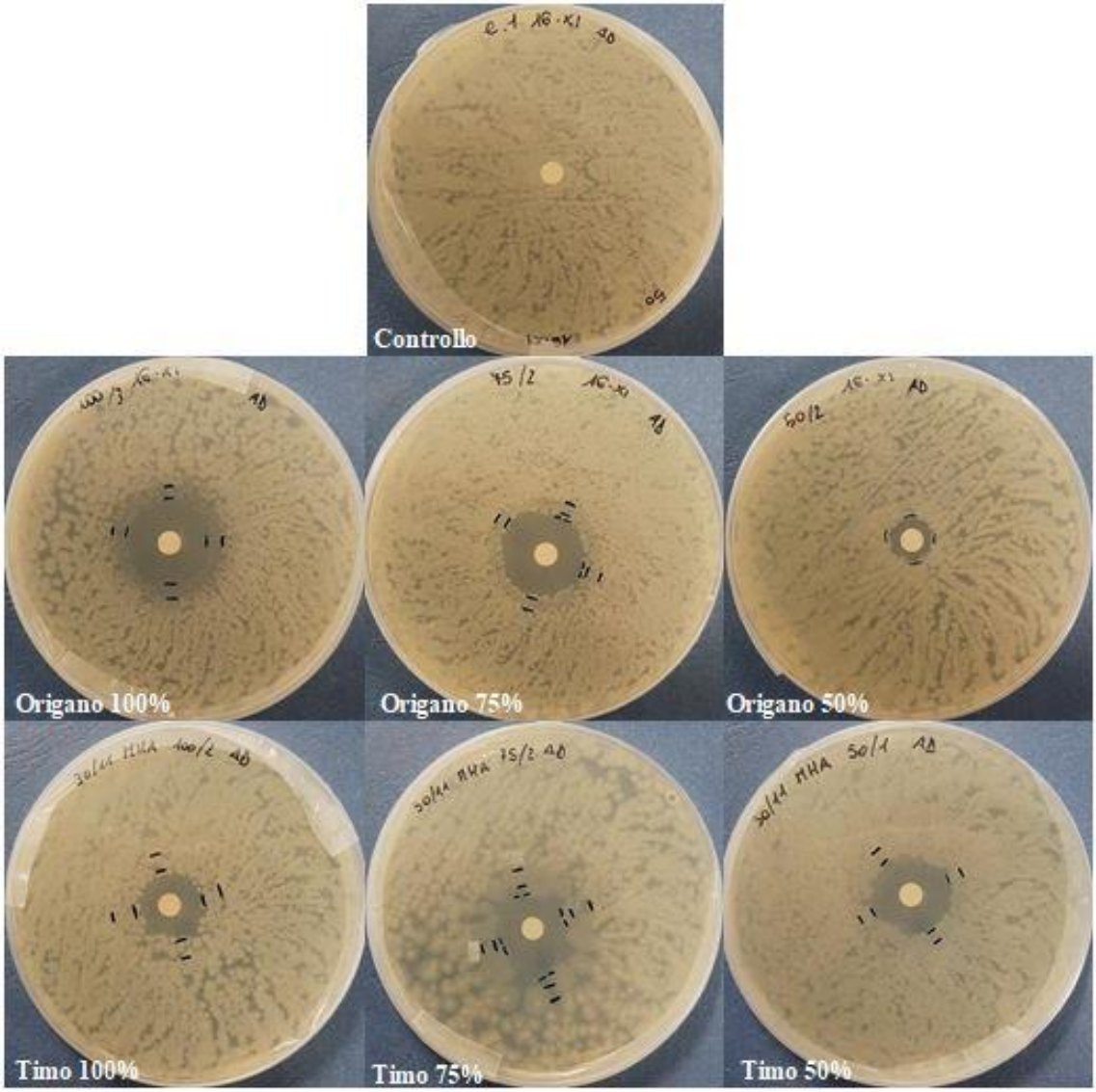

Figura 3.3: crescita di *E. coli* dopo trattamento con OE di origano e timo alle diverse concentrazioni dopo 48 ore di incubazione.

Nella Tabella 3.4 sono riportati i valori numerici del diametro degli aloni di inibizione dopo 48 ore, mentre l'istogramma di Figura 3.4 li mette a confronto in forma grafica.

Tabella 3.4: diametro medio alone di inibizione misurato testando 3 µL di OE alle diverse concentrazioni nei confronti di *E. coli* incubato per 48 h a 28°C.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		OE 75%		OE 50%	
OE	Alone totale	Alone inibizione completa	Alone totale	Alone inibizione completa	Alone totale	Alone inibizione completa
Origano	28,0 ± 1,4	20,8 ± 1,0	27,0 ± 1,3	20,0 ± 1,4	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0
Timo	25,2 ± 6,4	18,8 ± 3,5	27,8 ± 4,1	17,5 ± 2,4	21,0 ± 5,8	17,8 ± 2,1

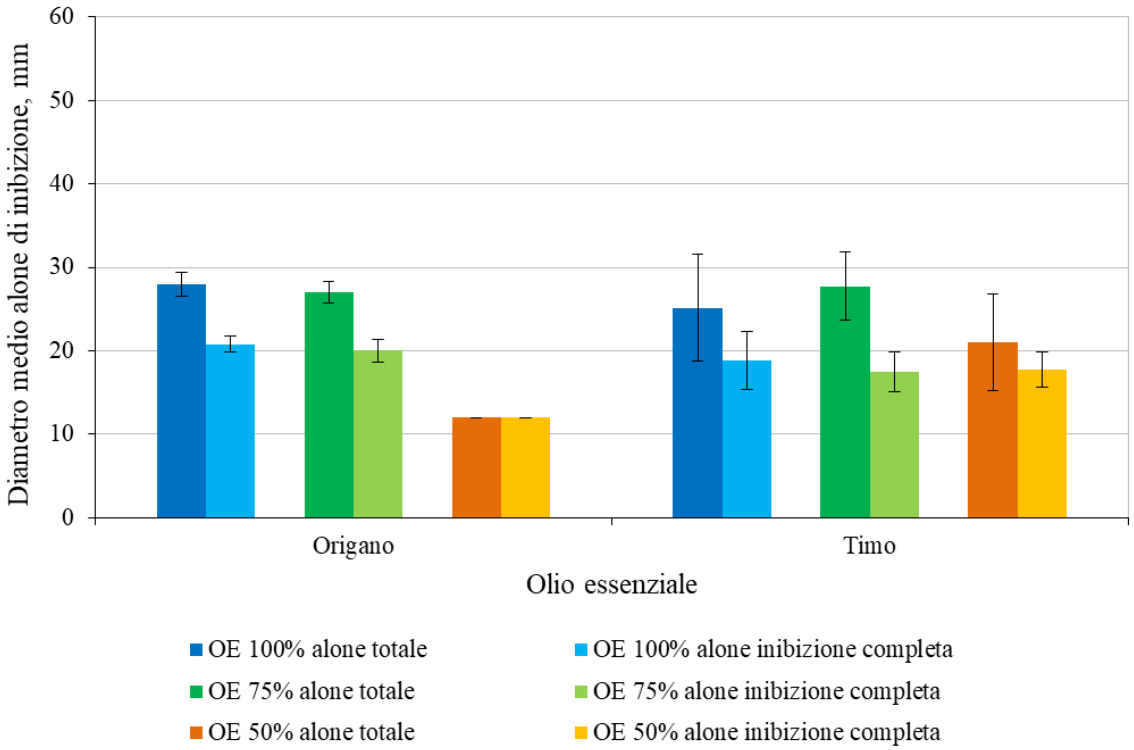

Figura 3.4: diametro medio dell'alone di inibizione degli OE di origano e timo, misurato testando 3 µL di OE alle diverse concentrazioni contro *E. coli* incubato per 48 h a 28°C.

La comparazione tra i diametri ottenuti ha messo in evidenza una lieve preponderanza dell'azione inibente dell'olio di origano rispetto a quella del timo alle concentrazioni di 100% e 75%, mentre l'opposto si è verificato in presenza della diluizione al 50% con TEGO.

Si è inoltre notata una confrontabilità tra i diametri medi di inibizione complessivi degli oli al 100% e 75%, laddove i diametri di inibizione completa si riducono all'aumentare del grado di diluizione, ad eccezione dell'olio di timo al 50% che è risultato paragonabile allo stesso al 75%.

A differenza di tutte le altre piastre, l'olio di origano diluito al 50% non ha fatto registrare alcun alone di crescita rallentata, mentre quest'ultimo è venuto ad annullarsi tra le 24 e le 48 ore di incubazione in alcune piastre testate con l'OE di timo. Ciò sembrerebbe quindi confermare il maggiore potere antibatterico dell'olio di origano.

La Figura 3.5 evidenzia, in modo qualitativo, le differenze tra le piastre trattate con l'OE di origano incubate a 37°C e quelle incubate a 28°C. I valori dei diametri sono riportati nella Tabella 3.5 e confrontati nell'istogramma di Figura 3.6.

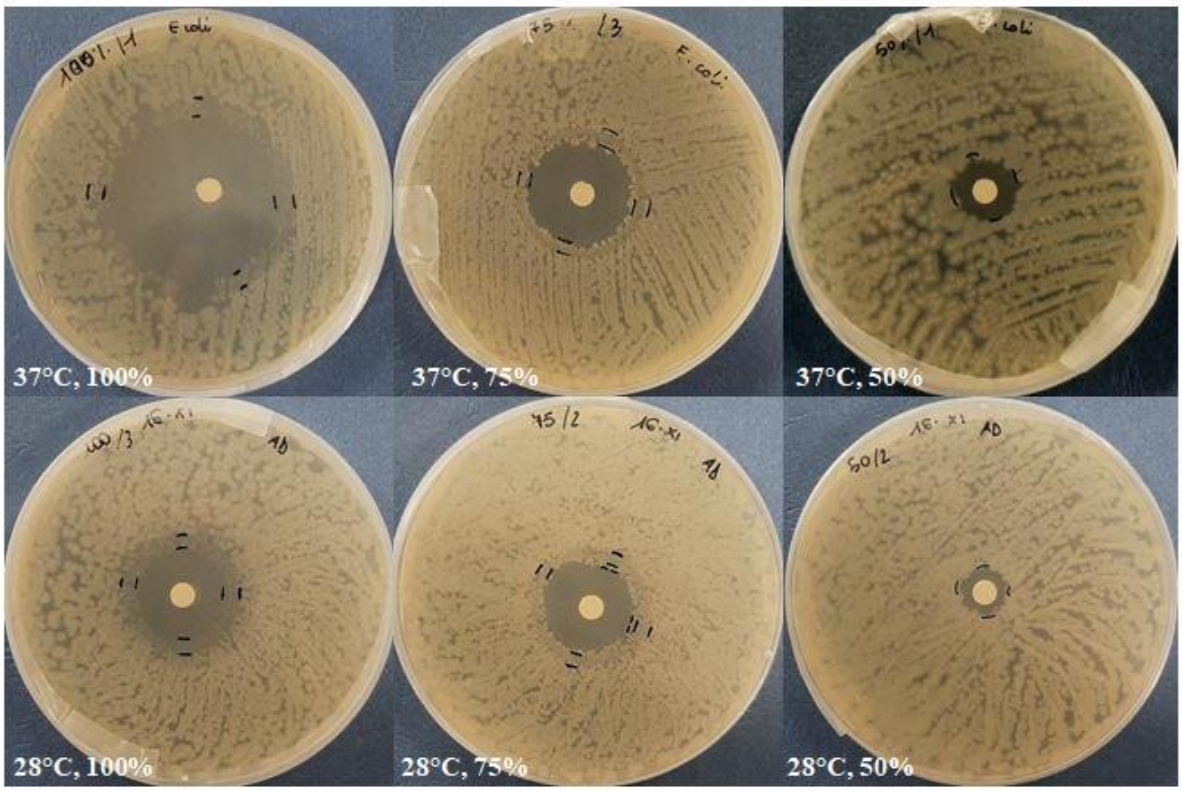

Figura 3.5: crescita di *E. coli* dopo 48 h di trattamento con OE di origano alle due temperature di incubazione testate.

Tabella 3.5: diametri di inibizione misurati testando l'OE di origano nei confronti di *E. coli* alle diverse temperature di incubazione dopo 48 h.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		OE 75%		OE 50%	
Temperatura, °C	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
37	46,0 ± 5,5	38,0 ± 5,3	27,7 ± 2,6	20,6 ± 2,7	20,3 ± 3,9	8,5 ± 1,4
28	28,0 ± 1,4	20,8 ± 1,0	27,0 ± 1,3	20,0 ± 1,4	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0

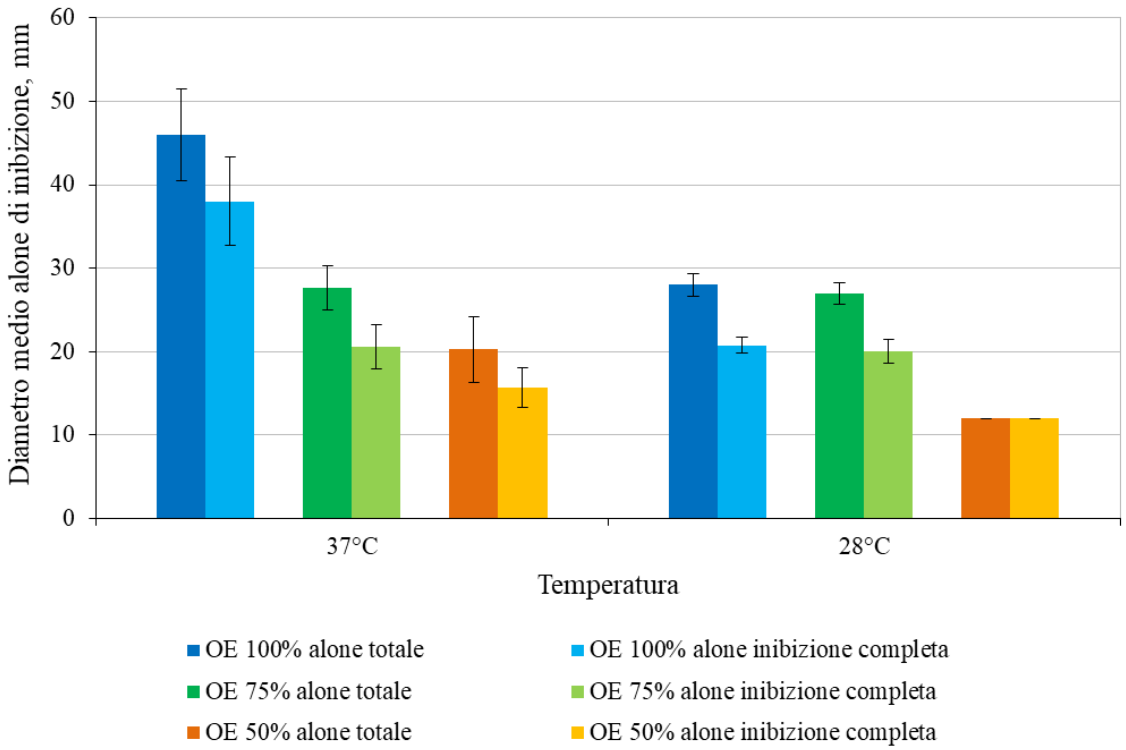

Figura 3.6: diametro medio dell'alone di inibizione dell'OE di origano, alle due temperature di incubazione testate.

