



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Scienze Chimiche
per la Conservazione e il Restauro

Tesi di laurea

Analisi dell'attività antimicotica di oli essenziali selezionati per la conservazione dei Beni Culturali

Laureanda
Eleonora Bresolin
Matricola 842266

Relatrice

Ch.ma Prof.ssa Sabrina Manente

Correlatori

Ch. Prof. Renzo Ganzerla

Ch. Dr. Matteo Bertoldini

Anno Accademico

2019 / 2020

INDICE

LEGENDA	5
OBIETTIVO DELLA TESI	6
1. INTRODUZIONE	7
1.1. OLI ESSENZIALI	7
1.1.1. <i>INTRODUZIONE</i>	7
1.1.2. <i>PRODUZIONE DEI METABOLITI SECONDARI E DEGLI OLI ESSENZIALI</i>	7
1.1.2.1. <i>PRINCIPI ATTIVI DERIVATI DALLA VIA DELL'ACIDO SHIKIMICO</i>	8
1.1.2.2. <i>PRINCIPI ATTIVI DI DERIVAZIONE TERPENICA</i>	11
1.1.2.2.1. <i>Emiterpenoidi</i>	13
1.1.2.2.2. <i>Monoterpenoidi</i>	13
1.1.2.2.3. <i>Sesquiterpenoidi</i>	15
1.1.2.3. <i>ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E MODALITÀ D'AZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI</i>	17
1.1.2.3.1. <i>Grado di lipofilia e di ripartizione della molecola</i>	17
1.1.2.3.2. <i>Gruppi funzionali</i>	19
1.1.2.3.3. <i>Interazione tra i principi attivi degli oli essenziali</i>	23
1.1.3. <i>VARIABILITÀ CHIMICA DEI METABOLITI SECONDARI E DEGLI OLI ESSENZIALI</i>	24
1.1.3.1. <i>VARIABILITÀ GENETICA O ENDOGENA</i>	24
1.1.3.2. <i>VARIABILITÀ AMBIENTALE O ECOLOGICA</i>	25
1.1.3.3. <i>FATTORI ARTIFICIALI</i>	27
1.1.4. <i>OLI ESSENZIALI PER LA CONSERVAZIONE DEI BENI CULTURALI</i>	28
1.2. FUNGHI	30
1.2.1. <i>INTRODUZIONE</i>	30
1.2.2. <i>STRUTTURA CELLULARE</i>	31
1.2.2.1. <i>PARETE</i>	31
1.2.2.2. <i>MEMBRANA PLASMATICA</i>	32
1.2.2.3. <i>CITOPLASMA E I SUOI ORGANULI</i>	34
1.2.3. <i>ASCOMICETI</i>	36
1.2.4. <i>I FUNGHI QUALI BIODETERIOGENI NEI BENI CULTURALI</i>	38
1.2.4.1. <i>FATTORI CHE INFLUENZANO L'ATTACCO MICROBIOLOGICO</i>	40
1.2.4.2. <i>COLONIZZAZIONE DEL SUBSTRATO E MECCANISMI DI DANNO</i>	43
2. STRUMENTI, TECNICHE E MATERIALI	45
2.1. DIPINTO IN ESAME	45
2.2. OLI ESSENZIALI IN ESAME	47
2.3. FUNGHI IN ESAME	52
2.4. GC-MS	54
2.5. ANTIBIOGRAMMA E STRISCIO	55
2.6. MICROSCOPIA	57
2.7. DIFFUSIONE DELL'OLIO ESSENZIALE IN FASE VAPORE SUL BENE CULTURALE	58
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	59
3.1. GC-MS	59
3.2. TEST DI CRESCITA FUNGINA IN PRESENZA DEGLI OLI ESSENZIALI: ANTIBIOGRAMMA E STRISCIO	77
3.2.1. <i>OLIO ESSENZIALE DI TIMO</i>	77
3.2.2. <i>OLIO ESSENZIALE DI CHIODI DI GAROFANO</i>	82
3.2.3. <i>OLIO ESSENZIALE DI BASILICO</i>	88
3.2.4. <i>OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO</i>	98
3.2.5. <i>OLIO ESSENZIALE DI LAVANDA</i>	107
3.2.6. <i>OLIO ESSENZIALE DI MANDARINO</i>	116
3.2.7. <i>OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO</i>	125
3.2.8. <i>OLIO ESSENZIALE DI TEA TREE</i>	133

3.2.9. DISCUSSIONE GENERALE SUI TEST AB E SUI TEST S.....	142
3.3. MICROSCOPIA	148
3.3.3. OLIO ESSENZIALE DI BASILICO	148
3.3.4. OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO	149
3.3.5. OLIO ESSENZIALE DI LAVANDA.....	150
3.3.6. OLIO ESSENZIALE DI MANDARINO	151
3.3.7. OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO.....	151
3.3.8. OLIO ESSENZIALE DI TEA TREE.....	152
3.3.9 DISCUSSIONE GENERALE DELLE ANALISI MICROSCOPICHE.....	153
3.4. DIFFUSIONE DELL'OLIO ESSENZIALE IN FASE VAPORE SUL BENE CULTURALE	154
4. CONCLUSIONI.....	156
5. RINGRAZIAMENTI	158
6. BIBLIOGRAFIA.....	159
7. ALLEGATI.....	168
ALLEGATO 7.1. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI TIMO.....	168
ALLEGATO 7.2. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI CHIODI DI GAROFANO	172
ALLEGATO 7.3. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI BASILICO	176
ALLEGATO 7.4. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO.....	180
ALLEGATO 7.5. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI LAVANDA	184
ALLEGATO 7.6. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI MANDARINO	188
ALLEGATO 7.7. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO.....	192
ALLEGATO 7.8. PROGRESSIONE DELLA CRESCITA MICOTICA DI <i>A. ALTERNATA</i> , <i>C. CLADOSPORIOIDES</i> , <i>PENICILLIUM SP.</i> E <i>S. CEREVISIAE</i> TRATTATI CON OLIO ESSENZIALE DI TEA TREE	196

LEGENDA

I campioni utilizzati in questa ricerca utilizzano la seguente nomenclatura:

- INIZIALE DEL NOME E DEL COGNOME DELL'ESECUTORE
- TERRENO DI COLTURA
- OLIO ESSENZIALE UTILIZZATO SEGUITO DAL NUMERO DI PROVA (1 o 2)
- MICRORGANISMO UTILIZZATO
- METODO (AB O S)

Ad esempio: EB_SAB-CL_TIMO1_ALT_AB

Per i campioni di controllo, la nomenclatura è la seguente:

- INIZIALE DEL NOME E DEL COGNOME DELL'ESECUTORE
- TERRENO DI COLTURA
- MICRORGANISMO UTILIZZATO
- METODO (AB O S)
- BIANCO

Ad esempio: EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO

Di seguito verranno esplicitate tutte le sigle utilizzate:

EB = Eleonora Bresolin

SAB-CL= Sabouraud-glucosio con cloramfenicolo

TIMO= Olio essenziale di timo

CHIODI= Olio essenziale di chiodi di garofano

BASIL= Olio essenziale di basilico

BERG= Olio essenziale di bergamotto

LAV= Olio essenziale di lavanda

MAND= Olio essenziale di mandarino

ROSM= Olio essenziale di rosmarino

TEE= Olio essenziale di tea tree

ALT= *Alternaria alternata*

CLA= *Cladosporium cladosporioides*

PEN= *Penicillium sp.*

SAC= *Saccharomyces cerevisiae*

AB= Antibiogramma con inoculo del micelio

S= Antibiogramma con striscio delle spore fungine

OBIETTIVO DELLA TESI

I Beni Culturali sono artefatti preziosissimi che hanno il compito di tramandare la cultura, la storia e/o l'idea di Arte di un popolo attraverso i secoli. Per quanto il loro scopo sia nobile, sono comunque oggetti e perciò non immuni al degrado provocato dal passare del tempo, dall'usura e dalla colonizzazione degli agenti (micro)biologici. Muffe e Batteri non si curano dei profondi significati che noi attribuiamo ai singoli manufatti e li utilizzano semplicemente come substrati per vivere e riprodursi.

La maggior parte dei prodotti a cui si fa riferimento per prevenire e disinfestare questi pericolosi attacchi, rientrano in quella classe di composti chimici sintetici (ad esempio il benzalconio cloruro) che, spesso, oltre ad avere la tanto ricercata azione antimicrobica, risultano essere pericolosi sia per l'operatore, sia per l'ambiente che per l'opera stessa.

Fortunatamente, negli ultimi anni la ricerca sta dando spazio a prodotti sempre meno inquinanti e a bassa tossicità sia per l'uomo che per l'ambiente, applicabili anche nel campo della conservazione e del restauro dei Beni Culturali.

In questa prospettiva ecosostenibile, sono stati scelti come possibili sostituti ai prodotti tradizionali alcuni oli essenziali ricavati da piante già conosciute per le loro proprietà antimicrobiche in ambito terapeutico e cosmetico, e quindi possibilmente applicabili anche in ambito preventivo, restaurativo e conservativo del Bene Culturale.

Per questa ragione sono stati selezionati alcuni oli essenziali (timo, chiodi di garofano, basilico, rosmarino, bergamotto, mandarino, lavanda e tea tree) per indagare *in vitro* i loro effetti antimicotici su una selezione di funghi molto comuni negli ambienti museali e archivistici, ma anche delle comuni abitazioni: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *Saccharomyces cerevisiae*.

In prima istanza questo lavoro di tesi si prefigge, quindi, di rispondere a diversi quesiti:

- Tutti gli oli essenziali analizzati svolgono realmente un'azione antimicotica? In particolare, quali tra quelli presi in esame potrebbero essere un'alternativa valida ai prodotti tradizionali in ambito preventivo per i Beni Culturali?
- Quali sono i principi attivi che costituiscono i suddetti oli essenziali e quali sono i loro meccanismi d'azione in base alla specie esaminata? Il loro effetto è maggiormente biocida o biostatico?
- Le composizioni degli oli essenziali che vengono riscontrate nei diversi studi presenti in letteratura risultano conformi tra loro e con i risultati di questa ricerca? Oppure la loro variabilità rientra in un ampio range? Nel caso fossero variabili, quali sono i fattori che influenzano tale variabilità? La riproducibilità e la ripetibilità di un metodo potrebbero risultare compromesse a causa di questi fattori?
- L'efficacia di un trattamento preliminare con oli essenziali avrà un effetto più o meno prolungato nel tempo?

La seconda fase della ricerca prevede l'utilizzo pratico dei suddetti oli essenziali su un Bene Culturale reale, con il doppio fine di stabilire come meglio applicare tali prodotti ad oggetti molto spesso delicati e fragili, oltre a concretarne la loro reale efficacia.

1. INTRODUZIONE

1.1. OLI ESSENZIALI

1.1.1. INTRODUZIONE

Gli oli essenziali sono una miscela complessa di sostanze organiche, estratta da piante o alberi aromatici attraverso distillazione in corrente di vapore o altri metodi estrattivi.

Naturalmente non sono da confondere con le *essenze*, che sono definibili come miscele complesse di sostanze organiche secrete da piante o alberi aromatici: l'origine è la stessa ma le trasformazioni chimiche che avvengono durante il processo di estrazione modificano inesorabilmente sia la composizione chimica che la concentrazione di principi attivi contenuti nelle essenze e le trasforma in prodotti nuovi, detti, appunto, *oli essenziali* (A. Camporese, 1998).

La quantità di olio essenziale che si può estrarre da una pianta è piuttosto limitata: costituisce, infatti, circa l'1% del peso umido complessivo del vegetale (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

Gli oli essenziali, a temperatura ambiente, sono liquidi, la colorazione varia dall'incolore ad un leggero giallo-arancio, ma possono presentare una colorazione verde-blu se contengono composti azulenici. Sono sostanze volatili e, in base alle diverse composizioni chimiche, assumono differenti sapori e odori aromatici (A. Camporese, 1998). Data la loro natura idrofila sono poco solubili in acqua, ma sono invece solubili nei lipidi, in alcol e in solventi organici (M. Valussi, 2005).

1.1.2. PRODUZIONE DEI METABOLITI SECONDARI E DEGLI OLI ESSENZIALI

Le essenze, e di conseguenza gli oli essenziali, sono costituiti da sostanze prodotte dal metabolismo secondario della specie vegetale.

I *metaboliti primari* sono quei composti che si possono trovare universalmente in ogni pianta e che svolgono un ruolo essenziale per la sua crescita, sviluppo e, in generale, per la sua sopravvivenza. Si distinguono in quattro sottogruppi: proteine, carboidrati, acidi nucleici e lipidi (I. Morelli e altri, 2005; C. Sell, 2010).

I *metaboliti secondari* sono, invece, quei composti non indispensabili per la sopravvivenza della pianta. Non sono presenti in ogni organismo vegetale e differiscono da specie a specie. La loro produzione è molto più limitata rispetto ai metaboliti primari e tendono ad essere sintetizzati da particolari cellule specializzate, oltre che dipendere dallo stato di sviluppo della pianta stessa, dipendentemente anche dalla locospecificità ambientale e climatica (I. Morelli e altri, 2005).

Anche se non indispensabili, il ruolo dei metaboliti secondari risulta comunque importante; essi possono, infatti, avere una funzione fondamentale nelle seguenti attività (M. Michelozzi, 2015):

- attrarre gli insetti impollinatori;
- fungere da adattatori chimici in particolari condizioni di stress (ad esempio, la produzione di isoprene aumenta in risposta a stress termici o per carenza di acqua; nel primo caso la sostanza aiuterebbe a stabilizzare la membrana dei cloroplasti, nel secondo avrebbe un'azione antiossidante verso le *Reactive Oxygen Species*);
- difesa contro microrganismi, insetti, funghi, erbivori e predatori in generale;
- difesa contro le altre piante producendo un effetto allelopatico, con lo scopo di limitare la germinazione dei semi ed inibire la crescita non solo delle specie estranee, ma anche della stessa.

Come precedentemente accennato, i metaboliti secondari che costituiscono le essenze vengono prodotti ed immagazzinati in cellule specializzate, chiamate idioblasti. Le modalità di secrezione verso l'esterno dei metaboliti secondari sono molteplici: in modo attivo o passivo, attraverso dotti, cavità intercellulari o direttamente verso la superficie (M. Valussi, 2005). Le strutture secretorie deputate a tale processo, che spesso si caratterizzano in base alla famiglia di pianta, si possono riassumere nelle seguenti tipologie (C. Frank e J. Novak, 2010):

- *idioblasti secretori*, cellule individuali che producono essenze in grande quantità e le accumulano al loro interno, come ad esempio nel khus (*Vetiveria zizanioides*), ma anche tipiche in *Rosa sp.*, *Viola sp.* o *Jasminum sp.*;
- *cavità o dotti*: spazio di accumulo extracellulare che possono avere due origini differenti: da un processo di schizogenia (spazio intercellulare che si forma dalla successiva dissoluzione della lamella mediale tra le cellule) o di isogenia (spazio intercellulare che si forma a seguito della morte e dissoluzione cellulare programmata). In entrambi i casi, le cellule periferiche vengono stimulate nella produzione di essenze o resine che vengono sprigionate all'interno della cavità extracellulare. Esempi di questa casistica si rintracciano nella famiglia delle Apiaceae (sedano, cumino, finocchio), delle Pinaceae (pino, abete⁹, delle Rutaceae (*Citrus sp.*) e delle Myrtaceae (chiodi di garofano e tea tree);
- *tricomi secretori o ghiandolari*: escrescenze o appendici che accumulano le secrezioni in uno spazio sottocutaneo, che si possono ritrovare nelle Laminaceae (timo e rosmarino).

In base alla struttura di immagazzinamento utilizzata dalla specie vegetale, le essenze si accumulano in parti differenti della pianta, oltre a sviluppare una differente composizione chimica. Alcune specie, come le Conifere, possono accumulare le essenze in ogni loro tessuto, mentre altre specie sono limitate a una o poche più zone particolari; ad esempio, le rose accumulano le essenze solo nei petali, mentre l'arancio amaro le accumula nei fiori, nelle foglie e nelle scorze (M. Valussi, 2005). È importante da sottolineare che, per quanto facciano parte dello stesso organismo, gli oli essenziali estratti da parti differenti della stessa pianta possono avere composizioni e caratteristiche chimiche completamente differenti (A. Camporese, 1998).

Le parti delle piante dove si accumulano maggiormente gli oli essenziali sono le seguenti (A. Camporese, 1998; M. Valussi, 2005):

- sommità fiorite (es. lavanda, rosmarino, timo);
- foglie (es. eucalipto, menta peperita);
- frutti (es. anice, ginepro, finocchio);
- semi (es. finocchio);
- scorza dei frutti (es. arancio, bergamotto, limone);
- radici e rizomi (es. iris, zenzero, curcuma);
- bulbi (es. aglio);
- corteccia (es. cannella);
- legno (es. canfora, sandalo, cedro);
- rami (es. cardamomo, noce moscata);
- steli (es. menta, garofano);
- rametti (es. pino, abete rosso, abete bianco);
- resina (es. mirra, incenso).

I costituenti degli oli essenziali rientrano nelle più svariate classi chimiche, ma le principali possono essere considerate i terpeni e i terpenoidi, seguiti dagli shikimati (C. Sell, 2010). Gli altri componenti, come i fenilpropanoidi, i polichetidi e derivati organici idrocarburici contenenti azoto e zolfo, compaiono meno frequentemente e spesso in proporzioni minori (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

I costituenti degli oli essenziali sono comunque accumulati tra loro dalla natura idrocarburica, dal basso peso molecolare e dall'insolubilità in acqua (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

Nei prossimi capitoli verranno illustrati i maggiori costituenti degli oli essenziali in base alla loro derivazione metabolica: i prodotti shikimati, i prodotti terpenici e terpenoidi.

1.1.2.1. PRINCIPI ATTIVI DERIVATI DALLA VIA DELL'ACIDO SHIKIMICO

La via dell'acido shikimico avviene esclusivamente nei microrganismi e nelle piante. L'acido shikimico è il principale precursore della sintesi di importanti molecole per la pianta, in particolare

aminoacidi aromatici (fenilalanine, tirosine e triptofano) e composti fenolici, come flavonoidi, tannini e lignina (C. Sell, 2010; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

Le piante, attraverso la fotosintesi, convertono il diossido di carbonio e l'acqua in glucosio. Mediante la glicolisi si forma il composto chiave per la biosintesi sia degli shikimati che dei terpeni: il fosfoenolpiruvato [Fig.1].

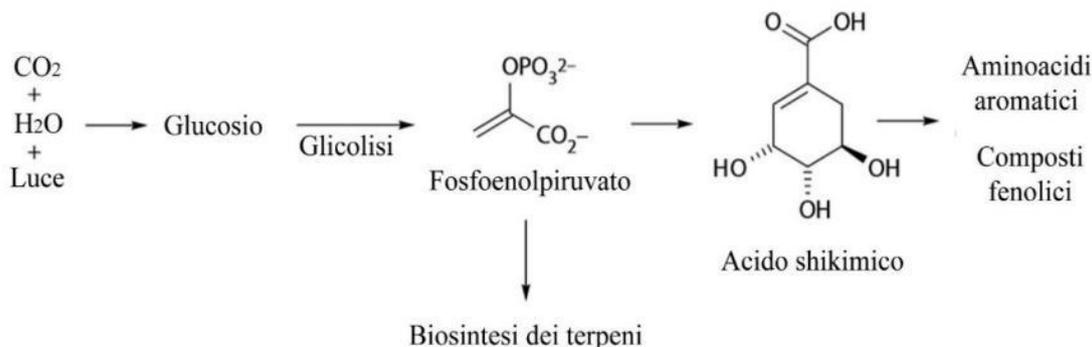


Figura 1: Produzione di acido shikimico dal fosfoenolpiruvato di derivazione glicoliscica.

Il fosfoenolpiruvato, reagendo inizialmente con una molecola di eritroso-4-fosfato, produce una molecola di acido shikimico mediante i seguenti passaggi [Fig.2]:

- 1) il fosfoenolpiruvato reagisce con l'eritroso-4-fosfato producendo una molecola di 3-deossi-7-fosfoeptulonato (DAHP). La reazione è catalizzata dall'enzima DAHP-sintasi e avviene con utilizzo di una molecola di acqua e liberazione di PO_4^{3-}
- 2) il DAHP viene convertito in acido 3-deidrochinico
- 3) l'acido 3-deidrochinico si condensa in una molecola di 3-deidroshikimato
- 4) il 3-deidroshikimato si riduce in acido shikimico utilizzando una molecola di NADPH.

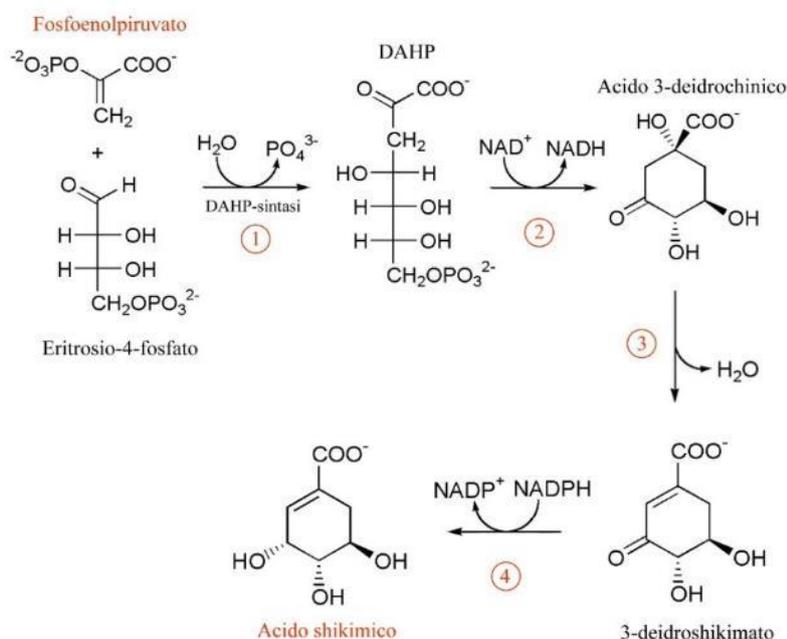


Figura 2: Reazioni per la produzione dell'acido shikimico dal fosfoenolpiruvato.

Dall'acido shikimico si hanno una serie di reazioni chimiche che portano alla formazione di intermediari biosintetici i quali possono essere precursori di ulteriori molecole che determinano la

differenti composizione chimica dell'olio essenziale. Questi prodotti, infatti, non sono uguali in tutte le piante e dipendono dal corredo genetico della pianta stessa (C. Sell, 2010).

Nell'immagine [Fig.3] sono riportati gli intermediari shikimici che influiscono maggiormente sulla composizione degli oli essenziali.

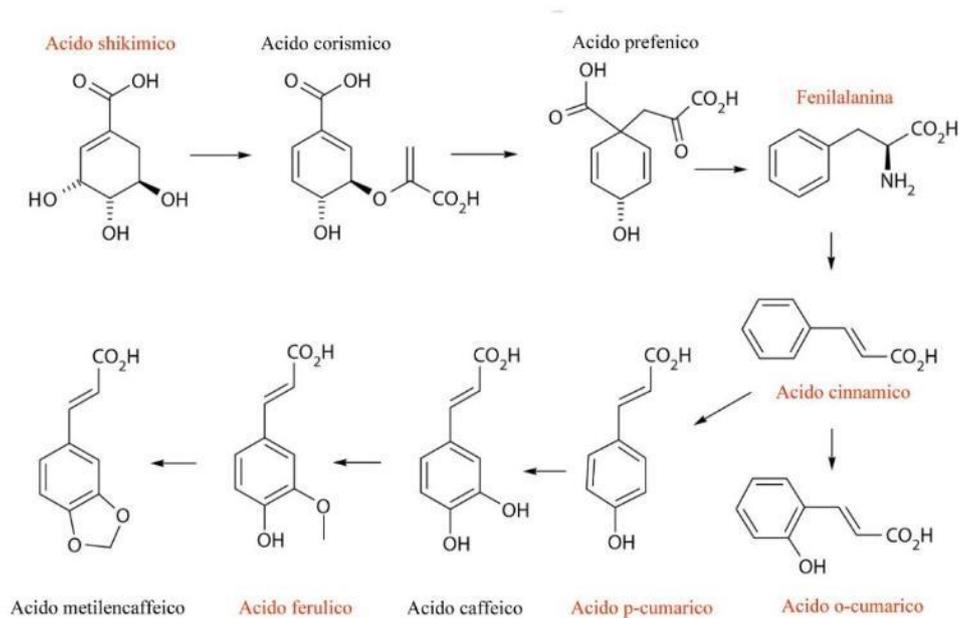
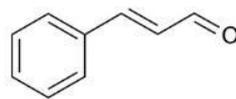


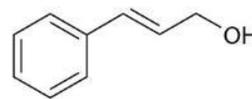
Figura 3: Intermediari shikimici importanti per le essenze e gli oli essenziali.

I principi attivi più importanti che costituiscono gli oli essenziali e che derivano da questa via metabolica sono (C. Sell, 2010):

- l'acido cinnamico e i suoi derivati: cinnamaldeide (contenuta nell'olio essenziale di cannella e cassia) e alcol cinnamico (es. oli essenziali di narciso e giglio);

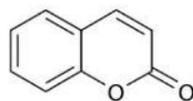


Cinnamaldeide

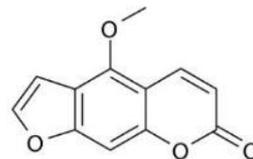


Alcol cinnamico

- i derivati dell'acido *o*-cumarico: cumarina (contenuta nell'olio essenziale di lavanda) e bergaptene (contenuto nell'olio essenziale di bergamotto e lime);

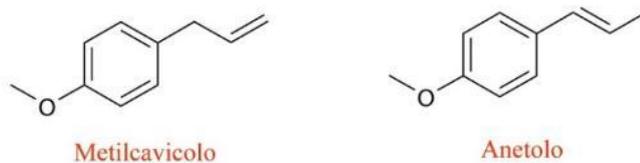


Cumarina

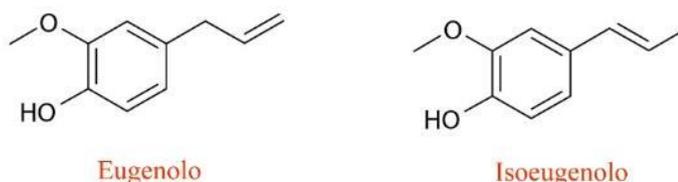


Bergaptene

- i derivati dell'acido *p*-cumarico: estragole formato da metilcavicol e anetolo (contenuti nell'olio essenziale di basilico, salvia, anice e rosmarino);



- i derivati dell'acido ferulico: eugenolo (contenuto nell'olio essenziale di chiodi di garofano, cannella, basilico e rosa) e isoeugenolo (contenuto nell'olio essenziale di basilico, cassia e chiodi di garofano).



1.1.2.2. PRINCIPI ATTIVI DI DERIVAZIONE TERPENICA

I terpeni e i loro derivati ossigenati, detti terpenoidi, sono il gruppo di sostanze naturali più ampio che si può riscontrare nella composizione degli oli essenziali. Tradizionalmente, vengono definiti come composti formati da unità isopreniche, anche se l'isoprene non è un intermediario della loro biosintesi ma l'unità base della loro struttura (C. Sell, 2010; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011). La struttura dei terpeni è data dall'accoppiamento di unità isopreniche, soprattutto di tipo testa-coda; più raramente di tipo coda-coda, testa-testa o testa-mezzo della molecola (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

I terpeni vengono classificati proprio mediante il numero di unità isopreniche da cui sono composti:

- Emiterpeni – 1 unità isoprenica (C5)
- Monoterpeni – 2 unità isopreniche (C10)
- Sesquiterpeni – 3 unità isopreniche (C15)
- Diterpeni – 4 unità isopreniche (C20)
- Sesteterpeni – 5 unità isopreniche (C25)
- Triterpeni – 6 unità isopreniche (C30)
- Tetraterpeni o carotenoidi – 7 unità isopreniche (C40)

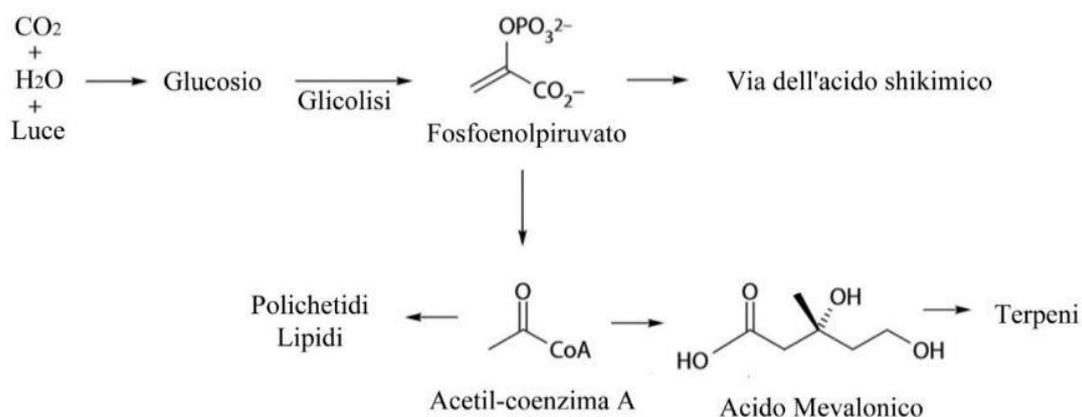


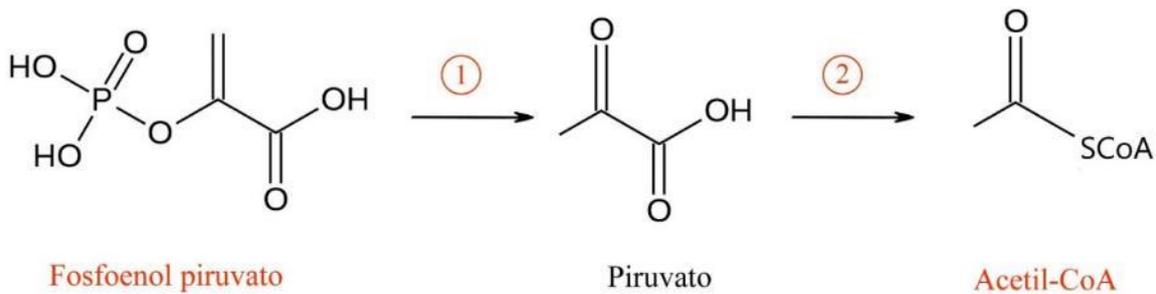
Figura 4: Produzione di acido mevalonico dal fosfoenolpiruvato di derivazione glicolisi.

Come per i composti shikimati, la biosintesi dei terpeni proviene anch'essa dalla glicolisi del glucosio. Il fosfoenolpiruvato, un intermediario chiave della glicolisi, può prendere parte sia alla via

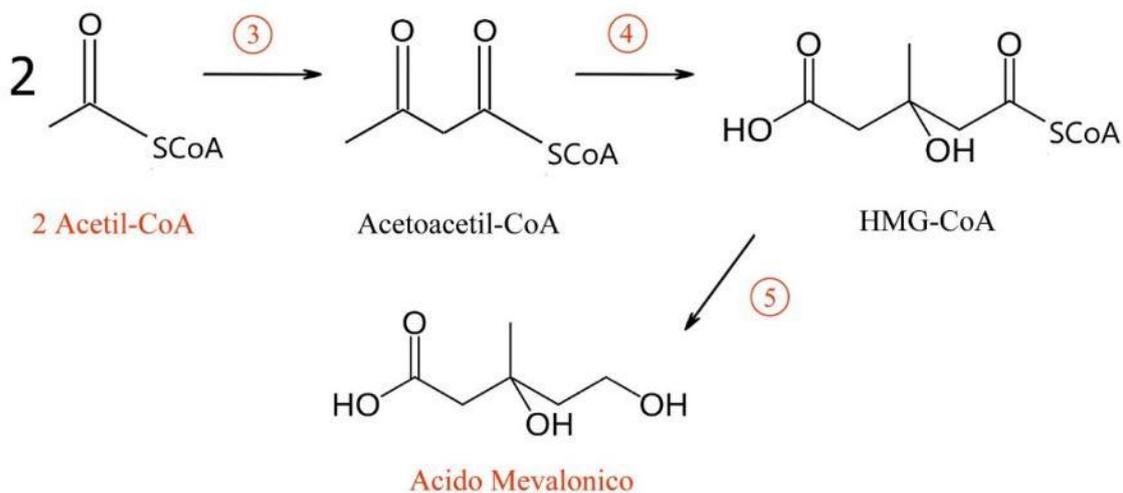
dell'acido shikimico descritta nel paragrafo 2.1.2.1., sia alla via dell'acido mevalonico per dare origine ai prodotti terpenici [Fig.4].

Le reazioni che avvengono per la formazione dei terpeni da una molecola di fosfoenolpiruvato sono di seguito riportate (C. Sell, 2010):

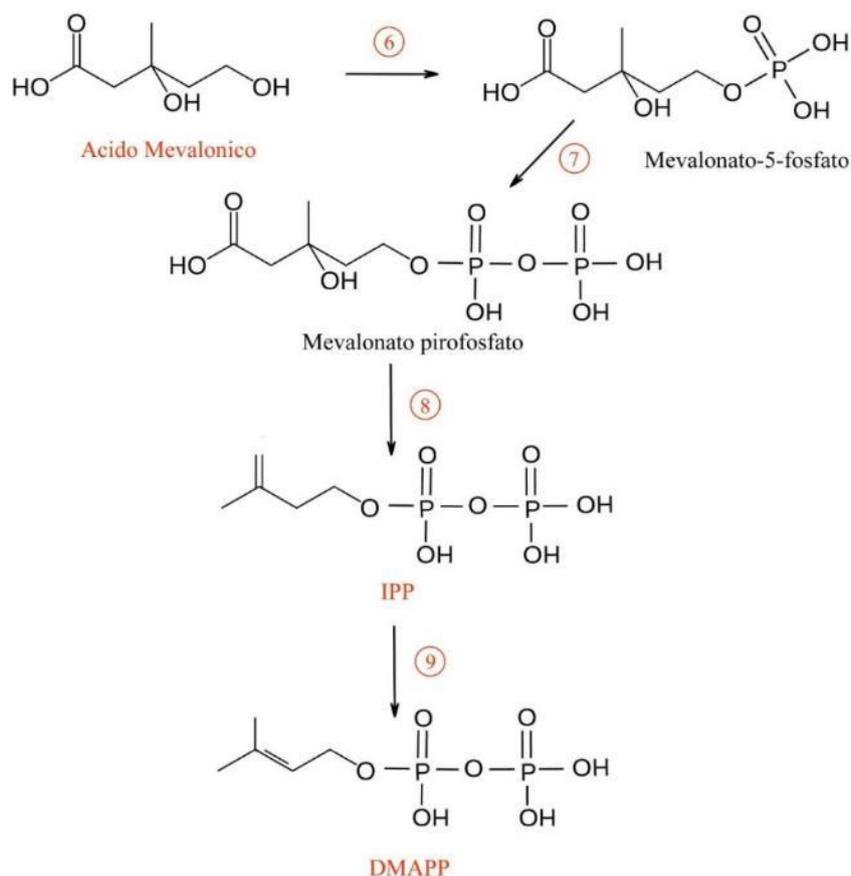
- 1 Inizialmente, il fosfoenolpiruvato trasferisce il suo gruppo fosfato ad una molecola di ADP con la formazione di piruvato. La reazione è catalizzata dall'enzima piruvato chinasi.
- 2 Il piruvato viene poi convertito in Acetil-CoA mediante il complesso enzimatico piruvato deidrogenasi.



- 3 L'unione di due molecole di Acetil-CoA forma l'acetoacetil-CoA con perdita di un gruppo CoA-SH. La reazione è catalizzata dall'enzima tiolasi.
- 4 L'acetoacetil-CoA forma una molecola di 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La reazione è catalizzata dall'enzima HMG-CoA sintetasi.
- 5 La molecola di HMG-CoA si riduce in Acido Mevalonico con perdita del gruppo CoA-SH. La reazione è catalizzata dall'enzima HMG-CoA riduttasi.



- 6 L'acido mevalonico forma una molecola di mevalonato-5-fosfato. La reazione utilizza una molecola di ATP ed è catalizzata dall'enzima mevalonato chinasi.
- 7 Il mevalonato-5-fosfato forma una molecola di mevalonato-pirofosfato. La reazione utilizza una molecola di ATP ed è catalizzata dall'enzima fosfomevalonato chinasi.
- 8 La decarbossilazione del mevalonatiropirofosfato forma una molecola di isopentil-5-pirofosfato (IPP). La reazione è catalizzata dall'enzima mevalonato-5-pirofosfato decarbossilasi.
- 9 L'IPP forma il suo isomero, il dimetilallilpirofosfato (DMAPP). La reazione è catalizzata dall'enzima isopentilpirofosfato isomerasi.



Le molecole di isopentil-5-pirofosfato (IPP) e dimetilallilpirofosfato (DMAPP) sono le due molecole chiave per la formazione dei terpeni. Le loro differenti combinazioni di tipo testa-coda producono (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011):

- geranyl difosfato (DMAPP + IPP), il maggior precursore dei monoterpeni;
- farnesil difosfato (DMAPP + 2IPP), il maggior precursore dei sesquiterpeni e dei triterpeni;
- geranylgeranyl difosfato (DMAPP + 3IPP), il maggior precursore dei diterpeni e dei tetraterpeni.

Gli oli essenziali sono composti sostanzialmente da emiterpeni, monoterpeni, sesquiterpeni e i loro derivati ossigenati perché sufficientemente volatili (C. Sell, 2010; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

1.1.2.2.1. Emiterpenoidi

Gli emiterpeni presentano una struttura composta da cinque atomi di carbonio (formula bruta: C_5H_8). Gli emiterpenoidi, quando presenti, sono tutti componenti minori degli oli essenziali. I più comuni sono gli alcoli, le aldeidi e gli esteri del 2-metilbutano, come il prenolo (3-metilbut-2-ene-1-olo) presente nell'olio essenziale di ylang ylang (C. Sell, 2010).

1.1.2.2.2. Monoterpenoidi

I monoterpeni presentano una struttura composta da dieci atomi di carbonio (formula bruta: $C_{10}H_{16}$).

I loro derivati ossigenati derivano tutti dal geranyl pirofosfato [Fig.5] e possono essere sia ciclici che aciclici, regolari o irregolari. I loro derivati includono alcoli, eteri, fenoli, chetoni, lattoni, aldeidi e ossidi (C. Sell, 2010; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

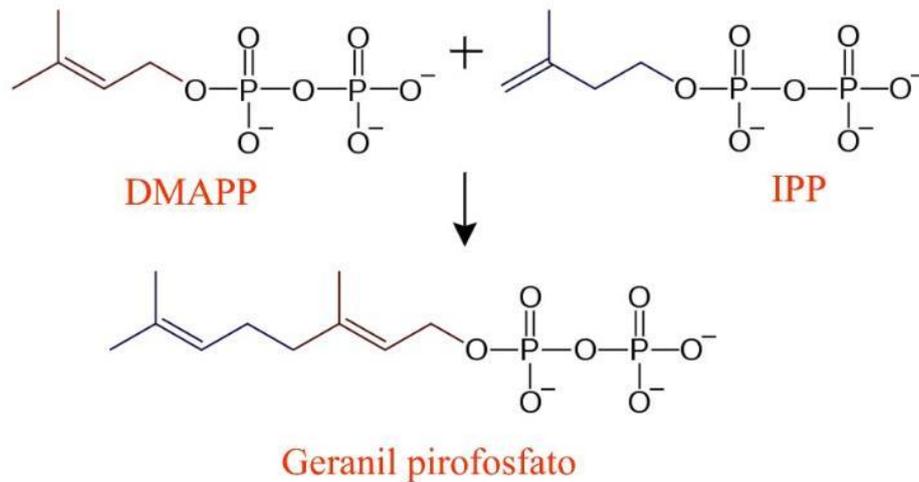
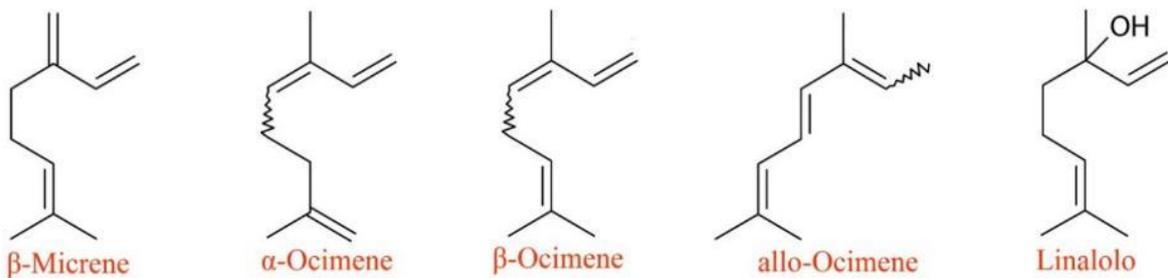


Figura 5: Formazione del geranyl pirofosfato, il precursore dei monoterpeni, da una molecola di DMAPP e una di IPP.

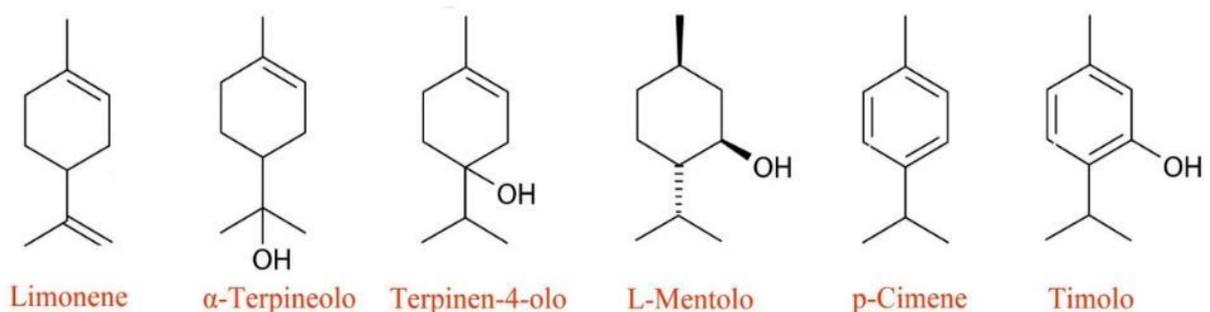
I monoterpeni aciclici più comuni sono:

- β -micrene e i suoi derivati geraniolo e nerolo;
- α -ocimene, β -ocimene, *allo*-ocimene;
- linalolo e il suo acetato (presenti in particolare nell'olio essenziale di lavanda, basilico, bergamotto).



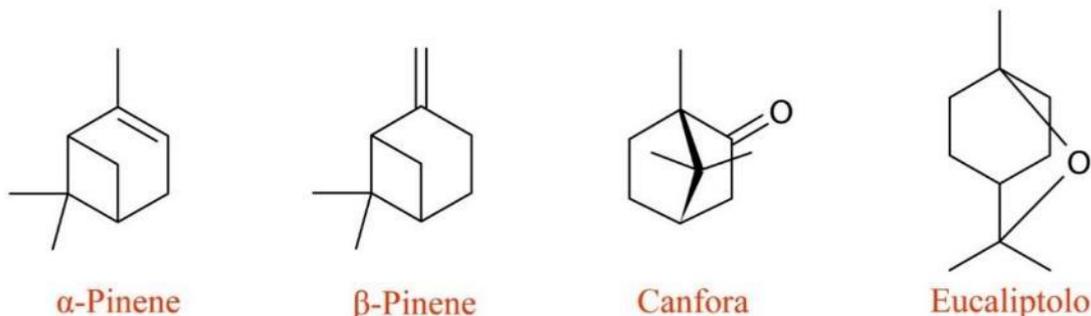
I monoterpeni e i loro sostituiti monociclici rappresentano il gruppo più vasto. I più comuni sono:

- limonene (presente in particolare nell'olio essenziale di limone);
- α -terpineolo;
- terpinen-4-olo (presente in particolare nell'olio essenziale di tea tree; il suo acetato, invece si trova maggiormente nell'olio essenziale di maggiorana e rosmarino);
- L-mentolo (il più comune dei suoi otto stereoisomeri);
- *p*-cimene e i suoi derivati Timolo e carvacolo (presenti in particolare nell'olio essenziale di timo e origano).



I monoterpeni biciclici (ossigenati e non) più comuni sono:

- α -pinene, β -pinene (presenti in particolare nell'olio essenziale di pino);
- canfora (presente in particolare nell'olio essenziale di legno di canfora e nell'olio essenziale di lavanda, salvia e rosmarino);
- eucaliptolo o 1,8-cineolo.



I monoterpeni includono anche molecole tricicliche, ma sono meno frequenti rispetto i mono e biciclici.

1.1.2.2.3. Sesquiterpeni

I sesquiterpeni (formula bruta: $C_{15}H_{16}$) presentano una struttura composta da quindici atomi di carbonio che può essere lineare, ramificata o ciclica (C. Sell, 2010; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

Derivano tutti dal farnesil pirofosfato [Fig.6], il quale può andare incontro a varie reazioni di ciclizzazione, ossidazione, degradazione e riarrangiamento, di numero superiore rispetto al geranil pirofosfato che presenta solamente due doppi legami, a differenza dei tre del farnesil pirofosfato (C. Sell, 2010; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

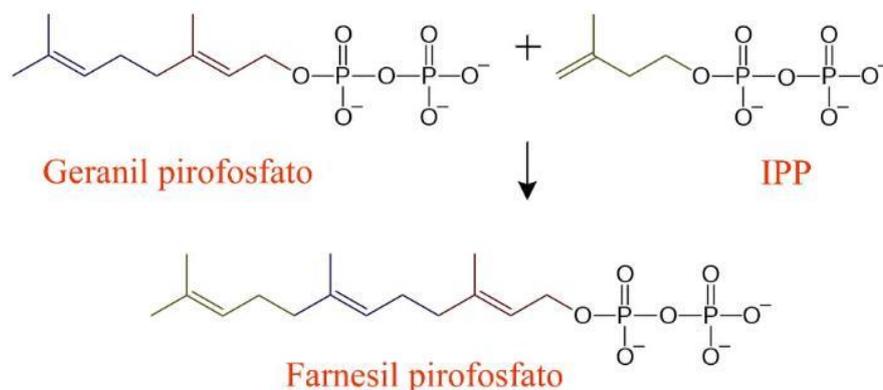
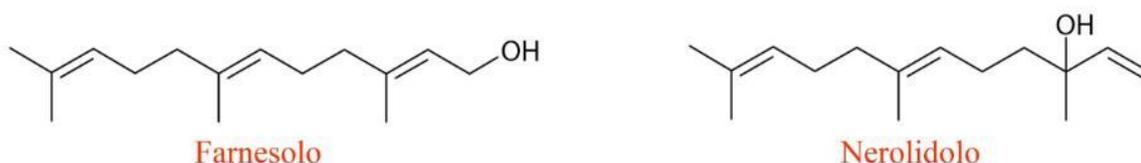


Figura 6: Formazione del farnesil pirofosfato, il precursore dei sesquiterpeni, da una molecola di GPP e una di IPP.

Le molecole sesquiterpeniche presentano una minore volatilità e punti di ebollizione più elevati rispetto a quelle monoterpeniche (C. Sell, 2010).

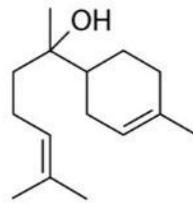
I sesquiterpeni aciclici sono presenti in diversi oli essenziali, in particolare i due isomeri:

- farnesolo (presente in particolare nell'olio essenziale di rosa e di sandalo);
- nerolidolo (presente in particolare nell'olio essenziale di rosa e di sandalo).



I sesquiterpeni monociclici più comuni sono:

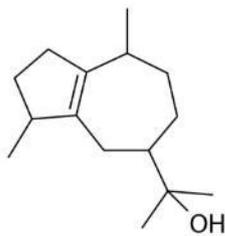
- α -bisabolene ed i suoi derivati ossigenati: α -bisabololo e β -bisabololo (entrambi presenti in alte concentrazioni nell'olio essenziale di camomilla).



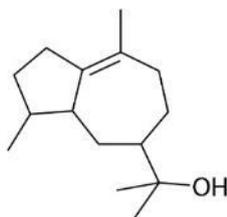
β -Bisabololo

I sesquiterpeni biciclici più comuni sono:

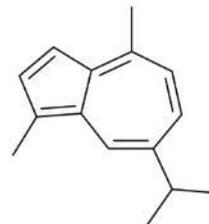
- gualiolo e il suo isomero bulnesolo (ossigenati);
- guaiazulene;
- il gruppo degli azuleni, responsabili del colore blu di alcuni oli essenziali (ad esempio il camazulene presente nell'olio essenziale di camomilla);
- β -cariofillene e α -umulene (presenti in particolare nell'olio essenziale di chiodi di garofano);



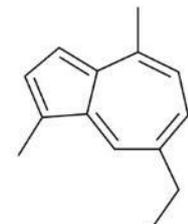
Guaiolo



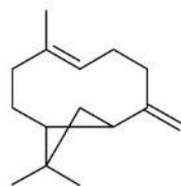
Bulnesolo



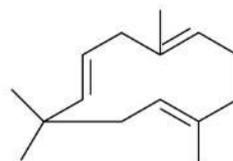
Guaiazulene



Camazulene



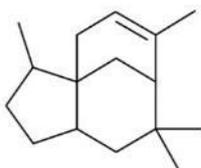
β -Cariofillene



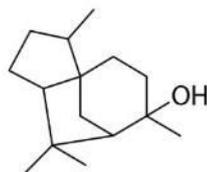
α -Umulene

I sesquiterpeni triciclici più comuni sono:

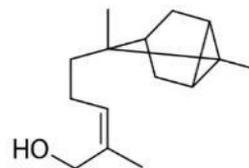
- cedrene e il suo sostituto cedrolo (presenti in particolare nell'olio essenziale di cedro);
- α -santalolo e β -santalolo (sesquiterpenoidi presenti in particolare nell'olio essenziale di sandalo).



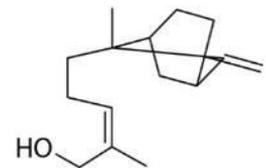
Cedrene



Cedrolo



α -Santalolo



β -Santalolo

1.1.2.3. ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E MODALITÀ D'AZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI

La vasta gamma di principi attivi che compongono gli oli essenziali fa sì che non sia possibile generalizzare la loro attività antimicrobica in un'unica modalità d'azione. I meccanismi sono diversi, spesso avvengono contemporaneamente o sono uno la conseguenza dell'altro, e variano non solo in base alla natura delle molecole, ma anche in base alla cellula su cui agiscono e dall'ambiente extra ed intracellulare (G. McDonnell e A. Denver Russel, 1999; S. Burt, 2004).

Un antimicrobico può, generalmente, attuare diversi meccanismi d'azione che sono associati alla capacità di interagire con la superficie cellulare, arrivando a scompagnarla, ovvero a penetrarla raggiungendo quindi e interagendo con determinati siti target intracellulari (G. McDonnell e A. Denver Russel, 1999).

Le modalità d'azione delle componenti degli oli essenziali dipendono principalmente da due fattori:

- 1) grado di lipofilia e di ripartizione della molecola;
- 2) gruppi funzionali della molecola.

1.1.2.3.1. Grado di lipofilia e di ripartizione della molecola

I principi attivi presenti negli oli essenziali sono accumulati dalla loro natura idrofobica. Questa proprietà dipende da varie caratteristiche fisiche e chimiche della molecola (area superficiale, volume molecolare e polarità) ed influenza le loro proprietà antimicrobiche. Infatti, più una molecola è idrofobica più risulta avere una buona affinità con le molecole di natura lipidica costituenti le membrane cellulari (J. Sikkema e altri, 1995; D. Kalemba e A. Kunicka, 2003; A. Ben Arfa e altri, 2006), che possono essere quindi oltrepassate anche senza un carrier di membrana e senza dispendio energetico, fenomeno detto *diffusione passiva*, il che – in ultima analisi – senza un preciso controllo da parte della cellula.

L'attività antimicrobica risulta essere quindi correlata al coefficiente di ripartizione della molecola, ovvero al grado di lipofilia che essa presenta in forma neutra. Questo parametro è definito come il rapporto tra la concentrazione della sostanza in forma neutra in soluzione organica (convenzionalmente ottanolo) e la concentrazione della sostanza in soluzione acquosa (P.C. Chiang e Y. Hu, 2009):

$$P = \frac{[soluto]_{(o)}}{[soluto]_{(aq)}}$$

Generalmente, si preferisce utilizzare il suo logaritmo decimale: il LogP. Quando il valore di LogP è > 0 , significa che la sostanza è idrofobica, se invece LogP è < 0 è idrofila.

L'effetto tossico di un solvente organico immiscibile in acqua è maggiore quando il valore di LogP si attesta tra 1 e 5 (J. Onken e R.G. Berger, 1999). Questo range compare anche nella "regola di Lipinski", la quale descrive le proprietà che un farmaco deve possedere per attraversare passivamente la membrana cellulare (C.A. Lipinski, 2004). Secondo Lipinski, infatti, una tale molecola deve possedere le seguenti caratteristiche:

- avere un peso molecolare minore di 500 g·mol⁻¹;
- non possedere più di 5 gruppi donatori di legami idrogeno;
- non possedere più di 10 gruppi accettori di legami idrogeno;
- avere un valore di LogP minore di 5 (secondo A. Ben Arfa e colleghi (2006) e J.Chen e colleghi (2016), l'effetto antimicrobico degli oli essenziali è maggiormente efficiente per i principi attivi con un LogP compreso tra 3 e 4)

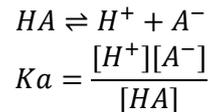
Ciononostante, non tutte le molecole sono neutre nell'ambiente in cui si trovano; in questo caso, bisogna tenere conto del loro comportamento acido-basico (P.C. Chiang e Y. Hu, 2009).

Gli acidi e le basi deboli, se sottoposti a ripartizione tra due solventi non miscibili, devono tenere conto di due equilibri simultanei:

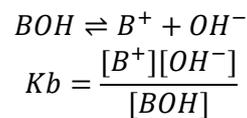
- equilibrio di ripartizione tra la specie neutra in fase acquosa e la specie neutra in fase organica (dipende dal valore di logP);
- equilibrio acido-base nella fase acquosa (dipende dal valore di pKa e dal pH ambientale).

La costante di dissociazione di un acido (K_a) descrive il grado di dissociazione tra la sua base coniugata e un protone, mentre la costante di dissociazione di una base (K_b) descrive il grado di dissociazione tra l'acido coniugato e uno ione idrossido. Più il valore di K_a è basso, più prevale la forma indissociata dell'acido. Corrispondentemente, più il valore di K_b è basso, più prevale la forma indissociata della base.

Per un generico acido HA:



Per una generica base BOH:



La pKa (o pKb) di un composto è definita come il logaritmo negativo del coefficiente di equilibrio tra la forma neutra e quella carica. Tramite questo parametro, si può stabilire il grado di dissociazione delle specie neutre e cariche in una soluzione, ad un determinato valore di pH.

La ripartizione complessiva che risulta dagli equilibri di ripartizione (P) e acido-base (K_a) è espressa come coefficiente di distribuzione (D) che, come per il coefficiente di ripartizione, viene espresso preferenzialmente con il suo logaritmo decimale, il logD (P.C. Chiang e Y. Hu, 2009).

I valori di logP e pKa sono una proprietà intrinseca della molecola, mentre il valore D varia in funzione del pH (P.C. Chiang e Y. Hu, 2009).

Per un acido o una base debole, la ripartizione tra ottanolo ed acqua è così espressa:

$$D = \frac{[Forma\ indissociata]_{(o)}}{[Forma\ indissociata]_{(aq)} + [Forma\ dissociata]_{(aq)}}$$

Il valore di LogD è correlato a quello di LogP e pKa dalla seguente equazione:

$$\text{Log}D_{(pH)} = \text{Log} P - \text{Log} [1 + 10^{(pH-pKa)}] \text{ per gli acidi}$$

$$\text{Log}D_{(pH)} = \text{Log} P - \text{Log} [1 + 10^{(pKa-pH)}] \text{ per le basi}$$

Quando pH = pKa:

$$\text{Log}D_{(pKa)} = \text{Log} P - \text{Log} (1 + 10^0)$$

$$\text{Log}D_{(pKa)} = \text{Log} P - \text{Log} 2$$

$$\text{Log}D_{(pKa)} = \text{Log} P - 0,301$$

La tendenza ad interagire con la superficie cellulare dipende non solo dalle caratteristiche della molecola e dell'ambiente, ma anche dalla composizione chimica della cellula. Infatti, si è riscontrato che i batteri Gram(-) presentano una resistenza maggiore all'azione di agenti tossici lipofili in quanto la loro membrana esterna, ricca di lipopolisaccaridi, è maggiormente idrofila rispetto a quella fosfolipidica dei Gram(+) (D. Kalemba e A. Kunicka, 2003, D. Trombetta e atri, 2005; M. Hyldgaard e altri, 2012).

Anche la presenza di uno strato di rivestimento di origine polisaccaridica, detto capsula, può funzionare come barriera per le sostanze idrofobiche. Si tratta di un rivestimento accessorio presente solo in alcuni batteri, come le specie di *Pseudomonas*, *Staphilococcus*, *Leuconostoc* e *Azotobacter* (M.G. Fiorin, 1993; J. Sikkema e altri, 1995).

Lo stadio di crescita della cellula è un altro fattore che influenza l'efficacia del principio attivo: quando il microrganismo è in stadio vegetativo ha una permeabilità maggiore rispetto al suo stadio latente di quiescenza (essendo di per sé uno *status* di resistenza), risultando quindi più suscettibile all'azione degli oli essenziali (E. Chivandi e altri, 2016).

È necessario che la molecola sia in forma indissociata per passare attraverso la membrana cellulare mediante diffusione passiva. Riassumendo, il grado di dissociazione dei principi attivi di un olio essenziale è un parametro fondamentale ed è influenzato da diversi fattori (J. Sikkema e altri, 1995; P.C. Chiang e Y. Hu, 2009):

- peso molecolare del principio attivo
- logP del principio attivo
- pKa del principio attivo
- condizioni ambientali (pH, temperatura, concentrazione dei sali) extracellulari ed intracellulari
- composizione della superficie cellulare.

I principi attivi che hanno i requisiti sovradescritti sono in grado non solo di passare attraverso le membrane lipidiche, ma anche di interagire con le molecole lipofile presenti nella membrana, come i lipidi associati ad enzimi o le catene aciliche dei fosfolipidi.

Tali molecole si accumulano nella parte centrale del bilayer fosfolipidico delle membrane cellulari e mitocondriali, in corrispondenza delle catene acicliche e idrofile, disturbando l'interazione tra le catene e, alla lunga, sovrasaturando la zona. Questi accumuli portano a cambiamenti nella struttura della membrana: aumentano la sua fluidità e provocano il malfunzionamento delle proteine di membrana e dei rigonfiamenti strutturali. L'eccessiva espansione della membrana aumenta la permeabilità non specifica della cellula con conseguente perdita di integrità e dissipazione della forza proton motrice (J. Sikkema e altri, 1995; J. Onken e R.G. Berger, 1999; S. Burt, 2004; D. Trombetta e altri, 2005; A. Ben Arfa e altri, 2006; J. Chen e altri, 2016), a discapito del *trade-off* della cellula.

1.1.2.3.2. Gruppi funzionali

La presenza di gruppi funzionali differenti nella struttura molecolare può influenzare l'efficacia e il meccanismo d'azione del principio attivo: oli essenziali che contengono una concentrazione di terpenoidi maggiore hanno un'attività antifungale e antibatterica maggiore rispetto a quelli che sono ricchi di monoterpeni e sesquiterpeni (E. Chivandi e altri, 2016).

In base ai gruppi funzionali che caratterizzano il terpenoide, si avranno meccanismi d'azione differenti che influenzeranno la sua efficacia antimicrobica.

I composti con un gruppo funzionale fenolico e aldeidico hanno un'attività antimicrobica maggiore, subito dopo si annoverano alcoli, ossidi ed infine gli idrocarburi terpenici (D. Kalemba e altri, 2003; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011; I.H.N. Bassolé e H.R. Juliani, 2012).

Idrocarburi

Gli idrocarburi terpenici, se applicati singolarmente, non presentano un'attività antimicrobica efficiente. Per quanto la molecola sia affine alla membrana e riesca a diffondersi e inserirsi nel doppio strato fosfolipidico provocando espansioni e rigonfiamenti, non risulta un meccanismo sufficiente per portare alla morte cellulare: per quanto la membrana venga danneggiata ed il suo potenziale elettrico modificato, la perturbazione provocata è solo parziale e la cellula riesce comunque a sopravvivere.

Nella ricerca effettuata da E. Chivandi e colleghi (2016), si è visto come il *p*-cimene [Fig.7a], uno dei costituenti principali dell'olio essenziale di timo, non presenta un effetto antimicrobico rispetto ad un vasto range di batteri Gram(-), sia che al lievito *Saccharomyces cerevisiae*, anche se applicato ad alte concentrazioni.

Anche il γ -terpinene [Fig.7b], un altro costituente terpenico principale di oli essenziali come mandarino e bergamotto, è risultato inefficace contro il lievito sovracitato (E. Chivandi e altri, 2016), mentre risulta avere un effetto batteriostatico rispetto a *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* (S.O. Oyedemi e altri, 2009).

Il D-limonene risulta attivo contro il batterio *Mycoplasma pneumoniae* (M. Bacanli e altri, 2018) e il basidiomicete *Pleurotus sapidus* (J. Onken e R.G. Berger, 1999). Il limonene è presente in natura come una miscela racemica dei suoi due enantiomeri destrogiro e levogiro [Fig.7c]. Negli oli essenziali di arancia, limone e bergamotto, la forma destrogiro risulta la più abbondante (M. Bacanli e altri, 2018; A.J. Vieira e altri, 2018).

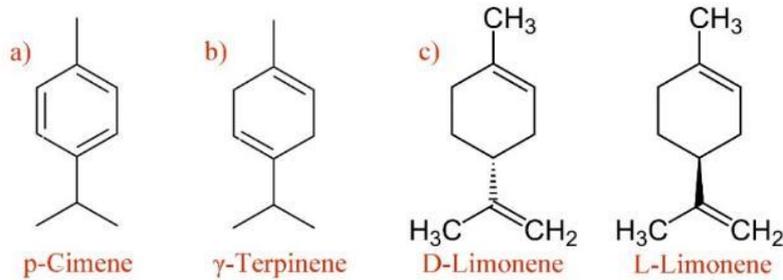


Figura 7: Strutture molecolari di a) p-cimene, b) γ-terpinene, c) D- limonene e L- limonene.

Alcol

I composti alcolici presentano un effetto battericida sulle cellule batteriche in stato vegetativo, mentre risultano batteriostatici se a contatto con le loro spore. Presentano, inoltre, un effetto inibitorio sulla sporulazione e sulla germinazione delle spore fungine (G. McDonnell e A. Denver Russel, 1999; H.J.D. Dorman e S.G. Deans, 2000).

