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 delle proprietà antimicrobiche di oli essenziali

Relatori

prof. Davide Fissore
prof.ssa Francesca Bosco

Candidato

Chiara Gallo

Ottobre 2021

Indice

Indice……..……..…….……1

1 Introduzione..... 1

1.1 Gli oli essenziali 1

1.1.1 L'estrazione degli oli essenziali 2

1.1.2 Composizione chimica degli oli essenziali..... 5

1.1.3 Il meccanismo di azione degli oli essenziali 8

1.1.4 Metodi di valutazione dell'attività antimicrobica..... 10

1.1.5 Azione antibatterica degli oli essenziali su terreno solido e in fase vapore 14

1.1.6 Tossicità..... 16

1.2 Scopo del lavoro..... 16

2 Materiali e metodologie sperimentali 17

2.1 Materiali..... 17

2.2 Microrganismi e condizioni colturali..... 19

2.3 Prove sperimentali per la valutazione delle proprietà antibatteriche degli oli essenziali 19

2.3.1 Preparazione degli oli essenziali 19

2.3.2 Prove preliminari sugli oli essenziali 20

2.3.2.1 Prove con il metodo di diffusione su agar 20

2.3.2.2 Prove con il metodo di volatilizzazione dal disco 22

3 Analisi dei risultati 24

3.1 Studio dell'effetto degli oli essenziali su terreno solido..... 24

3.1.1 Attività antibatterica degli oli essenziali su *S. epidermidis* e *E. coli*..... 24

3.1.2 Attività antibatterica degli oli essenziali in piastre di polistirene e di vetro..... 29

3.1.3 Prove antibatteriche con un solo dischetto imbibito di olio essenziale per piastra.... 32

3.1.4 Valutazione del diametro dell'alone di inibizione nel tempo..... 35

3.1.5 Studio del fenomeno di diffusione degli oli essenziali sullo strato di agar 38

3.2 Studio dell'effetto degli oli essenziali in fase vapore *39*

3.2.1 Attività antibatterica degli oli essenziali su *S. epidermidis* e *E. coli* 40

3.2.2 Effetto del volume di olio essenziale applicato a dischetti di diverse dimensioni 42

3.2.3 Valutazione del diametro dell'alone di inibizione nel tempo 46

3.2.4 Valutazioni delle concentrazioni di olio essenziale testate 52

3.2.5 Effetto della dimensione del dischetto imbibito di olio essenziale sull'estensione dell'alone di inibizione 56

3.3 Confronto degli effetti degli oli essenziali su terreno solido e in fase vapore *59*

4 Conclusioni 63

5 Bibliografia 65

1 Introduzione

Le malattie infettive sono da sempre la causa più comune di morbilità e mortalità in molti Paesi del mondo.
La scoperta degli antibiotici ha permesso di limitare i danni causati dai microrganismi patogeni, causa di numerose malattie infettive, abbassando l'indice di mortalità.
L'utilizzo eccessivo di queste sostanze ha comportato, però, un progressivo aumento della capacità di resistenza agli antibiotici tradizionali da parte di funghi e batteri patogeni.
I nuovi ceppi di patogeni resistenti agli antibiotici sono, quindi, un problema per la salute pubblica e impongono la necessità di individuare nuovi composti con proprietà antimicrobiche, possibilmente non tossici per le cellule umane.
È cresciuto, di conseguenza, l'interesse verso sostanze naturali da impiegare come agenti terapeutici e antimicrobici, considerata la loro elevata disponibilità, la minor tossicità e miglior biodegradabilità rispetto agli antibiotici e ai conservanti sintetici attualmente disponibili (Raut *et al*, 2014).

Le piante medicinali e le erbe aromatiche sono da sempre la fonte principale di molecole attive per la produzione di prodotti farmaceutici.
Già da tempo, infatti, è noto che alcune sostanze presenti nelle piante o in parti di esse (fiori, foglie, radici), hanno capacità terapeutiche, antinfiammatorie, antiossidanti e antimicrobiche.
Queste sostanze sono state utilizzate nella produzione di farmaci o come additivi naturali per la conservazione degli alimenti in sostituzione dei conservanti chimici: inizialmente venivano, infatti, aggiunte solamente migliorare il gusto delle pietanze (spezie ed erbe aromatiche) per rendersi conto, poi, che sono in grado di aumentare la durata di conservazione per merito della loro natura antimicrobica e antiossidante (Bakkali *et al.*, 2008).
Da quel momento l'interesse verso queste sostanze con attività batteriostatica/battericida è cresciuto ulteriormente.

1.1 Gli oli essenziali

Un gruppo di composti naturali particolarmente interessanti per le loro proprietà antimicrobiche e antiossidanti è quello composto dagli oli essenziali (OE), sostanze presenti sottoforma di goccioline nei peli ghiandolari o nelle cavità secretorie della parete cellulare delle piante, nelle foglie, nei fiori o nella buccia di diversi agrumi, dai quali vengono estratti.
Gli OE sono miscele complesse di sostanze volatili, caratterizzate da un forte odore, prodotte da numerose piante come metaboliti secondari: sostanze non necessarie per le funzioni vitali del vegetale, ma prodotte in risposta ad agenti infettivi e a parassiti o per attirare gli impollinatori.
Sono stati utilizzati per molto tempo in diversi Paesi del mondo per scopi medicinali e sanitari.

Gli oli essenziali possono essere classificati in base al metodo di estrazione, alla composizione chimica o alle note aromatiche.

Herman *et al.* (2019) riportano la seguente classificazione degli oli essenziali in base all'aroma:

- *agrumati*: hanno un caratteristico odore di agrumi (es. limone, arancia, lime);
- *erbacei*: estratti da piante aromatiche (es. basilico, salvia, rosmarino);
- *medicinali/canfora*: hanno particolari proprietà curative (es. tea tree);
- *floreali*: ricavati da fiori o contengono l'essenza floreale della pianta (es. geranio, lavanda, rosa);
- *legnosi*: estratti da cortecce o con aroma di legno (es. cipresso, pino);
- *terrosi*: estratti da radici, con aroma terroso (es. valeriana);
- *speziati*: estratti da spezie o piante speziate (es. timo, anice, cannella, zenzero).

Il metodo di estrazione e la composizione chimica sono discussi nel seguito.

1.1.1 L'estrazione degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono miscele complesse di molecole organiche volatili e idrofobiche estratte sottoforma di goccioline di liquido oleoso da materiale vegetale di diverso tipo.
I metodi più comuni per l'estrazione di oli essenziali dai vegetali sono la distillazione con vapore, la spremitura a freddo e l'estrazione con solvente (Herman *et al*, 2019).

- *Distillazione in corrente di vapore*

  È il metodo più antico e il più utilizzato per l'estrazione di oli essenziali dai vegetali. Il prodotto ottenuto da questa estrazione è un olio incontaminato, privo di impurità.

  La materia prima vegetale da cui si vuole estrarre l'olio, viene posta nella parte superiore di una camera di distillazione, sul fondo della quale si trova dell'acqua in ebollizione: il vapore d'acqua attraversa il materiale vegetale, provocando l'apertura delle sacche oleose ed estraendo le essenze volatili in esso contenute.

  Come schematizzato nella Figura 1.1, il vapore ricco di sostanze aromatiche vaporizzate scorre in un tubo all'interno del refrigeratore e condensa.

  Il liquido così ottenuto è una miscela di acqua e olio essenziale che, essendo idrofobico e con densità minore rispetto all'acqua, si accumula nella parte superiore del recipiente e può essere facilmente separato.

  Nonostante la semplicità del processo, è possibile insorgano dei problemi causati dall'elevata temperatura a cui è esposta la matrice vegetale: l'acqua bollente può, infatti, causare l'idrolisi di esteri ad alcoli e acidi con conseguente modifica nella composizione degli oli essenziali estratti (Stratakos *et al*., 2015).

Figura 1.1: schema della distillazione in corrente di vapore per l'estrazione di oli essenziali, Figura tratta da *https://www.inherba.it/tecniche-estrazione-distillazione-oli-essenziali-piante-officinali/distillazione/* con modifiche

La frazione di oli essenziali estratti mediante distillazione a vapore è circa il 93% mentre il restante 7% può essere ulteriormente estratto con altri metodi.

L'acqua separata dall'olio è un'acqua aromatica, detta *idrolato*, che contiene ancora una certa quantità di olio essenziale disciolto (<5%) e di sostanze idrosolubili e viene utilizzata per produrre acque profumate e nell'industria della cosmetica.

- <u>*Spremitura a freddo*</u>

Questa tecnica viene applicata principalmente per l'estrazione di oli essenziali a partire dalle bucce degli agrumi: le sostanze aromatiche sono, infatti, contenute nelle sacche oleose o nelle ghiandole oleifere presenti principalmente nel *flavedo*, sottile strato esterno delle bucce degli agrumi (Figura 1.2).

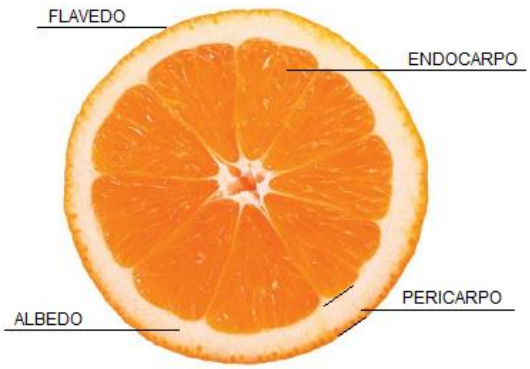

Figura 1.2: schema di un'arancia con indicate le parti principali che la costituiscono, Figura tratta da *http://www.it.contentotrade.net/siti-progetti-eu/life-terpene/gli-agrumi*

Come schematizzato in Figura 1.3, l'estrazione avviene in seguito all'azione meccanica di torchiatura che provoca la rottura delle ghiandole oleifere con conseguente rilascio dell'olio contenuto in esse e formazione di un'emulsione acquosa che andrà incontro a un processo di separazione (Herman *et al*, 2019).

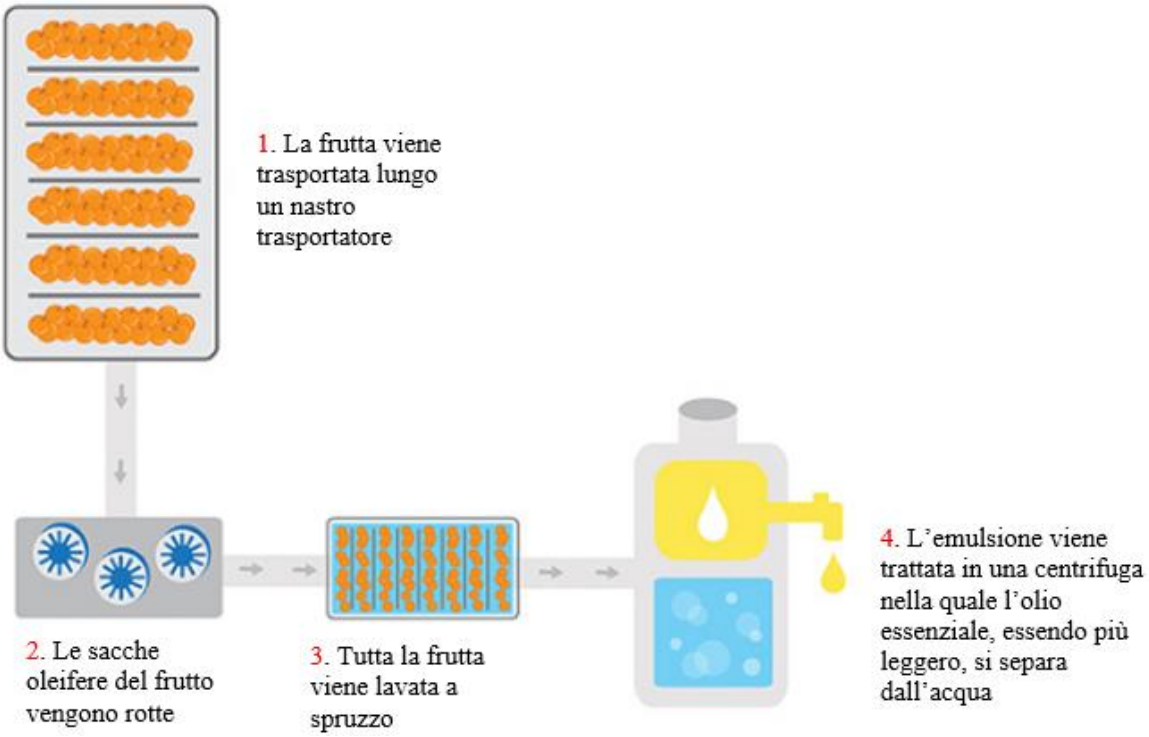

Figura 1.3: processo di spremitura a freddo per l'estrazione degli oli essenziali, Figura tratta da *https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html,* con modifiche

- *Estrazione con solvente*

Questa tecnica viene utilizzata solitamente per materiali vegetali delicati, non adatti alla spremitura a freddo o a essere sottoposti alla distillazione con vapore perché sensibili al calore, ad esempio i fiori.
Come schematizzato in Figura 1.4, il materiale da trattare viene posizionato su un vassoio e lavato con il solvente selezionato in grado di assorbire i composti volatili; il materiale vegetale viene spesso precedentemente sminuzzato per favorire la penetrazione del solvente nella matrice.
I solventi più utilizzati sono etanolo, alcol e metanolo.

La miscela solvente-olio ottenuta prende il nome di *concreta* ed ha una consistenza cerosa, questa viene sottoposta a un processo distillazione.

L'essenza ottenuta in seguito alla separazione del solvente si chiama *assoluta* e non olio essenziale e può essere contaminata da residui di solvente; perciò, non verrà utilizzata per applicazioni alimentari ma è di uso comune nelle industrie di profumi (Stratakos *et al.*, 2015).

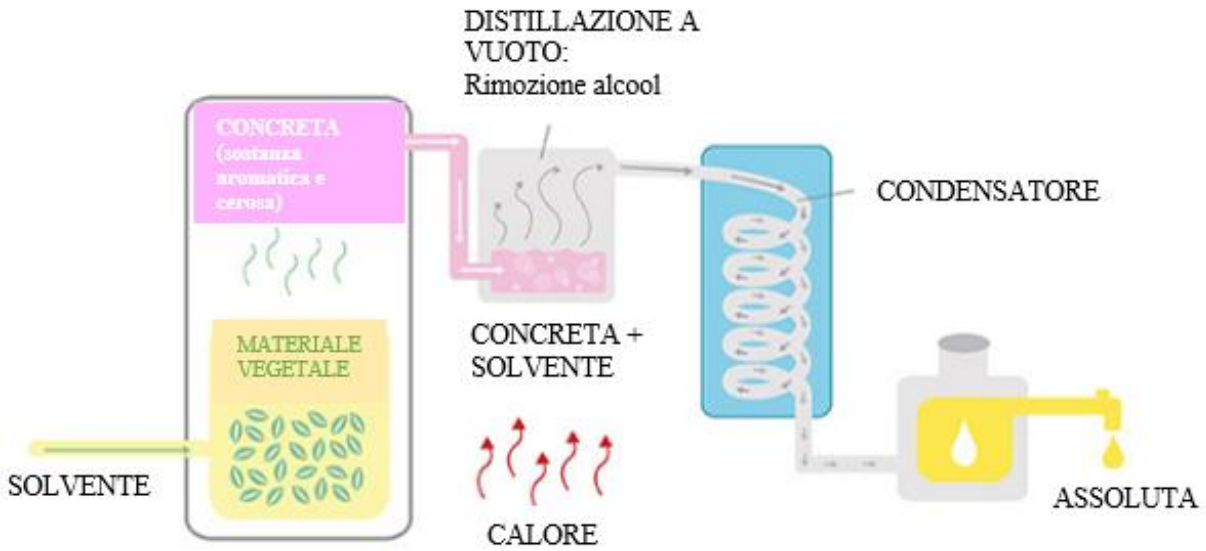

Figura 1.4: schema del processo di estrazione di oli essenziali con solvente,
Figura tratta da *https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html,* con modifiche

1.1.2 Composizione chimica degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono miscele naturali molto complesse che possono contenere fino a cento diversi componenti a concentrazioni più o meno elevate.

Sono solitamente caratterizzati da due o tre componenti principali, presenti ad elevate concentrazioni (20 - 70 %), mentre altre sostanze sono presenti solamente in tracce (Bakkali *et al.*, 2008).

I costituenti e le relative concentrazioni non dipendono solamente dalla specie della pianta, ma anche dalla provenienza (clima, altitudine, condizioni del suolo), dal tipo di fertilizzanti utilizzati per la coltivazione, dalla stagione di raccolta e dal metodo di estrazione.

Ad esempio, il carvacrolo e il timolo sono i componenti principali degli oli essenziali della famiglia delle Lamiaceae, a cui appartengono l'*Origanum vulgaris* (origano comune) e il *Thymus vulgaris* (timo), ma la concentrazione di queste due sostanze varia a seconda della provenienza e della stagione di raccolta della pianta.

La maggior parte dei componenti presenti negli oli essenziali appartiene al gruppo dei terpeni e terpenoidi, altri costituenti sono i composti aromatici e alifatici a basso peso molecolare.

I terpeni sono molecole derivanti dalla condensazione di unità ramificate di isoprene (Figura 1.5)

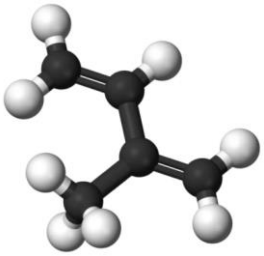

Figura 1.5: struttura dell'isoprene.
Figura tratta da *https://www.chimicamo.org/chimica-organica/isoprene/*

I terpeni maggiormente presenti negli oli essenziali sono i monoterpeni C_{10} e i sesquiterpeni C_{15}. Le strutture principali sono rappresentate in Figura 1.6.

I monoterpeni sono molecole presenti in tutti gli oli essenziali per circa il 90% e presentano una struttura a 10 atomi di carbonio con almeno un doppio legame, formato in seguito all'unione di due unità isopreniche.

Queste sostanze reagiscono velocemente con l'ossigeno dell'aria e sono particolarmente sensibili al calore.

Come riportato da Bakkali *et al.* (2008), i monoterpeni possono essere classificati in base ai gruppi funzionali presenti nella struttura in:

- *idrocarburi aciclici* o *ciclici* (es. p-cimene, limonene);
- *alcoli* (es. linalolo, terpineolo);
- *aldeidi* (es. geraniale);
- *chetoni;*
- *esteri* (es. linalil acetato);
- *eteri;*
- *perossidi;*
- *fenoli* (es. timolo, carvacrolo)

I sesquiterpeni sono molecole costituite da 15 atomi di C e si formano in seguito all'accoppiamento di tre unità isopreniche.

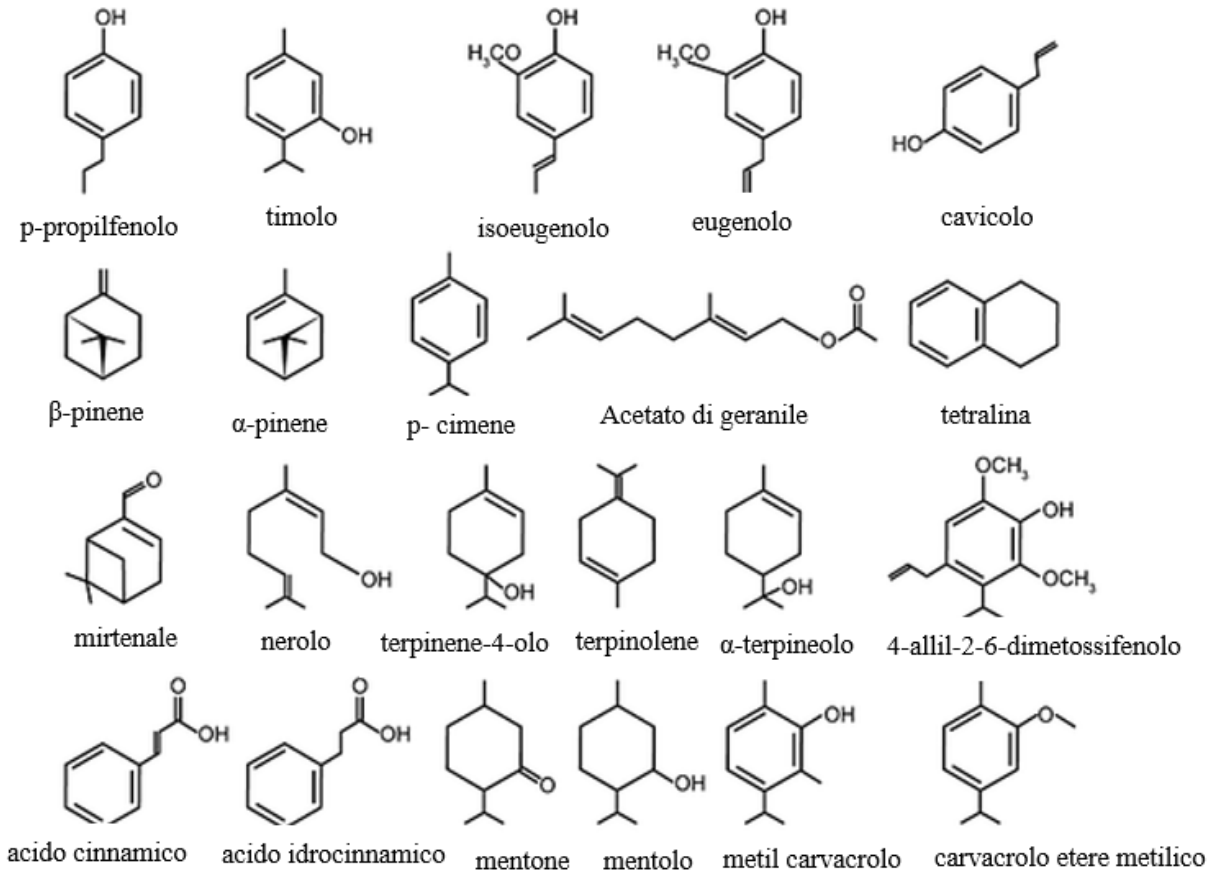

Figura 1.6: strutture terpeniche presenti negli oli essenziali
Figura tratta da *Saad et al. (2013)* e riprodotta con modifiche

Negli oli essenziali, oltre ai terpenoidi, sono presenti in concentrazioni minori alcuni composti aromatici derivanti dal fenilpropano (Figura 1.7).

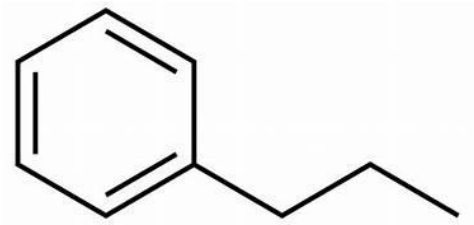

Figura 1.7: struttura del fenilpropano
Figura tratta da *https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylbenzene#section=2D-Structure*

I composti aromatici comprendono:

- *aldeidi* (es. cinnamaldeide);
- *alcoli*;
- *fenoli* (es. eugenolo);
- *derivanti metossi*;
- *composti di metil diossile*

I principali composti aromatici presenti negli oli essenziali sono rappresentati in Figura 1.8.