Alla temperatura di 28°C si è osservata una marcata riduzione del diametro medio degli aloni di inibizione per l'olio di origano in concentrazioni del 100% e 50%. In particolare, ad esclusione del diametro di inibizione completa dell'olio maggiormente diluito, questi valori si sono attestati poco al di sopra della metà degli stessi con il batterio incubato a 37°C.

L'olio diluito al 75% ha invece fatto registrare aloni confrontabili ad entrambe le temperature testate, sia per i valori di inibizione completa, sia per l'estensione della zona a crescita rallentata.

La comparazione visiva tra l'efficacia antibatterica dell'olio di timo testato a 37°C e 28°C è illustrata in Figura 3.7 I valori numerici dei diametri di inibizione sono riportati nella Tabella 3.6 e confrontati nel grafico di Figura 3.8.

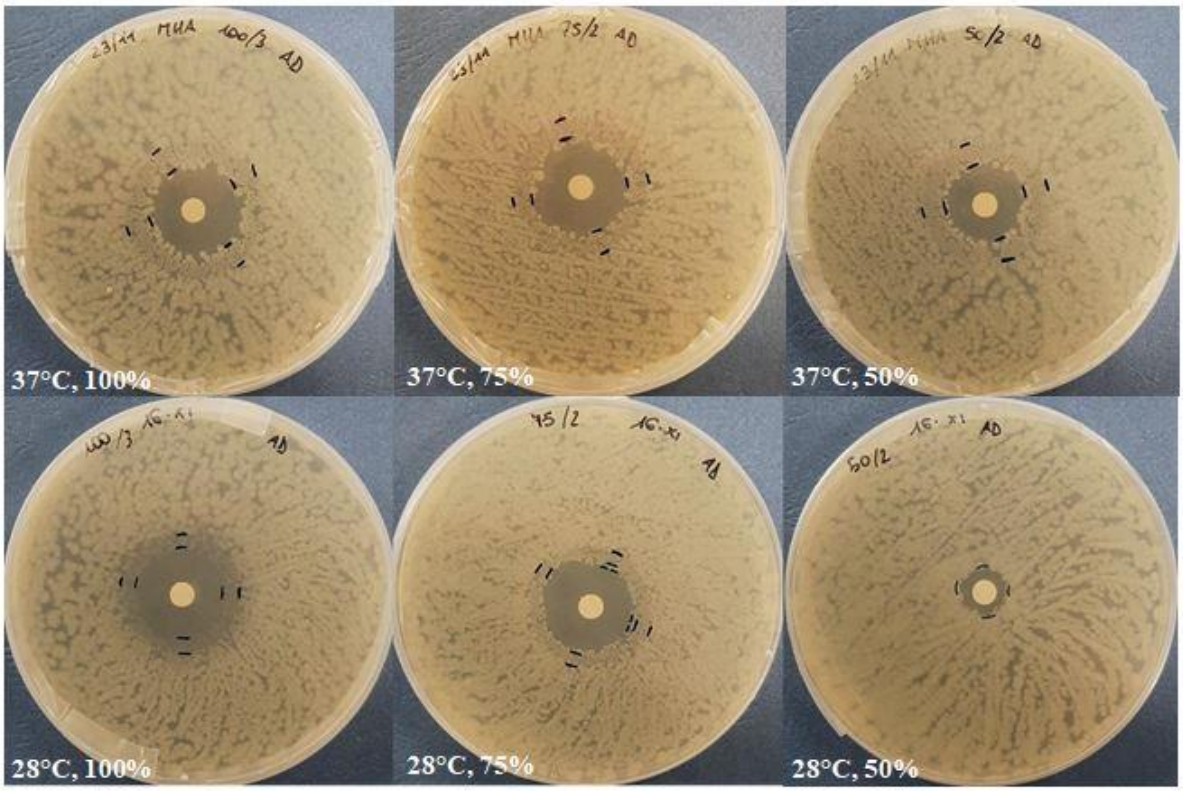

Figura 3.7: crescita di *E. coli* dopo 48 h di trattamento con OE di origano alle due temperature di incubazione testate.

Tabella 3.6: diametri di inibizione misurati testando l'OE di timo nei confronti di *E. coli* alle diverse temperature di incubazione dopo 48 h.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		**OE 75%**		**OE 50%**	
Temperatura, °C	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
37	32,0 ± 1,8	22,7 ± 3,4	28,2 ± 5,2	22,5 ± 1,4	27,7 ± 1,2	17,7 ± 0,8
28	25,2 ± 6,4	18,8 ± 3,5	27,8 ± 4,1	17,5 ± 2,4	21,0 ± 5,8	17,8 ± 2,1

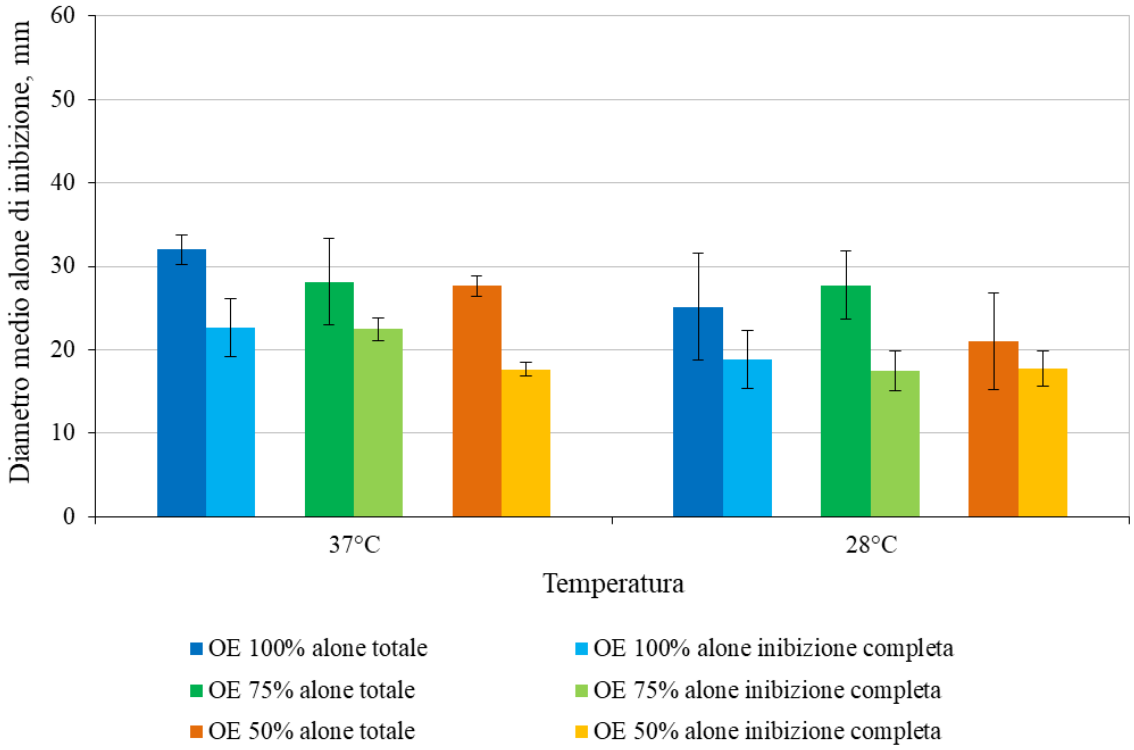

Figura 3.8: diametro medio dell'alone di inibizione dell'OE di timo, alle due temperature di incubazione testate.

Anche con questo olio è stata notata una differenza tra le dimensioni assunte dagli aloni di inibizione alle due temperature di incubazione testate. A parità di concentrazione, infatti, i diametri misurati alla temperatura di incubazione minore sono stati inferiori, o al più confrontabili, rispetto agli stessi a 37°C.

Ad entrambe le temperature, guardando agli aloni di inibizione completa, l'olio utilizzato puro ha mostrato un'efficacia paragonabile a quella della sua diluizione al 75%, mentre altresì paragonabili sono quelli ottenuti con l'olio testato al 50%.

Sia l'olio di origano, sia quello di timo hanno quindi mostrato maggior efficacia a 37°C. Questo risultato potrebbe spiegarsi considerando che, in quella condizione termica, il ceppo di *E. coli* cresce più lentamente rispetto ad una incubazione alla sua temperatura ottimale di 28°C, e, inoltre, le componenti degli oli che hanno effetto antibatterico diffondono più rapidamente se la temperatura è maggiore.

3.1.3 Confronto con *S. epidermidis* a 37°C

I risultati ottenuti con i test condotti in presenza di *E. coli* incubato a 37°C sono stati confrontati con i dati raccolti da Gallo (2021), che, nel suo lavoro di Tesi, ha testato gli stessi oli essenziali nelle medesime concentrazioni e quantità, nelle prove di diffusione su agar, nei confronti del batterio *S. epidermidis*, Gram+, incubato anch'esso alla stessa temperatura. Nazzaro et al. (2013) riportano, infatti, che gli OE hanno una maggiore efficacia contro i batteri Gram+, poiché sono più facilmente penetrabili dai composti idrofobici come i fenoli, e

i risultati sperimentali ottenuti da Goncalves (2013), che includono i batteri testati in questo lavoro di Tesi, confermano questa tendenza.

La Tabella 3.7 ripropone i valori dei diametri medi di inibizione completa nei confronti di *S. epidermidis* dopo 48 ore confrontati con quelli ottenuti in questo lavoro di Tesi con *E. coli*.

Tabella 3.7: diametri medi di inibizione completa misurati da Gallo (2021) nei confronti di *S. epidermidis* e quelli osservati in questo lavoro di Tesi nei confronti di *E. coli*, dopo 48 h di incubazione.

		Diametro medio alone di inibizione completa, mm		
OE	**Batterio**	**OE 100%**	**OE 75%**	**OE 50%**
Origano	*S. epidermidis*	23,0 ± 2,5	21,9 ± 2,1	14,7 ± 1,0
	E. coli	38,0 ± 5,3	20,6 ± 2,7	8,5 ± 1,4
Timo	*S. epidermidis*	28,5 ± 3,0	26,5 ± 3,0	10,4 ± 0,4
	E. coli	22,7 ± 3,4	22,5 ± 1,4	17,7 ± 0,8

I confronti tra gli aloni di inibizione per i due microrganismi sono stati rappresentati nella Figura 3.9.

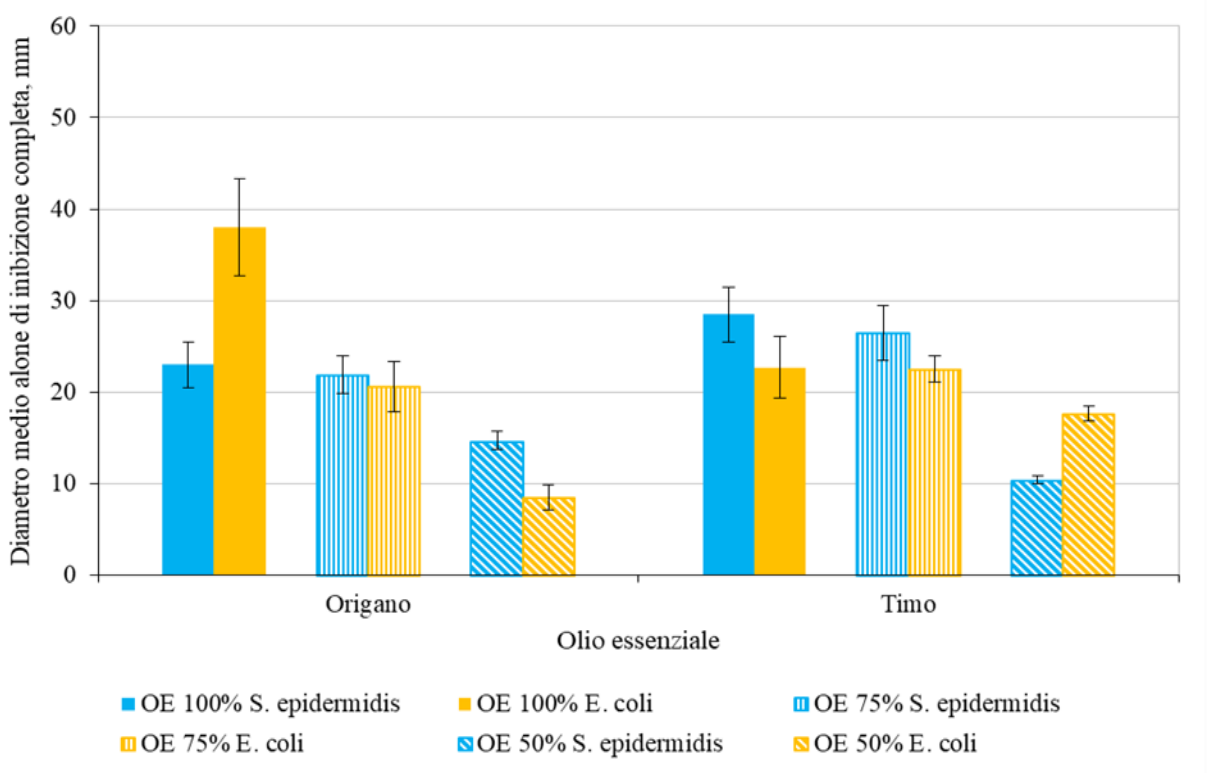

Figura 3.9: diametro medio dell'alone di inibizione completa per *S. epidermidis* ed *E. coli* dopo 48 h di incubazione.