Il gruppo funzionale alcolico, presente in alcuni terpenoidi, come il terpinen-4-olo e il linalolo, potrebbe interagire attivamente con le proteine presenti nella membrana citoplasmatica, in particolare le ATPasi, denaturandole. La loro inibizione intacca la produzione di ATP necessaria per lo svolgersi delle attività metaboliche cellulari fondamentali. Questo processo porta all'inibizione della respirazione cellulare, oltre che a diminuire l'integrità di membrana, causando la fuoriuscita di materiale citoplasmatico, tra cui ioni K^+ e H^+ . Questo squilibrio ionico porta inizialmente alla dissipazione della forza proton motrice e, quando unito a perdite importanti di macromolecole citoplasmatiche, porta alla lisi cellulare (J. Sikkema e altri, 1995; S.D. Cox e altri, 1998; G. McDonnell e A. Denver Russel, 1999; H.J.D. Dorman e S.G. Deans, 2000).

Questa modalità d'azione è stata riscontrata con il terpinen-4-olo [Fig.8a], il componente principale dell'olio essenziale di tea tree, rispetto ad un'ampia gamma di microrganismi Gram(+), Gram(-) e lieviti. È stato rilevato un aumento della permeabilità di membrana agli ioni K^+ (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011), correlato alla denaturazione di proteine di membrana che hanno portato a perdite di citoplasma e lisi cellulare (S.D. Cox e altri, 1998).

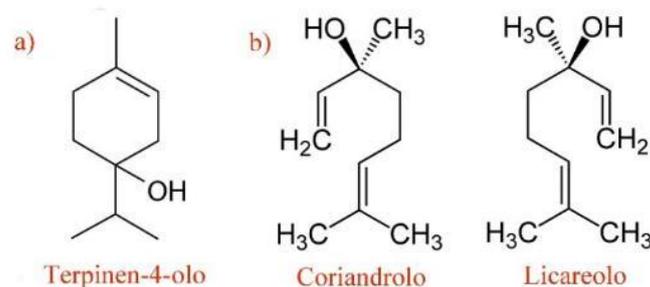


Figura 8: Strutture molecolari di a) terpinen-4-olo, b) coriandrolo e licareolo, i due enantiomeri del linalolo.

Modalità analoga è stata riscontrata con il linalolo, componente principale degli oli essenziali di basilico, bergamotto e lavanda (I. Pereira e altri, 2018). La presenza di un doppio legame e del gruppo idrossilico aumenta la possibilità della molecola di andare incontro a modificazioni di tipo chimico, come ossidazione, glicosilazione, esterificazione e metilazione. Tra queste, la più comune è l'ossidazione che porta alla formazione di furanosi e piranosi, ossidi che producono, in cascata, aldeidi

e alcoli (R.A. Raguso, 2016; I. Pereira e altri, 2018). Il legame idrossilico nel carbonio C3 è stereocentrico e questo conferisce proprietà chirali alla struttura. Il linalolo, infatti, è una miscela racemica dei seguenti enantiomeri: (3S)-(+)-linalolo (coriandolo) e (3R)-(-)-linalolo (licareolo) [Fig.8b] (R.A. Raguso, 2016; I. Pereira e altri, 2018), il cui rapporto è caratteristico in base alla specie, alla provenienza e alla coltivazione della specie vegetale (A.C. Aprotosoia e altri, 2014).

Il linalolo presenta un'attività antimicotica rispetto al *Trichophyton rubrum*, prevenendo la formazione del micelio mediante l'inibizione della conidiogenesi. Il principio attivo provoca dei danni alla membrana cellulare, portando cambiamenti significativi nella morfologia e nella fisiologia del fungo: oltre all'inibizione della conidiogenesi, è stata riscontrata una depigmentazione e una produzione di conidiospore deformi (M.I. de Oliveira Lima e altri, 2017).

Secondo le ricerche di C.C. Hsu e colleghi (2013) e di N.N.R. Cardoso e colleghi (2016), l'attività antimicrobica del linalolo è stata riscontrata nella crescita e nella formazione di biofilm della *Candida albicans*. Il composto ha attaccato l'integrità di membrana e la sintesi di ergosterolo (l'altro componente costitutivo essenziale delle membrane, tipico del Regno dei Funghi), portando ad una crescita di ife deformi e fragili.

Aldeidi

Il gruppo carbonile aldeidico presenta un'alta elettronegatività, con la formazione di un polo negativo verso l'ossigeno e un polo positivo verso il carbonio, rendendolo reattivo. Le aldeidi sono in grado di interferire nei processi biologici che utilizzano trasferimento di elettroni e di reagire con le componenti azotate di proteine e acidi nucleici, portando all'inibizione della crescita dei microrganismi (H.J.D. Dorman e S.G. Deans, 2000).

I gruppi aminici presenti nel DNA e nelle proteine reagiscono con il gruppo aldeidico formando cross-link covalenti, modificandone la struttura (E. Chivandi e altri, 2016).

Questo meccanismo è stato riscontrato con la cinnamaldeide [Fig.9], costituente principale dell'olio essenziale di cannella. A basse concentrazioni, il composto interagisce con i diversi enzimi presenti nella membrana cellulare atti alla funzione di citochinesi cellulare (il processo di divisione del citoplasma a seguito della meiosi), portando alla mancata separazione delle cellule. A concentrazioni più elevate interagisce con le ATPasi ed i lipidi di membrana, aumentando l'apporto di acidi grassi saturi che irrigidiscono progressivamente la membrana, fino a disgregarla (E. Chivandi e altri, 2016).

Il primo effetto della cinnamaldeide riscontrato nel *Bacillus cereus* e nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* è l'inibizione della divisione cellulare e la disgregazione della parete cellulare a causa dell'interazione con gli enzimi β -(1,3)-glucano sintetasi e gli isoenzimi per la sintesi della chitina (E. Chivandi e altri, 2016).

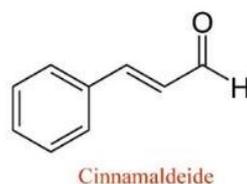


Figura 9: Struttura chimica della cinnamaldeide.

Fenoli

I composti fenolici sono caratterizzati da un gruppo ossidrilico legato all'anello benzenico. L'anello aromatico provoca una delocalizzazione degli elettroni che porta a rilasciare più facilmente il protone ossidrilico, rendendo il fenolo un acido più forte rispetto agli alcoli (S. Burt, 2004; A. Ben Arfa e altri, 2006; J. Xu e altri, 2008; M. Zabka e R. Pavela, 2013).

Le membrane cellulari sono sistemi generalmente impermeabili al passaggio di ioni. Attraverso specifici sistemi enzimatici atti allo scambio di metaboliti tra l'interno e l'esterno della cellula, viene assicurata la sua stabilità osmotica. L'equilibrio elettrochimico, instaurato dal passaggio di ioni e protoni attraverso la membrana (*Forza elettrone motrice*, o Δp), può essere intaccato dai composti fenolici, i quali possono agire come trasportatori di cationi monovalenti di tipo trans-membranico. Il

fenolo indissociato, grazie al suo basso peso molecolare e alla sua affinità lipidica, riuscirebbe a diffondersi attraverso la membrana citoplasmatica fino all'interno della cellula, dove si dissocia in ione fenato, rilasciando il proprio protone nel citoplasma. Il fenato acquisisce un catione monovalente presente nell'ambiente intracellulare (ad esempio uno ione K^+) e, nuovamente in forma indissociata, riesce a diffondersi nella membrana citoplasmatica ed a ritornare nell'ambiente esterno, dove scambia il catione monovalente con un nuovo protone, ricominciando il ciclo. Attraverso questa modalità, viene instaurato un influsso di protoni verso l'interno della cellula e un efflusso di ioni K^+ verso l'esterno (A. Ultee e altri, 2002), portando ad un'acidificazione del citosol e ad una diminuzione del gradiente di pH (S. Burt, 2004).

Questo meccanismo porterebbe al collasso della forza proton motrice (Δp), inibendo la sintesi di ATP da parte degli enzimi ATPasi. Questo spiegherebbe il motivo per cui in molte ricerche il livello di ATP intracellulare diminuisce senza aumentare all'esterno, eliminando l'ipotesi di una fuoriuscita di ATP dalla cellula. Non è certo, però, se questo avvenga per il meccanismo sopra citato o per una diretta inibizione delle ATPasi (A. Ultee e altri, 2002; S. Burt, 2004; M. Zabka e R. Pavela, 2013; A. Ahmad e altri, 2011; C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

L'azione dei composti fenolici, inoltre, sembra essere correlata all'inibizione degli enzimi β -galattosidasi (indispensabili per l'idrolisi del lattosio in galattosio e glucosio con generazione di energia e carbonio) e dell'enzima fosfatasi alcalina (AKP o ALP), utilizzato dai microrganismi per la produzione di fosfato inorganico (J.G. Xu e altri, 2016; H. Cui e altri, 2018).

È stata avanzata l'ipotesi che i composti fenolici siano in grado di cambiare le proprietà fisiche e chimiche dei lipidi di membrana, in particolare deformando la struttura dei fosfolipidi mediante legami idrogeno. La conformazione e la permeabilità di membrana vengono così modificate, portando instabilità al bilayer (S. Burt, 2004; A. Ben Arfa e altri, 2006; J. Xu e altri, 2008; K.P. Devi e altri, 2010).

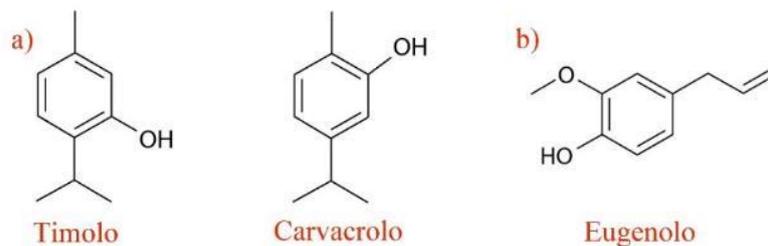


Figura 10: Struttura chimica di a) timolo e carvacrolo, b) eugenolo.

Il timolo e il carvacrolo, rispettivamente i costituenti principali dell'olio essenziale di timo e di origano, sono isomeri la cui unica differenza è la posizione differente del gruppo idrossilico nell'anello benzenico [Fig. 10a]. Questa differenza strutturale sembra non influenzare sul grado di efficacia antimicrobica (S. Burt, 2004; J. Xu e altri, 2008; A. Ahmad e altri, 2011; M. Zabka e R. Pavela, 2013). Essi riescono ad inibire la sintesi di ergosterolo della membrana fungina, rendendola porosa. L'ergosterolo è il principale sterolo presente nei sistemi membranosi in lieviti e Funghi filamentosi ed è necessario per la crescita e le funzioni della membrana cellulare. I suoi ruoli sono: controllare la fluidità, l'asimmetria, l'integrità e il corretto funzionamento degli enzimi di membrana. Inibendo l'ergosterolo, la membrana viene perturbata, fino a far fuoriuscire i suoi contenuti cellulari (A. Ahmad e altri, 2011, K.S. De Lira Mota, 2012; T. Gao e altri, 2016). Le lesioni create dall'instabilità e dall'aumento di permeabilità della membrana provocano la conseguente perdita di protoni e ioni, come ioni fosfato e potassio (S. Burt, 2004; A. Ben Arfa e altri, 2006; A. Ahmad e altri, 2011), elettroliti che aggravano ulteriormente il disequilibrio elettrochimico di membrana (J. Xu e altri, 2008; T. Gao e altri, 2016). Quando riescono a fuoriuscire anche le macromolecole presenti nel citoplasma, come ATP, DNA e proteine, la cellula va incontro a lisi e quindi alla morte (T. Gao e altri, 2016; H. Cui e altri, 2018).

Più in dettaglio, il timolo altera la morfologia delle ife di *Aspergillus parasiticus*, che risultano collassate, oltre a ridurre la conidazione e la produzione di aflatoossina. L'interferenza con gli enzimi

atti alla sintesi della parete influiscono sulla morfogenesi e la crescita cellulare, impedendo la separazione delle cellule a seguito della meiosi (I. Rasooli e P. Owlia, 2005). Inoltre, è stato visto che il timolo inibisce anche la crescita miceliare di *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* e *Alternaria alternata*, con arresto della produzione di aflatossina prodotta da parte dell'*A. flavus* (J. Walentowska e J. Foksowicz-Flaczyk, 2013). Questo principio attivo inibisce la produzione di conidi in *Fusarium graminearum*, rendendo le ife e i conidi maggiormente irregolari e fragili, oltre a formare vacuoli di accumulo di glicerolo, a causa dello stress osmotico provocato (T. Gao e altri, 2016). Il timolo presenta un effetto inibente maggiore a pH 5,5. Infatti, a pH acido, le molecole di timolo risultano essere maggiormente indissociate, favorendo così la diffusione attraverso la fase lipidica della membrana (S. Burt, 2004).

Il carvacrolo inibisce la produzione di tossine del *Bacillus cereus* (S. Burt, 2004) e la sintesi di flagellina, la proteina per la produzione di flagelli per la mobilità batterica (C.F. Carson e K.A. Hammer, 2011).

L'eugenolo [Fig.10b], componente principale nell'olio essenziale di chiodi di garofano, presenta minore efficacia rispetto al timolo e al carvacrolo. Per quanto possiede un gruppo fenolico nella sua struttura, la molecola possiede una minore idrofobicità e un sistema di delocalizzazione elettronica differente. Infatti, il gruppo metossilico in posizione *orto* sfavorisce il rilascio del protone dal gruppo idrossilico (A. Ben Arfa e altri, 2006; M. Zabka e R. Pavela, 2013). Secondo la ricerca di K.P. Devi e colleghi (2010), l'eugenolo ha un effetto maggiore ad un pH alcalino.

1.1.2.3.3. Interazione tra i principi attivi degli oli essenziali

Nella maggior parte dei casi, il componente principale di un olio essenziale riflette le caratteristiche generali dell'olio essenziale da cui viene isolato. Varie ricerche hanno riscontrato, però, che i differenti principi attivi degli oli essenziali possono interferire tra loro (F. Bakkali e altri, 2008).

L'interazione tra i vari principi attivi di un olio essenziale può essere (S. Burt, 2004; I.H.N. Bassolé e H.R. Juliani, 2012):

- additiva, quando l'effetto antimicrobico complessivo è uguale alla somma dei singoli effetti antimicrobici;
- antagonista, quando l'effetto antimicrobico complessivo è minore rispetto a quello dei componenti applicati individualmente;
- sinergica, quando l'effetto antimicrobico complessivo è maggiore rispetto alla somma degli effetti antimicrobici individuali.

Rispetto alla struttura chimica prevalente del singolo, la combinazione di fenoli con alcol monoterpenici produce un effetto antimicrobico sinergico per molti microrganismi, mentre sono stati riscontrati effetti antagonisti combinando monoterpeni idrocarburici non-ossigenati con monoterpeni idrocarburici ossigenati (I.H.N. Bassolé e H.R. Juliani, 2012).

La combinazione tra cinnamaldeide e carvacrolo o timolo porta spesso ad un effetto sinergico rispetto all'*Escherichia coli* e alla *Salmonella typhimurium*, anche se in alcuni casi risulta avere solo un effetto additivo (I.H.N. Bassolé e H.R. Juliani, 2012).

La combinazione tra limonene e 1,8-cineolo presenta un effetto sinergico, mentre la combinazione tra limonene con α -pinene presenta un effetto additivo (I.H.N. Bassolé e H.R. Juliani, 2012).

Il linalolo, se utilizzato insieme all'olio essenziale di garofano (con eugenolo come principio attivo principale), presenta un'interazione sinergistica rispetto ai batteri *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus brasiliensis*, mentre presenta un'interazione additiva rispetto allo *Staphylococcus aureus* e alla *Candida albicans*. Insieme all'olio essenziale di *Thymus vulgaris*, presenta un'interazione additiva rispetto al batterio *Pseudomonas aeruginosa* (I. Pereira e altri, 2018).

La combinazione tra carvacrolo e timolo mostra un effetto additivo con lo *Staphylococcus aureus* e lo *Pseudomonas aeruginosa* (S. Burt, 2004).

Si riscontra un effetto sinergico tra carvacrolo e il suo precursore *p*-cimene se utilizzato contro il *Bacillus cereus* in stato vegetativo. Il *p*-cimene ha il ruolo di espandere e destabilizzare le membrane

cellulari, aiutando il carvacrolo a diffondersi maggiormente attraverso la membrana (A. Ultee e altri, 2002; S. Burt, 2004).

In un olio essenziale, la presenza di terpenoidi con un gruppo acetato aumenta l'attività antimicrobica del composto alcolico corrispondente. Ad esempio, una miscela di geraniolo e acetato di geranile mostra di avere un'attività antimicrobica maggiore, come dimostrano anche il borneolo e l'acetato di borneolo (H.J.D. Dorman e S.G. Deans, 2000).

1.1.3. VARIABILITÀ CHIMICA DEI METABOLITI SECONDARI E DEGLI OLI ESSENZIALI

La composizione delle essenze e, di conseguenza, degli oli essenziali dipende da:

- fattori genetici o endogeni, intesi sia come variabilità tra i diversi organismi che fanno parte della stessa specie, sia da quelli presenti nel singolo organismo vegetale rispetto al suo stadio di sviluppo;
- fattori esterni naturali, intesi come variabilità indotte dall'ambiente (influenzano la tipologia di suolo, il clima, la radiazione solare, la variabilità dell'apporto idrico, la competizione con altre piante);
- fattori esterni artificiali, intesi come variabilità indotte dall'intervento dell'uomo, attraverso i metodi di conservazione ed essiccazione della pianta e con il processo estrattivo degli oli essenziali.

1.1.3.1. VARIABILITÀ GENETICA O ENDOGENA

Come precedentemente detto nel capitolo 1.1.2., la produzione di metaboliti secondari varia sia in base alla tipologia di strutture di accumulo delle essenze, sia dalla loro collocazione. Se ne deduce quindi che gli oli essenziali prodotti da una stessa pianta possono risultare diversi se estratti da parti differenti, ma che ovviamente prendendo in considerazione piante appartenenti alla stessa specie, le strutture di accumulo e la loro collocazione sono le stesse.

In piante appartenenti alla stessa specie, si avranno delle vie metaboliche privilegiate per la produzione o meno di determinate sostanze e dei loro specifici rapporti. Ad esempio, l'eugenolo è il principio attivo principale dei chiodi di garofano, ma questo non esclude la sua presenza in quantità minori anche in altre specie, come la cannella e il basilico (C. Franz e J. Novak, 2010).

Non tutti i membri della stessa specie e allo stesso cultivar, però, producono le stesse proporzioni di principi attivi; infatti, si possono individuare diversi *chemotipi*.

Il termine chemotipo si riferisce ad una popolazione di piante appartenenti alla stessa specie, quindi morfologicamente e fenotipicamente identiche, ma che differiscono tra loro nella composizione chimica dei metaboliti secondari (M. Valussi, 2005). Questa variabilità intraspecifica è, probabilmente, il risultato di una serie di processi di adattamento rispetto alle condizioni ambientali che hanno cambiato in modo permanente il loro genotipo (M. Valussi, 2005). Ad esempio, i sei chemotipi conosciuti del *Thymus vulgaris* che si distinguono tra loro per la produzione preferenziale di prodotti fenolici (carvacrolo e timolo) o non-fenolici (geraniolo, α -terpeniolo, tujanolo e linalolo) (B.K. Ehlers e J. Thompson, 2004).

Per questa ragione, per stabilire la nomenclatura di un olio essenziale, non basta segnalarne la specie botanica, ma anche l'eventuale varietà e chemotipo (A. Camporese, 1998).

Un altro fattore da tenere conto è il ciclo vitale in cui si trova la pianta: il quantitativo totale di principi attivi aumenta con il suo accrescimento e risulta massimo quando lo stadio vegetativo è completo (I. Morelli e altri, 2005). Questo periodo di massima resa viene definito "*tempo balsamico*" e varia non solo in base alla pianta, al suo ciclo vitale e alla parte raccolta, ma dipende anche dalla stagione e, in alcuni casi, dall'ora del giorno (I. Morelli e altri, 2005).

La raccolta in base al ciclo vitale della pianta può influenzare anche la composizione chimica dei metaboliti secondari. Ad esempio, la menta piperita produce maggiormente mentone durante il suo stato vegetativo, mentre produce maggiormente mentolo e metil acetato durante la fioritura (M. Valussi, 2005; C. Frank e J. Novak, 2010).

Anche la raccolta in un mese rispetto ad un altro influisce non solo sulla quantità di essenze prodotte, ma anche nel rapporto tra le sue varie costituenti chimiche. Ad esempio, la santoreggia raccolta a maggio presenta concentrazioni quantitativamente maggiori e ricche di carvacrolo, mentre quella raccolta ad ottobre è minore in quantità e più ricca di *p*-cimene (F. Firenzuoli, 2002).

Risulta evidente pertanto e fondamentale il rapporto che si instaura tra la pianta e l'ambiente che la circonda, determinando meccanismi e processi epigenetici particolarmente importanti nel mondo vegetale.

1.1.3.2. VARIABILITÀ AMBIENTALE O ECOLOGICA

I fattori ambientali naturali che possono influenzare la produzione di metaboliti secondari nelle piante sono i seguenti:

- condizioni climatiche (luce, temperatura, apporto idrico);
- composizione del terreno;
- fattori biotici.

Condizioni climatiche

L'apporto luminoso è sicuramente un fattore climatico molto importante: influenza, infatti, sia il metabolismo principale che secondario dell'organismo vegetale.

Le piante producono un quantitativo maggiore di sostanze naturali soprattutto nell'intervallo del visibile (l compresa 400 – 760 nm), in particolare nella regione del rosso tra i 660 e i 680 nm (I. Morelli, 2005). La luce è una variabile estremamente mutevole: la sua intensità cambia in base all'ora del giorno, alla stagione e all'altitudine. Ad un'altitudine elevata si avrà un maggior apporto di luminosità e una maggiore attività fotosintetica, che può influire sulla composizione chimica delle essenze. Confrontando, ad esempio, la composizione degli oli essenziali derivati da piante di lavanda coltivate in pianura rispetto ad altre coltivate in alta montagna, il rapporto di acetato di linalile/linalolo di queste ultime risulta essere più elevato (M. Valussi, 2005).

Un altro fattore climatico da prendere in considerazione è la temperatura. L'intervallo di temperatura ottimale per le reazioni biochimiche che avvengono in una pianta è tra gli 0 e i 45 °C (I. Morelli, 2005).

La temperatura sembra apportare modifiche più sostanziali nella composizione chimica dei metaboliti primari rispetto a quelli secondari. Diminuendo la temperatura, o aumentando la latitudine, si avranno piante che si sono adattate maggiormente al clima freddo producendo oli o grassi a più alto contenuto di doppi legami. Le piante tropicali, al contrario, contengono quasi esclusivamente acidi grassi saturi (ad es. l'acido stearico contenuto nel burro di cacao), mentre avviene un aumento progressivo di contenuto di acidi grassi insaturi nelle piante subtropicali (es: acido oleico contenuto nell'olio d'oliva), nelle piante delle zone temperate (acido linoleico contenuto nell'olio di cotone) ed infine nelle piante dei climi freddi (ad es. l'acido linolenico contenuto nell'olio di lino) (I. Morelli, 2005).

Per quanto riguarda i metaboliti secondari, invece, la temperatura sembra influire maggiormente sulla resa, più che sulla loro composizione chimica. Ad esempio, la lavanda coltivata in un clima freddo ha una resa in olio essenziale di un terzo minore rispetto a quello di lavanda coltivata in un clima caldo (E. Schmidt, 2010).

La composizione dei metaboliti secondari, poi, può variare quando la differenza di temperatura viene relazionata all'umidità. Una temperatura elevata associata ad un altrettanto elevata umidità favorisce la proliferazione di specie parassite e microrganismi: la pianta è quindi sollecitata ad aumentare la produzione di metaboliti secondari a scopo di difesa (E. Schmidt, 2010).

In base alla temperatura, l'acqua che viene a contatto con la pianta si può trovare sotto forma di pioggia, rugiada e umidità (I. Morelli, 2005). Pioggia, rugiada o interventi irrigui possono ridurre la resa dell'olio essenziale, in particolare nel periodo antecedente alla raccolta. Un intervento irriguo di una certa importanza, ricevuto sull'epidermide delle parti aeree della pianta, provoca una solubilizzazione delle sostanze solubili in essa contenute, con la loro conseguente dissoluzione (I.

Morelli, 2005; S. Delfine e G. Cippa, 2015). Se l'apporto di acqua è basso, l'olio essenziale prodotto risulta avere una qualità elevata ma a discapito della resa (S. Delfine e G. Cippa, 2015).

Composizione del terreno

Il terreno è una miscela di composti minerali e componenti organici (humus); i primi si formano attraverso l'erosione delle rocce, i secondi dalla decomposizione di piante e animali. Le proprietà chimico-fisiche del terreno possono influenzare la produzione dei principi attivi della pianta (I. Morelli, 2005).

Il pH del suolo influenza significativamente, oltre che l'attecchimento e la proliferazione della stessa pianta, sia la resa che la qualità dell'olio essenziale. Questo parametro, infatti, favorisce o meno la solubilità di alcuni elementi presenti nel terreno ed indispensabili per il metabolismo. Un terreno alcalino tende a trasformare ferro, zinco, rame e manganese in idrossidi, ciò non avviene in terreni acidi (A.C. Figueiredo e altri, 2005; Schmidt, 2010). La presenza di calce nel terreno fornisce al suolo un pH basico mentre se sono presenti alti quantitativi di humus e poca calce il pH sarà acido (I. Morelli, 2005).

Anche la tessitura del terreno ha il suo ruolo nella crescita della pianta: la grandezza delle particelle è, infatti, correlata alla capacità di trattenere o meno l'acqua e l'ossigeno. Un terreno con particelle di piccole dimensioni come l'argilla (2-20 μ m) ha il pregio di trattenere fino al 40% di acqua, ma di contro risulta avere una bassa permeabilità all'aria. Un terreno sabbioso (particelle tra i 20 μ m e i 2mm), invece, tende a far evaporare velocemente l'acqua ma allo stesso tempo è altamente permeabile all'aria (I. Morelli, 2005). La maggior parte delle piante cresce in terreni neutri, relativamente ricchi di humus e composto da una miscela di particelle sottili e più grossolane, in modo da combinare la capacità di trattenere acqua delle argille con quella della maggiore permeabilità dell'aria della sabbia (I. Morelli, 2005). Sono presenti ovviamente eccezioni, come la lavanda, il timo, l'origano e la salvia che richiedono terreni magri, ma ricchi di calce e quindi alcalini (E. Schmidt, 2010).

La pianta, crescendo, sottrae gli elementi minerali presenti nel terreno; essi possono essere reintegrati attraverso la concimazione. Questo procedimento di origine antropica influisce non solo sulla resa delle essenze, ma anche sulla loro diversa composizione chimica. Per esempio, la salvia può variare la propria sintesi di tujoni (o absintoli, terpenoidi dall'odore di mentolo) se concimata con azoto, mentre in presenza di nitrato di sodio si osserva un aumento della crescita fogliare e della resa dell'essenza. Se concimata con fosfato minerale, la resa dell'olio essenziale aumenta del 37%, mediante concimazione letamica del 22%, mentre se vengono applicate entrambe le concimazioni l'aumento è del 58% (F. Firenzuoli, 2002).

Fattori biotici

I fattori biotici rappresentano le interazioni tra i diversi organismi animali, vegetali e umani in un determinato ambiente e, in una pianta, si osservano con la produzione e l'emissione di determinate sostanze (I. Morelli, 2005).

Quando una pianta cresce vicino ad un'altra, può avvenire un'interferenza più o meno reciproca osservabile sull'accrescimento, sullo sviluppo della pianta o di alcuni suoi organi, oltre che sulla produzione dei metaboliti secondari. Questa interazione può essere di tipo simbiotico, ovvero un'associazione più o meno stretta tra due o più organismi, o antibiotico, ovvero un'interazione tra due o più organismi che risulta dannosa almeno per uno di questi (I. Morelli, 2005).

Le sostanze prodotte da queste interazioni positive o negative sono definite allelochimiche, come le fitoalessine sintetizzate dalle piante a seguito di un'infezione di patogeni e che non sono presenti quando la pianta è sana. Queste sostanze possono apportare delle modifiche indesiderate sulla composizione chimica delle essenze (I. Morelli, 2005).

Inoltre, la presenza o meno di piante infestanti può influenzare sia la resa che la composizione di un olio essenziale. Per avere un prodotto di maggior qualità è indispensabile gestire la competizione interspecifica per ridurla o sfruttarla al meglio (S. Delfine e G. Cippa, 2015).

1.1.3.3. FATTORI ARTIFICIALI

Per fattori artificiali si intendono tutti quei procedimenti antropici atti a estrarre le essenze e trasformarle in oli essenziali, generalmente mediante distillazione.

Con il termine generale “*distillazione*” si intende l’evaporazione di un liquido e la conseguente condensazione del vapore formatosi. Quando l’evaporazione della sostanza è provocata dal contatto con vapore acqueo, viene definita come “*distillazione in corrente di vapore*”; se l’evaporazione è provocata dall’ebollizione della sostanza in un liquido (in genere acqua) è detta “*idrodistillazione*” (E. Schmidt, 2010).

Il metodo più utilizzato per estrarre gli oli essenziali è la distillazione in corrente di vapore. Le cellule vegetali, a contatto con il vapore, si rompono rilasciando le essenze volatili, che verranno in seguito trasportate dal vapore stesso fino al condensatore dove la miscela viene condensata ed infine raccolta. Essa viene successivamente separata dalla sua componente acquosa per ottenere l’olio essenziale (E. Schmidt, 2010).

In questo modo si riesce a fare evaporare a circa 100 °C anche i composti volatili con punti di ebollizione compresi tra 150 – 300 °C. Infatti, quando due liquidi immiscibili (in questo caso le essenze e l’acqua) formano una miscela, la pressione di vapore totale corrisponde alla somma delle pressioni parziali di vapore dei due liquidi puri. La temperatura di ebollizione della miscela risulta, quindi, minore delle temperature di ebollizione dei singoli liquidi separati (E. Schmidt, 2010).

Alcune componenti degli oli essenziali possono essere più delicate a causa della loro bassa temperatura di ebollizione, in questo caso è possibile favorire la loro estrazione eseguendo la distillazione sotto pressione (E. Schmidt, 2010).

Qualunque sia il processo estrattivo utilizzato, è molto probabile che la composizione dell’olio essenziale risulti modificata rispetto a quella dell’essenza corrispondente. Si potrebbero osservare sia fenomeni di evaporazione, sia reazioni chimiche che portano alla formazione di nuovi prodotti (F. Firenzuoli, 2002). Le reazioni chimiche possono avvenire anche tra i composti non volatili e ad alto peso molecolare, estranei all’interno della composizione delle essenze, come i glucosidi. Ad esempio, i maggiori costituenti dell’olio essenziale di rosa (citronellolo, geraniolo e nerolo) sono il risultato di reazioni secondarie prodotte durante il processo di idrodistillazione (Schmidt, 2010).

Ovviamente, più un metodo estrattivo usa temperature elevate e tempi di lavorazione prolungati, più esiste il rischio di avere degradazione o evaporazione delle diverse componenti. Questo può risultare particolarmente dannoso in oli essenziali ricchi di esteri, come l’olio essenziale di lavanda ricco di acetato di linalile, il quale può subire un processo di idrolisi con la formazione di alcoli o acidi non voluti (E. Schmidt, 2010).

In genere, la distillazione viene effettuata su parti di pianta allo stato fresco per evitare perdita di principi attivi (A. Camporese, 1998). Dopo la raccolta, infatti, i processi biochimici non si arrestano, ma continuano ad avvenire. Si potrebbero innescare, in particolare, processi di ossidazione che portano alla formazione di prodotti colorati, dovuti principalmente dalla trasformazione della clorofilla in feoclorofilla. Questo fenomeno di imbrunimento è favorito dalla presenza di ossigeno e da alte temperature, mentre può essere impedito se sono presenti sostanze antiossidanti come l’acido ascorbico (I. Morelli, 2005). Ossigeno e alte temperature possono portare inoltre alla formazione di idroperossidi che alterano la composizione chimica degli acidi grassi insaturi formando aldeidi e chetoni; questo fenomeno è detto “*irrancidimento ossidativo*” (I. Morelli, 2005). L’irrancidimento può avvenire anche ad opera di enzimi (detti lipasi) in presenza di acqua; il fenomeno, in questo caso, prende nome di “*irrancidimento idrolitico*” (I. Morelli, 2005).

Se non è possibile usare la pianta fresca, è possibile attuare un processo di essiccazione per rallentare le sopracitate reazioni, anche se queste non vengono totalmente arrestate (I. Morelli, 2005). Ad esempio, l’olio essenziale di santoreggia estratto dalla pianta fresca presenta un contenuto di principi attivi diverso rispetto a quello estratto dopo 40 giorni di essiccazione. La quantità di *p*-cimene diminuisce passando dal 36 al 26%, mentre il carvacrolo aumenta dal 21% al 40% (F. Firenzuoli, 2002).

1.1.4. OLI ESSENZIALI PER LA CONSERVAZIONE DEI BENI CULTURALI

I Beni Culturali comprendono una vasta e diversificata gamma di oggetti e materiali, spesso molto antichi, delicati e fragili. Essi sono molto sensibili a cambiamenti ambientali: variazioni di pH, temperatura, umidità e ai diversi reagenti chimici. L'applicazione di sostanze chimiche (es: protettivi, consolidanti e antimicotici) senza le dovute precauzioni e accertamenti, può comportare un ulteriore rischio di degrado per il Bene. Infatti, quando tali sostanze risultano incompatibili con il materiale o con alcuni delle sue componenti, potrebbero avvenire reazioni chimiche non volute e potenzialmente dannose, tra cui indebolimenti strutturali, macchie e ingiallimenti.

Purtroppo, l'applicazione degli oli essenziali nell'ambito della conservazione e del restauro dei Beni Culturali non è stata ancora approfonditamente indagata: la maggior parte degli studi, infatti, si ferma alle sole analisi *in vitro* e non prende in considerazione le interazioni dannose che tali sostanze possono provocare sulle diverse tipologie di materiali.

In base alle attuali ricerche scientifiche, per quanto riguarda l'applicazione su opere composte da materiali fragili, come i materiali cartacei e le superfici pittoriche su tela e a tavola o altro supporto, il metodo di applicazione più indicato sembra essere la diffusione dell'olio essenziale in fase vapore. Per diminuire il rischio di alterazioni di carattere chimico-fisico, è invece sconsigliata l'applicazione degli oli essenziali direttamente sulla superficie del Bene, soprattutto se non sono stati effettuate precedentemente test che ne determinano la sicurezza operativa.

Di seguito sono riportate le ricerche più pertinenti ed interessanti che hanno utilizzato gli oli essenziali *in situ* per il restauro e la conservazione di materiali cartacei, tessili e per gli ambienti interni.

M.S. Rakotonirainy e B. Lavédrine (2005) hanno applicato, mediante diffusione in micro-atmosfera, il principio attivo linalolo su dei volumi al cui interno erano state poste delle strisce di carta contaminata dai seguenti Funghi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus repens*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium frequentans*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii* e *Stachybotrys atra*. I volumi così infettati sono stati successivamente posti in sospensione all'interno di camere di disinfezione di vetro. Alla base della camera, è stato posto un piattino di vetro contenente un disco di carta imbevuto di principio attivo. I livelli di RH (*Relative Humidity*) sono stati mantenuti costanti mediante una soluzione salina di nitrato d'ammonio (RH=50%) e solfato di magnesio (RH=80%). L'incubazione è durata 21 giorni ad una temperatura costante di 25 °C.

Il linalolo ha inibito completamente la crescita dei Funghi solo a livello della superficie, mostrando un effetto biostatico, a differenza dei test eseguiti su piastre Petri che hanno invece mostrano un effetto biocida.

K. Pietrzak e colleghi (2017) hanno applicato, mediante diffusione in micro-atmosfera, l'olio essenziale di timo (*Thymus vulgaris*), diluito in DMSO al 10% di concentrazione, su due volumi già affetti da contaminazione biologica. Il metodo è risultato efficace e sono stati riscontrati maggiori effetti batteriostatici rispetto che micostatici. L'utilizzo della diffusione in micro-atmosfera di olio essenziale di timo ha provocato, però, un ingiallimento e una diminuzione del pH della carta in esame.

K. Matsusiak e colleghi (2018) hanno applicato l'olio essenziale di cannella (*Cinnamomum zeylanicum*), mediante diffusione in fase vapore, su materiali tessili in cotone, lino e lana, sia antichi che invecchiati artificialmente.

È stata costruita una camera di disinfestazione di vetro al cui interno sono stati poste su una barra orizzontale delle strisce di materiale tessile infetto alternate ad altre di carta imbevuta d'olio essenziale. La parte finale della carta è stata immersa in una capsula Petri contenente 50mL di soluzione etanolica al 12,5% di olio essenziale, posta nella parte inferiore della camera, cosicché l'ambiente si saturasse di vapori di olio essenziale. La temperatura del test oscillava tra 21,8 – 22,5 °C e l'ambiente presentava una RH=57,0 - 58,41%. Il tempo di disinfezione all'interno della camera è stato di 24h.

L'olio essenziale di cannella in fase vapore ha avuto un effetto inibente sulla crescita di funghi (*Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma viride*) e di batteri (*Streptomyces*

rutgersensis, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens*). Non sono stati rilevati cambiamenti dal punto di vista ottico, meccanico e strutturale dei materiali tessili dopo la disinfestazione.

J. Walentowska e J. Foksowicz-Flaczyk (2013) hanno applicato l'olio essenziale di timo (*Thymus vulgaris*) al 5,8 e 12% di concentrazione in metanolo, su materiali tessili in lino-cotone. L'applicazione è stata svolta mediante *Mathis 2-Roll Laboratory Padder* e il materiale è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente per 24h.

L'olio essenziale di timo ha mostrato un alto potere antibatterico e antimicotico sui materiali tessili di lino-cotone, mentre non ha mostrato attività antimicotica su materiali di solo lino.

S. Gatenby e P. Townley (2003) hanno applicato mediante spray aereo, dell'olio essenziale di *Malaleuca alternifolia* in un ambiente interno di un castello, adibito a deposito per beni artistici. La composizione dell'aerosol (Bactigas®) è la seguente: 0,3% olio essenziale, 97% diossido di carbonio liquido, 2,7% etanolo. L'applicazione è stata ripetuta ogni due ore per sette giorni.

È stata riscontrata una riduzione della sporulazione e della crescita delle muffe presenti, ma solo sulle superfici che sono entrate in contatto con lo spray.

1.2. FUNGHI

1.2.1. INTRODUZIONE

I Funghi sono organismi eucarioti, chemioeterotrofi, privi di clorofilla (M.G. Fiorin, 1993; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

I Funghi sono organismi in grado di secernere enzimi digestivi (litici) extracellulari che degradano materiali organici anche complessi, come la cellulosa o la lignina (M.G. Fiorin, 1993; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015). Le modalità che essi utilizzano per procurarsi la sostanza organica necessaria alla nutrizione sono tre (M.G. Fiorin, 1993; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015), tutte appunto caratterizzate da processi di digestione esterna:

- saprofitismo, cioè la degradazione di organismi morti. Il ruolo di questi Funghi è fondamentale per il riciclo dei nutrienti dell'ambiente;
- simbiosi mutualistiche, cioè l'interazione di scambio reciproco di metaboliti, ad esempio i Licheni (simbiosi tra Funghi e microalghe), o le micorrize (simbiosi tra Funghi e piante terrestri);
- parassitismo, cioè l'interazione a proprio vantaggio con altri organismi viventi.

Sono rigogliosi in ambienti caldi, umidi e ombreggiati (M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015), ma presentano comunque una notevole tolleranza ambientale, che assicura loro la crescita anche a temperature inferiori o prossime agli 0 °C, o in condizioni ambientali estreme, come pH acidi e concentrazioni elevate di zuccheri (M.G. Fiorin, 1993).

Vivono essenzialmente in presenza di ossigeno (le muffe, o Funghi filamentosi, in particolare), anche se alcuni sono anaerobi facoltativi, come ad esempio i lieviti che utilizzano le vie fermentative alcolica o lattica in assenza di O₂ (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016a).

La maggior parte dei Funghi è pluricellulare ed ha un corpo filamentoso visibile macroscopicamente, ma sono presenti anche organismi microscopici, che possono rimanere unicellulari per la maggior parte del loro ciclo vitale, come i già sopracitati lieviti. Presentano tutti una parete cellulare, non sono mobili e la loro riproduzione può avvenire sia sessualmente che asessualmente attraverso spore, sia per frammentazione (M.G. Fiorin, 1993; M. Blackwell e J.W. Spatafora, 2004; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

La differenza tra Funghi filamentosi e Lieviti è unicamente morfologica e non la si può ricondurre ad una divergenza evolutiva. Alcuni Funghi, come i generi *Candida* e *Blastomyces*, possono alternare la propria forma da filamentosa ad unicellulare a seconda delle condizioni ambientali e nutritive. In questo caso vengono definiti come Funghi dimorfi (M.G. Fiorin, 1993).

Dal punto di vista tassonomico, i Funghi vengono classificati in base alla natura del ciclo vitale, alla tipologia di riproduzione e alle caratteristiche morfologiche e metaboliche. Una prima suddivisione può essere fatta distinguendo gli Eumiceti, o Funghi veri, dai Mixomiceti, o muffe mucillaginose (M.G. Fiorin, 1993). Gli Eumiceti possono essere ulteriormente suddivisi nei seguenti Phylum (M. Blackwell e J.W. Spatafora, 2004):

- Chitridimiceti
- Zigomiceti
- Basidiomiceti
- Ascomiceti.

Verranno in seguito analizzati nello specifico gli Ascomiceti, in quanto sono la più comune causa di biodeterioramento micotico di diversi materiali rintracciabili nei Beni Culturali (M.G. Fiorin, 1993; M. Blackwell e J.W. Spatafora, 2004; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; I. Money, 2016a; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

1.2.2. STRUTTURA CELLULARE

Le cellule dei funghi sono in generale costituite dagli stessi organuli presenti nelle altre cellule eucariotiche; presentando quindi una membrana plasmatica, un nucleo e un sistema endocellulare. Altri organuli, invece, sono caratteristici del regno dei Funghi, come il corpo di Woronin e lo Spitzenkörper. Il corpo di Woronin, caratteristico degli Ascomiceti filamentosi, ha la funzione di formare delle barriere intracellulari in caso di danno, in modo da arrestare le perdite citoplasmatiche (I. Money, 2016b). Lo Spitzenkörper, un organulo che si trova solamente nei Funghi filamentosi, è un assemblamento di vescicole secretorie poste nella zona apicale dell'ifa che, attraverso un processo di esocitosi, trasportano gli enzimi e i polimeri precursori della parete cellulare verso l'esterno. Questo processo esocitosico porta alla crescita direzionata dell'ifa (G.T. Cole e Y. Nozawa, 1981; I. Money, 2016b).

Le cellule dei Funghi presentano una parete cellulare chitosinica, a differenza di quella cellulosa vegetale e di quella peptodicanica batterica (I. Money, 2016b).

1.2.2.1. PARETE

La parete cellulare è il rivestimento più esterno della cellula e la sua funzione è essenzialmente protettiva. È dotata di una certa elasticità, ma è sufficientemente rigida da conferire forma alla cellula e per contenere la pressione osmotica interna (turgore) che si crea dalla differenza di concentrazione tra i sali e gli zuccheri presenti nel citosol e quelli presenti nell'ambiente extracellulare. Nelle cellule più giovani, la pressione interna dilata le pareti cellulari, allungandole e ingrossandole. Quando le cellule raggiungono la maturazione, le loro pareti non sono più in grado di espandersi e la crescita viene così arrestata (H. Curtis e N.S. Barnes, 2003; I. Money, 2016b, P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

La natura della parete è principalmente polisaccaridica ed è composta prevalentemente da chitina, glucani, glicoproteine ed enzimi, mentre la presenza di lipidi è molto bassa (J.E. Smith e altri, 1981; I. Money, 2016b). A differenza dei Funghi filamentosi, i lieviti come il *Saccharomyces cerevisiae*, presentano un'inferiore percentuale di chitina (dall'1 al 2%); la loro parete è, infatti, composta principalmente da β -glucani e mannoproteine (G.T. Cole e Y. Nozawa, 1981; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017). La chitina, nel *Saccharomyces cerevisiae*, si riscontra essenzialmente nella lamina di separazione che viene a formarsi a seguito della gemmazione (G.T. Cole e Y. Nozawa, 1981).

Dal punto di vista chimico, la chitina è un polisaccaride costituito da unità di N-acetil-D-glucosammina legate tra loro da legami β -1,4 [Fig.11] (J.M. Aronson, 1981; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017). Le catene di chitina si possono aggregare tra loro mediante legami ad idrogeno intra e intermolecolari fino alla formazione di microfibrille. Le microfibrille di chitina conferiscono alla parete rigidità ed alta resistenza alla trazione (J.M. Aronson, 1981; J.E. Smith e altri, 1981; I. Money, 2016b). La sintesi di chitina è catalizzata dagli enzimi chitina sintasi, presenti nella membrana plasmatica. Esistono diversi tipi di chitina sintasi e la loro presenza dipende dalla specie, ad esempio il *Saccharomyces cerevisiae* presenta tre chitina sintasi, mentre *Aspergillus fumigatus* ne presenta sette (J.E. Smith e altri, 1981; I. Money, 2016b).

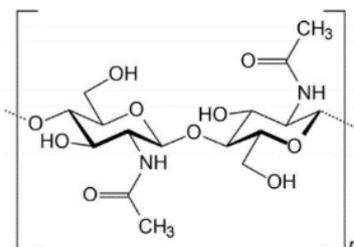


Figura 11: Struttura chimica del dimero di base del polisaccaride chitina.

I glucani, in particolare i β -glucani, costituiscono circa il 60% del peso secco della parete fungina. Sono polisaccaridi lineari costituiti da unità di D-glucosio legate tra loro mediante legami di tipo β (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6) glicosidici (J.M. Aronson, 1981; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017). Il più abbondante è il β -1,3-glucano, che può trovarsi sia in forma debolmente ramificata per contribuire alla

forma e alla rigidità della parete, in associazione con la chitina, oppure in forma ramificata mediante legami glucosidici $\beta(1\rightarrow6)$, la cui funzione è contribuire all'elasticità di parete e ancorare le diverse costituenti della parete cellulare in una struttura coerente [Fig.12] (J.E. Smith e altri, 1981; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017). I β -glucano sintasi operano in modo simile alle chitina sintasi e sono presenti nella membrana plasmatica (I. Money, 2016b).

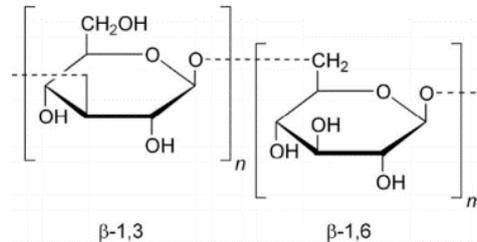


Figura 12: Struttura chimica dei glucani.

Le proteine strutturali della parete cellulare sono prevalentemente glicoproteine, in particolare mannoproteine. Nel *Saccharomyces cerevisiae* costituiscono dal 25 al 50% del peso secco della parete (P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017). Le mannoproteine hanno un ruolo importante sia dal punto di vista immunologico per il riconoscimento di sostanze nocive, sia per l'adesione sulle superfici, la formazione di biofilm, l'assorbimento i composti dall'ambiente circostante e la fusione con altre cellule (I. Money, 2016b). L'attività delle mannoproteine e degli enzimi associati alla membrana è massima durante la fase di crescita esponenziale, mentre tende ad essere minore durante la fase stazionaria (P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

La composizione e le proporzioni tra i vari costituenti della parete, chitina, glucani e glicoproteine [Fig.13], dipendono dalla specie e sono fortemente influenzate dalle condizioni ambientali, dall'età cellulare e dai nutrienti presenti nell'ambiente. Quando il tenore di zuccheri è elevato, le proporzioni di glucano nella parete tende ad aumentare. Quando la cellula invecchia presenta una maggiore quantità di glucani e chitina e una minore quantità di mannoproteine, rispetto alle cellule più giovani (I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

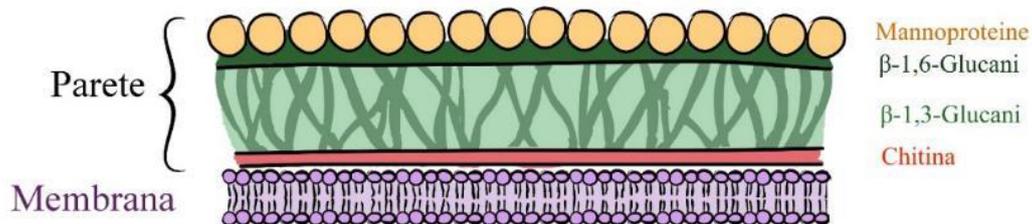


Figura 13: Schema della composizione della parete cellulare fungina.

1.2.2.2. MEMBRANA PLASMATICA

La membrana cellulare è una barriera idrofoba altamente selettiva che regola gli scambi tra l'ambiente interno ed esterno della cellula, intesi sia come introduzione di nutrienti, sia come espulsione di materiale metabolico di scarto e tossine. I complessi enzimatici che la compongono gestiscono la funzione respiratoria cellulare e catalizzano la biosintesi delle macromolecole della parete e della membrana (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

La membrana plasmatica è costituita principalmente da lipidi e proteine; in particolare il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è composto da circa 40% di lipidi e il 50% da proteine (P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Secondo il modello "a mosaico fluido" proposto da S.S. Singer e G.L. Nicolson nel 1972, i lipidi rappresentano una matrice fluida al cui interno sono presenti le proteine libere di spostarsi lateralmente (M.G. Fiorin, 1993; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017). I lipidi che compongono la membrana citoplasmatica sono – come in un qualsiasi organismo - essenzialmente fosfolipidi e steroli. Entrambi

sono sostanze anfipatiche: possiedono, quindi, una parte polare ed una apolare che determinano il grado di fluidità della membrana (P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

I fosfolipidi di membrana si arrangiano in una conformazione a doppio strato: le teste polari sono rivolte verso i due esterni ed attuano interazioni idrostatiche e legami a ponte idrogeno tra loro e le molecole d'acqua circostanti; mentre le code lipidiche sono rivolte all'interno ed attuano tra loro interazioni idrofobiche, come legami di van der Waals [Fig.14] (P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

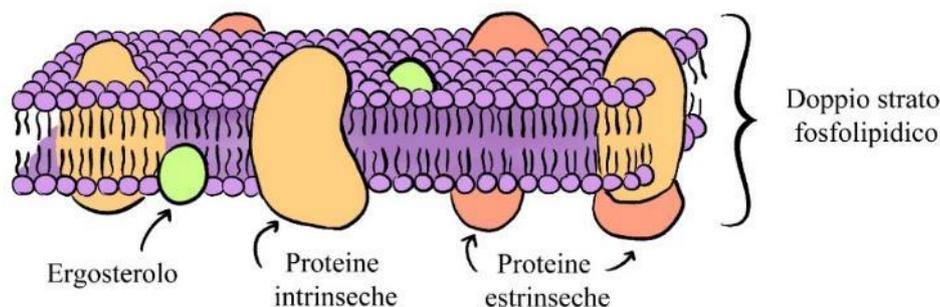


Figura 14: Schema della composizione della membrana plasmatica.

Le catene alifatiche dei fosfolipidi presentano dei doppi legami che possono far assumere alla molecola una conformazione di tipo *trans* o *cis*. Quando assumono la conformazione *trans*, le catene sono disposte in modo rettilineo, rendendo il sistema ordinato e rigido. Quando assumono la conformazione *cis*, le catene si piegano, rendendo il sistema disordinato e fluido (P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Lo sterolo principale che viene riscontrato nelle membrane plasmatiche fungine è l'ergosterolo [Fig.15]. Questa molecola riesce ad interagire con i fosfolipidi, formando legami idrogeno con le loro teste polari e legami di van der Waals con le loro code alifatiche. In questo modo riesce ad ostacolare la cristallizzazione delle catene degli acidi grassi quando la temperatura è bassa, mentre, se la temperatura è alta, riesce a moderare l'eccesso di fluidità che viene a crearsi per la formazione di numerosi legami *cis* tra le catene. Il suo ruolo è quindi quello di moderare la fluidità della membrana e la sua permeabilità (I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

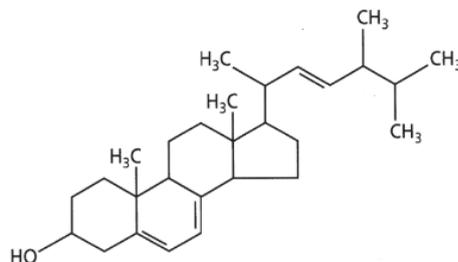


Figura 15: Struttura chimica dell'ergosterolo.

Le proteine che compongono la membrana possono essere intrinseche, se in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico, o estrinseche, se localizzate unicamente sulla sua superficie, esterna o interna [Fig.14]. Delle prime fanno parte le proteine transmembraniche o permeasi, la cui funzione è quella di trasportare ioni e molecole dall'esterno all'interno della membrana e viceversa (I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Le proteine transmembraniche addette al passaggio di protoni sono dette Adenosina trifosfatasi o ATPasi. Il trasferimento di protoni mediante ATPasi viene definito come un trasporto attivo primario, che avviene, quindi, contro il suo gradiente di concentrazione e con consumo di energia. In questo modo si crea una differenza di concentrazione tra l'ambiente esterno ed interno, che viene mantenuto stabile proprio grazie alle ATPasi (M.G. Fiorin, 1993; P.R. Rich, 2013; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Il gradiente protonico così instaurato provoca sia un gradiente di pH (ΔpH), sia una differenza di potenziale elettrico ($\Delta\psi$) che, se sommate, danno un unico fattore detto forza proton motrice ($\Delta\mu$). La

forza proton motrice rappresenta l'energia libera richiesta per muovere i protoni attraverso la membrana, oppure, l'energia libera disponibile quando i protoni si muovono attraverso la membrana per ristabilire l'equilibrio. Questo meccanismo, detto anche "teoria chemiosmotica" è stato proposto nel 1961 da P. Mitchell ed è tuttora attuale (P.R. Rich, 2013).

Altre proteine di transmembrana, chiamate proteine *carrier*, funzionano mediante un trasporto attivo secondario. Si distingue dal primario in quanto è reso possibile non da un utilizzo diretto di energia, ma dallo sfruttamento del potenziale elettrochimico creato dal trasporto attivo primario (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016b).

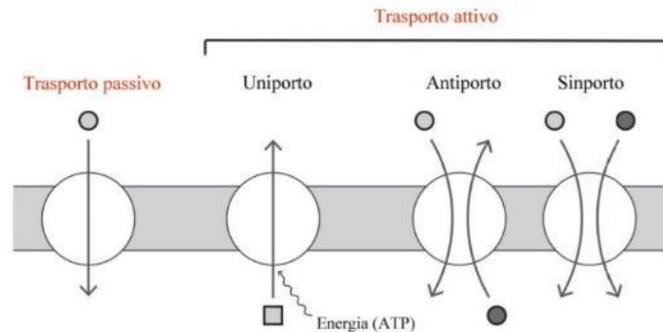


Figura 16: Tipi di trasporto che possono avvenire nella membrana citoplasmatica. Fonte: I. Money, 2016b.

Il trasporto attivo si può distinguere ulteriormente in trasporto uniporto, sinporto e antiporto [Fig.16]. Con uniporto si intende il passaggio effettuato da una sola sostanza e in un'unica direzione. Sinporto è il passaggio tra due sostanze avviene contemporaneamente e nella medesima direzione, ad esempio il carrier sodio-amminoacidi. Antiporto è quando il passaggio tra due sostanze avviene contemporaneamente e in direzioni opposte la pompa Na^+/H che permette l'espulsione di uno ione sodio per ogni protone che entra e viceversa, in modo da mantenere l'omeostasi e un gradiente di pH intracellulare stabile (H. Curtis e N.S. Barnes, 2003; I. Money, 2016b).

1.2.2.3. CITOPLASMA E I SUOI ORGANULI

L'ambiente interno della cellula viene chiamato citoplasma o citosol. È una soluzione acquosa tamponata ad un pH tra 5 e 6, contenente vari organuli indispensabili per la sopravvivenza della cellula, tra cui reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, vacuolo, mitocondri e nucleo (I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Nei Funghi unicellulari, come i Lieviti, la struttura cellulare è tendenzialmente sferica e il citoplasma è mononucleato [Fig.17]. Nei Funghi filamentosi pluricellulari si osserva, invece, un allungamento della struttura cellulare che le conferisce un aspetto tubulare e filiforme, di nome ifa [Fig.18] (I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Le ife si possono distinguere in:

- settate (o acenocitiche), mono e polinucleate
- non settate (o cenocitiche), polinucleate.

Gli Ascomiceti presentano ife acenocitiche polinucleate. I setti sono dotati di pori che permettono la comunicazione e il passaggio degli organelli cellulari tra i vari compartimenti ifali, tra cui i nuclei cellulari, favorendo la crescita miceliare.

La presenza di setti aumenta la rigidità dell'ifa, limitandone il collasso quando la pressione di turgore è bassa, situazione che si riscontra in condizioni di disidratazione. Inoltre, mediante i corpi di Woronin, i setti hanno l'aggiuntivo ruolo di delimitare e isolare i danni meccanici, prevenendo le perdite citoplasmatiche. È possibile che alcuni compartimenti ifali occludano totalmente i loro setti, trasformandosi in cellule indipendenti e in grado di formare un nuovo micelio mediante un processo di riproduzione per frammentazione (R.R. Mouriño-Pérez, 2013; S. Manente, 2018).

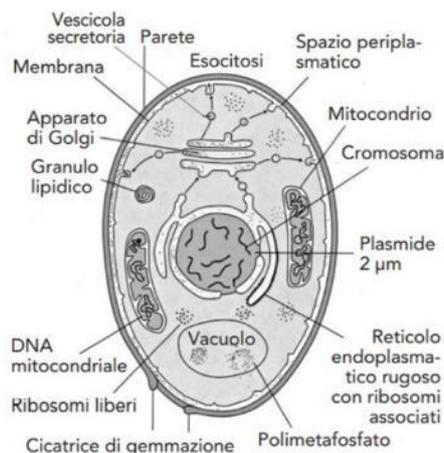


Figura 17: Schema della cellula di *Saccharomyces cerevisiae* e i suoi corpuscoli citoplasmatici: reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, vacuolo, mitocondri e nucleo. Fonte: P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017.

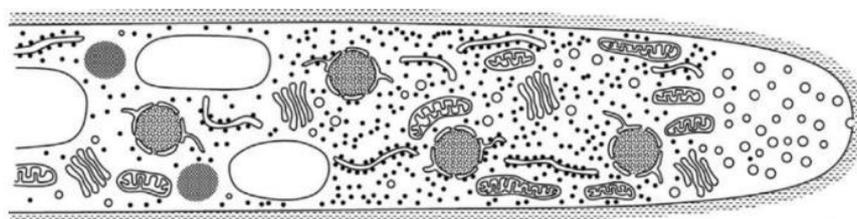


Figura 18: Schema della struttura cellulare e citoplasmatica di un'ifa. Fonte: I. Money, 2016b.

Il reticolo endoplasmatico è una complessa rete di membrane che si distingue in reticolo endoplasmatico rugoso quando è rivestito, nel lato citoplasmatico, da ribosomi, e in reticolo endoplasmatico liscio quando i ribosomi sono assenti (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016b). In questo apparato vengono sintetizzate, da parte dei ribosomi del reticolo endoplasmatico rugoso, le proteine, mentre nel reticolo endoplasmatico liscio vengono sintetizzati i polisaccaridi di riserva e i lipidi di membrana (M.G. Fiorin, 1993; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

I materiali sintetizzati dal reticolo endoplasmatico vengono trasportati nell'apparato di Golgi, la cui funzione è quella di modificarli in modo da poterli trasportare a loro volta, mediante esocitosi, verso la membrana plasmatica, le membrane degli altri organuli o il vacuolo (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

I vacuoli sono vaste vescicole mobili, in grado di inglobare ed immagazzinare sostanze nutritive, vengono inoltre utilizzati per secernere i prodotti cellulari di scarto e le tossine assorbite dall'ambiente (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016b; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Nella zona periferica del citoplasma sono presenti organuli cilindrici addetti alla produzione energetica cellulare: i mitocondri. Presentano due membrane, una esterna ed una interna caratterizzata da numerose creste. Al loro interno vengono sintetizzate le molecole di ATP e si realizza la respirazione cellulare (M.G. Fiorin, 1993; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

All'interno della cellula è presente il nucleo, un corpuscolo generalmente sferico, che è separato dal citosol mediante la membrana cellulare, la quale presenta dei pori per lo scambio tra il comparto nucleare e quello citoplasmatico. All'interno del nucleo avviene la sintesi degli acidi nucleici DNA e RNA, contenenti il corredo genetico della cellula (M.G. Fiorin, 1993).

Il citoplasma presenta delle strutture proteiche che costituiscono il citoscheletro cellulare, il cui ruolo è di sostenere la forma della cellula e direzionare il movimento degli organuli interni. Questo intreccio proteico è formato essenzialmente da microfilamenti di actina, septina e microtubuli di monomeri di α - e β -tubulina (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016b).

1.2.3. ASCOMICETI

Il phylum degli Ascomiceti è il più vasto del regno dei Funghi ed include organismi molto diversi tra loro, come Lieviti, Funghi filamentosi, o Muffe, e funghi a cappello (corpo fruttifero, o stadio aereo del ciclo vitale). Al suo interno si ritrovano le maggiori specie attive nei processi di biodegradazione e biodeteriorazione dei materiali di cui fanno parte anche i Beni Culturali (M.G. Fiorin, 1993; M. Blackwell e J.W. Spatafora, 2004; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; I. Money, 2016a; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Come nella maggior parte dei Funghi, gli Ascomiceti possono presentare nel loro ciclo vitale l'alternanza di una fase asessuale *anamorfa* e una fase sessuale *teleomorfa*, con produzione di spore, rispettivamente asessuali o sessuali, atte alla formazione di nuovi miceli, cioè di un nuovo corpo fungino filamentoso ifale (M.G. Fiorin, 1993).

Nella fase anamorfa, gli Ascomiceti producono spore asessuali dette *conidi* poste all'interno di strutture chiamate *conidiofori*. I conidi si formano nella parte terminale del conidioforo e si possono distribuire come singole spore, a catenella o in ammassi compatti (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016a; I. Money, 2016c).

Molto comuni negli Ascomiceti (come per esempio nei generi *Aspergillus* e *Penicillium*) è la presenza di *fialidi*, cellule a forma di vaso che si trovano nella parte terminale del conidioforo e alla cui sommità sono posti i conidi distribuiti in catene, che in questo caso assumono la denominazione di *fialospore* o *fialoconidi* [Fig.18]. Si tratta di una struttura molto vantaggiosa in quanto ogni singolo conidioforo è in grado di produrre un gran numero di spore, dell'ordine di milioni per centimetro quadrato (I. Money, 2016c).

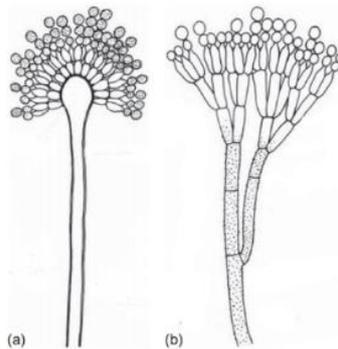


Figura 19: Conidioforo con fialidi e fialospore in: a) *Aspergillus* e b) *Penicillium*. Fonte: I. Money, 2016c.

In base alla forma dei conidi e dei processi di conidiogenesi che portano al loro sviluppo, si hanno diverse varietà di spore che hanno valore tassonomico (I. Money, 2016c).