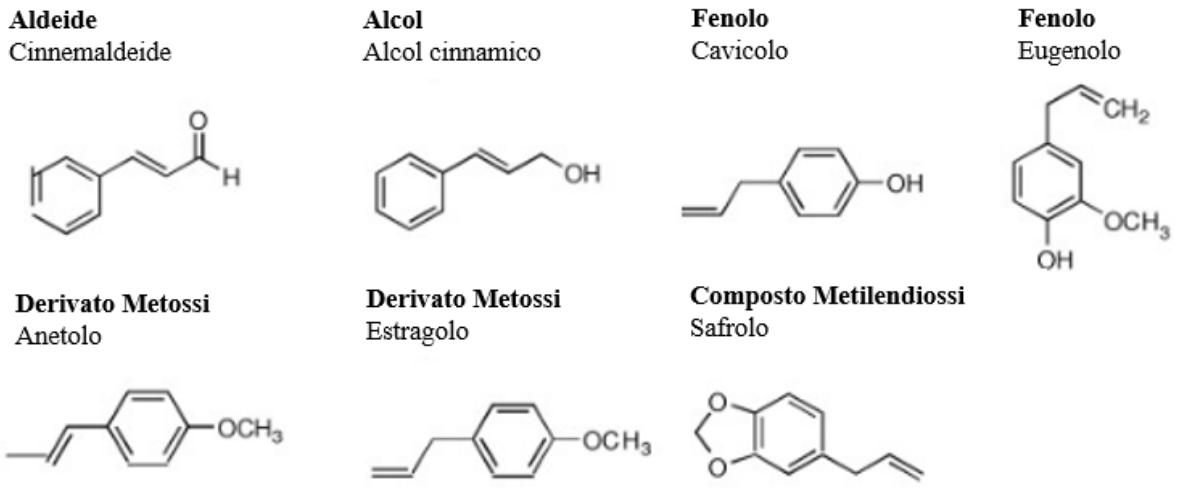

Figura 1.8: composti aromatici presenti negli oli essenziali
Figura tratta da *Bakkali et al. (2008)* e riprodotta con modifiche

1.1.3 Il meccanismo di azione degli oli essenziali

Gli oli essenziali sono stati oggetto di studi farmacologici e di vari test *in vitro* con lo scopo di valutare la loro attività antimicrobica.

In natura, essi svolgono un ruolo importante nella protezione delle piante come antibatterici, antivirali, insetticidi e agiscono riducendo l'appetibilità della pianta per gli erbivori; possono anche, però, essere prodotti per attirare insetti impollinatori per favorire la dispersione di polline e semi.

Nella maggior parte dei casi, gli oli essenziali hanno la capacità di inibire la crescita di potenziali patogeni agendo sulla vitalità del biofilm e sulla morfologia delle cellule sessili.

Alcuni oli hanno, infatti, mostrato un'attività antibatterica e antifungina significativa, superiore a quella dei prodotti chimici tradizionali.

La diversa efficacia degli oli essenziali sui microrganismi dipende dai componenti presenti nell'olio, dalle loro caratteristiche prevalentemente idrofile o lipofile e dal loro impatto sinergico: infatti, anche se l'attività antimicrobica viene spesso attribuita al o ai componenti principali dell'OE, le interazioni tra i diversi costituenti, ossia l'effetto sinergico che può svilupparsi, non deve essere trascurato (Bakkali *et al.*, 2008).

Tra i componenti più attivi contro i microrganismi, si trovano i composti fenolici (es. timolo, carvacrolo, eugenolo) e i composti aromatici.

L'idrofobicità di queste sostanze consente loro di alterare la frazione lipidica della membrana cellulare batterica o fungina e mitocondriale, con conseguente alterazione delle strutture cellulari, aumento della permeabilità e fuoriuscita del contenuto citoplasmatico.

La capacità di permeabilizzare, depolarizzare e distruggere le membrane mitocondriali esterne e interne provoca la morte cellulare, poiché le reazioni che interessano inizialmente la parete

cellulare e la membrana esterna si estendono all'intera cellula, provocando la perdita di ioni, la riduzione del potenziale di membrana, il collasso della pompa protonica e l'esaurimento del pool di ATP (Raut *et al.,* 2014).

Saad *et al*. (2013) hanno confrontato l'attività antibatterica del carvacrolo (che può costituire più del 70% dell'olio essenziale di origano e fino al 30% dell'olio di timo) con la sua forma di etere metilico, osservando una differenza nella capacità inibitiva a seconda della presenza o meno del gruppo idrossile nella struttura fenolica.

Anche la posizione del gruppo ossidrile influenza l'efficacia dei terpeni: i due isomeri timolo e carvacrolo hanno, infatti, mostrato attività differente contro i batteri Gram positivi e Gram negativi, seppur con elevata efficacia antimicrobica per entrambi.

Le strutture di timolo e carvacrolo sono riportate in Figura 1.9.

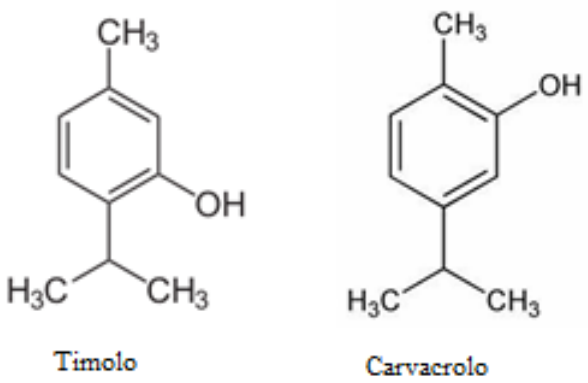

Figura 1.9: timolo e carvacrolo,
Figura tratta da *https://it.wikipedia.org/wiki*

Saad *et al*. (2013) hanno anche confrontato l'attività del timolo e del p-cimene, un idrocarburo monoterpenico ciclico, dimostrando l'importanza dell'anello fenolico nella struttura della molecola nel garantire efficacia antimicrobica, siccome la sua lipofilia favorisce la rottura della membrana citoplasmatica.

Le strutture di timolo e p-cimene sono riportate in Figura 1.10.

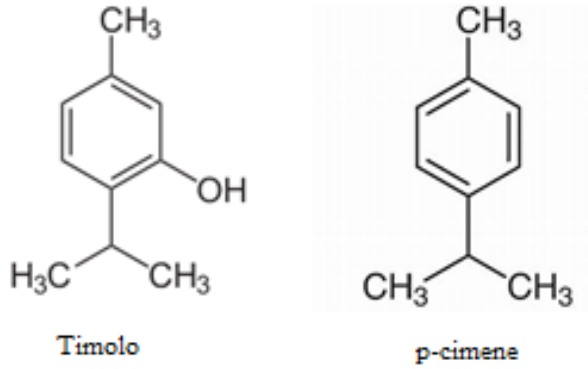

Figura 1.10: timolo e p-cimene,
Figura tratta da *https://it.wikipedia.org/wiki*

Anche i gruppi alcolici e i gruppi chetonici dei terpeni mostrano un'attività battericida sulle cellule vegetative, in particolare sembrano agire denaturando le proteine.

Quindi, l'azione antibatterica degli oli essenziali sembra essere dovuta alle frazioni lipofile dei componenti presenti negli oli essenziali che agiscono sulle frazioni lipidiche delle membrane cellulari, influenzando, a seconda della struttura e delle proprietà chimico-fisiche dei componenti, le funzioni delle strutture molecolari di membrana: sistemi di trasporto, enzimi, canali ionici di sodio e potassio o recettori.

I batteri Gram negativi, generalmente, hanno dimostrato di essere più resistenti dei Gram positivi e questo comportamento è attribuito alla maggior complessità della parete cellulare: la membrana esterna, saldamente legata allo strato interno di peptidoglicano tramite la lipoproteina di Braun, circonda la cellula e, essendo quasi totalmente impermeabile, ostacola l'ingresso delle molecole di OE (Nazzaro *et al*., 2013).

Memar *et al*. (2017) hanno mostrato la capacità di timolo e carvacrolo di inibire la formazione del biofilm, struttura complessa di cellule microbiche incluse in una matrice polimerica extracellulare da esse prodotta: questi composti, infatti, sono in grado di bloccare la produzione delle forme filamentose vitali necessarie per la formazione del biofilm già durante le prime fasi di crescita.

Hanno, inoltre, studiato la capacità antifungina di timolo e carvacrolo, componenti principali dell'olio di timo e di origano, su patogeni fungini: anche in questo caso, la frazione lipofila di timolo e carvacrolo influenza la fluidità della membrana cellulare e la sua permeabilità, oltre che modificare la funzione degli enzimi di membrana che catalizzano la sintesi dei composti polisaccaridici che compongono la parete cellulare, inibendo così la crescita delle cellule.

L'attività fungistatica e fungicida sembra, quindi, dipendere dalla presenza di alcuni gruppi funzionali; in particolare si riconosce la seguente scala di attività:

fenoli > aldeidi cinnamiche > alcoli > aldeidi > chetoni > eteri > idrocarburi.

Per quanto riguarda i componenti fenolici, l'attività antimicotica aumenta con il crescere dell'ingombro sterico della molecola, ulteriormente incrementata dalla presenza di gruppi alchilici sull'anello benzenico.

1.1.4 Metodi di valutazione dell'attività antimicrobica

Per la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali vengono utilizzati, con delle leggere modificazioni, i metodi convenzionali per i test gli antibiotici, con tutte le caratteristiche di standardizzazione, ripetibilità e qualità del risultato richieste dagli organismi internazionali di controllo, quali EUCAST e CLSI (ISS, 2015).

Testare e valutare l'attività antimicrobica degli oli essenziali risulta difficile a causa della loro complessità, elevata volatilità, insolubilità e viscosità; ad oggi, non esiste, infatti, una standardizzazione delle metodiche sperimentali.

La natura idrofobica e la viscosità possono ridurre la possibilità di diluizione e indurre, quindi, la separazione tra la fase oleosa e la fase acquosa utilizzata per le diluizioni e, conseguentemente, una distribuzione non uniforme nel terreno di coltura.

Durante le prove antimicrobiche è dunque necessario valutare se i solventi utilizzati per le diluizioni influenzano la crescita microbica e limitare l'evaporazione degli oli o la decomposizione di alcuni componenti a causa delle condizioni sperimentali e dei tempi di incubazione (Kalemba e Kunicka, 2003).

Molti studi scientifici esprimono i risultati ottenuti dalle prove antimicrobiche effettuate come *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), cioè la concentrazione minima di olio essenziale in grado di inibire la crescita microbica in una data configurazione, o come *Minimum Bactericidial Concentration* (MBC), cioè la concentrazione minima di OE in grado uccidere il microrganismo in esame.

La valutazione dell'efficacia antimicrobica degli oli essenziali può essere condotta con diversi metodi a seconda della fase in cui viene svolto il test.

Per valutare l'attività antimicrobica degli OE su fase solida si utilizza il *metodo di diffusione su agar*, per il test di oli essenziali in fase liquida si utilizza il *metodo di diluizione su agar o in terreno liquido* e, infine, per testare l'efficacia antimicrobica degli oli essenziali in fase vapore si usa il *metodo di volatilizzazione dal disco*.

- *Metodo di diffusione su agar*

  È la tecnica più diffusa per la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali su fase solida.

  In questa procedura, le piastre di Petri del diametro di 90 mm vengono riempite con 20 ml di brodo di coltura agarizzato e successivamente inoculate con un inoculo standardizzato del microrganismo da testare.

  La standardizzazione della dimensione della piastra e della quantità di terreno utilizzata per l'esecuzione dei test è importante perché, variazioni dello spessore, possono comportare una variazione degli aloni di inibizione causata da una diversa diffusione degli OE (ISS, 2015).

  Sono possibili due metodi di incorporazione dell'olio essenziale sul terreno solido: uno prevede l'utilizzo di un dischetto di carta filtrante, l'altro la realizzazione di un pozzetto nell'agar.

  Il diametro del disco di carta o del pozzetto, la concentrazione e la quantità di oli essenziale e il solvente utilizzato per le diluizioni sono i parametri più importanti da considerare durante la valutazione dei risultati (Kalemba *et al*, 2003).

  Il disco di carta è la tecnica più utilizzata perché facile da eseguire e richiede piccole quantità di olio: il disco filtrante viene posizionato sulla superficie di agar precedentemente inoculato e successivamente imbibito di olio essenziale alla concentrazione desiderata; gli oli essenziali, infatti, vengono raramente testati puri, ma di solito si procede con delle diluizioni.

  L'olio essenziale aggiunto al disco filtrante diffonde radialmente sulla superficie dell'agar in maniera più o meno uniforme, provocando un gradiente di concentrazione, con valori di concentrazione che diminuiscono all'aumentare della distanza dal disco.

Nelle prove effettuate con il metodo di diffusione, l'efficacia antimicrobica degli oli essenziali viene valutata misurando l'alone di inibizione, definito come la zona che si forma attorno al disco imbibito di agente antimicrobico in cui non si ha crescita batterica o fungina; maggiore è la dimensione dell'alone, maggiore è l'efficacia della sostanza antimicrobica.

In Figura 1.11 si ha un esempio degli aloni di inibizione ottenuti da Silva *et al*. (2012) testando gli OE di timo e origano contro *S. aureus*

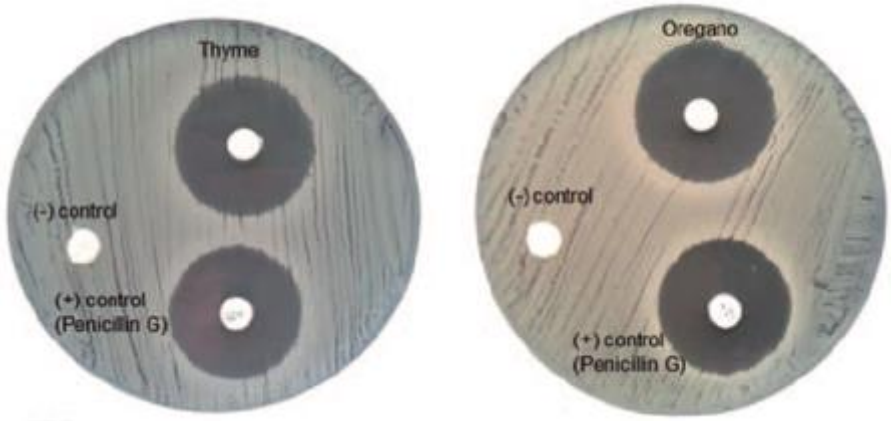

Figura 1.11: Aloni di inibizione ottenuti con il metodo della diffusione in agar per timo (*T. vulgaris*) e origano (*O. vulgare*) contro *S. aureus*,
Figura tratta da *Silva N. et al. (2012),* con modifiche

Alcuni degli svantaggi segnalati quando si utilizza questo metodo per testare gli oli essenziali sono dovuti alla natura idrofobica di alcuni componenti che ne limita la diffusione sull'agar, causando un'errata valutazione del loro contributo contro i microrganismi, e a una possibile evaporazione dei componenti volatili con il solvente disperdente durante l'incubazione (Silva *et al.*, 2012).

- <u>*Metodo di volatilizzazione dal disco*</u>

  È il test più semplice impiegato per la valutazione dell'attività microbica degli oli essenziali in fase vapore; è anche conosciuto come *metodo in microatmosfera*.

  Le piastre di Petri del diametro di 90 mm vengono riempite con 20 ml di brodo di coltura agarizzato e successivamente inoculate con un inoculo standardizzato del microrganismo da testare, un disco di carta sterile viene posizionato sul coperchio della piastra e imbibito di olio essenziale alla concentrazione desiderata.

  Anche in questo caso è importante la standardizzazione della quantità di terreno usato per l'esecuzione del test per garantire la corretta riproducibilità dei risultati.

  Le piastre vengono sigillate con Parafilm e avvolte in uno strato di pellicola trasparente per impedire la fuoriuscita dei vapori di OE, incubate posizionate capovolte alla temperatura ottimale per la crescita del microrganismo.

  Dopo un tempo di incubazione stabilito, si misura l'inibizione risultante (Bueno J., 2015).

  In Figura 1.12 è rappresentato uno schema della piastra di Petri preparata con il metodo appena descritto.

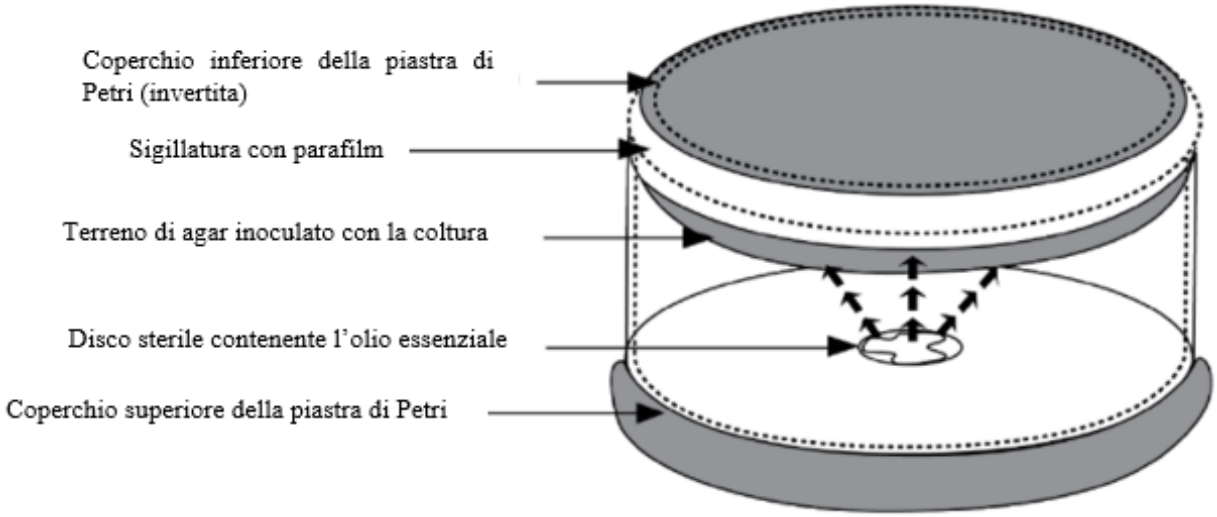

Figura 1.12: *metodo di volatilizzazione dal disco* per la valutazione dell'attività microbica di oli essenziali in fase vapore. Figura tratta da *Bueno (2015)*, con modifiche

Anche se non esiste un metodo operativo standardizzato per la valutazione dell'attività antimicrobica in fase vapore, la MIC e la MBC in queste condizioni vengono solitamente espresse come µL di olio essenziale per unità di volume di spazio di testa sopra il microrganismo che cresce sulla superficie dell'agar.

In Figura 1.13 è rappresentato un confronto tra le due metodiche appena descritte.

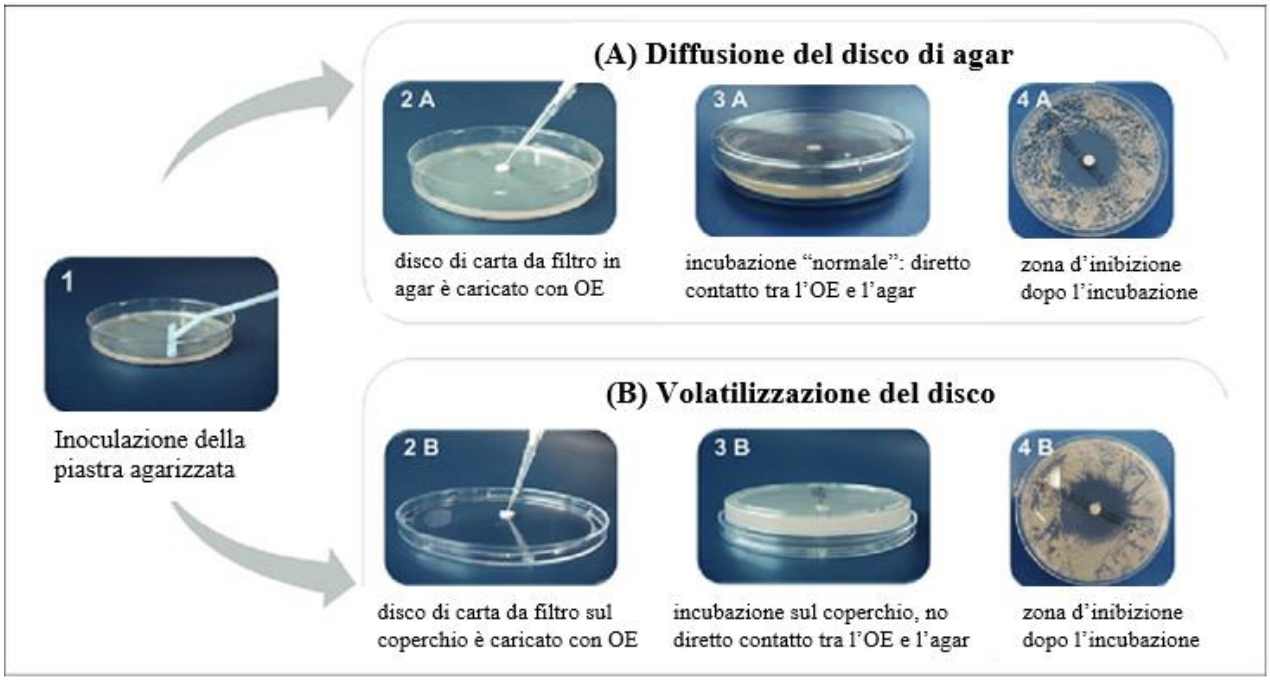

Figura 1.13: Procedura sperimentale per il test di diffusione del disco di agar (A) e per il test di volatilizzazione dal disco (B). Le immagini 4A e 4B mostrano le zone di inibizione dopo l'incubazione. Figura tratta da *Bismarck D. et al.* (2019), con modifiche

- *Metodo di diluizione in brodo o agar*

  Il metodo di diluizione è uno dei metodi di base per i test di sensibilità degli antimicrobici in terreno liquido e viene utilizzato sia per i batteri che per i funghi.

  A seconda del liquido utilizzato per la diluizione, si distinguono il *metodo di diluizione in brodo* e il *metodo di diluizione in agar*: nel primo caso si utilizzano per la diluizione beute coniche (in questo caso di parla di *microdilution assay*) o una piastra a 96 pozzetti (*multiwell*) in ciascuno dei quali vengono aggiunti il terreno di coltura liquido, l'inoculo microbico preparato nello stesso mezzo dopo opportuna diluizione della sospensione microbica e l'olio essenziale alla concentrazione da testare, nel secondo caso per la diluizione si utilizzano piastre di Petri o provette (Kalemba *et al*, 2013, Balouiri *et al*, 2015). Dopo opportuna miscelazione, le beute o la piastra multiwell vengono incubate alle condizioni di temperatura più adatte per la crescita del microrganismo.

  L'efficacia dell'inibizione può essere valutata ad occhio nudo osservando la torbidità della soluzione o più precisamente misurando la densità ottica (OD) con lo spettrofotometro e successivamente inoculando delle piastre di Petri prelevando dei campioni dai pozzetti torbidi, che mostrano quindi crescita batterica, per poi procedere con il conteggio delle colonie (CFU) dopo opportuna incubazione (Balouiri *et al*, 2015).

  Durante questo tipo di prove, la MIC e la MBC vengono solitamente espresse come mg di OE su L di soluzione.