Dalla comparazione, è stato osservato che gli oli possono avere un effetto maggiore su un microrganismo piuttosto che un altro in funzione della concentrazione alla quale sono utilizzati.

Testando l'OE di origano, è risultato che l'olio puro ha inibito maggiormente la crescita di *E. coli*, mentre l'opposto si è osservato per la diluizione al 50%. L'olio diluito al 75% ha fatto registrare aloni di inibizione confrontabili per i due ceppi batterici. Questi risultati potrebbero essere dovuti, principalmente, al diverso meccanismo di azione di uno stesso composto degli OE nei confronti dei due ceppi batterici; in secondo luogo, alla scarsa miscibilità degli oli con il diluente e alla variabilità intrinseca delle prove.

L'OE di timo è risultato più efficiente contro *S. epidermidis* in concentrazioni del 100% e del 75%; all'opposto, la diluizione al 50% ha fatto osservare un alone maggiore nel caso di *E. coli*.

Confrontando invece gli oli, a parità di microrganismo, si è notata una preponderanza dell'azione dell'OE di timo al 100% e al 75% di purezza rispetto all'olio di origano contro *S. epidermidis*. All'opposto, con *E. coli*, l'effetto dell'OE di origano ha prevalso in forma pura, mentre diluito al 75% ha dimostrato un'azione simile all'OE di timo. Testando la diluizione al 50%, il batterio usato da Gallo è risultato meno resistente all'azione antimicrobica con l'OE di origano, invece *E. coli* lo è stato con l'OE di timo.

La maggior dimensione dell'alone di inibizione degli OE nei confronti di *S. epidermidis* dopo 24 ore confermerebbe, infine, una più alta efficacia contro i batteri Gram positivi, la cui struttura della parete consente una maggiore permeazione ai composti degli oli dannosi per il microrganismo (Nazzaro, 2013).

3.1.4 Effetti nei confronti di *R. mucilaginosa*

Le prove sono state condotte utilizzando gli OE di timo e origano alle diverse concentrazioni oggetto di studio in un volume di 3 µL. Dopo l'imbibizione dei dischetti, il lievito è stato incubato per 72 h.

Osservando le piastre al tempo stabilito dal test, si è riscontrato che, per entrambi gli OE, nessuna concentrazione di olio ha condotto ad una inibizione della crescita del lievito. Tuttavia, in esse, rispetto al controllo, non è stata osservata la colorazione rosata tipica del ceppo utilizzato, indice del fatto che alcuni componenti degli oli potrebbero essere penetrati nelle cellule del microrganismo e aver influenzato la produzione del pigmento. Questo risultato è in accordo con quanto osservato da Martina (2019) nelle prove sul trattamento del microrganismo con gli OE su carta alluvionata.

In Figura 3.10 è raffigurato il confronto tra le piastre di controllo e quelle trattate con gli OE in concentrazione del 100%.

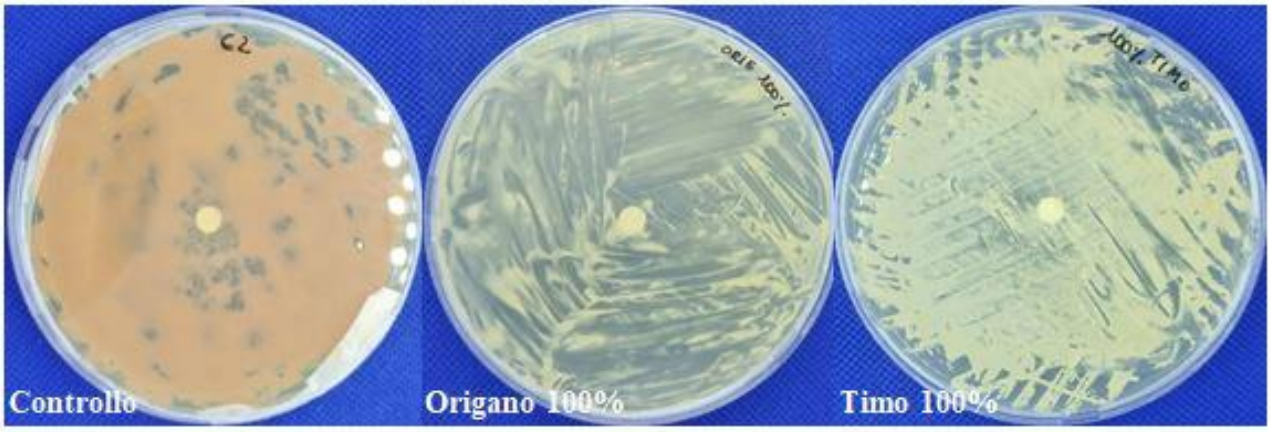

Figura 3.10: controllo e le piastre di *R. mucilaginosa* trattate con gli OE di origano e di timo al 100% con il metodo della diffusione su agar dopo 72 h di incubazione.

3.2 Studio dell'attività degli oli essenziali con il metodo della volatilizzazione dal disco

In queste prove è stata indagata l'efficacia degli oli essenziali di origano e di timo in fase vapore, con il metodo della volatilizzazione dal disco, nei confronti del batterio *E. coli* e del lievito *R. mucilaginosa*, confrontandone l'azione antimicrobica rispetto a quanto ottenuto col metodo della diffusione su agar.
Lo stesso metodo è stato poi utilizzato per testare l'efficacia degli OE nei confronti del fungo filamentoso *A. alternata*, testando anche volumi differenti delle soluzioni a differente concentrazione di olio.

3.2.1 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 37°C

Per le prime prove sono stati utilizzati dischetti con diametro di 5 mm imbibiti con 3 µL di OE alle diverse concentrazioni. Dalle misure è emerso che i diametri osservati dopo 48 ore dall'inoculo non hanno subito variazioni rispetto agli stessi dopo 24 ore.

La Tabella 3.8 riporta i valori del diametro medio di inibizione misurati a 48 ore dall'inoculo.

Tabella 3.8: diametro medio alone di inibizione misurato testando 3 μL di OE alle diverse concentrazioni nei confronti di *E. coli* incubato per 48 h a 37°C.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		**OE 75%**		**OE 50%**	
OE	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
Origano	8,5 ± 1,4	0	0	0	0	0
Timo	0	0	0	0	0	0

Diversamente dai test effettuati con il metodo di diffusione su agar, per i quali nella zona prossima al disco era stato rilevato anche un alone di inibizione completa, in queste prove è stato osservato solamente un alone di inibizione di crescita rallentata nella zona soprastante il disco.

La Figura 3.11 mostra le immagini degli aloni di inibizione dopo un periodo di incubazione di 48 ore.

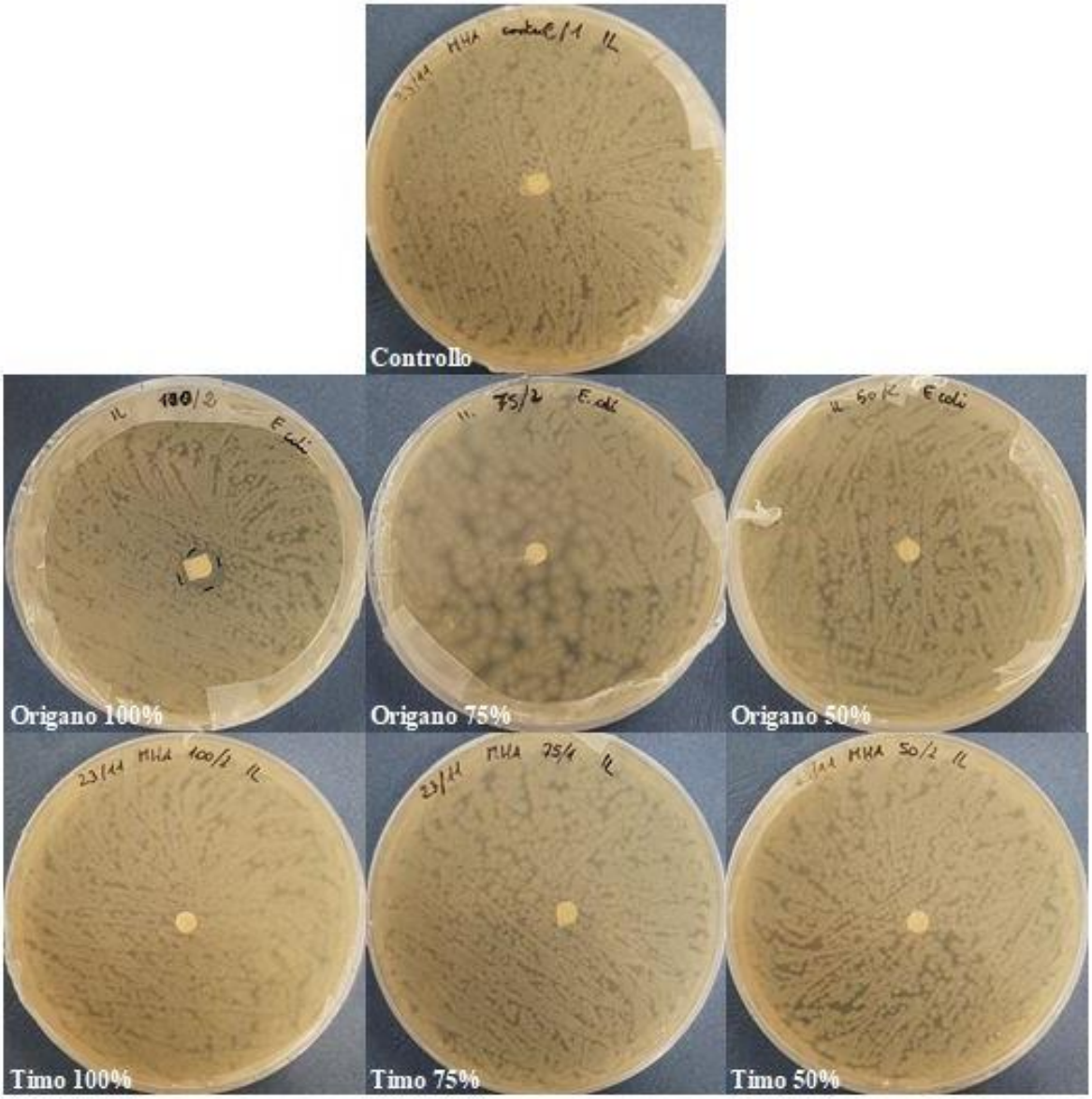

Figura 3.11: crescita di *E. coli* dopo trattamento con OE di origano e timo alle diverse concentrazioni dopo 48 ore di incubazione a 37°C.

Dalle osservazioni è emerso che, in queste prove, diversamente dal metodo di diffusione su agar, per il quale si è sempre osservata un'efficacia antibatterica, entrambi gli oli diluiti al 75% e al 50% con TEGO non hanno avuto alcun effetto inibente sulla crescita batterica, mentre l'olio di origano al 100% in purezza ha rallentato, ma non inibito totalmente, la crescita nella zona soprastante il dischetto. L'olio di timo testato puro non ha invece prodotto nessun alone di inibizione.

3.2.2 Effetti nei confronti di *E. coli* incubato a 28°C

Le prove descritte nel capitolo 3.2.1 sono state ripetute, utilizzando le stesse quantità e concentrazioni di oli, incubando le piastre ad una temperatura di 28°C, al fine di valutare l'effetto di una diversa velocità di diffusione dei componenti antimicrobici degli oli, considerando però che anche il batterio varia la propria velocità di crescita.

La Figura 3.12 mostra le immagini delle piastre fotografate dopo 48 ore di incubazione.