I Funghi unicellulari, come il *Saccharomyces cerevisiae*, hanno la possibilità di attuare due tipi di riproduzione asessuale: per scissione trasversa o, più frequentemente, per gemmazione. Entrambi i processi si basano sulla duplicazione del materiale genetico e sulla mitosi ma, mentre con la scissione trasversa la citogenesi porta alla formazione di due cellule con massa citoplasmatica uguale, con la gemmazione la cellula figlia risulta più piccola della madre a causa di una distribuzione diseguale del citosol (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016a; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

Quando il lievito si riproduce per gemmazione, le pareti cellulari della madre e della figlia presentano una zona cicatriziale ben evidente in corrispondenza del punto di separazione. Quando la cellula madre viene totalmente ricoperta da queste cicatrici non è più in grado di duplicarsi, anche se è comunque in grado di proseguire le sue attività metaboliche (G.T. Cole e Y. Nozawa, 1981; M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016a).

Come per tutti gli organismi che la utilizzano, la riproduzione asessuata rappresenta il metodo più efficace per la propagazione della specie ma non consente alcuna variazione nel corredo genetico (M.G. Fiorin, 1993).

Gli Ascomiceti, nella fase teleomorfa, producono spore sessuali, chiamate *ascospore*, tramite cellule caratteristiche chiamate *aschi*, da cui il phylum prende il nome (M.G. Fiorin, 1993; M. Blackwell e J.W. Spatafora, 2004; I. Money, 2016a). Gli aschi, che racchiudono generalmente otto

ascospore (con delle eccezioni: ad esempio il *Saccharomyces cerevisiae* ne produce solo quattro), possono essere prodotti direttamente sulle ife vegetative del micelio, come nel caso dei lieviti, oppure possono essere contenute all'interno di un corpo fruttifero, detto *ascocarpo* o *ascoma* (M.G. Fiorin, 1993; I. Money, 2016a). L'ascoma, in base alla sua morfologia, si può distinguere in (I. Money, 2016a):

- apotecio (a forma di coppa),
- peritecio (a forma di fiasco con una singola apertura apicale per l'uscita delle spore),
- cleistotecio (a forma globulosa e chiusa).

Pur meno vantaggiosa dal punto di vista quantitativo delle spore prodotte, la riproduzione sessuale permette la combinazione del corredo genetico, favorendo l'adattamento ambientale della specie (M.G. Fiorin, 1993). Infatti, la riproduzione sessuale viene attuata quando i nutrienti sono esauriti o le condizioni esterne (dettate da fattori come la temperatura, il pH, la concentrazione di ossigeno e di diossido di carbonio) sono diventati sfavorevoli per la sopravvivenza. La produzione di spore sessuali può avere due fini: lo spostamento del micelio in un ambiente differente attraverso dispersione via aria o acqua; oppure di sopravvivenza e di resistenza *in loco* della specie quiescente fino alla re-introduzione di nuovi nutrienti. In quest'ultimo caso le spore presentano una parete cellulare molto spessa, oltre a presentare al loro interno accumuli di nutrimenti di riserva in modo da sopravvivere per il più a lungo possibile (J.E. Smith e altri, 1981; I. Money, 2016c; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017).

La spora fungina, quando trova condizioni ambientali favorevoli, germina formando dei filamenti, detti *ife*. Esse si diramano nel substrato, accrescendosi e spesso ramificandosi sempre di più, fino a formare una struttura morfologicamente caratteristica (*colonia*) per colore, forma, spessore, bordo, presenza di aloni, etc., ovvero con una particolare e distintiva *texture*, in condizioni ottimali di forma circolare e assolutamente dipendente per le sue caratteristiche dal substrato metabolico di crescita (M.G. Fiorin, 1993; J.C. Zac e M.R. Willing, 2014; I. Money, 2016b).

Per introdursi all'interno del substrato in cerca di nutrimento, le ife combinano forza meccanica e degradazione enzimatica. Le secrezioni enzimatiche, sostanzialmente delle idrolasi, hanno il doppio compito di modificare le cellule dell'organismo ospite per facilitare la colonizzazione e di digerire i complessi polisaccaridici, proteici e lipidici per la formazione di zuccheri solubili e molecole meno complesse e maggiormente assimilabili. Quando le ife vegetative trovano una fonte di nutrimento, la crescita viene indirizzata verso essa e la morfologia della colonia può mutare (S. Hacquard, 2014; I. Money, 2016b).

A differenza delle ife vegetative, le ife aeree sono dei filamenti che si possono estendere al di sopra del substrato; quindi non si propagano penetrando nel terreno ma espandendosi in aria. Anche se non necessitano di forza per scavare, hanno comunque bisogno di una certa pressione cellulare, detta turgore, in modo da supportare l'orientazione verticale delle cellule (I. Money, 2016b).

Se il Fungo si trova in un ambiente acquoso, le ife possono secretare delle idrofobine, proteine idrofobiche atte a ridurre la tensione superficiale che si crea tra l'interfaccia aria/acqua. Le idrofobine facilitano inoltre l'attacco delle ife sulle superfici idrofobiche (I. Money, 2016b).

L'architettura del micelio varia in base alla specie e alle condizioni ambientali, ma si riconoscono sempre un corpo denso e concentrato in vicinanza al punto di origine (*tallo fungino*), ed un micelio aereo fatto da ife che si diffondono velocemente nell'area circostante, formando un micelio più sottile, ma ampio (I. Money, 2016b). Il micelio aereo ha funzione replicativa, mentre il micelio vegetativo, composto da ife che si addentrano nel substrato, ha funzione nutritiva. Generalmente, le ife appena formate e in crescita sono di colore bianco o chiaro mentre, a mano a mano che il micelio invecchia, assumono colorazioni caratteristiche in base alla specie che le ha prodotte (M.G. Fiorin, 1993).

1.2.4. I FUNGHI QUALI BIODETERIOGENI NEI BENI CULTURALI

Insieme a Batteri, Alghe, Cianobatteri, Animali e Piante, i Funghi fanno parte di quegli organismi viventi in grado di danneggiare, chimicamente e/o meccanicamente, ma anche semplicemente esteticamente, la vasta gamma di materiali di cui sono composti i Beni Culturali. Si definisce tale processo *biodeterioramento* e gli organismi che lo causano sono detti *biodeteriogeni*.

Di seguito si prenderà in considerazione l'azione biodeteriogenica dei Funghi, nello specifico gli Ascomiceti, in quanto la maggior parte delle specie che causano questo fenomeno rientrano in questo phylum (M.G. Fiorin, 1993; M. Blackwell e J.W. Spatafora, 2004; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; I. Money, 2016a; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Nella seguente tabella [Tab.1] sono elencate le specie micotiche riscontrate in diversi casi di studio. Da essa, si può evincere che i generi micotici più comuni sono: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Alternaria*.

Tab.1: Specie micotiche riscontrate in diversi casi di studio.

LOCAZIONE ovvero SUBSTRATO METABOLICO	COLLOCAZIONE OPERA	GENERE/SPECIE	TIPOLOGIE DI DANNO	BIOFILM	FONTE BIBLIOGRAFICA
Affresco	Chiesa di S. Martin a Greene-Kreiesen, Germania	<i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Scopulariopsis</i>	Presenza di biofilm che deturpa l'estetica dell'affresco. Discolorazioni. Perdita di coesione.	Presente	A.A. Gorbushina e altri, 2004
Affresco	Sagrestia della Chiesa di S. Caterina a Vel'kà Lomnica, Slovacchia	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i>	Presenza di microflora che deturpa l'estetica dell'affresco.	Presente	D. Pangallo e altri, 2012
Affresco	Giardino del Palazzo dell'Inquisizione a Évora, Portogallo	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i>	Presenza di biofilm che deturpa l'estetica dell'affresco. Perdita di coesione. Discolorazioni.	Presente	T. Rosado e altri, 2017
Affresco e interni	Tomba del faraone Tutankhamun, Egitto	<i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i>	Presenza di macchie brune.	Assente	A. Vasanthakumar e altri, 2013

Dipinto ad olio	Archivio del "Museu Nacional de Castro", a Coimbra, Portogallo	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Penicillium copticola</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Phlebiopsis gigantea</i> , <i>Pithomyces chartarum</i>	Presenza di colonizzazione fungina che deturpa l'estetica dell'opera. Perdita di coesione.	Assente	H.P. De Carvalho e altri, 2018
Dipinto ad acrilici e grafite	Deposito del museo "Casa das História Paula Rego" a Cascais, Portogallo	<i>Alternaria</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Stachybotrys</i>	Presenza di colonizzazione fungina che deturpa l'estetica del dipinto.	Assente	H.P. De Carvalho e altri, 2019
Materiale cartaceo	Campioni da archivio	<i>Chaetomium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Myrothecium verrucaria</i> , <i>Stachybotrys atra</i>	Foxing	Assente	A. Michaelsen e altri, 2006
Materiale cartaceo	Archivio dell'Università di Coimbra, Portogallo	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Chromelosporium carneum</i> , <i>Toxicocladosporium irritans</i>	Foxing	Assente	N, Mesquita e altri, 2009
Superficie lapidea	Sito archeologico di Fiesole, Italia	<i>Alternaria</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Coprinellus</i> <i>Epicoccum</i> , <i>Phoma</i>	Presenza di biofilm che deturpa l'estetica delle opere. Macchie scure.	Presente	D. Pinna e altri, 2018

Materiale igneo	Sagrestia della chiesa di S. Antonio e S. Francesco di Aveiro, Portogallo	<i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	Presenza di colonie fungine che deturpano l'estetica dell'opera. Perdita di coesione e di materiale. Macchie rosse e scure.	Assente	A.C. Pinheiro e altri, 2013
Materiale igneo	Archivio del "Museu Nacional de Machado de Castro", a Coimbra, Portogallo	<i>Chaetomium globosum</i> , <i>Penicillium copticola</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Phlebiopsis gigantea</i> , <i>Pithomyces chartarum</i>	Presenza di colonizzazione fungina che deturpa l'estetica dell'opera. Perdita di coesione.	Assente	H.P. De Carvalho e altri, 2018
Pellicola cinematografica	Collezione del "Cuban Institute for Cinematographic Industry and Arts (ICAIC)"	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Microascus</i> , <i>Penicillium</i>	Presenza di colonie fungine e macchie marroni. Perforazioni della pellicola.	Presente	I. Vivar e altri, 2013

1.2.4.1. FATTORI CHE INFLUENZANO L'ATTACCO MICROBIOLOGICO

Le caratteristiche del materiale, le condizioni ambientali e i microrganismi coinvolti, determinano la predisposizione ad un attacco biodeteriogeno del Bene Culturale.

Caratteristiche del materiale

Le caratteristiche fisiche e chimiche di un materiale possono favorire o meno l'attacco da parte dei microrganismi.

I parametri fisici di una superficie sono (M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015):

- rugosità,
- porosità,
- grado di assorbimento di acqua,
- grado di idrofobicità.

Più una superficie è rugosa o presenta pori, più è in grado di offrire una maggiore superficie d'appoggio per microrganismi, spore, polvere ed ife, oltre ad offrire maggiori rientranze in grado di trattenere acqua, l'elemento fondamentale per la proliferazione e la colonizzazione biologica (M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

I parametri chimici di un materiale dipendono, invece, dalla sua composizione chimica. I Funghi sono organismi che, per sopravvivere, possono utilizzare un'ampia gamma di sostanze organiche, come zuccheri, proteine e lipidi, provenienti dal substrato. Alcune di queste sostanze organiche, come cellulosa, lignina e cheratina, sono inutilizzabili per la maggior parte degli organismi con cui si trovano a competere, in particolare i Batteri, facendo dei Funghi degli organismi con una impareggiabile versatilità (M.G. Fiorin, 1993).

Un esempio di tipologia di Bene Culturale che si presenta come una ricca fonte di nutrimento è il dipinto a tempera o ad olio, in quanto coesistono fonti di cellulosa (presenti nella tela e nelle cornici di legno), di proteine e di lipidi (presenti nelle colle animali, come la colla di coniglio, e nei leganti, come il tuorlo d'uovo e gli oli) (K.L. Garg e altri, 1995; D. Pangallo e altri, 2012; A. Pavić e altri, 2015; H.P. De Carvalho e altri, 2019). È stato riscontrato, invece, che i metalli pesanti che compongono alcuni pigmenti (es: rame, piombo, zinco, cromo) hanno effetto inibitorio parziale o totale sulla crescita microbica (K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; A. Pavić e altri, 2015; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Anche la carta è una fonte potenzialmente ricca di nutrimento, in quanto composta da cellulosa, un polimero del glucosio. Si riscontra un livello minore di biodeterioramento nella carta di giornale, fenomeno riconducibile alla maggior presenza di lignina, polimero ramificato difficilmente scindibile, che sembra proteggere parzialmente le molecole di cellulosa da alcuni attacchi micotici. Anche la presenza di cere naturali e/o adesivi e collanti sintetici, come composti vinilici, resine acriliche e derivati della cellulosa, abbassano (ma non eliminano) la probabilità di un attacco biologico. Gli adesivi e i collanti di origine naturale, come amido, caseina e destrina, invece, risultano facilmente degradabili da parte dei Funghi (F. Gallo, 1992; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

Bisogna tenere conto, quindi, che un Bene Culturale può essere composto da diverse tipologie di materiali, organici e inorganici, che gli conferiscono una composizione chimica specifica e, spesso, unica. Ognuno di essi deve essere analizzato, pertanto, come un caso a sé, senza cadere in fuorvianti generalizzazioni.

Caratteristiche ambientali

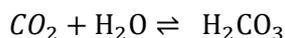
I fattori ambientali che influiscono maggiormente sullo sviluppo e sulla colonizzazione degli agenti microbiologici sono:

- il pH;
- l'umidità e la presenza di acqua;
- la temperatura;
- l'inquinamento ambientale,
- la presenza di sali.

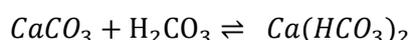
Il biodeterioramento di un Bene Culturale è favorito da un pH tendenzialmente acido. La maggior parte dei Funghi, in particolare, crescono ottimamente se il pH è compreso tra 5 e 7 (F. Gallo, 1992). Il materiale cartaceo che presenta un pH maggiore di 8, infatti, non viene generalmente attaccato dai microrganismi (M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015). Anche gli affreschi, che presentano un pH alcalino elevato, sono tendenzialmente protetti dagli attacchi microbiologici, anche se nella quotidianità è piuttosto comune riscontrare la presenza di muffe sulle loro superfici. Il biodeterioramento degli affreschi avviene, infatti, come conseguenza di reazioni che acidificano il medium, come la dissoluzione o la solfatazione del carbonato di calcio. La dissoluzione avviene a causa del biossido di carbonio, un'anidride proveniente principalmente dalla respirazione degli esseri viventi. Essa, a contatto con l'acqua piovana si trasforma in acido carbonico che reagisce a sua volta con i carbonati, trasformandoli in bicarbonati solubili, che acidificano il pH dell'affresco, promuovendo così la colonizzazione da parte dei miceti (K.L. Garg e altri, 1995; W. Sand, 1997; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

Specificatamente, le reazioni del processo di dissoluzione sono le seguenti:

- 1) l'anidride carbonica reagisce con l'acqua, formando acido carbonico



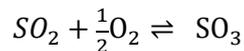
- 2) il carbonato di calcio reagisce con l'acido carbonico, formando bicarbonato di calcio solubile



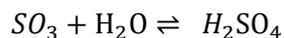
La solfatazione avviene a causa dell'anidride solforosa atmosferica, un inquinante che proviene principalmente dai gas di scarico. A contatto con l'acqua piovana, l'anidride solforosa si trasforma in acido solforico che reagisce a sua volta con i carbonati, trasformandoli in gesso insolubile e anidride carbonica, che acidificano il pH dell'affresco (K.L. Garg e altri, 1995; W. Sand, 1997; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

Le reazioni del processo di solfatazione sono le seguenti:

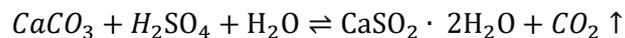
- 1) l'anidride solforosa reagisce con l'ossigeno atmosferico, con formazione di anidride solforica



- 2) l'anidride solforica reagisce con l'acqua, formando acido solforico



- 3) il carbonato di calcio reagisce con l'acido solforico e l'acqua, con formazione di solfato di calcio biidrato (gesso) e anidride carbonica



Anche la disponibilità di luce può essere un fattore che può indurre o meno alla colonizzazione microbica, soprattutto da parte degli organismi fototrofi. I Funghi, però, sono organismi eterotrofi e la luce non è necessaria per la loro sopravvivenza, come si può riscontrare dalle numerose colonizzazioni micotiche in catacombe, grotte e angoli bui delle abitazioni (K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

L'umidità è un ulteriore fattore determinante per la crescita micotica. La maggior parte dei microrganismi riesce a crescere se l'umidità relativa è maggiore a 65%, mentre le spore fungine riescono a germinare con umidità relativa tra il 75 e il 95%. Quando queste condizioni di umidità sono costanti, lo sviluppo ifale è favorito, portando alla formazione di conidi e conidiospore in sole 48-72 ore (K.L. Garg e altri, 1995; M.R. Fidanza e G. Caneva, 2019). Alcune specie fungine, come i generi *Aspergillus* e *Penicillium*, sono in grado di germinare a valori di umidità relativa di poco superiori al 60%. Con la loro iniziale colonizzazione del substrato e la loro tendenza ad accumulare acqua, favoriscono gli attacchi di altri microrganismi che necessitano di maggiore quantità idrica per svilupparsi (F. Gallo, 1992).

La temperatura considerata ottimale per la maggior parte dei Funghi rientra in un *range* tra i 20 e i 35 °C, anche se esistono specie che presentano un *range* più esteso (K.L. Garg e altri, 1995). Quando l'ambiente in cui si trova il Bene Culturale è un interno umido non riscaldato o l'innalzamento della temperatura è solo periodica (come in alcune chiese, nelle cripte o nelle grotte), il clima risulta particolarmente stabile: in questo modo si favorisce la proliferazione di muffe e spore fungine, queste ultime spesso trasportate dai visitatori o dagli addetti del settore (A.A. Gorbushina e altri, 2004; M.R. Fidanza e G. Caneva, 2019).

Gli ambienti esterni sono meno stabili climaticamente, in quanto suscettibili dall'alternanza stagionale, meteorica e dai cicli giorno/notte. L'attacco biologico, in questi casi, è altamente influenzato dalla presenza di acqua e dagli inquinanti ambientali, come polvere, sporco, cellule morte, escrementi e composti organici volatili idrocarburici. Gli inquinanti ambientali sono particelle in grado di depositarsi sulla superficie del Bene Culturale, formando multipli strati che possono fungere sia da fonte di nutrizione che di ancoraggio per i diversi microrganismi (K.L. Garg e altri, 1995; A. Pavić e altri, 2015; T. Rosado e altri, 2017; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Anche il deposito salino, che si crea dal contatto o per la prossimità all'acqua marina, può formare multipli strati in grado di favorire l'ancoraggio di Funghi resistenti al cloruro di sodio, tra cui i generi: *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (K.L. Garg e altri, 1995).

1.2.4.2. COLONIZZAZIONE DEL SUBSTRATO E MECCANISMI DI DANNO

La colonizzazione microbiologica del substrato si può suddividere in due fasi: adesione e aggregazione.

Nella fase di adesione, la spora fungina si ancora alla superficie formando le prime ife, il processo è dettato dall'affinità tra la spora e le caratteristiche ambientali e chimico-fisiche del Bene. Nella fase di aggregazione avviene la formazione di un complesso intreccio di ife che portano alla formazione del micelio, il quale si espande il più possibile in ricerca di nutrimento (M.G. Fiorin, 1993; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

Queste due fasi si riscontrano anche nella colonizzazione da parte di Batteri e Funghi unicellulari, i quali non formano ife o miceli, ma un biofilm: un aggregato idrato e complesso di cellule, depositi biologici, sostanze polimeriche extracellulari, materiali di scarto, nutrienti e particelle inorganiche (M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; T. Rosado e altri, 2017).

Il biofilm ricopre la superficie del Bene e altera *in primis* il suo aspetto estetico. Inoltre, le sostanze contenute nel biofilm possono modificare le caratteristiche chimiche e strutturali della superficie con cui è in contatto, rendendola maggiormente porosa e portandola da una parte ad accumulare acqua e dall'altra a sgretolarsi (W. Sand, 1997; T. Rosado e altri, 2017). Inoltre, il biofilm può svilupparsi in una crosta che funge da "tappo" in grado di trattenere il calore e l'acqua. Si forma, in questo modo, un microclima caldo e umido stabile, in grado di favorire ulteriore crescita microbiologica (W. Sand, 1997; J. Garty, 2011).

I batteri sono spesso i primi colonizzatori di affreschi e abitazioni, possono creare biofilm con microcondizioni ambientali e superficiali che si rivelano particolarmente adatte per l'adesione delle spore e la crescita delle ife fungine, oltre ad essere loro stessi una fonte nutritiva di materiale organico (K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015). I microrganismi che compongono il biofilm (Batteri, Alghe, Cianobatteri e Funghi) possono creare delle relazioni di cooperazione o di antagonismo. La specie *Aureobasidium pullulans*, ad esempio, riesce a colonizzare i substrati ricchi di cellulosa solo in presenza di Funghi in grado di degradarla mediante enzimi specifici, come nel caso dei generi *Aspergillus*, *Alternaria* e *Cladosporium* (K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Il fenomeno di biodeterioramento, provocato dalla colonizzazione del materiale da parte del micete, può avvenire mediante la contemporanea azione meccanica-fisica e chimica. In base al tipo di microrganismo, alle condizioni ambientali e al substrato colonizzato, può esserci una predominanza di un processo rispetto all'altro (K.L. Garg e altri, 1995; D. Pangallo e altri, 2012; T. Rosado e altri, 2017; H.P. De Carvalho e altri, 2019; M.R. Fidanza e G. Caneva, 2019). Il meccanismo di biodeterioramento meccanico-fisico è il risultato dell'azione fisica di penetrazione delle ife e dalla crescita miceliare. Nei dipinti, ad esempio, questo fenomeno porta a disgregazioni, spaccature, perdita di coesione tra i vari strati pittorici, con conseguenti distacchi e polverizzazioni, fino alla completa distruzione del Bene Culturale. Inoltre, se il micelio non si forma in superficie, ma all'interno degli strati pittorici, provoca la formazione di bolle e crateri con conseguente indebolimento strutturale (K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; T. Rosado e altri, 2017; H.P. De Carvalho e altri, 2019; M.R. Fidanza e G. Caneva, 2019; M.A. Kakakhel e altri, 2019).

Il meccanismo di biodeterioramento chimico avviene attraverso reazioni chimiche tra il substrato e i metaboliti prodotti dal micete, spesso catalizzate dagli eventuali composti organici e inorganici inquinanti ivi depositatesi. Questi prodotti fisiologici sono secreti per scopi assimilatori (per favorire il nutrimento), dissimilatori (per favorire il movimento e la crescita), di *soiling* (per favorire l'adesione del micelio e la formazione di biofilm) o di scarto. Queste sostanze, se a contatto con il materiale, possono danneggiare, macchiare e deturpare irrimediabilmente la sua superficie (K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Gli enzimi extracellulari secreti dalle diverse specie micotiche hanno perlopiù ruolo assimilativo. Trasformano, infatti, le molecole complesse del substrato (come proteine, cellulosa e lignina) in molecole più semplici, solubili in acqua e facilmente assimilabili. Esempi di complessi enzimatici sono le proteasi per la scissione di molecole proteiche, le cellulasi per scissione della cellulosa e la

lignina perossidasi per la scissione della lignina (F. Gallo, 1992; K.L. Garg e altri, 1995; N. Mesquita e altri, 2009). I prodotti di tali reazioni enzimatiche possono essere utilizzati anche da altri Funghi o batteri, come il già citato caso del *Aureobasidium pullulans* che colonizza materiali ricchi di cellulosa ma solo in presenza di specie in grado di secretare enzimi cellulolitici (K.L. Garg e altri, 1995; H.P. De Carvalho e altri, 2019).

Le sostanze acide prodotte durante le attività metaboliche dei Funghi, come l'acido gluconico, ossalico, malico, succinico, aspartico e acetico, possono reagire con il substrato attraverso solubilizzazione dei cationi o chelazione con i metalli presenti nei pigmenti (K.L. Garg e altri, 1995; W. Sand, 1997; A. Vasanthakumar e altri, 2013; M.A. Kakakhel e altri, 2019). Queste reazioni possono portare alla formazioni di Sali, come ad esempio la Whewellite ($Ca(C_2O_4) \cdot (H_2O)$) e la Weddellite ($Ca(C_2O_4) \cdot 2(H_2O)$), prodotti dalla reazione tra l'acido ossalico ($H_2C_2O_4$) e gli ioni calcio presenti nella calce di un affresco o di una pietra carbonatica (K.L. Garg e altri, 1995). Anche il biossido di carbonio, prodotto dalla respirazione, può reagire con l'acqua e formare acido carbonico. Esso reagisce con il carbonato di calcio e di magnesio, formando bicarbonati solubili e riducendo il pH; ciò rende i metalli presenti maggiormente suscettibili alla corrosione e il substrato alla biodeteriorazione da parte di microrganismi acidofili (W. Sand, 1997; K.L. Garg e altri, 1995; M. Falkiewicz-Dulik e altri, 2015).

Un'ulteriore conseguenza dell'attività metabolica dei Funghi è la produzione di pigmenti organici che provocano alterazioni estetiche spesso irreversibili. La formula chimica di tali sostanze è caratteristica della specie fungina e può rientrare in diverse classi chimiche, come gli antrachinoni, le melanine e i carotenoidi (K.L. Garg e altri, 1995; D. Pangallo e altri, 2012; H.P. De Carvalho e altri, 2019). Ad esempio, l'*Alternaria alternata* e il *Cladosporium cladosporioides* sono in grado di secretare pigmenti a base di melanina (H.P. De Carvalho e altri, 2019). Le colorazioni che provocano tali pigmenti sono molteplici (neri, rosse, brune, verdi, grigi, blu, viola), ma non hanno valore tassonomico. Infatti, sono influenzate non solo dalla composizione chimica del pigmento, ma anche dalla tipologia di substrato, dalle condizioni ambientali (pH, umidità), dalla possibile interazione di altre specie microbiche e dalla fase di crescita di queste ultime (F. Gallo, 1992; K.L. Garg e altri, 1995).

Nei materiali cartacei, tale fenomeno di pigmentazione viene definito come *foxing* di origine biologica. Le macchie di *foxing* si presentano con colorazioni tendenzialmente bruno-rossicce (da cui il nome), ma sono comuni anche colorazioni rosse, gialle, violacee, verdi e nere. In alcuni casi si presentano come piccole macchie isolate e con margini netti, altre volte le dimensioni sono maggiori e i perimetri più irregolari. I Funghi maggiormente associati a questo fenomeno rientrano nei generi *Aspergillus* e *Penicillium* (F. Gallo, 1992). Il *foxing* potrebbe avere anche origini abiotiche, come reazioni di ossidazione dei metalli contenuti negli inchiostri, anche se viene maggiormente associato ad origini biotiche (N. Mesquita e altri, 2009).

Alcuni Funghi, nel pieno del loro sviluppo, sono in grado di produrre micotossine, sostanze chimiche tossiche che, se inalate, ingerite o assorbite, possono provocare nell'uomo micosi, allergie e asma (F. Gallo, 1992; N. Mesquita e altri, 2009), ma pure fenomeni tossico-nocivi di avvelenamento. Proprio per questo, oltre che per la perdita dell'informazione storico-culturale-estetica direttamente correlata al Bene stesso, occorre prevenire il potenziale attecchimento di spore e/o frammenti fungini (e batterici), tenendo sotto controllo il possibile sviluppo e la conseguente proliferazione dei microrganismi, impedendo loro di utilizzare il Bene Culturale alla stregua di un mero substrato metabolico, da cui poter ricavare fonte di sostentamento carbonioso ed energetico.

2. STRUMENTI, TECNICHE E MATERIALI

2.1. DIPINTO IN ESAME

Il dipinto utilizzato per testare l'efficacia biocida degli oli essenziali fa parte di una particolare tipologia di manufatto artistico, il cui "essere opera d'arte", o meno, è al momento al centro di un acceso dibattito culturale. Si tratta, infatti, di una copia 3D della "Natività con i Santi Lorenzo e Francesco d'Assisi", eseguita da Caravaggio (XVII secolo): l'originale è stato trafugato nel 1969 dall'Oratorio di San Lorenzo di Palermo e mai ritrovata.

La copia 3D dell'olio su tela di Caravaggio è stata eseguita dalla ditta Factum Arte e dal 2015 è esposta nell'Oratorio di San Lorenzo, nello spazio originale a lei destinato [Fig.20].



Figura 20: Facsimile ad opera della FACTUM ARTE della Natività di Caravaggio (a sinistra) e la sua collocazione nell'Oratorio di San Lorenzo a Palermo nel 2015 (a destra). Fonte: <https://www.factum-arte.com/pag/1181/nativity-with-saint-francis-and-saint-lawrence>

La ditta Factum Arte (sito web: factum-arte.com) è nata nel 2001 a Madrid ed ha lo scopo di realizzare riproduzioni di opere d'arte in scala 1:1 unendo le abilità artigianali con le tecnologie più innovative, come lo scanning e la digitalizzazione dell'opera in alta risoluzione mediante NUB3D Scanner. Il processo avviene in totale sicurezza, in quanto non avviene un contatto diretto tra lo scanner e la superficie dell'opera, vengono inoltre utilizzate luci e led integrati, in modo da non utilizzare raggi ultravioletti e generare bassissima quantità di calore, fattori che potrebbero degradare l'opera originale. Lo scanner non riproduce solamente il colore e l'immagine dell'opera, ma ne mette anche in evidenza la tridimensionalità e gli spessori, nonché le irregolarità, i ritocchi e le diverse forme di usura provocate dal passare del tempo. Le informazioni così acquisite vengono digitalizzate e convertite in facsimili in tre dimensioni, mediante Epson Pro 9600 digital printer. Questo procedimento è stato attuato per la realizzazione del facsimile delle "Nozze di Cana" del Veronese, commissionata dalla Fondazione Giorgio Cini di Venezia in collaborazione con il Museo del Louvre.

La ditta Factum Arte è stata contattata da svariati musei ed istituzioni per eseguire facsimili di opere d'arte sia antiche che moderne, come il Museo del Prado e il Museo Nacional Centro de Arte Reina Sofia di Madrid, i già citati Museo del Louvre di Parigi e la Fondazione Giorgio Cini di Venezia.

Nel caso della Natività di Caravaggio non è stato possibile eseguire lo scan dell'opera originale, in quanto dispersa, l'unica fotografia di qualità dell'originale è stata scattata da Enzo Brai nel 1968. Per comprendere come Caravaggio eseguisse i suoi dipinti, sono stati sottoposti a scan tre opere

dell'artista, ciò ha permesso di raccogliere informazioni preziose riguardo alla tecnica esecutiva dei diversi strati pittorici ed al tipo di craquelure formatosi. Utilizzando come riferimento la foto del 1968 unita alle informazioni raccolte sugli studi delle altre opere del Caravaggio, è stata ricostruita la fedele riproduzione, prima digitale e in seguito fisica mediante stampa 3D. Sono inoltre stati integrati a mano i dettagli pittorici impossibili da riprodurre.

Alcune parti del facsimile, nella versione definitiva appena antecedente alla copia che è stata poi esposta a Palermo in scala 1.1, sono state richieste alla FactumArte e da questa donate per essere utilizzate a fini di ricerca.

È appunto su tasselli di colore diverso che sono in corso degli studi *in vitro* sul possibile deterioramento e biodeterioramento dell'opera [dati che esulano da questo lavoro di tesi]. Alcuni di tali tasselli, su cui è stato fatto un inoculo di Funghi, sono poi stati messi in presenza di vapori degli oli essenziali qui utilizzati.

2.2. OLI ESSENZIALI IN ESAME

Gli oli essenziali selezionati per questa ricerca, illustrati nella [Tab.2], sono i seguenti:

- di timo rosso con chemotipo “timolo” (*Tymus zygis*),
- di chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*),
- di basilico (*Ocimum basilicum*),
- di bergamotto (*Citrus bergamia*),
- di lavanda (*Lavandula angustifolia*),
- di mandarino (*Citrus reticulata*),
- di rosmarino (*Rosmarinus officinalis*),
- di tea tree (*Malaleuca alternifolia*).

Tab.2: Oli essenziali utilizzati in questa ricerca.

Oli essenziali	Pianta/e di origine	Marca	Metodo di estrazione	Data di estrazione
Timo Rosso di Spagna	Miscela tra: • <i>Thymus vulgaris</i> “bianco” • <i>Thymus zygis ssp. gracillis</i> “rosso” Famiglia: Lamiaceae	Drom Fragrances	Distillazione in corrente di vapore	16/03/15
Chiodi di garofano	<i>Syzygium aromaticum</i> (detto anche <i>Eugenia caryophyllata</i>) Famiglia: Myrtaceae	Farmacia Dr. Burati (Ve)	Distillazione in corrente di vapore	11/10/12
Basilico Grand Vert	Miscela tra: • <i>Ocimum basilicum</i> “Methyl Chavicol type” • <i>Ocimum basilicum</i> “Linalool type” Famiglia: Lamiaceae	Drom Fragrances	Distillazione in corrente di vapore	01/10/15
Bergamotto	Frutti di <i>Citrus aurantium bergamia</i> Origine: Italia Famiglia: Rutaceae	EOS Secondo Natura	Distillazione in corrente di vapore	
Lavanda 40/42%	Fiori di <i>Lavandula angustifolia L.</i> Famiglia: Lamiaceae	Drom Fragrances	Distillazione in corrente di vapore	27/02/15
Mandarino	Buccia e foglie di <i>Citrus reticulata</i> Origine: Cina Famiglia: Rutaceae	Laguna Moon	Distillazione in corrente di vapore	

Rosmarino	Foglie di <i>Rosmarinus officinalis</i> Origine: Spagna Famiglia: Lamiaceae	Laguna Moon	Distillazione in corrente di vapore
Tea tree	Foglie e germogli di <i>Melaleuca alternifolia</i> Origine: Australia Famiglia: Myrtaceae	Laguna Moon	Distillazione in corrente di vapore

Olio essenziale di timo

Secondo L'European Medicines Agency del 2010, la composizione dell'olio essenziale di timo rosso con chemotipo "timolo" in commercio è il risultato della distillazione dei fiori freschi di *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* Loefl. Ex. L. o di una miscela di entrambe le specie. Nel caso di questa ricerca, si tratta di quest'ultima eventualità.

L'olio essenziale di timo è stato riconosciuto come un elemento generalmente sicuro (*Generally recognized as safe* o "GRAS") dall'United States Food and Drug Administration e trova impiego in campo alimentare (come aromatizzante e conservante), cosmetico e medico (contro problemi cutanei come acne, eczemi e punture di insetto) (S. Mandal e M. DebMandal, 2016b).

È riconosciuto, anche, per avere un'attività antimicrobica ad ampio spettro, grazie alla presenza di timolo nella sua composizione, il quale può attuare effetti sinergici con altri suoi componenti, come il *p*-cimene (S. Mandal e M. DebMandal, 2016b).

Sono stati intrapresi numerosi studi riguardanti l'effetto antimicotico dell'olio essenziale di timo e i loro risultati sono molto promettenti.

M. Sapper e colleghi (2018) hanno utilizzato dei film di amido-gellano con proporzioni 9:1 e 8:2 e contenenti olio essenziale di timo (*T. zygis*) emulsionato o encapsulato con lecitina, per testare in vitro le proprietà antifungali rispetto a *Alternaria alternata* e a *Botrytis fuckeliana*. Dopo sette giorni di incubazione al buio a 25 °C, è stata osservata un'inibizione della crescita dell'*A. alternata* a tutte le concentrazioni, mentre è stata osservata un'azione fungicida rispetto a *B. fuckeliana*, in quanto non è stata osservata crescita se trattato con una concentrazione di olio essenziale di 0,074 g/g. Solo sotto a questa concentrazione critica è stata osservata una crescita fungina del fungo, ma questa ha altresì provocato un'alterazione della morfologia delle cellule.

F. Reyes-Jurado e colleghi (2019) hanno analizzato l'effetto antimicrobico degli oli essenziali di origano maessicano (*Lippia berlandieri*), timo (*Thymus vulgaris*) e mostarda (*Brassica nigra*) rispetto a diverse specie batteriche (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* e *Salmonella enteritidis*) e fungine (*Aspergillus nomius*, *Eupenicillium hirayamae*, *Penicillium cinnamomipurpureum* e *P. viridicatum*), mediante il metodo della diffusione della fase vapore. È stato osservato che gli oli essenziali hanno inibito la crescita fungina, indicando un'attività fungicida. In particolare, la MIC (*Minimal inhibitory concentration*) dell'olio essenziale di timo rispetto alle specie microbiche selezionate è tra 0,1 e 0,5 µg/mL.

M. Zabka e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicotico di diversi oli essenziali rispetto ad *Alternaria alternata*, *Stachybotrys charatrum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Aspergillus niger*, utilizzando il metodo della diluizione su agar. Dopo sette giorni di incubazione a 21 °C, si è osservato che l'olio essenziale di timo (*T. vulgaris*) a concentrazione 1 µg/mL ha inibito al 100% la crescita di tutte le specie fungine in analisi. La MIC (*Minimal inhibitory concentration*) dell'olio essenziale di timo rispetto alle specie fungine selezionate è tra 0,040 e 0,146 µg/mL.

Olio essenziale di chiodi di garofano

L'olio essenziale di chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*) è riconosciuto per le sue proprietà antiossidanti, antibiotiche e repellenti. Viene utilizzato anche in campo alimentare come conservante e aromatizzante (M.G. Goñi e altri, 2016).

F. Hu e colleghi (2019) hanno analizzato l'effetto antimicotico di diversi oli essenziali, tra cui quello di chiodi di garofano, rispetto ai Funghi *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *A. ochraceus*, mediante antibiogramma. Dopo tre e cinque giorni di incubazione a 28 °C, la MIC (*Minimal inhibitory concentration*) dell'olio essenziale di chiodi di garofano è 0,25 mg/mL per tutti i tre Funghi in esame, risultando così il prodotto più efficace dopo l'olio essenziale di cannella. È stata riscontrata un'inibizione della crescita miceliare e della sporulazione per tutte le specie esaminate.

A.E. Aguilar-González e colleghi (2015) hanno analizzato l'effetto inibitorio dell'olio essenziale di chiodi di garofano e di mostarda rispetto alla muffa *Botrytis cinerea*, utilizzando la fase vapore dell'olio sia *in vitro* che *in vivo* su dei campioni di fragole. Dopo cinque giorni di incubazione a 25 °C, la MIC (*Minimal inhibitory concentration*) dell'olio essenziale di chiodi di garofano è 46,28 µg/mL per i campioni *in vitro* e 11,57 µg/mL per i campioni *in vivo*.

Olio essenziale di basilico

L'olio essenziale di basilico (*Ocimum basilicum* L.) è riconosciuto come un elemento generalmente sicuro (*Generally recognized as safe* o "GRAS") dall'United States Food and Drug Administration e trova impiego principalmente in campo alimentare come aromatizzante e conservante. Esistono diversi chemotipi di oli essenziali di basilico in commercio, ma quello più utilizzato in aromaterapia e con maggiori attività antimicrobiche e antiossidanti è quello a linalolo (Q.X. Li e C.L. Chang, 2016).

S. Da Silva Gündel e colleghi (2018) hanno analizzato l'effetto antibiotico dell'olio essenziale di basilico, sia libero che in forma di nanoemulsione, rispetto *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*, mediante microdiluzione in brodo cultura. Dopo un tempo di incubazione di 24h a 37 °C, è stata osservata un'inibizione della crescita microbica sia con l'olio essenziale libero che in nanoemulsione. Riguardo quest'ultimo caso, l'effetto antibiotico è stato riscontrato anche dopo 90 giorni di analisi.

F. Hossain e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicotico dell'olio essenziale di basilico rispetto *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*, sia *in vitro* mediante metodo dell'antibiogramma, sia *in vivo* trattando con i vapori dell'olio essenziale dei campioni di riso inoculato con i Funghi sopracitati. Per quanto riguarda i test *in vitro*, dopo 72 ore di incubazione hanno presentato una MIC (*Minimal inhibitory concentration*) di 0,1% v/v per entrambi i Funghi, mentre a concentrazioni più basse è stata osservata crescita fungina dopo 8 h dall'incubazione.

M. Zabka e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicotico di diversi oli essenziali rispetto ad *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Aspergillus niger*, utilizzando il metodo della diluizione su agar. Dopo sette giorni di incubazione a 21 °C, si è osservato che l'olio essenziale di basilico (*O. basilicum*) a concentrazione 1 µg/mL ha inibito del circa 12% la crescita dell'*A. alteranta*, del 26% quella del *S. chartarum*, del 27% quella del *C. cladosporioides* e del 4% quella dell'*A. niger*.

Olio essenziale di bergamotto

Secondo L'European Medicines Agency del 2012 e R. Avila-Sosa e colleghi (2016), la composizione dell'olio essenziale di bergamotto (*Citrus bergamia* Risso) in commercio è il risultato della distillazione in corrente di vapore o dall'estrazione a freddo dell'epicarpo e, parzialmente, del mesocarpo della buccia del frutto fresco.

L'olio essenziale di bergamotto è usato principalmente nell'industria profumiera, ma ha un ruolo importante anche nell'industria alimentare come aromatizzante, in particolar modo per i tè come l'Earl Grey. Viene utilizzato anche in aromaterapia e nell'industria cosmetica e farmaceutica per la produzione di prodotti dermatologici, ginecologici e dentistici (R. Avila-Sosa e altri, 2016).

L'olio essenziale di bergamotto ha anche effetti antimicotici, in particolare provoca effetti mutageni e carcinogenici alle cellule fungine come nell'*Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *F.*

sporotrichioides, *F. oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Verticillium dahliae*, *Phomopsis* sp., *Phoma* sp. e *Myrothecium verrucaria* (R. Avila-Sosa e altri, 2016).

M. Zabka e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicotico di diversi oli essenziali rispetto ad *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chararum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Aspergillus niger*, utilizzando il metodo della diluizione su agar. Dopo sette giorni di incubazione a 21 °C, si è osservato che l'olio essenziale di bergamotto (*C. bergamia*) a concentrazione 1 µg/mL ha inibito del circa 18% la crescita dell'*A. alteranta*, del 28% quella del *S. chartarum*, del 19% quella del *C. cladosporioides* e del 13% quella dell'*A. niger*.

Olio essenziale di lavanda

L'olio essenziale di lavanda (*Lavandula angustifolia*) è conosciuto per le sue proprietà antimicrobiche, antiossidanti, antifungali, repellenti, analgesiche e sedative. Viene utilizzato in campo cosmetico, alimentare e in aromaterapia (L.A.E. Erland e S.S. Mahmoud, 2016).

Può essere utilizzato come conservante in campo alimentare contro Funghi come *Phytophthora*, *Sclerotinia* e *Botrytis*, anche se l'olio essenziale ha la tendenza ad evaporare rapidamente se esposto ad alte temperature (L.A.E. Erland e S.S. Mahmoud, 2016).

M. Zabka e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicotico di diversi oli essenziali rispetto ad *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chararum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Aspergillus niger*, utilizzando il metodo della diluizione su agar. Dopo sette giorni di incubazione a 21 °C, si è osservato che l'olio essenziale di lavanda (*L. angustifolia*) a concentrazione 1 µg/mL ha inibito del circa 50% la crescita dell'*A. alteranta*, del 78% quella del *S. chartarum*, del 53% quella del *C. cladosporioides* e del 23% quella dell'*A. niger*. La MIC (*Minimal inhibitory concentration*) dell'olio essenziale di lavanda rispetto le specie fungine selezionate è tra 1,540 e 5,352 µg/mL, ad esclusione dell'*A. niger*, la quale non è stata raggiunta.

Olio essenziale di mandarino

L'olio essenziale di mandarino (*Citrus reticulata*) è utilizzato principalmente per scopi alimentari come aromatizzante, anche se sono presenti diversi studi che riportano le sue proprietà antimicrobiche, antifungali e antiossidanti. L'olio essenziale è utilizzato anche in campo cosmetico e medico per trattamenti cutanei o per aromaterapia (S. Mandal e M. DebMandal, 2016a).

S. Javed e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicrobico di diversi oli essenziali del genere *Citrus* rispetto ai Batteri *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Escherichia coli*, *Yersinia* sp. e *Klebsiella planticola*, e ai Funghi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigates* e *Aspergillus niger*, utilizzando il metodo della diffusione su agar. Dopo un periodo di incubazione di 24h a 37 °C per i Batteri e 72h a 27 °C per i Funghi, si è osservato che 60 µL di olio essenziale di mandarino (*C. reticulata*) hanno mostrato un'attività biostatica rispetto tutti i Batteri e Funghi sotto esame.

M. Chutia e colleghi (2009) hanno analizzato l'effetto antimicotico dell'olio essenziale di mandarino (*C. reticulata* Blanco) rispetto *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* e *Helminthosporium oryzae*, mediante antibiogramma. La MIC (*Minimal inhibitory concentration*) dell'olio essenziale di mandarino rispetto alle specie fungine selezionate è di 2 mL/100mL, inibendo completamente la sporulazione fungina, ad esclusione di *C. lunata* e di *H. oryzae* dove il valore di MIC è di 0,2 mL/100mL.

Olio essenziale di rosmarino

L'olio essenziale di rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) ha un ampio uso come conservante alimentare ed è conosciuto per avere proprietà antimicrobiche, antimicotiche e antiossidanti. Viene utilizzato anche in campo farmaceutico, cosmetico e in aromaterapia (M.D. Hernández e altri, 2016).

Viene utilizzato come conservante per gli alimenti e risulta efficace verso i Funghi *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium oxysporum* (M.D. Hernández e altri, 2016).

M. Zabka e colleghi (2014) hanno analizzato l'effetto antimicotico di diversi oli essenziali rispetto ad *Alternaria alternata*, *Stachybotrys chararum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Aspergillus niger*,

utilizzando il metodo della diluizione su agar. Dopo sette giorni di incubazione a 21 °C, si è osservato che l'olio essenziale di rosmarino (*R. officinalis*) a concentrazione 1 µg/mL ha inibito del circa 14% la crescita dell'*A. alterata*, del 44% quella del *S. chartarum*, del 28% quella del *C. cladosporioides* e del 0,45% quella dell'*A. niger*.

Risultati meno promettenti sono stati riscontrati dalla ricerca di R. Ribeiro-Santos e colleghi (2017), dove è stato analizzato l'effetto antibiotico di diversi oli essenziali rispetto il Batterio *Staphylococcus aureus* e il Fungo *Penicillium sp.*, utilizzando il metodo dell'antibiogramma. Dopo un periodo di incubazione durato 24h a 35 °C per il Batterio e 48h a 25 °C per il Fungo, la MIC (*Minimal inhibitory concentration*) non è stata raggiunta neanche con la concentrazione massima di 0,43 mg/mL.

Olio essenziale di tea tree

L'olio essenziale di tea tree (*Malaleuca alternifolia*) ha un ampio uso in campo cosmetico (prodotti per capelli, creme per la pelle e per le unghie), in aromaterapia e in detergenti per il bucato. È conosciuto inoltre per le sue proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali, anti-infiammatorie e analgesiche (J.K. Aronson, 2016).

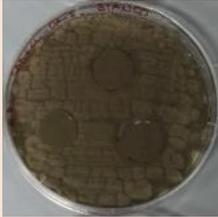
F. Chidi e colleghi (2020) hanno analizzato il potenziale antimicotico dell'olio essenziale di tea tree rispetto *Penicillium griseofulvum* isolato da lenticchie e dal *Penicillium verrucosum* isolato da uva. Hanno osservato che l'aggiunta di olio essenziale in diverse concentrazioni (soluzioni olio essenziale/acqua del 0,08%, 0,16%, 0,63%, 1,25%, 2,50% e 2,75%) arresta completamente la produzione di acido terrastrico e ocharatossina A da parte del *P. griseofulvum* e delle micotossine prodotte dal *P. verrucosum*. È stata osservata un'inibizione totale della crescita miceliare a concentrazione 2,75% per entrambi i Funghi.

A.C. Da Rocha Neto e colleghi (2019) hanno analizzato l'effetto antimicotico dell'olio essenziale di tea tree rispetto al *Penicillium expansum*, mediante esposizione dei suoi vapori a varie concentrazioni (da 0,125 g/L a 1 g/L) e a vari tempi di esposizione (da 1 a 24 ore). L'olio essenziale ha inibito la germinazione del Fungo anche a basse concentrazioni, causando danni alla membrana plasmatica delle cellule.

2.3. FUNGHI IN ESAME

Nella seguente tabella [Tab.3] sono illustrate le caratteristiche dei quattro Funghi appartenenti al phylum degli Ascomiceti presi in esame in questa ricerca di tesi: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Tab.3: Tassonomia e caratteristiche di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae*.

	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FOTOGRAFIA MACROSCOPICA	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO	EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO	EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO	EB_SAB-CL_SAC_AB_BIANCO
Terreno di coltura: <i>Sabouraud-gluco</i> sio con cloramfenicolo				
Scattata 12 giorni dopo la germinazione delle spore				
SUBPHYLUM	Pezizomycotina	Pezizomycotina	Pezizomycotina	Saccharomycitina
CLASSE	Dothideomycetes	Dothideomycetes	Eurotiomycetes	Saccharomycetes
ORDINE	Pleosporales	Capnodiales	Eurotiales	Saccharomycetales
FAMIGLIA	Pleosporaceae	Cladosporiaceae	Trichocomaceae	Saccharomycetaceae
STRUTTURA CELLULARE	pluricellulare filamentosa (muffa)	pluricellulare filamentosa (muffa)	pluricellulare filamentosa (muffa)	Unicellulare (lievito)
RESPIRAZIONE	aeroba	aeroba	aeroba	anaeroba facoltativa
RIPRODUZIONE	essenzialmente asessuata	essenzialmente asessuata	sessuata (forme telomorfiche) e asessuata (forme anamorfiche)	asessuata per gemmazione e sessuata
SUBSTRATI DI CRESCITA FAVORITI	compost, suolo, piante, frutta, prodotti agricoli, interni di abitazione, tessuti, legno, carta, tele, leganti proteici, colle naturali	piante, frutta, prodotti agricoli, interni di abitazione, legno, carta, tele, leganti proteici, colle naturali	Suolo, piante, frutta, prodotti agricoli, prodotti caseari, articoli di pelletteria, interni di abitazione, legno, carta, tele, leganti proteici, colle naturali	Alimenti, piante, frutta, prodotti agricoli

**CONDIZIONI
AMBIENTALI
FAVOREVOLI ALLO
SVILUPPO E ALLA
FASE VEGETATIVA**

Temperatura: 22-28 °C ma vitale fino a -3 °C (mesofilo/psicrofilo)	Temperatura: 18-28 °C ma vitale fino a -10 °C (mesofilo/psicrofilo)	Temperatura: 25-35 °C ma vitale fino a -3 °C (mesofilo/psicrofilo)	Temperatura: 30-35 °C (mesofilo)
Umidità relativa per la germinazione delle spore: >70%	Umidità relativa per la germinazione delle spore: >80%	Umidità relativa per la germinazione delle spore: >60%	
pH: 4 - 5.4	pH: 5 - 7	pH: 5 - 7	pH: 3,8 - 5,8

Fonti bibliografiche: F. Gallo, 1992; N. Kimura e T. Tsuge, 1993; R.F. Reis e altri, 2006; R. Ogòrek e altri, 2012; A. Patriarca e altri, 2014; P. Ribéreau-Gayon e altri, 2017.

2.4. GC-MS

La tecnica della gascromatografia associata alla spettrometria di massa è stata impiegata per determinare la composizione degli oli essenziali utilizzati: il gascromatografo effettua la separazione delle diverse componenti del campione, mentre lo spettrometro di massa funge da rivelatore.

L'olio essenziale, introdotto nel gascromatografo in fase gassosa, viene trasportato mediante la fase mobile gassosa (*carrier*) in una colonna, in cui è posta la fase stazionaria. La separazione delle diverse molecole che compongono l'olio essenziale si basa sul grado di affinità che esse hanno rispetto alla fase mobile e a quella stazionaria: le molecole con bassa affinità alla fase stazionaria e peso molecolare minore vengono eluite in tempi più brevi rispetto a quelle con alta affinità e pesi molecolari maggiori. Il tempo impiegato da ciascuna sostanza per scorrere nella colonna è detto tempo di ritenzione (t_R).

Lo spettrometro di massa permette la ionizzazione delle diverse componenti così separate, con formazione di frammenti di diversa massa/carica, caratteristici della molecola. In questo modo, mediante delle banche dati, è possibile risalire alla composizione chimica di ogni singola componente della miscela, oltre che a stabilire il suo rapporto rispetto alla miscela totale.

L'analizzatore di massa utilizzato per le analisi ha le seguenti caratteristiche:

- MSD Agilent Technologies Modello 59778 (electron impact, 70 eV),
- associato ad un gascromatografo GC System Agilent Technologies Modello 7720°,
- equipaggiato con una colonna HP-5MS (19091S-433UI)
 - dimensioni 30 m x 0,250 mm,
 - spessore del film interno 0,25 μm ,
- range operativo di temperatura: -60 °C – 325/350 °C.

Il metodo gascromatografico attuato si tratta di un metodo standard dello strumento ed è il seguente:

- Temperatura iniziale= 60 °C (isoterma per 2 minuti)
- Rampa di riscaldamento= 20 °C/min
- Temperatura Finale= 300 °C (isoterma per 4 minuti)
- Tempo di corsa totale= 18 minuti
- Pressione= 7.8 psi
- Total flow= 21,71 mL/min (split ratio 20:1)
- Carrier gas: He

2.5. ANTIBIOGRAMMA E STRISCIO

L'attività antifungina degli oli essenziali esaminati rispetto alle specie fungine *A. alternaria*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* è stata valutata *in vitro* mediante il metodo dell'antibiogramma su terreno solido, detto anche test di Kirby-Bauer, nelle due versioni:

- Con inoculo centrale del micelio già germinato
- Con striscio delle spore fungine e del lievito sulla superficie dell'intera piastra di Petri.

Tramite il primo metodo è possibile stabilire quanto l'olio essenziale è in grado di inibire la crescita del micelio già germinato, mentre con il secondo metodo quanto è in grado di inibire la germinazione delle spore fungine. Nel caso del *S. cerevisiae*, è stato utilizzato solo il metodo dello striscio poiché si tratta di un lievito unicellulare e, per questo, non forma alcun micelio (per la maggior parte del proprio ciclo vitale e sicuramente non nelle condizioni testate).

Successivamente, il metodo dell'antibiogramma con inoculo del micelio sarà denominato con la sigla *AB* (da "AntiBiogramma"), mentre il metodo dell'antibiogramma con striscio delle spore fungine con la sigla *S* (da "Striscio").

Terreno di coltura

Il terreno di coltura utilizzato è l'agar di Sabouraud-glucosio con cloramfenicolo, della Sigma-Aldrich, la cui composizione è la seguente [Tab.4]:

Tab.4: composizione del terreno di coltura Sabouraud-glucosio con cloramfenicolo.

INGREDIENTI	CONCENTRAZIONE
Peptone di caseina	5 g/L
Peptoni pre-digeriti da tessuti animali	5 g/L
Destrosio	40 g/L
Cloramfenicolo	0,05 g/L
Agar	15 g/L
pH finale	5.6 +/- 0,2 (a 25 °C)

Si tratta di un terreno di coltura selettivo, adatto per l'isolamento, la coltura e l'identificazione di tutti i Funghi. Il cloramfenicolo è un antibiotico ad ampio spettro che ha effetto inibitorio sulla maggior parte dei Batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

È presente una quantità molto elevata di destrosio per favorire la crescita dei Funghi, in quanto essi utilizzano il glucosio come fonte energetica. I fattori di crescita azotati, invece, sono rappresentati dai peptoni di caseina e i peptoni pre-digeriti. Il pH finale leggermente acido favorisce lo sviluppo fungino e non quello della maggior parte dei Batteri.

Il terreno è stato preparato con acqua distillata, autoclavato a 121 °C per 15 min per raggiungere la sterilità, distribuito sotto cappa sterile a flusso laminare in piastre Petri ventilate dal diametro di 90 mm al raggiungimento di circa 40 °C e lasciato qui solidificare senza coperchio, sempre in condizioni di sterilità.

Preparazione dei campioni

○ *Antibiogramma AB*

È stata, innanzitutto, asportata un'area di terreno di circa 1 cm di diametro dal centro della piastra Petri, successivamente sostituita da un'area congruente con terreno contenente micelio già germinato del Fungo filamentoso (*A. alternaria*, *C. cladosporioides* o *Penicillium sp.*), preventivamente inoculato a parte e portato in fase vegetativa. L'operazione è stata svolta mediante pinzette sterili, il tutto sotto cappa sterile a flusso laminare.

Per ogni capsula Petri sono stati inseriti tre cerchietti di carta Kozo di diametro 15 mm ($n=3$), preventivamente sterilizzati mediante quattro cicli di 3 h sotto luce UV. L'operazione è stata eseguita sotto cappa, mediante pinzette sterili. Tali cerchietti sono stati posizionati alla stessa distanza dal centro, ovvero dall'inoculo della muffa, e mantenendo un'uguale distanza fra di loro, formando un triangolo equilatero. Il test si basa, infatti, su due semplici ma essenziali presupposti:

- la crescita radiale e in direzione centrifuga del Fungo filamentoso,
- la diffusione radiale omogenea della soluzione da testare.

Su ogni dischetto sono stati erogati 50 μ L di una soluzione 1:5 di olio essenziale in acetone, mentre nelle capsule Petri che fungono da controllo (bianchi) sono stati erogati 50 μ L di acetone.

Ogni test di olio con le diverse combinazioni essenziale/Fungo è stato eseguito due volte ($n= 3$, in duplicato). Le piastre Petri seminate sono state successivamente incubate a 20 °C. La crescita, ovvero la sua inibizione, dei Funghi filamentosi è stata quindi monitorata, misurando via via il diametro raggiunto dalla colonia centrale inoculata.

- **Antibiogramma S**

Le spore fungine di *A. Alternata*, *C. cladosporioides* e *Penicillium sp.* sono state seminate sulla superficie del terreno fatto solidificare nelle rispettive piastre Petri, tramite leggeri movimenti a zig-zag interessanti l'intera area della capsula. L'operazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di tamponi sterili (*swab*), il tutto sotto cappa a flusso laminare.

Per quanto riguarda il *S. cerevisiae*, sono prelevati 5,0 mg dall'interno di un panetto di lievito (coltura madre) ed è stata fatta una sospensione in 10 mL di acqua deionizzata al 0,9% di NaCl (acqua fisiologica). Sono stati successivamente erogati e distribuiti 100 μ l di questa sospensione sulla superficie del terreno di coltura, già solidificato nelle rispettive Petri.

Per ogni piastra Petri sono stati inseriti tre cerchietti di carta Kozo di diametro 15 mm ($n= 3$), preventivamente sterilizzati sotto cappa mediante quattro cicli di 3 h sotto luce UV. L'operazione è stata eseguita mediante pinzette sterili, facendo attenzione a porre i cerchietti alla dovuta distanza sia dai bordi della piastra Petri che tra di loro.

Per quanto riguarda le piastre Petri contenenti le spore dei Funghi filamentosi, su ogni dischetto sono stati erogati 50 μ L di una soluzione 1:5 di olio essenziale in acetone; mentre sulle Petri contenenti il lievito ne sono stati erogati 100 μ L. Per quanto riguarda le piastre Petri che fungono da controllo (bianchi), sono stati erogati 50 μ L di acetone.

Ogni test con le diverse combinazioni di olio essenziale/Fungo è stato eseguito due volte ($n= 3$, in duplicato). Le piastre Petri seminate sono state successivamente incubate a 20 °C.

2.6. MICROSCOPIA

Una volta ottenute le colture pure, si è proceduto alla preparazione di vetrini a fresco per la valutazione dei caratteri microscopici di ogni singolo Fungo.

Da ogni colonia è stata asportata una piccola porzione tramite l'utilizzo di un'ansa di platino sterilizzata alla fiamma di un becco Bunsen. La porzione è stata posizionata in un vetrino portaoggetti da microscopio nel quale è stata posta una goccia di acido lattico. Con un vetrino coprioggetti, infine, è stato coperto il campione, evitando la formazione di bolle d'aria.

Ogni vetrino è stato osservato e fotografato utilizzando un microscopio ottico a luce trasmessa Axio Plan 452945 [Zeiss, Jena, Germania] e interfacciato all'apposito software ZEN Lite 2011 [Zeiss, Jena, Germania].

Il microscopio ottico è uno strumento fondamentale nelle indagini microbiologiche che permette di osservare i microrganismi, troppo piccoli per essere osservati ad occhio nudo. Il suo funzionamento è basato principalmente sull'impiego di due lenti (*oculare* ed *obbiettivo*) con cui viene deviata la luce emessa da una sorgente luminosa. La sorgente, che in genere è costituita da una lampada ad incandescenza, è posizionata sulla base del microscopio. La luce prodotta, indirizzata verso l'alto, incontra un primo sistema di lenti atto a convergerla verso il *condensatore*. Questo è costituito da un insieme di lenti ed ha lo scopo di concentrare la luce sul campione. Esso viene oltrepassato dal fascio luminoso in rapporto alla diversa opacità posseduta. La luce che ne emerge, continuando il suo percorso, entra prima nella lente obiettivo, che è posta davanti all'oggetto, e poi nell'oculare che è posto ad una distanza tale per cui il fuoco di questa lente coincide con la prima immagine dell'oggetto formata dall'obiettivo. In questo modo l'immagine della prima lente diventa l'oggetto della seconda.

Il microscopio ottico presenta come limite massimo d'ingrandimento 1000-2000X poiché, per il fenomeno della diffrazione, con nessuna sorgente si possono osservare cose più piccole della lunghezza d'onda impiegata.

Durante l'osservazione al microscopio è stata realizzata l'identificazione, consultando due volumi specializzati sull'identificazione dei Funghi (Klich, 2002; Samson, 2004) che contengono le chiavi dicotomiche (identificazione morfologica attraverso una serie di coppie di affermazioni contrapposte che, dopo varie eliminazioni, portano ad un'unità tassonomica quale ordine, famiglia o genere).

Tutte le capsule di Petri relative ai differenti test sono state anche osservate allo stereomicroscopio (Stemi SV6; Zeiss, Jena, Germania). Si è potuto, quindi, operare in questo modo l'osservazione tridimensionale dei singoli caratteri macroscopici definenti la texture delle singole colonie dei Funghi in crescita, apprezzandone nella loro totalità gli eventuali effetti (test di inibizione) dovuti agli oli essenziali.

2.7. DIFFUSIONE DELL'OLIO ESSENZIALE IN FASE VAPORE SUL BENE CULTURALE

Per la diffusione dell'olio essenziale in fase vapore sul Bene Culturale si è ideato un sistema [Fig.21], mantenuto in condizioni ermetiche, composto da un pesafiltro o da un becher, nel quale sono stati posti al suo interno:

- canapulo impregnato di olio essenziale di timo o di basilico [purtroppo per motivi contingenti del periodo in corso non è stato possibile effettuare le prove con tutti gli oli come si era prospettato];
- un filtro Büchner in ceramica rovesciato, posto al di sopra del canapulo impregnato di olio essenziale;
- un campione di dipinto già inoculato con il Fungo, poggiato sulla sommità del filtro Büchner, attaccato e in piena fase vegetativa di espansione.