1.1.5 Azione antibatterica degli oli essenziali su terreno solido e in fase vapore

Il metodo più diffuso per la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali è il metodo diffusione su terreno solido.
Numerosi studi hanno messo a confronto i diversi oli essenziali analizzando le capacità inibitorie sulla crescita di batteri e funghi.
Si portano ad esempio le prove condotte da Dorman *et al.* (2000), i quali hanno valutato con il metodo di diffusione su agar le proprietà antibatteriche di alcuni oli essenziali, tra cui l'olio di origano e l'olio di timo, su 25 ceppi batterici.
I risultati mostrano che tutti i ceppi batterici hanno un certo grado di sensibilità agli oli essenziali testati, sebbene la crescita di alcuni sia maggiormente sfavorita da specifici oli.
L'olio di timo e l'olio di origano sono risultati essere gli oli essenziali con lo spettro di attività più vasto.
Anche Bozin *et al*. (2006) hanno valutato l'attività antimicrobica di alcuni oli essenziali, tra cui l'olio di origano e l'olio di timo, contro 13 ceppi batterici e sei funghi, con il metodo di diffusione su agar. Sebbene tutti gli oli essenziali testati abbiano mostrato un tasso significativo di attività antimicrobica, l'olio essenziale di origano è risultato essere il più efficace anche sui ceppi più resistenti come *Escherichia coli.*

L'effetto antimicrobico dei vapori di olio essenziale viene, invece, analizzato tramite il metodo di volatilizzazione dal disco descritto in precedenza.

Gli studi riportati in seguito mostrano che valori di MIC determinati testando gli oli in fase vapore con il metodo di volatilizzazione dal disco sono minori di quelli ottenuti testando gli

oli in fase liquida con il metodo di diluizione del brodo; questi risultati possono essere spiegati dalla bassa solubilità degli oli essenziali in acqua.
Velásquez-Nuñez *et al*. (2013) hanno studiato l'effetto dell'OE estratto dalla buccia di arancia (*Citrus sinensis* var. Valencia) su *A. flavus*, dimostrando che, sebbene l'effetto dell'aggiunta diretta dell'olio a contatto con il microrganismo in fase liquida sia più rapido, i vapori di OE risultano essere più efficaci, cioè sono necessarie concentrazioni inferiori per ottenere lo stesso effetto antimicrobico.
Risultati simili sono stati ottenuti da Tullio *et al*. (2007), che hanno testato l'effetto di alcuni oli essenziali (timo rosso, chiodi di garofano, lavanda) su ceppi fungini clinici e ambientali.
L'esito di queste prove incoraggia all'utilizzo degli oli essenziali in fase vapore con il vantaggio di ridurre la dose antimicrobica necessaria per impedire la crescita dei microrganismi e quindi limitare una potenziale irritazione.

López *et al.* (2005) hanno, invece, testato l'attività antimicrobica di sei oli essenziali contro diversi ceppi batterici e fungini con prove di diffusione su solido e prove in fase vapore.
I loro risultati mostrano che, nella maggior parte dei casi, l'inibizione della fase vapore è più debole che nei test di diffusione solida; ci sono alcune eccezioni, come ad esempio l'olio essenziale di cannella, che è risultato più inibente in fase vapore contro *E. faecalis* rispetto alla fase solida.
Analizzando la composizione dell'OE di chiodi di garofano e cannella, risultati i più efficaci in fase vapore, sono stati rilevati due composti principali, il calamenene e il timolo, descritti, quindi, come composti antimicrobici potenzialmente interessanti.
Alcuni oli essenziali testati (OE di basilico e OE di rosmarino) sono risultati, invece, essere efficaci solamente a diretto contatto con i microrganismi e inefficaci in fase vapore.

Per quanto riguarda l'efficacia degli OE contro in batteri Gram positivi e Gram negativi, Gonçalves *et al.* (2013), conducendo dei test di diffusione su solido, hanno individuato una maggior efficacia dell'OE di timo su *S. epidermidis* (diametro medio dell'alone di inibizione pari a 16 mm) rispetto a *S. aureus* (diametro medio 14 mm) e a *E. coli* (diametro medio pari a 10 mm).
Anche Nedorostova *et al.* (2008), svolgendo delle prove di volatilizzazione, hanno osservato una maggiore efficacia dei vapori dell'OE di timo e di origano contro *S. aureus* rispetto a *E. coli*.
Lopez *et al.* (2007), invece, svolgendo delle prove con il metodo di volatilizzazione, hanno individuato una maggior capacità inibitiva dell'OE di timo contro *S. aureus* rispetto a *E. coli* e per l'OE di origano gli stessi valori di MIC contro entrambi in batteri.

L'efficacia di timolo e carvacrolo, presentati dalla letteratura come i componenti più efficaci nell'inibizione dei microrganismi, è stata dimostrata da López *et al.* (2007) conducendo delle prove con oli essenziali non modificati e altre con oli rinforzati con l'aggiunta, appunto, di timolo e carvacrolo; gli oli essenziali rinforzati hanno mostrato capacità inibitorie superiori.
Queste osservazioni suggeriscono che, sebbene le proprietà fisiche e chimiche, quali la solubilità e la volatilità, hanno un'influenza considerevole sull'attività antimicrobica in vitro, l'efficacia dell'olio è dovuta principalmente alla composizione chimica.
Non stupisce, quindi, che l'olio di timo e chiodi di garofano, costituiti principalmente da composti fenolici quali timolo, carvacrolo ed eugenolo, si dimostrino i migliori inibitori; infatti, sebbene il timolo e il carvacrolo possiedano una moderata solubilità e una bassa

volatilità, è stato riportato che i loro vapori si accumulano in grandi quantità negli strati di agar, favorendo così l'azione microbicida (Tullio *et al*., 2007).

1.1.6 Tossicità

Gli oli essenziali risultano essere sicuri a basse concentrazioni ma mostrano tossicità per l'uomo ad altre concentrazioni: la modifica della permeabilità della membrana cellulare da parte delle frazioni lipidiche dei componenti degli oli essenziali comporta la perdita di funzioni cellulari e può colpire, infatti, anche le cellule eucariote umane.

I danni sono causati principalmente dal contatto con la pelle mentre eventuali danni da inalazione sono dovuti alla formazione di composti inquinanti secondari, come la formaldeide, in seguito all'interazione di sostanze volatili come terpeni, alcoli ed eteri con ossidanti, come ozono e radicali idrossilici, e ciò ne rende necessaria una limitazione dell'uso in campo medico.

Essendo, poi, gli oli essenziali miscele complesse di componenti, è necessario valutare i singoli composti volatili come potenziali allergeni (Laird *et al.*, 2011).

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 timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e l'olio essenziale di origano spagna (*Origanum vulgaris* oil OE0375).

I microrganismi presi in esame sono *Escherichia coli* LMG 08063 e *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474.

Sono state inizialmente effettuate delle prove con gli OE puri per valutare quale tra i due mostrasse maggiori capacità inibitive sulla crescita microbica; i test sono stati condotti con il *metodo di diffusione su agar* e con il *metodo di volatilizzazione dal disco*.

In seguito, sono state effettuati dei test variando il volume di olio essenziale e la concentrazione dello stesso a contatto con i microrganismi con l'obiettivo di valutare quali tra le diluizioni testate fossero batteriostatiche, cioè impedissero la crescita microbica per un tempo limitato, e quali battericide, cioè non consentissero la riproduzione cellulare per un periodo prolungato.

Infine, si sono confrontati i risultati ottenuti dalle prove condotte con il *metodo di diffusione su agar* con quelle condotte con il *metodo di volatilizzazione dal disco* al fine di valutare l'effetto dei soli vapori di OE sulla crescita batterica.

2 Materiali e metodologie sperimentali

2.1 Materiali

Gli oli essenziali impiegati in questo studio sono stati quelli di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e di origano spagna (*Origanum vulgaris* leaf oil OE0375), entrambi forniti dall'azienda Witt Italia Spa (Figura 2.1).

Questi oli essenziali sono risultati, dalla letteratura scientifica (Memar *et al*., 2017; Tullio *et al*., 2007), tra i migliori in grado di inibire la crescita di batteri e funghi grazie alle proprietà antimicrobiche del timolo e del carvacrolo, i composti fenolici presenti in maggior concentrazione.

Figura 2.1: oli essenziali utilizzati nel lavoro di Tesi

Si riportano in Tabella 2.1 e in Tabella 2.2 le indicazioni di pericolo degli OE utilizzati durante le prove, reperite sulle schede di sicurezza fornite dall'azienda produttrice.
In Figura 2.2 e Figura 2.3 sono rappresentati i pittogrammi di pericolo.

Tabella 2.1: indicazioni di pericolo dell'olio essenziale di timo rosso

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

Figura 2.2: pittogrammi di pericolo dell'olio essenziale di timo rosso

Tabella 2.2: indicazioni di pericolo dell'olio essenziale di origano

O.E. ORIGANO	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

Figura 2.3: pittogrammi di pericolo dell'olio essenziale di origano spagna

Durante le prove condotte, gli oli essenziali sono stati testati puri oppure diluiti utilizzando una soluzione acquosa di TEGO SML 20, un tensioattivo non ionico di origine vegetale che si presenta come liquido ambrato, noto come *polisorbato 20* (Figura 2.4).

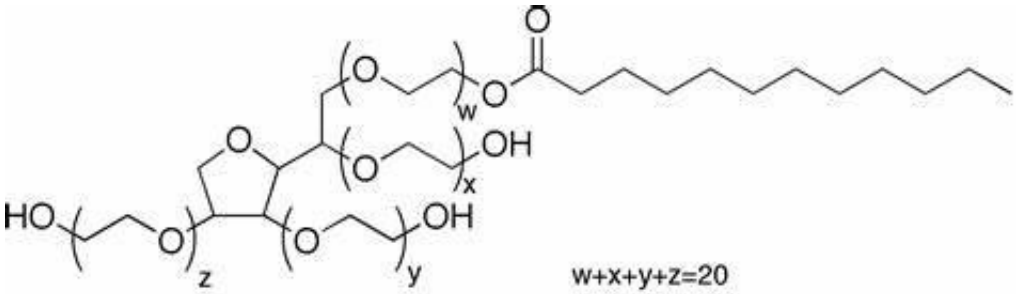

Figura 2.4: struttura chimica del polisorbato 20
Figura tratta da *https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polysorbate_20.png*

2.2 Microrganismi e condizioni colturali

I microrganismi utilizzati durante le prove svolte sono stati:

1. *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474*:* batterio Gram positivo
2. *Escherichia coli* LMG 08063*:* batterio Gram negativo

Entrambi i batteri sono stati coltivati su terreno nutritivo Mueller Hinton Agar (MHA) a una temperatura di 37°C; lo stesso terreno è stato utilizzato anche per il mantenimento dei microrganismi alla temperatura di +4°C sino al momento del loro utilizzo.
La composizione del terreno MHA è la seguente:

- estratto di carne, 2.0 g/L
- digerito di caseina, 17.5 g/L
- amido, 1.5 g/L
- agar, 17.0 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 lo svolgimento delle prove, gli oli essenziali sono stati utilizzati puri o opportunamente diluiti con una soluzione acquosa di TEGO SML 20 all'1.5% v/v; è stato, dunque, necessario valutare se il solvente utilizzato per le diluizioni influenzasse la crescita microbica.
Sono state preparate sette diverse diluzioni, riportate in Tabella 2.3, a partire dall'OE puro 100% v/v fino a 0,75 %.
La preparazione delle diluizioni è stata svolta in condizioni di sterilità.

Tabella 2.3: concentrazioni degli oli essenziali testate

	Concentrazione di olio essenziale, %
1	100
2	75
3	50
4	25
5	10
6	1
7	0,75

2.3.2 Prove preliminari sugli oli essenziali

2.3.2.1 Prove con il metodo di diffusione su agar

Con lo scopo di testare la capacità antimicrobica degli OE a diretto contatto con i batteri scelti, sono state condotte diverse prove con il *metodo di diffusione su agar*.

Per lo svolgimento delle prove, sono state utilizzate delle piastre di Petri con diametro di 90 mm e altezza 15 mm in polistirene (PS) o, dove specificatamente indicato, in vetro.
A ciascuna piastra sono stati aggiunti 20 ml di terreno MHA, ottenendo un'altezza di circa 5 mm di terreno agarizzato.
In Figura 2.5 è riportato uno schema della geometria della piastra di Petri utilizzata nelle prove antimicrobiche.
Il volume dello spazio di testa risultato con queste condizioni geometriche è pari a $63{,}62\ cm^3$.
La dimensione della piastra e la quantità di terreno utilizzata sono importanti per garantire la corretta riproducibilità dei risultati; una variazione dello spessore può, infatti, causare una diversa diffusione dei vapori degli OE nello spazio di testa.

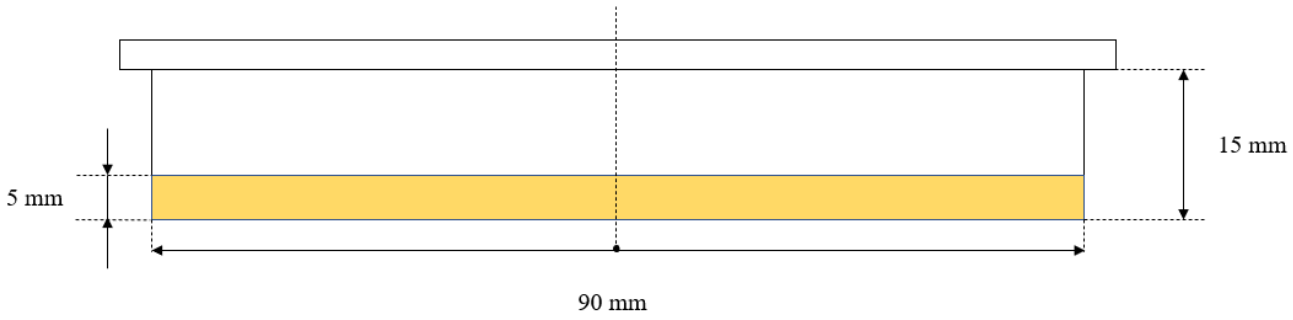

Figura 2.5: geometria delle piastre di Petri utilizzate nelle prove antibatteriche svolte

Successivamente ciascuna delle piastre è stata inoculata con 100 µL di una sospensione 10^5 CFU/mL dei microrganismi da testare.
Il tipo di inoculo utilizzato è chiamato *metodo della sospensione diretta delle colonie*: tre colonie sono state prelevate da una coltura batterica cresciuta su terreno MHA nelle 24 h precedenti l'allestimento della prova e sospese in 5 ml di una soluzione salina 0.85% di NaCl, ottenendo così una sospensione di microrganismi 10^8 CFU/mL; la sospensione è stata progressivamente diluita con la soluzione salina 0.85% di NaCl fino ad ottenere una concentrazione di 10^5 CFU/mL.
La preparazione dell'inoculo è avvenuta in condizioni di sterilità.

Come mezzo per depositare l'olio essenziale all'interno della piastra di Petri, sono stati preparati dei dischetti di carta da filtro di tipo qualitativo, Whatmann n°1, con diametro di 5 mm.
I dischetti di carta filtrante, dopo opportuna sterilizzazione, sono stati posizionati sulla superficie solida di MHA inoculata con i microrganismi e successivamente imbibiti 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, al cui dischetto sono stati aggiunti 3 µl di soluzione acquosa di TEGO 1.5% v/v.

Le piastre sono state chiuse con Parafilm e successivamente avvolte in uno strato di pellicola trasparente per evitare la fuoriuscita dei vapori degli oli essenziali e infine incubate a 37°C per 48 h.

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, ossia della zona formatasi attorno 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 riportati in mm.

In Figura 2.6 è visibile un esempio di alone di inibizione ottenuto durante lo svolgimento delle prove antibatteriche.

Figura 2.6: alone di inibizione ottenuto con il metodo di diffusione su agar aggiungendo 3 µL di OE di timo puro a un dischetto di carta da filtro da 5 mm posizionato su un terreno inoculato con *S. epidermidis*

In Tabella 2.4 è riportato uno schema riassuntivo delle prove di diffusione su agar effettuate.

Tabella 2.4: schema riassuntivo delle prove di diffusione su agar

	OLI ESSENZIALI TESTATI	***MICRORGANISMI TESTATI***	***CONCENTRAZIONI TESTATE***	***N° dischetti per piastra***	
prova 1	*Thymus vulgaris* *Origanum vulgaris*	*S. epidermidis* *E. coli*	100 % (OE puro)	3	piastre in PS
prova 2	*Thymus vulgaris* *Origanum vulgaris*	*S. epidermidis*	100 % 10 % 1 % 0.75 %	3	piastre in PS piastre in vetro
prova 3	*Thymus vulgaris* *Origanum vulgaris*	*S. epidermidis*	100 % 75 % 50 % 25 % 10 %	1	piastre in PS

2.3.2.2 Prove con il metodo di volatilizzazione dal disco

Le prove effettuate con il *metodo di volatilizzazione dal disco* hanno lo scopo di valutare l'efficacia dei soli vapori degli oli essenziali per poi confrontarla con la capacità inibitiva osservata nei test di diffusione solida.

Il processo di preparazione delle piastre utilizzate durante queste prove è il medesimo descritto precedentemente nel capitolo 2.3.2.1; l'unica differenza riguarda la dimensione dei dischetti di carta da filtro di tipo qualitativo, Whatmann n°1, preparati, in questo caso, con diametro di 5 mm e di 10 mm.

Per l'allestimento delle prove, al centro del coperchio di ogni piastra di Petri è stato posizionato, utilizzando un quadratino di nastro biadesivo, un dischetto di carta filtrante, opportunamente sterilizzato.

Sono stati testati due diversi valori di volume, 3 µL e 10 µL con l'intenzione di valutare la crescita batterica in presenza di diverse quantità di OE.

Le piastre di controllo sono state realizzate imbibendo i dischetti con una soluzione acquosa di TEGO 1.5% v/v.

Le piastre sono state chiuse con Parafilm e successivamente avvolte in uno strato di pellicola trasparente per evitare la fuoriuscita dei vapori degli oli essenziali, e infine incubate per 168 h a 37°C, capovolte.

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.

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

Si riporta in Figura 2.7 un esempio di alone di inibizione ottenuto durante lo svolgimento delle prove antibatteriche effettuate.

Figura 2.7: alone di inibizione ottenuto con il metodo di volatilizzazione dal disco aggiungendo 3 µL di OE di timo puro a un dischetto di carta da filtro da 5 mm posizionato su un terreno inoculato con *S. epidermidis*.

La Tabella 2.5 riporta uno schema riassuntivo delle prove di volatilizzazione effettuate.

Tabella 2.5: schema riassuntivo delle prove di volatilizzazione dal disco effettuate

	OLI ESSENZIALI TESTATI	***MICRORGANISMI TESTATI***	***DIMENSIONE DISCHETTO e VOLUMI TESTATI***	***CONCENTRAZIONI TESTATE***	***N° dischetti per piastra***
prova 1	*Thymus vulgaris* *Origanum vulgaris*	*S. epidermidis* *E. coli*	10 mm, 3 µl	100 % (OE puro)	1
prova 2	*Thymus vulgaris* *Origanum vulgaris*	*S. epidermidis*	5 mm, 3 µl 10 mm, 10 µl	100% 75% 50%	1
prova 3	*Thymus vulgaris* *Origanum vulgaris*	*S. epidermidis*	10 mm, 3 µl 10 mm, 10 µl	100% 75% 50%	1

Durante la seconda prova e la terza prova, dopo 168 h di incubazione, i coperchi delle piastre di Petri su cui erano stati posizionati i dischetti imbibiti di olio essenziale, sono stati sostituiti con dei coperchi privi di dischetto per poter valutare l'eventuale crescita microbica in assenza di dischetto imbibito di OE e determinare, quindi, se le concentrazioni testate fossero battericide o batteriostatiche.

3 Analisi dei risultati

3.1 Studio dell'effetto degli oli essenziali su terreno solido

Gli obiettivi di queste prove sperimentali erano identificare quale fosse, tra l'olio essenziale di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e di origano spagna (*Origanum vulgaris* oil OE0375), quello con il maggior effetto inibente sulla crescita dei batteri *S. epidermidis* e *E. coli*, valutando l'efficacia antimicrobica degli OE a diverse concentrazioni.

Le prove sono state condotte con il *metodo di diffusione su agar* utilizzando delle piastre di Petri da 90 mm di diametro inoculate ciascuna con 20 mL di terreno MHA e dischetti di carta da filtro di diametro 5 mm imbibiti con 3 µL di OE a diverse concentrazioni.

3.1.1 Attività antibatterica degli oli essenziali su *S. epidermidis* e *E. coli*

I primi test antimicrobici sono stati condotti posizionando in ogni piastra di Petri in plastica tre dischetti con diametro di 5 mm, imbibiti ciascuno con 3 µL di OE puro (100 % v/v), insieme con un dischetto per il controllo imbibito con 3 µL di soluzione TEGO 1,5 % (v/v).

Le immagini riportate in Figura 3.1, relative alla crescita di *S. epidermidis* e *E. coli* trattati con gli OE puri, mostrano gli aloni di inibizione ottenuti dopo un periodo di incubazione di 24 h.