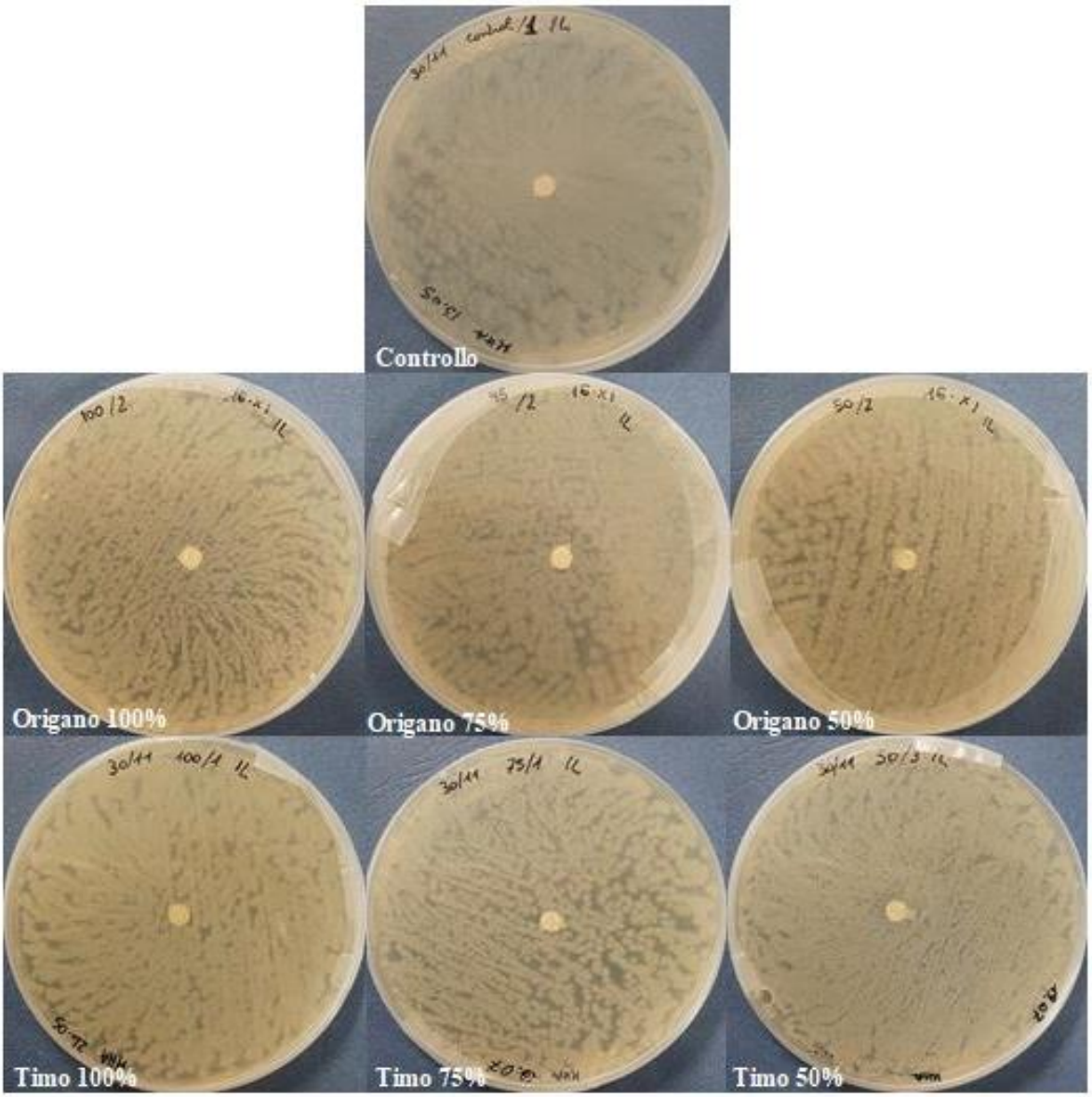

Figura 3.12: crescita di *E. coli* dopo trattamento con OE di origano e timo alle diverse concentrazioni dopo 48 ore di incubazione a 28°C.

Dalle immagini si può notare chiaramente come il batterio sia cresciuto uniformemente nelle piastre per entrambe gli oli alle diverse concentrazioni, anche quando testati puri.

La Tabella 3.9 confronta i diametri ottenuti testando l'olio di origano alle due temperature di incubazione.

Tabella 3.9: diametri di inibizione misurati testando l'OE di origano nei confronti di *E. coli* alle diverse temperature di incubazione dopo 48 h.

	Diametro medio alone di inibizione, mm					
	OE 100%		**OE 75%**		**OE 50%**	
Temperatura, °C	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
37	8,5 ± 1,4	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0

Non essendo stati osservati aloni di inibizione a 28°C, il confronto a 37°C e 28°C per l'OE di origano si riduce all'aver constatato che tale olio ha rallentato la crescita di *E. coli* nella zona sopra il disco, quando usato non diluito e a 37°C.

L'olio di timo non è risultato efficace in nessuna delle due condizioni termiche testate.

Queste osservazioni sono in linea con quanto già osservato nella sezione 3.1.2 per la diffusione su agar: su tempi lunghi, lo spazio di testa della piastre si riempie di vapori d'olio, maggiormente a più alta temperatura e, poiché a 28°C la crescita del microrganismo è massima e la vaporizzazione minima, non si osserva inibizione.

3.2.3 Confronto con *S. epidermidis* a 37°C

I dati raccolti nelle prove effettuate con *E. coli* incubato a 37°C sono stati confrontati con i diametri di inibizione osservati da Gallo (2021) nelle prove di volatilizzazione dal disco con *S. epidermidis*, incubato anch'esso a 37°C, utilizzando gli stessi oli essenziali nelle medesime concentrazioni e quantità.

La Tabella 3.10 ripropone i valori dei diametri medi di inibizione completa nei confronti di *S. epidermidis* dopo 48 ore affiancati a quelli ottenuti in questo lavoro di Tesi con *E. coli*.

Tabella 3.10: diametri medi di inibizione completa misurati da Gallo (2021) nei confronti di *S. epidermidis* e quelli osservati in questo lavoro di Tesi nei confronti di *E. coli*, dopo 48 h di incubazione.

		Diametro medio alone di inibizione completa, mm		
OE	**Batterio**	**OE 100%**	**OE 75%**	**OE 50%**
Origano	*S. epidermidis*	10,7 ± 1,3	8,9 ± 0,5	7,8 ± 0,8
	E. coli	8,3 ± 1,4	0	0
Timo	*S. epidermidis*	8,3 ± 0,8	7,6 ± 1,0	0
	E. coli	0	0	0

I confronti tra gli aloni di inibizione per i due microrganismi sono stati rappresentati nella Figura 3.13.

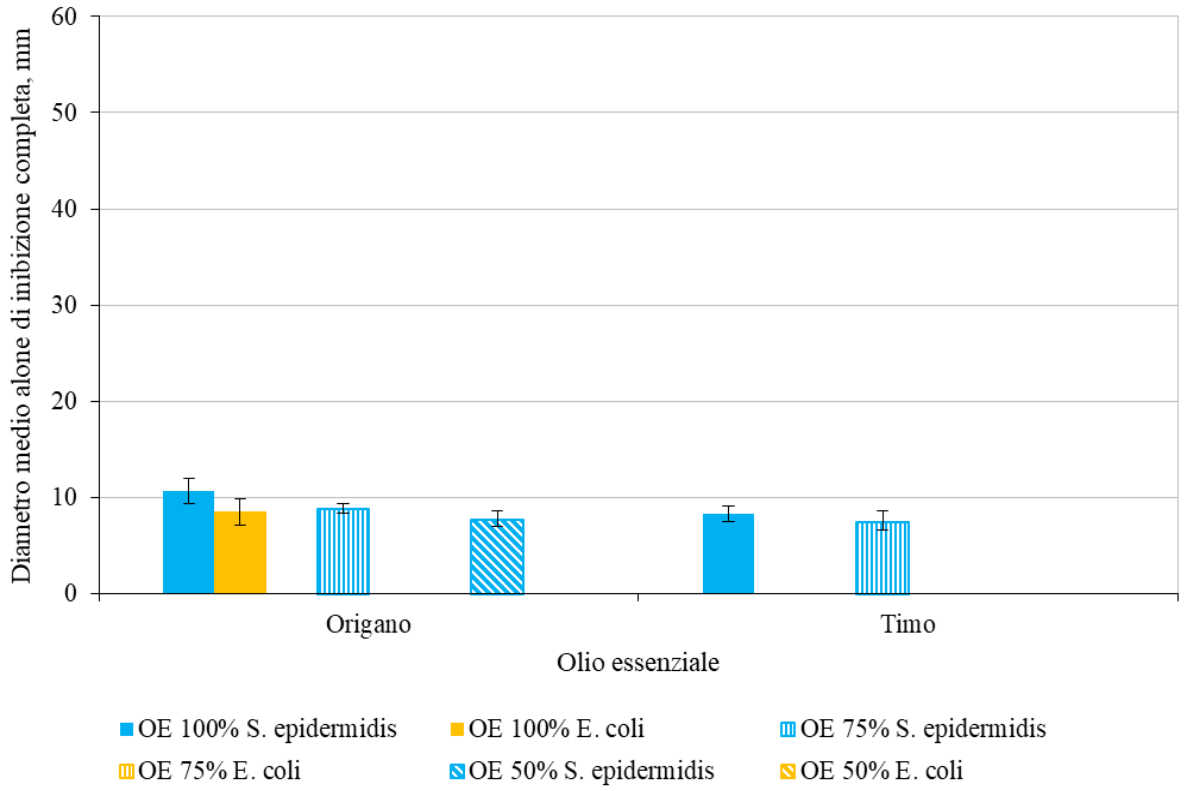

Figura 3.13: diametro medio dell'alone di inibizione completa per *S. epidermidis* ed *E. coli* dopo 48 h di incubazione per le prove in fase vapore.

Dalla comparazione, è stato rilevato che gli oli, testati nei confronti di *S. epidermidis* dopo 48 ore di incubazione, hanno inibito la crescita del batterio a tutte le concentrazioni, fatta eccezione per l'OE di timo diluito al 50%, per il quale però è stata osservata inibizione dopo 24 ore. L'efficacia dell'olio di origano in concentrazione del 100% è stata maggiore nei confronti del batterio testato da Gallo rispetto all'azione nei confronti di *E. coli*, unico caso in cui anche per questo microrganismo è stato osservato un alone di inibizione nelle prove di volatilizzazione dal disco.

Anche per le prove in fase vapore, oli hanno mostrato una maggiore efficacia nei confronti dei batteri Gram positivi.

3.2.4 Effetti del diluente sulla diffusione dell'OE di origano in fase vapore

Per valutare se il diluente TEGO influenzasse l'evaporazione dei componenti dell'olio, è stata allestita una prova in fase vapore nella quale è stato misurato e confrontato l'alone di inibizione venutosi a formare per effetto dell'olio essenziale di origano utilizzato puro e diluito al 50% nei confronti di *E. coli*. Sono stati testati volumi di 3 µL di OE al 50% e al 100% in purezza e un volume dimezzato di OE sempre al 100%, in modo che il quantitativo di olio fosse pari al volume di olio contenuto nella soluzione diluita al 50%. La prova è stata quindi ripetuta utilizzando un volume maggiore di olio (10 µL per la soluzione diluita al 50%; 10 µL e 5 µL per l'olio puro) su dischi da 10 mm, valutando anche se vi fossero cambiamenti in una replica aggiuntiva dove il disco è stato posizionato decentrato. L'utilizzo di dischi da 10 mm si è reso necessario dal momento che quelli da 5 mm non sarebbero riusciti ad assorbire tutta la soluzione.

I diametri dell'alone di inibizione medi osservati dopo 48 ore di incubazione sono riportati nella Tabella 3.11, mentre le immagini degli aloni sono rappresentate in Figura 3.14.

Tabella 3.11: diametri medi dell'alone di inibizione osservati dopo 48 h con i volumi e le concentrazioni di OE di origano testati nei confronti di *E. coli*.

	Diametro medio alone di inibizione, mm			
	OE 100%		**OE 50%**	
Volume di soluzione di OE, µL	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**	**Alone totale**	**Alone inibizione completa**
1,5	0	0	non testato	non testato
3	10,8 ± 2,6	0	0	0
5	27,7 ± 2,8	19,3 ± 2,7	non testato	non testato
10	31,1 ± 1,2	21,4 ± 0,9	0	0

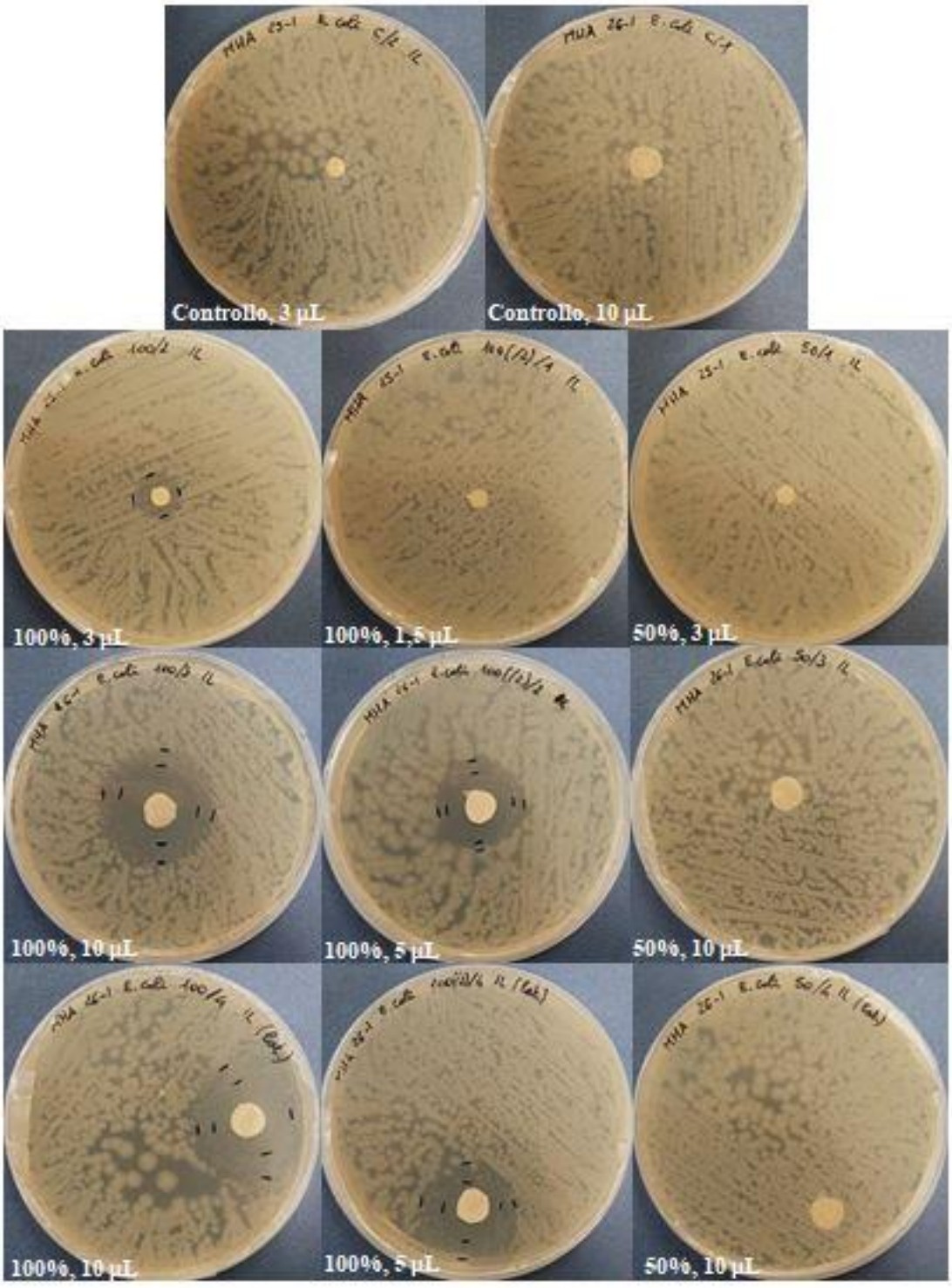

Figura 3.14: diametro dell'alone di inibizione per i volumi e le concentrazioni di OE di origano testati nei confronti di *E. coli* dopo 48 h.