Il sistema è stato poi sigillato, con il coperchio nel caso del pesafiltro o mediante parafilm nel caso del becher, e posto in un ambiente controllato con $T= 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\text{RH}= 45\text{-}50\%$.

I vapori di olio essenziale si sono diffusi nel microambiente così creatosi, senza permettere il diretto contatto della sostanza con il materiale in esame.

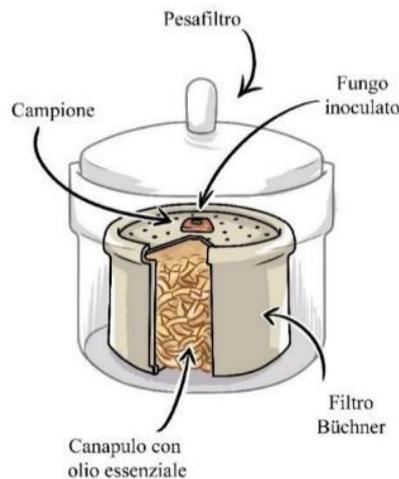


Figura 21: Schema del sistema attuato.

Sono stati utilizzati 20 mL di olio essenziale su 20 g di canapulo.

Per quanto riguarda l'olio essenziale di basilico, il rapporto percentuale m/m tra olio essenziale e canapulo è del 9,0% (in quanto la densità dell'olio essenziale di basilico è 9,0 g/mL, mentre quella del canapulo è di circa 0,1 g/mL), mentre per l'olio essenziale di timo è del 9,20% (in quanto la sua densità è 9,2 g/mL).

Per far assorbire l'olio essenziale sul canapulo, lo si è diluito in cloruro di metilene in proporzione 1:10. Successivamente si è fatto evaporare il cloruro di metilene mediante rotavapor.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. GC-MS

Di seguito verranno riportati, dapprima in modo sinottico e poi puntuale, i risultati delle analisi GC-MS attuate su ogni olio essenziale utilizzato per questo lavoro di ricerca. I risultati ottenuti saranno confrontati con quelli riscontrati in letteratura.

Nella Tab.5 sono riportati i principi attivi rinvenuti per gli oli essenziali utilizzati in questa ricerca.

Tab.5: Principi attivi riscontrati negli oli essenziali utilizzati in questa ricerca.

Oli essenziali	Pianta/e di origine	Costituenti riscontrati mediante GC- MS
Timo Rosso di Spagna	Miscela tra: • <i>Thymus vulgaris</i> “bianco” • <i>Thymus zygis sp. gracillis</i> “rosso” Famiglia: Lamiaceae	• timolo: 100%*
Chiodi di garofano	<i>Syzygium aromaticum</i> (detto anche <i>Eugenia caryophyllata</i>) Famiglia: Myrtaceae	• eugenolo: 68%*
		• cariofillene: 22%*
		• acetato di eugenile: 7%*
		• α -cariofillene: 3%*
Basilico Grand Vert	Miscela tra: • <i>Ocimum basilicum</i> “Methyl Chavicol type” • <i>Ocimum basilicum</i> “Linalool type” Famiglia: Lamiaceae	• linalolo: 58%*
		• trans- α -bergamotene: 22%*
		• eugenolo: 19%*
Bergamotto	Frutti di <i>Citrus aurantium bergamia</i> Origine: Italia Famiglia: Rutaceae	• acetato di linalile: 49%*
		• limonene: 31%*
		• linalolo: 12%*
		• γ -terpinene: 8%*

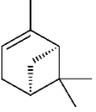
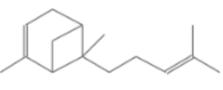
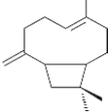
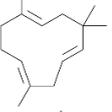
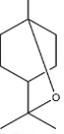
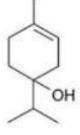
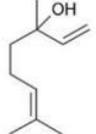
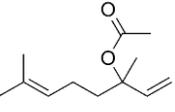
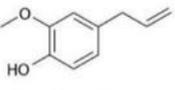
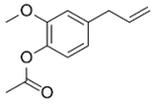
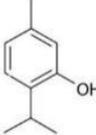
Lavanda 40/42%	Fiori di <i>Lavandula angustifolia</i> L. Famiglia: Lamiaceae	• acetato di linalile: 52%*
		• linalolo. 40%*
		• cariofillene: 8%*
Mandarino	Buccia e foglie di <i>Citrus reticulata</i> Origine: Cina Famiglia: Rutaceae	• limonene: 66%*
		• γ -terpinene: 33%*
Rosmarino	Foglie di <i>Rosmarinus officinalis</i> Origine: Spagna Famiglia: Lamiaceae	• 1,8-cineolo: 57%*
		• canfora: 34%
		• α -pinene: 9%*
		• etere di petrolio
Tea tree	Foglie e germogli di <i>Melaleuca alternifolia</i> Origine: Australia Famiglia: Myrtaceae	• acido miristico: 95%*
		• terpinen-4-olo: 4%*
		• γ -terpinene: 0,7%*
		• etere di petrolio

*percentuale in base ai picchi considerati, non rispetto ai costituenti totali.

Nella Tab.6 sono elencati i diversi valori di LogP e di peso molecolare dei principi attivi caratterizzanti gli oli essenziali esaminati. Si ricorda che possedere un valore di LogP compreso tra 3 e 4 e un valore basso di peso molecolare sono fattori che favoriscono l'attraversamento passivo della membrana cellulare.

Tab.6: Coefficiente di ripartizione e Peso Molecolare dei principali principi attivi rinvenuti negli oli essenziali utilizzati in questa ricerca.

Struttura molecolare	Principio attivo	Olio essenziale di provenienza	LogP	Peso Molecolare (g·mol ⁻¹)
	D-limonene	mandarino bergamotto	4,45	136,23

	γ -terpinene	mandarino bergamotto tea tree	2,89	136,24
	α -pinene	rosmarino	4,83	136,23
	trans- α -bergamotene	basilico	4,46	204,35
	cariofillene	chiodi di garofano lavanda	4,73	204,36
	α -cariofillene	chiodi di garofano	5,04	204,35
	canfora	rosmarino	2,38	152,23
	1,8-cineolo	rosmarino	2,82	154,25
	terpinen-4-olo	tea tree	2,99	154,25
	linalolo	basilico bergamotto lavanda	3,28	154,25
	linalil acetato	basilico bergamotto lavanda	4,12	196,29
	eugenolo	chiodi di garofano basilico	2,20	164,21
	eugenil acetato	chiodi di garofano	2,71	206,24
	timolo	timo	3,28	150,22

Fonti bibliografiche: K. Cal, 2006; H.J. Chang e altri, 2007; J. Chen e altri, 2016 e il sito web PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> in data: 18/05/2020

Olio essenziale di timo

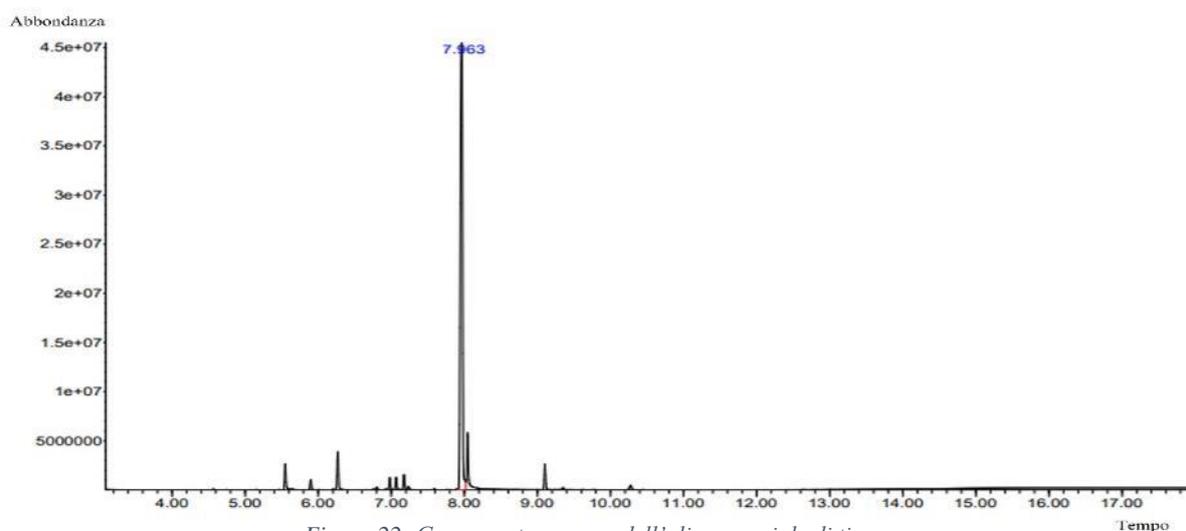


Figura 22: Gascromatogramma dell'olio essenziale di timo.

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di timo rosso è il seguente [Fig.22]:

Nella seguente Tab.7 sono riportati lo spettro di massa del picco maggiore, identificato come timolo, rilevato all'analisi di tale olio essenziale, la sua probabilità, la sua percentuale rispetto ai picchi considerati, rivelandosi il costituente principale, e il suo tempo di ritenzione.

Tab.7: Spettro di massa, t_r , % relativa di abbondanza del composto relativo al picco maggiore dell'analisi in GC-MS, identificato come timolo (formula chimica a lato).

Timolo	
Probabilità: 57,6% Percentuale*: 100% Tempo di ritenzione: 7,9 min	

*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 1), non rispetto al totale

Secondo l'European Medicines Agency, la composizione dell'olio essenziale di timo con chemotipo al timolo è definita dall'European Pharmacopoeia, i cui range in composizione percentuale sono riportati in Tab.8, insieme ai risultati riscontrati in altre ricerche. Sono stati tenuti in considerazione solo i costituenti in percentuale maggiore.

Tab.8: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di timo.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	European Medicines Agency, 2010 Fiori (%)	H. Hudaib e altri, 2002 (<i>T. vulgaris</i>) (%)	M. Zabka e altri, 2014 (<i>T. vulgaris</i>) (%)	J.D. Maia e altri, 2019 (<i>T. vulgaris</i>) (%)
Timolo	100	36,0 - 55,0	19,38 - 54,10	60,2	53,02
Carvacrolo		1,0 - 4,0	1,43 - 4,00	5,9	
Linalolo		4,0 - 6,5	0,71 - 2,19	5,8	

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di timo con chemotipo "timolo" presenti un'alta variabilità, per quanto il principio attivo principale sia sempre il timolo.

Olio essenziale di chiodi di garofano

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di chiodi di garofano è il seguente [Fig.23]:

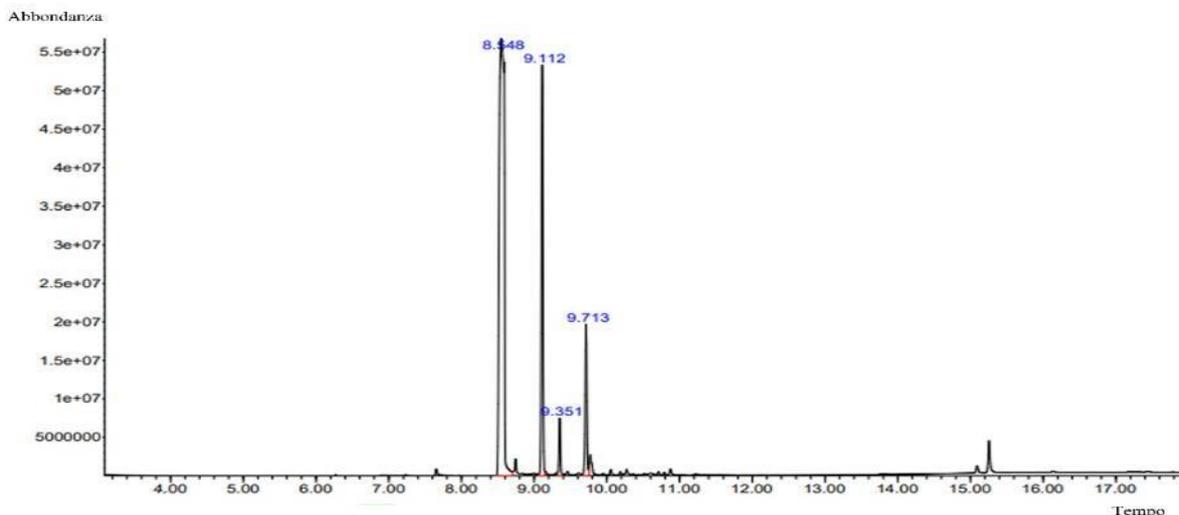
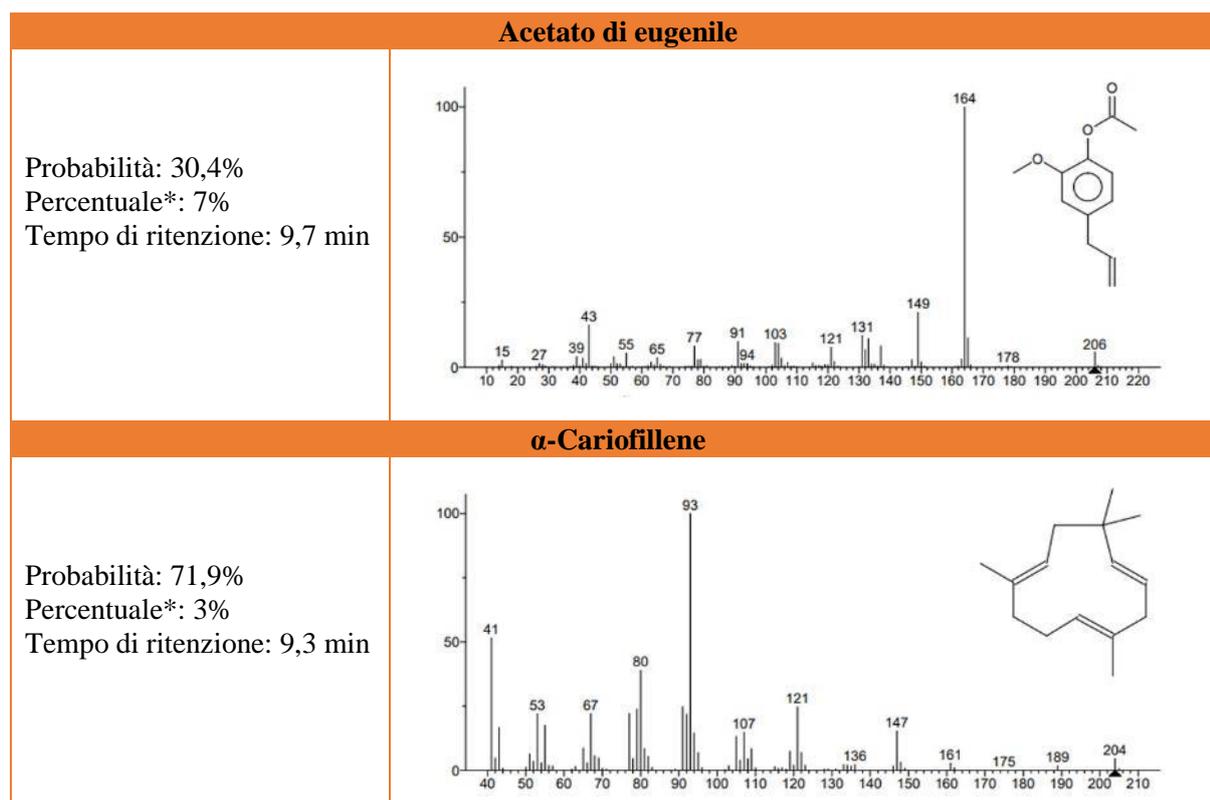


Figura 23: gascromatogramma dell'olio essenziale di chiodi di garofano.

Nella Tab.9 sono riportati i quattro costituenti principali di tale olio essenziale, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

Tab.9: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come eugenolo, cariofillene, acetato di eugenile e α -cariofillene (formule chimiche a lato).

Eugenolo	
Probabilità: 34,7% Percentuale*: 68% Tempo di ritenzione: 8,5 min	
Cariofillene	
Probabilità: 45,8% Percentuale*: 22% Tempo di ritenzione: 9,1 min	



*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 4), non rispetto al totale

Nella Tab.10 sono riportati i risultati gascromatografici riscontrati in diverse ricerche, tra cui il range di composizione percentuale secondo l'*European Medicines Agency* del 2011, tenendo in considerazione solo i primi quattro costituenti in percentuale maggiore.

Tab.10: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di chiodi di garofano.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	<i>European Medicines Agency, 2011b (S. aromaticum)</i> (%)	A.E. Aguilar- González e altri, 2015 (<i>S. aromaticum</i>) (%)	J.G. Xu e altri, 2016 (<i>S. aromaticum</i>) (%)	A. Plata-Rueda e altri, 2018 (<i>S. aromaticum</i>) (%)	M. Radünz e altri, 2019 (<i>S. aromaticum</i>) (%)
Eugenolo	68	75 - 88	75,39	76,23	27	56,06
Cariofillene	22			11,54	24,5	39,63
α-Cariofillene	3		3,7	0,64	10,8	4,31
β-Cariofillene		5 - 14				
Cariofillene ossido			11,22	4,29	18,3	
Acetato di eugenile	7	4 - 15	5,16	1,76		

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di chiodi di garofano presenti un'alta variabilità, per quanto il principio attivo principale risulti essere sempre l'eugenolo.

L'olio essenziale utilizzato per questa ricerca presenta una percentuale di eugenolo minore rispetto al range proposto dall'*European Medicine Agency* del 2011, anche se maggiore delle analisi eseguite da M. Radünz e colleghi (2019) e A. Plata-Rueda e colleghi (2018).

Olio essenziale di basilico

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di basilico è il seguente [Fig.24]:

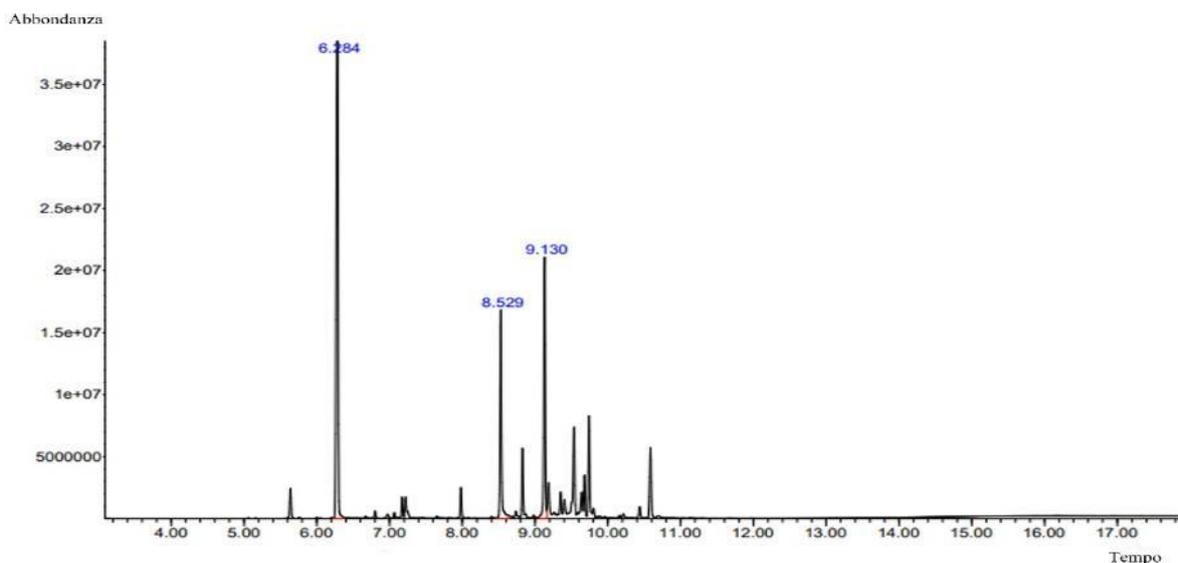
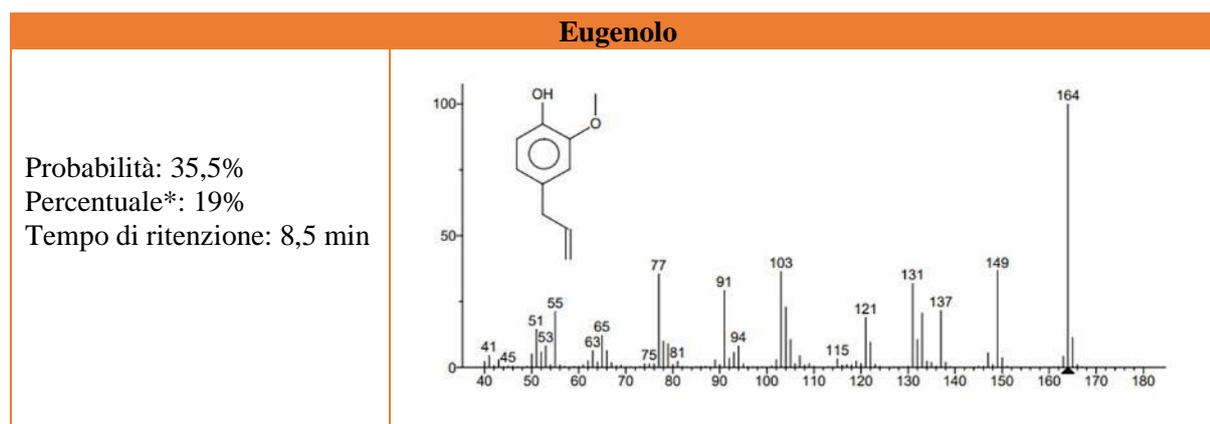


Figura 24: Gascromatogramma dell'olio essenziale di basilico.

Nella Tab.11 sono riportati i tre costituenti principali di tale olio essenziale, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

Tab.11: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come linalolo, trans- α -bergamotene ed eugenolo (formule chimiche a lato).

Linalolo	
Probabilità: 83,6% Percentuale*: 58% Tempo di ritenzione: 6,3 min	
Trans- α -bergamotene	
Probabilità: 43,8% Percentuale*: 22% Tempo di ritenzione: 9,1 min	



*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 3), non rispetto al totale

Nella Tab.12 sono riportati i risultati di analisi gascromatografiche di oli essenziali di basilico con chemotipo “linalolo” riscontrati in altre ricerche. Si sono tenuti in considerazione solo i primi tre costituenti in percentuale maggiore.

Tab.12: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di basilico.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	B. Bernhardt e altri, 2015 (O. basilicum) (%)	D. Dris e altri, 2017 (O. basilicum) (%)	H. Nawaz e altri, 2017 (O. basilicum) (%)	A.F. Ahmed e altri, 2019 (O. basilicum) (%)
Linalolo	58	0,66 - 79,59	22,52	70,44	27,65 - 31,66
Acetato di linalile		0,00 - 0,19	53,89		
Eugenolo	19	0,00 - 4,41			2,78 - 7,33
Trans- α - bergamotene	22			3,71	3,95 - 4,52
1,8- Cineolo		0,00 - 8,16			
Estragole				14,43	15,97 - 17,37
Tau-Cadinolo				4,13	
α -Terpineolo		0,09 - 0,96	4,57		
Metil cavicolo		0,00- 62,62			
Metil cinnamato					10,49 - 13,39

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di basilico presenti un'alta variabilità e che non sempre il linalolo è la componente realmente principale, ma lo è piuttosto l'acetato di linalile. In alcune ricerche il linalolo è associato all'acetato di linalile, mentre in altri casi quest'ultimo componente non è presente. Il campione analizzato in questa tesi non presenta acetato di linalile. Anche le componenti secondarie non sembrano essere congruenti: il trans- α -bergamotene e l'eugenolo, rispettivamente secondo e terzo costituente maggiore di questa ricerca, non sempre sono presenti negli oli essenziali degli altri studi e, quando presenti, presentano delle percentuali nettamente inferiori.

Olio essenziale di bergamotto

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di bergamotto è il seguente [Fig.25]:

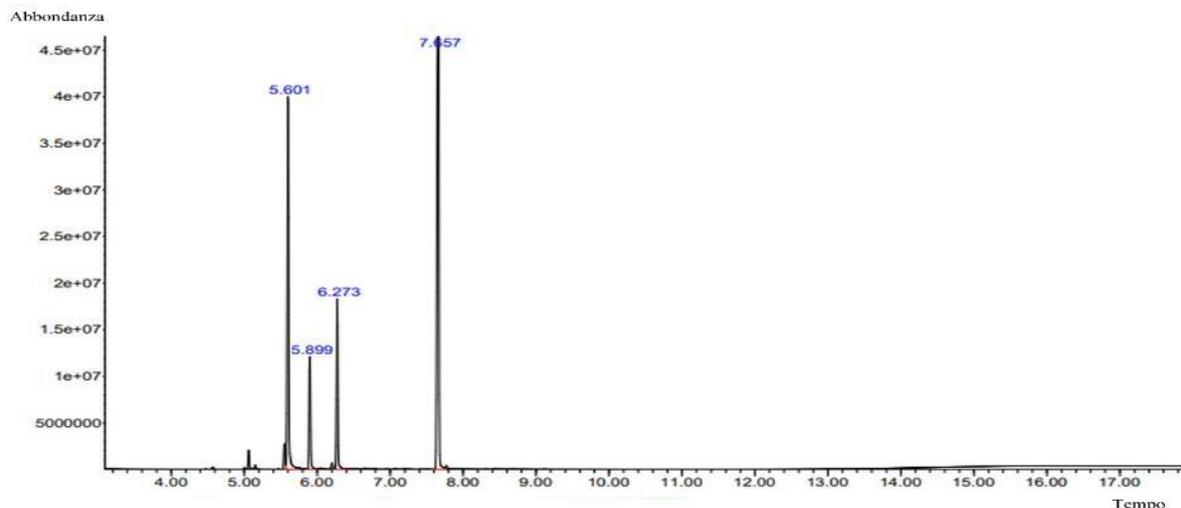
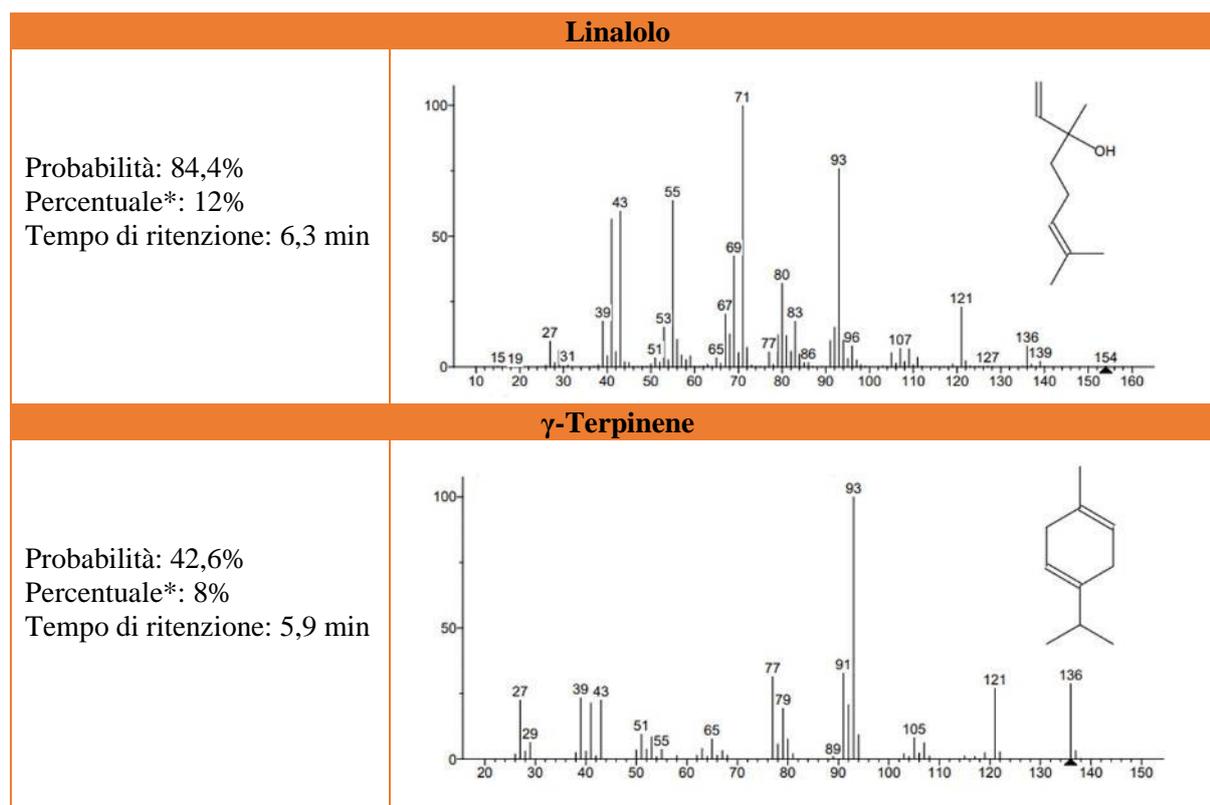


Figura 25: Gascromatogramma dell'olio essenziale di bergamotto.

Nella Tab.13 sono riportati i quattro costituenti principali di tale olio essenziale, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

Tab.13: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come acetato di linalile, limonene, linalolo e γ -terpinene (formule chimiche a lato).

Acetato di linalile	
Probabilità: 18,1% Percentuale*: 49% Tempo di ritenzione: 7,7 min	
Limonene	
Probabilità: 23,1% Percentuale*: 31% Tempo di ritenzione: 5,6 min	



*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 4), non rispetto al totale

I range di composizione percentuale dell'olio essenziale di bergamotto dell'*European Medicines Agency* si rifanno a quelli della *Farmacopea Ufficiale Italiana – 12° edizione* e sono riportati in tabella [Tab.14], insieme ai risultati in altre ricerche. Si sono tenuti in considerazione solo i costituenti in percentuale maggiore.

Tab.14: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di bergamotto.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	<i>European Medicines Agency, 2012 (C. bergamia Risso) (%)</i>	M. Sawamura e altri, 2006 (<i>C. bergamia</i> Risso) (%)	B. Nabiha e altri, 2010 (<i>C. bergamia</i> Risso, bucce) (%)	R. Costa e altri, 2010 (<i>C. bergamia</i>) (%)	P.M. Furneri e altri, 2012 (<i>C. bergamia</i>) (%)
Acetato di linalile	49	23,0 - 35,0	30,1	16,83	25,07 - 73,94	20,1 - 27,1
Limonene	31	30,0 - 50,0	37,2	59,21	0,31 - 43,75	25,6 - 33,7
Linalolo	12	6,0 - 15,0	8,8	9,51	5,55 - 22,24	5,5 - 13,2
γ-Terpinene	8	6,0 - 18,5	6,8	0,01	0,16 - 6,19	7,4 - 9,6
β-pinene		5,0 - 10,0	6,2	4,38	0,01 - 5,59	4,5 - 6,0

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di bergamotto presenti un'alta variabilità e non sempre l'acetato di linalile è la componente principale ma, bensì, il limonene. Le componenti secondarie, come linalolo e γ-Terpinene sono principi attivi presenti in tutti gli oli essenziali considerati, anche se con percentuali differenti.

L'olio essenziale di questa ricerca presenta una percentuale di acetato di linalile maggiore rispetto al range proposto dall'*European Medicine Agency* del 2011.

Olio essenziale di lavanda

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di lavanda è il seguente [Fig.26]:

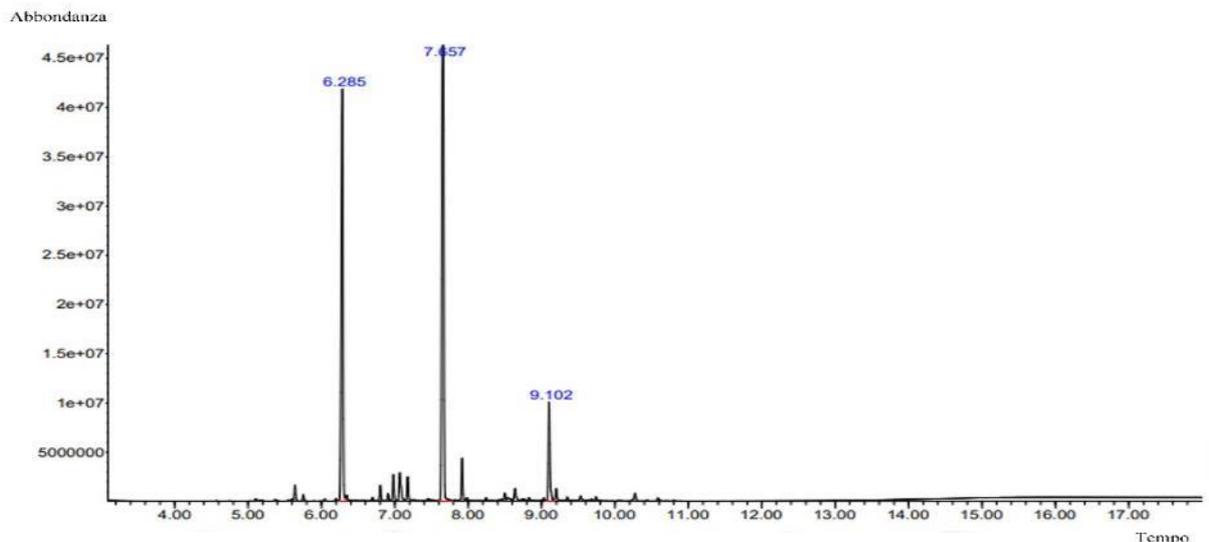
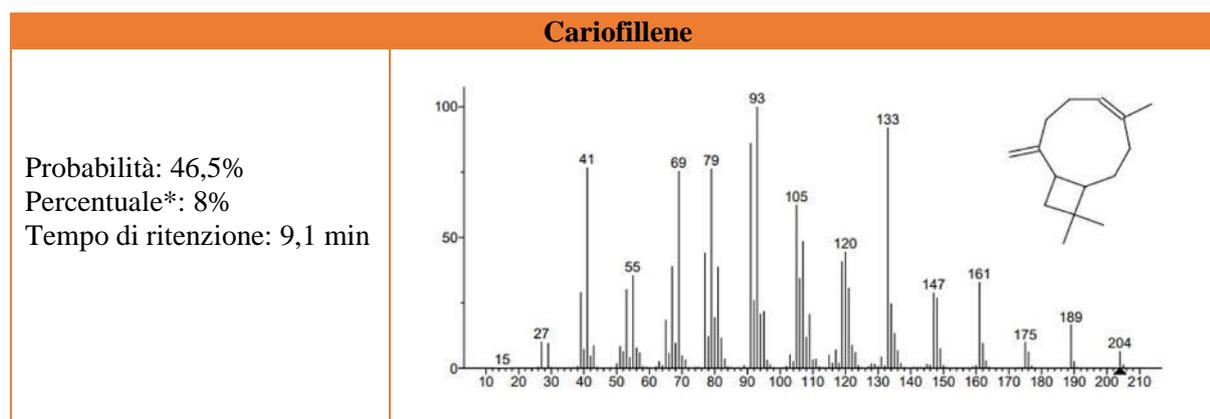


Figura 26: Gascromatogramma dell'olio essenziale di lavanda.

Nella Tab.15 sono riportati i tre costituenti principali di tale olio essenziale, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

Tab.15: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come acetato di linalile, linalolo e cariofillene (formule chimiche a lato).

Acetato di linalile	
<p>Probabilità: 17,9%</p> <p>Percentuale*: 52%</p> <p>Tempo di ritenzione: 7,7 min</p>	
Linalolo	
<p>Probabilità: 86,4%</p> <p>Percentuale*: 40%</p> <p>Tempo di ritenzione: 6,3 min</p>	



*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 3), non rispetto al totale

Nella Tab.16 sono riportati i risultati gascromatografici riscontrati in diverse ricerche, tra cui il range di composizione percentuale secondo l'ISO 3515:2002(E) e l'European Medicines Agency del 2011, tenendo in considerazione solo i costituenti in percentuale maggiore.

Tab.16: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di lavanda.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	ISO, 2002 (<i>L. angustifolia</i> Miller, "altre origini") (%)	European Medicines Agency, 2011a (<i>L. angustifolia</i> Miller) (%)	C.N. Hassiotis e altri, 2014 (<i>L. angustifolia</i>) (%)	M. Stupar e altri, 2014 (<i>L. angustifolia</i>) (%)
Acetato di linalile	52	25 - 47	25 - 46	23,12 - 24,54	34,86
Linalolo	40	20 - 43	20 - 50	38,61 - 46,52	37,61
Canfora		0 - 1,5		4,36 - 4,99	0,73
1,8-Cineolo		0 - 3		3,08 - 4,14	1,16
α -Pinene				0,1 - 0,19	3,45
Cariofillene	8				

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di lavanda presenti un'alta variabilità ma che le componenti principali sono sempre l'acetato di linalile e il linalolo, in percentuali all'incirca uguali. Il cariofillene, costituente terziario dell'olio essenziale di questa ricerca, non è presente nelle composizioni degli studi considerati.

Olio essenziale di mandarino

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di mandarino è quello riportato in [Fig.27]:

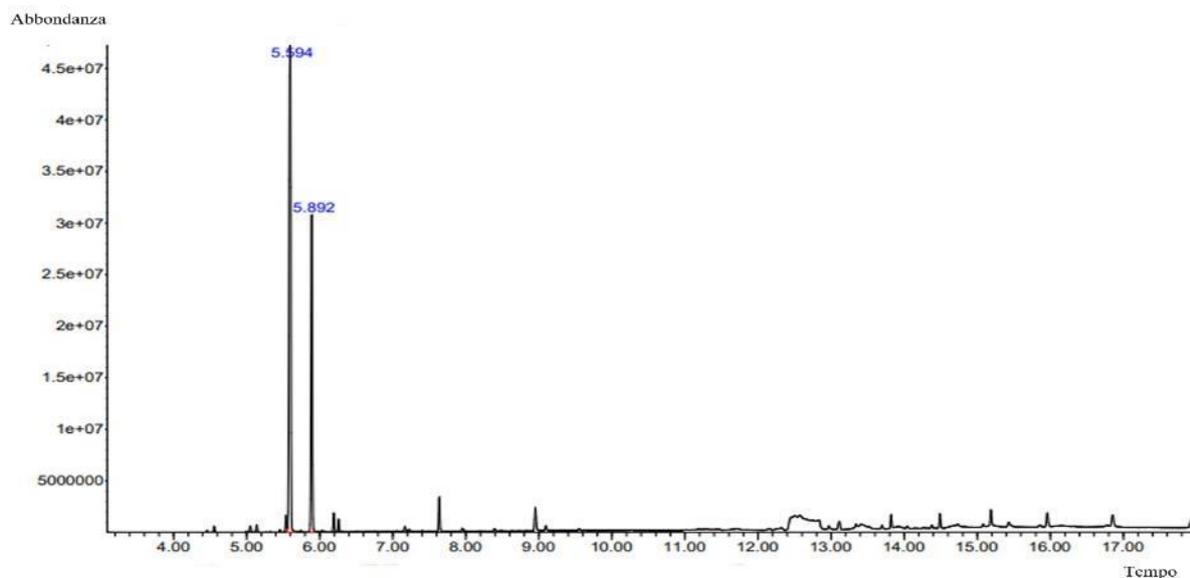


Figura 27: Gascromatogramma dell'olio essenziale di mandarino.

Nella Tab.17 sono riportati i due costituenti principali di tale olio essenziale, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

Tab.17: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come limonene e γ -terpinene (formule chimiche a lato).

Limonene	
Probabilità: 31,4% Percentuale*: 66% Tempo di ritenzione: 5,6 min	
γ-Terpinene	
Probabilità: 45,6% Percentuale*: 33% Tempo di ritenzione: 5,9 min	

*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 2), non rispetto al totale

Nella Tab.18 sono riportati i risultati gascromatografici riscontrati in altre ricerche, tenendo conto solo dei primi tre costituenti in percentuale maggiore.

Tab.18: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di mandarino.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	S. Javed e altri, 2014 (<i>C. reticulata</i>) (%)	G.M. Kamal e altri, 2011 (<i>C. reticulata</i> , bucce fresche) (%)	M. Chutia e altri, 2009 (<i>C. reticulata</i> , frutti maturi) (%)	I. Bonaccorsi e altri, 2009 (<i>C. deliciosa</i>) (%)
Limonene	66	87,84	69,9	46,7	68,64 - 72,06
γ -Terpinene	33				18,20 - 20,72
α -Terpineolo		12,55		tracce	0,07 - 0,21
β -Mircene			3,27		
β -Citrale				14,5	0,00 - 0,04

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di mandarino presenti un'alta variabilità ma la componente principale è sempre il limonene. Il γ -terpinene, costituente secondario dell'olio essenziale di questa ricerca, non sembra essere presente in tutte le composizioni degli studi considerati.

Olio essenziale di rosmarino

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di rosmarino è il seguente [Fig.28]:

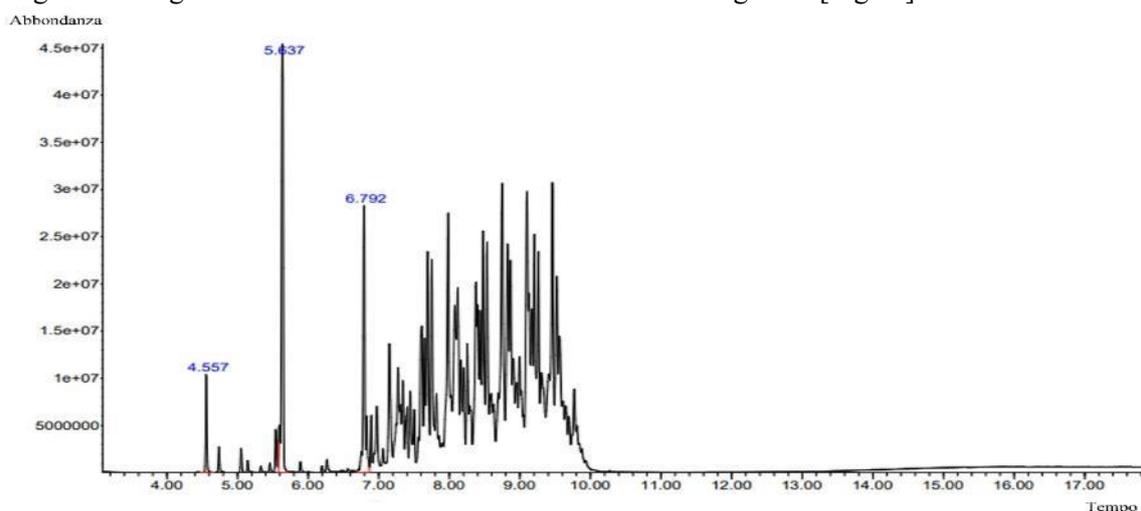


Figura 28: Gascromatogramma dell'olio essenziale di rosmarino.

È possibile notare come il campione presenti un rilevante assetto di picchi tra i 7 e 10 minuti, il quale è riconducibile all'etere di petrolio. L'etere di petrolio è uno dei principali solventi utilizzati per l'estrazione di oli essenziali, insieme all'esano, etanolo, metanolo, etil etere ed etil acetato (X. Zhang e altri, 2012; A.C. Stratakos e A. Koidis, 2016).

Il processo di estrazione di oli essenziali mediante solventi sfrutta la polarità dei diversi costituenti contenuti nell'essenza vegetale e viene attuato se queste sono termicamente labili (come nei fiori) e nel caso in cui la loro composizione verrebbe compromessa se distillati con alte temperature. Il materiale vegetale viene "risciacquato" più volte mediante solventi, i quali estraggono i costituenti ritenuti indesiderati. Successivamente, viene attuato un processo di filtrazione e, infine, il liquido risultante viene distillato in corrente di vapore con temperature di lavoro molto più basse rispetto a quelle eseguite normalmente (E. Schmidt, 2010; A.C. Stratakos e A. Koidis, 2016). Si tratta di un processo economico e relativamente veloce, soprattutto se, nella fase di estrazione, il solvente viene riscaldato. Il principale svantaggio che comporta questa tecnica è la presenza di residui di solvente nell'olio essenziale e, per questa ragione, non può essere utilizzato in ambito alimentare, mentre viene

utilizzato comunemente nell'industria di profumi (X. Zhang e altri, 2012; A.C. Stratakos e A. Koidis, 2016).

È, quindi, ovvio sottolineare che il metodo di estrazione incide pesantemente sulla composizione dell'olio essenziale finale, sia sulle concentrazioni relative dei vari componenti, sia per la presenza o l'assenza di alcune sostanze chimiche. Nel caso della distillazione è possibile che alcune sostanze degradino a causa dell'alta temperatura, formando composti a più basso peso molecolare. Con l'estrazione mediante solventi è possibile rimuovere le impurezze presenti nel materiale vegetale, spesso di bassa qualità, che con la distillazione non si è in grado di attuare. L'olio essenziale così prodotto presenta una concentrazione di costituenti aromatici maggiore rispetto a quello prodotto dallo stesso materiale per distillazione (E. Schmidt, 2010; X. Zhang e altri, 2012; A.C. Stratakos e A. Koidis, 2016).

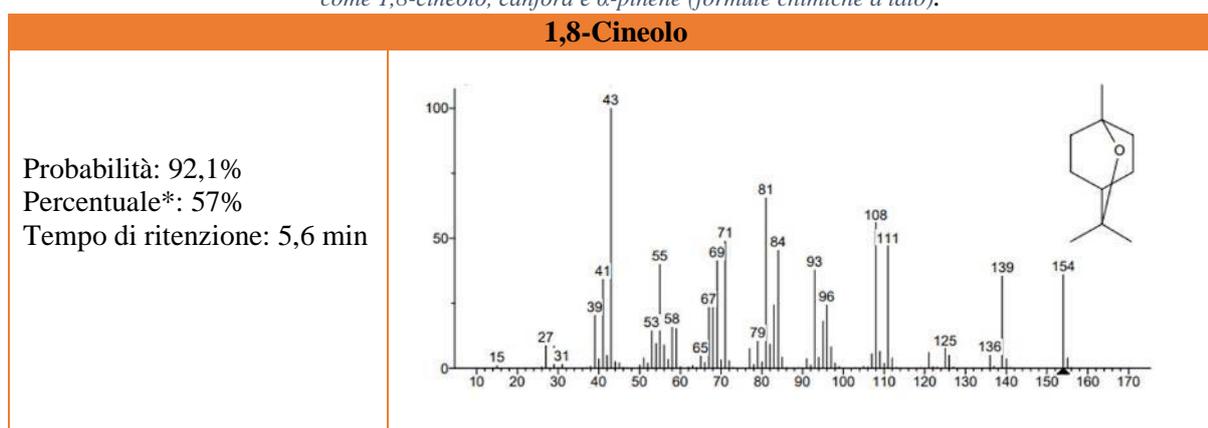
X. Zhang e colleghi (2012) hanno identificato le varie componenti presenti in tre oli essenziali di tabacco: il primo estratto mediante idrodistillazione, il secondo con solventi organici e il terzo con solventi organici e successiva distillazione in corrente di vapore. Le composizioni dei tre oli essenziali, per quanto simili, hanno riscontrato delle differenze, in particolare alle concentrazioni relative delle diverse componenti.

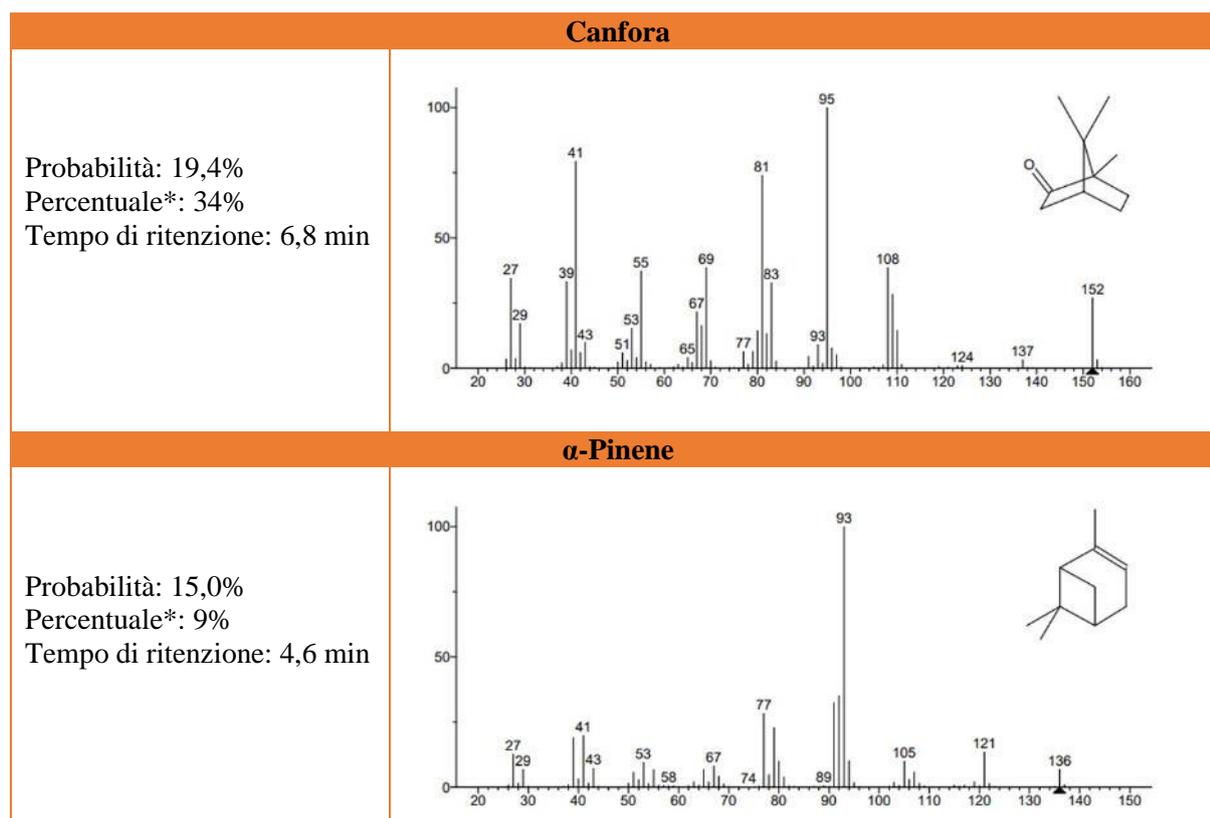
L'olio essenziale estratto mediante estrazione con solventi risulta più scuro, con una maggior quantità di impurità e residui di solvente. L'olio essenziale estratto con solventi e successivamente distillato mediante corrente di vapore risulta essere, invece, quello con la migliore qualità e con una concentrazione relativa maggiore di costituenti aromatici, anche se sono comunque presenti tracce di solvente (X. Zhang e altri, 2012).

La ditta che ha prodotto l'olio essenziale di rosmarino potrebbe aver utilizzato l'estrazione mediante etere di petrolio associata alla distillazione mediante corrente di vapore, per quanto l'elevata quantità di solvente presente nel campione potrebbe indurre a non escludere all'utilizzo della sola estrazione mediante solvente (nonostante quanto dichiarato).

Nella Tab.19 sono riportati i tre costituenti principali di tale olio essenziale, escluso l'etere di petrolio, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

Tab.19: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come 1,8-cineolo, canfora e α -pinene (formule chimiche a lato).





*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 3), non rispetto al totale

Nella Tab.20 sono riportati i risultati gascromatografici riscontrati in diverse ricerche, tra cui il range di composizione percentuale secondo l'ISO 1342:2012(E), tenendo in considerazione solo i costituenti in percentuale maggiore.

Tab.20: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di rosmarino.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	ISO, 2012 (<i>R. officinalis</i> L. "Tunisian and Maroccan type") (%)	ISO, 2012 (<i>R. officinalis</i> L. "Spanish type") (%)	M.Stupar e altri, 2014 (<i>R. officinalis</i>) (%)	Y. Ozogul e altri, 2017 (<i>R. officinalis</i>) (%)	E.M. Napoli e altri, 2010 (<i>R. officinalis</i>) (%)	R. Ribeiro- Santos e altri, 2017 (<i>R. officinalis</i> , foglie) (%)
1,8-Cineolo	57	38,0 – 55,0	16 - 23	44,28	52,17	5,7 - 67,0	49,24
Canfora	34	5,0 – 15,0	12,5 - 22	13,54	8,53	0,6 - 15,9	16,05
α-Pinene	9	9,0 – 14,0	18 - 26	11,62	12	9,7 - 27,9	13,03
β-Pinene		4,0 – 9,0	2,0 – 5,0	8,26	1,04	0 - 6,7	8,15
Borneolo		1,0 – 5,0	1,0 – 4,5	2,96	3,55	2,0 - 13,4	1,62

Dai dati riscontrati, si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di rosmarino presenti un'alta variabilità, ma la componente principale sia sempre l'eugenolo (1,8-Cineolo). La canfora e l'α-Pinene, rispettivamente il costituente secondario e terziario di questa ricerca, sono presenti anche nelle analisi degli altri studi. La comparazione delle varie percentuali potrebbe non essere significativa in quanto il campione analizzato in questa ricerca presenta un'alta percentuale di residuo di etere di petrolio, probabilmente derivante dal processo di estrazione.

Per quanto l'olio essenziale di rosmarino di questa ricerca indichi come provenienza la Spagna, sembra avere più corrispondenza al rosmarino di origine tunisina e marocchina dell'ISO. Non è da escludere che l'alta componente di 1,8-Cineolo sia in parte sintetica e che non derivi totalmente dal rosmarino raccolto, oppure che il metodo di estrazione mediante solventi lo abbia concentrato.

Olio essenziale di tea tree

Il gascromatogramma dell'olio essenziale di tea tree è illustrato in Fig.29.

Si è notata la presenza di etere di petrolio nella regione tra i 7,00 e i 10,00 minuti, per quanto di minore intensità rispetto al campione di rosmarino. Anche in questo caso è possibile ipotizzare che l'olio essenziale abbia subito una preventiva estrazione mediante solventi prima di essere distillato mediante corrente di vapore.

Nella Tab.21 sono riportati i due costituenti principali di tale olio essenziale, con i corrispondenti spettri di massa, le loro probabilità, le loro percentuali rispetto ai picchi considerati e i loro tempi di ritenzione.

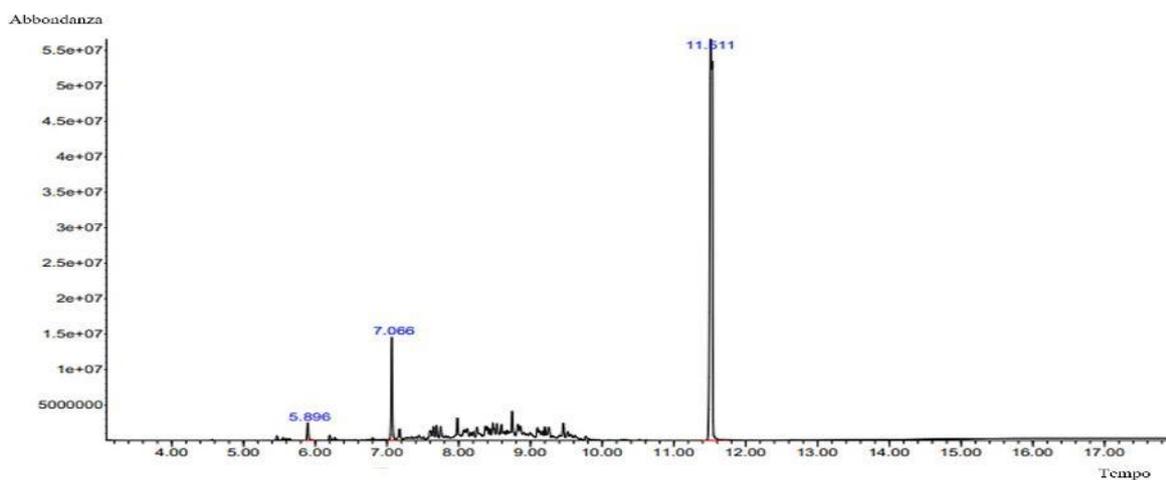
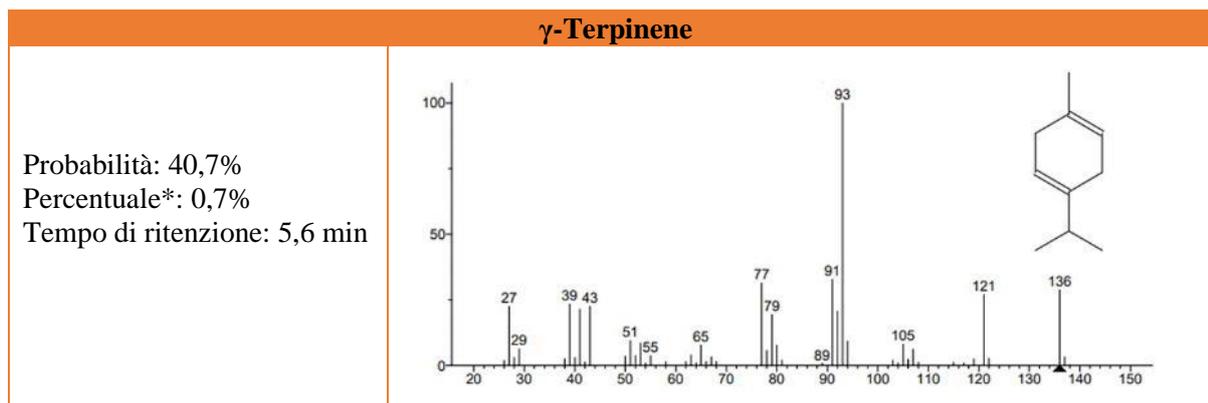


Figura 29: Gascromatogramma dell'olio essenziale di tea tree.

Tab.21: Spettro di massa, t_R , % di abbondanza del composto relativi ai picchi maggiori dell'analisi in GC-MS, identificati come acido miristico, terpinen-4-olo e γ -terpinene (formule chimiche a lato).

Acido miristico	
Probabilità: 87,2% Percentuale*: 95% Tempo di ritenzione: 4,6 min	
Terpinen-4-olo	
Probabilità: 41,2% Percentuale*: 4% Tempo di ritenzione: 6,8 min	



*percentuale in base ai picchi considerati (in questo caso 3), non rispetto al totale

Nella Tab.22 sono riportati i risultati gascromatografici riscontrati in diverse ricerche, tra cui il range di composizione percentuale secondo l'ISO riportato da C.F. Carson e colleghi (2006). Sono stati tenuti in considerazione solo i costituenti in percentuale maggiore.

Tab.22: Confronto tra differenti analisi al GC-MS di diversi oli essenziali di tea tree.

PRINCIPALI COMPOSTI RINVENUTI	Ricerca in corso (%)	ISO C.F. Carson e altri, 2006 (<i>M. alternifolia</i>) (%)	J.T. Callander e P.J. James, 2012 (<i>M. alternifolia</i>) (%)	C.J. Lee e altri, 2013 (<i>M. alternifolia</i> , foglie) (%)	C.J. Lee e altri, 2013 (<i>M. alternifolia</i> , rami) (%)
Terpinene-4-olo	4	≥ 30	43	47,31	39,09
γ -Terpinene	0,7	10 - 28	20,9	20,59	6,71
α -Terpinene		5 - 13	10	9,58	1,01
α -Terpinolene		1,5 - 5		2,96	1,45
α -Terpineolo		1,5 - 8	2,8	3,02	
Acido miristico	95				

Dai dati riscontrati si può dedurre come la composizione dell'olio essenziale di tea tree presenti un'alta variabilità, ma la componente principale è sempre il terpinene-4-olo.

Differente invece è il caso dell'olio essenziale analizzato in questa ricerca. La componente principale risulta essere l'acido miristico, acido grasso ad alto peso molecolare e non volatile, impossibile da riscontrare nella composizione di qualunque olio essenziale.

L'acido miristico si può riscontrare in prodotti cosmetici (ad esempio: saponi, detersivi, creme idratanti, ombretti, rossetti, prodotti per capelli), associato spesso ai suoi esteri e sali, come agente opacizzante e surfatante. Si tratta di un acido grasso digeribile e può essere utilizzato anche nel settore alimentare come agente plastificante, lubrificante, legante, antischiuma o aromatizzante. Viene prodotto commercialmente dalla saponificazione e dal frazionamento di grassi animali e vegetali, come l'olio di cocco, l'olio di semi di palma, il burro di noce moscata e i grassi del latte (L.C. Becker e altri, 2010).

La presenza di acido miristico è, pertanto, riconducibile ad un'aggiunta intenzionale da parte della ditta successivamente al processo di estrazione dell'olio essenziale.

L'elevata concentrazione relativa di acido miristico potrebbe aver influito sull'effetto antimicotico dell'olio essenziale, sia per una semplice diluizione dei principi attivi, presenti proporzionalmente in misura minore, sia perché l'acido grasso può diventare esso stesso fonte primaria di carbonio per il microrganismo, che trova in questo modo una fonte biodisponibile immediata per la sua sopravvivenza.

3.2. TEST DI CRESCITA FUNGINA IN PRESENZA DEGLI OLI ESSENZIALI: ANTIBIOGRAMMA E STRISCIO

Per verificare l'effetto degli otto oli essenziali analizzati sullo sviluppo e la crescita dei quattro differenti Funghi, come già detto [vedasi par.2.2. per i dettagli], è stato approntato *in vitro* il metodo dell'antibiogramma su terreno solido, o test di *Kirby-Bauer*, o *metodo di diffusione*, riadattato allo scopo di questa ricerca nelle due differenti versioni:

- con inoculo centrale del micelio già germinato, qui denominato *test AB*
- con striscio delle spore fungine e del lievito sulla superficie dell'intera piastra di Petri, qui denominato *test S*.

Sono state effettuate le seguenti ricognizioni:

- inoculo: t= 0
- 1°: t= 7 giorni
- 2°: t= 8 giorni
- 3°: t= 12 giorni
- 4°: t= 14 giorni
- 5°: t= 16 giorni
- 6°: t= 54 giorni
- 7°: t= 99 giorni

Nei campioni AB è stata misurata, ad ogni ricognizione, la crescita radiale del micelio, con la quale è stata costruita la curva di crescita del Fungo, potenzialmente compromessa dalla presenza dell'olio essenziale diffondentesi anch'esso radialmente e uniformemente dai cerchietti di carta posti nell'intorno dell'inoculo. Nei campioni a t= 0 (data di inoculo) è stato preso come valore di riferimento di partenza il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm). Il valore massimo che il raggio di crescita può raggiungere corrisponde al raggio delle capsule di Petri (45 mm).

Nei campioni S, invece, è stato misurato il diametro dell'inibizione dello sviluppo delle spore e conseguente formazione di micelio, ovvero della crescita della vera e propria colonia fungina, attorno ai cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale, diffondentesi uniformemente dagli stessi, con il quale è stato costruito il grafico che esplicita l'efficacia dell'inibizione causata dall'olio essenziale rispetto al variare del tempo. Nei campioni a t= 0 (data di inoculo) è stato preso come valore di riferimento di partenza l'intero diametro delle capsule di Petri (90 mm).

3.2.1. OLIO ESSENZIALE DI TIMO

Non sono state osservate crescite micotiche nei campioni trattati con olio essenziale di timo. Il principio attivo timolo sembra in grado di garantire un effetto inibitorio duraturo nel tempo, influenzato anche dal fatto che la piastra Petri non è mai stata aperta e che quindi la quantità di olio essenziale volatile contenuto al suo interno si è mantenuta costante e non si è mai dispersa al suo esterno.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di timo con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.1.