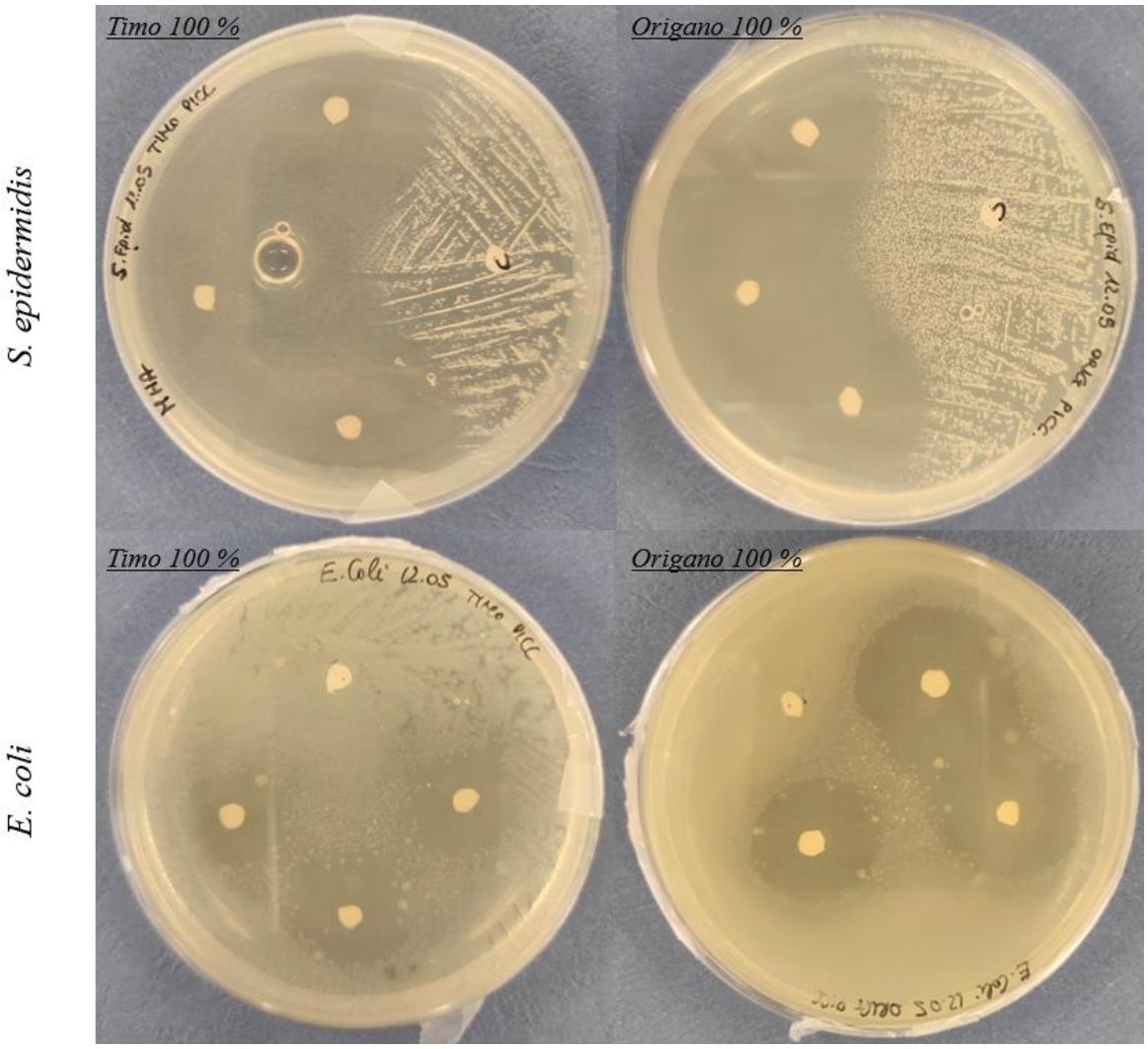

Figura 3.1: confronto della crescita di *S. epidermidis* (in alto) e di *E. coli* (in basso) trattati con 3 µL OE di timo rosso (a sinistra) e OE di origano spagna (a destra) puri aggiunti a un dischetto di 5 mm

In Tabella 3.1 e in Tabella 3.2 sono riportati i valori del diametro medio dell'alone di inibizione ottenuti.

Tabella 3.1: effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis*

	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
Diametro medio dell'alone di inibizione, mm	35 ± 1	27 ± 1

Tabella 3.2: effetto degli oli essenziali su *E. coli*

	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
Diametro medio dell'alone di inibizione, mm	19,2 ± 1,07	25,4 ± 2,15

Osservando i risultati, si nota che entrambi gli OE risultano più efficaci nell'inibire la crescita di *S. epidermidis*, anche se l'OE di timo in maniera un po' più evidente rispetto all'OE di origano per il quale, invece, l'efficacia inibitoria è circa la stessa su entrambi i batteri.
Inoltre, l'OE di timo risulta più efficace dell'OE di origano contro *S. epidermidis* mentre contro *E. coli* è visibile un alone di inibizione leggermente maggiore in presenza dell'OE di origano.

La stessa prova per valutare l'attività antimicrobica dell'OE di timo e di origano contro *S. epidermidis* e *E. coli* è stata condotta aggiungendo 3 µL di OE puro a un dischetto di 10 mm di diametro.
Le considerazioni che si possono trarre dai risultati ottenuti sono leggermente differenti dalle precedenti.

In Figura 3.2, Tabella 3.3 e Tabella 3.4 sono riportati gli esiti della prova ottenuti dopo un periodo di incubazione di 24 h.

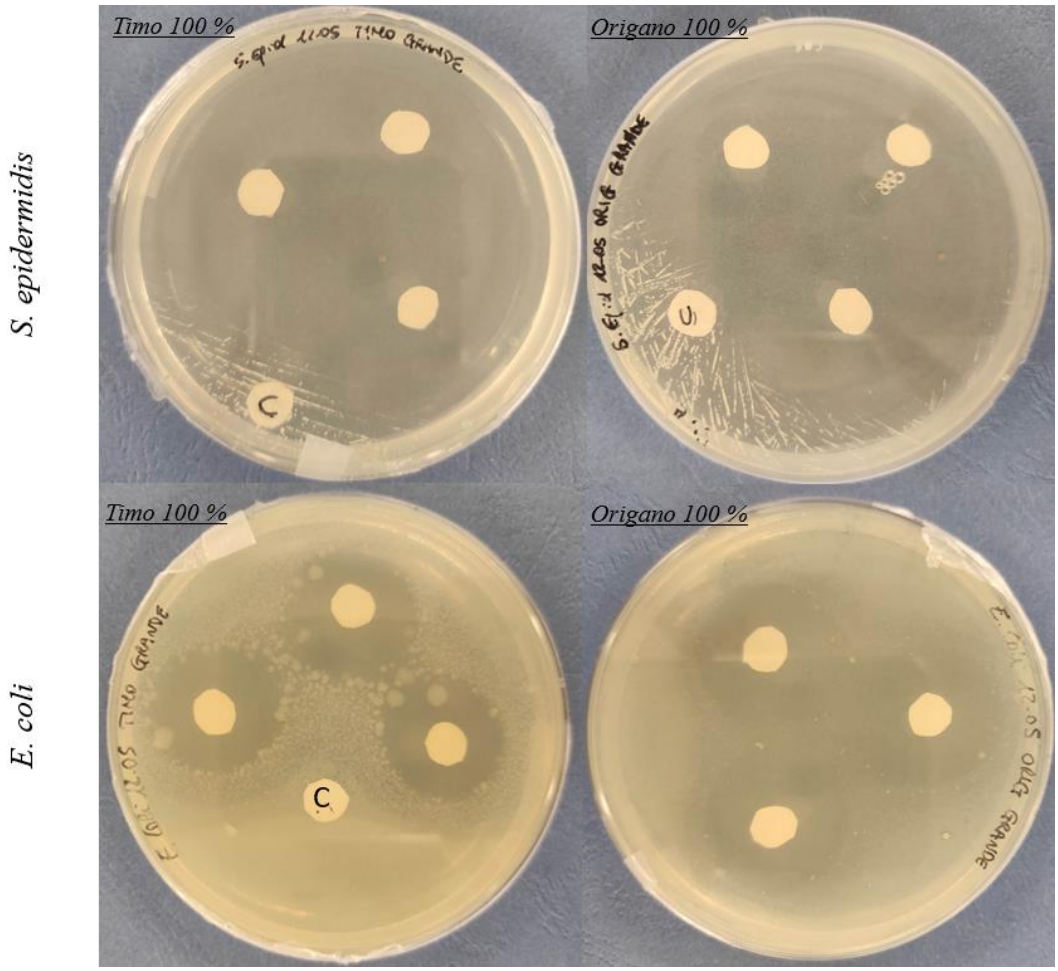

Figura 3.2: confronto della crescita di *S. epidermidis* (in alto) e di *E. coli* (in basso) trattati con 3 µL OE di timo rosso (a sinistra) e OE di origano spagna (a destra) puri aggiunti a un dischetto di 10 mm

Tabella 3.3: effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis*

	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
Diametro medio dell'alone di inibizione, mm	53,0 ± 3,0	43,3 ± 2,5

Tabella 3.4: effetto degli oli essenziali su *E. coli*

	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
Diametro medio dell'alone di inibizione, mm	23,3 ± 1,6	24,2 ± 2,5

Come si nota in Tabella 3.3 e in Tabella 3.4, anche in queste condizioni entrambi gli OE sono risultati più efficaci nell'inibire la crescita di *S. epidermidis* che di *E. coli*, ma, mentre per *S. epidermidis* l'OE di timo risulta più efficace, contro *E. coli* risulta che gli OE abbiano circa la stessa capacità di inibizione.

Le differenze che si osservano dagli esiti delle due prove riguardo la maggior o minor efficacia degli OE di timo e origano su *S. epidermidis* e *E. coli* sono probabilmente dovute all'intrinseca variabilità delle prove biologiche e alla complessità degli OE, difficili da utilizzare data la loro idrofobicità, viscosità ed elevata volatilità.

Complessivamente, dai risultati ottenuti, si nota che sia l'OE di timo che l'OE di origano hanno una maggiore efficacia nell'inibire la crescita del batterio *S. epidermidis* (Gram positivo) rispetto a *E. coli* (Gram negativo); queste considerazioni sono in accordo con quanto pubblicato da Nazzaro *et al*. (2013) riguardo l'effetto degli OE sui diversi tipi di batteri e con i risultati ottenuti da Gonçalves *et al.* (2013), i quali hanno ottenuto un valore di MIC minore per l'OE di timo nei confronti di *S. epidermidis* rispetto a *E. coli*.

In Tabella 3.5 e Tabella 3.6 sono, inoltre, messi a confronto i diametri medi degli aloni ottenuti dalle due prove condotte precedentemente utilizzando i dischetti da 5 mm e da 10 mm di diametro.

Tabella 3.5: effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis*

Diametri medi alone di inibizione (mm)		
	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
5 mm	35 ± 1	27 ± 1
10 mm	53 ± 3	43,3 ± 2,5

Tabella 3.6: effetto degli oli essenziali su *E. coli*

Diametri medi alone di inibizione (mm)		
	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
5 mm	19,2 ± 1,1	25,4 ± 2,2
10 mm	23,3 ± 1,6	24,2 ± 2,5

Si osserva che, per quanto riguarda l'effetto degli OE su *S. epidermidis*, i diametri medi degli aloni hanno una dimensione maggiore quando è stato utilizzato il dischetto da 10 mm: ciò sembrerebbe significare che la dimensione del dischetto, e quindi l'assorbimento degli OE

da parte di esso, influenzi la diffusività dell'OE sul terreno solido consentendo una diversa distribuzione sulla superficie di agar; infatti, maggiore è il diametro del dischetto, maggiore è l'alone che si sviluppa attorno ad esso.
Diverso è, invece, ciò che si osserva per *E. coli*: in questo caso i valori dei diametri degli aloni ottenuti non si discostano molto tra di loro, anzi, nel caso dell'OE di origano, l'alone formatosi attorno al dischetto da 10 mm è leggermente minore di quello formatosi attorno al dischetto da 5 mm. Questo fenomeno potrebbe essere attribuito alla maggior resistenza del batterio Gram negativo *E. coli* all'effetto inibitivo degli OE.

3.1.2 Attività antibatterica degli oli essenziali in piastre di polistirene e di vetro

Sono state condotte delle prove antimicrobiche con il *metodo di diffusione su agar* sia in piastre di Petri in PS che in vetro per valutare se ci fosse un assorbimento dei vapori degli OE da parte della plastica, fenomeno che causerebbe un'incorretta interpretazione dei risultati di inibizione ottenuti.
Durante questa prova gli oli essenziali sono stati utilizzati puri o diluiti con una soluzione di TEGO 1.5 % v/v.

Anche in questo caso sono stati posizionati in ciascuna piastra tre dischetti con diametro di 5 mm imbibiti ciascuno con 3 µL delle diluizioni di OE, insieme con un dischetto per il controllo imbibito con 3 µL di soluzione TEGO 1,5 % v/v.

I valori dei diametri medi dell'alone di inibizione ottenuti con queste prove sono riportati in Tabella 3.7 e in Tabella 3.8.

Tabella 3.7: effetto dell'OE di timo rosso su *S. epidermidis* a diverse concentrazioni

	PIASTRE DI PETRI IN PLASTICA	**PIASTRE DI PETRI IN VETRO**
CONCENTRAZIONI DI OLIO ESSENZIALE (V/V)	**Diametro medio alone di inibizione, mm**	
100 %	nm*	nm*
10 %	7,5 ± 1	7,9 ± 1,2
1 %	0	0
0,75%	0	0

nm* non misurabile perché esteso fino alle pareti o sovrapposto agli altri aloni presenti nella piastra

Tabella 3.8: effetto dell'OE di origano spagna su *S. epidermidis* a diverse concentrazioni

	PIASTRE DI PETRI IN PLASTICA	**PIASTRE DI PETRI IN VETRO**
CONCENTRAZIONI DI OLIO ESSENZIALE (V/V)	**Diametro medio alone di inibizione, mm**	
100 %	nm*	nm*
10 %	9,0 ± 1,2	9,2 ± 1,9
1 %	0	0
0,75%	0	0

nm* non misurabile perché esteso fino alle pareti o sovrapposto agli altri aloni presenti nella piastra

Si può notare, confrontando i valori riportati per la concentrazione di OE 10%, che non vi sono differenze rilevanti tra i diametri medi misurati nelle capsule in PS e quelli in vetro: ciò permette di escludere il fenomeno di assorbimento dei vapori di OE da parte della plastica e di utilizzare solamente le capsule di Petri in PS per lo svolgimento delle prove successive.

Come mostrato in Tabella 3.7 e Tabella 3.8, in presenza degli OE puri non è stata possibile la misurazione degli aloni di inibizione in quanto questi si estendevano fino alle pareti o si sovrapponevano tra loro.
Inoltre, si osserva che non vi è alcuna inibizione della crescita batterica da parte degli oli essenziali per i due valori di concentrazione più bassi testati, 1% e 0.75%.
In Figura 3.3, infatti, risulta ben evidente come non ci sia alcuna differenza tra la crescita batterica attorno ai dischetti imbibiti con l'OE diluito all'1 % e allo 0,75 % e quella attorno al dischetto di controllo imbibito con la soluzione di TEGO 15,5 % v/v (indicato con la lettera C).

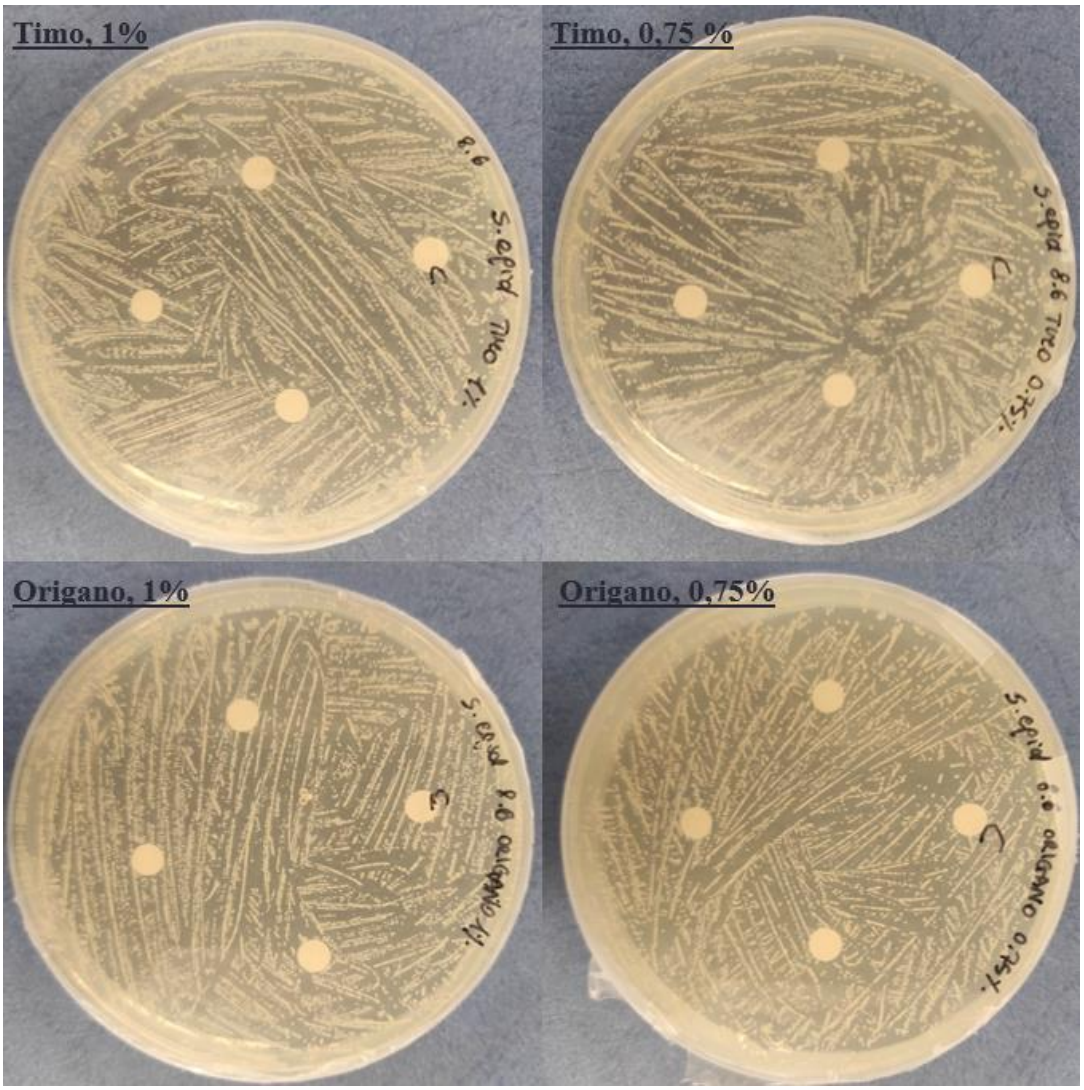

Figura 3.3: confronto della crescita di *S. epidermidis*, trattato con OE di timo rosso e OE di origano spagna alle concentrazioni 1% (a sinistra) e 0.75% (a destra)

Tenendo conto dei risultati ottenuti, nelle prove condotte successivamente sono stati testati valori di diluizioni degli OE maggiori o uguali al 10%.

È possibile calcolare, nota la dimensione del dischetto, 5 mm, e il volume di OE aggiunto, 3 µL, la concentrazione di OE per unità di superficie. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.9.

$$A_{dischetto} = \frac{\pi}{4}\, d^2 = 0{,}19635\ cm^2$$

Tabella 3.9: concentrazioni di OE per unità di superficie

Concentrazioni di olio essenziale	Volume di OE, µL	Concentrazione di OE per unità di superficie, µL / cm^2
100 %	3	15,279
10 %	0,3	1,528
1 %	0,03	0,153
0,75%	0,0225	0,115

Siccome nelle piastre contenti i dischetti imbibiti con OE diluito all'1% e allo 0,75 % v/v non è stato osservato alcun alone di inibizione, la concentrazione iniziale di OE sul dischetto imbibito deve essere sicuramente superiore a 0,153 µL / cm^2 per poter inibire la crescita microbica *S. epidermidis* con il *metodo di diffusione su agar*.

3.1.3 Prove antibatteriche con un solo dischetto imbibito di olio essenziale per piastra

Facendo riferimento ai risultati ottenuti precedentemente, si è deciso di condurre un'ultima prova con il *metodo di diffusione su agar* utilizzando solo piastre di Petri in PS e testando gli OE diluiti con concentrazioni superiori al 10% sul batterio *S. epidermidis* ma, a differenza delle prove precedenti, posizionando un solo dischetto imbibito per piastra.
È stato, infatti, osservato che posizionando tre dischetti in una stessa piastra di Petri, la misurazione degli aloni di inibizione risultava difficile in quanto alcuni si estendevano fino alle pareti o si sovrapponevano tra loro.

Si è pensato, inoltre, che l'inibizione della crescita batterica osservata potesse essere dovuta, non solo all'azione di contatto dell'OE liquido, ma in parte anche all'EO vaporizzato all'interno della piastra.
Aggiungendo, quindi, tre dischetti, come nelle prove precedenti, l'inibizione osservata non era dovuta solamente ai 3 µL, parte in fase liquida parte in fase vapore, aggiunti a un dischetto, ma probabilmente era alterata dall'azione dei vapori di OE vaporizzati dagli altri dischetti presenti nella stessa piastra.
La valutazione delle concentrazioni inibenti la crescita microbica risulta così imprecisa e risulterebbe anche sbagliato il futuro confronto con il test di volatilizzazione in cui in ogni piastra è presente un solo dischetto.

I risultati ottenuti da questa prova sono riportati in Tabella 3.10 e Tabella 3.11 e mostrati in Figura 3.4 e Figura 3.5.