E' stato notato che, nelle piastre con il disco decentrato, l'alone di inibizione si sposta con il disco stesso, senza però subire cambiamenti dimensionali, perciò queste misure sono state conteggiate insieme alle altre nel calcolo del diametro medio.

Nella Figura 3.15 è rappresentata graficamente la comparazione tra i diametri medi degli aloni di inibizione ottenuti nella prova.

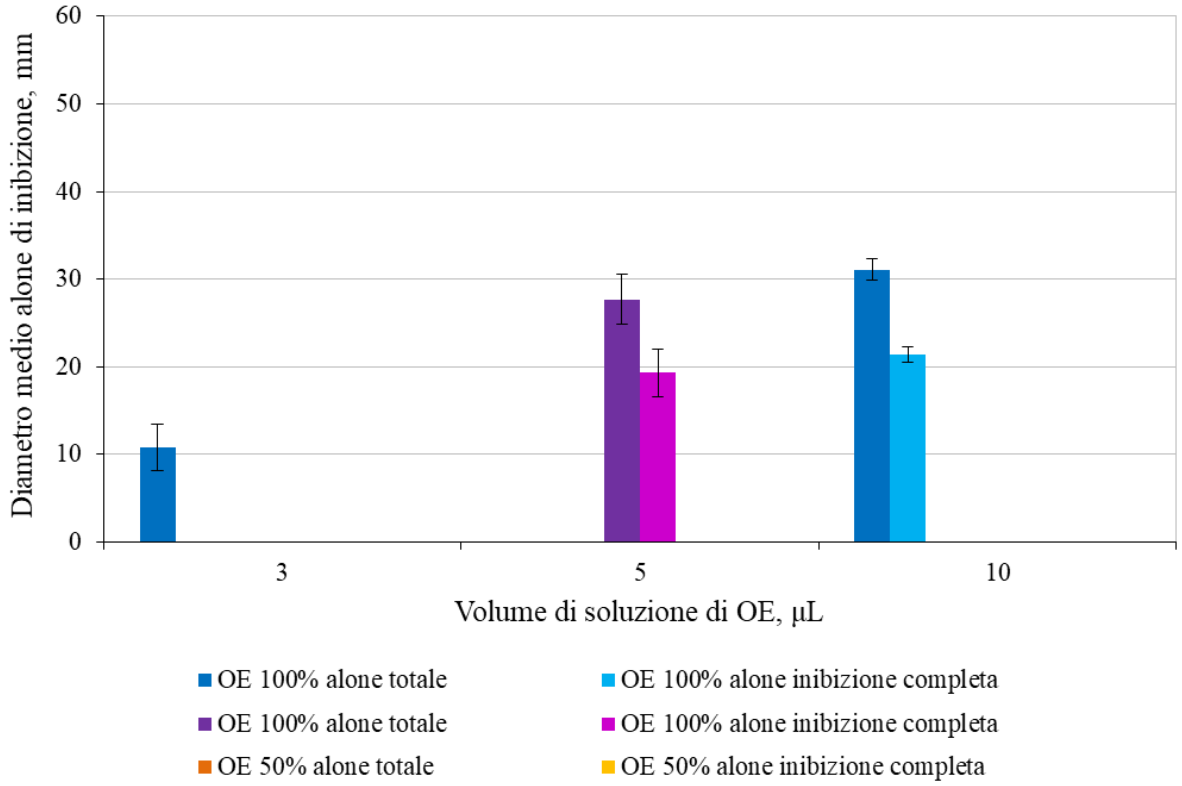

Figura 3.15: diametro medio dell'alone di inibizione per i volumi e le concentrazioni di OE di origano testati nei confronti di *E. coli* dopo 48 h.

Testando 3 µL di OE di origano al 100%, è stata osservata una zona di crescita rallentata sopra il dischetto, le cui dimensioni confermano i risultati ottenuti nel paragrafo 3.2.1, così come la crescita è stata nuovamente uniforme in tutta la piastra per lo stesso volume di OE in soluzione al 50%. Anche la stessa concentrazione di olio di quest'ultima, ma al 100%, non ha fatto registrare inibizione.

Aumentando il volume di olio a 10 µL, l'alone complessivo dell'olio testato puro è incrementato proporzionalmente, triplicando il suo valore da 10,8 mm a 31,1 mm, facendo riscontrare anche un alone di inibizione completa di 21,4 mm. Un diametro simile (19, 3 mm) è stato misurato anche per la dose di 5 µL al 100%. Tuttavia, quest'ultimo volume di olio, diluito con un ugual volume di TEGO, non ha fatto registrare neppure una crescita rallentata.

Questa osservazione suggerisce che il diluente, sebbene non alteri la crescita del batterio, come dimostrato dalle piastre di controllo, possa invece influire sulla diffusione dell'olio, ostacolandone l'evaporazione.

3.2.5 Effetti degli OE nei confronti di *R. mucilaginosa*

I risultati ottenuti testando 3 µL degli OE di timo e origano alle diverse concentrazioni in fase vapore sono analoghi a quelli osservati nel capitolo 3.1.4: non è stato osservato nessun

alone nemmeno per gli oli puri, e, rispetto alle piastre di controllo, non vi è stata pigmentazione.

In Figura 3.16 è raffigurato il confronto tra le piastre di controllo e quelle trattate con gli OE in concentrazione del 100%.

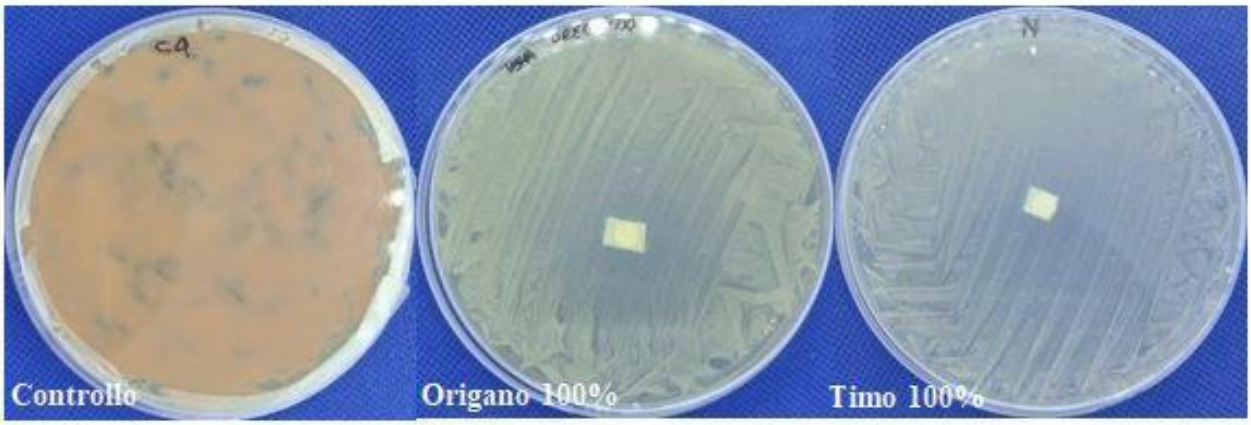

Figura 3.16: controllo e piastre di *R. mucilaginosa* trattate con gli OE di origano e di timo al 100% con il metodo della diffusione su agar dopo 72 h di incubazione. La parvenza di una zona di minor crescita è in realtà un riflesso della piastra.

3.2.6 Effetti degli OE nei confronti di *A. alternata*

Le prove sono state condotte testando gli OE di origano e timo alle concentrazioni del 100%, 75% e 50%, in volume di 3 µL su dischetto da 5 mm e in volume di 10 µL su dischetto da 10 mm, dopo 16 ore di incubazione a 30°C in seguito all'inoculo.

I diametri delle colonie fungine sono stati misurati nel tempo fino a 240 ore dall'imbibizione dei dischi.

La Tabella 3.12 riporta i valori del diametro medio della colonia trattata con 3 µL degli OE alle diverse concentrazioni, mentre nella Figura 3.17 e nella Figura 3.18 sono raffigurate le immagini delle piastre e il confronto con il controllo.

Tabella 3.12: diametro medio delle colonie di *A. alternata* trattate con 3 μL di OE di origano e di timo a diversi tempi di misurazione e confronto con la colonia di controllo.

		Diametro medio colonia fungina, mm			
OE	**Tempo, h**	**Controllo**	**OE 100%**	**OE 75%**	**OE 50%**
Origano	**24**	18,3 ± 1,2	0	0	13,0 ± 1,2
	48	26,8 ± 1,4	0	0	13,0 ± 1,2
	72	36,4 ± 1,2	0	0	13,0 ± 1,2
	168	73,5 ± 1,2	0	23,3 ± 4,5	16,8 ± 4,6
	240	90	0	35,7 ± 5,8	26,0 ± 4,1
Timo	**24**	18,3 ± 1,2	0	0	13,0 ± 1,1
	48	26,8 ± 1,4	0	0	13,8 ± 2,2
	72	36,4 ± 1,2	0	0	14,7 ± 2,3
	168	73,5 ± 1,2	0	12,0 ± 0,8	22,5 ± 1,3
	240	90	17,3 ± 2,1	14,3 ± 1,7	31,3 ± 2,1

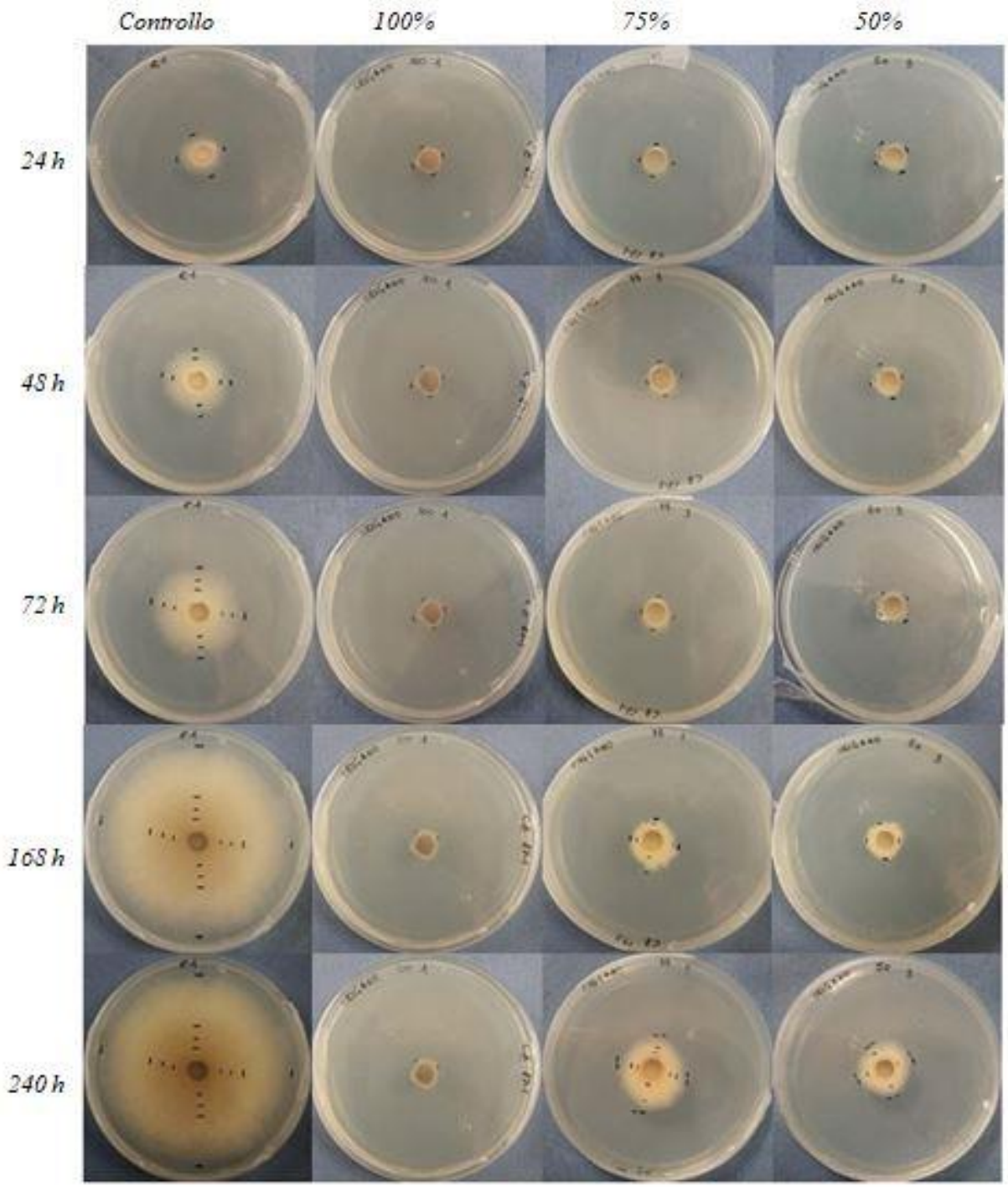

Figura 3.17: del controllo e piastre di *A. alternata* testate con 3 µL di OE di origano alle diverse concentrazioni.