Alternaria alternata

Nel grafico Fig.30 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n= 3$ per il controllo e $n= 3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. Non è stata rilevata una crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di timo: la curva di crescita è, infatti,

rappresentata da una retta orizzontale di valore costante (6 mm, valore del raggio del micelio inoculato), a differenza della curva di crescita di *A. alternata* di controllo, dove è ben visibile la fase di crescita esponenziale e il raggiungimento della completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo.

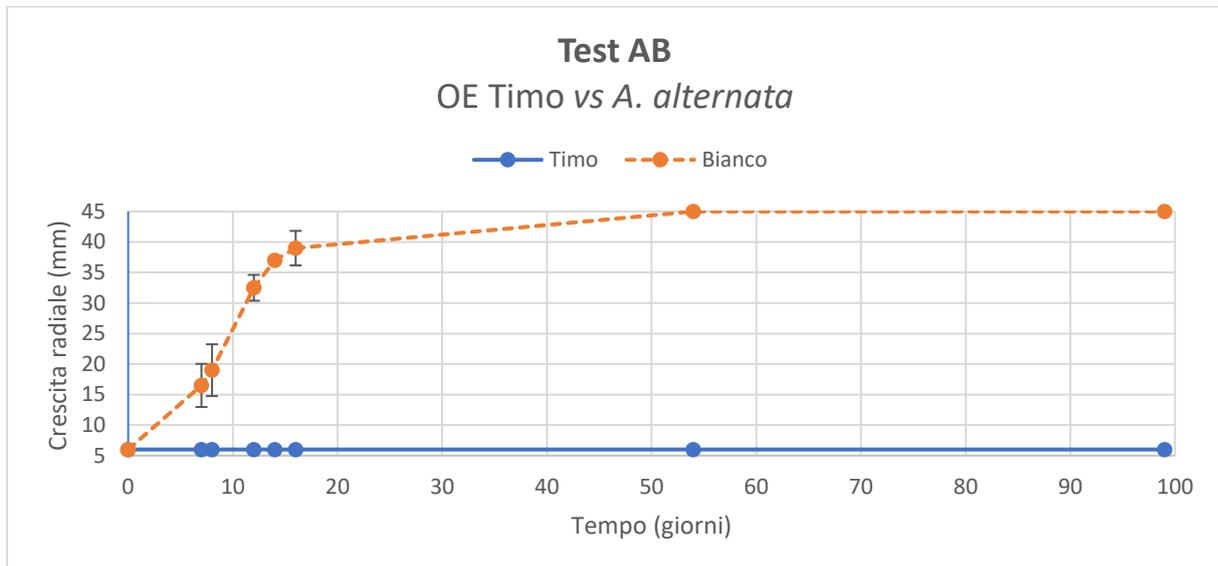


Figura 30: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.31, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile.

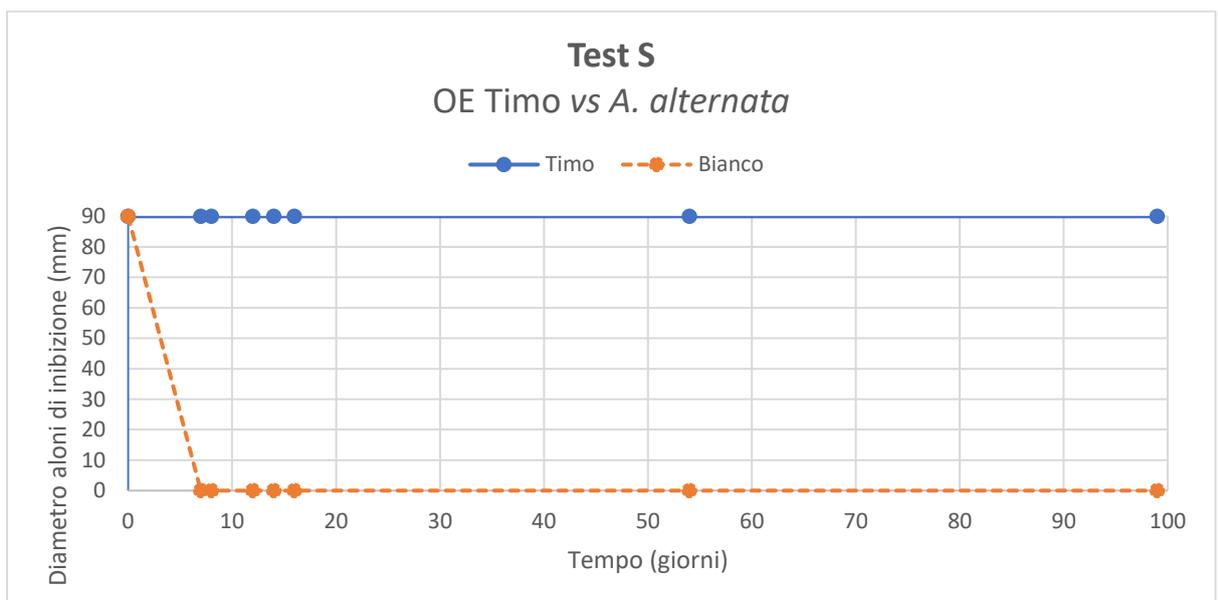


Figura 31: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Non è stata rilevata una germinazione delle spore di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di timo: il diametro di inibizione è, infatti, rappresentato da una retta orizzontale di valore costante (90 mm, valore massimo), a differenza di quello di *A. alternata* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo.

Cladosporium cladosporioides

Nel grafico Fig.32 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. Non è stata rilevata una crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di timo: la curva di crescita è, infatti, rappresentata da una retta orizzontale di valore costante (6 mm, valore del raggio del micelio inoculato), a differenza della curva di crescita di *C. cladosporioides* di controllo, dove il raggiungimento della completa colonizzazione della piastra Petri si riscontra dal 7° giorno dall'inoculo.

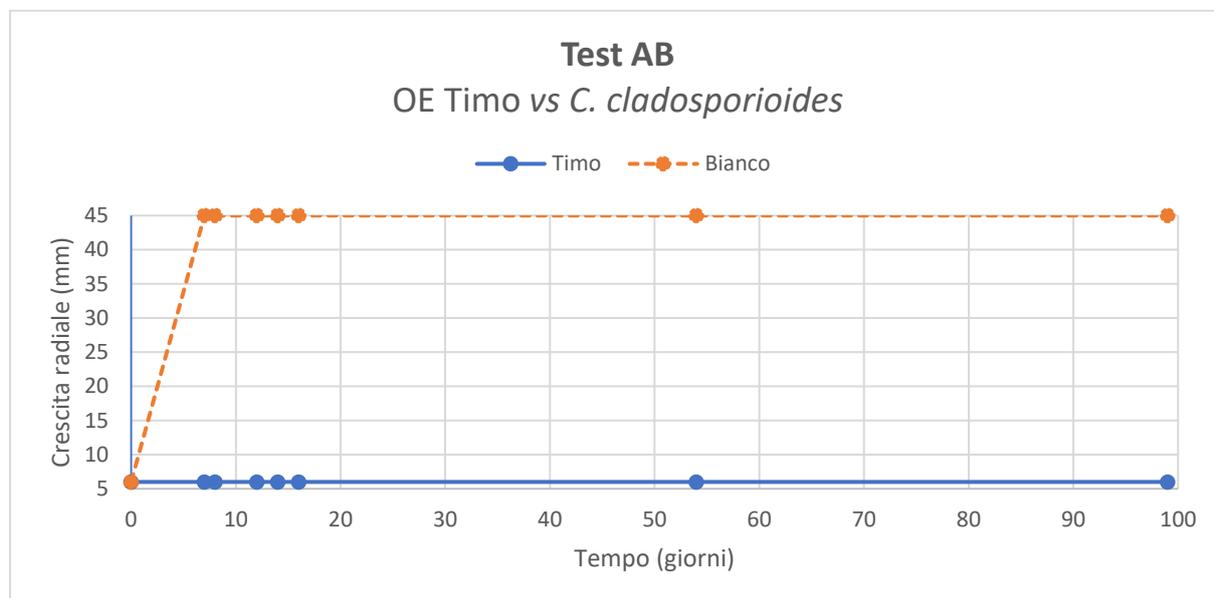


Figura 32: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.33, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Non è stata rilevata una germinazione delle spore di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di timo: il diametro di inibizione è, infatti, rappresentato da una retta orizzontale di valore costante (90 mm, valore massimo), a differenza di quello di *C. cladosporioides* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo.

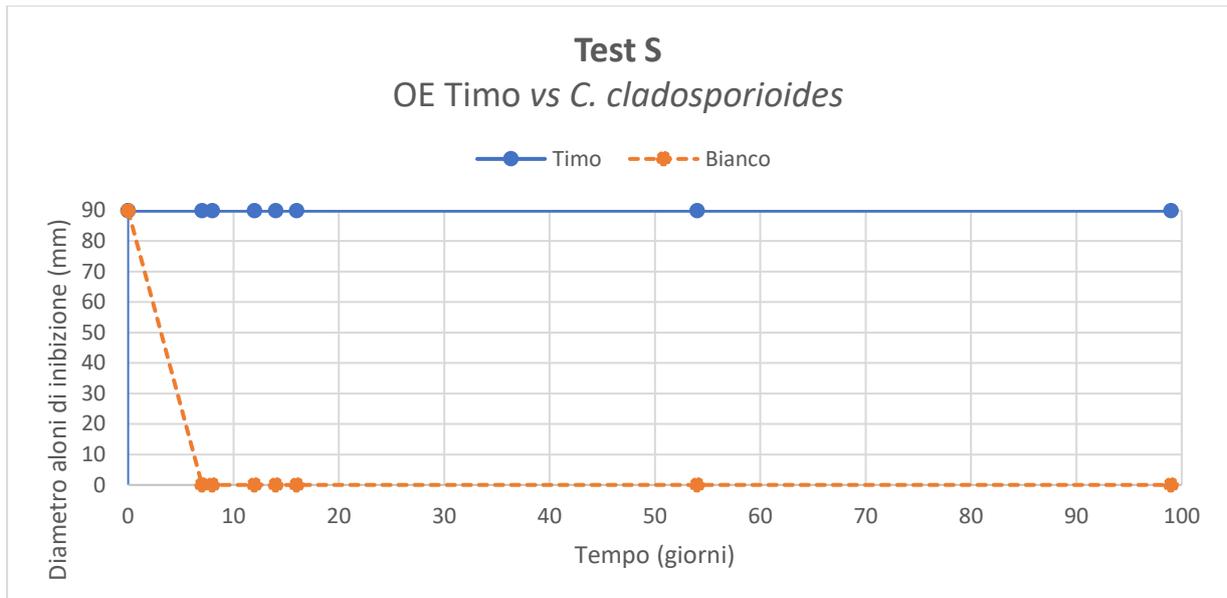


Figura 33: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nel grafico Fig.34 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. Non è stata rilevata una crescita di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di timo: la curva di crescita è, infatti, rappresentata da una retta orizzontale di valore costante (6 mm, valore del raggio del micelio inoculato), a differenza della curva di crescita di *Penicillium sp.* di controllo, dove il raggiungimento della completa colonizzazione della piastra Petri si riscontra dal 7° giorno dall'inoculo.

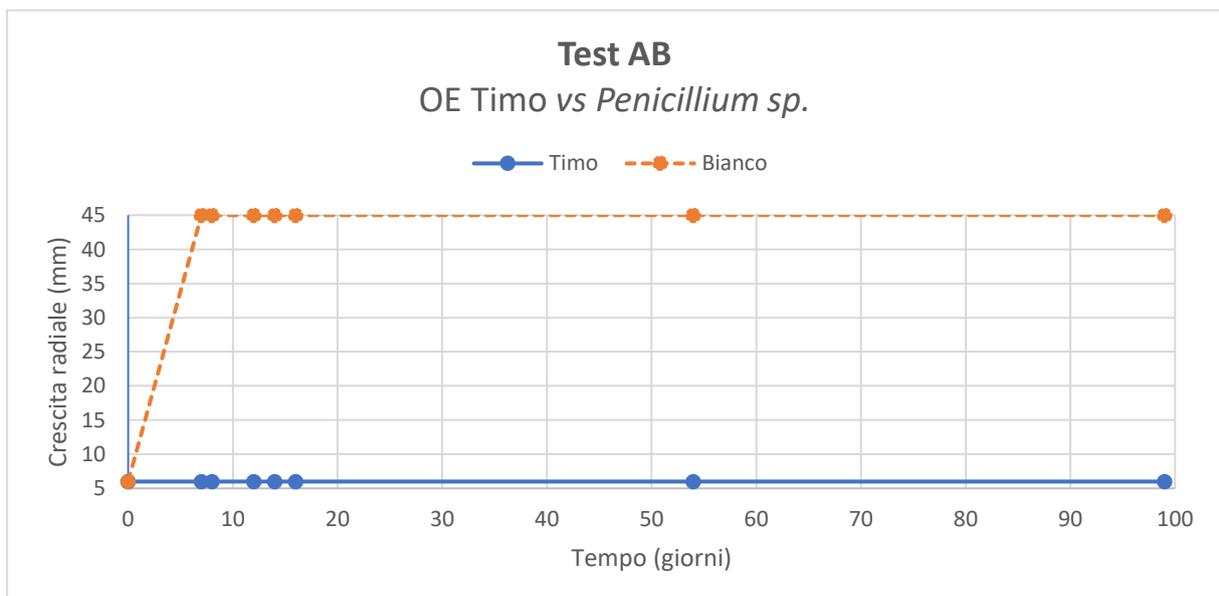


Figura 34: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.35, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Non è stata rilevata una germinazione delle spore di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di timo: il diametro di inibizione è, infatti, rappresentato da una retta orizzontale di valore costante (90 mm, valore massimo), a differenza di quello di *Penicillium sp.* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo.

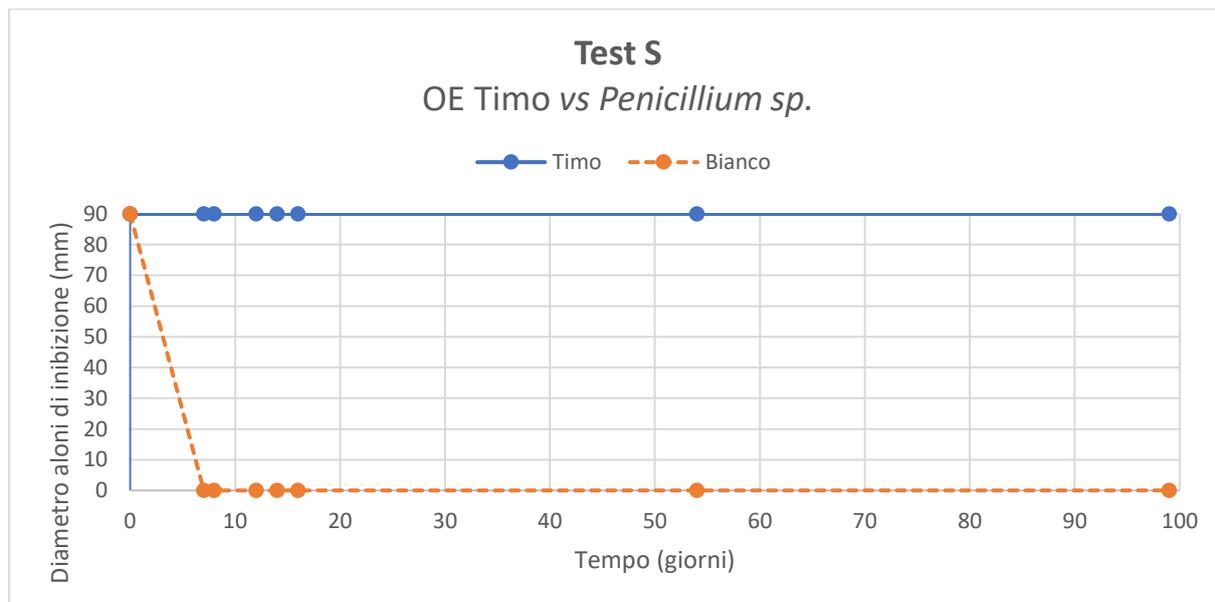


Figura 35: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Saccharomyces cerevisiae

Nel seguente grafico [Fig.36], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di timo, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Non è stata rilevata crescita di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di timo: il diametro di inibizione è, infatti, rappresentato da una retta orizzontale di valore costante (90 mm, valore massimo), a differenza di quello di *S. cerevisiae* di controllo, che ha raggiunto il valore medio di 23 ± 1 mm al 7° giorno dall'inoculo e si è mantenuto costante nel tempo.

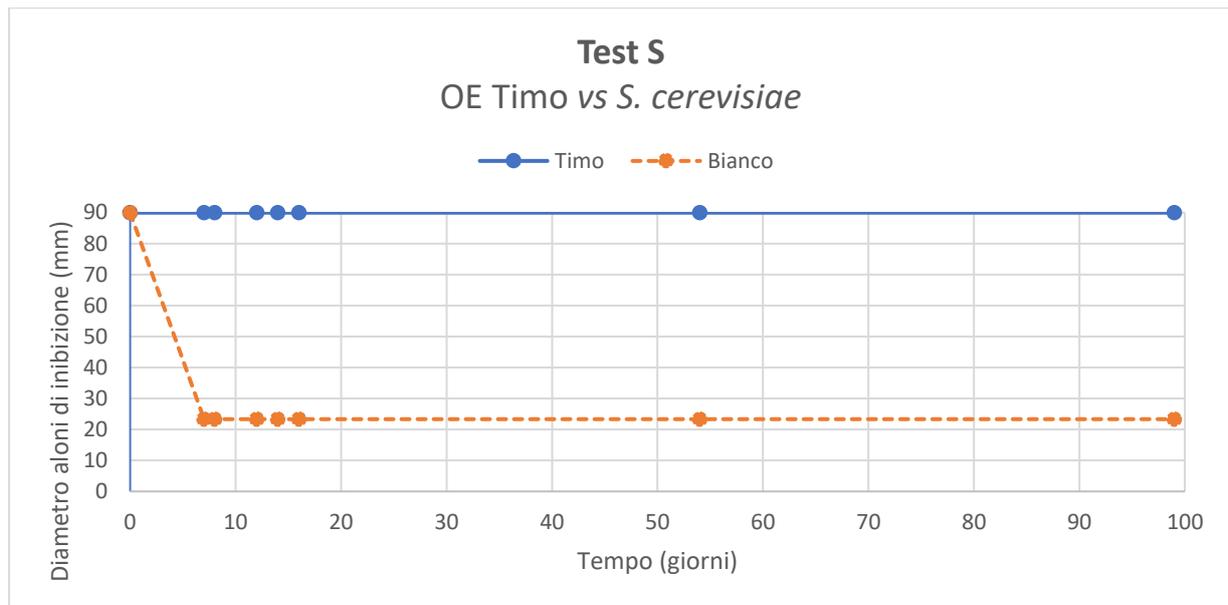


Figura 36: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di timo. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.2. OLIO ESSENZIALE DI CHIODI DI GAROFANO

Non sono state osservate crescite micotiche nei campioni trattati con olio essenziale di chiodi di garofano. Al contrario, i campioni testati con *Penicillium sp.* e con *Saccharomyces cerevisiae* hanno presentato una crescita fungina sotto forma di una leggera patina periferica, fin dalla prima ricognizione, senza però mutare nel tempo.

In questi campioni, il principio attivo eugenolo sembra in grado di garantire un effetto inibitorio duraturo nel tempo, influenzato anche dal fatto che la piastra Petri non è mai stata aperta e che quindi la quantità di olio essenziale volatile contenuto al suo interno si è mantenuta costante e non si è mai dispersa al suo esterno.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di chiodi di garofano con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.2.

Alternaria alternata

Nel grafico Fig.37 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. Non è stata rilevata una crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: la curva di crescita è, infatti, rappresentata da una retta orizzontale di valore costante (6 mm, valore del raggio del micelio inoculato), a differenza della curva di crescita di *A. alternata* di controllo, dove è ben visibile la fase di crescita esponenziale e il raggiungimento della completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo.

Nel grafico Fig.38, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Non è stata rilevata una germinazione delle spore di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: il diametro di inibizione è, infatti, rappresentato da una retta orizzontale di valore costante

(90 mm, valore massimo), a differenza di quello di *A. alternata* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo.

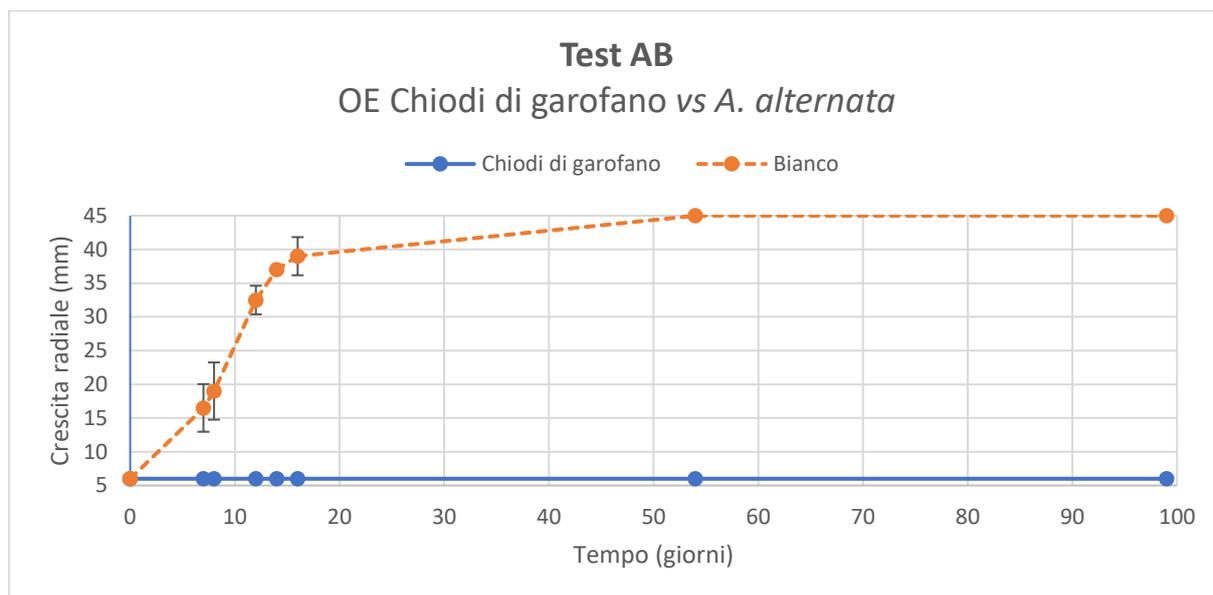


Figura 37: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

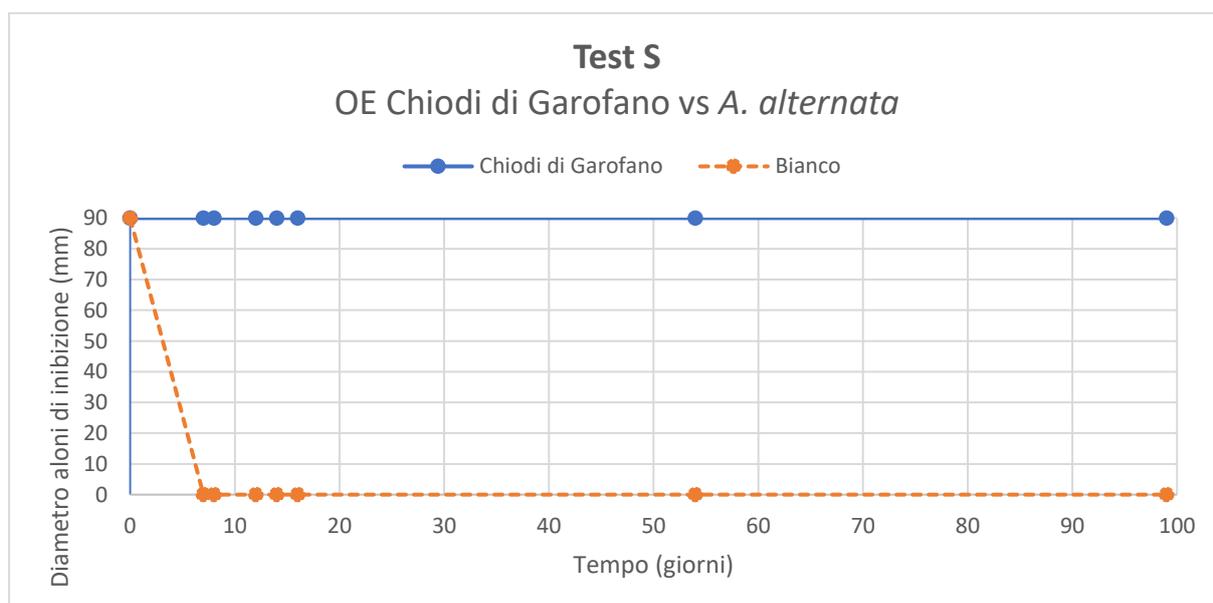


Figura 38: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Cladosporium cladosporioides

Nel grafico Fig. 39 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. Non è stata rilevata una crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di chiodi

di garofano: la curva di crescita è, infatti, rappresentata da una retta orizzontale di valore costante (6 mm, valore del raggio del micelio inoculato), a differenza della curva di crescita di *C. cladosporioides* di controllo, dove il raggiungimento della completa colonizzazione della piastra Petri si riscontra dal 7° giorno dall'inoculo.

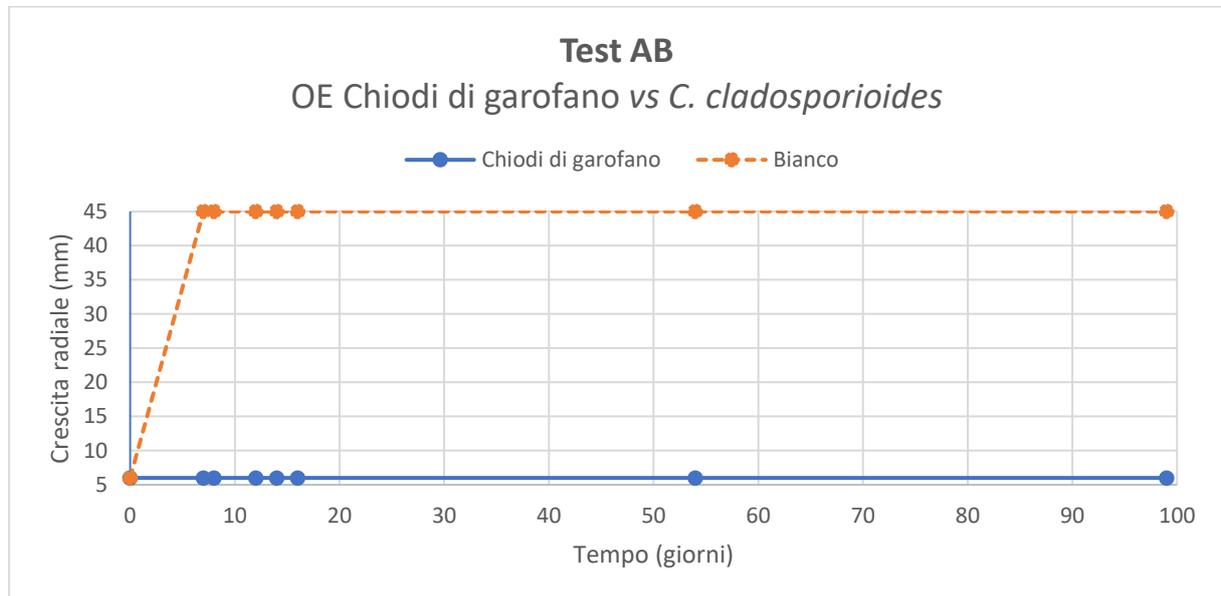


Figura 39: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.40, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale).

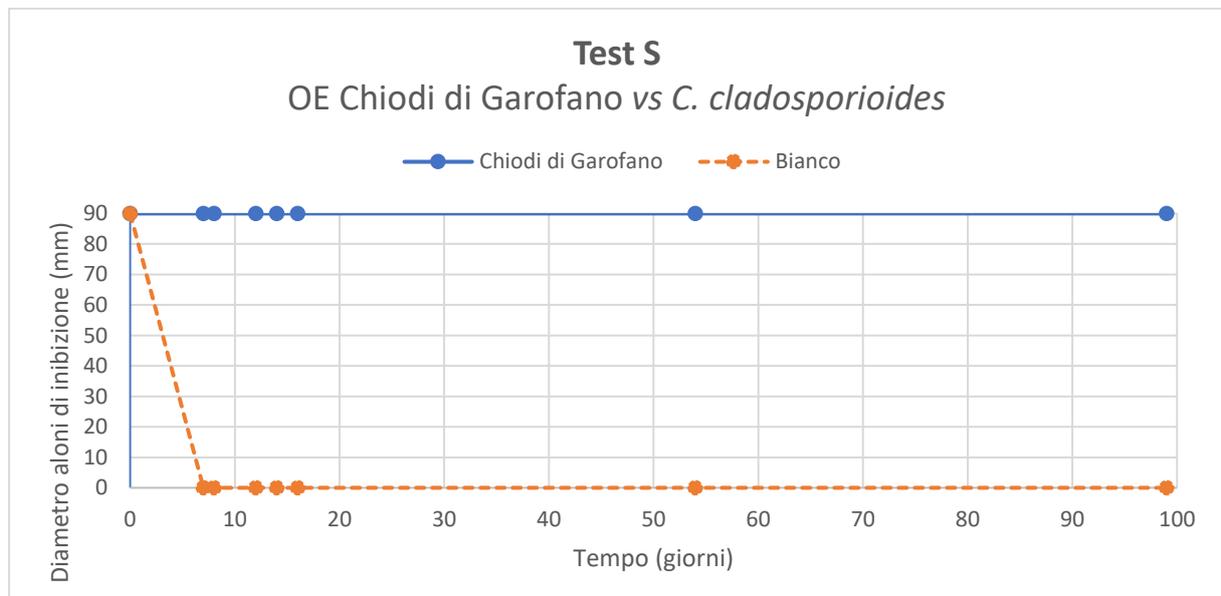


Figura 40: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile.

Non è stata rilevata una germinazione delle spore di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: il diametro di inibizione è, infatti, rappresentato da una retta orizzontale di valore costante (90 mm, valore massimo), a differenza di quello di *C. cladosporioides* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo.

Penicillium sp.

Non è stata riscontrata crescita fungina nei campioni EB-SAB-CL_CHIODI1_PEN_AB e EB-SAB-CL_CHIODI2_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB).

È stata rilevata, invece, una leggera crescita fungina, invece, nei campioni EB_SAB-CL_CHIODI1_PEN_S e EB_SAB-CL_CHIODI2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S).



Figura 41: Patina periferica di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_CHIODI1_PEN_S e EB_SAB-CL_CHIODI2_PEN_S, dopo 99 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

In entrambi i campioni, infatti, è stata osservata - come si evince dalle fotografie in Fig.41 A e B - la formazione di una periferica patina bianca, feltrosa, compatta e dal profilo elevato sui bordi della Piastra Petri, nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale. La presenza di questa patina è stata riscontrata già dal primo monitoraggio, ad una settimana dalla semina delle spore, ma non ha subito variazioni nel tempo, ben evidenti confrontando le piastre con la corrispettiva di controllo [Fig.41 C], dimostrando comunque anche in questo caso una azione diretta dell'olio essenziale di chiodi di garofano verso la muffa testata.

Nel grafico Fig. 42 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. Non è stata rilevata una crescita di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: la curva di crescita è, infatti, rappresentata da una retta orizzontale di valore costante (6 mm, valore del raggio del micelio inoculato), a differenza della curva di crescita di *Penicillium sp.* di controllo, dove il raggiungimento della completa colonizzazione della piastra Petri si riscontra dal 7° giorno dall'inoculo.

Nel grafico Fig.43, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 51 mm al 7° giorno dall'inoculo e si

è mantenuto costante nel tempo, a differenza di quello di *Penicillium sp.* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo.

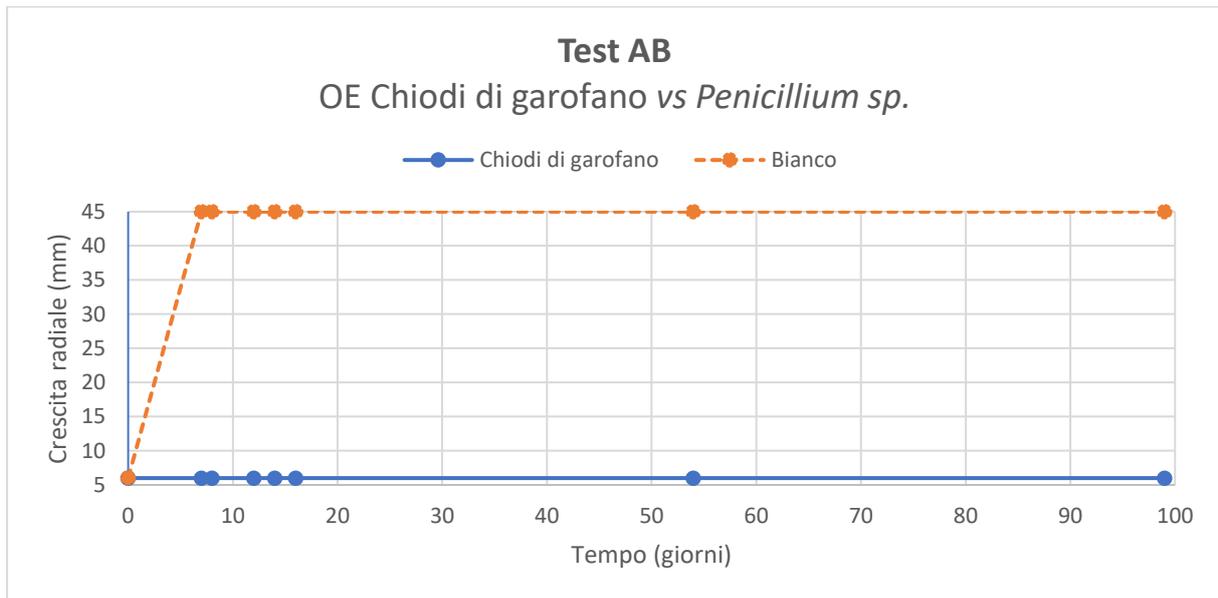


Figura 42: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

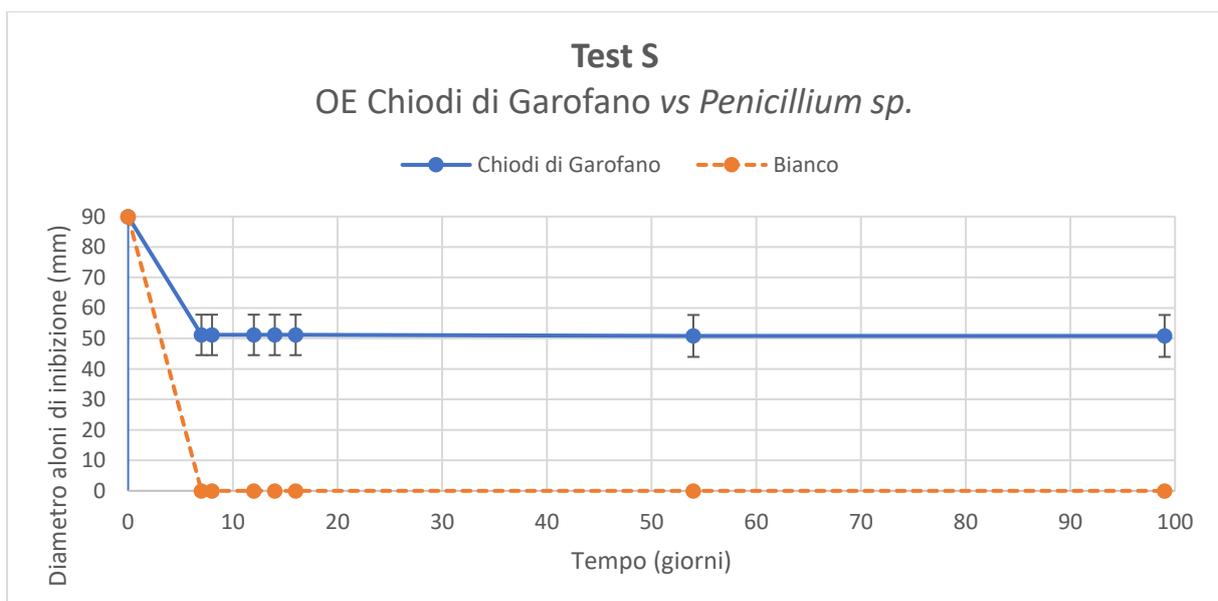


Figura 43: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_CHIODI1_SAC_S e EB_SAB-CL_CHIODI2_SAC_S è stata osservata la formazione di una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato sui bordi della Piastra Petri, nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale. La presenza di questa patina è stata riscontrata già dal primo monitoraggio, ad una settimana dalla semina del lievito [Fig.44], e ha subito una variazione minima nel tempo [Fig.45].

Sono presenti aloni di inibizione anche nel campione di controllo, provocati dal contatto diretto del lievito con l'acetone.



Figura 44: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_CHIODI1_PEN_S e EB_SAB-CL_CHIODI2_PEN_S, dopo 7 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.



Figura 45: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_CHIODI1_SAC_S e EB-S-CL_CHIODI2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_S_BIANCO.

Nel seguente grafico [Fig.46], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata crescita di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 39 ± 3 mm al 7° giorno dall'inoculo e si è mantenuto costante nel tempo, a differenza di quello di *S. cerevisiae* di controllo, che ha raggiunto il valore medio e costante di 23 ± 1 mm dal 7° giorno dall'inoculo.

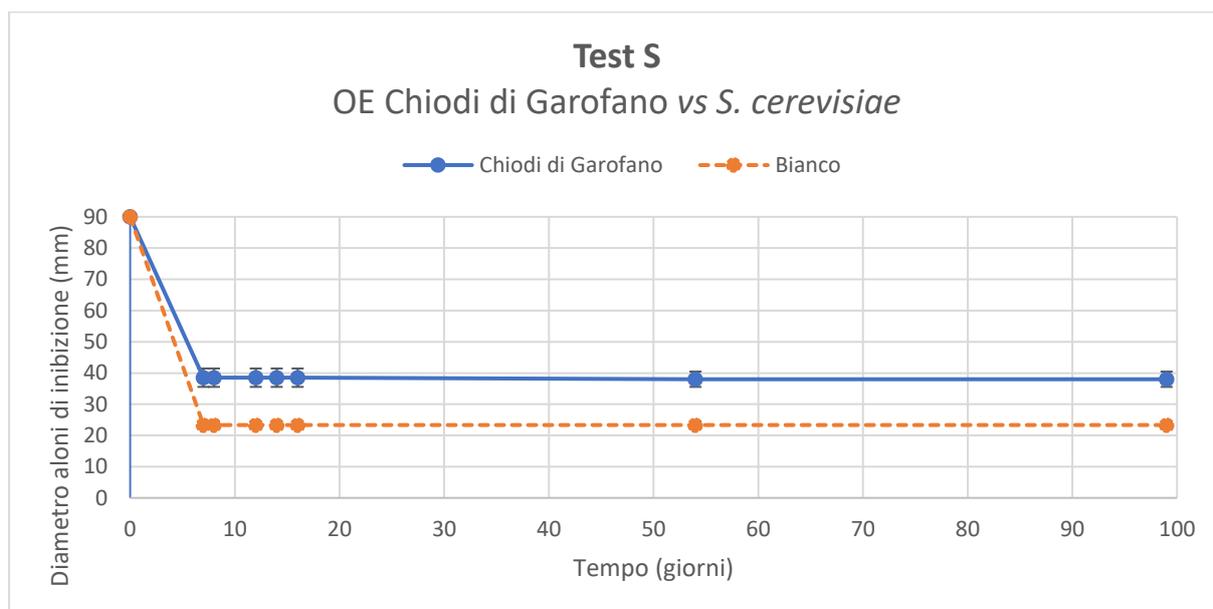


Figura 46: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di chiodi di garofano. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.3. OLIO ESSENZIALE DI BASILICO

È stata osservata una crescita micotica in tutti i campioni trattati con olio essenziale di basilico.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di basilico con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.3.

Alternaria alternata

Nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_ALT_AB e EB_SAB-CL_BASIL1_ALT_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di ife bianche e cotonose dalla zona di inoculo del micelio durante la terza ricognizione (12° giorno) [Fig.47].

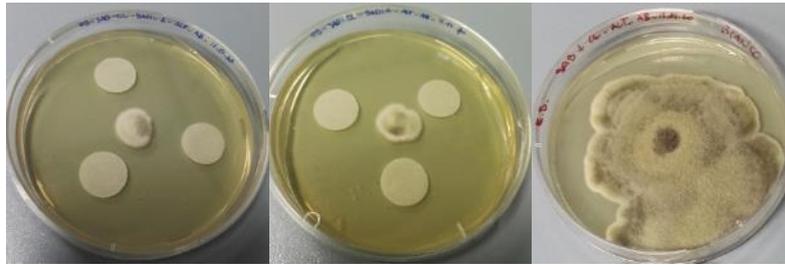


Figura 47: Ife di accrescimento di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_ALT_AB e EB_SAB-CL_BASIL1_ALT_AB, dopo 12 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nel campione EB_SAB-CL_BASIL1_ALT_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la germinazione di ife bianche e cotonose nei bordi della piastra Petri, nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale, durante la terza ricognizione (12° giorno) [Fig.48].



Figura 48: Ife di accrescimento di *A. alternata* nel campione EB_SAB-CL_BASIL1_ALT_S, dopo 12 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Lo stesso tipo di accrescimento è stato osservato nel campione EB_SAB-CL_BASIL2_ALT_S, ma durante la quarta ricognizione (14° giorno) [Fig.49].

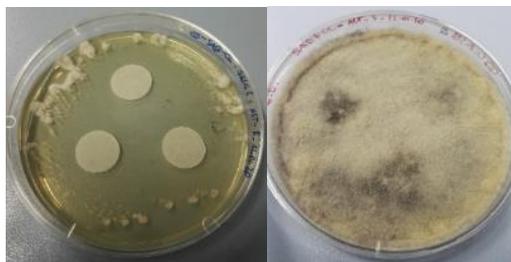


Figura 49: Ife di accrescimento di *A. alternata* nel campione EB_SAB-CL_BASIL2_ALT_S, dopo 14 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

È stata rilevata una variazione di colorazione anomala del micelio, sia nei campioni AB che nei campioni S.

Nei primi, il micelio di confronto, se paragonato allo stesso stadio di crescita, presenta una zona centrale verde oliva circondata da una corona di ife bianche più giovani, con funzione di accrescimento. I campioni trattati con olio essenziale di basilico, invece, presentano una zona centrale

di verde più scuro, sovrastata da ife bianche aeree, un anello più esterno di colorazione giallo senape ed infine il perimetro di ife bianche più giovani, con funzione di accrescimento [Fig.50].

La presenza di miceli secondari, distanziati dal principale, è causata dallo spostamento delle piastre Petri. I conidi del Fungo sono riusciti, tramite il movimento, a rilasciare le conidiospore, le quali sono germinate successivamente. Questo fenomeno si è riscontrato anche nel campione di controllo.



Figura 50: Colorazione anomala di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BASILI_ALT_AB e EB_SAB-CL_BASILI_ALT_AB, dopo 16 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con la colorazione del campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO, dopo una settimana dall'inoculo del micelio.

Nei campioni S, la variazione di colore è meno netta ma ugualmente presente [Fig.51]. L'olio essenziale di basilico potrebbe aver influito sulla produzione di pigmenti da parte del Fungo *A. alternata*.



Figura 51: Colorazione anomala di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BASILI_ALT_AB e EB_SAB-CL_BASILI_ALT_AB, dopo 16 giorni dalla semina delle spore. Confronto con la colorazione del campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO, dopo una settimana dalla semina delle spore.

Per tutti i campioni analizzati, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), senza subire ulteriori variazioni nella successiva ricognizione. La colorazione è virata a marrone scuro ed è stata riscontrata la presenza di goccioline sulla superficie lanosa del Fungo.

Nei campioni AB, la crescita fungina è avanzata solo sopra la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco [Fig.52].

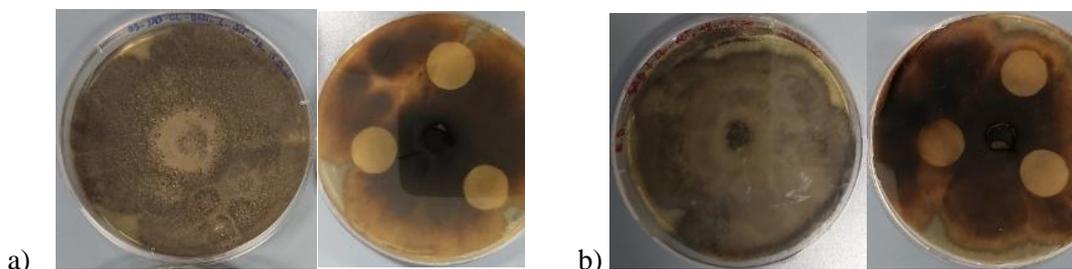


Figura 52: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BASILI_ALT_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni S, non è avvenuta crescita fungina nel triangolo centrale della piastra Petri, area dove si è concentrato più olio essenziale. Nel retro della piastra Petri è possibile osservare come le ife si sono parzialmente diramate anche sotto i cerchietti, ma in proporzione minore rispetto al campione di controllo [Fig.53].

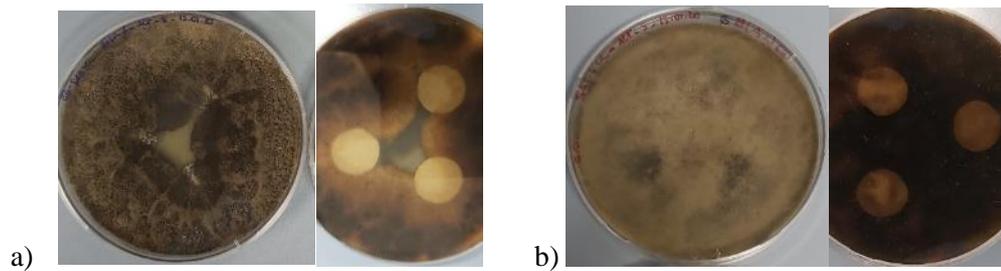


Figura 53: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BASILI_ALT_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.54 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben visibile l'inizio della fase esponenziale della curva di crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di basilico che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono nettamente inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto. L'olio essenziale di basilico provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

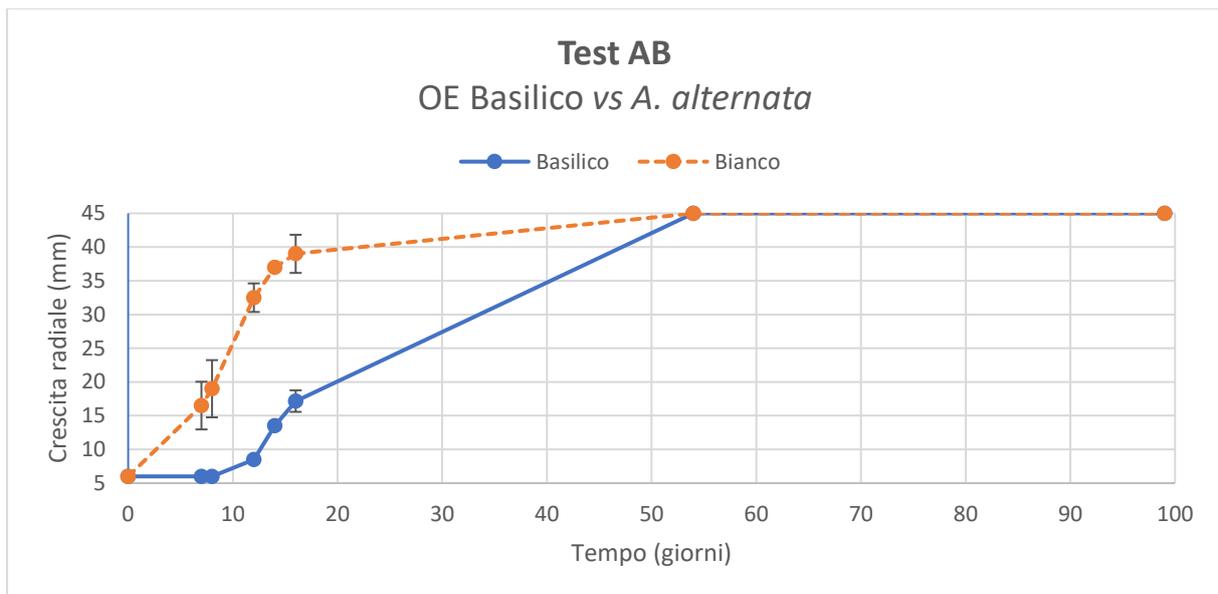


Figura 54: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.55, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di basilico. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 54° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del

campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di basilico provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

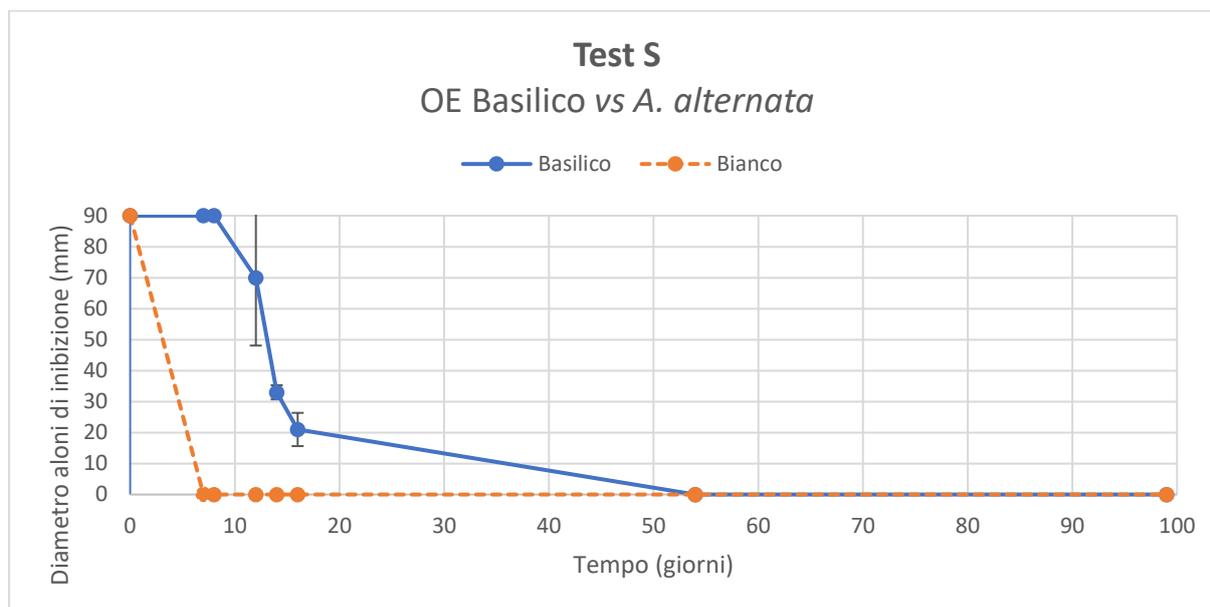


Figura 55: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Cladosporium cladosporioides

Nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_AB e EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di ife cotonose verdi e bianche dalla zona di inoculo del micelio, durante la quarta ricognizione (14° giorno) [Fig.56].

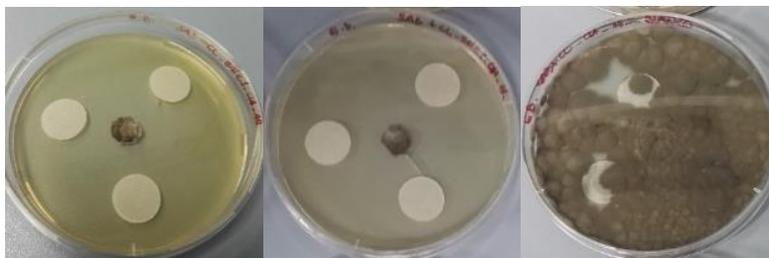


Figura 56: Ife di accrescimento di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_AB e EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_AB, dopo 14 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_S e EB_SAB-CL_BASIL2_CLA_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la presenza del micelio, ormai maturo, durante la sesta ricognizione (54° giorno). Le spore di *C. cladosporioides* germinate con l'olio essenziale di basilico presentano una dimensione di micelio maggiore rispetto a quelli di confronto. Questo può essere spiegato se si considera che parte delle spore è inibita dall'olio essenziale e non è riuscita a germinare, mentre le spore rimanenti, vista la minore competizione, sono riuscite a crescere espandendosi maggiormente in larghezza. I miceli germinati si presentano come colonie fungine rotonde, vellutate, con margini interi e dal profilo umbonato. Nella zona centrale del micelio è presente una zona sferica rialzata che presenta le ifee aeree bianche. Il colore è marrone, salvo il perimetro che è bianco, per la presenza di ife di accrescimento [Fig.57].

Nei campioni AB, il micelio presenta una superficie vellutata e rugosa, di colorazione marrone scuro. Rispetto al campione di confronto, composto da tante colonie fungine, esso si presenta come una massa omogenea. Questo può essere spiegato dalla minore competizione data dall'effetto inibitorio dell'olio essenziale [Fig.58].

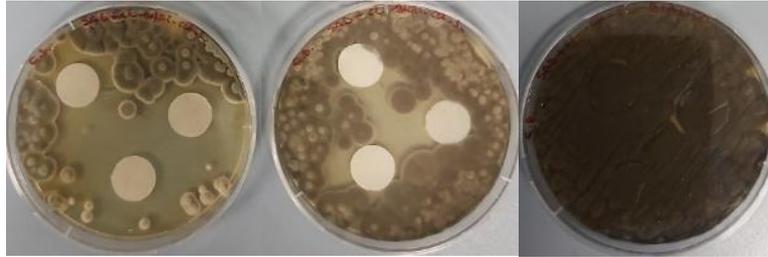


Figura 57: Formazione di miceli di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_S e EB_SAB-CL_BASIL2_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.



Figura 58: Formazione di miceli di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_AB e EB_SAB-CL_BASIL2_CLA_AB, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni AB, la crescita del micelio ha ricoperto parzialmente tutta l'area della piastra Petri durante la settima ricognizione (99° giorno).

La crescita fungina è avanzata anche sotto la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco [Fig.59].

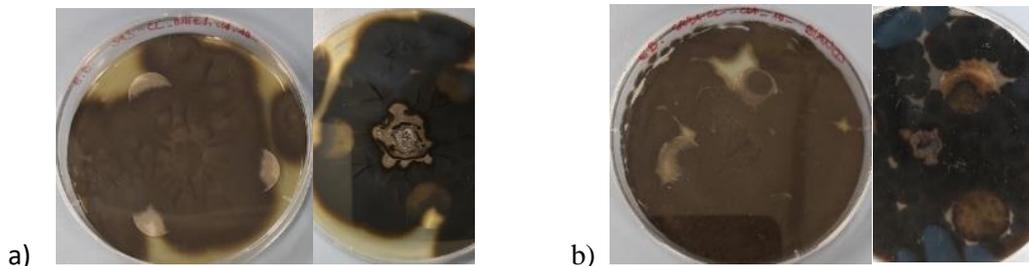


Figura 59: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_AB, dopo 99 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni S, la crescita del micelio non ha ricoperto tutta la superficie della piastra Petri neanche durante l'ultima ricognizione. Non è stata osservata crescita miceliare nell'area centrale della piastra Petri, dove si è concentrato più olio essenziale. Nel retro della piastra Petri è possibile osservare come la crescita fungina non si sia spinta sotto i cerchietti, a differenza del campione di controllo [Fig.60].

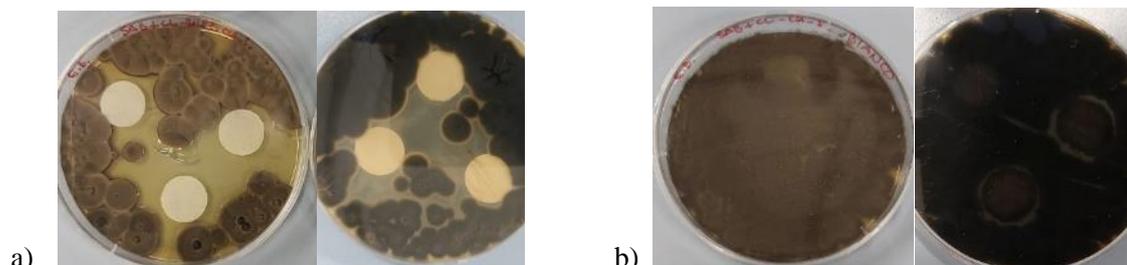


Figura 60: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nel grafico Fig. 61 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È stata rilevata l'inizio della fase esponenziale della curva di crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di basilico durante la quarta ricognizione (14° giorno) che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. Si può notare come la fase di latenza ha avuto una durata maggiore rispetto a quella del campione di controllo e che i valori della fase esponenziale sono nettamente inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto. L'olio essenziale di basilico provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

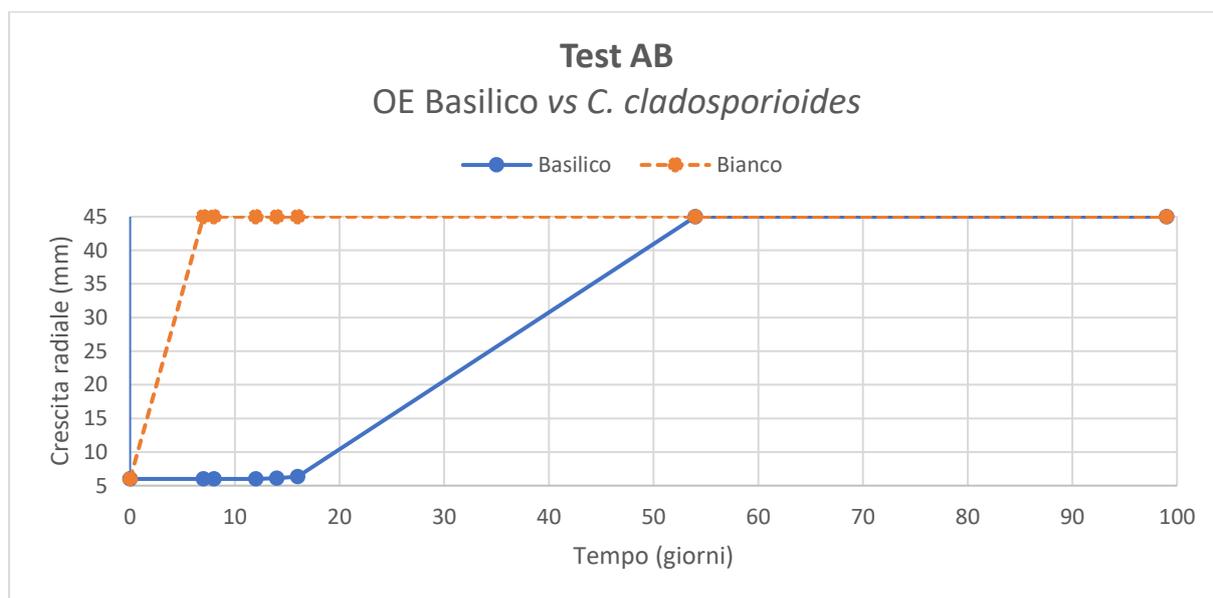


Figura 61: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.62, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di basilico: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 20 mm al 54° giorno dall'inoculo ed è diminuito a 17 al 99° giorno, a differenza di quello di *C. cladosporioides* di controllo, che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo. È possibile notare anche che la fase di latenza abbia avuto una durata maggiore rispetto a quella del campione di controllo.

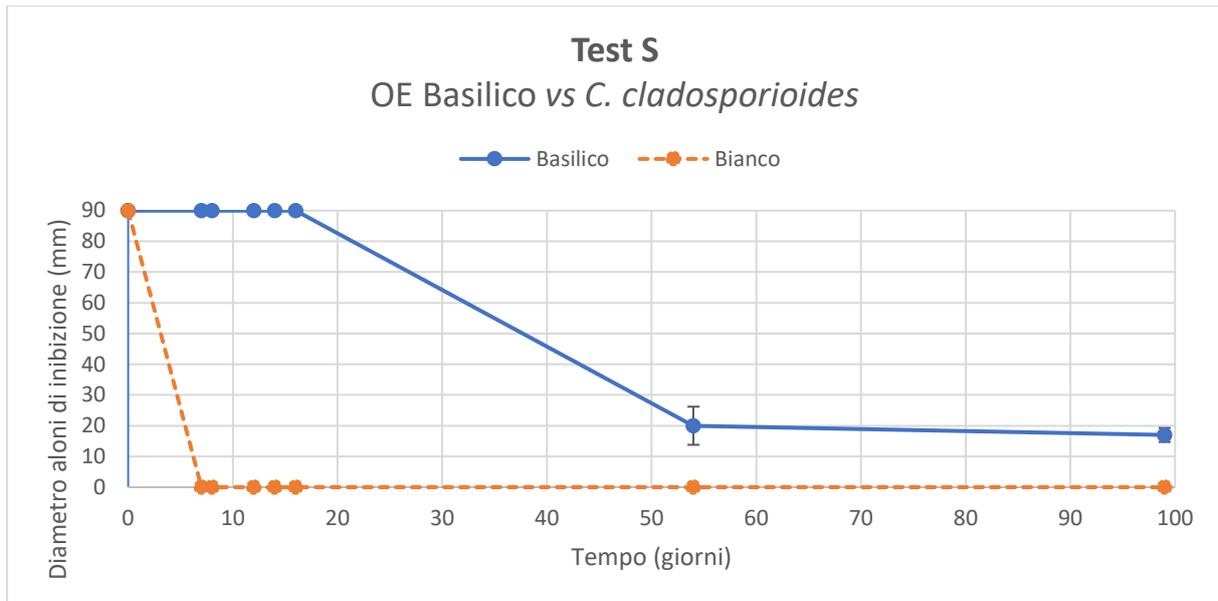


Figura 62: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_AB e EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di ife feltrose verdi e bianche dalla zona di inoculo del micelio, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.63].



Figura 63: Ife di accrescimento di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_AB e EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_S e EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la germinazione di ife bianche e feltrose nei bordi della piastra Petri, nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.64].



Figura 64: Ife di accrescimento di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_S e EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Durante la terza ricognizione (12° giorno), il micelio ha assunto una colorazione tendente al verde brillante con presenza di ife di accrescimento bianche. Nei campioni AB il profilo risulta cupoliforme

e l'aspetto feltroso. Nei campioni S, invece, il profilo è elevato e tendenzialmente costante, con aspetto soffice e vellutato. Il micelio giovane dei campioni di controllo, invece, si presenta di un verde meno brillante, con una consistenza maggiormente polverosa e secca, con presenza di ciuffetti di ife aeree bianche sulla superficie [Fig.65].