Tabella 3.10: effetto dell'OE di timo rosso su *S. epidermidis* a diverse concentrazioni dopo un periodo di incubazione di 24 h

Concentrazioni di olio essenziale (v/v)	Diametro medio alone di inibizione, mm
100 %	49,3 ± 2,4
75 %	44,9 ± 1,0
50 %	10,4 ± 0,4
25 %	11,1 ± 1,1
10 %	10,0 ± 1,0

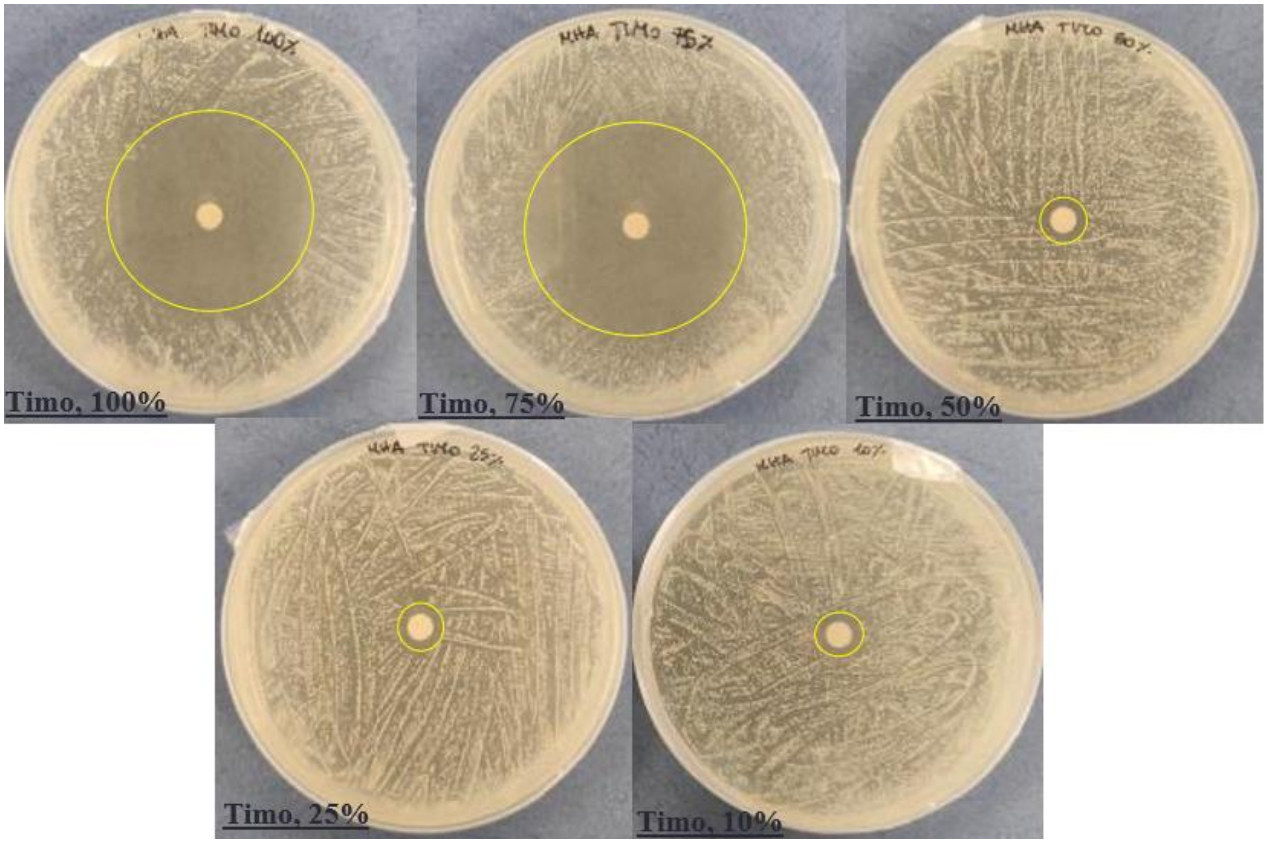

Figura 3.4: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con 3 µL di OE di timo rosso a diverse concentrazioni dopo un periodo di incubazione di 24 h

Tabella 3.11: effetto dell'OE di origano spagna su *S. epidermidis* a diverse concentrazioni

Concentrazioni di olio essenziale (v/v)	Diametro medio alone di inibizione, mm
100 %	40,0 ± 3,3
75 %	38,7 ± 0,9
50 %	21,0 ± 2,3
25 %	20,7 ± 2,8
10 %	17,3 ± 3,8

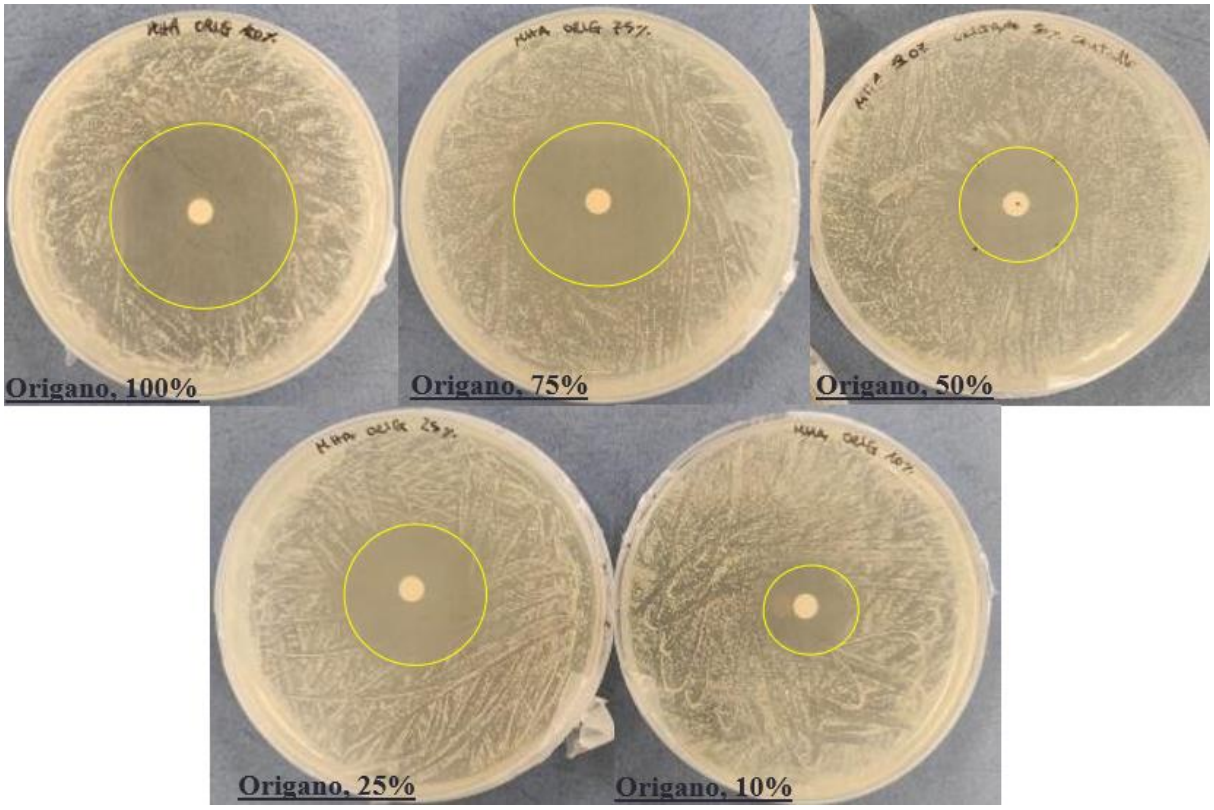

Figura 3.5: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con 3 µL di OE di origano spagna a diverse concentrazioni dopo un periodo di incubazione di 24 h

I valori dei diametri medi degli aloni riportati in Tabella 3.10 e Tabella 3.11 mostrano che l'OE di timo è leggermente più efficace dell'OE di origano nell'inibire la crescita batterica di *S. epidermidis* in corrispondenza delle concentrazioni più elevate testate, 100 % e 75 % v/v

mentre per le % di OE inferiori (50%, 25% e 10% v/v) l'inibizione risulta maggiore in presenza dell'OE di origano.
Si osserva, inoltre, che per entrambi gli OE, per le concentrazioni più basse testate (50%, 25% e 10% v/v), cioè quando la percentuale di TEGO è uguale o supera quella dell'OE, i valori di diametro medio ottenuti non si discostano molto tra di loro; questo fenomeno può essere spiegato ipotizzando che il solvente acquoso influenzi il comportamento degli OE, ostacolando la diffusività di alcuni componenti responsabili dell'azione antimicrobica.
L'inibizione della crescita osservata è, quindi, probabilmente dovuta ai soli componenti dell'OE che sono in grado di diffondere sullo strato di agar.

3.1.4 Valutazione del diametro dell'alone di inibizione nel tempo

Per valutare se le concentrazioni individuate come responsabili dell'inibizione della crescita microbica fossero batteriostatiche o battericide, le piastre sono state poste nel termostato a 37°C per ulteriori 24 h per poi procedere con una nuova raccolta dei risultati.

Si è osservata una diminuzione del diametro medio di inibizione per la maggior parte delle concentrazioni testate.
In Tabella 3.12 e Tabella 3.13 sono riportate le variazioni osservate dopo 48 h riferite, rispettivamente, all'OE di timo e di origano.

Tabella 3.12: variazione del diametro dell'alone di inibizione dopo 24 h e 48 h di *S. epidermidis* trattato con l'OE di timo rosso

Concentrazione di OE (v/v)	Δ diametro *, mm
100 %	20,7
75 %	18,4
50 %	0
25 %	0
10 %	0

*Δ diametro: differenza tra il diametro dell'alone di inibizione misurato dopo 24 h e 48 h

Tabella 3.13: variazione del diametro dell'alone di inibizione dopo 24 h e 48 h di *S. epidermidis* trattato con l'OE di origano spagna

Concentrazione di OE (v/v)	Δ diametro *, mm
100 %	17
75 %	16
50 %	6,3
25 %	3,5
10 %	3,7

In Figura 3.6 e Figura 3.7 è mostrata la variazione di diametro dell'alone di inibizione osservata dopo 48 h.

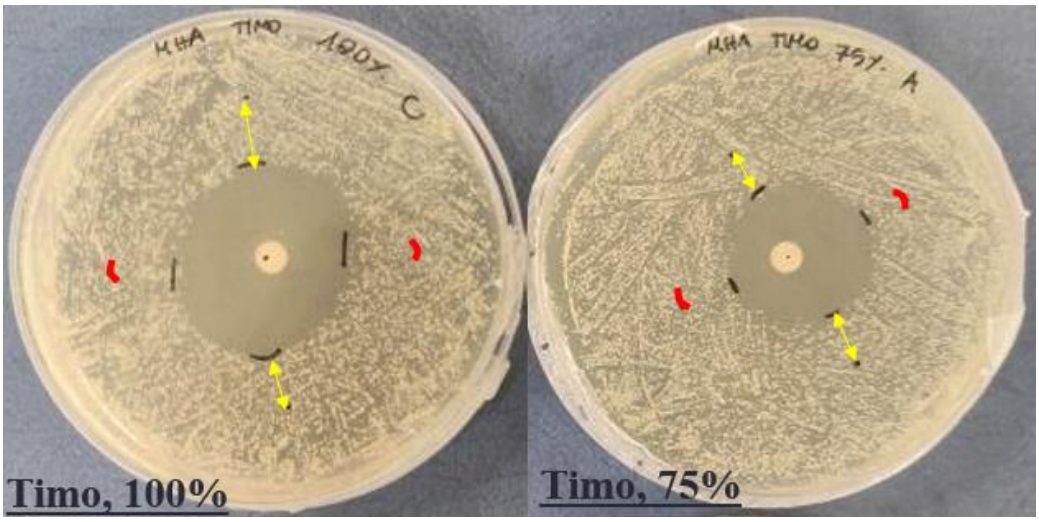

Figura 3.6: variazione del diametro dell'alone di inibizione dopo 24 h e 48 h di *S. epidermidis* trattato con l'OE di timo rosso

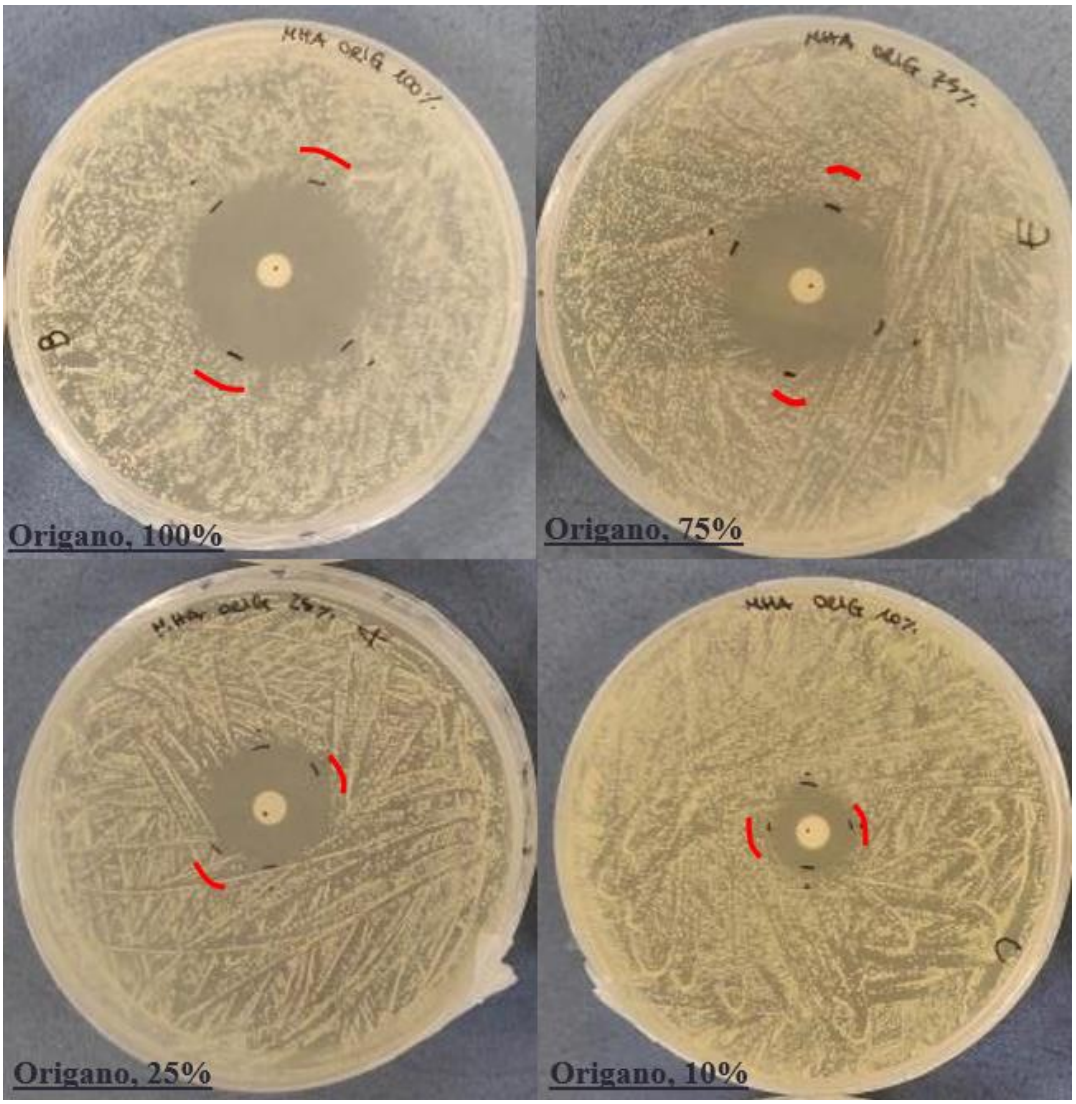

Figura 3.7: variazione del diametro dell'alone di inibizione dopo 24 h e 48 h di *S. epidermidis* trattato con l'OE di origano spagna

Il fenomeno di riduzione del diametro dell'alone di inibizione osservato è probabilmente dovuto al fatto che il batterio, per poter essere efficacemente inibito nella sua crescita, deve essere in presenza di una concentrazione di OE superiore ad un determinato valore, che potrebbe essere definito 'concentrazione soglia'.
Nelle prime 24 h, la concentrazione di OE è sufficientemente elevata in prossimità del dischetto da inibire la crescita batterica però con il passare del tempo diminuisce e non è più in grado di impedire la riproduzione cellulare di *S. epidermidis*.
Inoltre, la quantità di OE in fase liquida in grado di diffondere sullo strato di agar diminuisce nel tempo a causa della vaporizzazione delle sostanze volatili presenti nell'OE; in questo modo, la quantità di OE liquido prima distribuita sullo strato solido diminuisce perché passa in fase vapore.
Il batterio essendo quindi soggetto ad una concentrazione di OE minore della 'concentrazione soglia', riesce a crescere, provocando la diminuzione del diametro dell'alone osservato.

I valori dei diametri medi degli aloni di inibizione misurati dopo 48 h sono riportati in Tabella 3.14.

Tabella 3.14: diametri medi degli aloni di inibizione misurati dopo 48 h su *S. epidermidis* in presenza dell'OE di timo e dell'OE di origano alle diverse concentrazioni

	Diametro medio alone di inibizione, mm				
	100 %	**75 %**	**50 %**	**25 %**	**10 %**
timo	28,5 ± 3,0	26,5 ± 3,0	10,4 ± 0,4	11,1 ± 1,0	10,0 ± 1,0
origano	23 ± 2,5	21,9 ± 2,1	14,7 ± 1,0	15,2 ± 0,9	13,7 ± 2,0

Le considerazioni riguardo l'efficacia dell'OE di timo e di origano dopo 24 h riportate della sezione 3.1.3 rimangono valide anche dopo 48 h di incubazione: l'OE di timo è leggermente più efficace dell'OE di origano nell'inibire la crescita batterica di *S. epidermidis* in corrispondenza delle concentrazioni più elevate testate, 100 % e 75 % v/v mentre per le % di OE inferiori (50%, 25% e 10% v/v) l'inibizione risulta maggiore in presenza dell'OE di origano.

3.1.5 Studio del fenomeno di diffusione degli oli essenziali sullo strato di agar

Volendo analizzare ulteriormente l'aspetto della diffusione dell'OE sullo strato di agar, si è deciso di allestire una prova in cui in ogni piastra di Petri in PS venivano aggiunti due dischetti da 5 mm, uno imbibito con 3 µL di OE alle diverse concentrazioni e uno con 3 µL di TEGO 1.5 % v/v; lo scopo è valutare se la presenza della soluzione di TEGO influenza la diffusione dell'OE limitando l'azione battericida.

In Tabella 3.15 e Tabella 3.16 sono riportati i risultati ottenuti.

Tabella 3.15: confronto dell'effetto di 3 µL di OE di timo rosso a diverse concentrazioni su *S. epidermidis* in piastre di Petri in plastica contenti un solo dischetto da 5 mm e in piastre contenenti anche un dischetto imbibito con 3 µL della soluzione di TEGO 1,5 % v/v

Diametro medio alone di inibizione (mm)					
	100 %	**75 %**	**50%**	**25%**	**10%**
Dischetto con OE	49,3 ± 2,4	44,9 ± 1,0	10,4 ± 0,4	11,1 ± 1,1	10,0 ± 1,0
Dischetto con OE + controllo	43,5 ± 1,5	29,5 ± 0,5	10,0 ± 0	7,8 ± 0,3	No inibizione

Tabella 3.16: confronto dell'effetto di 3 µL di OE di origano spagna a diverse concentrazioni su *S. epidermidis* in piastre di Petri in plastica contenti un solo dischetto da 5 mm e in piastre contenenti anche un dischetto imbibito con 3 µL della soluzione di TEGO 1,5 % v/v

Diametro medio alone di inibizione (mm)					
	100 %	**75 %**	**50%**	**25%**	**10%**
Dischetto con OE	42,0 ± 2,0	38,7 ± 0,9	21,0 ± 2,3	20,8 ± 2,8	17,3 ± 3,8
Dischetto con OE + controllo	51,5 ± 0,5	28,0 ± 2,0	14,0 ± 0	12,0 ± 0	7,0 ± 0

Dai risultati riportati Tabella 3.15 e Tabella 3.16, si osserva che le ipotesi fatte riguardo la diffusività dell'OE liquido sullo strato solido di agar potrebbero essere corrette; infatti, le piastre in cui è stato aggiunto il dischetto con la soluzione di TEGO 1.5 % v/v mostrano un diametro medio dell'alone di inibizione meno esteso e ciò può essere dovuto al fatto che il solvente a base acquosa, diffondendo sullo strato solido, ostacola la diffusione dell'EO liquido. L'unica eccezione si osserva in corrispondenza dell'OE di origano 100%, per il quale l'inibizione nella piastra con il controllo risulta maggiore.

3.2 Studio dell'effetto degli oli essenziali in fase vapore

Gli obiettivi di queste prove sperimentali erano identificare quale fosse, tra l'olio essenziale di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e di origano spagna (*Origanum vulgaris* oil OE0375), quello con il maggior effetto inibente sulla crescita dei batteri *S. epidermidis* e *E. coli* e valutare l'efficacia dei vapori degli OE sulla crescita batterica per poter successivamente confrontare i risultati con quelli ottenuti con il *metodo di diffusione su agar*.

Le prove sono state condotte con il *metodo volatilizzazione dal disco* utilizzando delle piastre di Petri da 90 mm di diametro, ciascuna inoculata con 20 mL di terreno MHA, e dischetti di carta da filtro di diametro 5 mm o 10 mm imbibiti con 3 µL o 10 µL di OE a diverse concentrazioni.

3.2.1 Attività antibatterica degli oli essenziali su *S. epidermidis* e *E. coli*

Durante la prima prova effettuata, è stata valutata la crescita di *S. epidermidis* e *E. coli* in piastre di Petri in plastica, in ciascuna delle quali 3 µL di OE puro sono stati aggiunti a un dischetto di carta da filtro di 10 mm di diametro posizionato sul coperchio della stessa tramite un quadratino di nastro biadesivo.
Gli esiti della prova sono visibili in Figura 3.8 e riportati in Tabella 3.17 e Tabella 3.18.

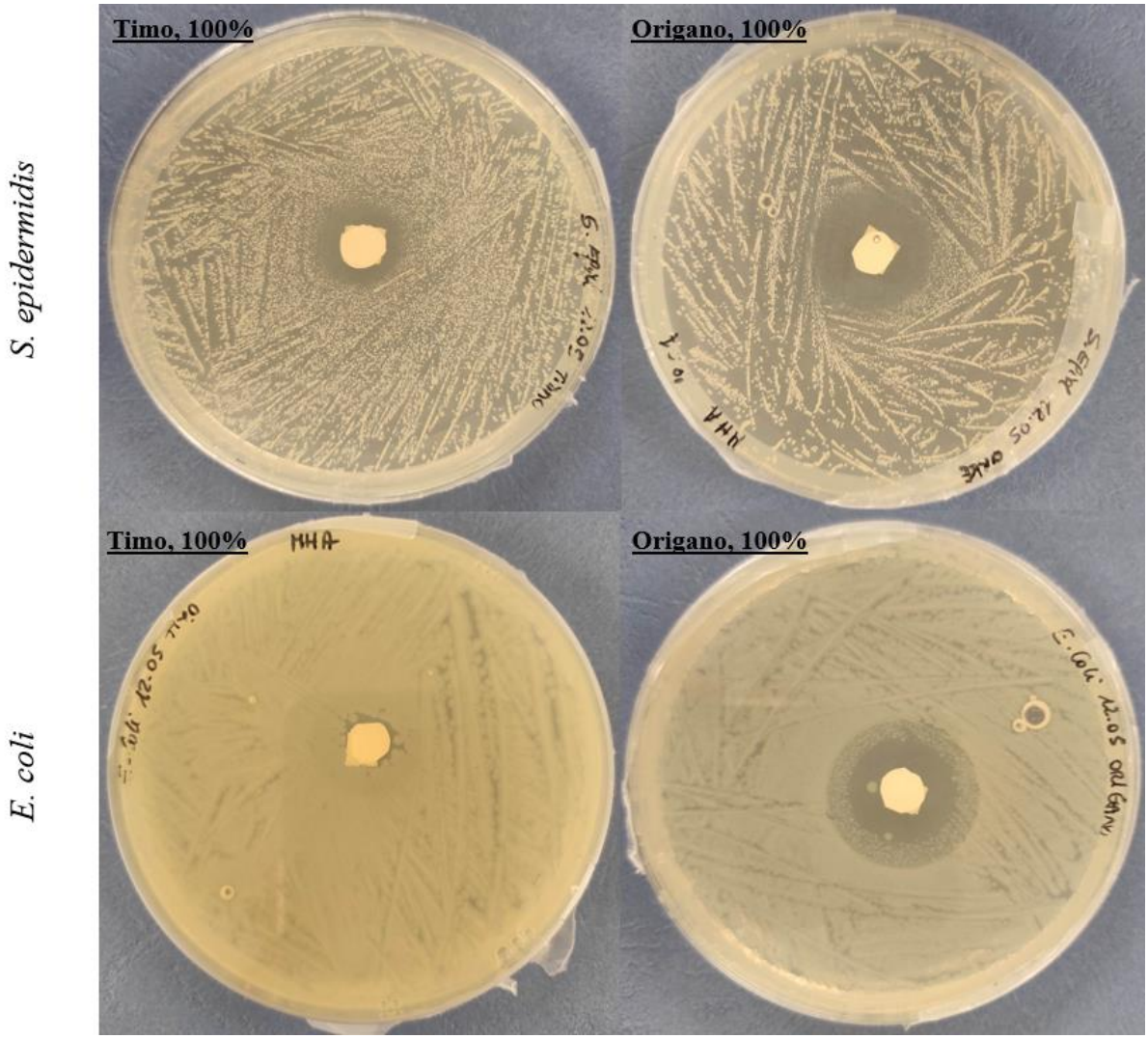

Figura 3.8: confronto della crescita di *S. epidermidis* (in alto) e di *E. coli* (in basso) trattati con OE di timo rosso (a sinistra) e OE di origano (a destra) puri dopo 24 h di incubazione

Tabella 3.17: effetto degli oli essenziali su *S. epidermidis*

	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
Diametro medio alone di inibizione, mm	15 ± 0	21 ± 0

Tabella 3.18: effetto degli oli essenziali su *E. coli*

	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
Diametro medio alone di inibizione, mm	8,5 ± 0.5	18,5 ± 0,5

Da Tabella 3.17 e Tabella 3.18 si può osservare che entrambi gli OE sono in grado di inibire più efficacemente la crescita di *S. epidermidis* rispetto a *E. coli*.
Inoltre, è ben evidente in Figura 3.8 che l'OE di origano è più efficace dell'OE di timo nell'inibire la crescita sia di *S. epidermidis* che di *E. coli*.