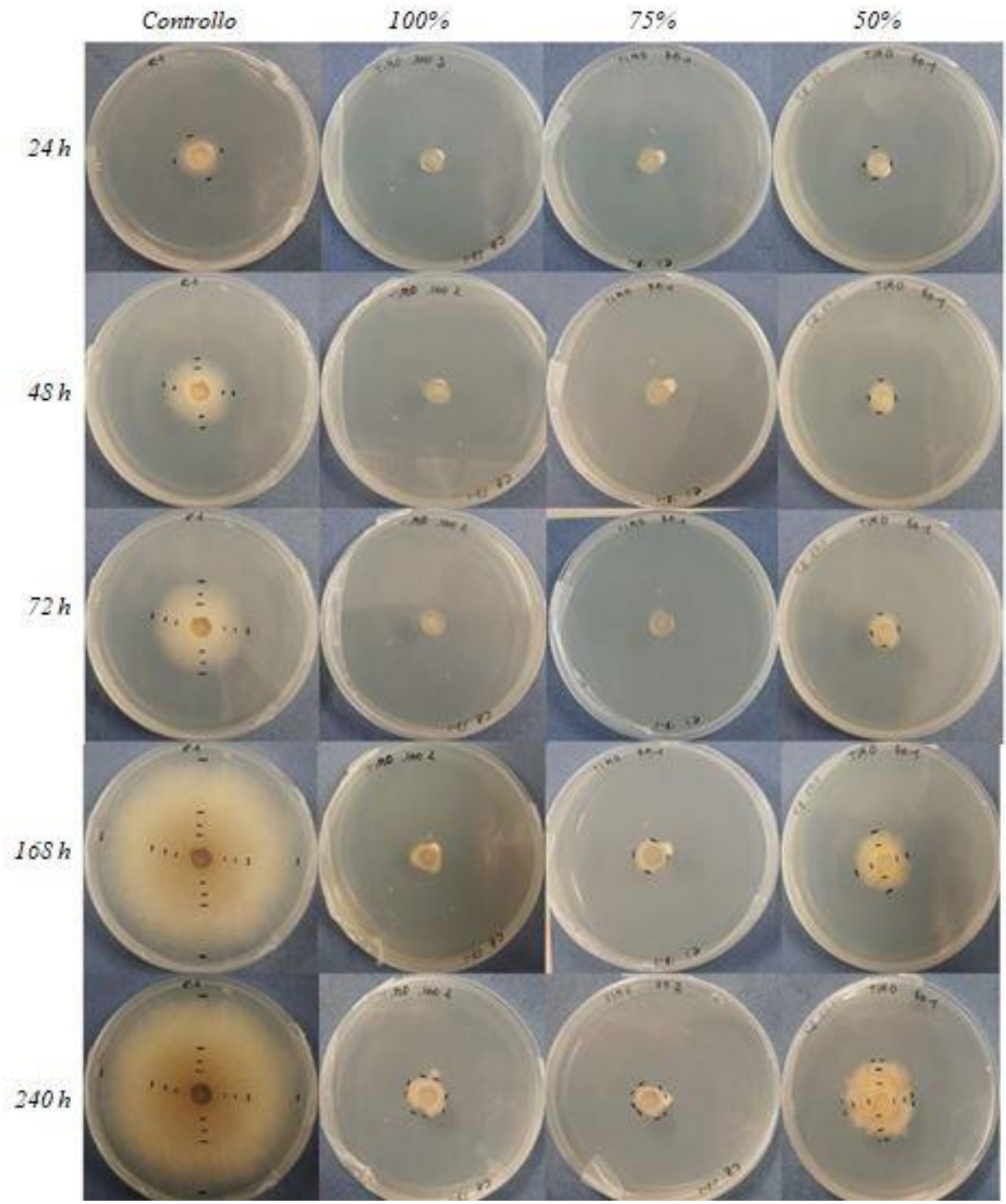

Figura 3.18: controllo e piastre di *A. alternata* testate con 3 µL di OE di timo alle diverse concentrazioni.

Il grafico di Figura 3.19 permette di visualizzare la crescita nel tempo delle colonie testate con le varie concentrazioni e di confrontarne i valori. La pendenza delle linee rappresenta qualitativamente la velocità di crescita delle colonie.

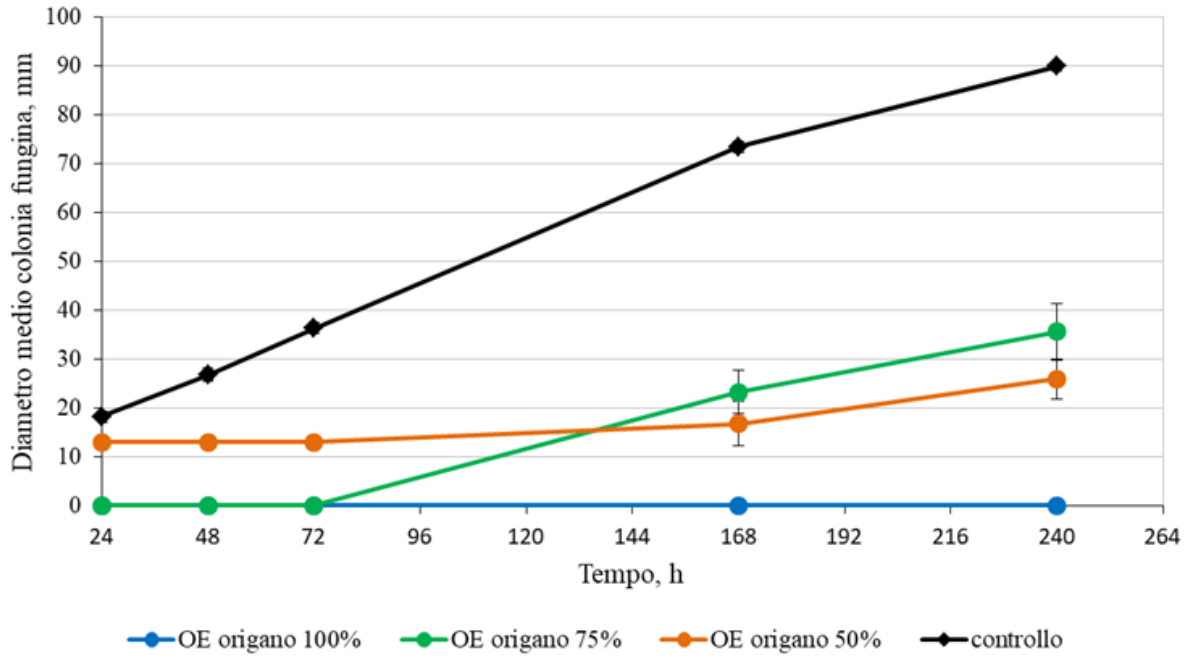

Figura 3.19: diametro medio della colonia fungina del controllo e nelle piastre di *A. alternata* testate con 3 µL di OE di origano alle diverse concentrazioni.

I dati indicano che l'olio di origano al 100% ha inibito la crescita del fungo durante tutto il periodo di osservazione, mentre diluito al 75% solamente per le prime 72 ore, tempo a cui è seguita una proliferazione, sebbene ad una velocità minore di quella del controllo nella stessa finestra temporale. Il microrganismo è invece cresciuto molto più lentamente rispetto al controllo, già dalle 24 ore in presenza dell'OE al 50%; è seguita quindi una fase di stasi per poi riprendere la replicazione dopo le 72 ore, subendo un'accelerazione tra le 168 e le 240 ore.

Si nota inoltre che dopo 240 ore la crescita del fungo trattato con l'olio al 50% è minore di quella in presenza dell'olio al 75% (rispettivamente 26 mm e 35,7 mm); è probabile che questo risultato sia frutto della variabilità intrinseca delle prove e della poca miscibilità dell'olio con il diluente.

I confronti per l'olio di timo sono visibili nel grafico di Figura 3.20.

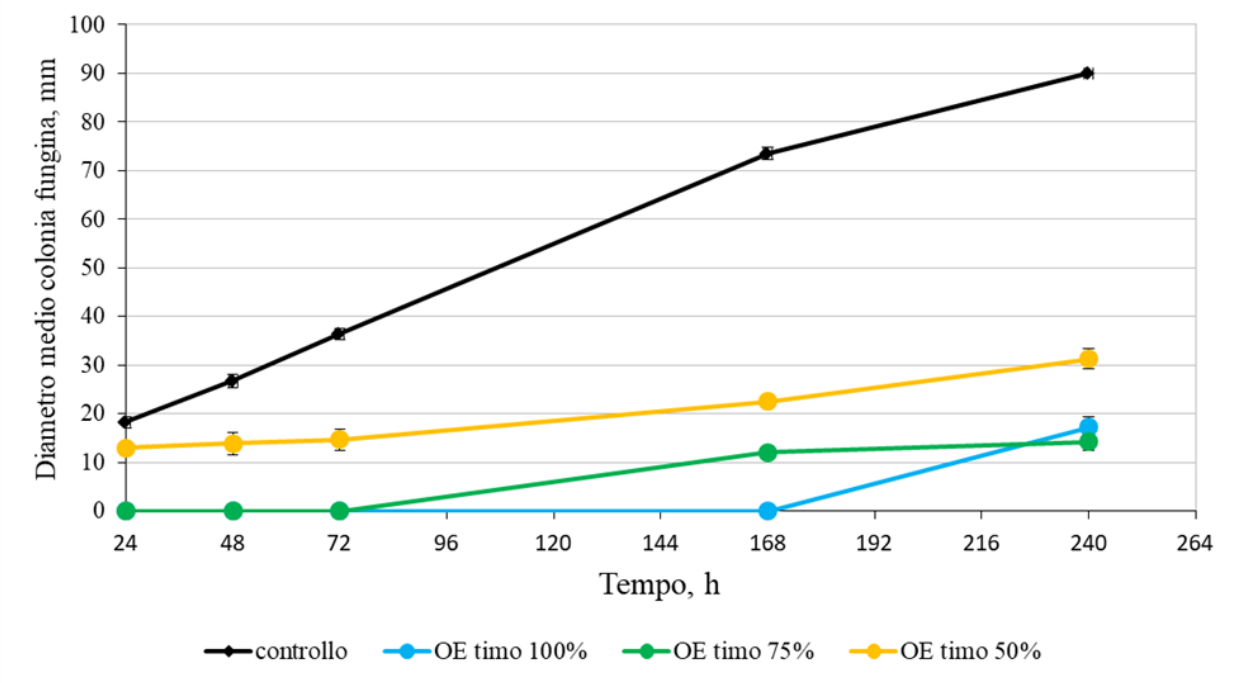

Figura 3.20: diametro medio della colonia fungina del controllo e delle piastre di *A. alternata* testate con 3 µL di OE di timo alle diverse concentrazioni.

L'OE di timo testato puro ha fatto registrare una crescita del fungo solamente dopo 240 ore, mentre, quando diluito al 75%, l'inibizione è stata completa fino a 72 ore, tempo dopo il quale la crescita è cominciata e proseguita fino al termine della finestra di osservazione con una velocità molto più lenta rispetto al controllo. La soluzione diluita al 50% ha rallentato, ma non annullato, la proliferazione del microrganismo fin dalle 24 ore dopo l'imbibizione dei dischi. La crescita, che è proseguita fino alle 240 ore subendo una piccola accelerazione a partire dalle 72 ore, è comunque stata molto più lenta rispetto al controllo, ed il valore finale del diametro della colonia è superiore di circa 15 mm rispetto a quelli trattati con le concentrazioni del 75% e del 100%, tra loro confrontabili.

Il grafico di Figura 3.21 mette a confronto l'andamento dei diametri delle colonie per i due oli sperimentati.

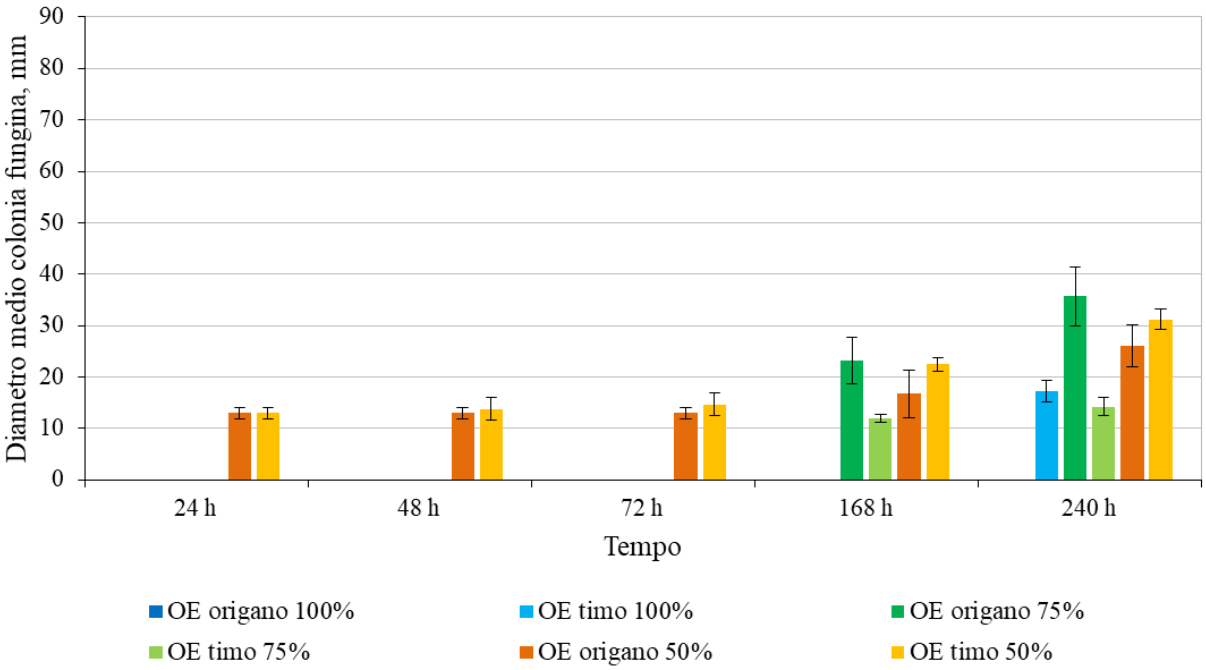

Figura 3.21: andamento nel tempo del diametro medio della colonia fungina delle piastre di *A. alternata* testate con i due OE alle diverse concentrazioni.