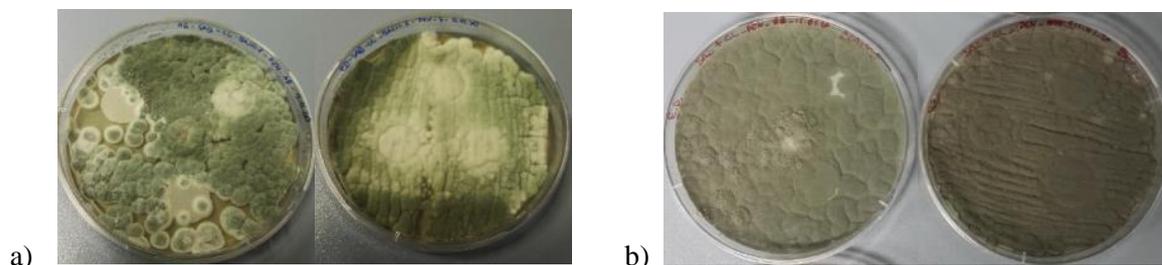


Figura 65: a) Crescita di *Penicillium* sp. nei campioni EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_AB e EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_S, dopo 12 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con i campioni di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Le fruttificazioni conidiche mature, invece, sono virate ad una colorazione marrone, senza subire ulteriori modificazioni nella morfologia di profilo e di superficie. Un completo viraggio di colore a marrone, nei campioni di confronto, è stato osservato durante la sesta ricognizione (54° giorno), mentre nei campioni trattati con olio essenziale è visibile già durante la quinta ricognizione (16° giorno) [Fig.66].

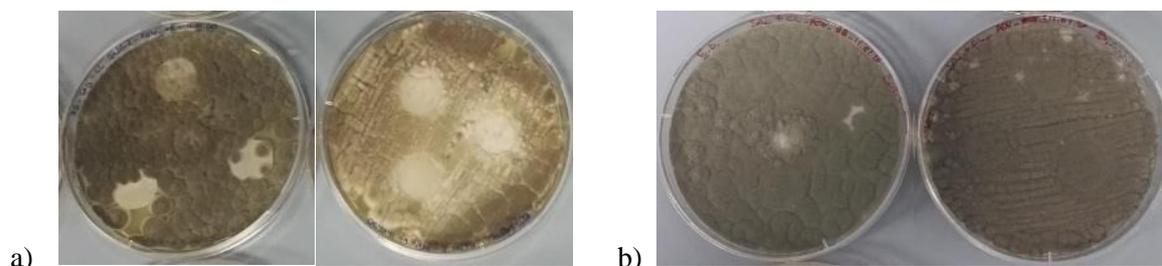


Figura 66: a) Micelio di colorazione marrone di *Penicillium* sp. nei campioni EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_AB e EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_S, durante la quinta ricognizione. b) Confronto con la colorazione verde dei campioni di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO e EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Per tutti i campioni analizzati, durante la terza ricognizione (12° giorno), il micelio si è espanso raggiungendo i bordi della piastra Petri.

Da notare che, per quanto riguarda i campioni AB, il Fungo non è stato in grado di colonizzare interamente tutta l'area a disposizione, durante la sesta ricognizione (54° giorno). La colonizzazione è avanzata parzialmente anche sotto i cerchietti, mentre nella piastra di controllo si nota che questi ultimi sono stati colonizzati interamente [Fig.67].

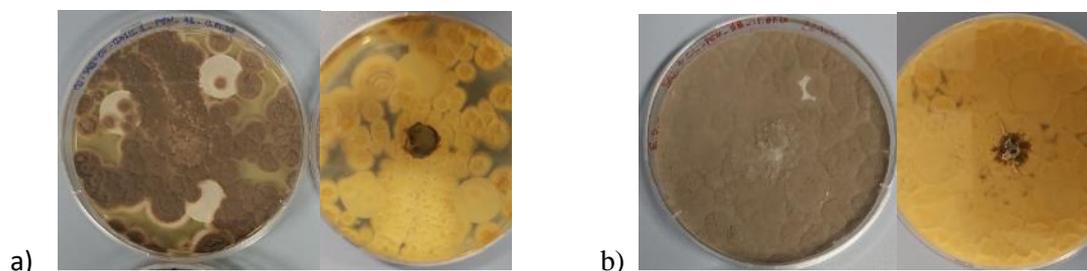


Figura 67: a) Micelio di *Penicillium* sp. nel campione EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni S, invece, la crescita del micelio ha ricoperto interamente tutta superficie della piastra Petri, anche se risulta inibita sopra i cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale. È possibile osservare come la crescita fungina si sia spinta sotto i cerchietti ed è paragonabile a quella di controllo [Fig.68].

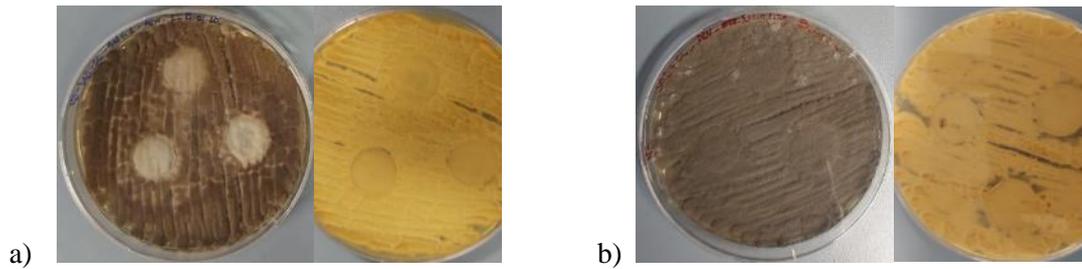


Figura 68: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_BASILI_PEN_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.69 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È stata rilevata l'inizio della fase esponenziale della curva di crescita di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di basilico alla prima ricognizione. Il fungo ha raggiunto i bordi della piastra Petri al 12° giorno dall'inoculo. I valori dell'inizio della fase esponenziale sono nettamente inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto. L'olio essenziale di basilico provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al fungo in esame.

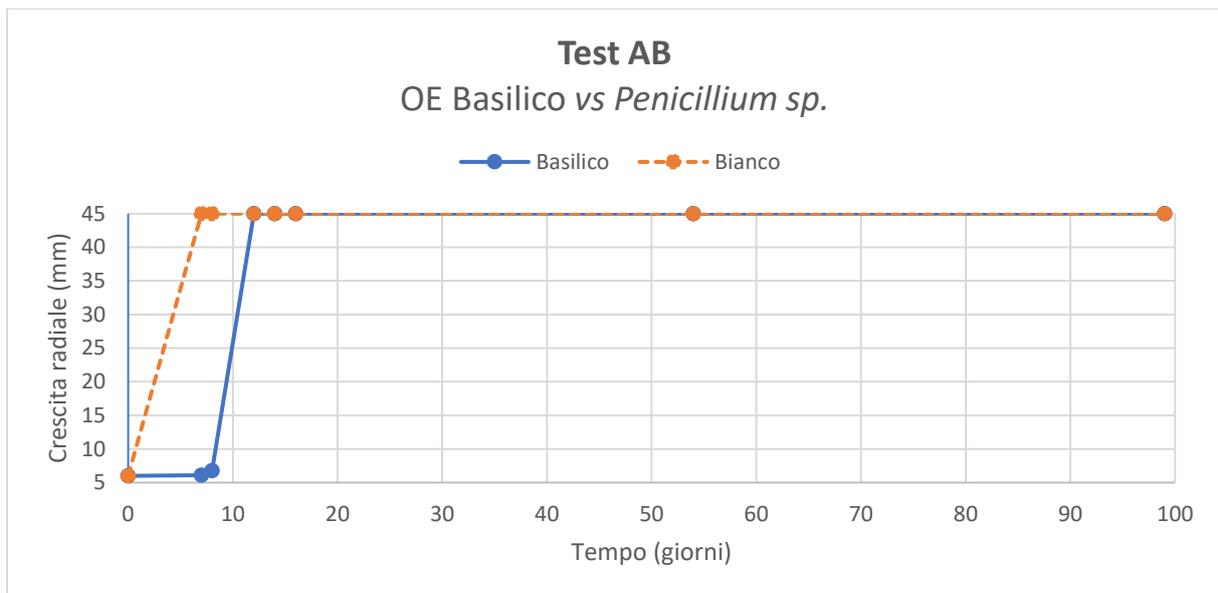


Figura 69: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.70, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di basilico. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 12° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di basilico provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al fungo in esame.

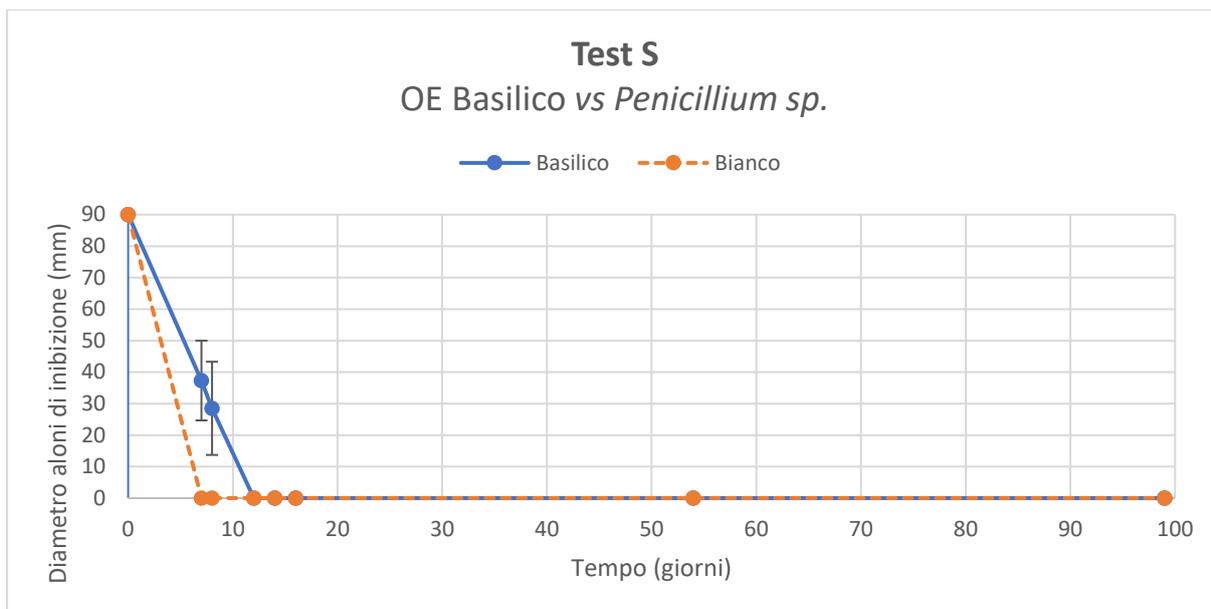


Figura 70: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_SAC_S e EB_SAB-CL_BASIL2_SAC_S è stata osservata la formazione di ampie colonie biancastre, lisce, cremose, dai margini ondulati e dal profilo cupoliforme, in prossimità dei bordi della piastra Petri, ovvero nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale. La presenza delle colonie è stata riscontrata durante la sesta ricognizione (54° giorno) e non è mutata nella ricognizione successiva [Fig.71].

Molto differente è l'aspetto della crescita nel campione di controllo, che si presenta come una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato. Sono presenti, inoltre, gli aloni di inibizione provocati dal contatto diretto del lievito con l'acetone.



Figura 71: Crescita di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_BASIL1_SAC_S e EB_SAB-CL_BASIL2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Nel seguente grafico [Fig.72], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di basilico, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata crescita di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di basilico: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 36 ± 9 mm al 54° giorno dall'inoculo e si è mantenuto costante nel tempo, a differenza di quello di *S. cerevisiae* di controllo, che ha raggiunto il valore medio e costante di 23 ± 1 mm dal 7° giorno dall'inoculo. La fase di latenza ha avuto una durata maggiore rispetto a quella del campione di controllo. L'olio essenziale di basilico provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

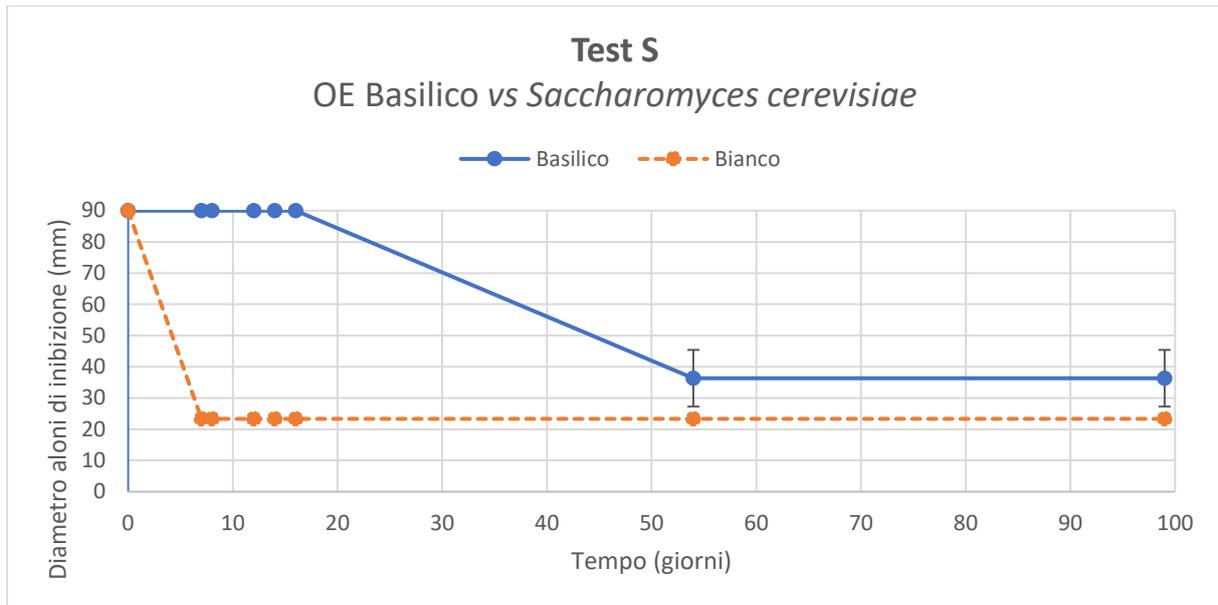


Figura 72: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di basilico. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.4. OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO

È stata osservata una crescita micotica in tutti i campioni trattati con olio essenziale di bergamotto.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di bergamotto con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.4.

Alternaria alternata

Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_ALT_AB e EB_SAB-CL_BERG1_ALT_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva, circondate da un perimetro bianco composto da ife bianche di accrescimento, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.73].

La presenza di un micelio secondario distanziato dal principale, nel campione EB_SAB-CL_BERG2_ALT_AB, è causato dallo spostamento della piastra Petri. I conidi del Fungo sono riusciti, tramite il movimento, a rilasciare le conidiospore, le quali sono germinate successivamente. Questo fenomeno si è riscontrato anche nel campione di controllo.

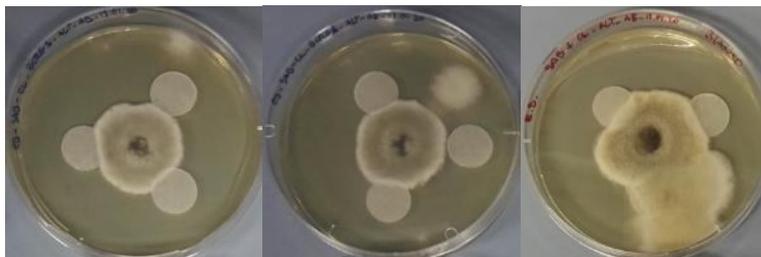


Figura 73: Crescita di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_ALT_AB e EB_SAB-CL_BERG1_ALT_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_ALT_S e EB_SAB-CL_BERG2_ALT_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la germinazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva, durante la prima ricognizione (7° giorno). È possibile osservare come l'area triangolare centrale della piastra non presenti crescita micotica, in quanto area a maggior concentrazione di olio essenziale [Fig.74].



Figura 74: Crescita di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_ALT_S e EB_SAB-CL_BERG2_ALT_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Per i campioni AB, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), senza subire ulteriori variazioni nella successiva ricognizione. Per i campioni S, invece, la colonizzazione completa dell'area si è riscontrata durante la terza ricognizione (12° giorno), anche se parzialmente inibita nell'area soprastante ai cerchietti imbevuti di olio essenziale.

Nei campioni AB, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro. La crescita fungina è avanzata solo sopra la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco [Fig.75].

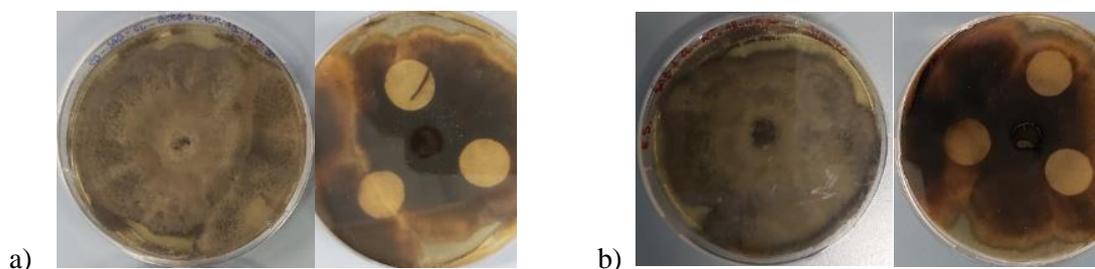


Figura 75: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_ALT_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni S, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro e non si osserva crescita fungina sotto la superficie dei dischetti di carta, riscontrata invece nel campione di controllo [Fig.76].

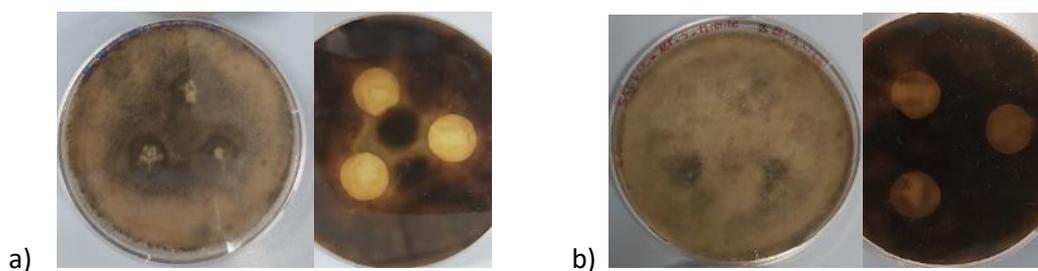


Figura 76: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_ALT_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO.

Nel grafico Fig. 77 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di bergamotto che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono simili a quelli della fase esponenziale di confronto.

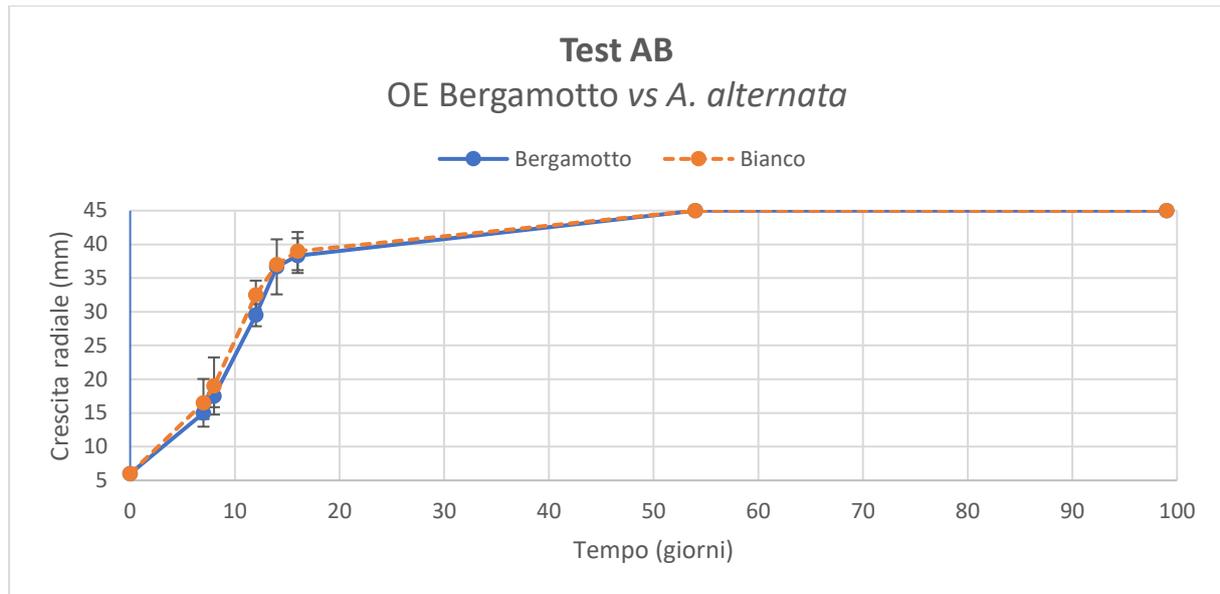


Figura 77: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.78, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di bergamotto. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore di 1 mm al 54° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di bergamotto provoca un leggero effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

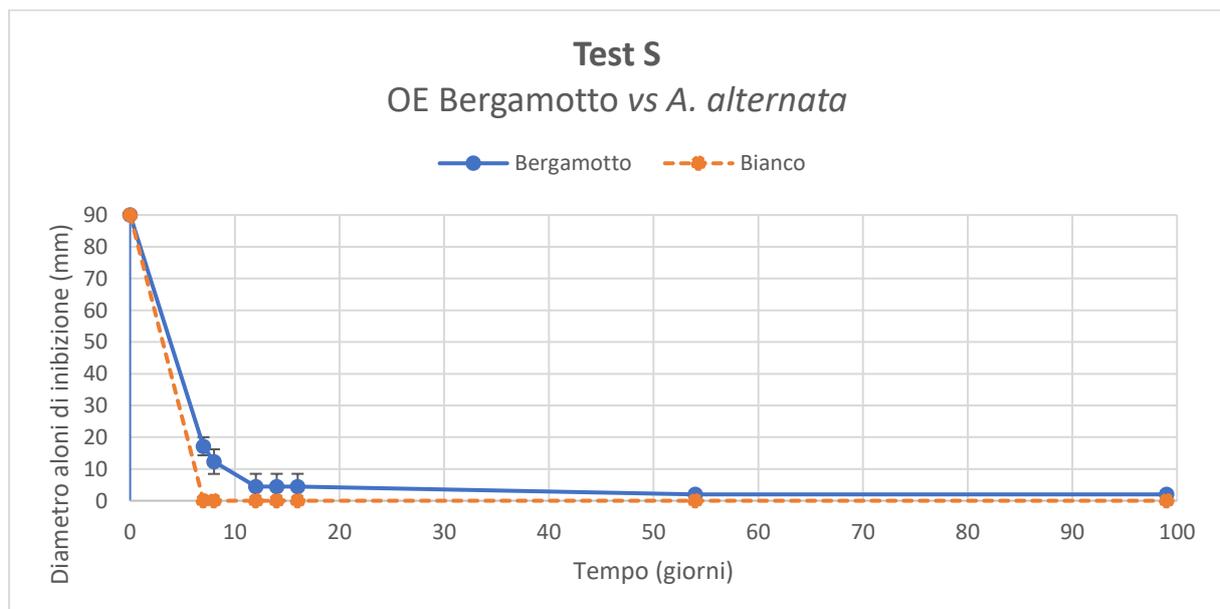


Figura 78: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Cladosporium cladosporioides

Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_CLA_AB e EB_SAB-CL_BERG1_CLA_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di colonie fungine rotonde, verdi, vellutate e dal profilo umbonato, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.79].

Rispetto al campione di controllo, le colonie si presentano di dimensioni minori e la colorazione è leggermente più chiara.



Figura 79: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_CLA_AB e EB_SAB-CL_BERG1_CLA_AB, dopo una settimana dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_CLA_S e EB_SAB-CL_BERG2_CLA_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata una crescita omogenea, vellutata, di consistenza soffice, che segue il movimento di striscio eseguito durante la semina, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.80].

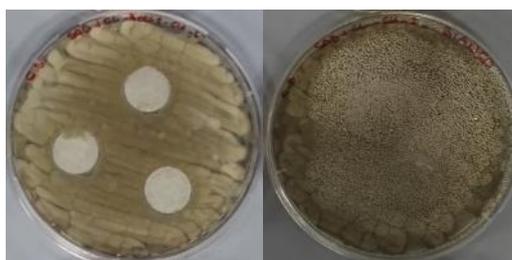


Figura 80: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BERG2_CLA_S, dopo una settimana dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Rispetto al campione di controllo, le colonie presentano una colorazione è leggermente più chiara e tendente al verde oliva. Non è osservata crescita fungina sopra i cerchietti imbevuti di olio essenziale.

Nei campioni AB, la crescita del micelio ha ricoperto parzialmente tutta l'area della piastra Petri durante la quinta ricognizione (16° giorno), mentre nei campioni S è avvenuta fin dalla prima ricognizione (7° giorno).

Il micelio maturo ha assunto una colorazione marrone e, nei campioni AB, non è riuscito a propagarsi interamente sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.81].

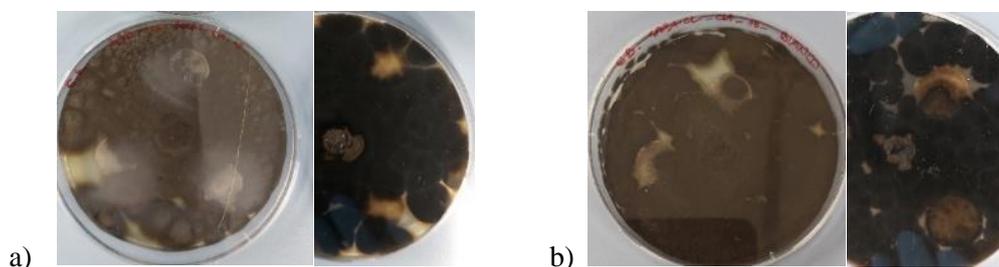


Figura 81: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_CLA_AB, dopo 99 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO. Le foto del retro della piastra Petri risalgono alla ricognizione del 30 Marzo (54° giorno).

Nei campioni S, invece, la crescita fungina è presente interamente anche sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale, mentre non sono stati completamente ricoperti in superficie [Fig.82].

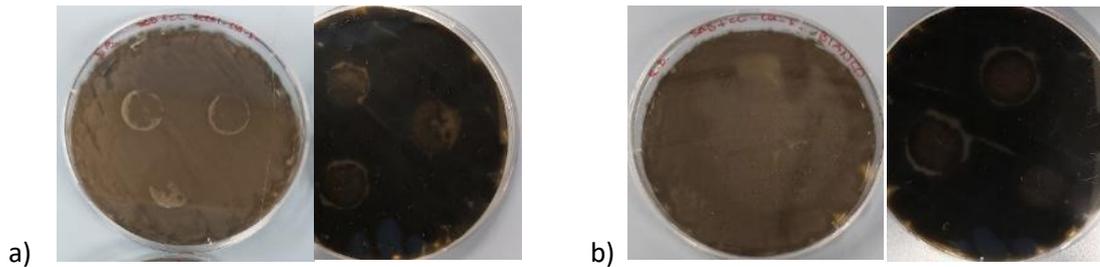


Figura 82: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nel grafico Fig. 83 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di bergamotto che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 12° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto. L'olio essenziale di bergamotto provoca, quindi, un effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

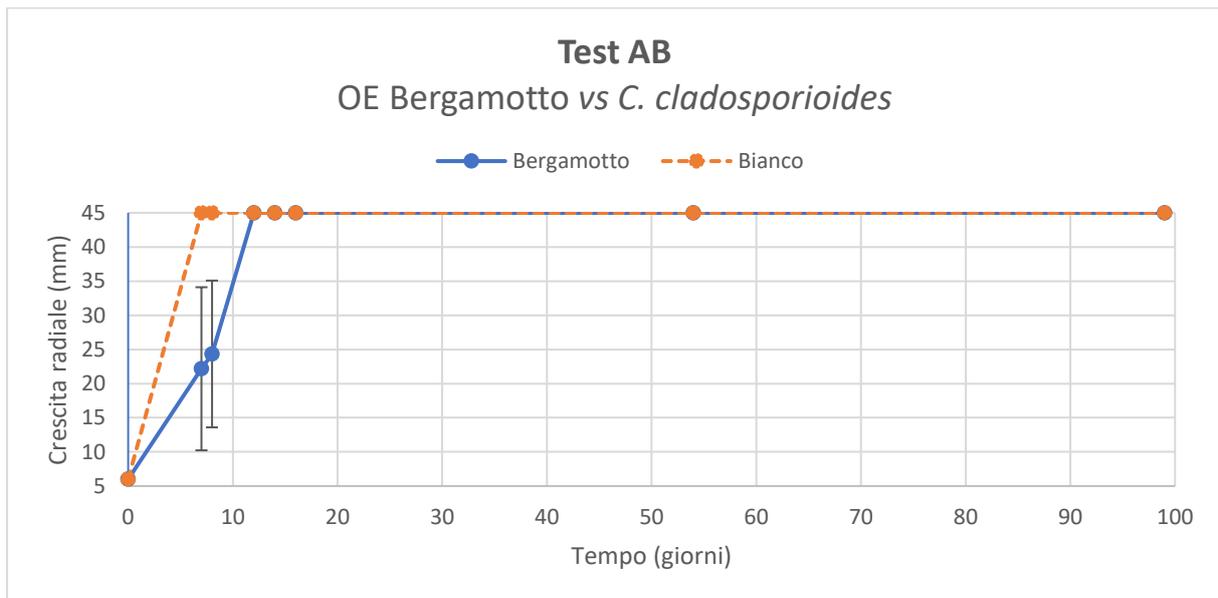


Figura 83: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.84, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di bergamotto. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 12° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7°

giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di bergamotto provoca un leggero effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

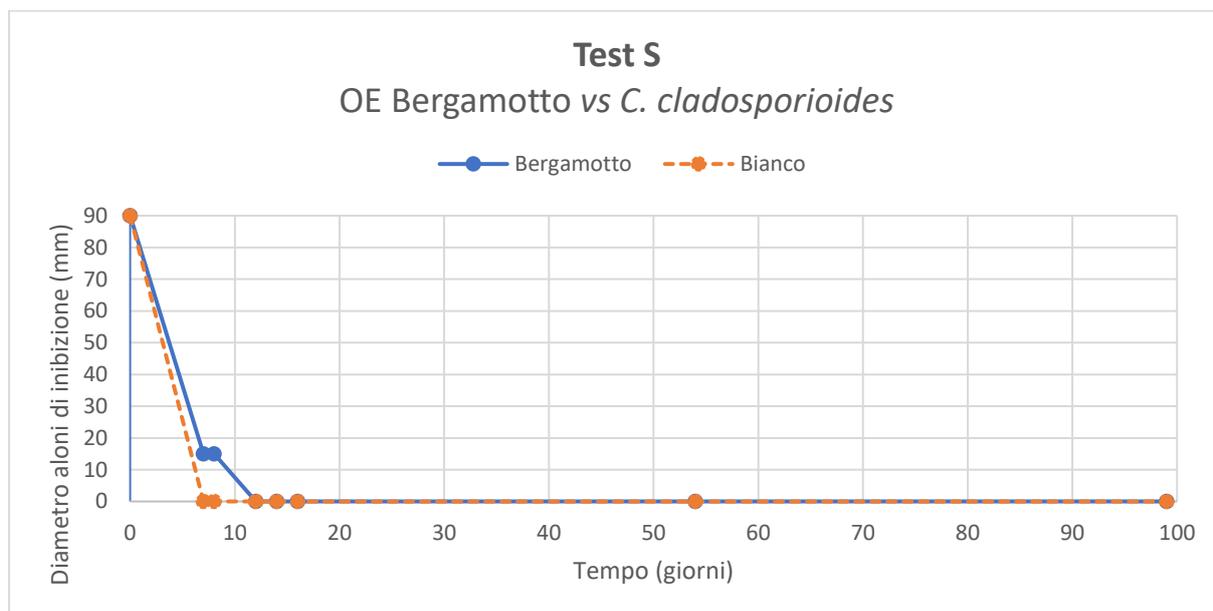


Figura 84: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_PEN_AB e EB_SAB-CL_BERG1_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di micelio composto da più colonie fungine verdi, circondate da perimetri ifali bianchi di accrescimento, con profili cupoliformi e aspetto feltroso e rugoso, durante la prima ricognizione (7° giorno). Non è presente crescita fungina sopra i dischetti di carta imbevuti di olio essenziale [Fig.85]. Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_PEN_S e EB_SAB-CL_BERG2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di un micelio verde omogeneo, durante la prima ricognizione (7° giorno). La crescita non si è propagata sopra i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.86].



Figura 85: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_PEN_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.



Figura 86: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_PEN_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Le fruttificazioni conidiche mature hanno assunto una colorazione marrone. Un completo viraggio di colore a marrone nei campioni di confronto è stato osservato durante la sesta ricognizione (54° giorno), mentre nei campioni trattati con olio essenziale è visibile già dalla quinta ricognizione (16° giorno) [Fig.87].

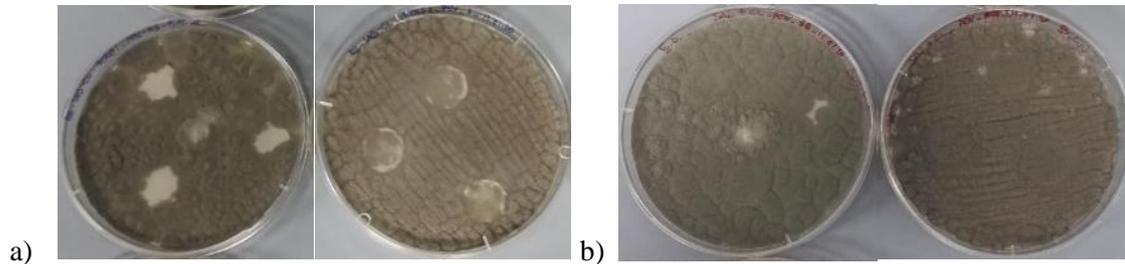


Figura 87: a) Colorazione del micelio di *Penicillium sp.* durante la quinta ricognizione (16° giorno); verde nel campione EB_SAB-CL_BERG2_PEN_AB e marrone nel campione EB_SAB-CL_BERG2_PEN_S. b) Confronto con la colorazione verde dei campioni di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO e EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Questo potrebbe essere spiegato dal maggiore stress a cui è sottoposto il Fungo, portandolo alla secrezione anticipata di metaboliti secondari, come pigmenti colorati.

Inoltre, i campioni S presentano una superficie maggiormente polverosa e secca rispetto a quella del micelio di confronto.

Per tutti i campioni analizzati, il micelio si è espanso raggiungendo i bordi della piastra Petri durante la prima ricognizione (7° giorno).

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), per quanto riguarda i campioni AB, la colonizzazione è avanzata parzialmente sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale, mentre nella piastra di controllo si nota che sono stati colonizzati interamente [Fig.88].

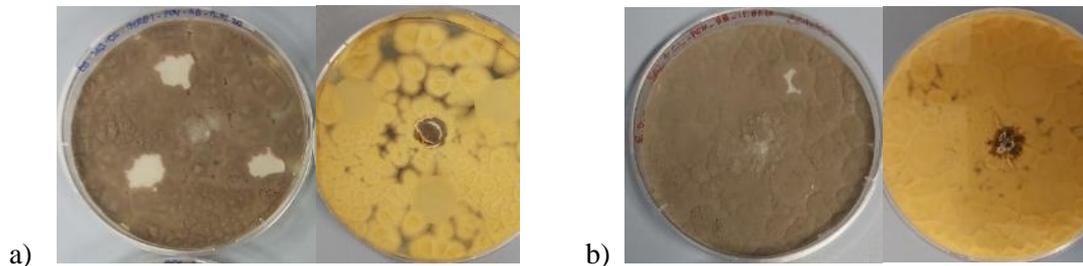


Figura 88: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_BERG1_PEN_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni S, invece, la crescita del micelio ha ricoperto quasi interamente la superficie della piastra Petri ed è presente una parziale colonizzazione sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.89].

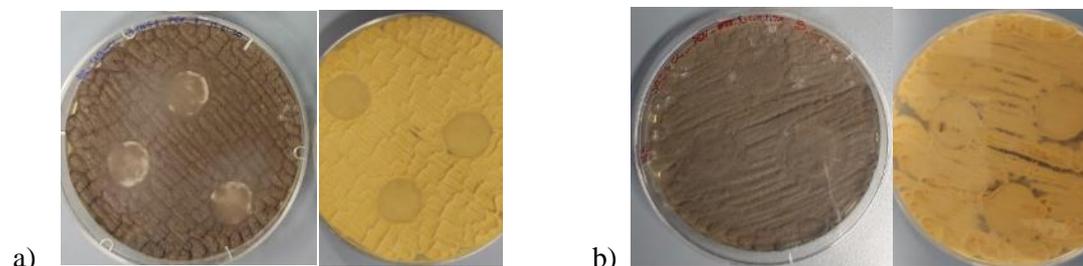


Figura 89: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_BERG1_PEN_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Nel grafico Fig. 90 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che

si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. La crescita di *Penicillium sp.*, riscontrata in presenza di olio essenziale di bergamotto è congruente a quella del campione di controllo.

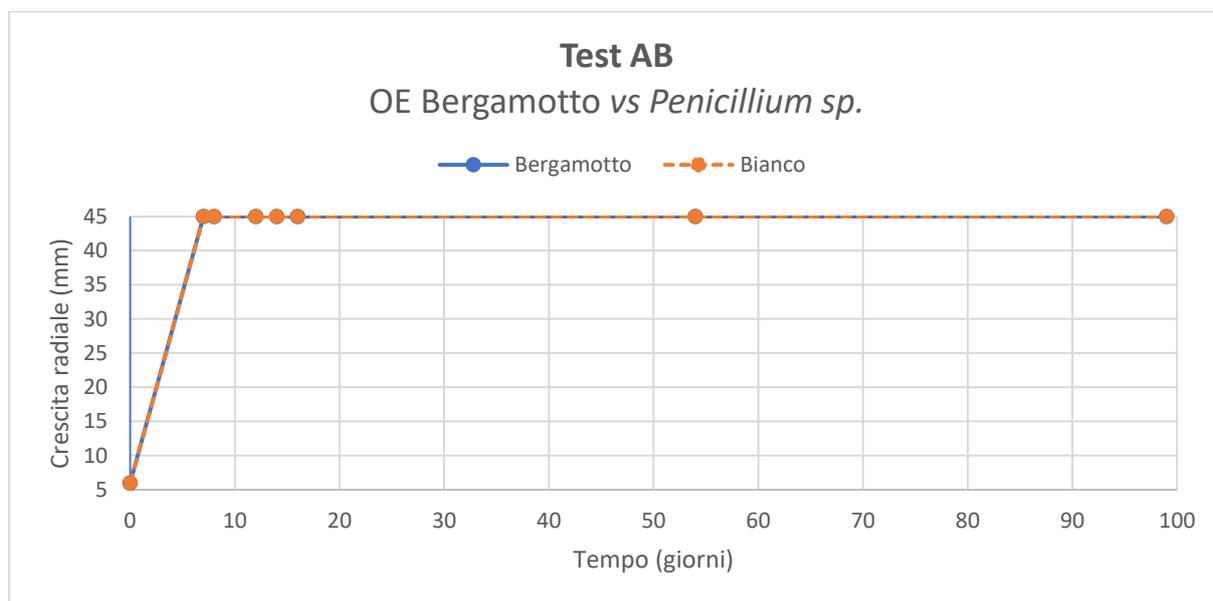


Figura 90: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.91, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile.

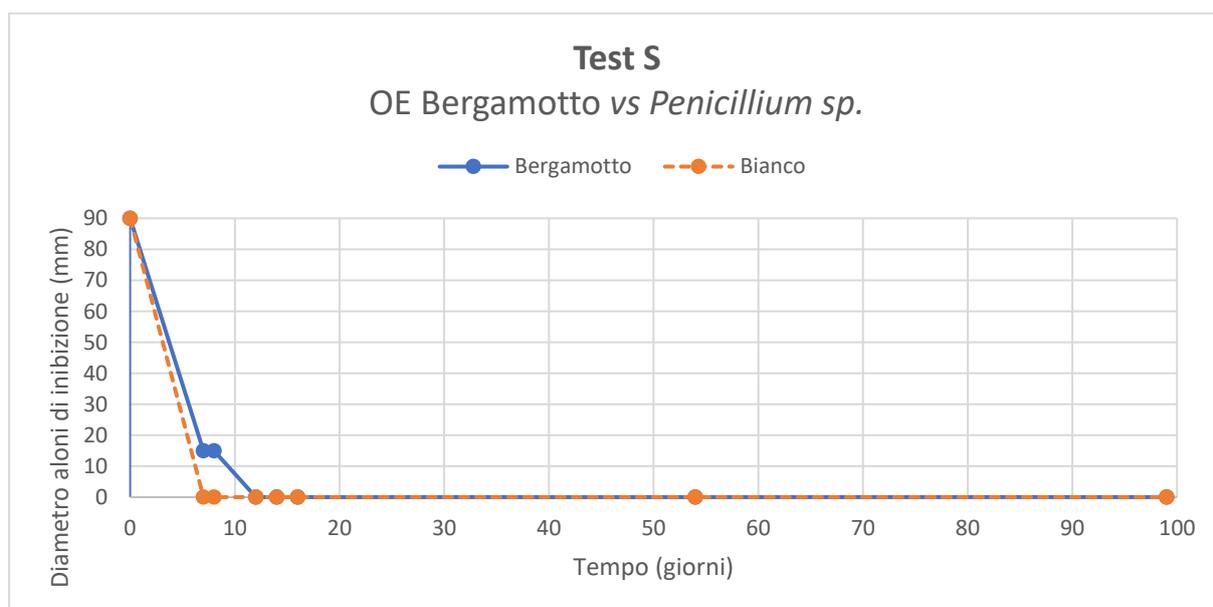


Figura 91: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

È stata rilevata una germinazione delle spore di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di bergamotto. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 12° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di bergamotto provoca un leggero effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_SAC_S e EB_SAB-CL_BERG2_SAC_S è stata osservata la formazione di piccole colonie biancastre, lisce, cremose, dai margini ondulati e dal profilo cupoliforme, in prossimità dei bordi della piastra Petri, ovvero nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale. La presenza delle colonie è stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.92].

Molto differente è l'aspetto della crescita nel campione di controllo, che si presenta come una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato. Sono presenti gli aloni di inibizione provocati dal diretto contatto del lievito con l'acetone.



Figura 92: Crescita di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_SAC_S e EB_SAB-CL_BERG2_SAC_S, dopo 7 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), è stata riscontrata una crescita da parte delle colonie di lievito, le quali, nel campione EB_SAB-CL_BERG1_SAC_S, hanno assunto una particolare forma allungata e di dimensioni maggiori rispetto a quelle del campione EB_SAB-CL_BERG2_SAC_S [Fig.93].



Figura 93: Crescita di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_BERG1_SAC_S e EB_SAB-CL_BERG2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Nel seguente grafico [Fig.94], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di bergamotto, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata crescita di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di bergamotto: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 37 ± 4 mm al 7° giorno dall'inoculo e si è mantenuto costante fino alla sesta ricognizione (54° giorno) dove è diminuito a 31 ± 5 mm. Il valore del diametro di inibizione di *S. cerevisiae* di controllo, invece, ha raggiunto il valore medio e costante di 23 ± 1 mm dal 7° giorno dall'inoculo.

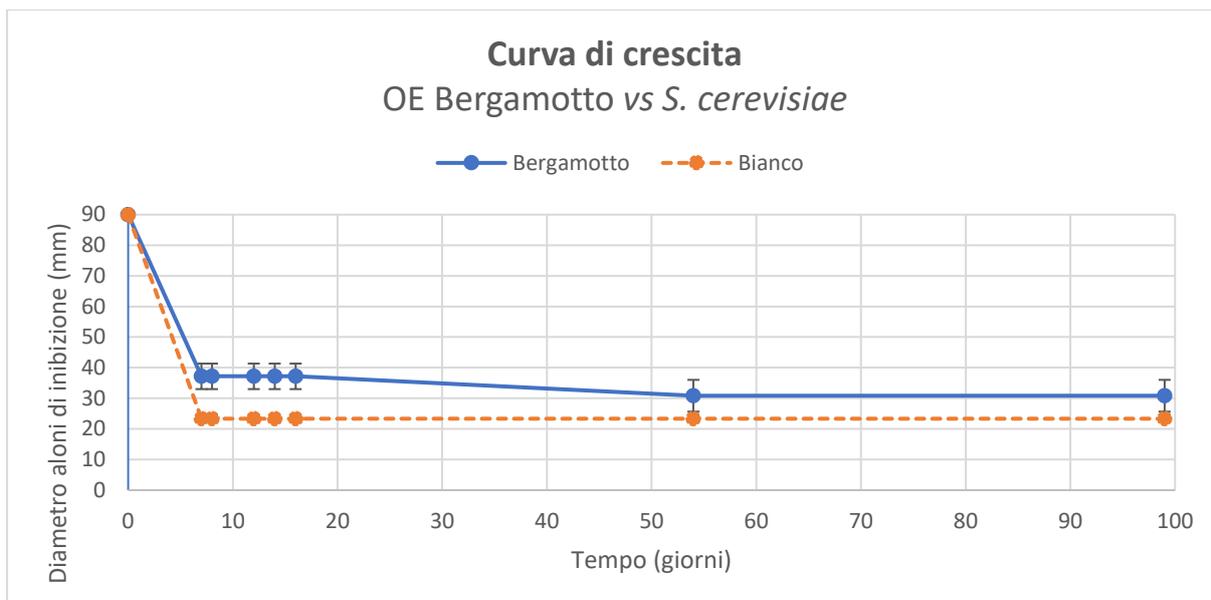


Figura 94: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di bergamotto. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.5. OLIO ESSENZIALE DI LAVANDA

È stata osservata una crescita micotica in tutti i campioni trattati con olio essenziale di lavanda.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di lavanda con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.5.

Alternaria alternata

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_ALT_AB e EB_SAB-CL_LAV1_ALT_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di ife bianche e cotonose dalla zona di inoculo del micelio, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.95].



Figura 95: Formazione di ife di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_ALT_AB e EB_SAB-CL_LAV1_ALT_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_ALT_S e EB_SAB-CL_LAV2_ALT_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la germinazione di ife bianche e cotonose nei bordi della piastra Petri, nelle aree più distanziate dai cerchietti imbevuti di olio essenziale, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.96].

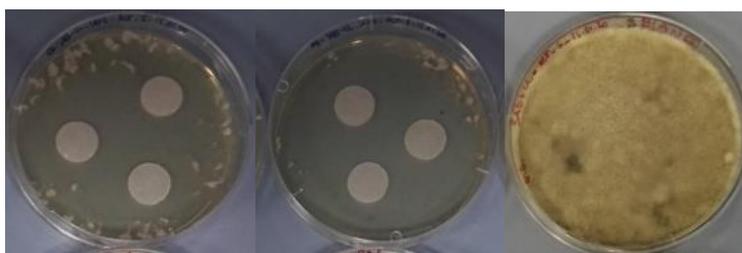


Figura 96: Crescita di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_ALT_S e EB_SAB-CL_LAV2_ALT_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Per i campioni AB, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), senza subire ulteriori variazioni nella successiva ricognizione. Per i campioni S, invece, la colonizzazione completa dell'area si è riscontrata durante la quarta ricognizione (14° giorno), anche se la crescita è stata inibita nell'area sovrastante ai cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale [Fig.97].

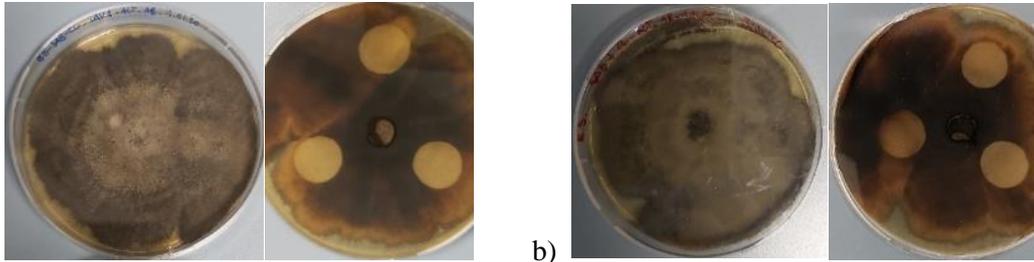


Figura 97: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_ALT_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni del test AB, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro. La crescita fungina è avanzata solo sopra la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco. Nei campioni del test S, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro e non si osserva crescita fungina sotto la superficie dei dischetti di carta, riscontrata invece nel campione di controllo [Fig.98].

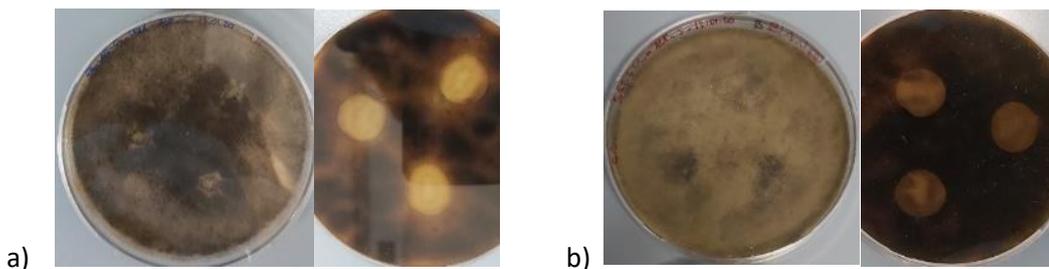


Figura 98: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_ALT_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.99 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di lavanda che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto. L'olio essenziale di lavanda provoca, quindi, un leggero effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

Nel grafico Fig.100, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di lavanda. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 14° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di lavanda provoca un leggero effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

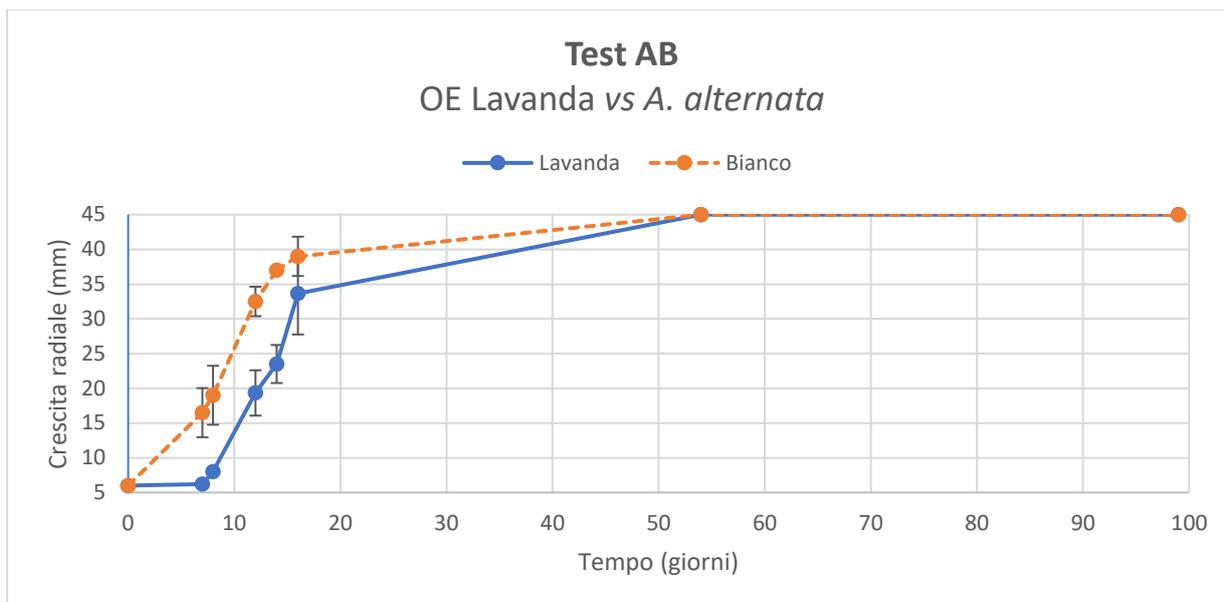


Figura 99: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

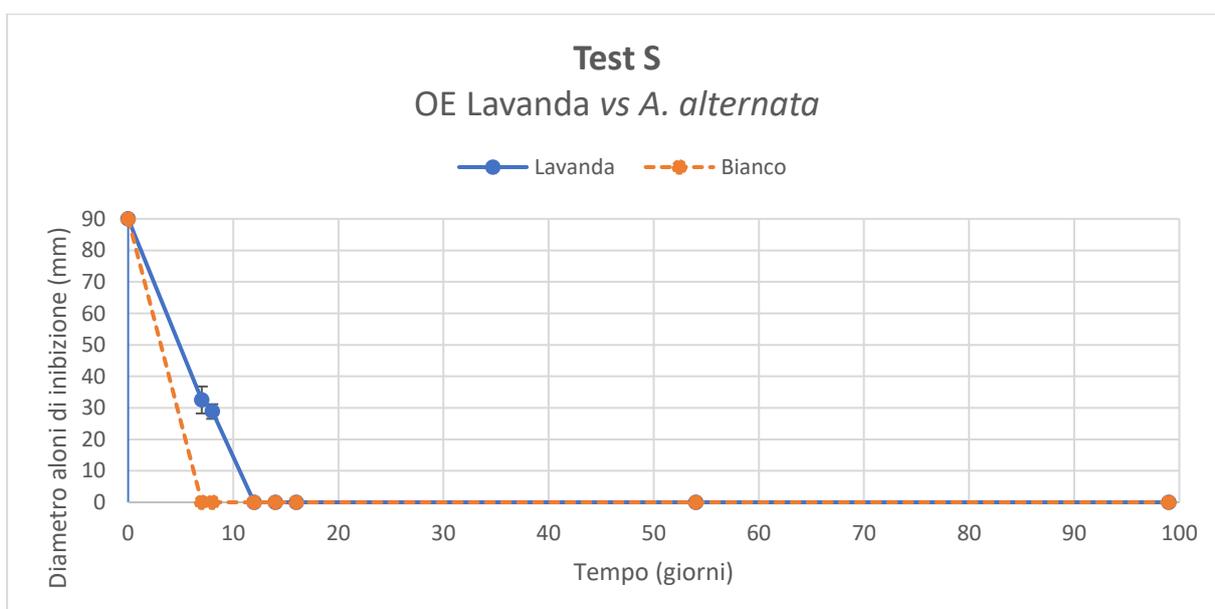


Figura 100: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Cladosporium cladosporioides

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_CLA_AB e EB_SAB-CL_LAV1_CLA_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di colonie fungine rotonde, verdi, vellutate e dal profilo umbonato, durante la terza ricognizione (12° giorno) [Fig.101]. Le colonie presentano dimensioni minori rispetto a quelle del campione di controllo.

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_CLA_S e EB_SAB-CL_LAV2_CLA_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata una crescita bianca, omogenea, vellutata, di consistenza soffice, che segue il movimento di striscio eseguito durante la semina, in particolare nel primo campione, durante la terza ricognizione (12° giorno) [Fig.102]. Non è presente crescita fungina sopra i cerchietti imbevuti di olio essenziale.



Figura 101: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_CLA_AB e EB_SAB-CL_LAVI_CLA_AB, dopo 12 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.



Figura 102: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_CLA_S e EB_SAB-CL_LAV2_CLA_S, dopo 12 giorni dalla semina del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nei campioni AB, la crescita del micelio ha ricoperto parzialmente tutta l'area della piastra Petri durante la quinta ricognizione (16° giorno), mentre nei campioni S è avvenuta durante la seconda ricognizione (8° giorno), anche se la crescita è stata inibita nell'area soprastante i cerchietti imbevuti di olio essenziale.

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), il micelio maturo ha assunto una colorazione marrone. Nei campioni AB la superficie si presenta rugosa e vellutata. La crescita miceliare è stata parzialmente inibita nell'area soprastante i cerchietti imbevuti di olio essenziale, mentre il Fungo è riuscito a propagarsi interamente sotto di essi [Fig.103].

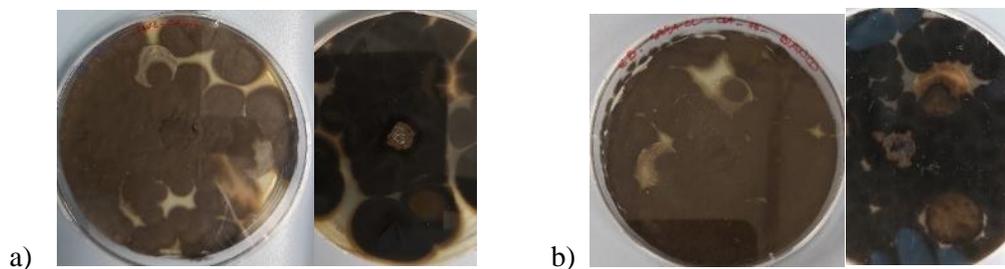


Figura 103: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_CLA_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni S la crescita fungina è interamente presente sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale, mentre questi ultimi non sono stati completamente ricoperti in superficie [fig.104].

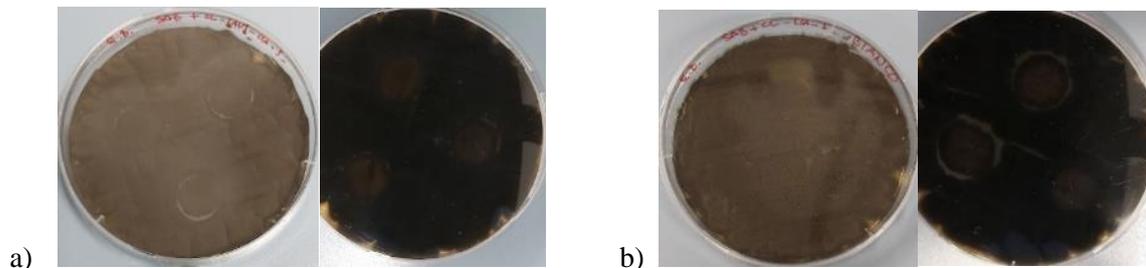


Figura 104: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.105 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=$

3 per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di lavanda che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto, ma presentano anche una variabilità maggiore dal punto di vista di valori di crescita radiale. La fase di latenza ha avuto una durata maggiore rispetto a quella del campione di controllo. L'olio essenziale di lavanda provoca, quindi, un effetto inibitorio seppur a breve termine rispetto al Fungo in esame.

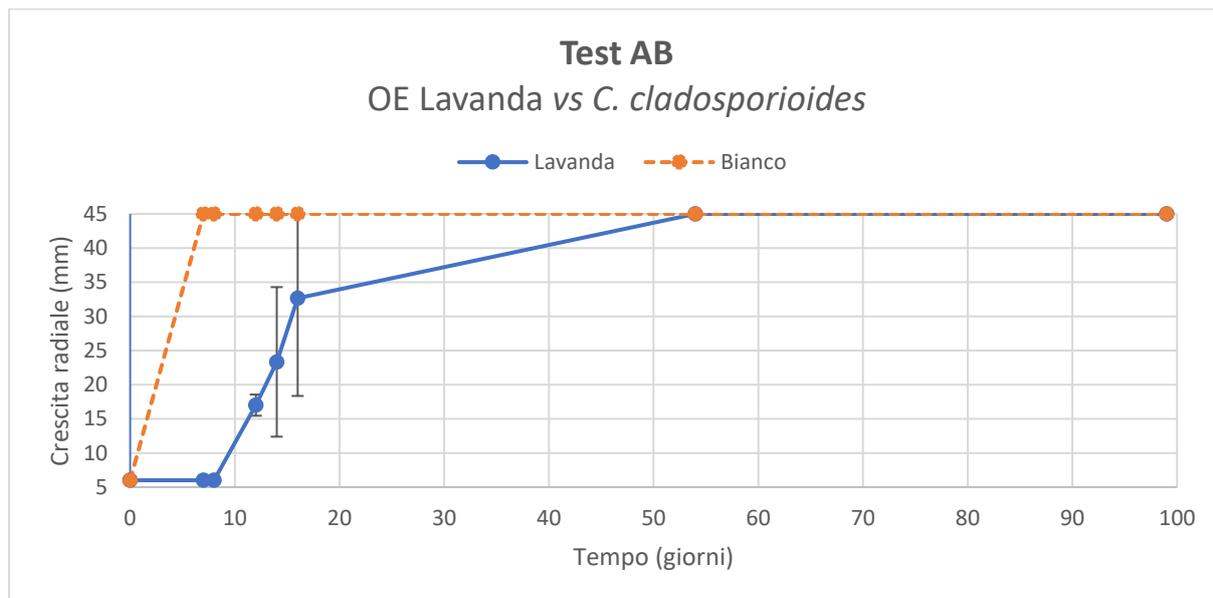


Figura 105: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.106, rispetto al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di lavanda. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 54° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7° giorno dall'inoculo. La fase di latenza ha avuto una durata maggiore rispetto a quella del campione di controllo. L'olio essenziale di lavanda provoca, quindi, un effetto inibitorio seppur a breve termine rispetto al Fungo in esame.

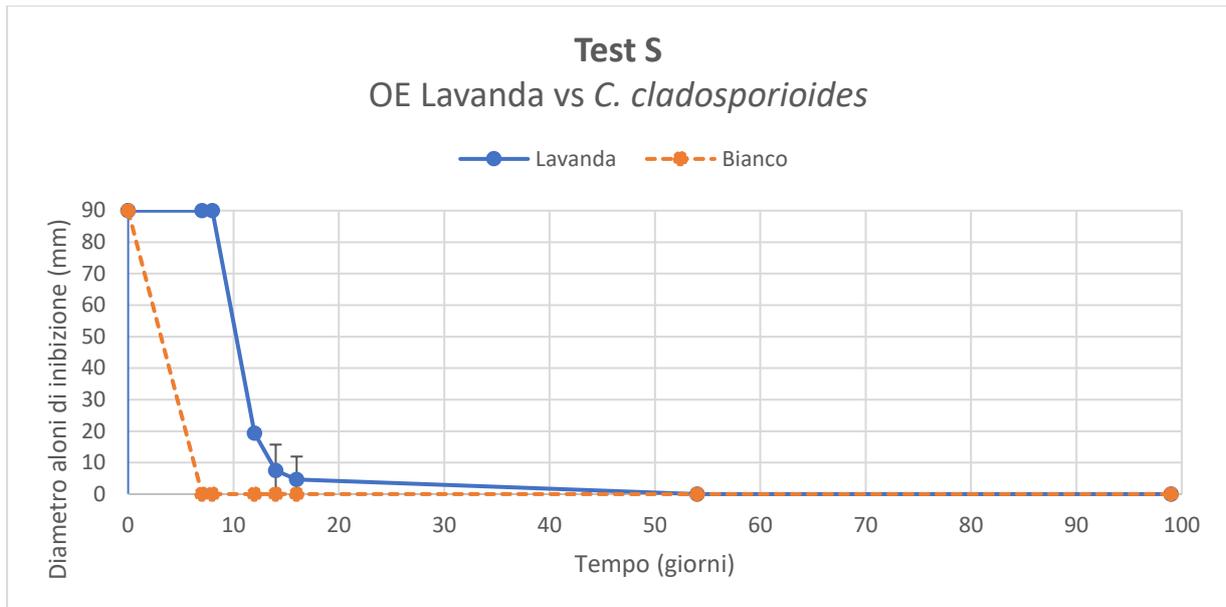


Figura 106: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_PEN_AB e EB_SAB-CL_LAV1_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di micelio composto da più colonie fungine bianche, con profili cupoliformi e aspetto feltroso, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.107].

La distribuzione irregolare di miceli secondari è causata dallo spostamento delle piastre Petri. I conidi del Fungo sono riusciti, tramite il movimento, a rilasciare le conidiospore, le quali sono germinate successivamente.