Questi risultati concordano in parte con quanto osservato da López *et al.* (2007) che, testando il batterio Gram positivo *S. aureus* e il batterio Gram negativo *E. coli*, hanno individuato concentrazioni minime inibitorie (MIC) minori per l'OE di origano rispetto all'OE di timo. Inoltre, mentre l'OE di origano ha mostrato un'efficacia simile nell'inibire la crescita sia di *S. aureus* e *E. coli,* la MIC per l'OE di timo è risultata minore nei confronti di *E. coli* rispetto a *S. aureus*, come riportato in Tabella 3.19.

Tabella 3.19: concentrazioni minime inibitorie espresse in µL di OE su L di spazio di testa della piastra ottenute da López *et al.* (2007)

Concentrazione minima inibitoria (µL / L)		
	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
S. aureus	87,3	13,1
E. coli	52,4	13,1

Diversi sono gli esiti delle prove condotte da Nedorostova *et al.* (2008) che, testando *S. aureus* e *E. coli,* hanno ricavato una maggiore efficacia di entrambi gli OE nei confronti del batterio Gram positivo e una maggior efficacia dell'OE di timo nell'inibire la crescita di *E. coli*. I valori da loro ottenuti sono riportati in Tabella 3.20.

Tabella 3.20: concentrazioni minime inibitorie espresse in µL di OE su L di spazio di testa della piastra ottenute da Nedorostova *et al.* (2008)

Concentrazione minima inibitoria (µL / cm^3)		
	Thymus vulgaris	*Origanum vulgaris*
S. aureus	0,017	0,017
E. coli	0,033	0,066

Come già evidenziato nella sezione 3.1.1, il fatto che i risultati ottenuti non concordino con le considerazioni riportate in letteratura, dipende da vari aspetti: innanzitutto la differenza dei ceppi microbici testati, poi l'elevata complessità degli OE, le cui caratteristiche di composizione chimica, volatilità e viscosità dipendono dall'origine e dal periodo di raccolta della pianta, dal metodo di estrazione e da altri fattori, la dimensione della piastra di Petri utilizzata per la conduzione delle prove, la quantità e il tipo di terreno che influenzano in modo considerevole gli esiti delle prove.

3.2.2 Effetto del volume di olio essenziale applicato a dischetti di diverse dimensioni

Al fine di valutare ulteriormente l'inibizione della crescita del batterio *S. epidermidis* per effetto dei soli vapori di OE, è stata condotta una seconda prova in cui a un dischetto di carta da filtro da 5 mm o da 10 mm sono stati rispettivamente aggiunti 3 µL e 10 µL di OE alle diverse concentrazioni.

I risultati delle piastre contenti un dischetto da 5 mm imbibito con 3 µL di OE sono riportati in Tabella 3.21.

Tabella 3.21: diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL di OE a un disco da 5 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
Timo	25,9 ± 1,2	20 ± 1,5	16 ± 2,1
Origano	21,3 ± 2,6	18 ± 0,9	15,3 ± 0,3

Dai risultati di Tabella 3.21, l'OE di timo sembrerebbe essere leggermente più efficace dell'OE di origano nell'inibire la crescita di *S. epidermidis* per tutti i valori di concentrazione testati.

In Figura 3.9 si possono osservare gli aloni di inbizione sviluppatisi in prossimità del dischetto imbibito di OE dopo 24 h di incubazione.

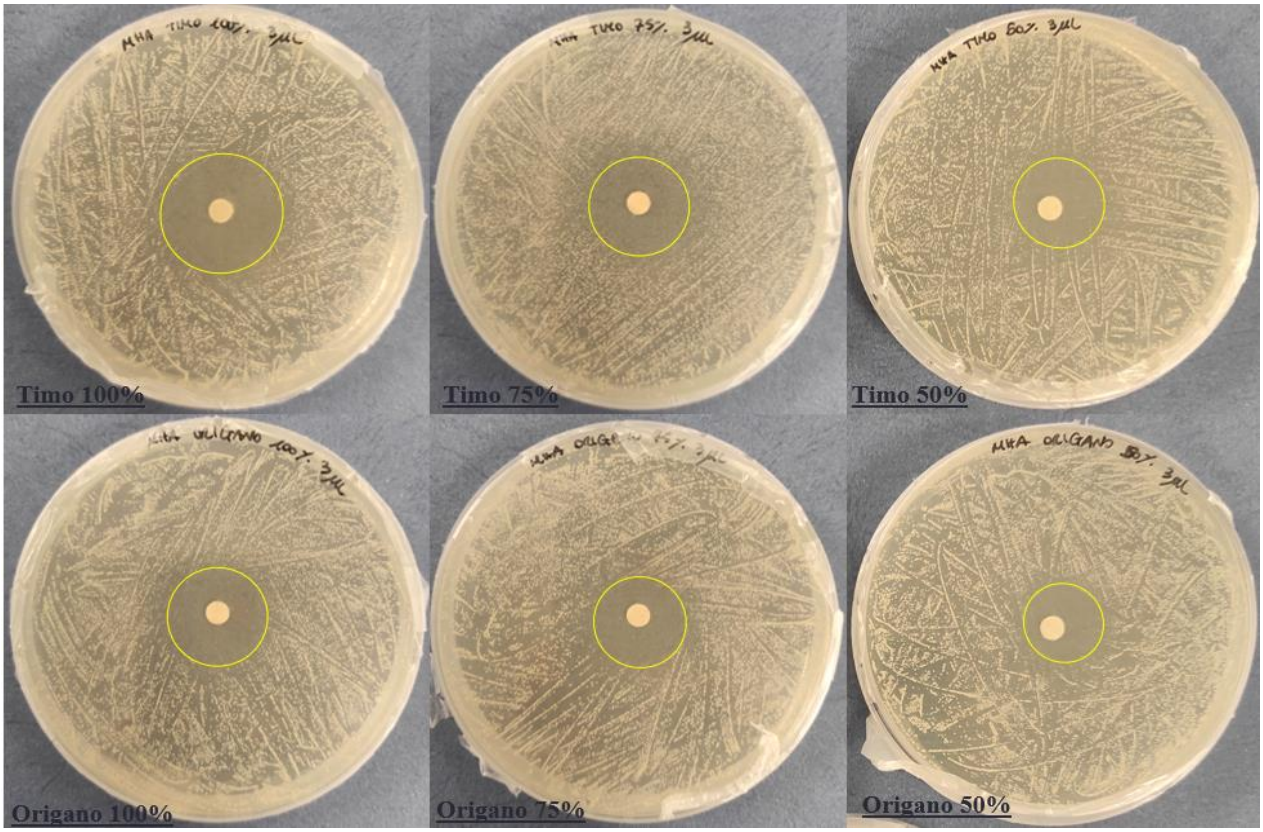

Figura 3.9: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di timo rosso (in alto) e OE di origano spagna (in basso) a diverse concentrazioni dopo 24 h di incubazione

Con lo scopo di valutare se le concentrazioni testate fossero batteriostatiche o battericide e analizzare il comportamento dei vapori di OE, la dimensione del diametro dell'alone di inibizione è stata monitorata nel tempo per un periodo di 168 h.

Si è osservato che dopo 48 h di incubazione, nella zona precedentemente priva di crescita batterica, *S. epidermidis* ha ricominciato a crescere; la Figura 3.10 mette, infatti, in evidenza la crescita microbica verificatasi per tutti i valori di concentrazione testati all'interno dell'alone prima individuato.

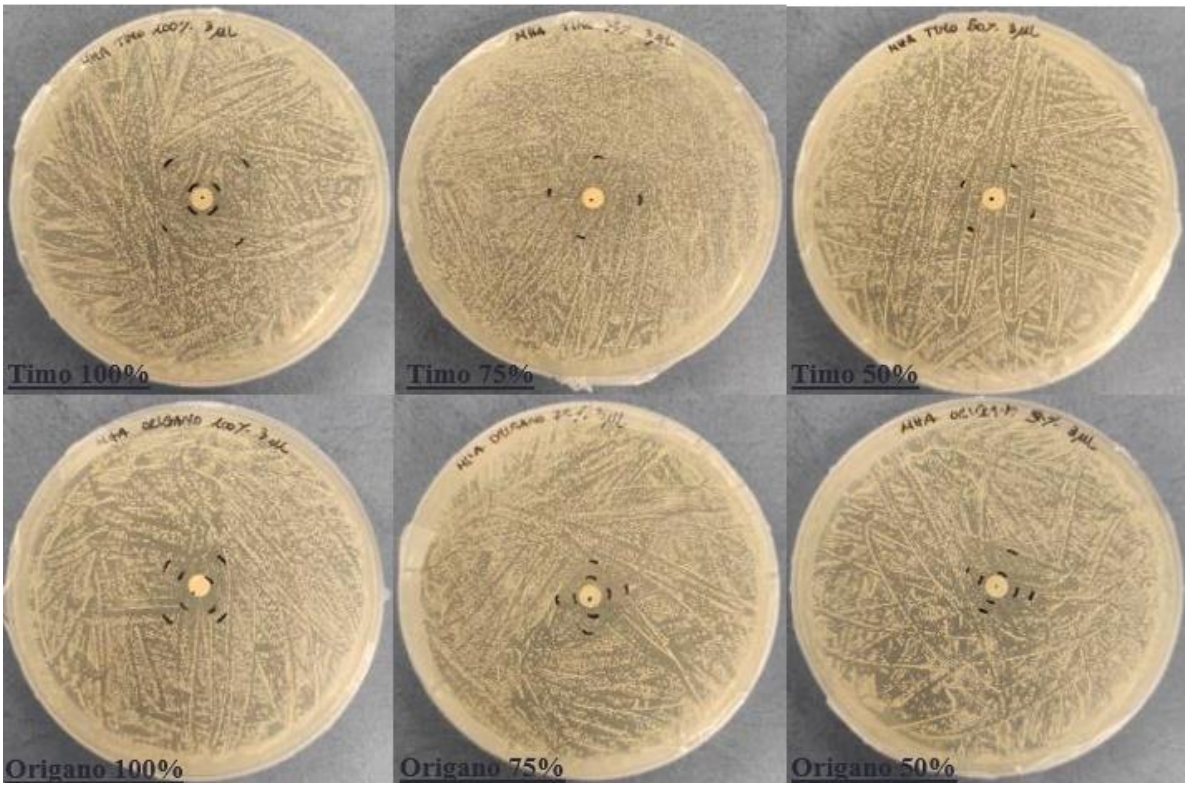

Figura 3.10: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di timo rosso (in alto) e OE di origano (in basso) a diverse concentrazioni dopo un periodo di incubazione di 48 h, ottenuto aggiungendo 3 µL a un dischetto di 5 mm

Nelle piastre con l'OE di origano 100%, 75% e 50% v/v e nelle piastre con l'OE di timo 100% risulta comunque individuabile una zona in cui la crescita batterica è ridotta rispetto al resto della piastra, come evidenziato dai tratti neri più interni riportati in Figura 3.10.
Sembra, quindi, che seppur la concentrazione in fase vapore sopra quella zona non sia sufficientemente elevata per impedire la crescita del batterio, essa è tale da non consentire la riproduzione cellulare alla massima velocità.

L'estensione delle zone in prossimità del dischetto imbibito di OE in cui è osservabile una ridotta crescita microbica dopo 48 h di incubazione è riportata in Tabella 3.22.

Tabella 3.22: diametro della zona con limitata crescita di *S. epidermidis* ottenuto dopo 48 h di incubazione

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
Timo	8,3 ± 0,8	7,6 ± 1,0	0
Origano	10,7 ± 1,3	8,9 ± 0,5	7,8 ± 0,8

Le prove con il *metodo di volatilizzazione dal disco* appena descritte sono state ripetute posizionando in ogni piastra un dischetto da 10 mm di diametro imbibito con 10 µL di OE alle diverse concentrazioni.
L'obiettivo è valutare la crescita batterica di *S. epidermidis* in presenza di un volume maggiore di OE e il fenomeno di diffusività degli OE aggiunti a un dischetto di maggiore diametro.
Per la scelta del volume e delle dimensioni del dischetto si è fatto riferimento alle prove condotte da López *et al.* (2005).

I risultati riportati in Tabella 3.23 mostrano che i diametri medi degli aloni sono risultati di dimensione maggiore rispetto a quelli osservati aggiungendo 3 µL al dischetto da 5 mm, probabilmente perché la quantità di OE aggiunto è maggiore.

Tabella 3.23: confronto dei diametri medi dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL di OE a un disco da 5 mm e 10 µL di OE a un disco da 10 mm

Diametri medi alone di inibizione (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
timo			
3 µL su 5 mm	25,9 ± 1,2	20,0 ± 1,5	16,0 ± 2,1
10 µL su 10 mm	45,5 ± 1,9	43,2 ± 1,3	28,5 ± 0,5
origano			
3 µL su 5 mm	21,3 ± 2,6	18,0 ± 0,9	15,3 ± 0,25
10 µL su 10 mm	37,2 ± 1,1	36,2 ± 0,9	26,7 ± 1,5

In Figura 3.11 sono mostrati gli aloni di inibizione ottenuti dopo un periodo di incubazione di 24 h aggiungendo 10 µL di OE a un dischetto di 10 mm.

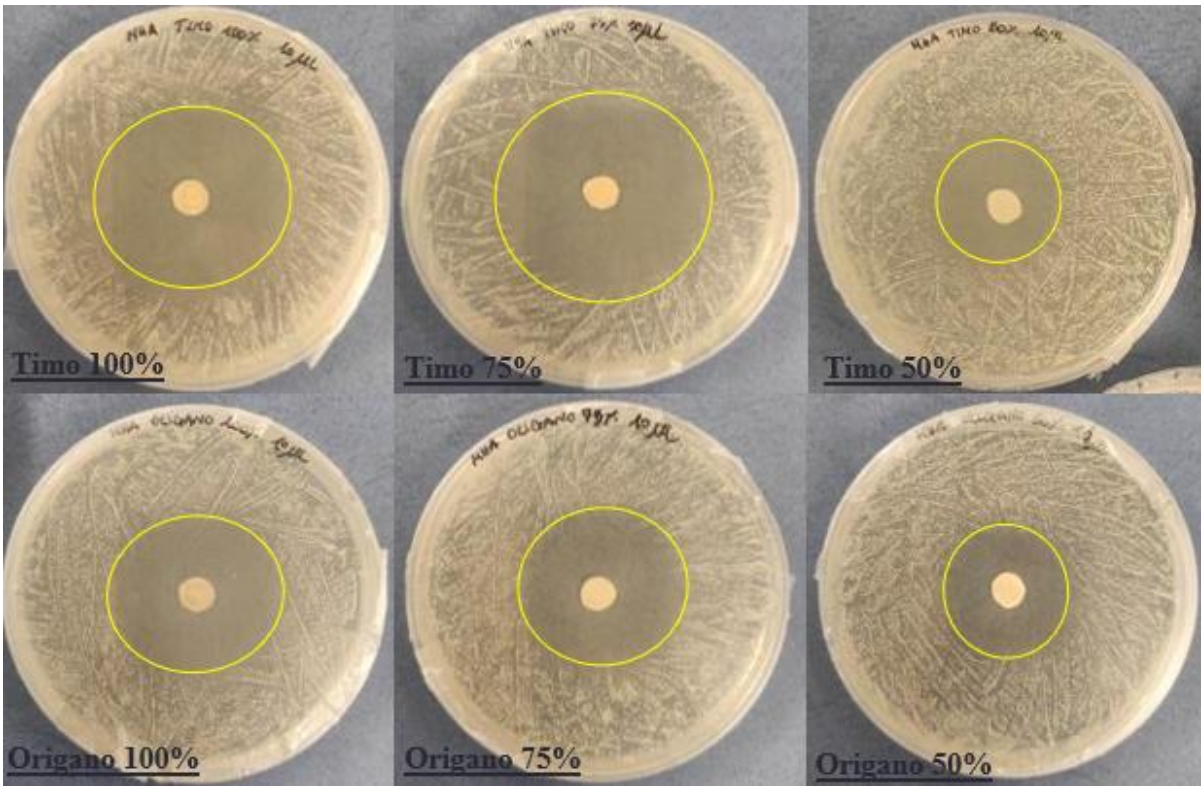

Figura 3.11: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di timo rosso (in alto) e OE di origano (in basso) a diverse concentrazioni dopo 24 h di incubazione, ottenuto aggiungendo 10 µL di OE a un dischetto di 10 mm

Come già osservato dai risultati ottenuti aggiungendo 3 µL al dischetto da 5 mm, anche in queste condizioni, dopo 24 h di incubazione, l'OE di timo sembra essere leggermente più efficace dell'OE di origano nell'inibire la crescita di *S. epidermidis* per tutti i valori di concentrazione testati.

3.2.3 Valutazione del diametro dell'alone di inibizione nel tempo

Anche per le prove condotte con il *metodo di volatilizzazione dal disco*, si è valutato se le concentrazioni testate fossero batteriostatiche o battericide; la dimensione del diametro medio dell'alone di inibizione è stata monitorata nel tempo per un periodo di 168 h.
I risultati dell'osservazione sono riportati in Figura 3.12 e Figura 3.13.

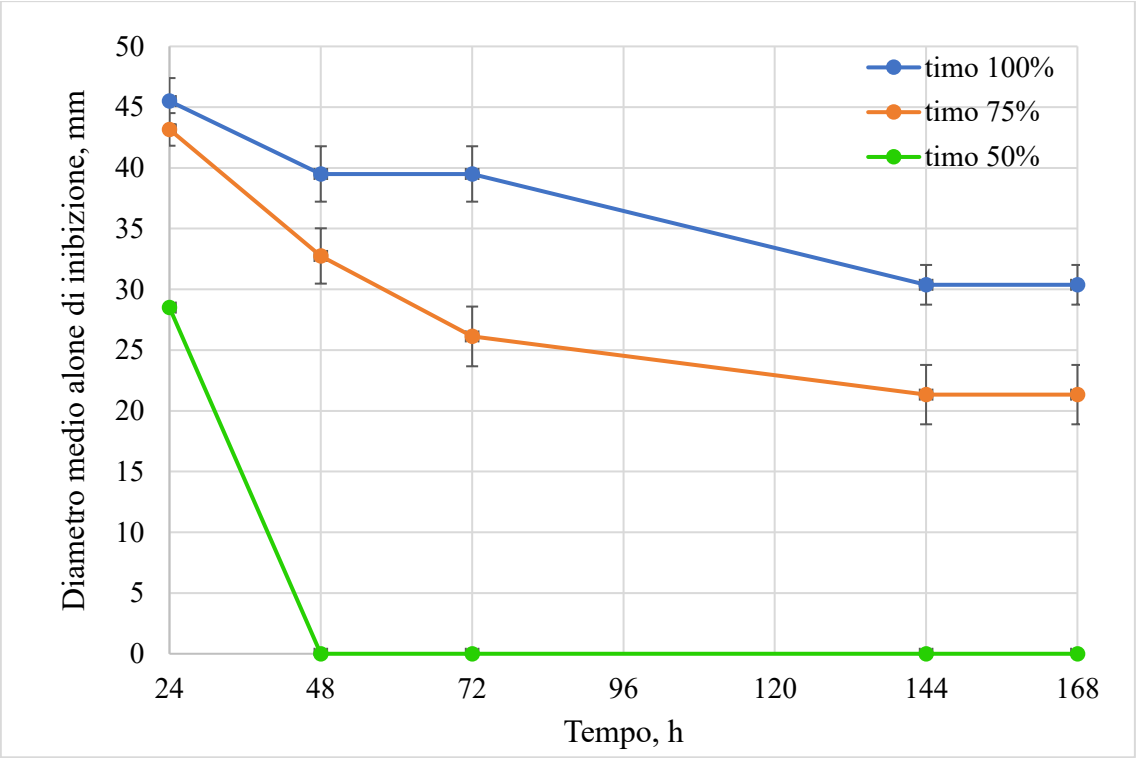

Figura 3.12: variazione del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto aggiungendo 10 µL di OE di timo a un disco da 10 mm

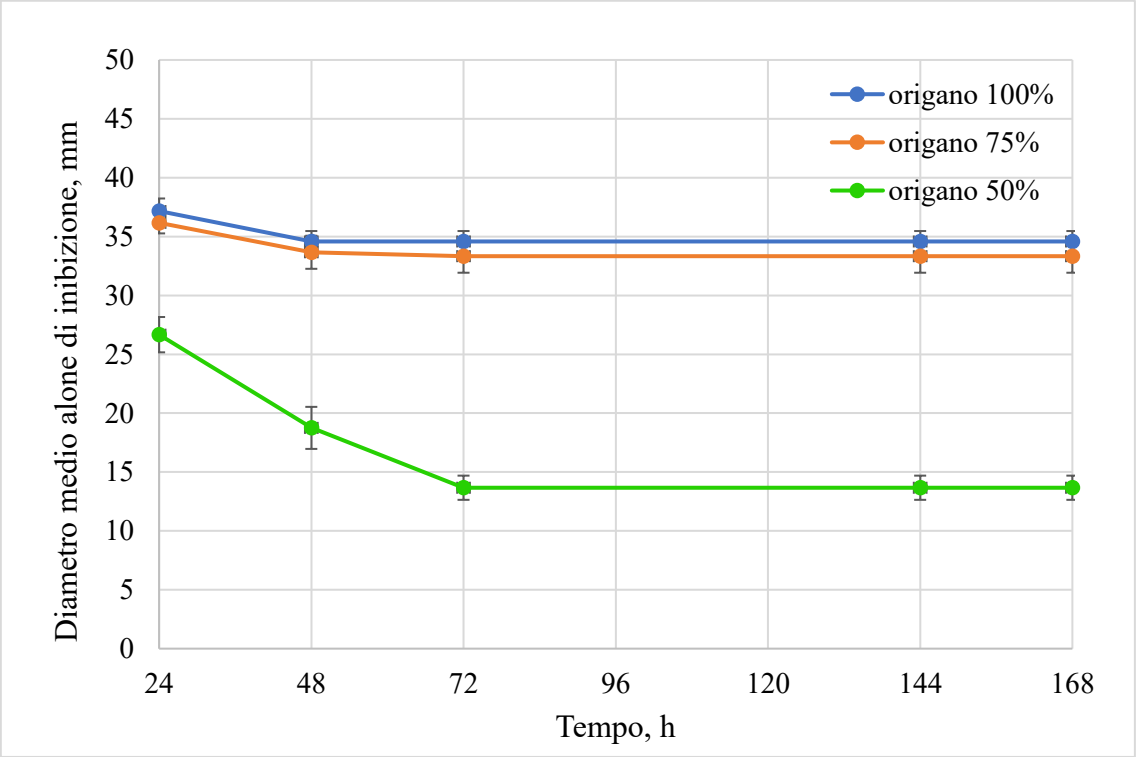

Figura 3.13: variazione del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto aggiungendo 10 µL di OE di origano a un disco da 10 mm

Dai grafici riportati in Figura 3.12 e Figura 3.13, si nota che in tutte le piastre si è verificata una diminuzione del diametro dell'alone di inibizione nel tempo.
Per l'OE di timo, ad eccezione della diluizione 50% per la quale già dopo 48 h è stata osservata crescita di *S. epidermidis* nella zona prima priva del batterio, la dimensione dell'alone di inibizione è diminuita progressivamente fino a 144 h di incubazione per poi rimanere inalterato nelle 24 h successive; in presenza dell'OE di origano, invece, dopo le prime 72 h in cui si è verificata una lieve diminuzione, il diametro medio dell'alone di inibizione è rimasto inalterato fino al termine dell'osservazione.
Per entrambi gli OE, la crescita microbica verificatasi nella zona prima priva del batterio è rallentata: sembrerebbe, infatti che, seppur la concentrazione in fase vapore sopra quella zona non sia sufficientemente elevata per impedire la crescita del batterio, essa sia tale da non consentire la riproduzione cellulare alla massima velocità.
Si nota, infatti, che muovendosi in direzione radiale allontanandosi dal centro della piastra, la crescita di *S. epidermidis* aumenta progressivamente; ciò sembra significare, quindi, che la concentrazione di OE nello spazio di testa diminuisce progressivamente lungo quella direzione.
Questo fenomeno è ben visibile nel particolare della Figura 3.14 riportato in Figura 3.15.