Confrontando l'azione dei due oli al tempo finale di 240 ore, si è osservato che l'OE di origano è più efficace, rispetto all'olio di timo, nell'inibire la crescita di *A. alternata* in concentrazione del 100% e del 50%, mentre, in diluizione al 75%, prevale l'effetto dell'olio di timo.

La Tabella 3.13 riporta i valori del diametro medio della colonia trattata con 10 µL degli OE alle diverse concentrazioni, mentre nella Figura 3.22 e nella Figura 3.23 sono raffigurate le immagini delle piastre e il confronto con il controllo.

Tabella 3.13: diametro medio delle colonie di *A. alternata* trattate con 10 µL di OE di origano e di timo a diversi tempi di misurazione e confronto con la colonia di controllo.

		Diametro medio colonia fungina, mm			
OE	**Tempo, h**	**Controllo**	**OE 100%**	**OE 75%**	**OE 50%**
Origano	**24**	18,3 ± 1,2	0	0	0
	48	26,8 ± 1,4	0	0	0
	72	36,4 ± 1,2	0	0	0
	168	73,5 ± 1,2	0	0	0
	240	90	0	0	17,8 ± 0,5
Timo	**24**	18,3 ± 1,2	0	0	0
	48	26,8 ± 1,4	0	0	0
	72	36,4 ± 1,2	0	0	0
	168	73,5 ± 1,2	0	0	0
	240	90	0	0	15,0 ± 1,6

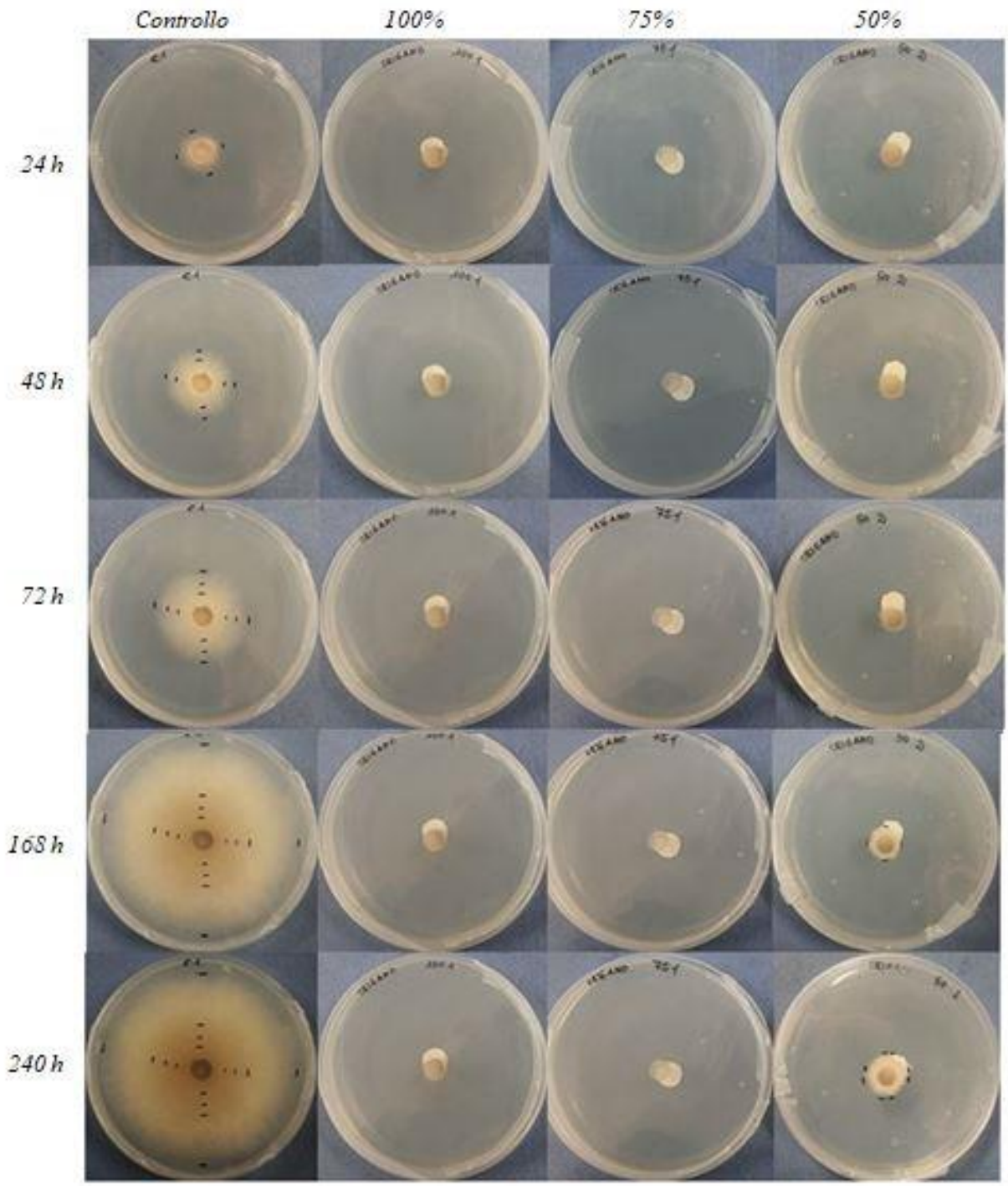

Figura 3.22: controllo e piastre di *A. alternata* testate con 10 µL di OE di origano alle diverse concentrazioni.

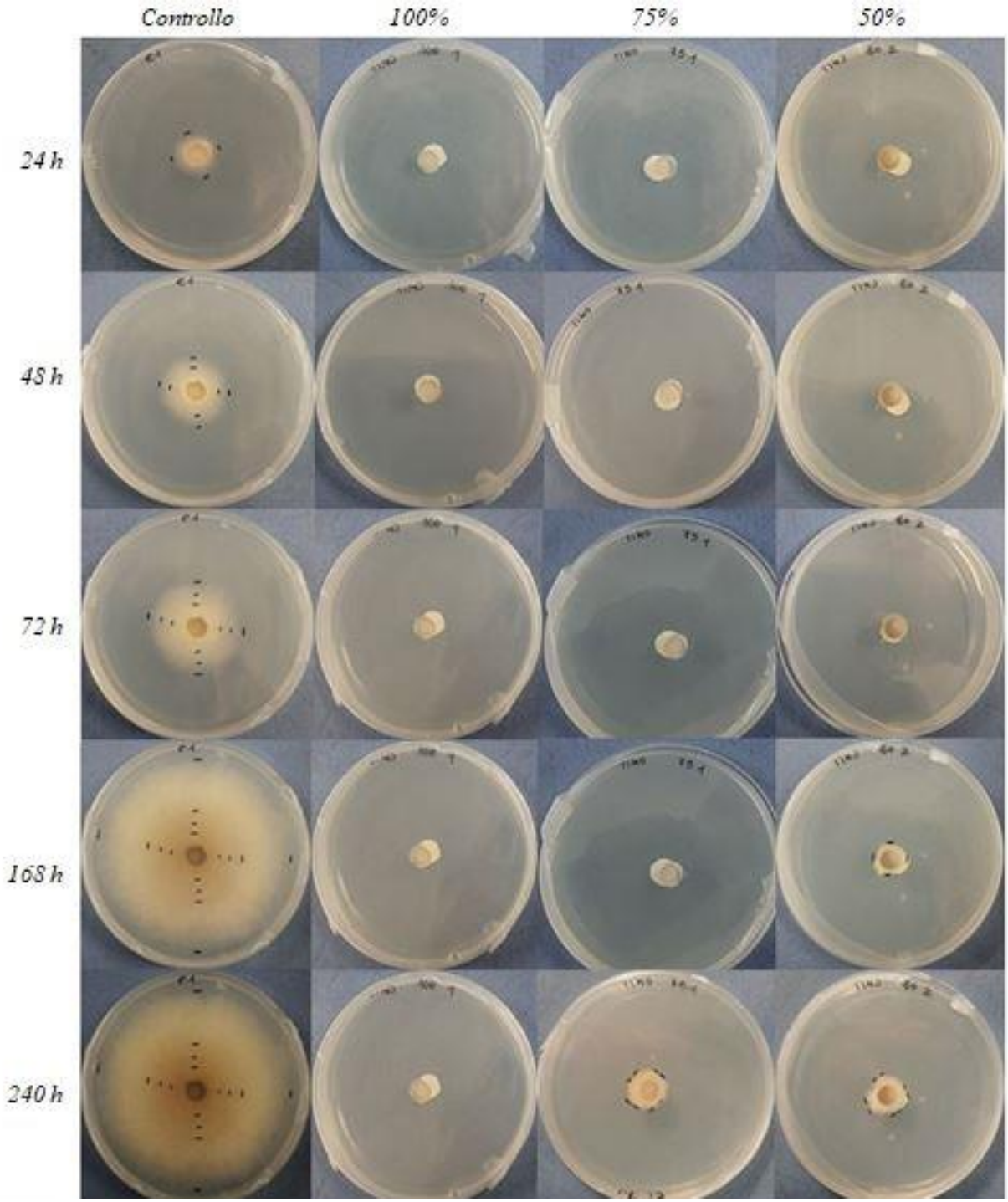

Figura 3.23: controllo e piastre di *A. alternata* testate con 10 µL di OE di timo alle diverse concentrazioni.

Aumentando la quantità di OE, è stata osservata, come da previsione, una maggiore inibizione della crescita. In particolare, essa è stata inibita totalmente per entrambe gli oli alle concentrazioni del 100% e del 75%, mentre al 50% hanno fatto registrare una crescita solamente dopo 240 ore, di poco preponderante nel caso dell'olio di origano.

La Tabella 3.14 riassume le percentuali di inibizione di crescita del micelio rispetto al controllo (MGI = mycelial growth inhibition), calcolate mediante la formula 3.1, seguendo uno degli approcci più utilizzati in letteratura (Özcan e Chalchat, 2009):

$$MGI\ (\%) = (d_c - d_t)/d_c \cdot 100 \qquad (3.1)$$

dove d_c è il diametro del micelio nella piastra di controllo e d_t è il diametro del micelio nella piastra trattata con gli OE.

Il valore è stato ricavato per ogni olio e per ogni tempo di osservazione, ad esclusione della rilevazione dopo 240 ore, per la quale la dimensione del controllo è stata limitata dalla geometria della piastra e una quantificazione del valore di inibizione sarebbe risultata errata.

Tabella 3.14: inibizione percentuale della crescita fungina delle piastre trattate con gli OE rispetto al controllo.

	Inibizione della crescita di *A. alternata* rispetto al controllo, %				
	Concentrazione, %	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**168 h**
Origano 3 µL	**100**	100	100	100	100
	75	100	100	100	68,4
	50	28,8	51,4	64,3	77,2
Origano 10 µL	**100**	100	100	100	100
	75	100	100	100	100
	50	100	100	100	100
Timo 3 µL	**100**	100	100	100	100
	75	100	100	100	83,7
	50	28,8	48,3	59,7	69,4
Timo 10 µL	**100**	100	100	100	100
	75	100	100	100	100
	50	100	100	100	100

Dal confronto dei valori di inibizione percentuale si è osservata un'elevata efficacia di tutti gli oli a tutte le concentrazioni testate, confermando quanto rilevato in precedenza.

3.3 Confronto tra gli effetti della diffusione su agar e della volatilizzazione dal disco

Paragonando i risultati ottenuti utilizzando gli OE di timo e origano nei confronti di *E. coli* incubato a 37°C per 48 ore nelle prove di diffusione su agar e in fase vapore, si è osservato che, nelle prime, gli aloni di inibizione hanno assunto dimensione maggiore. Inoltre, in fase solida è stato registrato un alone di inibizione completa anche per le diluizioni di entrambe gli oli al 50%, mentre in fase vapore la crescita è stata solamente rallentata con l'olio di origano testato puro.

La Tabella 3.15 e la Figura 3.24 riassumono numericamente e graficamente il confronto dei dati tra le due modalità.

Tabella 3.15: confronto a 48 h tra i diametri osservati testando gli OE nei confronti di *E. coli* a 37°C con il metodo di diffusione su agar e in fase vapore.