Figura 107: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_PEN_AB e EB_SAB-CL_LAV1_PEN_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_PEN_S e EB_SAB-CL_LAV2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di un micelio bianco, vellutato e omogeneo, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.108].



Figura 108: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_PEN_S e EB_SAB-CL_LAV2_PEN_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Durante ricognizione del giorno successivo, la colorazione del micelio è virata a verde brillante, a differenza delle fruttificazioni conidiche mature che presentano una colorazione marrone. Per i campioni AB, la maturità è stata raggiunta durante la sesta ricognizione (54° giorno), mentre per i campioni S durante la terza ricognizione (12° giorno). Un completo viraggio di colore a marrone nei campioni di confronto è stato osservato durante sesta la ricognizione (54° giorno) [Fig.109].

Questo anticipo potrebbe essere spiegato dal maggiore stress a cui è sottoposto il Fungo, portandolo alla secrezione anticipata di metaboliti secondari, come pigmenti colorati. Inoltre, i campioni S presentano una superficie maggiormente polverosa e secca rispetto a quella del micelio di confronto.

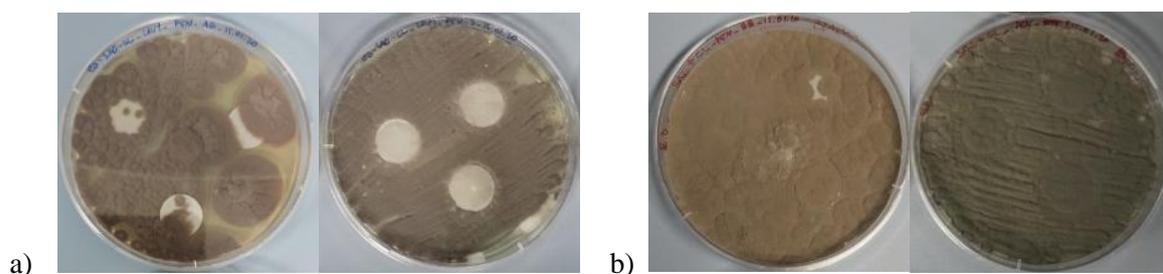


Figura 109: a) Micelio di colorazione marrone di *Penicillium* sp. nei campioni EB_SAB-CL_LAVI_PEN_AB e EB_SAB-CL_LAVI_PEN_S, il primo durante la sesta ricognizione (54° giorno), il secondo durante la terza ricognizione (12° giorno). b) Confronto con i campioni di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO e EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO, il primo durante la sesta ricognizione (54° giorno), il secondo durante la terza ricognizione (12° giorno).

Per i campioni AB analizzati, il micelio si è espanso raggiungendo i bordi della piastra Petri durante la terza ricognizione (12° giorno), mentre per i campioni S è stato raggiunto durante la prima ricognizione (7° giorno).

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), per quanto riguarda i campioni AB, la colonizzazione è avanzata parzialmente sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale, a differenza della piastra di controllo dove si nota una colonizzazione totale. Il micelio entrato in contatto con l'olio essenziale presenta una superficie rugosa, secca e dal profilo umbonato [fig.110].

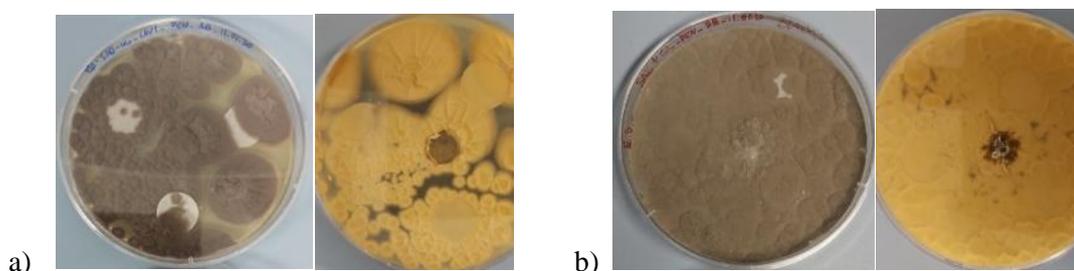


Figura 110: a) Micelio di *Penicillium* sp. nel campione EB_SAB-CL_LAVI_PEN_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni S, invece, la colonizzazione non si è riscontrata sopra la superficie dei cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale, mentre è presente una parziale colonizzazione sotto di essi [Fig.111].

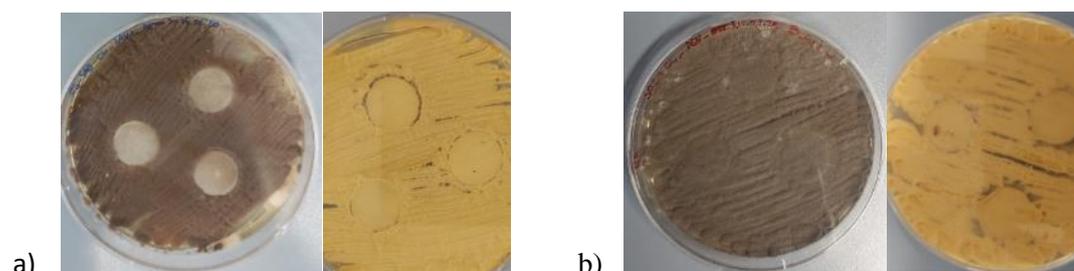


Figura 111: a) Micelio di *Penicillium* sp. nel campione EB_SAB-CL_LAVI_PEN_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.112 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di lavanda che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 14° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto, ma presentano anche una variabilità maggiore dal punto di vista di valori di crescita radiale. L'olio essenziale di lavanda provoca un leggero effetto inibitorio nel brevissimo termine rispetto il Fungo in esame.

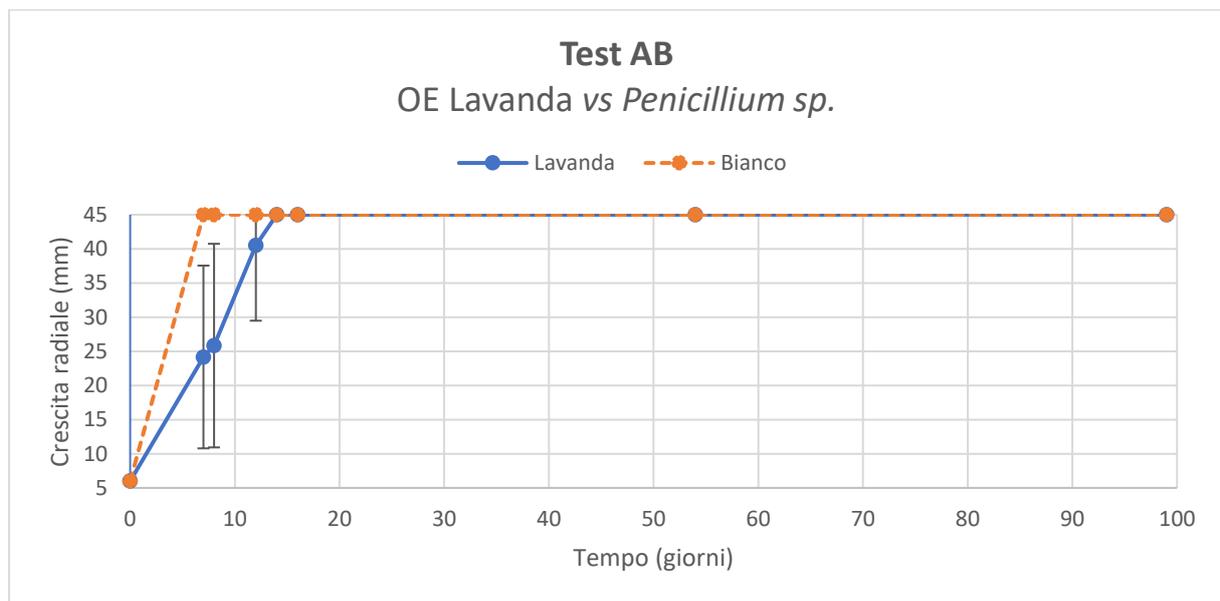


Figura 112: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.113 sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di lavanda. Il diametro di inibizione ha raggiunto il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 7° giorno dall'inoculo, come il campione di controllo, non mostrando quindi alcun effetto da parte dell'olio essenziale di lavanda.

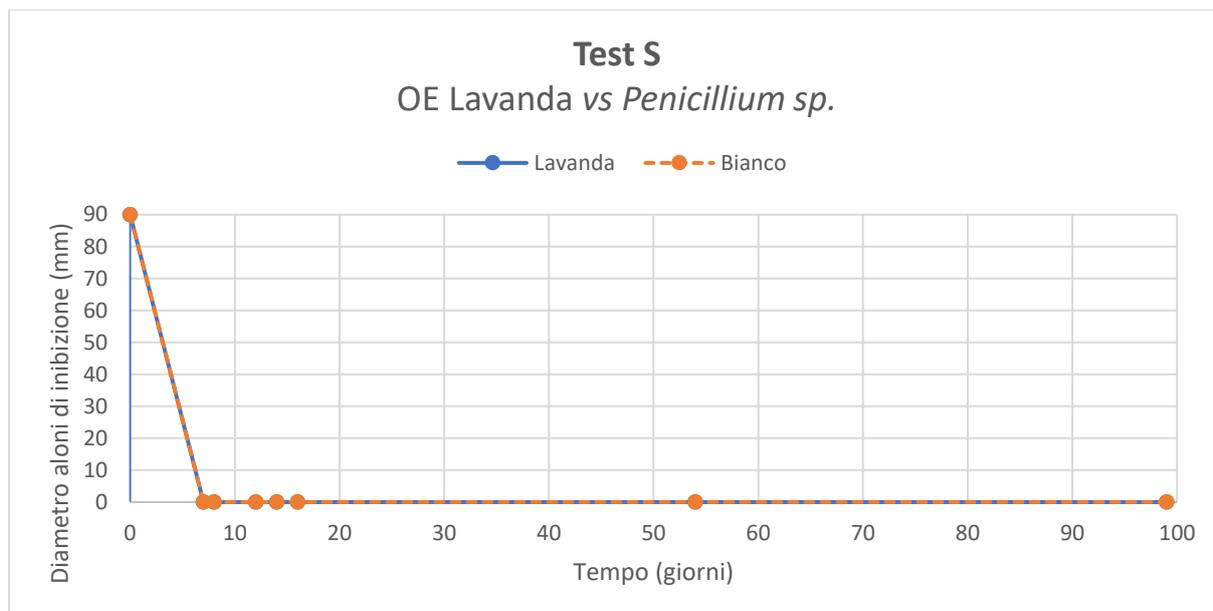


Figura 113: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium* sp. in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_SAC_S e EB_SAB-CL_LAV2_SAC_S è stata osservata la formazione una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato. La presenza delle colonie è stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.114].

Sono presenti aloni di inibizione anche nel campione di controllo, provocati dal diretto contatto del lievito con l'acetone.

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), la patina si è propagata radialmente, aumentando contemporaneamente il suo spessore [Fig.115].



Figura 114: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_SAC_S e EB_SAB-CL_LAV2_SAC_S, dopo 7 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.



Figura 115: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_LAV1_SAC_S e EB_SAB-CL_LAV2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Nel seguente grafico [Fig.116], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di lavanda, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di

inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata crescita di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di lavanda: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 33 ± 2 mm al 7° giorno dall'inoculo e si è mantenuto costante fino alla sesta ricognizione (54° giorno) dove è diminuito a 32 ± 2 mm. Il valore del diametro di inibizione di *S. cerevisiae* di controllo, invece, ha raggiunto il valore medio e costante di 23 ± 1 mm dal 7° giorno dall'inoculo.

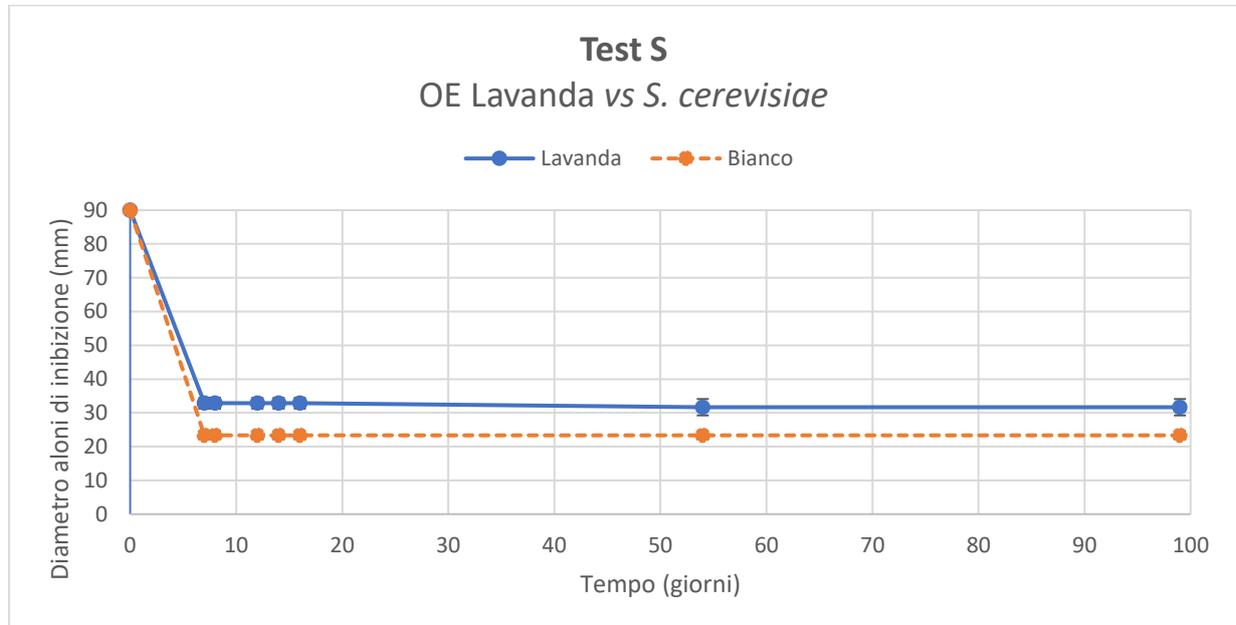


Figura 116: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di lavanda. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.6. OLIO ESSENZIALE DI MANDARINO

È stata osservata una crescita micotica in tutti i campioni trattati con olio essenziale di mandarino.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di mandarino con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.6.

Alternaria alternata

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_ALT_AB e EB_SAB-CL_MAND1_ALT_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva, circondate da un perimetro bianco composto da ife bianche di accrescimento, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.117].

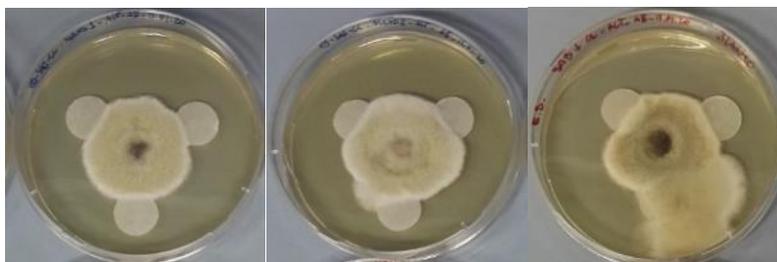


Figura 117: Formazione di ife di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_ALT_AB e EB_SAB-CL_MAND1_ALT_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_ALT_S e EB_SAB-CL_MAND2_ALT_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di

fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva che hanno ricoperto tutta la superficie della piastra Petri, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.118].

Per i campioni AB, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), senza subire ulteriori variazioni nella successiva ricognizione. Per i campioni S, invece, la colonizzazione completa dell'area si è riscontrata fin dalla prima ricognizione (7° giorno), anche se è visibile un'inibizione della crescita nell'area sovrastante i cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale.



Figura 118: Crescita di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_MAND2_ALT_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni AB, la colorazione del micelio maturo è virata a marrone scuro. La crescita fungina è avanzata solo sopra la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco [Fig.119].

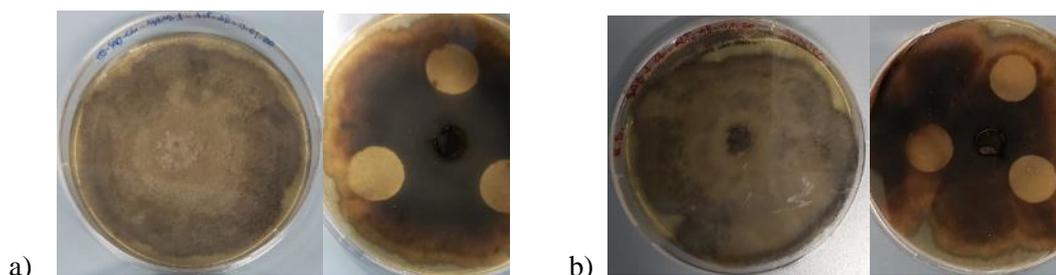


Figura 119: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_ALT_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni S, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro e si osserva una parziale crescita fungina sotto la superficie dei dischetti di carta, che risulta invece totale nel campione di controllo. La colonizzazione risulta parzialmente inibita nell'area sovrastante i cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale [Fig.120].

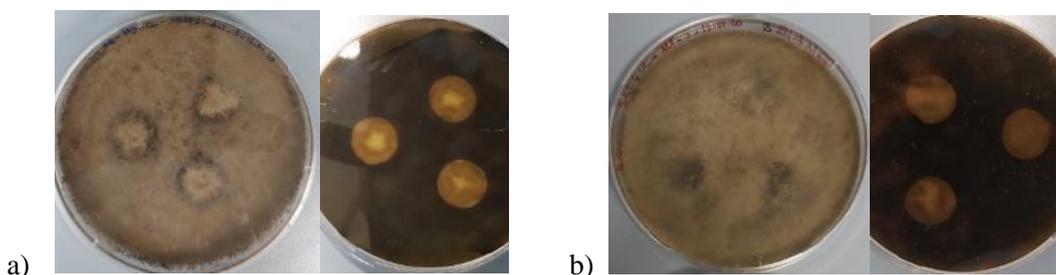


Figura 120: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_ALT_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.121 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben

visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di mandarino che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. L'andamento della curva di crescita presenta dei valori leggermente maggiori rispetto a quelli di confronto, indicando che l'olio essenziale ha favorito la crescita micotica anziché inibirla.

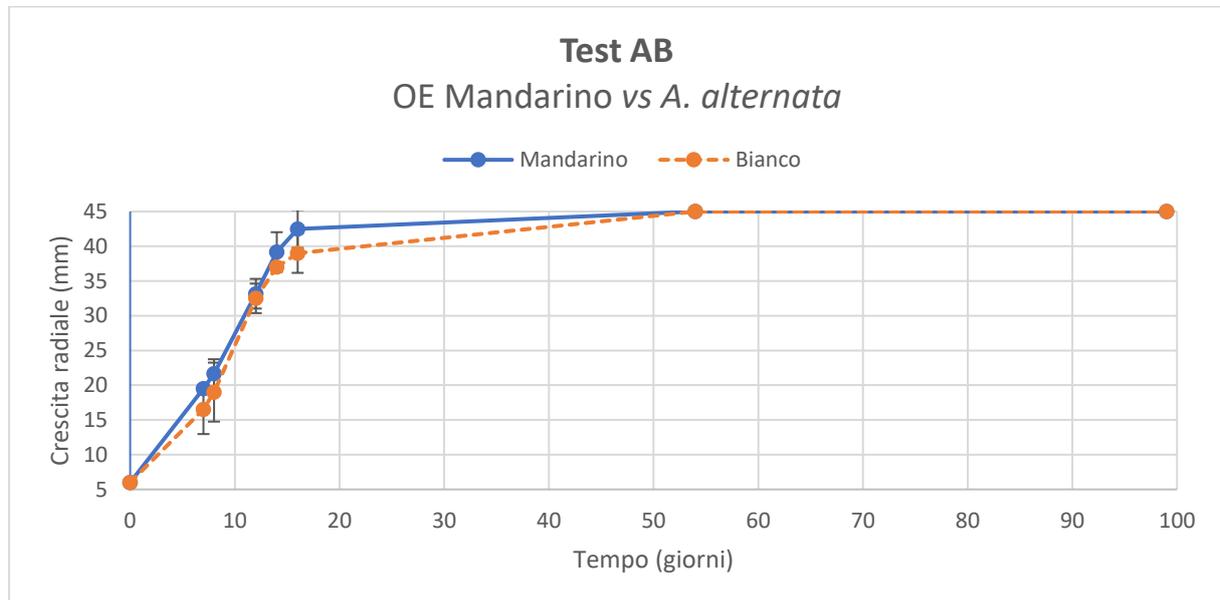


Figura 121: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

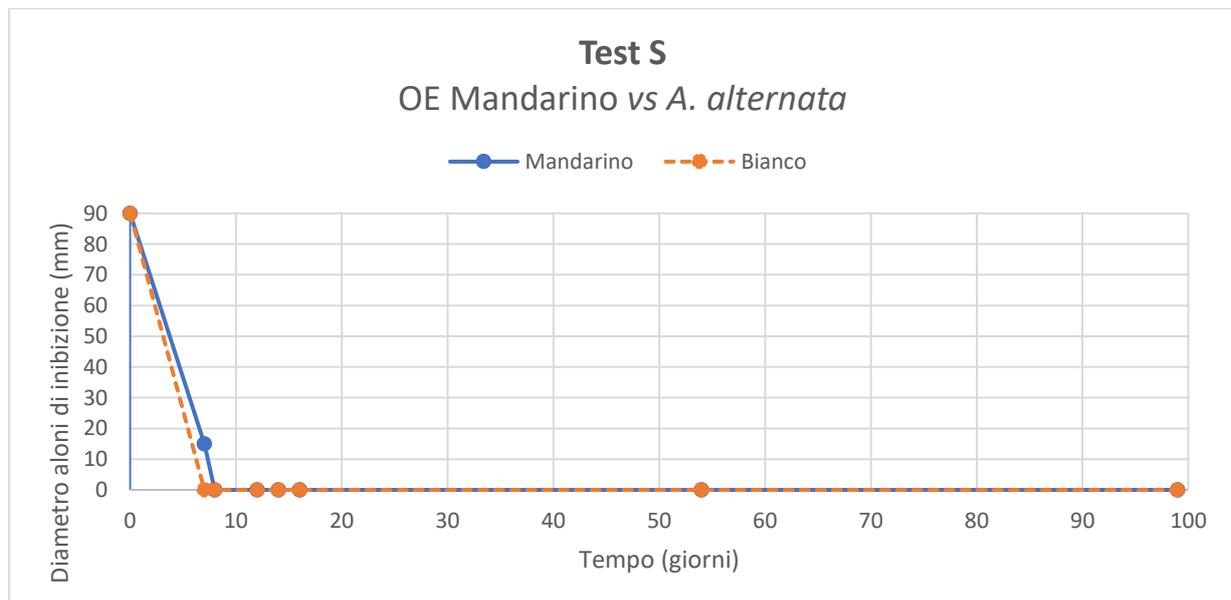


Figura 122: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Nel grafico Fig.122, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *Alternaria alternata* in presenza di olio essenziale di

mandarino. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 12° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo all'8° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di mandarino provoca un minimo effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

Cladosporium cladosporioides

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_CLA_AB e EB_SAB-CL_MAND2_CLA_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di micelio composto da più colonie fungine rotonde, verdi, vellutate e dal profilo umbonato, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.123].



Figura 123: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_CLA_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_CLA_S e EB_SAB-CL_MAND2_CLA_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata una crescita di micelio verde, omogeneo, vellutato, di consistenza soffice, che segue il movimento di striscio eseguito durante la semina, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.124]. Non è presente crescita fungina sopra i cerchietti imbevuti di olio essenziale.

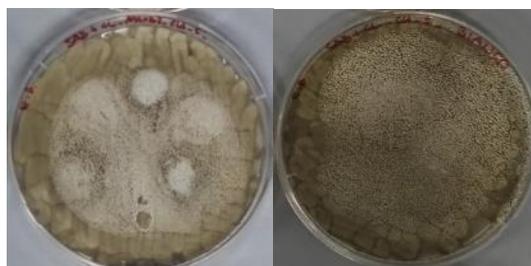


Figura 124: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_MAND2_CLA_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nei campioni AB, la crescita del micelio ha ricoperto parzialmente tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), mentre nei campioni S è avvenuta fin dalla prima ricognizione (7° giorno). Il micelio maturo, nella sesta ricognizione (54° giorno), ha assunto una colorazione marrone. Nei campioni AB la superficie si presenta rugosa e vellutata. Il micelio è riuscito a propagarsi parzialmente sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.125].

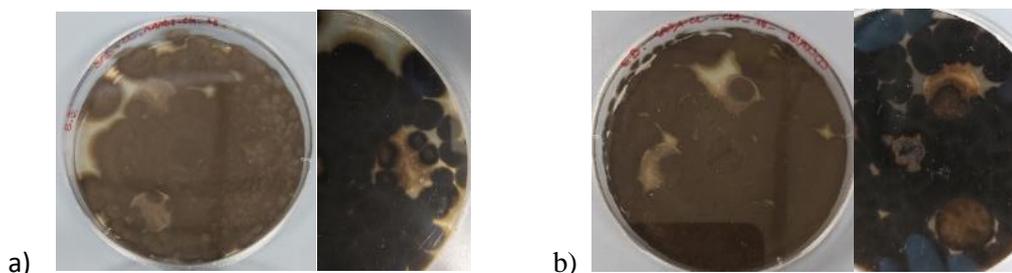


Figura 125: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_MAND2_CLA_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

Nei campioni S la crescita fungina è interamente presente sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale, mentre questi ultimi non sono stati ricoperti completamente in superficie [Fig.126].

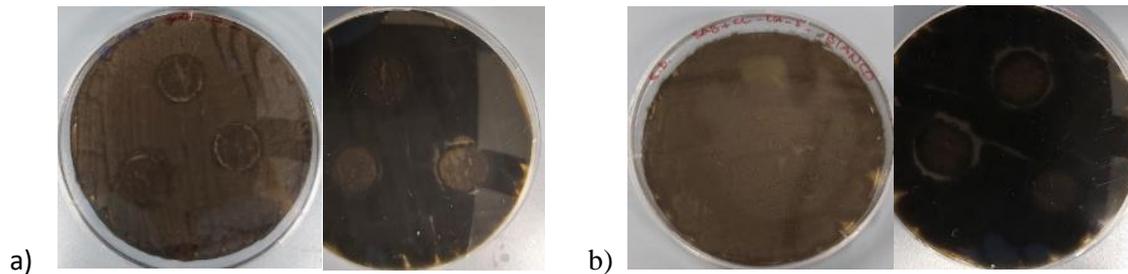


Figura 126: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_MANDI_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.127 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di mandarino che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto, ma presentano una maggiore variabilità in termini di deviazione standard. L'olio essenziale di mandarino provoca un leggero effetto inibitorio rispetto il Fungo in esame.

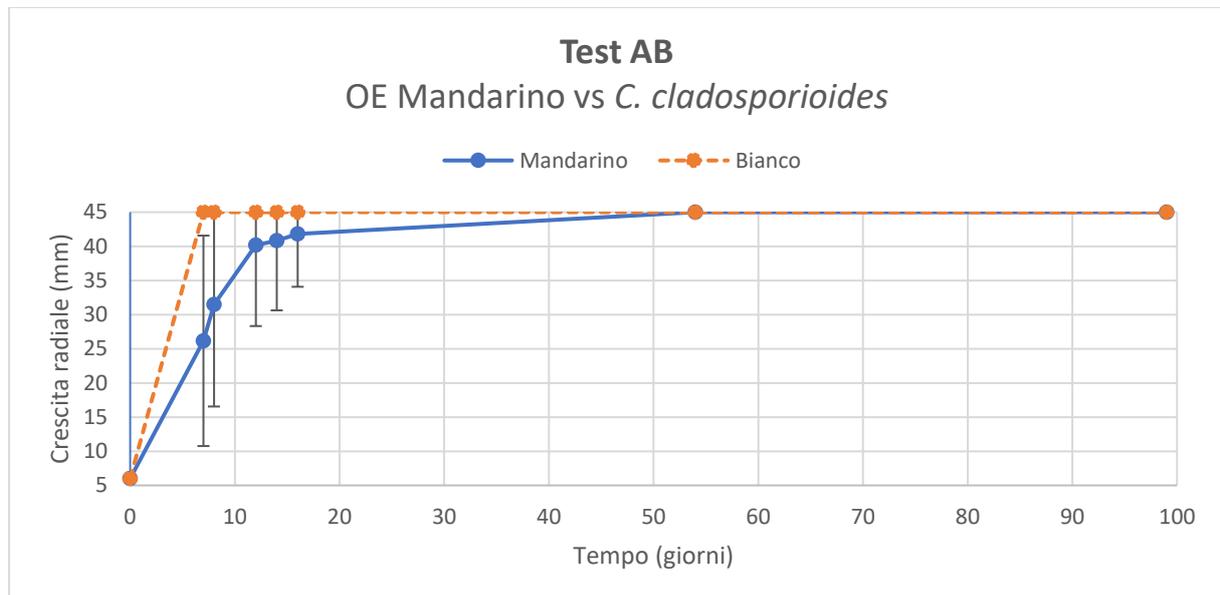


Figura 127: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.128, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata una germinazione delle spore di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di mandarino. Il diametro di inibizione è diminuito esponenzialmente fino al

raggiungimento del valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) al 12° giorno dall'inoculo, a differenza di quello del campione di controllo che ha raggiunto il valore minimo al 7° giorno dall'inoculo. L'olio essenziale di mandarino provoca un leggero effetto inibitorio rispetto al Fungo in esame.

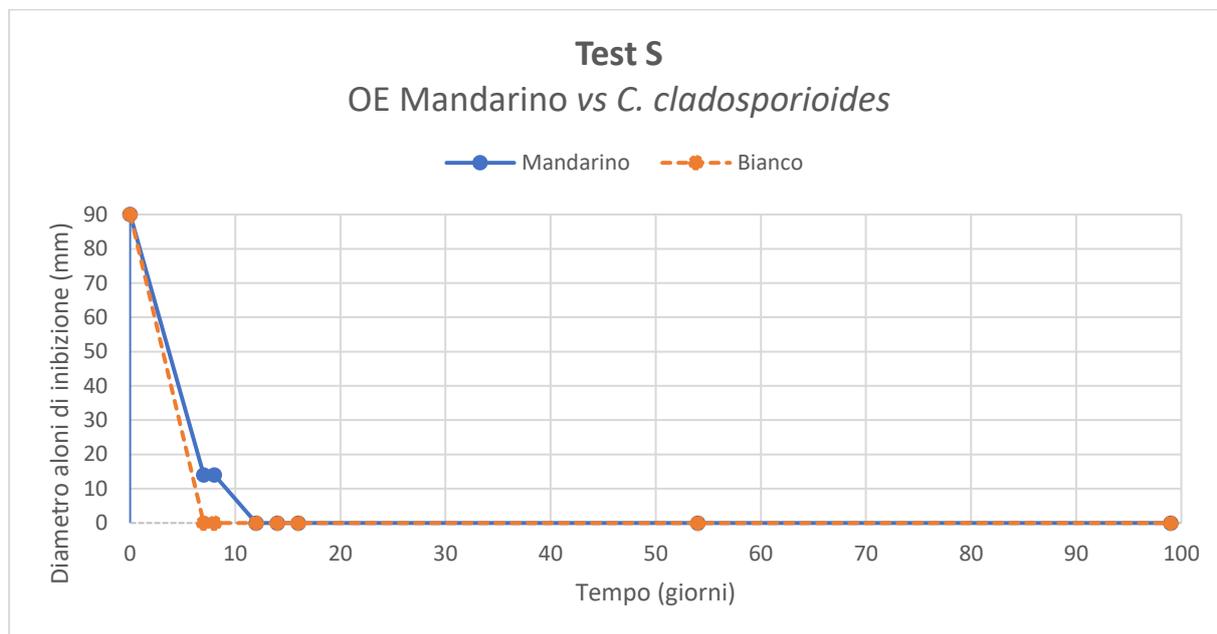


Figura 128: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_PEN_AB e EB_SAB-CL_MAND1_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di micelio composto da più colonie fungine verdi, rugose, con profili cupoliformi e aspetto feltroso, che segue il movimento di striscio eseguito durante la semina. È stato osservato durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha colonizzato interamente tutta l'area disponibile [Fig.129].

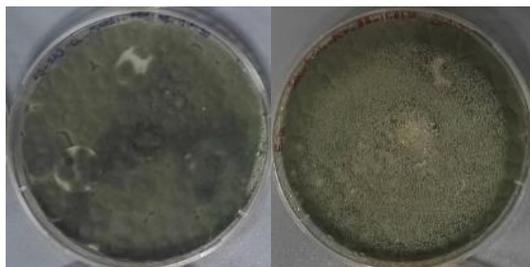


Figura 129: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_PEN_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_PEN_S e EB_SAB-CL_MAND2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di un micelio verde, vellutato e omogeneo. È stato osservato durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha colonizzato interamente tutta l'area disponibile [Fig.130].

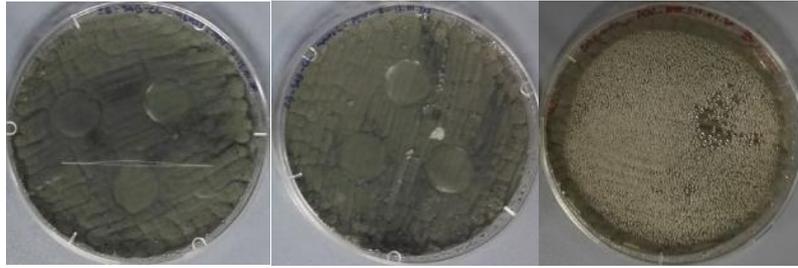


Figura 130: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_MANDI_PEN_S e EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Le fruttificazioni conidiche mature hanno assunto una colorazione marrone durante la sesta ricognizione (54° giorno), come il campione di controllo. Sono state rilevate dei ciuffetti di ife aeree bianche nella superficie del Fungo, paragonabili a quelle del controllo [Fig.131].

Per quanto riguarda i campioni AB, la colonizzazione è avanzata sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale ed è paragonabile a quella del campione di controllo.

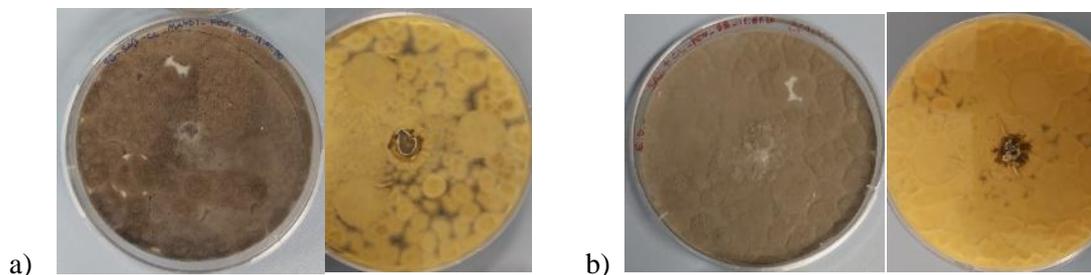


Figura 131: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_MANDI_PEN_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni S la crescita del micelio si è riscontrata sia sopra che sotto la superficie dei cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale ed è paragonabile a quella riscontrata nel campione di controllo [Fig.132].

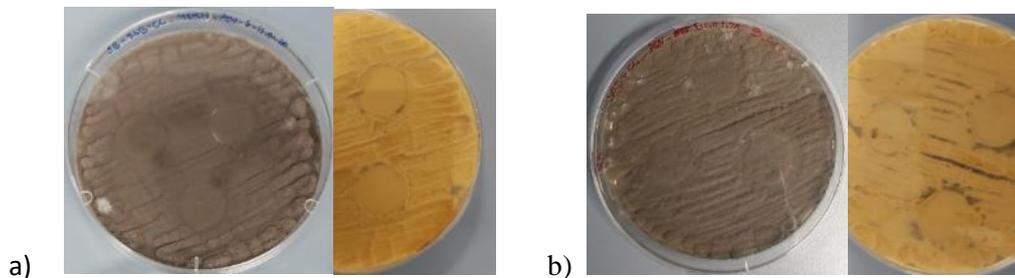


Figura 132: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_MANDI_PEN_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.133 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. La crescita di *Penicillium sp.* è simile a quella del campione di controllo, in quanto viene raggiunta la completa colonizzazione della piastra Petri il 7° giorno dall'inoculo.

Nel grafico Fig.134, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta

corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

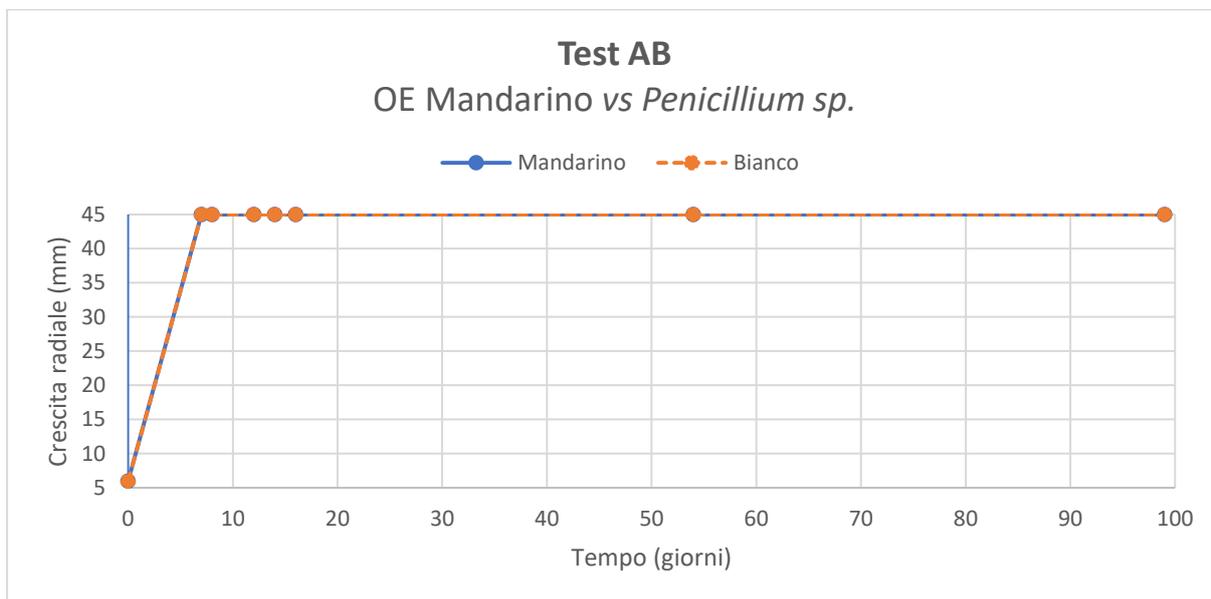


Figura 133: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

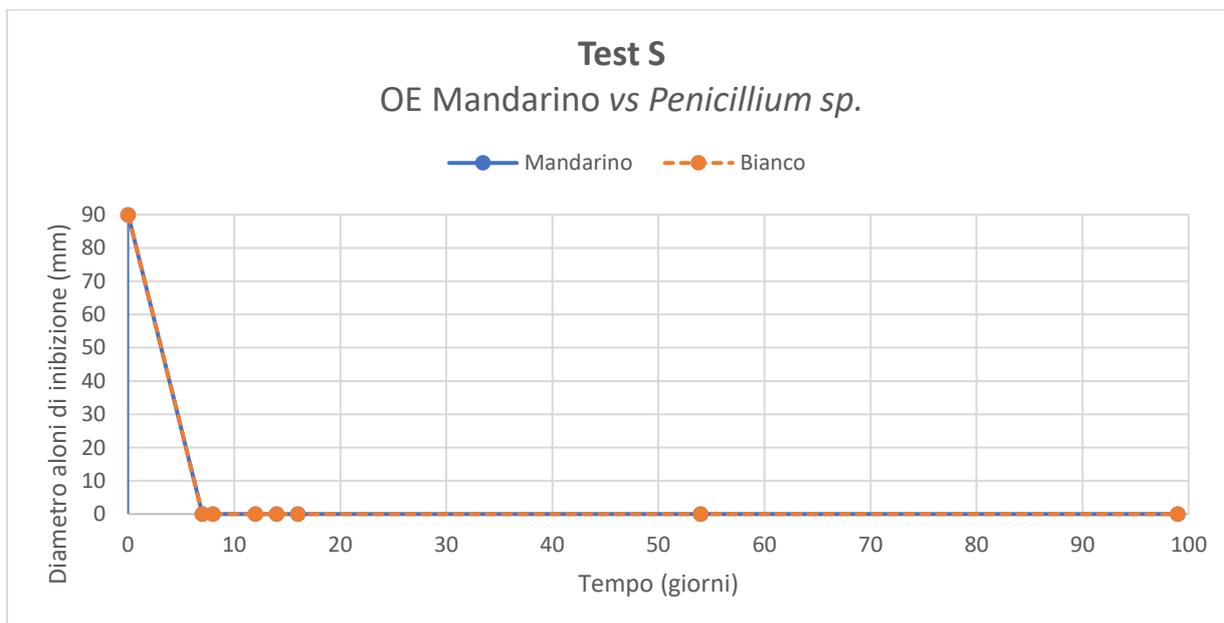


Figura 134: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_MAND1_SAC_S e EB_SAB-CL_MAND2_SAC_S è stata osservata la formazione una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato, unita alla formazione di colonie isolate nell'area centrale della piastra Petri e sotto i cerchietti di carta imbevuta di olio essenziale. La presenza delle colonie è stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.135].

Sono presenti aloni di inibizione anche nel campione di controllo, provocati dal diretto contatto del lievito con l'acetone. Durante la ricognizione del 30 Marzo (54° giorno), la patina ha aumentato il suo spessore ma non si è propagata radialmente [Fig.136].

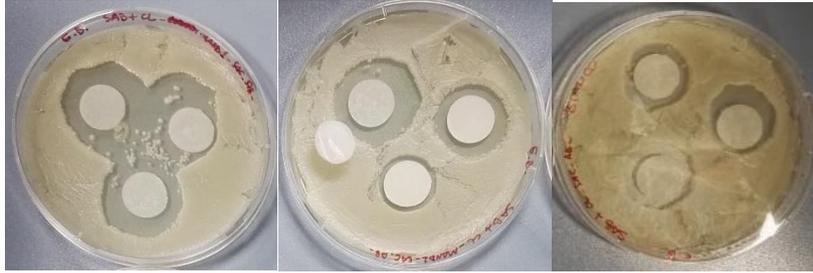


Figura 135: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB-SAB-CL_MAND1_SAC_S e EB-SAB-CL_MAND2_SAC_S, dopo 7 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

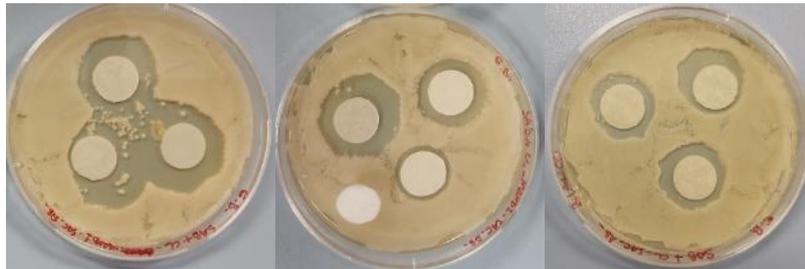


Figura 136: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB-SAB-CL_MAND1_SAC_S e EB-SAB-CL_MAND2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Nel seguente grafico [Fig.137], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di mandarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile.

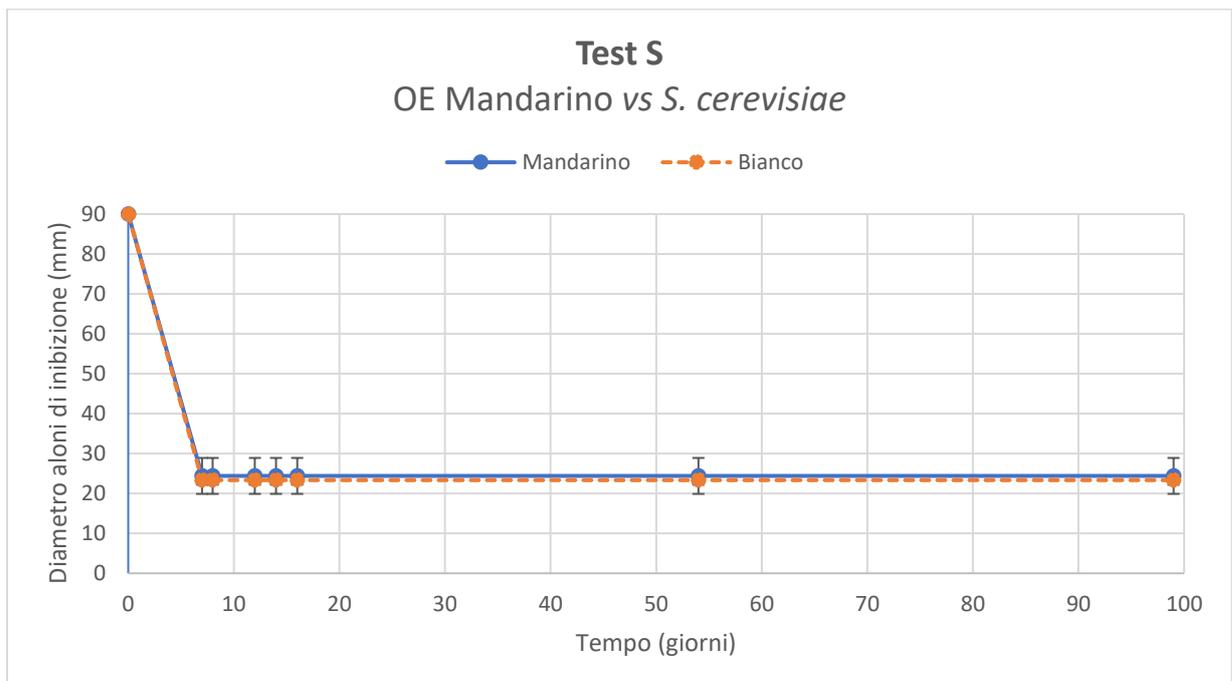


Figura 137: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di mandarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore medio di 24 ± 5 mm durante la prima ricognizione (7° giorno), rispetto i 23 ± 1 mm del controllo.

3.2.7. OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO

È stata osservata una crescita micotica in tutti i campioni trattati con olio essenziale di rosmarino. L'effetto dell'olio essenziale è stato probabilmente compromesso a causa della presenza di etere di petrolio nella sua formulazione.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di rosmarino con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.7.

Alternaria alternata

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_AB e EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva, circondate da un perimetro bianco composto da ife bianche di accrescimento, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.138].

La presenza di miceli secondari, distanziati dal principale, è causata dallo spostamento delle piastre Petri. I conidi del Fungo sono riusciti, tramite il movimento, a rilasciare le conidiospore, le quali sono germinate successivamente. Questo fenomeno si è riscontrato anche nel campione di controllo.



Figura 138: Formazione di ife di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM2_ALT_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_S e EB_SAB-CL_ROSM2_ALT_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva che hanno ricoperto tutta la superficie della piastra Petri, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.139].



Figura 139: Crescita di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM2_ALT_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Per i campioni AB, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), senza subire ulteriori variazioni nella successiva ricognizione. Per i campioni S, invece, la colonizzazione completa dell'area si è riscontrata fin dalla prima ricognizione (7° giorno) [Fig.140].

Nei campioni AB, la colorazione del micelio maturo è virata a marrone scuro. La crescita fungina è avanzata solo sopra la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco.

Nei campioni S, la colorazione del micelio maturo è virata a marrone scuro e la crescita fungina sotto la superficie dei dischetti di carta è parziale, mentre risulta totale nel campione di controllo [Fig.141].

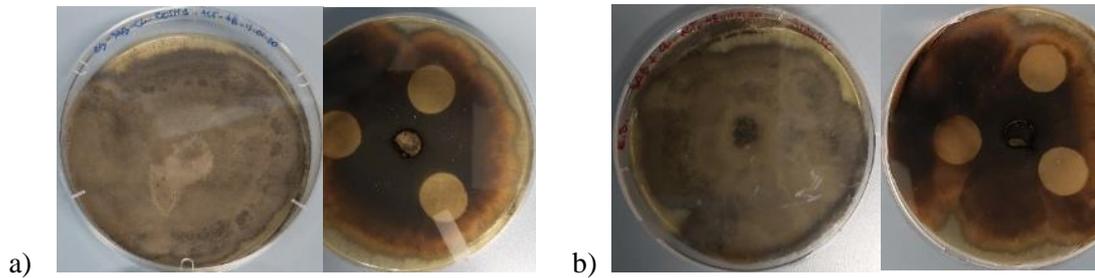


Figura 140: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

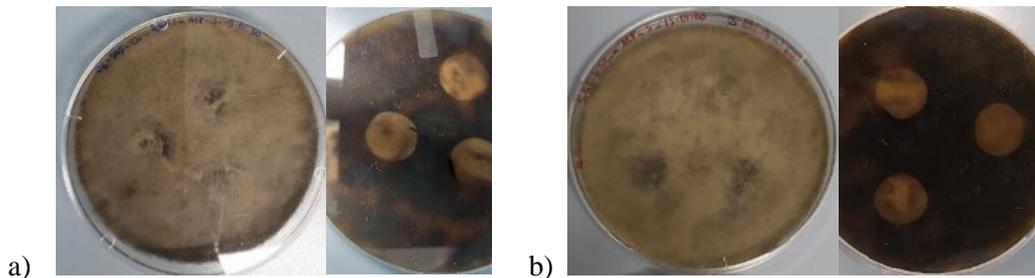


Figura 141: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.142 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di rosmarino che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. L'andamento della curva di crescita presenta dei valori maggiori rispetto a quelli di confronto, indicando che l'olio essenziale ha favorito la crescita micotica anziché inibirla.

Nel grafico Fig.143, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

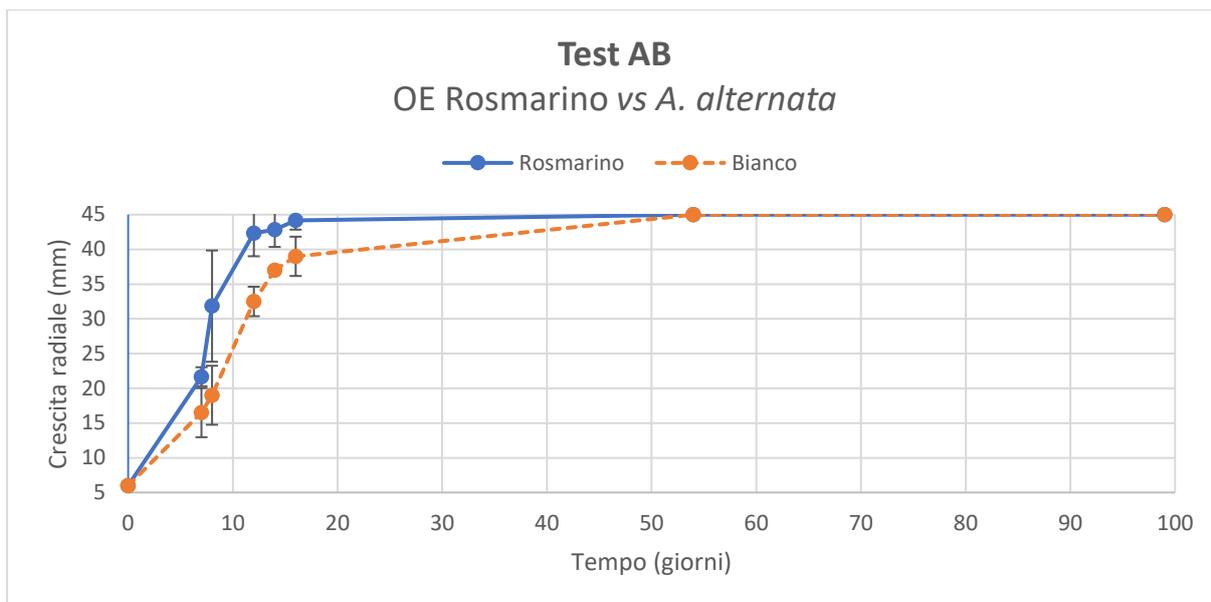


Figura 142: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

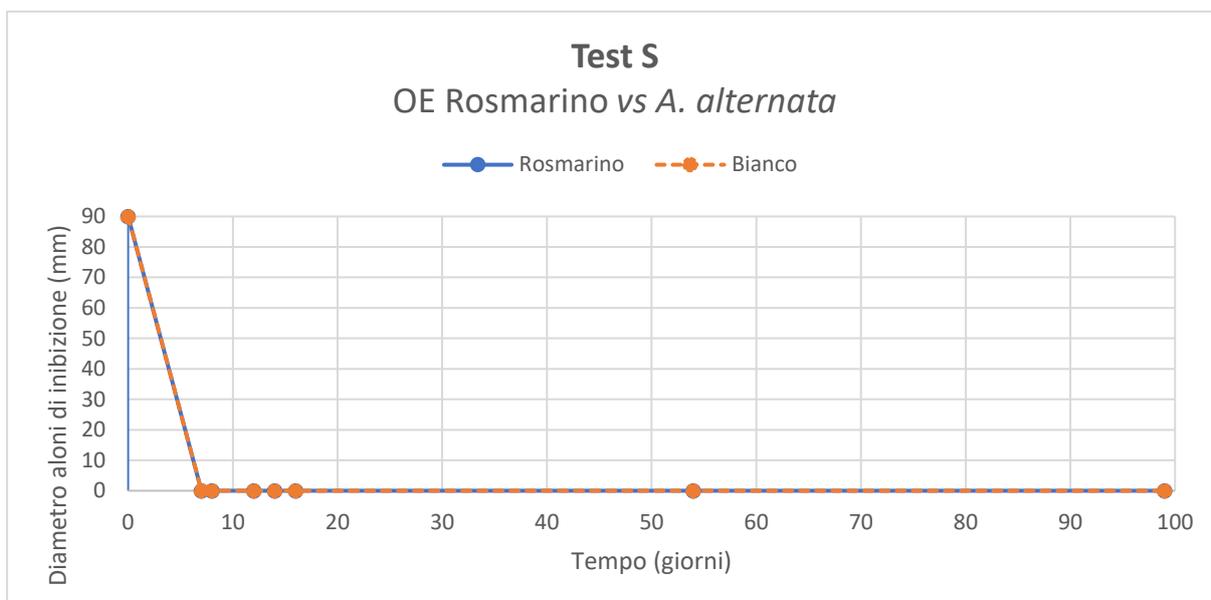


Figura 143: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Cladosporium cladosporioides

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_CLA_AB e EB_SAB-CL_ROSM1_CLA_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di colonie fungine rotonde, verdi, vellutate e dal profilo umbonato. È stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto interamente tutta l'area a disposizione [Fig.144].

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_CLA_S e EB_SAB-CL_ROSM2_CLA_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata una crescita miceliare verde, omogenea, vellutata, di consistenza soffice, che segue il movimento di striscio eseguito durante la semina. È stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto interamente tutta l'area a disposizione [Fig.145].

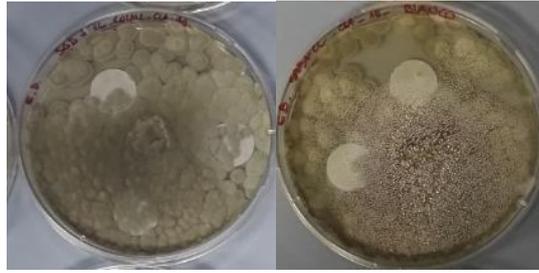


Figura 144: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM2_CLA_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

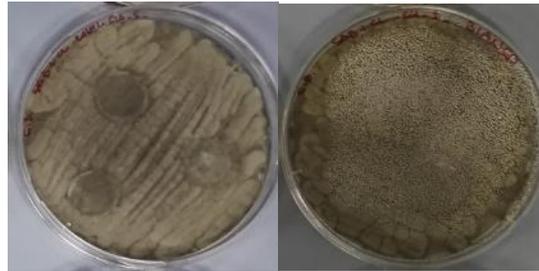


Figura 145: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_CLA_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Il micelio maturo, durante la sesta ricognizione (54° giorno), ha assunto una colorazione marrone. Nei campioni AB, il micelio si è propagato sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.146]. Nei campioni S, la crescita fungina si è propagata sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.147].

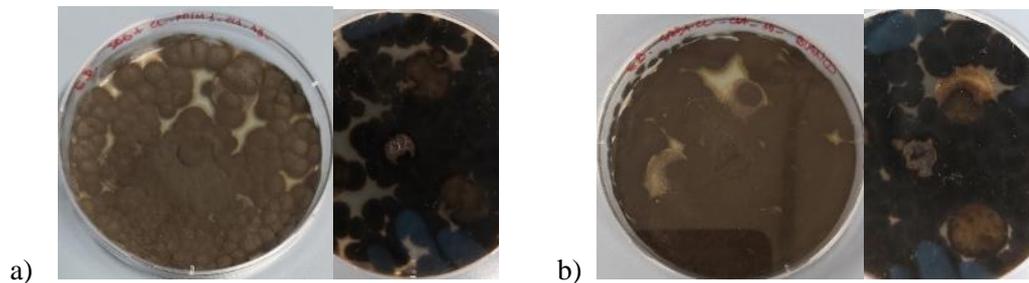


Figura 146: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_CLA_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

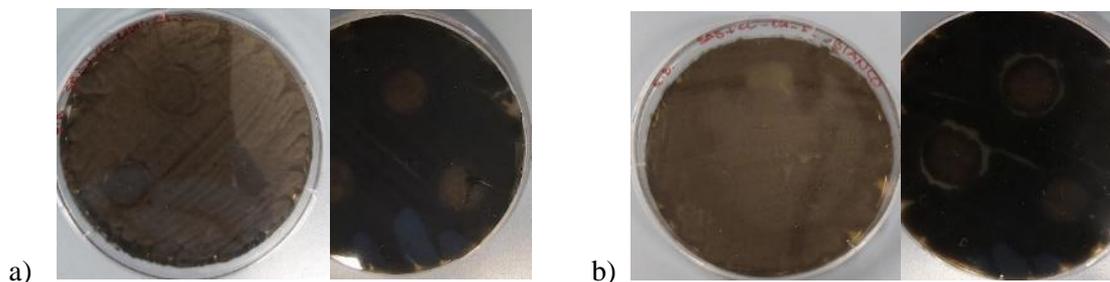


Figura 147: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.148 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. La

crescita di *C. cladosporioides* è simile a quella del campione di controllo, in quanto viene raggiunta la completa colonizzazione della piastra Petri il 7° giorno dall'inoculo.

Nel grafico Fig.149, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n= 3$ per il controllo e $n= 3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

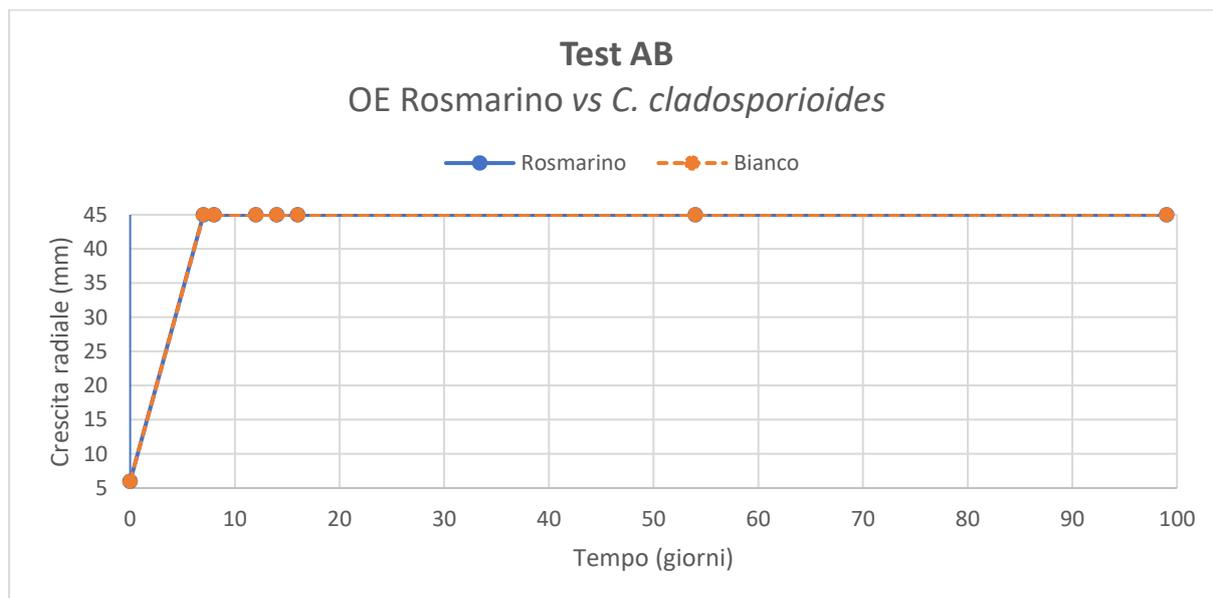


Figura 148: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

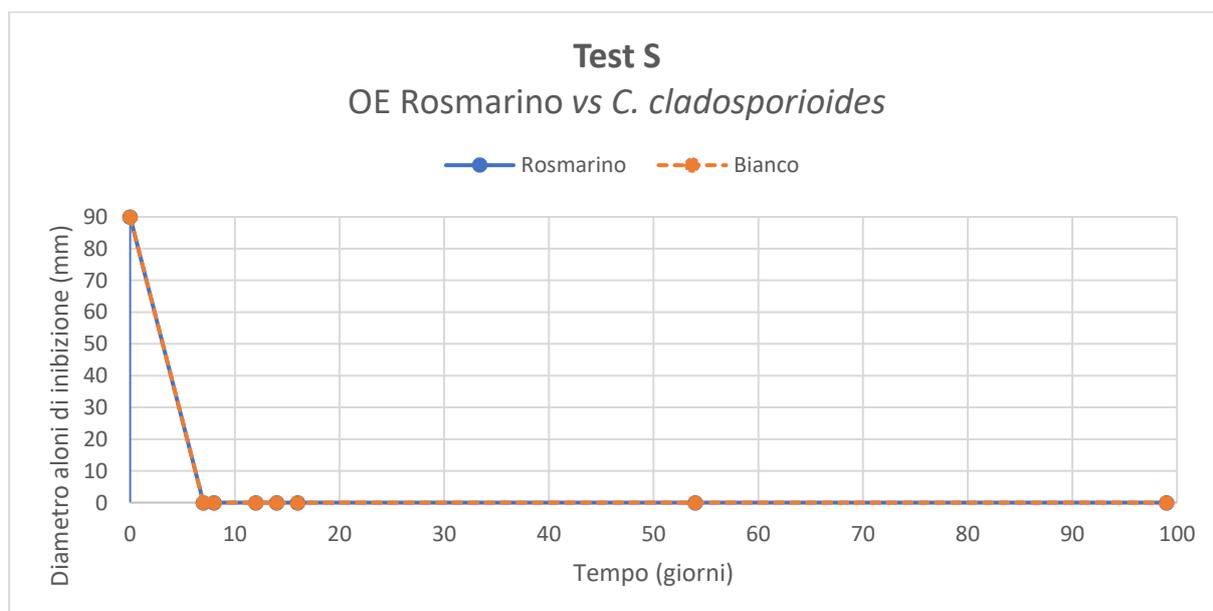


Figura 149: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_AB e EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di micelio composto da più colonie fungine bianche, con profili cupoliformi e aspetto feltroso. È stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri [Fig.150].