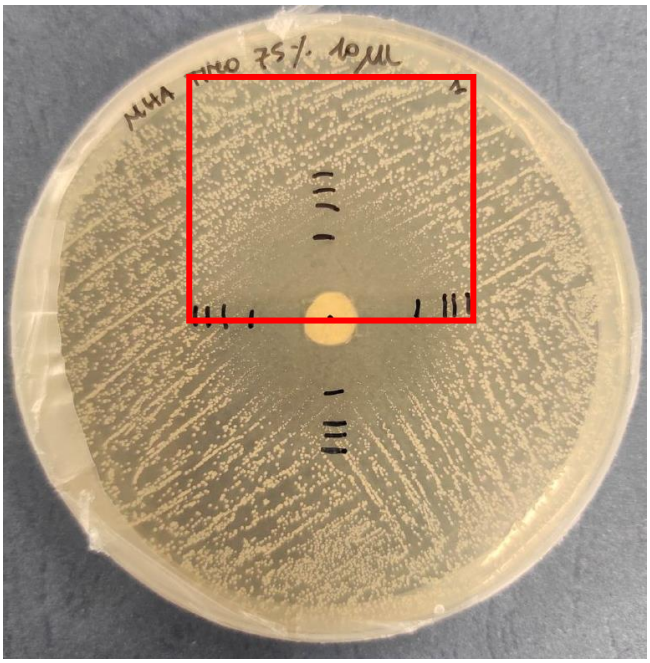

Figura 3.14: crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di origano nel tempo, ottenuto aggiungendo 10 µL di OE a un dischetto di 10 mm

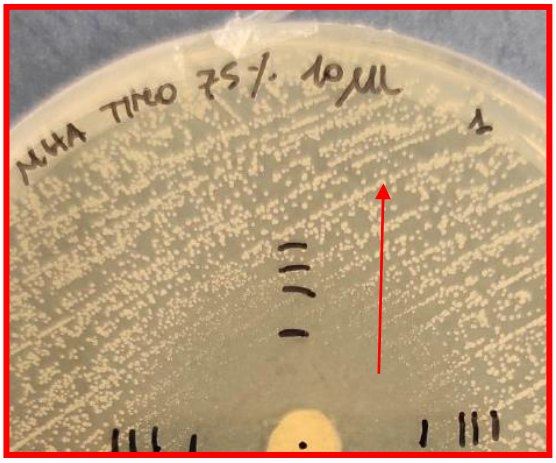

Figura 3.15: particolare della crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di origano nel tempo, ottenuto aggiungendo 10 µL di OE a un dischetto di 10 mm

Si riportano in Tabella 3.24 e Tabella 3.25 i valori dei diametri medi misurati nel periodo di osservazione e in Figura 3.16 vengono mostrate le piastre con l'esito della prova.

Tabella 3.24: misura del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto aggiungendo 10 µL di OE di timo a un disco da 10 mm nel tempo

DIAMETRO MEDIO ALONE DI INIBIZIONE (mm)					
	24 h	**48 h**	**72 h**	**144 h**	**168 h**
100%	45,5 ± 1,9	39,5 ± 2,3	39,5 ± 2,3	30,4 ± 1,6	30,4 ± 1,6
75 %	43,2 ± 1,3	32,75 ± 2,3	26,1 ± 2,5	21,3 ± 2,4	21,3 ± 2,4
50 %	28,5 ± 0,5	0	0	0	0

Tabella 3.25: misura del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto aggiungendo 10 µL di OE di origano a un disco da 10 mm nel tempo

DIAMETRO MEDIO ALONE DI INIBIZIONE (mm)					
	24 h	**48 h**	**72 h**	**144 h**	**168 h**
100%	37,2 ± 1,1	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9
75 %	36,2 ± 0,9	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4
50 %	26,7 ± 1,5	18,75 ± 1,8	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0

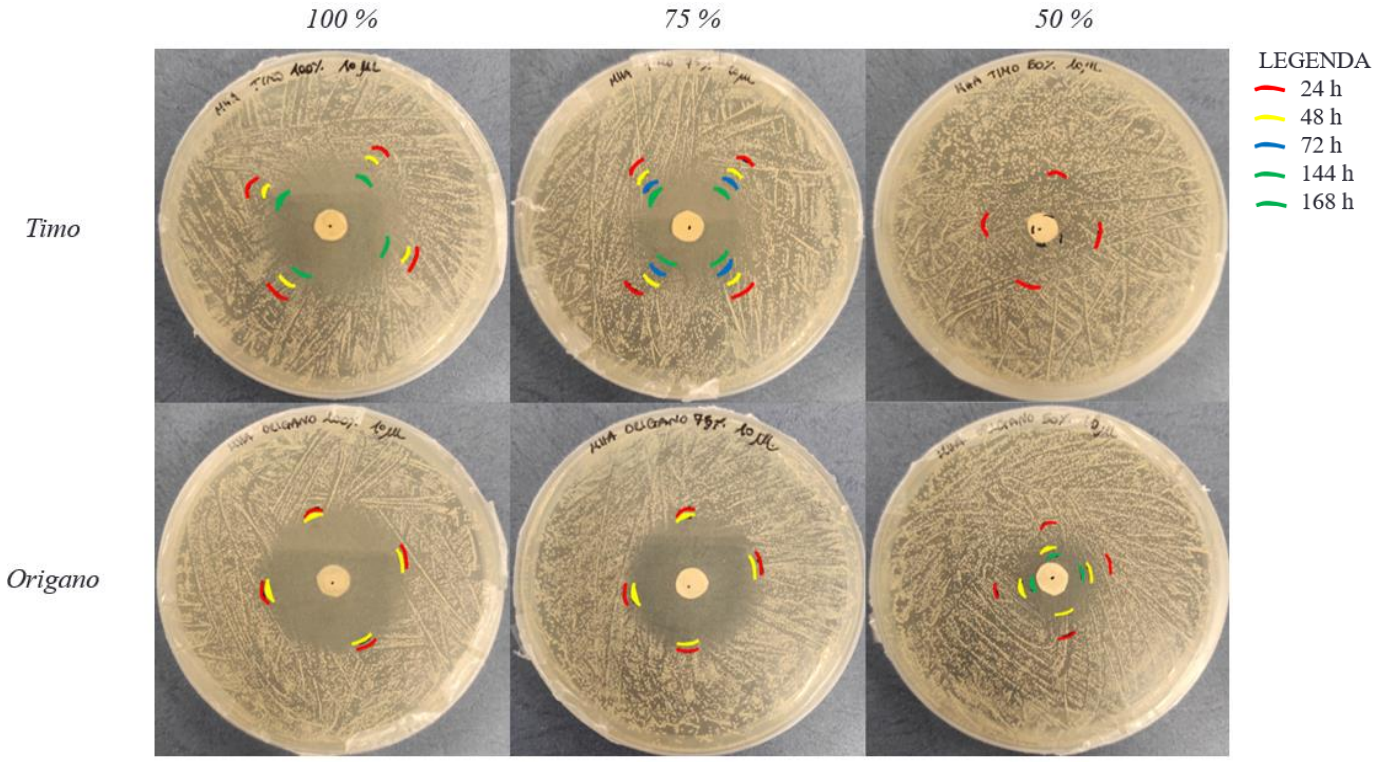

Figura 3.16: confronto tra l'azione dell'OE di timo e di origano sulla crescita di *S. epidermidis* nel tempo ottenuto aggiungendo 10 µL di OE a un disco da 10 mm

In Tabella 3.26 è riportato un confronto tra i valori di diametro dell'alone di inibizione ottenuti in presenza dell'OE di timo e dell'OE di origano nel tempo per le diverse concentrazioni testate.

Tabella 3.26: confronto diametri medi dell'alone di inibizione in presenza dell'OE di timo e dell'OE di origano nel tempo

Diametro medio alone di inibizione (mm)					
	24 h	**48 h**	**72 h**	**144 h**	**168 h**
100 %					
timo	45,5 ± 1,9	39,5 ± 2,3	39,5 ± 2,3	30,4 ± 1,6	30,4 ± 1,6
origano	37,2 ± 1,1	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9
75 %					
timo	43,2 ± 1,3	32,75 ± 2,3	26,1 ± 2,5	21,3 ± 2,4	21,3 ± 2,4
origano	36,2 ± 0,9	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4
50 %					
timo	28,5 ± 0,5	0	0	0	0
origano	26,7 ± 1,5	18,75 ± 1,8	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0

Dai valori riportati in Tabella 3.26 si osserva che a partire dalle 48 h, l'OE di origano sembra essere più efficace dell'OE di timo nell'inibire la crescita batterica per le concentrazioni di OE 75 % e 50% v/v; a partire da 144 h risulta più efficace anche per l'OE puro 100% v/v.
In particolare, per le concentrazioni al 50% v/v, l'OE di origano sembra mantenere la propria efficacia antimicrobica mentre l'OE di timo dopo 48 h non è più in grado di inibire la crescita di *S. epidermidis.*

3.2.4 Valutazioni delle concentrazioni di olio essenziale testate

Successivamente si sono voluti analizzare i risultati ottenuti nelle varie prove effettuate con il *metodo di volatilizzazione dal disco* per trarre delle considerazioni sulla quantità di OE che vaporizza e sulla capacità batteriostatica o battericida delle concentrazioni testate.
In Tabella 3.27 sono riportati i valori di diametro medio dell'alone di inibizione ottenuti aggiungendo diversi volumi di OE di timo a diverse concentrazioni a un dischetto da 10 mm di diametro.

Tabella 3.27: confronto dei diametri medi degli aloni di inibizione su *S. epidermidis* ottenuti aggiungendo diversi volumi di OE di timo a diverse concentrazioni a un disco da 10 mm nel tempo

DIAMETRO MEDIO ALONE DI INIBIZIONE (mm)					
	24 h	**48 h**	**72 h**	**144 h**	**168 h**
3 µL TIMO 50% (1,5 µL OE + 1,5 µL TEGO)	17,7 ± 1,8	0	0	0	0
3 µL TIMO 75% (2,25 µL OE + 1,25 µL TEGO)	21,8 ± 3,1	8,8 ± 0,8	8,8 ± 0,8	8,8 ± 0,8	8,8 ± 0,8
3 µL TIMO 100% (3 µL OE)	34,8 ± 2,2	25,8 ± 0,8	17,5 ± 0,5	15,5 ± 1,5	15,5 ± 1,5
10 µL TIMO 50% (5 µL OE + 5 µL TEGO)	24,75 ± 3,3	0	0	0	0

Si osserva che 1,5 µL di OE non sono sufficienti per inibire la crescita batterica per un tempo superiore alle 24 h; 2,25 µL sono, invece, sufficienti per svolgere un'azione battericida in una zona di diametro 8,75 ± 0,75 mm attorno al dischetto imbibito di OE.
Si nota anche che 5 µL di OE aggiunti in diluizione al 50 % con la soluzione di TEGO (1,5 % v/v) hanno un'efficacia minore di 3 µL di OE puro; ciò sembra confermare le valutazioni fatte nella Sezione 3.1.3 riguardo una possibile influenza da parte del solvente nell'ostacolare l'evaporazione di alcuni componenti responsabili dell'azione antimicrobica.

In Tabella 3.28 sono riportati i valori di diametro medio dell'alone di inibizione ottenuti aggiungendo diversi volumi di OE di origano a diverse concentrazioni a un dischetto da 10 mm di diametro.

Tabella 3.28: confronto dei diametri medi degli aloni di inibizione su *S. epidermidis* ottenuti aggiungendo diversi volumi di OE di origano a diverse concentrazioni a un disco da 10 mm nel tempo

DIAMETRO MEDIO ALONE DI INIBIZIONE (mm)					
	24 h	**48 h**	**72 h**	**144 h**	**168 h**
3 µL TIMO 50% (1,5 µL OE + 1,5 µL TEGO)	15,0 ± 0	0	0	0	0
3 µL TIMO 75% (2,25 µL OE + 1,25 µL TEGO)	22,7 ± 3,0	11,25 ± 0,4	8,0 ± 0	8,0 ± 0	8,0 ± 0
3 µL TIMO 100% (3 µL OE)	26,4 ± 1,2	14,5 ± 1,5	11,0 ± 0	11,0 ± 0	11,0 ± 0
10 µL TIMO 50% (5 µL OE + 5 µL TEGO)	26,7 ± 1,5	18,75 ± 1,8	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0

Anche per l'OE di origano si osserva che 1,5 µL di OE non sono sufficienti per inibire la crescita batterica per un tempo superiore alle 24 h; 2,25 µL sono, invece, sufficienti per svolgere un'azione battericida in una zona di diametro 8 mm attorno al dischetto imbibito di OE.
Una differenza si osserva rispetto all'analisi precedente: in questo caso, 5 µL di OE aggiunti in diluizione al 50 % con la soluzione di TEGO (1,5 % v/v) hanno un'efficacia maggiore di 3 µL di OE puro; tuttavia, la dimensione dell'alone non è estesa come ci si aspetterebbe e ciò è in accordo con l'ipotesi dell'influenza da parte del solvente nell'ostacolare l'evaporazione di alcuni componenti degli OE responsabili dell'azione antimicrobica.

È possibile calcolare un valore indicativo della quantità di OE che si trova nello spazio di testa della piastra di Petri esprimendolo come µL di OE per unità di volume; i valori sono riportati in Tabella 3.29.
(Per la geometria della piastra di Petri si rimanda alla Figura 2.5).

$$V_{spazio\ di\ testa} = 63{,}62\ cm^3$$

Tabella 3.29: µL di OE per unità di volume dello spazio di testa della piastra di Petri per i volumi di OE testati

µL	**µL / cm^3**
1,5	0,023
2,25	0,035
3	0,047
5	0,078

In queste condizioni si può, quindi, definire 0,035 µL / cm^3 come la minima concentrazione tra quelle testate in grado di inibire la crescita per un tempo superiore alle 48 h sia per l'OE di timo che per l'OE di origano.

Dopo un periodo di incubazione di 168 h, il coperchio delle piastre di Petri su cui era stato precedentemente posizionato il dischetto imbibito di olio essenziale, è stato rimosso e sostituito con un coperchio privo di dischetto per valutare se *S. epidermidis* in assenza di OE riprendesse a crescere.
Dopo 24 h in assenza di OE, si osserva che il diametro degli aloni non è variato cioè il batterio non è cresciuto; ciò significa che per qui valori di concentrazione di OE testati, l'effetto è battericida.

Le piastre di Petri sono poi state conservate in frigo alla temperatura di + 4°C per i successivi 40 giorni, incubate per 24 h e dopodiché sono stati misurati nuovamente i diametri degli aloni di inibizione.
I risultati dopo 24 h senza dischetto e dopo ulteriori 41 giorni sono riportati in Tabella 3.30 e Tabella 3.31.

Tabella 3.30: confronto tra il diametro dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto aggiungendo 10 µL di OE di timo, misurato dopo 168 h di incubazione, 24 h in assenza di dischetto e dopo altri 40 giorni di conservazione nel frigorifero a +4°C e 24 h di incubazione

DIAMETRO MEDIO ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	168 h di incubazione	**24 h senza dischetto**	**42 giorni senza dischetto**
100%	30,4 ± 1,6	30,4 ± 1,6	23,1 ± 0,7
75 %	21,3 ± 2,4	21,3 ± 2,4	19,2 ± 2,2
50 %	0	0	0

Tabella 3.31: confronto tra il diametro dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto aggiungendo 10 µL di OE di origano, misurato dopo 168 h di incubazione, 24 h in assenza di dischetto e dopo altri 40 giorni di conservazione nel frigorifero a +4°C e 24 h di incubazione

DIAMETRO MEDIO ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	168 h di incubazione	**24 h senza dischetto**	**42 giorni senza dischetto**
100%	34,6 ± 0,9	34,6 ± 0,9	29,7 ± 0,5
75 %	33,7 ± 1,4	33,7 ± 1,4	27,6 ± 2,1
50 %	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0	13,7 ± 1,0

La prova appena descritta, in cui 10 µL di OE alle diverse concentrazioni sono stati aggiunti a un dischetto da 10 mm di diametro posizionando sul coperchio di ogni piastra per valutare l'efficacia antimicrobica dei vapori di OE, è stata ripetuta per verificare l'effettiva riproducibilità dei risultati.

Da ciò che è riportato in Tabella 3.32 e Tabella 3.33 si può osservare che, nonostante l'intrinseca variabilità delle prove antimicrobiche e la complessità degli oli essenziali, la volatilità e l'idrofobicità che comportano la preparazione di una sospensione non perfettamente omogenea, i valori di diametro medio dell'alone di inibizione ricavati dalla prova precedente sono stati confermati.

Tabella 3.32: confronto del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto nelle due prove effettuate, aggiungendo 10 µL di OE di timo rosso a un disco da 10 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
PROVA 1	45,5 ± 1,9	43,2 ± 1,3	28,5 ± 0,5
PROVA 2	43,2 ± 1,5	40,2 ± 2,6	24,75 ± 3,3

Tabella 3.33: confronto del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto nelle due prove effettuate, aggiungendo 10 µL di OE di origano spagna a un disco da 10 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
PROVA 1	37,2 ± 1,1	36,2 ± 0,9	26,7 ± 1,5
PROVA 2	37,3 ± 0,7	35,4 ± 1,8	13 ± 0*

*probabile errore durante la preparazione della diluzione

3.2.5 Effetto della dimensione del dischetto imbibito di olio essenziale sull'estensione dell'alone di inibizione

È stata, infine, condotta una prova per valutare se la dimensione del dischetto su cui si aggiunge l'OE influenzi il fenomeno di vaporizzazione degli OE e conseguentemente la dimensione dell'alone di inibizione.

Sono stati utilizzati dischetti di diametro differente, 5 mm e 10 mm, a cui sono stati aggiunti 3 µL di OE alle diverse concentrazioni.

In Tabella 3.34 e Tabella 3.35 sono riportati i valori ottenuti e in Figura 3.17 e Figura 3.18 gli aloni formatisi dopo un periodo di incubazione di 24 h.

Tabella 3.34: diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL di OE di timo rosso a un disco da 5 mm e da 10 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
5 mm	25,9 ± 1,2	20 ± 1,5	16 ± 2,1
10 mm	34,8 ± 2,2	21,8 ± 3,1	17,8 ± 1,8

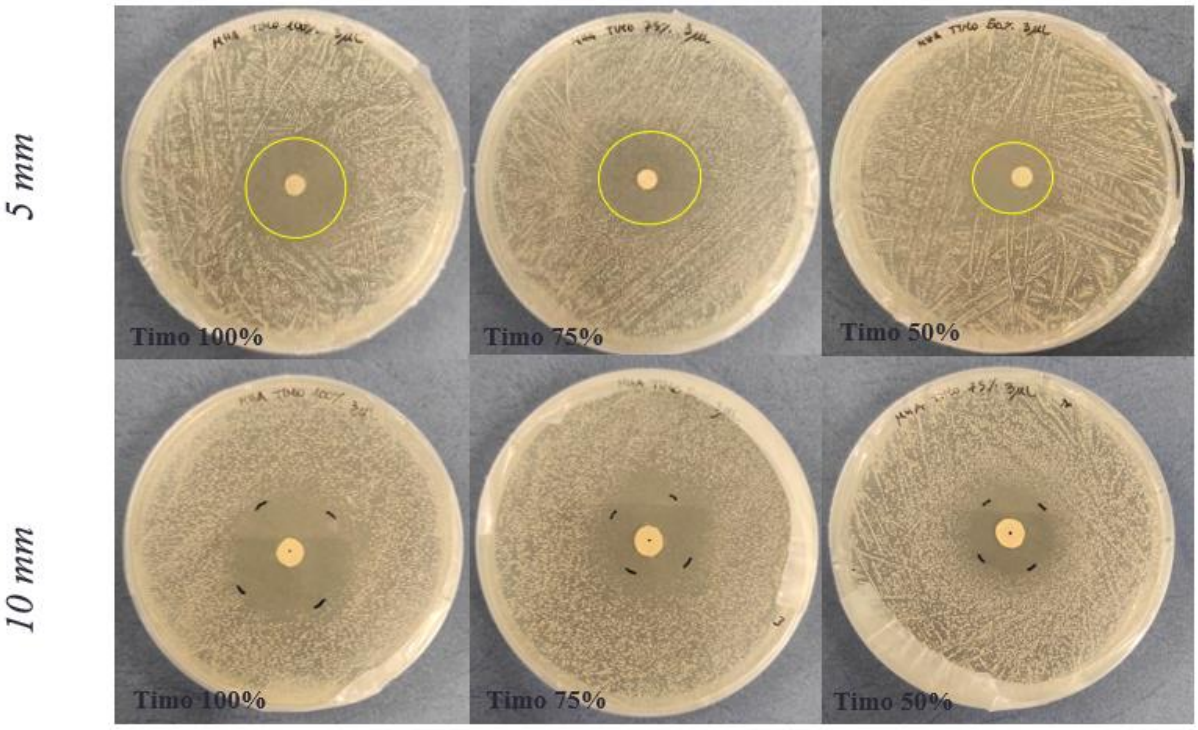

Figura 3.17: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di timo dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL di OE a un disco da 5 mm (in alto) e da 10 mm (in basso)

Tabella 3.35: diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL di OE di origano spagna a un disco da 5 mm e da 10 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
5 mm	21,3 ± 2,6	18,0 ± 0,9	15,3 ± 0,3
10 mm	26,4 ± 1,2	22,7 ± 3,0	15,0 ± 0

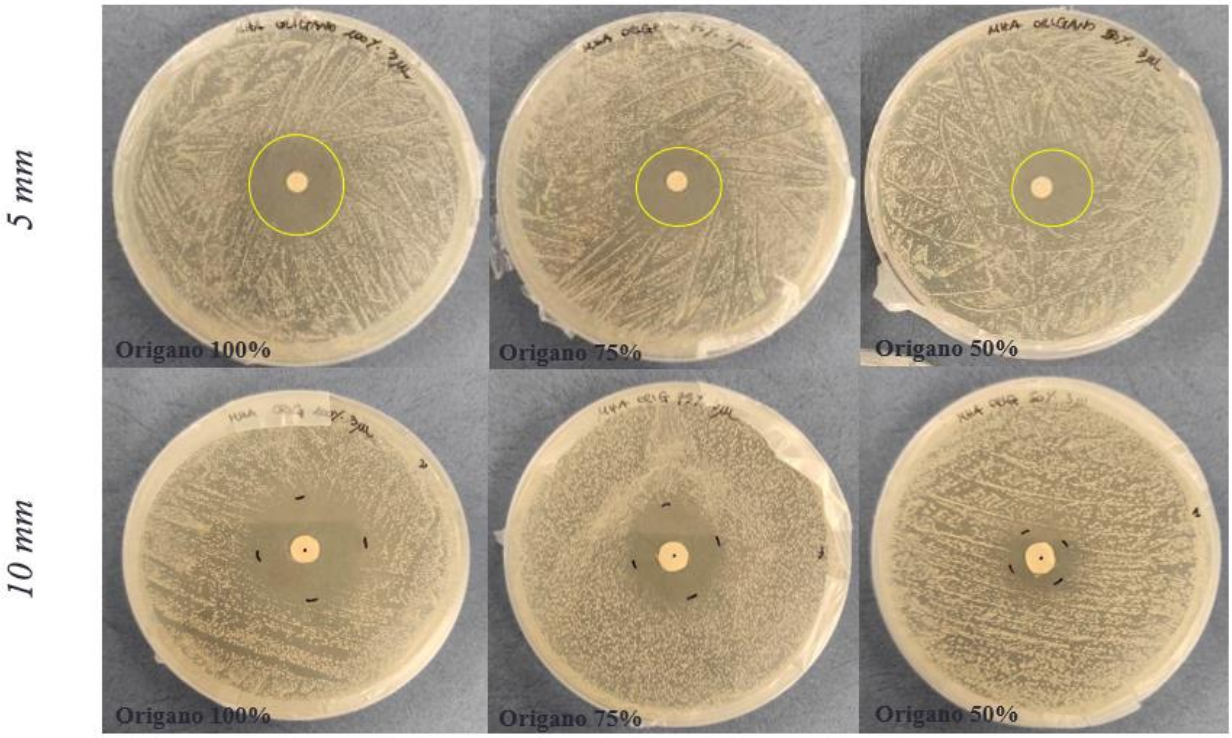

Figura 3.18: confronto della crescita di *S. epidermidis* trattato con OE di origano dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL di OE a un disco da 5 mm (in alto) e da 10 mm (in basso)

Dai dati riportati in Tabella 3.34 e Tabella 3.35 si osserva che, mentre per gli OE puri il diametro dell'alone di inibizione risulta leggermente maggiore se viene utilizzato il dischetto da 10 mm, per le diluizioni al 75% e al 50 % v/v la differenza di diametro può essere considerata trascurabile.
Questi risultati fanno pensare al fatto che l'inibizione della crescita batterica possa dipendere esclusivamente dalla quantità di OE che, a prescindere dalla dimensione del dischetto, vaporizza e definisce la concentrazione nello spazio di testa sopra i microrganismi.