	Diametro medio alone totale di inibizione, mm					
	OE 100%		**OE 75%**		**OE 50%**	
	Origano	**Timo**	**Origano**	**Timo**	**Origano**	**Timo**
Diffusione su agar	46,0 ± 5,5	38,0 ± 5,3	27,7 ± 2,6	20,6 ± 2,7	20,3 ± 3,9	15,8 ± 2,4
Volatilizzazione dal disco	32,0 ± 1,8	22,7 ± 3,4	28,2 ± 5,2	22,5 ± 1,4	27,7 ± 1,2	17,7 ± 0,8

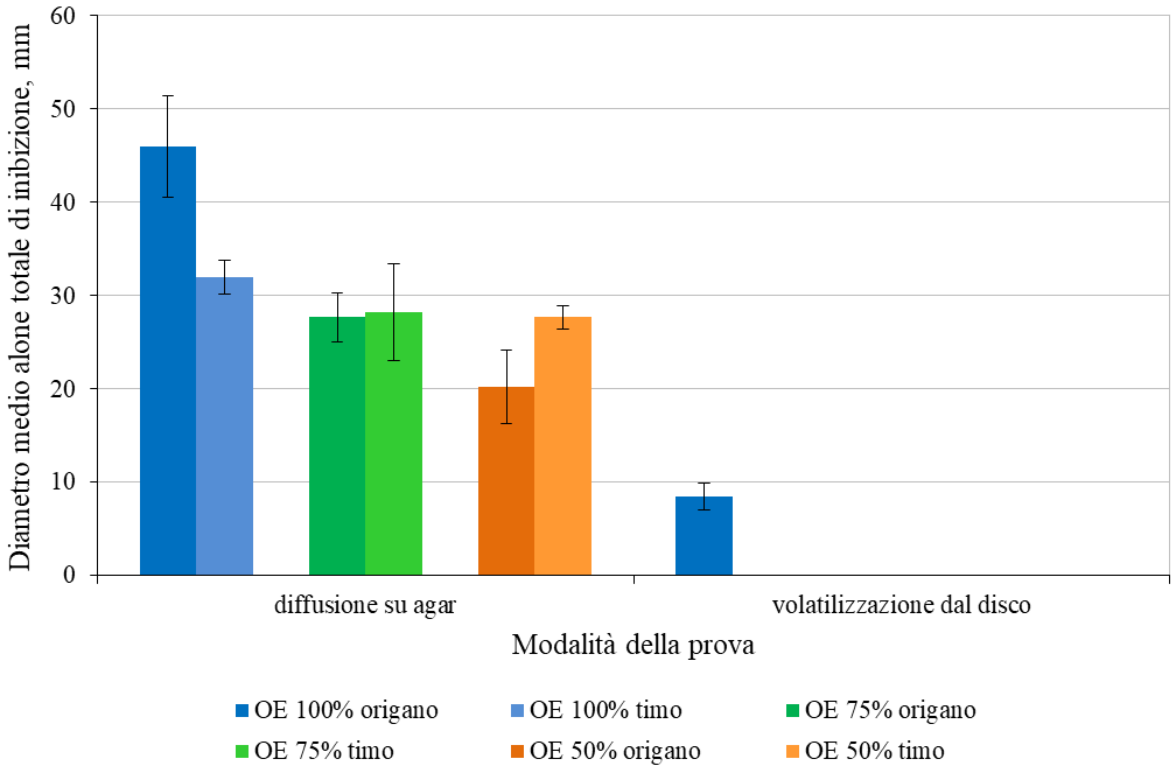

Figura 3.24: confronto a 48 h tra i diametri osservati testando gli OE nei confronti di *E. coli* a 37°C con il metodo di diffusione su agar e in fase vapore.

Anche il paragone tra i test condotti a 28°C evidenzia la netta preponderanza dell'efficacia degli oli nelle prove a contatto con l'agar, dal momento che in fase vapore non è stata osservata alcuna inibizione nemmeno per gli oli puri.

Il lievito *R. mucilaginosa*, testato con gli oli in fase liquida, ha solamente fatto osservare una mancanza di pigmentazione, senza aloni di inibizione; seguendo la tendenza delle prove con il batterio, non stupisce se anche nelle prove di volatilizzazione dal disco non si è notato un effetto maggiore.

4 Conclusioni

In questo lavoro di Tesi è stata indagata l'efficacia degli oli essenziali nell'inibire o rallentare la crescita di alcuni microrganismi.

Gli oli essenziali presi in esame sono stati l'OE di origano (*Origanum vulgaris* oil OE0375) e l'OE di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970), testati in diverse concentrazioni nei confronti del batterio *E. coli* LMG 08063, del lievito *R. mucilaginosa* e del fungo filamentoso *A. alternata* BNR.

Per il batterio e il lievito, le sperimentazioni sono state condotte utilizzando il metodo della diffusione su agar, per valutare l'azione degli oli a diretto contatto con i microrganismi, e successivamente con il metodo della volatilizzazione dal disco, per testare l'efficacia dei vapori degli oli. Il fungo filamentoso è stato testato solamente con quest'ultimo procedimento.

Dalle prove compiute con il metodo della diffusione su agar è risultato che:

- entrambi gli oli essenziali sono in grado di inibire la crescita di *E. coli* e di provocare un'assenza di pigmentazione nel lievito, senza far osservare aloni di inibizione;
- l'effetto inibente aumenta all'incrementare della concentrazione di olio, anche se non proporzionalmente in tutte le prove;
- la temperatura di incubazione ha un ruolo chiave nelle prove condotte su *E. coli*, in quanto influenza sia la velocità di crescita del batterio, sia la tensione di vapore degli oli: a 37°C, infatti, questa è più alta rispetto alla stessa a 28°C e gli aloni di inibizione misurati sono stati di dimensione maggiore;
- l'OE di origano sembra avere un'efficacia superiore a quella dell'OE di timo quando testato puro, mentre l'opposto avviene in diluizione del 50% con TEGO.

I risultati relativi ad *E. coli* incubato a 37°C sono poi stati confrontati con quelli ottenuti da Gallo (2021) con *S. epidermidis* incubato alla stessa temperatura e testando le medesime concentrazioni e quantità di OE. La comparazione ha evidenziato che, rispetto ai test di Gallo, gli aloni di inibizione completa sono risultati inferiori in diametro, circondati da un zona di crescita rallentata e questi valori non sono variati nel tempo. Ciò confermerebbe la maggior efficacia, almeno entro le 24 ore, degli OE sui batteri Gram positivi, la cui parete è più facilmente permeabile ai componenti terpenici con azione antimicrobica (Nazzaro, 2013).

Dalle prove compiute con il metodo della volatilizzazione dal disco è risultato che:

- entrambe gli oli essenziali sono in grado di inibire la crescita di *A. alternata* e di provocare un'assenza di pigmentazione nel lievito, senza far osservare aloni di inibizione, mentre, nei confronti di *E. coli*, solo l'OE di origano testato puro ha provocato un rallentamento della crescita del batterio
- l'effetto inibente, come osservato per le prove su fase solida, aumenta con la purezza dell'olio e, nel caso dell'OE di origano, anche dal volume di olio testato, sebbene anche in questo caso non sempre in modo proporzionale;
- con *E. coli*, così come per le prove a contatto, la temperatura più elevata ha consentito di ottenere un effetto maggiore in virtù della più alta tensione di vapore degli oli;
- con volumi di 3 µL di soluzione, l'OE di origano è risultato maggiormente efficace dell'olio di timo in concentrazione del 100% e del 50% nei confronti di *A. alternata*,

inibendo totalmente la crescita del fungo nel primo caso, mentre nel secondo rallentandola sensibilmente rispetto al controllo; in concentrazione del 75%, invece, la crescita è iniziata dopo 168 h di incubazione in entrambi i casi;

- con volumi di 10 µL di soluzione, entrambi gli OE hanno inibito la crescita del fungo per tutto il tempo di osservazione, mentre diluiti al 50% hanno fatto registrare crescita solamente dopo 240 ore;
- l'olio di origano ha avuto, nei confronti di *E. coli*, una maggiore efficacia rispetto a uno stesso volume di olio puro, ma diluito al 50% con TEGO. Questo dato suggerisce che, nonostante il diluente non inibisca la crescita, esso influenzi l'evaporazione dell'olio, ostacolandola.

I ottenuti con *E. coli* incubato a 37°C sono stati poi confrontati con quelli di Gallo condotti con *S. epidermidis*, facendo nuovamente emergere una maggiore efficacia degli oli contro il batterio Gram positivo, per il quale si sono osservati aloni anche testando l'OE di timo.

Infine, il paragone tra i dati ottenuti con il metodo di diffusione su agar e il metodo di volatilizzazione dal disco ha evidenziato come il primo abbia fatto registrare aloni di inibizione di dimensione maggiore. Ciò può essere spiegato dal fatto che, su terreno solido, vi è sia il contributo antimicrobico dovuto alla fase liquida a diretto contatto con i microrganismi, sia il contributo dei vapori degli oli.

Premessi ulteriori studi per indagare più approfonditamente il meccanismo d'azione, i diluenti più appropriati e le concentrazioni limite che portano ad avere un'azione antimicrobica e senza provocare effetti avversi per la salute dell'uomo, gli OE sembrano possedere le caratteristiche idonee per essere utilizzati nella disinfezione di ambienti e superfici.

5 Bibliografia

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008, Biological effects of esential oils – A review, *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446-475.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S. K., 2016, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**, 71-79.

Bozin B., mimika-Dukic N., Simin N., Anackov G., 2006, Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1822-1818.

Butzge J. C., Ferrão S. K., Mezzomo L., Calil L. N., Mezzari A., Limberger R. P., Apel M. A., 2020, Antifungal activity of essential oils from *Cinnamomum cassia*, *Myristica fragrans* and *Syzygium aromaticum* against *Rhodotorula mucilaginosa*, *Drug Analytical Research*, **4**(2), 3-11.

Cetin-Karaca H., 2011, Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens. Master's Theses. University of Kentucky.

Feng W., Chen J., Zheng X., Liu Q., 2011, Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments, *Food Control*, **22**, 78-81.

Gallo C., 2021, Studio delle proprietà antimicrobiche di oli essenziali. Tesi di Laurea. Politecnico di Torino, Torino.

Ghabraie M., Vu K. D., Tata L., Salmieri S., Lacroix M., 2016, Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat, *LWT-Food Science and Technology*, **66**, 332-339.

Gonçalves G. M. S, Srebernich S. M., Bragagnolo N., Madalozzo E. S., V. L. Merhi, Pires D. C., 2013, Study of the composition of *Thymus vulgaris* essential oil, developing of topic formulations and evaluation of antimicrobial efficacy, *Journal of Medicinal Plants Research*, **73**, 1736-1745.

Kanyinda J.-N. M., 2020, Coronavirus (COVID-19): A Protocol For Prevention And Treatment (Covalyse®), *European Journal of Medical and Health Science*, **2**(3), 1-4.

Kloucek P., Smid J., Frankova A., Kokoska L., Valterova I., Pavela R., 2012, Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase, *Food Research International*, **47**, 161-165.

Konuk H. B., Ergüden B., 2017, Antifungal activity of various essential oils against *Saccharomyces cerevisiae* depends on disruption of cell membrane integrity, *Biocell*, **41**(1), 13-18.

Kustrzeba-Wójcicka I., Siwak E., Terlecki G., Wolańczyk-Mędrala A., Mędrala W., 2014, *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, **47**, 354-365.

Mani-López E., Cortés-Zavaleta O., López-Malo A., 2021, A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi, *SN Applied Sciences*, **3**(1), 44.

Marriott P. J., Shellie R., Cornwell C., 2001, Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *Journal of Chromatography*, **936**, 1-22.

Martina C., 2019, Trattamento con oli essenziali di materiale cartaceo alluvionato e biodeteriorato. Tesi di Laurea. Politecnico di Torino, Torino.

Masango P., 2005, Cleaner production of essential oils by steam distillation, *Journal of Cleaner Production*, **13**, 833-839.

Memar M. Y., Raei P., Alizadeh N., Aghdam M. A., Kafil H. S., 2017, Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates, *Reviews in Medical Microbiology*, **28**(2), 63-68.

Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V., 2013, Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals*, **6**, 1451-1474.

Oussalah M., Caillet S., Lacroix M., 2006, Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, **69**(5), 1046-1055.

Özcan M. M., Chalchat J. C., 2009, Chemical composition and antimicrobial properties of the essential oil of *Origanum saccatum L.*, *Journal of Food Safety*, **29**, 617-628.

Pateiro M., Barba F. J., Domínguez R., Sant'Ana A. S., Khaneghah A. M., Gavahian M., Gómez B., Lorenzo J. M., 2018, Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review, *Food Research International*, **113**, 156-166.

Rusenova N., Parvanov P., 2009, Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance, *Trakia Journal of Sciences*, **7**(1), 37-43.

Saad N. Y., Muller C. D., Lobstein A., 2013, Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components, *Flavour and Fragrance Journal*, **28**, 269-279.

Solgi M., Ghorbanpour M., 2014, Application of essential oils and their biologıcal effects on extendıng the shelf-life and quality of horticultural crops, *Trakia Journal of Science*, **12**(2), 198-210.

Sutherland K., 2019, Gas chromatography/mass spectrometry techniques for the characterisation of organic materials in works of art, *Physical Sciences Reviews*, **4**(6), 1-16.

Tongnuanchan P., Benjakul S., 2014, Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation, *Journal of Food Science*, **79**(7), 1231-1249.

Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli M. A., Cuffini A. M., Alonzo V., Carlone N. A., 2007, Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods, *Journal of Applied Microbiology*, **102**(6), 1544-1550.

Tyagi A. K., Malik A., Gottardi D., Guerzoni M. E., 2012, Essential oil vapour and negative air ions: A novel tool for food preservation, *Food Science & Technology*, **26**, 99-113.

Wani A. R., Yadav K., Khursheed A., Rather M. A., 2020, An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses, *Microbial Pathogenesis*, **152**, 1-14.

Ringraziamenti

Questo lavoro di tesi rappresenta la conclusione di un percorso di studi durato cinque anni, durante i quali ho avuto la possibilità di arricchire le mie conoscenze, di fare nuove esperienze e di conoscere persone preziose.

Ringrazio i miei relatori, Davide Fissore e Francesca Bosco, per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto di tesi, per la loro competenza e disponibilità.

Ringrazio la dottoressa Chiara Mollea che con la sua disponibilità, la sua pazienza e la sua gentilezza mi ha aiutato nelle pratiche di laboratorio.

Desidero ringraziare la mia famiglia, i miei genitori e mia nonna Elda, per il loro aiuto e sostegno e per aver sempre creduto nelle mie capacità.

Un pensiero speciale va a Debora, l'amica di studi di questi cinque anni, per avermi aiutato, allietato ed avermi fatto tornare il sorriso, con la sua straordinaria allegria ed ironia, anche nei momenti più difficili.

Ringrazio, in ultimo, tutti gli amici che mi sono stati accanto in questi anni e che mi hanno aiutato e supportato, negli studi e nello svago.