A conferma di queste ipotesi, confrontando le misure diametro medio ottenute aggiungendo 3 µL e 10 µL a un dischetto di diametro 10 mm, riportate in Tabella 3.36 e Tabella 3.37, si osservano valori di diametro medio dell'alone di inibizione più elevati in presenza di un volume maggiore di OE.

Tabella 3.36: diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL e 10 µL di OE di timo rosso a un disco da 10 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
3 µL	34,8 ± 2,2	21,8 ± 3,1	17,75 ± 1,8
10 µL	44,3 ± 2,1	41,7 ± 2,5	26,6 ± 3,0

Tabella 3.37: diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* dopo 24 h di incubazione ottenuto aggiungendo 3 µL e 10 µL di OE di origano spagna a un disco da 10 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
3 µL	25,8 ± 2,9	24,1 ± 1,2	15,0 ± 0
10 µL	37,25 ± 0,9	35,8 ± 1,5	26,7 ± 4,9

3.3 Confronto degli effetti degli oli essenziali su terreno solido e in fase vapore

Uno degli obiettivi di questo lavoro di Tesi è valutare l'efficacia degli oli essenziali in fase vapore, confrontandola con il loro effetto su terreno solido.

Le prove sono state effettuate con il *metodo di diffusione su agar* per la valutazione dell'effetto degli OE su terreno solido e con il *metodo di volatilizzazione dal disco* per esaminare l'effetto dei vapori degli OE.
Sono stati utilizzati dei dischetti da 5 mm a cui sono stati aggiunti 3 µL di OE alle concentrazioni desiderate.

Le considerazioni che si possono trarre dai risultati mostrati in Tabella 3.38 e Tabella 3.39 concordano con quanto riportato da López *et al.* (2009) che, studiando l'effetto diversi OE sulla crescita di diversi batteri, tra cui *E. coli* e *S. aureus*, hanno osservato una maggiore inibizione quando il dischetto, e quindi l'OE, era posto a diretto contatto con i microrganismi, cioè nelle prove condotte con il *metodo di diffusione su agar.*

Tabella 3.38: confronto del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto con il *metodo di diffusione su agar* e con il *metodo di volatilizzazione* dopo un periodo di incubazione di 24 h aggiungendo 3 µL di OE di timo rosso alle diverse concentrazioni a un dischetto di 5 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
Diffusione su agar	46,2 ± 2,7	44,9 ± 1,0	10,4 ± 0,4
Volatilizzazione dal disco	25,9 ± 1,2	20 ± 1,5	16 ± 2,1

Tabella 3.39: confronto del diametro medio dell'alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto con il metodo di diffusione su agar e con il metodo di volatilizzazione dopo un periodo di incubazione di 24 h aggiungendo 3 µL di OE di origano spagna alle diverse concentrazioni a un dischetto di 5 mm

DIAMETRI MEDI ALONE DI INIBIZIONE (mm)			
	100 %	**75 %**	**50%**
Diffusione su agar	40,0 ± 3,3	38,7 ± 0,8	14,5 ± 1,1
Volatilizzazione dal disco	21,3 ± 2,6	18,0 ± 0,9	15,3 ± 0,3

I risultati riportati in Tabella 3.38 e Tabella 3.39 sono stati calcolati come media di tutti i valori ottenuti nelle varie prove nelle stesse condizioni operative.

In Figura 3.19 e Figura 3.20 sono mostrati a confronto gli aloni di inibizione ottenuti applicando i due metodi; è ben evidente la maggior estensione del diametro dell'alone nei test di diffusione solida. Si osserva un'eccezione nel caso dell'OE diluito al 50 %.

I risultati ottenuti potrebbero essere spiegati dal fatto, che nel caso di test di diffusione su solido, l'effetto inibitorio degli OE è dovuto sia alla fase liquida a diretto contatto con il batterio che ai vapori degli OE formatisi all'interno della piastra di Petri; di conseguenza l'alone di inibizione risulta più esteso.
Più precisamente, si osserva che i diametri ottenuti dalle prove di volatilizzazione hanno dei valori che sono circa la metà di quelli ottenuti dalle prove di diffusione su solido, quindi si potrebbe dedurre che nelle prove condotte con il metodo di diffusione su agar l'azione

antibatterica osservata è dovuta per metà all'azione degli OE in fase liquida che diffondono sullo strato di agar e per metà all'azione dei vapori di OE.

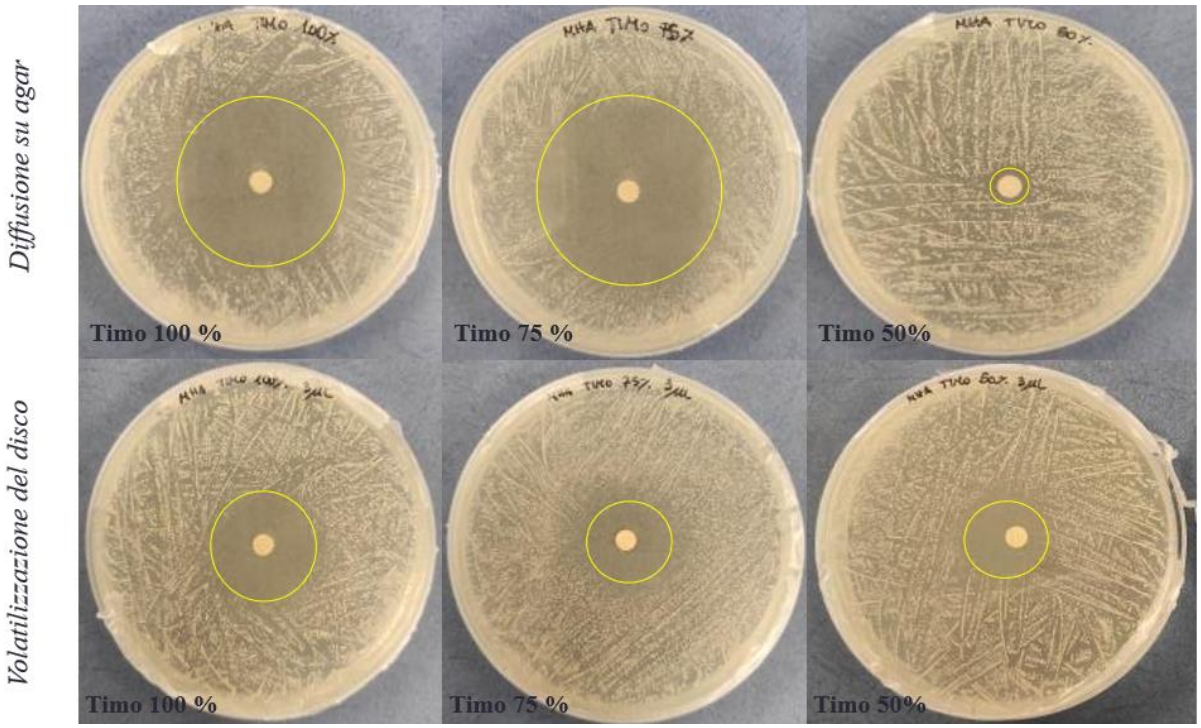

Figura 3.19: alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto con il *metodo di diffusione su agar* e con il *metodo di volatilizzazione dal disco* dopo 24 h di incubazione aggiungendo 3 µL di OE di timo a un dischetto di 5 mm di diametro

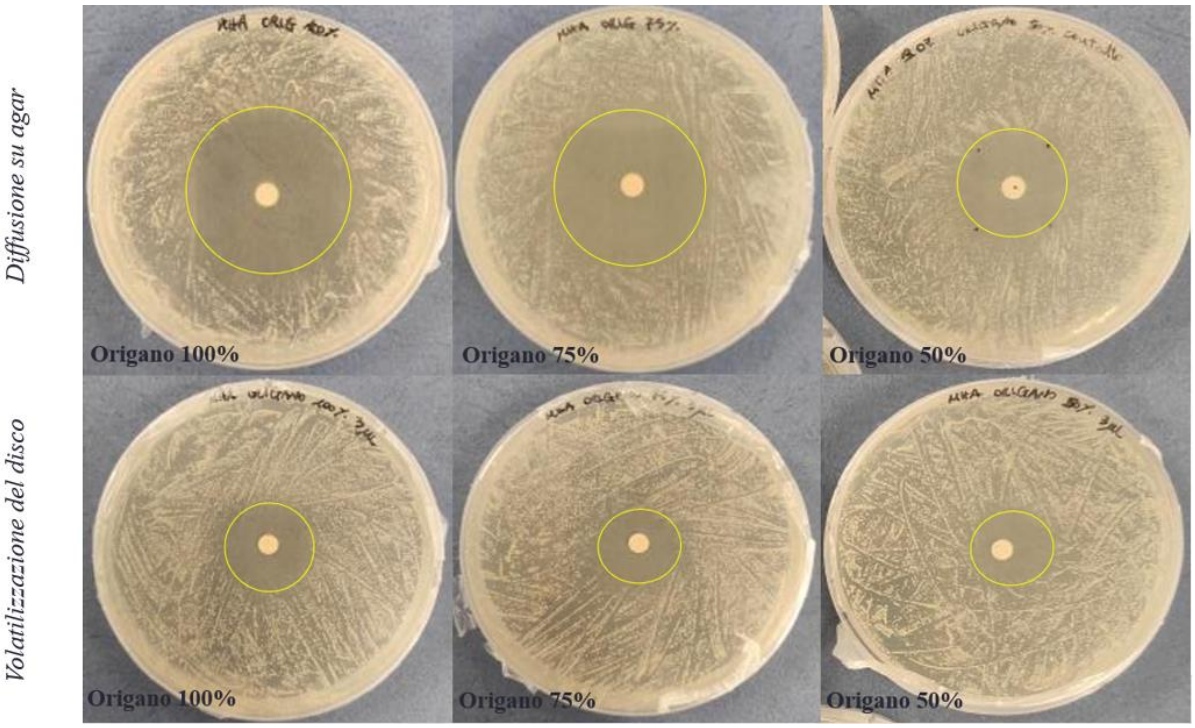

Figura 3.20: alone di inibizione su *S. epidermidis* ottenuto con il *metodo di diffusione su agar* e con il *metodo di volatilizzazione dal disco* dopo 24 h di incubazione aggiungendo 3 µL di OE di origano a un dischetto di 5 mm di diametro

4 Conclusioni

In questo lavoro di Tesi è stata studiata la capacità degli oli essenziali di inibire o rallentare la crescita di alcuni microrganismi.
Gli oli essenziali testati sono stati l'OE di timo rosso (*Thymus vulgaris* oil OE0970) e l'OE di origano spagna (*Origanum vulgaris* oil OE0375) e sono stati presi in esame i batteri *Escherichia coli* LMG 08063 e *Staphylococcus epidermidis* LMG 10474.

Inizialmente sono state condotte delle prove con lo scopo di determinare quale tra i due oli essenziali scelti fosse responsabile di una maggiore inibizione della crescita di *S. epidermidis* e *E. coli* e successivamente sono stati eseguiti dei test per valutare l'efficacia degli OE a diverse concentrazioni, a partire dall'OE 100% fino a 0,75 % v/v, ottenute diluendo gli OE puri con una soluzione di TEGO (1,5 % v/v).

Le prove sono state condotte con due metodi: il *metodo di diffusione su agar,* per testare la capacità inibitiva degli oli essenziali a diretto contatto con i microrganismi, e il *metodo di volatilizzazione dal disco*, in cui si valuta l'attività antibatterica dei vapori degli OE.

Dalle sperimentazioni compiute con *il metodo di diffusione su agar* è risultato che:

- entrambi gli oli essenziali sono in grado di inibire maggiormente la crescita del batterio *S. epidermidis* rispetto a *E. coli*;
- tra le concentrazioni testate, solamente quelle maggiori o uguali al 10% hanno rallentato la crescita microbica, mentre le concentrazioni più basse testate (1% e 0,75 % v/v) non hanno influenzato la crescita dei microrganismi;
- la dimensione del dischetto influenza la diffusività dell'OE sul terreno solido consentendo una diversa distribuzione sulla superficie di agar, maggiore è il diametro del dischetto, maggiore è l'alone che si sviluppa attorno ad esso;
- l'olio essenziale di timo è più leggermente efficace dell'OE di origano nell'inibire la crescita di *S. epidermidis* per le concentrazioni più elevate testate, 100% e 75%, mentre per % più basse (50%, 25% e 10%) l'OE di origano sembra più efficace;
- è stato individuato, per entrambi gli OE, il valore di 0,153 µL / cm^2 come concentrazione minima iniziale di OE su dischetto per unità di superficie in grado di garantire inibizione della crescita batterica.

È stata, inoltre, valutata la variazione del diametro medio dell'alone di inibizione nel tempo; è stato osservato per quasi tutti i valori di diluizione che, a partire dalle 48 h di incubazione, il diametro diminuisce.
Questo fenomeno è probabilmente dovuto al fatto che il batterio, per poter essere efficacemente inibito nella sua crescita, deve essere in presenza di una concentrazione di OE superiore ad un determinato valore, definito 'concentrazione soglia', la quale garantisce un effetto batteriostatico: nelle prime 24 h, la concentrazione di OE è sufficientemente elevata in prossimità del dischetto da inibire la crescita batterica però, con il passare del tempo, diminuisce e consentendo la crescita del batterio prima inibito.

In seguito, si è voluto analizzare meglio il fenomeno di diffusività dell'OE su terreno solido per valutare se la presenza di un'altra sostanza liquida, come la soluzione di TEGO SML 20, influenzasse la diffusione dell'OE limitando l'azione battericida.

Dagli esiti della prova sembrerebbe che la presenza del TEGO influenzi l'azione antibatterica degli OE siccome i diametri degli aloni risultanti hanno dimensioni inferiori.

Dalle sperimentazioni compiute con il *metodo di volatilizzazione dal disco* è emerso che:

- entrambi gli oli essenziali sono in grado di inibire maggiormente la crescita del batterio *S. epidermidis* rispetto a *E. coli*;
- dopo 24 h di incubazione, si nota una capacità inibitoria leggermente maggiore per dell'OE di timo rispetto all'OE di origano per tutti i valori di concentrazione testati;
- a partire dalle 48 h, l'OE di origano sembrerebbe mantenere la sua efficacia inibitoria in maniera migliore rispetto all'OE di timo per valori di concentrazione inferiori al 75% v/v;
- 0,035 $\mu L/cm^3$, corrispondente a 2,25 µL di OE, è stata individuata come la concentrazione minima tra quelle testate per cui si ha un'azione inibitoria per un periodo di tempo superiore alle 48 h sia per l'OE di timo che per l'OE di origano;
- rimuovendo il dischetto imbibito di OE dopo 168 h di incubazione e misurando il diametro dell'alone di inibizione nelle successive 24 h non si rileva alcuna variazione della dimensione;
- dopo due mesi di mantenimento delle piastre in frigo a +4°C e ulteriori 24 h di incubazione, non è stata osservata crescita batterica nell'alone di inibizione precedentemente individuato

Si è valutato, inoltre, se la dimensione del dischetto su cui si aggiunge l'OE influenzi la dimensione dell'alone di inibizione; perciò, si sono confrontati gli esiti delle prove condotte aggiungendo 3 µL a dischetti di 5 mm e 10 mm di diametro.
È emerso che, mentre per gli OE puri il diametro dell'alone di inibizione risulta leggermente maggiore se viene utilizzato il dischetto da 10 mm, per le diluizioni al 75% e al 50 % v/v la differenza di diametro può essere considerata trascurabile.
Questi risultati fanno pensare al fatto che l'inibizione della crescita batterica possa dipendere esclusivamente dalla quantità di OE che, a prescindere dalla dimensione del dischetto, vaporizza e definisce la concentrazione nello spazio di testa sopra i microrganismi.

Infine, si sono confrontati i risultati ottenuti con il *metodo di diffusione su agar* e con il metodo di *volatilizzazione dal disco* per valutare quale delle due applicazioni, gli OE in fase liquida o gli OE in fase vapore, fosse più efficace nell'inibire la crescita microbica di *S. epidermidis*.
Gli esiti hanno mostrato una inibizione maggiore quando è stato utilizzato il *metodo di diffusione su agar*, cioè quando l'OE era a diretto contatto con il batterio; si è osservata un'eccezione per gli OE diluiti al 50%.
Questi risultati possono essere spiegati dal fatto che, nei test a contatto, l'effetto inibitorio degli OE è dovuto sia alla fase liquida a diretto contatto con il batterio che ai vapori degli OE volatilizzati nello spazio di testa della piastra di Petri; di conseguenza l'alone di inibizione risulta più esteso.
In particolare, i diametri ottenuti dalle prove di volatilizzazione sono circa la metà di quelli ottenuti dalle prove di diffusione solida; ciò sembrerebbe indicare che con il *metodo di diffusione su agar* l'azione antibatterica è dovuta per metà all'azione degli OE in fase liquida che diffondono sullo strato di agar e per metà all'azione dei vapori di OE.

5 Bibliografia

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

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S. K., 2015, Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **6**, 71-79

Bismarck D., Dusold A., Heusinger A., Müller E., 2019, Antifungal in vitro activity of essential oils against clinical isolates of Malassezia pachydermatis from canine ears: a report from a practice laboratory, *Complementary Medicine Research*, **27**, 1-12

Bozin B., Mimica-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**, 1822-1828

Bueno J., 2015, Models of evaluation of antimicrobial activity of essential oils in vapour phase: a promising use in healthcare decontamination, *Natural Volatiles and Essential Oils,* **2**, 16-29

Burt S. A., Reinders R. D., 2003, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 162-167

Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308–316

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

Herman R. A., Ayepa E., Shittu S., Fometu S. S., Wang J., 2019, Essential oils and their applications -a mini review, *Advances in Nutrition and Food science*, **4**, 1-13

Holley R.A., Patel D., 2005, Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, *Food Microbiology,* **22**, 273–292

Kalemba D., Kunicka A., 2003, Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 813-829

Laird K., Phillips C., 2011, Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?, *Letters in Applied Microbiology*, **54**, 169-174

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C., 2005, Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6939-6946

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C., 2007, Vapor-phase activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 4348−4356

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**, 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

Nedorostova L., Kloucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkrabek J., 2008, Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria, *Food Control*, **20**, 157–160

Raut J. S., Karuppayil S. M., 2014, A status review on the medicinal properties of essential oils, *Industrial Crops and Products*, **62**, 250-264

Sitarek P., Rijo P., Garcia C., Skała E., Kalemba D., et al., 2016, Antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, and antiproliferative properties of essential oils from hairy and normal roots of Leonurus sibiricus L. and their chemical composition, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2017**, 1-12

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

Silva N., Alves S., Gonçalves A., Amaral J. S., Poeta P., 2012, Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria, *Food Science and Technology International,* **0**, 1-8

Stratakos A., Koidis A., 2015, Methods for extracting essential oils, *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety,* **2016**, 31-38

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**, 1544-1550

ISS, Istituto Superiore di Sanità, 2015, Oli essenziali per la salute dell'uomo e la salvaguardia dell'ambiente

Ringraziamenti

Questo lavoro di Tesi conclude un percorso di studi di cinque anni che mi ha reso la persona che sono oggi.

Ringrazio i relatori, Davide Fissore e Francesca Bosco, per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto di Tesi, per la loro disponibilità e i loro insegnamenti.
Ringrazio la dottoressa Chiara Mollea per avermi accompagnato durante questi mesi di approccio alle pratiche di laboratorio, per la sua gentilezza e i suoi insegnamenti.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, ai miei genitori che mi hanno permesso di scegliere da sola il percorso da seguire standomi sempre accanto, supportandomi e sopportandomi e alle mie sorelle Erika e Marta e a mio fratello Davide senza i quali non avrei potuto dare sfogo alla mia pazzia.

Ringrazio Stefano per essermi stato accanto fin dall'inizio di questo percorso, per avermi incoraggiata e amata; spero che continueremo a camminare fianco a fianco.

Ringrazio Sara e Alisia per i momenti trascorsi insieme a Torino, tra lezioni condivise, pranzi sul prato e per l'amicizia che ci unisce.
Ringrazio Ambra per i momenti insieme, per la sua disponibilità nell'aiutarmi ogni volta che ho avuto bisogno e tutti i compagni di corso con cui ho potuto confrontarmi durante questi anni.

Ringrazio Francesca che in questi due anni particolari mi è stata vicina in campo e fuori.

Ringrazio tutti gli altri membri della famiglia, nonni, cugini e zii per essere stati sempre presenti.