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_S e EB_SAB-CL_ROSM2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di un micelio verde, vellutato e omogeneo. È stato riscontrato durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri [Fig.151].



Figura 150: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_AB e EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.



Figura 151: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_S e EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Le fruttificazioni conidiche mature hanno assunto una colorazione marrone durante la sesta ricognizione (54° giorno), come il campione di controllo. Sono state rilevate dei ciuffetti di ife aeree bianche nella superficie del Fungo, paragonabili a quelle del controllo [Fig.152].

Per quanto riguarda i campioni AB, la colonizzazione è avanzata sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale.

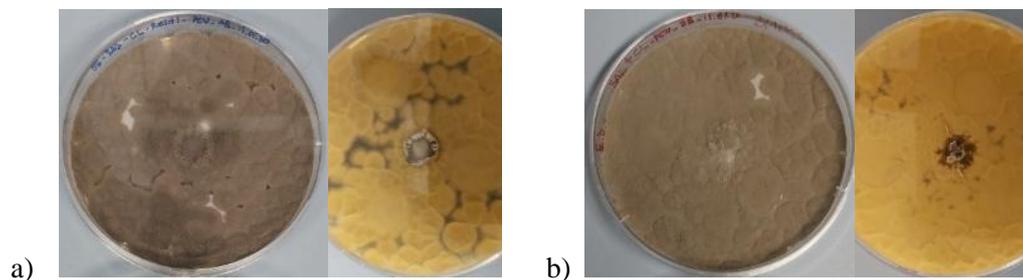


Figura 152: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_ROSM1_PEN_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni S la crescita del micelio si è riscontrata sia sopra che sotto la superficie dei cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale [Fig.153].

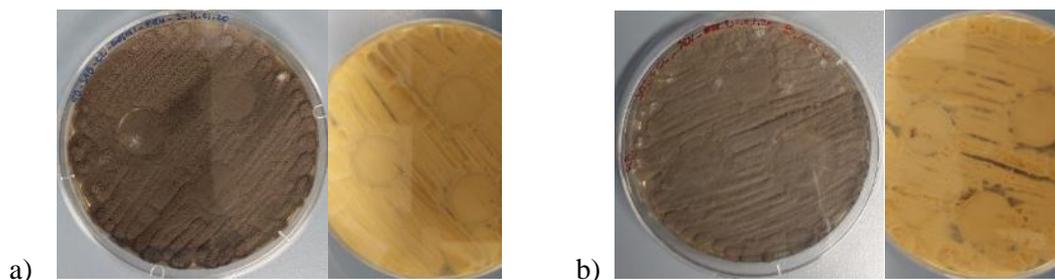


Figura 153: a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_ROSMI_PEN_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.154 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. La crescita di *Penicillium sp.* è simile a quella del campione di controllo, in quanto viene raggiunta la completa colonizzazione della piastra Petri il 7° giorno dall'inoculo.

Nel grafico Fig.155, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

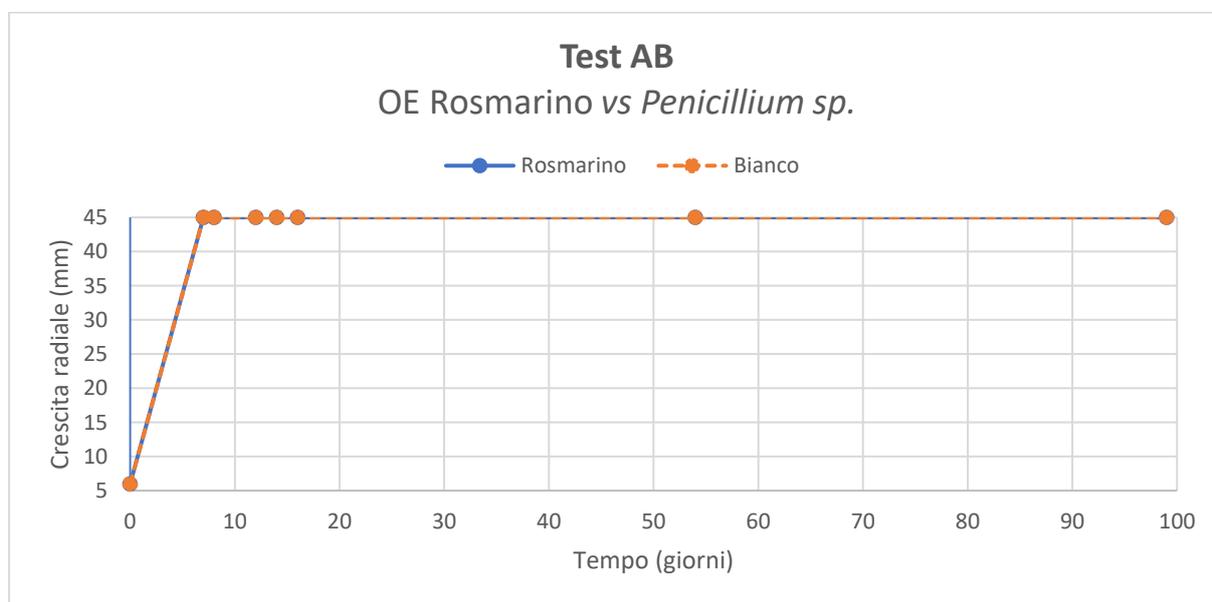


Figura 154: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

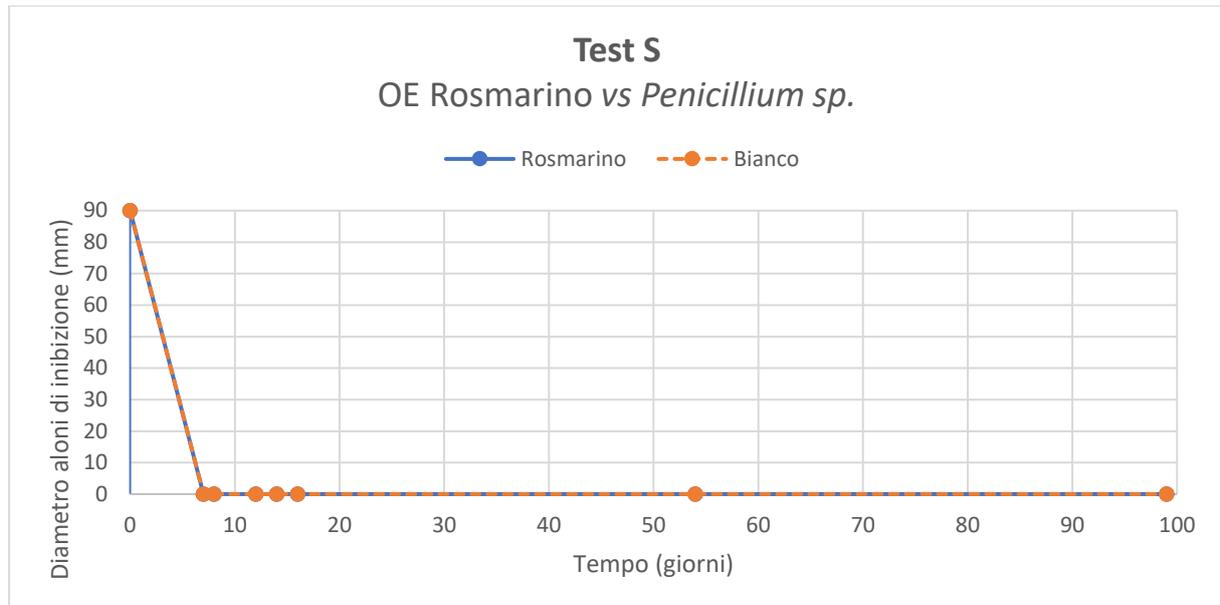


Figura 155: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_SAC_S e EB_SAB-CL_ROSM2_SAC_S è stata osservata la formazione una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato, unita alla formazione di colonie isolate nell'area centrale della piastra Petri e sotto i cerchietti di carta imbevuta di olio essenziale. La presenza delle colonie è stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.156].

Sono presenti aloni di inibizione anche nel campione di controllo, provocati dal diretto contatto del lievito con l'acetone.

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), la patina ha aumentato il suo spessore ma non si è propagata radialmente [Fig.157].



Figura 156: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_SAC_S e EB_SAB-CL_ROSM2_SAC_S, dopo 7 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.



Figura 157: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_ROSM1_SAC_S e EB_SAB-CL_ROSM2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Nel grafico Fig.158, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di rosmarino, effettuando una media dei valori raccolti ($n= 3$ per il controllo e $n= 3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. È stata rilevata crescita di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano: il diametro di inibizione ha raggiunto il valore medio di 28 ± 3 mm al 7° giorno dall'inoculo e si è mantenuto costante nel tempo, a differenza di quello di *S. cerevisiae* di controllo, che ha raggiunto il valore medio e costante di 23 ± 1 mm dal 7° giorno dall'inoculo.

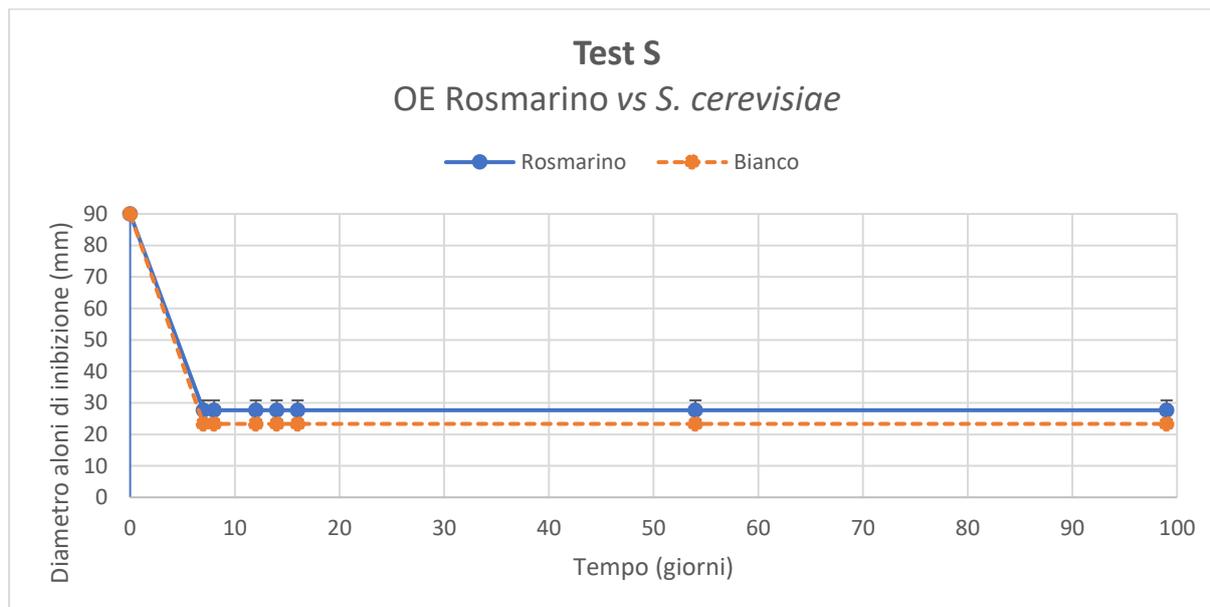


Figura 158: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di rosmarino. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.8. OLIO ESSENZIALE DI TEA TREE

È stata osservata una crescita micotica in tutti i campioni trattati con olio essenziale di tea tree. L'effetto dell'olio essenziale è stato probabilmente compromesso a causa della presenza di acido miristico nella sua formulazione.

Per confrontare la progressione della crescita micotica dei Funghi esaminati trattati con olio essenziale di tea tree con i campioni di controllo, vedasi Allegato 7.8.

Alternaria alternata

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_ALT_AB e EB_SAB-CL_TEE1_ALT_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva, circondate da un perimetro bianco composto da ife bianche di accrescimento, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.159].

La presenza di miceli secondari, distanziati dal principale, è causata dallo spostamento delle piastre Petri. I conidi del Fungo sono riusciti, tramite il movimento, a rilasciare le conidiospore, le quali sono germinate successivamente. Questo fenomeno si è riscontrato anche nel campione di controllo.

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_ALT_S e EB_SAB-CL_TEE2_ALT_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di fruttificazioni conidiche cotonose verdi oliva che hanno ricoperto tutta la superficie della piastra Petri, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.160].



Figura 159: Formazione di ife di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_ALT_AB e EB_SAB-CL_TEE1_ALT_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del campione. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

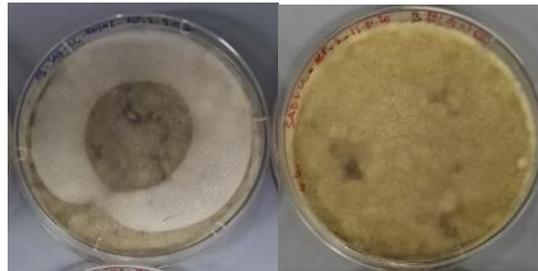


Figura 160. Crescita di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_TEE2_ALT_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Per i campioni AB, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la sesta ricognizione (54° giorno), senza subire ulteriori variazioni nella successiva ricognizione. Per i campioni S, invece, la colonizzazione completa dell'area si è riscontrata fin dalla prima ricognizione (7° giorno).

Nei campioni AB, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro. La crescita fungina è avanzata solo sopra la superficie dei dischetti di carta ed è paragonabile alla crescita osservata nel bianco [Fig.161].

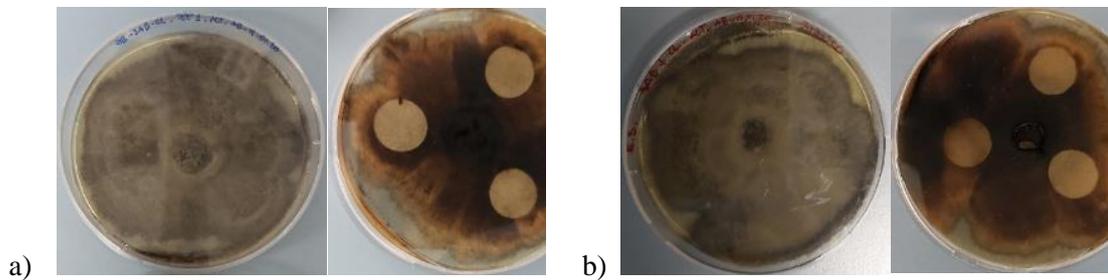


Figura 161: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_ALT_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO.

Nei campioni S, la colorazione del micelio è virata a marrone scuro. La crescita fungina sotto la superficie dei dischetti di carta è parziale, mentre risulta totale nel campione di controllo [Fig.162].

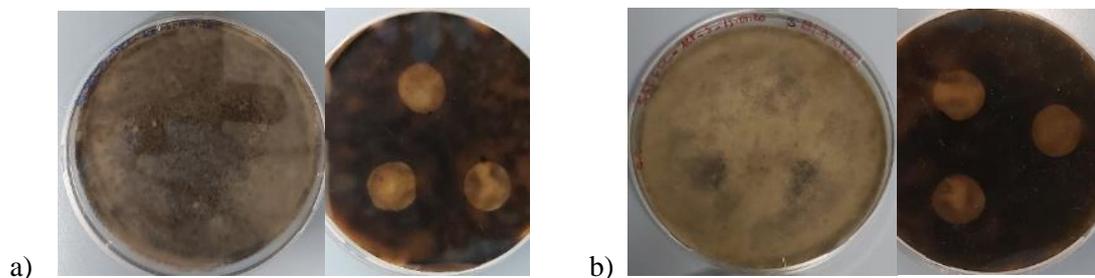


Figura 162: a) Crescita massima di *A. alternata* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_ALT_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.163 sono comparate le curve di crescita di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo

e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben visibile la fase esponenziale della curva di crescita di *A. alternata* in presenza di olio essenziale di tea tree che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono simili a quelli di confronto, ma presentano una variabilità maggiore. L'andamento della curva di crescita presenta dei valori leggermente maggiori rispetto a quelli di confronto, indicando che l'olio essenziale ha favorito la crescita micotica anziché inibirla.

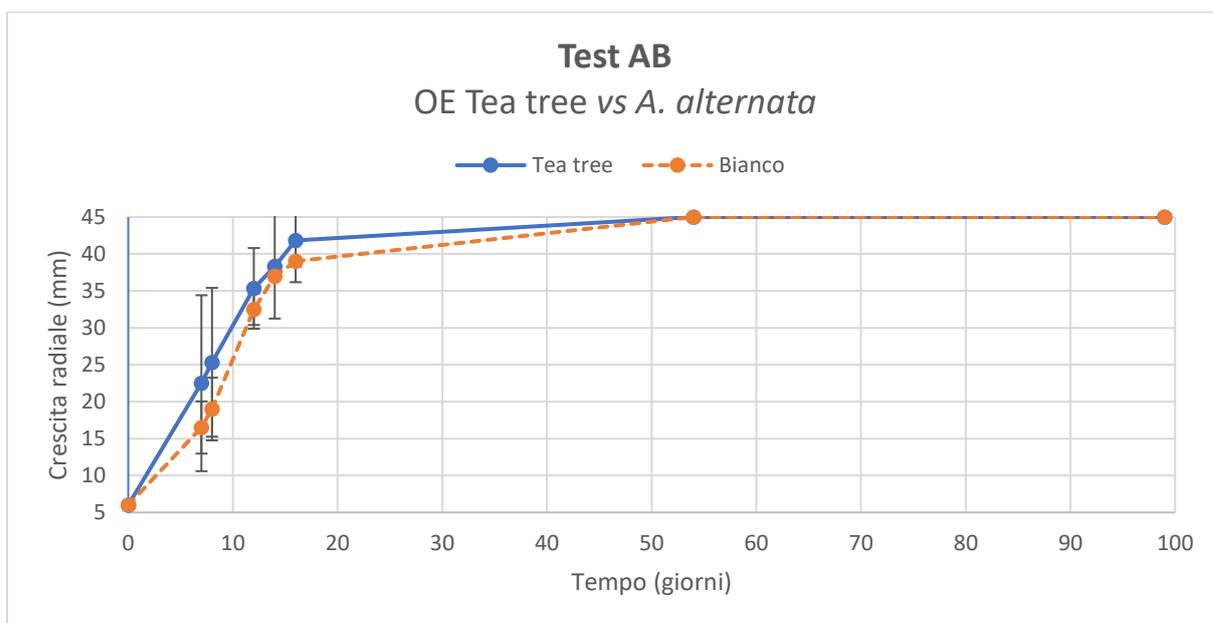


Figura 163: Curva di crescita (test AB) di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

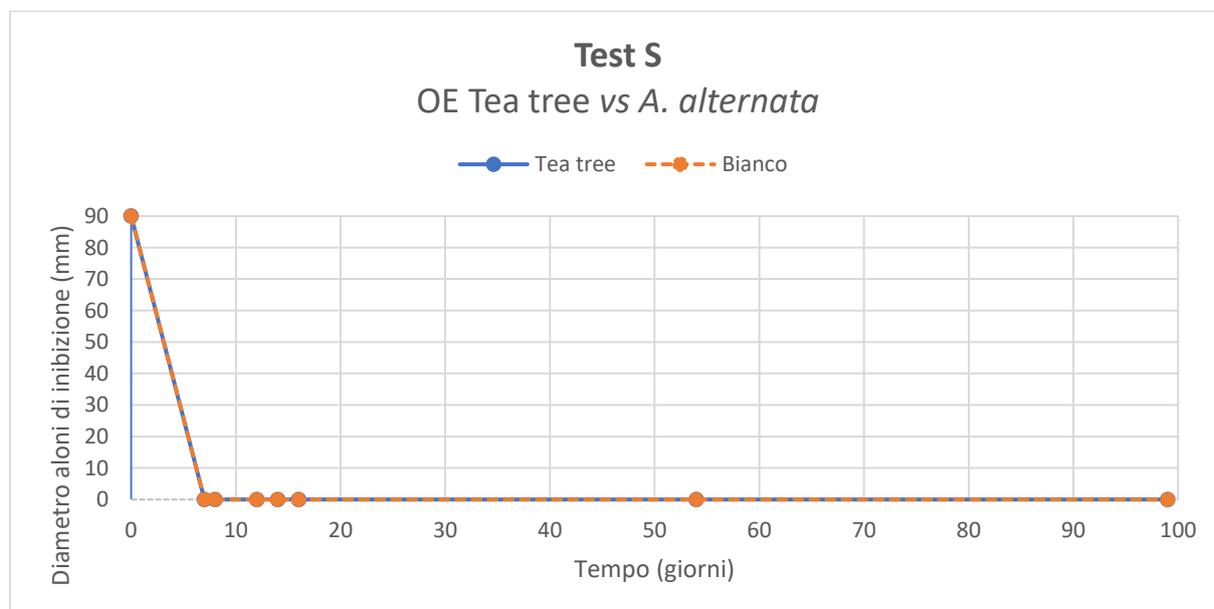


Figura 164: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *A. alternata* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Nel grafico Fig.164, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *A. alternata* di controllo e di *A. alternata* in presenza di olio

essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n= 3$ per il controllo e $n= 3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

Cladosporium cladosporioides

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_CLA_AB e EB_SAB-CL_TEE2_CLA_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di colonie fungine rotonde, verdi, vellutate e dal profilo umbonato, durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.165].

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_CLA_S e EB_SAB-CL_TEE2_CLA_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata una crescita miceliare verde, omogenea, vellutata, di consistenza soffice, che segue il movimento di striscio eseguito durante la semina. È stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto interamente tutta l'area a disposizione [Fig.166].



Figura 165: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_TEE2_CLA_AB, dopo 7 giorni dall'inoculo del micelio. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

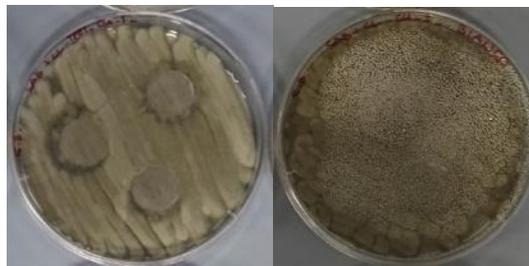


Figura 166: Crescita di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_CLA_S, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Per i campioni AB, la crescita del micelio è diventata massima e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri durante la quarta ricognizione (14° giorno). Per i campioni S, invece, la colonizzazione completa dell'area si è riscontrata fin dalla prima ricognizione (7° giorno).

Il micelio maturo, nella sesta ricognizione (54° giorno), ha assunto una colorazione marrone. Nei campioni AB, il micelio si è propagato sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.167].

Nei campioni S, la crescita fungina è interamente presente sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.168].

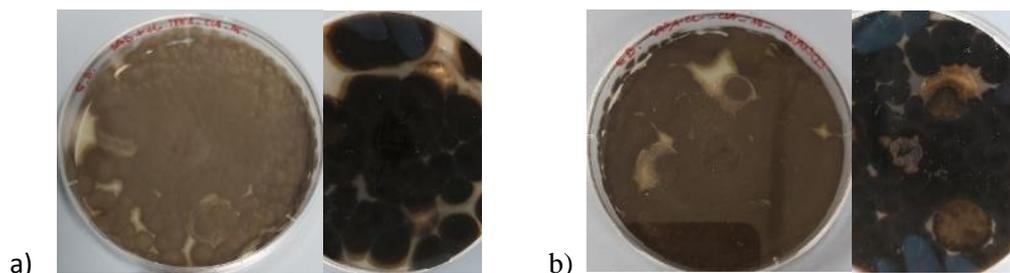


Figura 167: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_CLA_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_AB_BIANCO.

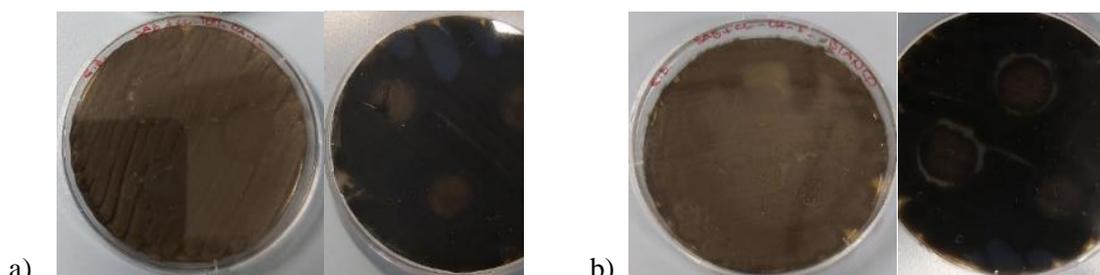


Figura 168: a) Crescita massima di *C. cladosporioides* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_CLA_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_CLA_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.169 sono comparate le curve di crescita di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto nel test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. È ben visibile l'inizio della fase esponenziale della curva di crescita di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di tea tree che ha raggiunto la completa colonizzazione della piastra Petri al 54° giorno dall'inoculo. I valori della fase esponenziale sono inferiori rispetto a quelli della fase esponenziale di confronto, anche se presentano una maggiore variabilità per quanto riguarda la deviazione standard.

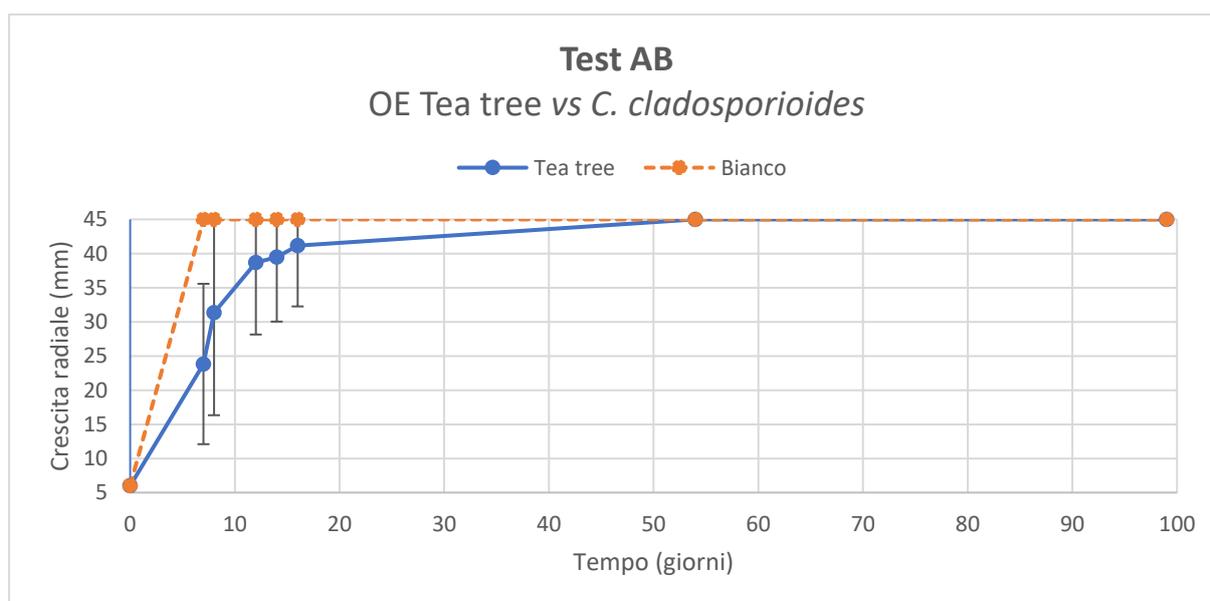


Figura 169: Curva di crescita (test AB) di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

Nel grafico Fig.170, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* di controllo e di *C. cladosporioides* in presenza di olio essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n= 3$ per il controllo e $n= 3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

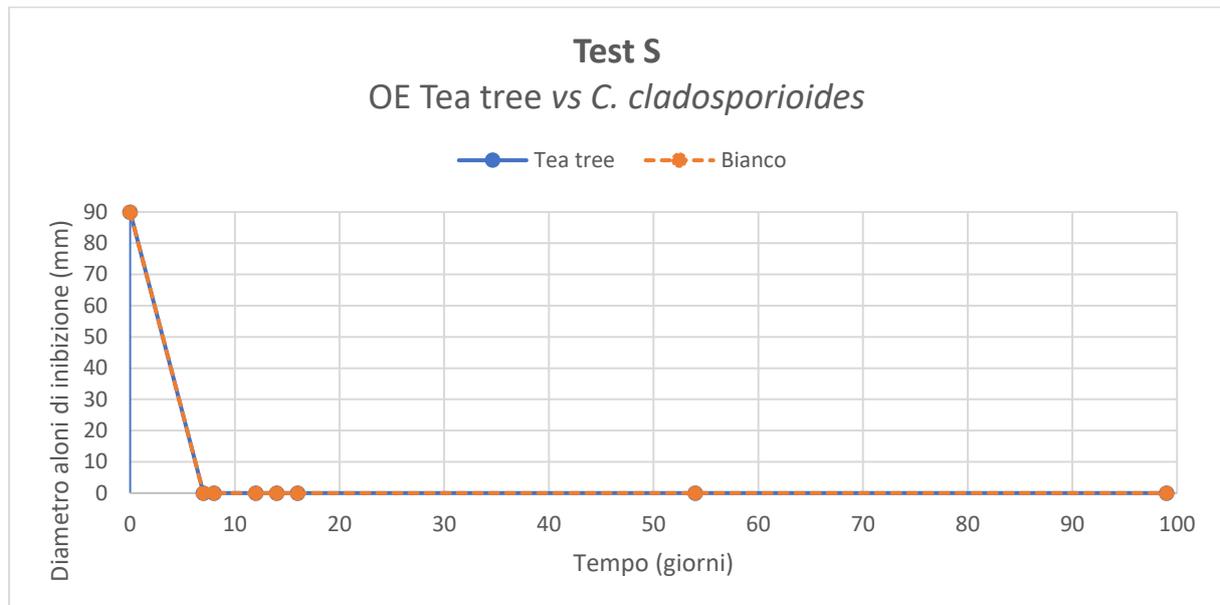


Figura 170: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *C. cladosporioides* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Penicillium sp.

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_PEN_AB e EB_SAB-CL_TEE2_PEN_AB, il cui scopo è l'analisi della crescita del micelio (test AB), è stata rilevata la formazione di micelio composto da più colonie fungine verdi con perimetro bianco, con profili cupoliformi e aspetto feltroso. È stato riscontrato durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri [Fig.171].



Figura 171: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_PEN_AB e EB_SAB-CL_TEE2_PEN_AB, dopo 7 giorni dalla semina. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_PEN_S e EB_SAB-CL_TEE2_PEN_S, il cui scopo è l'analisi della germinazione e della crescita delle spore (test S), è stata rilevata la formazione di un micelio verde, vellutato e omogeneo. È stato riscontrato durante la prima ricognizione (7° giorno) e ha ricoperto tutta l'area della piastra Petri [Fig.172]. Le fruttificazioni conidiche mature dei campioni S hanno assunto una colorazione marrone durante la quinta ricognizione (16° giorno), mentre i campioni

AB durante la sesta ricognizione (54° giorno), come nei campioni di confronto [Fig.173]. Sulla superficie è stata osservata la presenza di ciuffetti di ife bianche aeree.

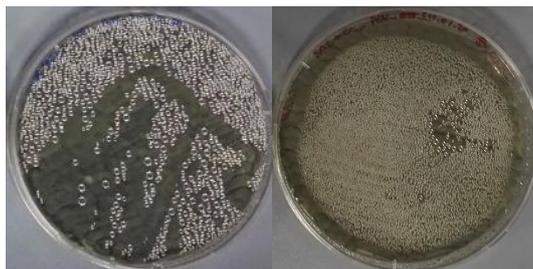
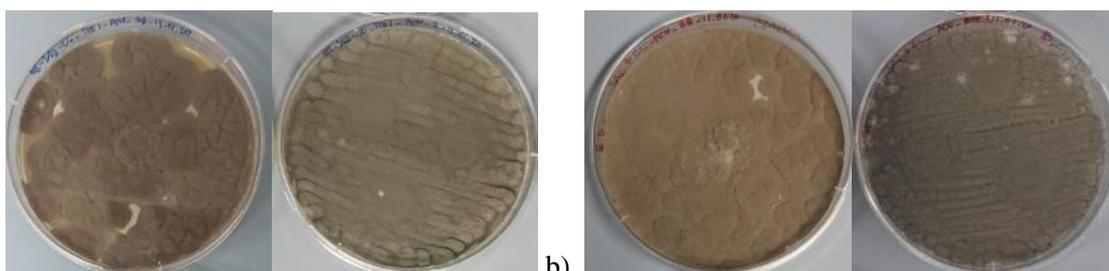
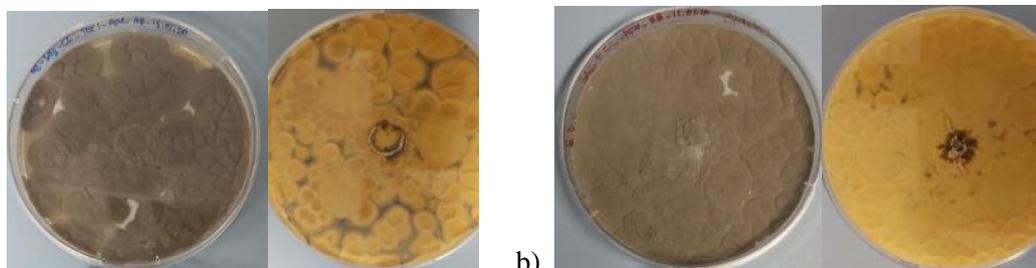


Figura 172: Crescita di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_PEN_, dopo 7 giorni dalla semina delle spore. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.



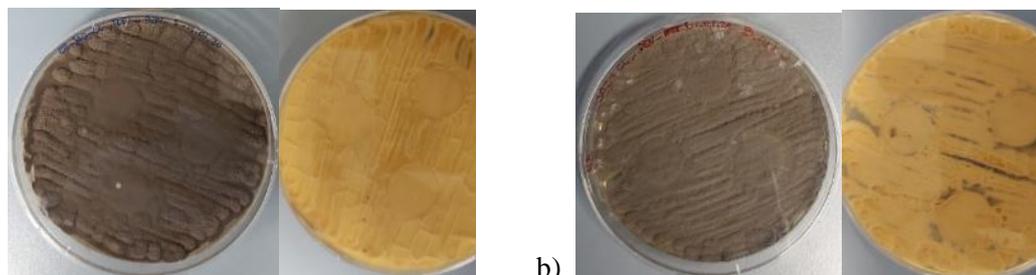
a) Colorazione marrone del micelio di *Penicillium sp.* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_PEN_AB e EB_SAB-CL_TEE1_PEN_S, il primo durante la sesta ricognizione (54° giorno), il secondo durante la quinta ricognizione (16° giorno). b) Confronto con la colorazione dei campioni di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO e EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO, il primo durante la sesta ricognizione (54° giorno), il secondo durante la quinta ricognizione (16° giorno).

Per quanto riguarda i campioni AB, la colonizzazione è avanzata sia sopra che sotto i cerchietti imbevuti di olio essenziale [Fig.174].



a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_TEE1_PEN_AB, dopo 54 giorni dall'inoculo del micelio. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO.

Nei campioni S la crescita del micelio si è riscontrata sia sopra che sotto la superficie dei cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale [Fig.175].



a) Micelio di *Penicillium sp.* nel campione EB_SAB-CL_TEE1_PEN_S, dopo 54 giorni dalla semina delle spore. b) Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO.

Nel grafico Fig.176 sono comparate le curve di crescita di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n=$

3 per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni punto del test AB risulta dalla misurazione della crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima crescita possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza. La crescita di *Penicillium sp.* è simile a quella del campione di controllo, in quanto viene raggiunta la completa colonizzazione della piastra Petri il 7° giorno dall'inoculo.

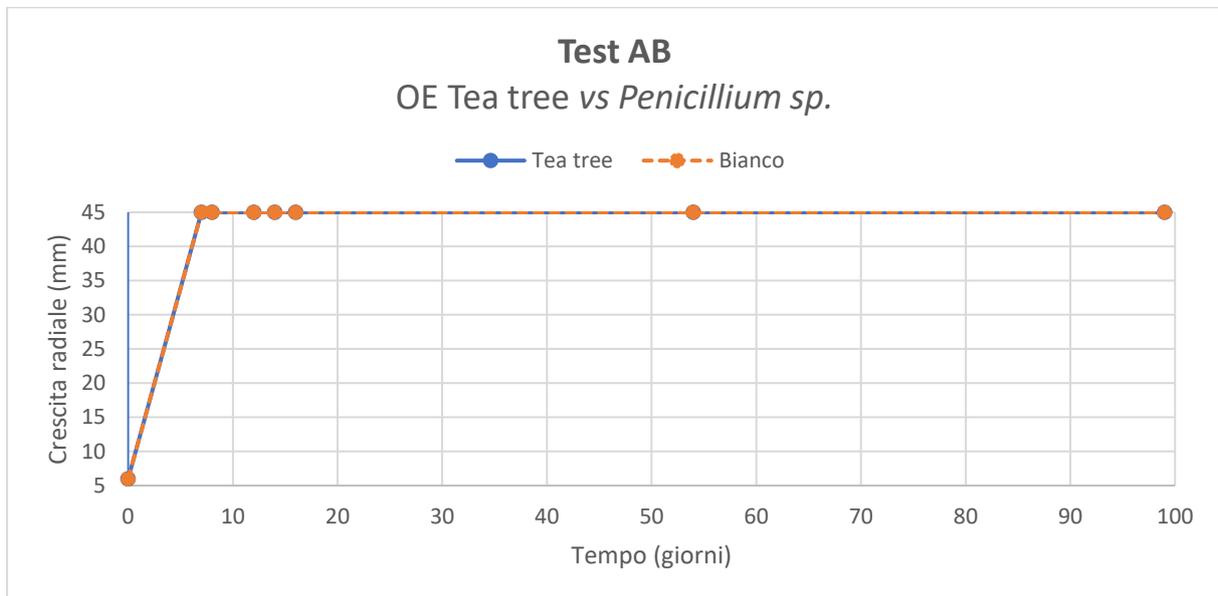


Figura 176: Curva di crescita (test AB) di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al raggio della capsula di Petri (45 mm) la massima inibizione possibile, mentre il raggio dell'inoculo centrale del micelio già germinato (6 mm) corrisponde al valore di partenza].

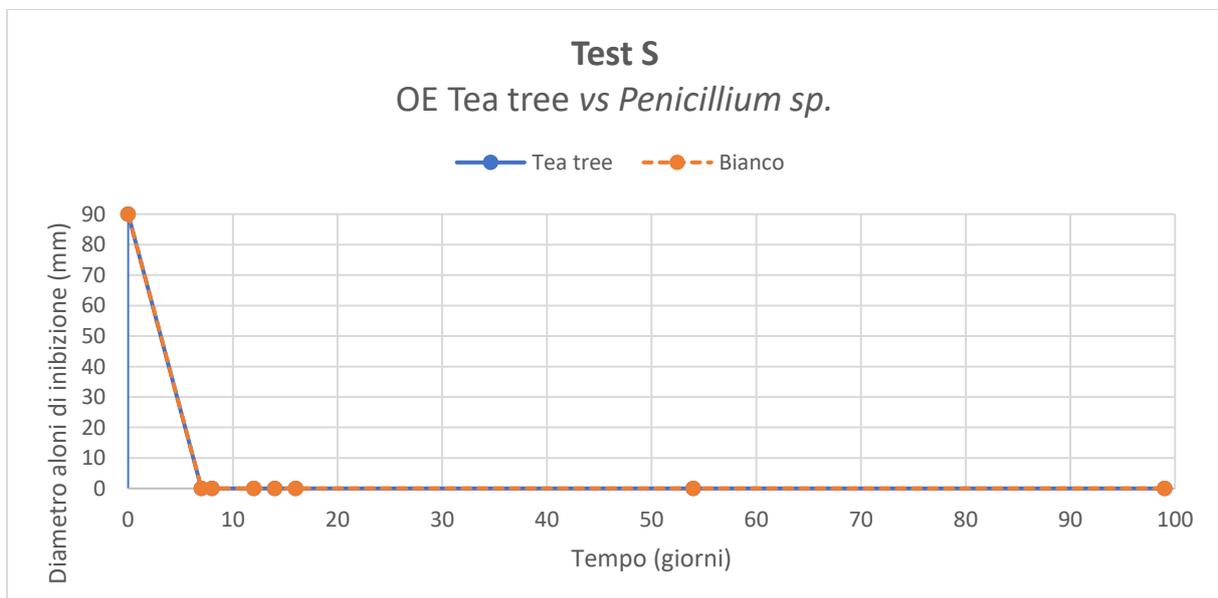


Figura 177: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

Nel grafico Fig.177, relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *Penicillium sp.* di controllo e di *Penicillium sp.* in presenza di olio essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n=3$ per il controllo e $n=3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta

corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore minimo (0 mm, completa colonizzazione della piastra Petri) durante la prima ricognizione (7° giorno).

Saccharomyces cerevisiae

Nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_SAC_S e EB_SAB-CL_TEE2_SAC_S è stata osservata la formazione una patina giallina, liscia, lucida, cremosa e dal profilo elevato, unita alla formazione di colonie isolate nell'area centrale della piastra Petri e sotto i cerchietti di carta imbevuta di olio essenziale. La presenza delle colonie è stata riscontrata durante la prima ricognizione (7° giorno) [Fig.178].

Sono presenti aloni di inibizione anche nel campione di controllo, provocati dal diretto contatto del lievito con l'acetone.

Durante la sesta ricognizione (54° giorno), la patina ha aumentato il suo spessore ma non si è propagata radialmente [Fig.179].



Figura 178: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_SAC_S e EB_SAB-CL_TEE2_SAC_S, dopo 7 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.



Figura 179: Patina di *S. cerevisiae* nei campioni EB_SAB-CL_TEE1_SAC_S e EB_SAB-CL_TEE2_SAC_S, dopo 54 giorni dalla semina del lievito. Confronto con il campione di controllo EB_SAB-CL_SAC_BIANCO_S.

Nel seguente grafico [Fig.180], relativo al test S, sono comparate le variazioni di diametro degli aloni di inibizione allo sviluppo delle spore di *S. cerevisiae* di controllo e di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di tea tree, effettuando una media dei valori raccolti ($n= 3$ per il controllo e $n= 3$ in duplicato per il test in presenza di olio essenziale). Ogni valore risulta dalla misurazione dell'alone di inibizione alla crescita verso il singolo cerchietto di una capsula Petri. Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile. Il valore medio dell'alone di inibizione è simile a quello del campione di controllo, in quanto raggiunge il valore medio di 22 ± 6 mm durante la prima ricognizione (7° giorno), rispetto i 23 ± 1 mm del controllo.

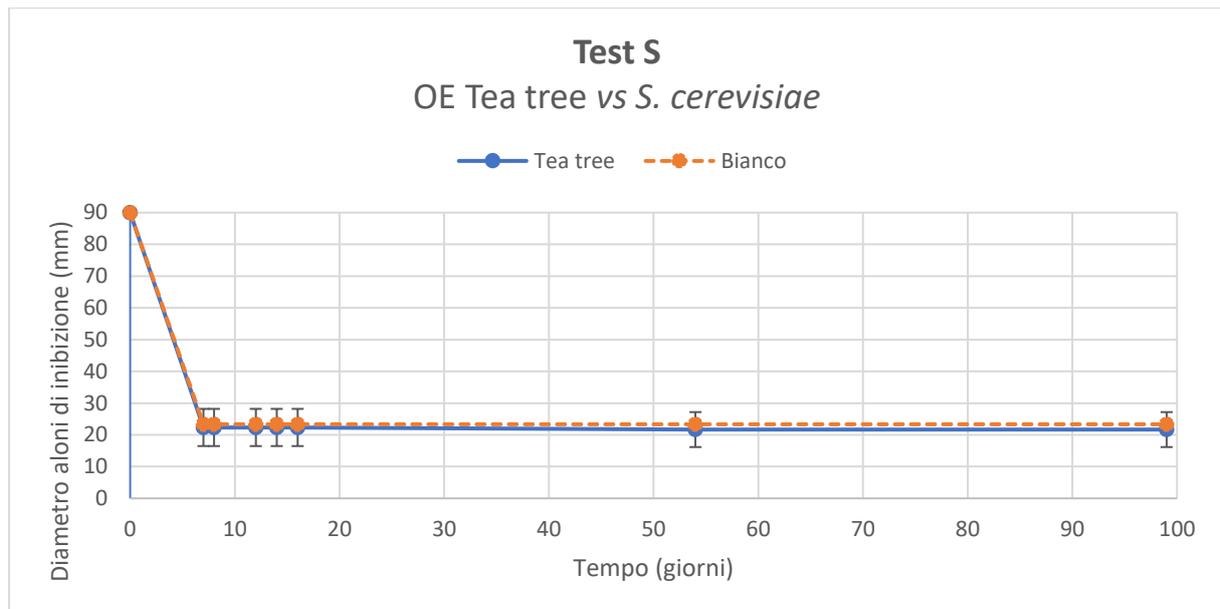


Figura 180: Curve di inibizione (Test S) allo sviluppo di *S. cerevisiae* in presenza (blu) e in assenza (arancio) di olio essenziale di tea tree. [Si noti che si è fatta corrispondere al diametro della capsula di Petri (90 mm) la massima inibizione possibile].

3.2.9. DISCUSSIONE GENERALE SUI TEST AB E SUI TEST S

A seguito delle analisi effettuate, è possibile stabilire che gli oli essenziali selezionati (timo, chiodi di garofano, basilico, lavanda, bergamotto, mandarino, rosmarino e tea tree) svolgono tutti, seppur in diverso grado e con tempistiche differenti, un'azione antimicotica rispetto alle specie *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium sp* e *Saccharomyces cerevisiae*, ma i risultati più promettenti sono stati raggiunti dagli oli essenziali di timo, chiodi di garofano e basilico.

L'effetto maggiore è stato riscontrato con l'utilizzo di olio essenziale di timo al chemotipo timolo, il quale ha inibito totalmente la crescita di ogni specie fungina per tutta la durata dell'analisi (99 giorni), seguito dall'olio essenziale di chiodi di garofano che, durante lo stesso lasso di tempo, ha inibito totalmente la crescita di *A. alternata* e *C. cladosporioides*. I campioni con *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* hanno presentato, invece, una leggera patina periferica di crescita fungina dopo sette giorni dall'inoculo, ma la crescita è rimasta invariata nelle ricognizioni successive.

Una buona azione antimicrobica è stata riscontrata inoltre con l'olio essenziale di basilico: anche se esso ha consentito la crescita fungina su tutti i campioni, ne ha rallentato nettamente lo sviluppo e ne ha aumentando la fase di latenza.

Si è osservato che l'azione degli oli essenziali ha un maggior effetto inibitorio nei test AB (inoculo centrale del micelio già germinato), rispetto ai test S (striscio delle spore fungine e del lievito sulla superficie dell'intera piastra Petri). Il motivo si ricollega alla disposizione dei cerchietti di carta imbevuti di olio essenziale: ognuno di essi rilascia un alone che si diffonde radialmente e si concentra nella zona centrale della piastra Petri, dove, nei test AB è posto l'inoculo del micelio già germinato. Anche nei test S si osserva questo meccanismo: le spore, che ricoprono interamente la superficie del terreno di coltura, tendono a germinare principalmente nei bordi periferici della piastra, dove la diffusione dell'olio essenziale è minore.

Gli oli essenziali sono composti da terpeni a basso peso molecolare che tendono ad evaporare facilmente. Tali vapori rimangono all'interno della piastra Petri sigillata e si trovano in equilibrio fisico con la loro fase liquida, rendendo l'ambiente saturo (fenomeno conosciuto come *tensione di vapore*). Questo fenomeno spiegherebbe l'effetto inibitorio dell'olio essenziale di timo su tutta la superficie della piastra Petri e non solo nella zona di diffusione prossimale ai cerchietti imbevuti di olio essenziale.

Il fenomeno potrebbe spiegare anche il motivo per cui, nei test S dove è stato utilizzato l'olio essenziale di chiodi di garofano, si sia formata una leggera patina di *Penicillium sp.* e di *S. cerevisiae* a sette giorni dalla semina, che poi è rimasta immutata nelle successive ricognizioni. Le spore seminate perifericamente hanno subito l'azione dei vapori di olio essenziale, provenienti dalla micro-atmosfera, che non sono risultati sufficientemente potenti per arrestare la loro germinazione. Il contatto prolungato con il principio attivo dell'olio essenziale in fase volatile è riuscito, però, ad agire sulle spore germinate, inibendone totalmente la crescita prima della formazione di un vero e proprio micelio e della maturazione dei conidi.

Con il passare del tempo, i principi attivi più reattivi, in particolar modo i composti ricchi di doppi legami, come linalolo e limonene, vanno incontro a degradazione ossidativa e perdono efficacia. Questo spiegherebbe il motivo per cui l'olio essenziale di basilico provochi un allungamento della fase di latenza dei Funghi esaminati, ma non una loro completa inibizione.

È da segnalare che, a causa della respirazione, le Muffe di *A. alternaria*, *C. cladosporioides* e *Penicillium sp.* producono vapore acqueo che può condensare sulla superficie interna del tappo della capsula Petri. Quando ciò comprometteva troppo la visione del Fungo all'interno della Petri, veniva rimossa mediante carta assorbente sotto cappa sterile a flusso laminare, sollevando, perciò, il coperchio. I vapori di olio essenziale si sono perciò inevitabilmente dispersi verso l'ambiente esterno, alterando l'equilibrio di saturazione formatosi tra olio essenziale in fase liquida e il suo vapore. Bisogna però sottolineare che la condensa è stata riscontrata solamente nelle piastre Petri con un livello di contaminazione già avanzata.

Alla luce dei risultati riscontrati, il *Penicillium sp.* si conferma essere il Fungo filamentoso generalmente più resistente all'azione degli oli essenziali e presenta una fase esponenziale piuttosto veloce che gli consente di colonizzare totalmente la piastra Petri in tempi molto brevi; infatti, entrambi i bianchi risultano completamente colonizzati già alla prima ricognizione (7° giorno). Nella maggior parte dei campioni è stata rilevata attività micotica fin dalla prima ricognizione (7° giorno), ad eccezione dei test AB e S con olio essenziale di timo e i test AB con olio essenziale di chiodi di garofano, dove non è stata riscontrata crescita fungina nemmeno dopo 99 giorni dall'inoculo. Il Fungo ha colonizzato interamente le piastre AB e S contenenti l'olio essenziale di basilico in 12 giorni, gli stessi giorni sono stati impiegati per colonizzare le piastre AB con l'olio essenziale di lavanda. Gli oli essenziali, in ordine di efficacia rispetto al *Penicillium sp.*, sono risultati:

timo > chiodi di garofano > basilico > lavanda > bergamotto > mandarino > tea tree > rosmarino.

Nella seguente tabella [Tab.23] sono riportati i giorni nei quali è stato segnalato l'inizio di crescita del micelio nei campioni AB, la germinazione delle spore nei campioni S e la colonizzazione totale della piastra Petri per i campioni AB e S, con i relativi valori di crescita radiale per i campioni AB e di alone di inibizione per i campioni S.

Tab.23: giorno di inizio crescita di micelio nei campioni AB, germinazione delle spore nei campioni S e colonizzazione completa di tutti i campioni da parte di *Penicillium sp* con i relativi valori di crescita radiale per i campioni AB e di alone di inibizione per i campioni S. Gli oli essenziali sono posti in ordine di efficacia.

<i>Penicillium sp.</i>						
Olio essenziale	Inizio crescita test AB (giorno)	Crescita radiale ad inizio crescita test AB (mm)	Germinazione spore test S (giorno)	Alone di inibizione ad inizio germinazione test S (mm)	Colonizzazione totale della piastra Petri test AB (giorno)	Colonizzazione totale della piastra Petri test S (giorno)
Timo	-	6	-	90	-	-
Chiodi di garofano	-	6	7	50 ± 7	-	-
Basilico	7	6	7	40 ± 10	12	12
Lavanda	12	20 ± 10	7	0	12	7
Bergamotto	7	45	7	15	7	7
Mandarino	7	45	7	0	7	7

Rosmarino	7	45	7	0	7	7
Tea tree	7	45	7	0	7	7
Bianco	7	45	7	0	7	7

La Muffa di *Cladosporium cladosporioides*, cresciuta all'interno delle piastre di controllo AB e S, presenta una fase esponenziale veloce e paragonabile a quella dei campioni di controllo di *Penicillium sp.*, infatti, dopo una settimana, entrambi i bianchi risultano completamente colonizzati. A differenza del *Penicillium sp.*, il *C. cladosporioides* risulta meno resistente al trattamento con gli oli essenziali, solo il rosmarino ha permesso una crescita fungina paragonabile a quella del bianco. Risulta, perciò, che gli oli essenziali che hanno più potere inibitorio rispetto al *C. cladosporioides*, sono i seguenti:

timo > chiodi di garofano > basilico > lavanda > bergamotto > mandarino/tea tree/rosmarino.

Nella seguente tabella [Tab.24] sono riportati i giorni nei quali è stato segnalato l'inizio di crescita di micelio nei campioni AB, la germinazione delle spore nei campioni S e la colonizzazione totale della piastra Petri per i campioni AB e S, con i relativi valori di crescita radiale per i campioni AB e di alone di inibizione per i campioni S.

Tab.24: giorno di inizio crescita di micelio nei campioni AB, germinazione delle spore nei campioni S e colonizzazione completa di tutti i campioni da parte di *Cladosporium cladosporioides*, con i relativi valori di crescita radiale per i campioni AB e di alone di inibizione per i campioni S. Gli oli essenziali sono posti in ordine di efficacia.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>						
Olio essenziale	Inizio crescita test AB (giorno)	Crescita radiale ad inizio crescita test AB (mm)	Germinazione spore test S (giorno)	Alone di inibizione ad inizio germinazione test S (mm)	Colonizzazione totale della piastra Petri test AB (giorno)	Colonizzazione totale della piastra Petri test S (giorno)
Timo	-	6	-	90	-	-
Chiodi di garofano	-	6	-	90	-	-
Basilico	14	6,1 ± 0,1	54	20 ± 6	99	-
Lavanda	12	17 ± 2	12	19 ± 1	16	8
Bergamotto	7	20 ± 10	7	15,1 ± 0,1	16	7
Mandarino	7	26 ± 15	7	14 ± 1	54	12
Tea tree	7	20 ± 10	7	0	14	7
Rosmarino	7	45	7	0	7	7
Bianco	7	45	7	0	7	7

L'*Alternaria alternata* è un fungo filamentoso che presenta una fase esponenziale più lenta rispetto a quella del *Penicillium sp.* e del *C. cladosporioides*, in particolare nei test AB. Nel bianco AB di *A. alternata*, la colonizzazione totale della piastra Petri di controllo è stata raggiunta alla sesta ricognizione (64° giorno), mentre nei bianchi AB degli altri Funghi è stata riscontrata nella prima settimana. Il bianco S, invece, ha colonizzato completamente la piastra Petri già alla prima ricognizione (7° giorno). È stato possibile constatare che gli oli essenziali di mandarino, rosmarino e tea tree hanno addirittura favorito la crescita micotica di *A. alternata* nei test AB, anziché inibirla. Gli oli essenziali, in ordine di efficacia rispetto ad *Alternaria alternata*, sono risultati:

timo/chiodi di garofano > basilico > lavanda > bergamotto > mandarino > tea tree/rosmarino.

Nella tabella [Tab.25] sono riportati i giorni nei quali è stato segnalato l'inizio di crescita di micelio nei campioni AB, la germinazione delle spore nei campioni S e la colonizzazione totale della piastra Petri per i campioni AB e S, con i relativi valori di crescita radiale per i campioni AB e di alone di inibizione per i campioni S.

Tab.25: giorno di inizio crescita di micelio nei campioni AB, germinazione delle spore nei campioni S e colonizzazione completa di tutti i campioni da parte di *Alternaria alternata*, con i relativi valori di crescita radiale per i campioni AB e di aloni di inibizione per i campioni S. Gli oli essenziali sono posti in ordine di efficacia.

<i>Alternaria alternata</i>						
Olio essenziale	Inizio crescita test AB (giorno)	Crescita radiale ad inizio crescita test AB (mm)	Germinazione spore test S (giorno)	Aloni di inibizione ad inizio germinazione test S (mm)	Colonizzazione totale della piastra Petri test AB (giorno)	Colonizzazione totale della piastra Petri test S (giorno)
Timo	-	6	-	90	-	-
Chiodi di garofano	-	6	-	90	-	-
Basilico	12	8,5 ± 0,5	12	60 ± 30	54	54
Lavanda	7	6,2 ± 0,1	7	30 ± 4	54	14
Bergamotto	7	15,0 ± 0,9	7	17 ± 3	54	12
Mandarino	7	19,5 ± 0,5	7	15,1 ± 0,1	54	8
Tea tree	7	20 ± 10	7	0	54	7
Rosmarino	7	21 ± 1	7	0	54	7
Bianco	7	17 ± 4	7	0	54	7

A differenza dei Funghi filamentosi, che ricordiamo essere a struttura policellulare e morfologicamente ben variabilmente strutturati, il lievito utilizzato nelle prove di inibizione alla crescita con gli otto oli essenziali ha mostrato un comportamento totalmente differente. *S. cerevisiae* è un fungo unicellulare per la maggior parte del proprio ciclo vitale ed ha, perciò, una modalità di crescita differente rispetto ai Funghi filamentosi. Non è quindi visibile un micelio formato da ife, ma una colonia molto più simile ad una colonia batterica in quanto a texture, formata dalle varie cellule di lievito che si sono riprodotte per gemmazione. Quando le cellule di lievito sono molte, le colonie possono quindi confluire l'una con l'altra e formare uno strato "a patina diffusa", quale si è appositamente ricreato nel campione di controllo. In alcuni casi, come si evince chiaramente anche da esame visivo, non si è riscontrata la formazione di una patina, ma la formazione di singole colonie ben distinguibili ad occhio nudo. Ne consegue in questo caso che l'olio essenziale è riuscito ad inibire la quasi totalità delle cellule di lievito, favorendo la crescita di ben pochi organismi, quantificabile dalla formazione di poche colonie che in alcune piastre si sono potute espandere (non essendo presente competizione per il substrato metabolico e per lo spazio) fino ad occupare più spazio possibile, come nel caso dell'olio essenziale di basilico [Fig. 181a] e di bergamotto [Fig.181b]. È inoltre molto significativo rilevare la particolare morfologia delle colonie prossimali all'alone di diffusione di tali oli essenziali che si è venuta a creare: come si sarà notato, le UFC formatesi hanno un aspetto nettamente differente a quelle del controllo [Fig. 181c], mostrando una convessità molto più accentuata, più larga e oblunga, con texture quasi soffice ed espansa.



Figura 181: a) Colonie di *S. cerevisiae* trattate con olio essenziale di basilico. b) Colonie di *S. cerevisiae* trattate con olio essenziale di bergamotto. c) Colonie di *S. cerevisiae* del campione di controllo.

Gli aloni di inibizione e la particolare morfologia delle UFC di lievito formatesi sono rimasti pressoché immutati al variare del tempo.

Non deve stupire che gli aloni di inibizione alla crescita siano presenti anche nel bianco (campione di controllo positivo): l'acetone, utilizzato per l'ottimale diluizione degli oli essenziali, anche avendo

una ottima volatilità, ha però un potere di disgregazione e disidratazione dei fosfolipidi delle membrane praticamente immediato ed ha quindi svolto anch'esso un effetto inibitorio sulla crescita del lievito. Di tale effetto si è ovviamente tenuto conto nella determinazione quantitativa degli effetti del test.

Gli oli essenziali, in ordine di efficacia rispetto al *S. cerevisiae*, sono risultati:

timo > chiodi di garofano > basilico > bergamotto > lavanda > rosmarino > mandarino > tea tree.

Nella seguente tabella [Tab.26] sono riportati i diametri di inibizione provocati dall'aggiunta di olio essenziale e quelli di confronto provocati dall'aggiunta di acetone, misurati durante la prima e l'ultima ricognizione.

Tab.26: aloni di inibizione (media con $n=3$, in duplicato) riscontrati alla prima e all'ultima ricognizione nei campioni di *Saccharomyces cerevisiae*. Il valore massimo è rappresentato dal raggio della piastra Petri ($r=45$ mm). Gli oli essenziali sono posti in ordine di efficacia.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Olio essenziale	Alone di inibizione al 7° giorno (mm)	Alone di inibizione al 99° giorno (mm)
Timo	45	45
Chiodi di garofano	39 ± 3	39 ± 3
Basilico	45	36 ± 9
Bergamotto	37 ± 4	31 ± 5
Lavanda	33 ± 2	32 ± 2
Rosmarino	28 ± 3	28 ± 3
Mandarino	24 ± 5	24 ± 5
Tea tree	22 ± 6	22 ± 6
Bianco	23 ± 1	23 ± 1

La maggiore o la minore efficacia di questi composti è riconducibile alla composizione chimica della miscela di cui sono formati. Come riportato nel sottoparagrafo 1.1.2.3.2., i composti con un gruppo funzionale fenolico e aldeidico hanno un'attività antimicotica maggiore, subito dopo troviamo alcoli, ossidi ed infine gli idrocarburi terpenici. La progressione riportata in letteratura ha avuto conferma anche in questa ricerca.

L'olio essenziale di timo presenta come principio attivo principale il timolo che rientra, infatti, nella classe chimica dei fenoli monoterpenici.

L'olio essenziale di garofano è composto principalmente da eugenolo (con una percentuale del 68% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), un composto anch'esso fenolico ma con potenza antimicrobica minore rispetto al timolo in quanto la molecola possiede una minore idrofobicità ($\log P_{\text{eugenolo}} = 2,20$, $\log P_{\text{timolo}} = 3,28$) e un sistema di delocalizzazione elettronica differente che sfavorisce il rilascio del protone dal gruppo idrossilico.

L'eugenolo si trova in quantità minore anche nell'olio essenziale di basilico (con una percentuale del 19% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), anche se il principio attivo maggiore è il linalolo (con una percentuale del 58% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), quest'ultimo con un $\log P_{\text{linalolo}} = 3,28$ e rientrante nella classe chimica degli alcoli monoterpenici.

L'olio essenziale di lavanda è composto da percentuali simili di acetato di linalile (con una percentuale del 52% rispetto ai picchi gascromatografici considerati) e linalolo (con una percentuale del 40% rispetto ai picchi gascromatografici considerati). In letteratura è riportato come la combinazione di terpenoidi con un gruppo acetato aumenti l'attività antimicrobica del composto alcolico corrispondente. Una percentuale elevata di linalolo potrebbe spiegare il motivo per cui l'olio essenziale di lavanda risulti più attivo rispetto a quello di bergamotto, il quale presenta anch'esso come principale principio attivo l'acetato di linalile (con una percentuale del 49% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), ma è associato ad una minore percentuale di linalolo (12% rispetto ai picchi gascromatografici considerati). Nella sua composizione è presente anche il limonene (con una

percentuale del 31% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), un idrocarburo terpenico con un $\log P_{\text{limonene}} = 4,45$, che potrebbe avere un ruolo attivo nell'inibizione della crescita fungina.

L'olio essenziale di mandarino presenta come principio attivo principale il limonene (con una percentuale del 66% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), ma, alla luce dei risultati ottenuti, non sembra avere un effetto antimicrobico efficace se utilizzato senza associazione con altri principi attivi alcolici o fenolici.

Il principio attivo principale dell'olio essenziale di tea tree è il terpinen-4-olo, un alcolo monoterpenico con un $\log P_{\text{terpinen-4-olo}} = 2,99$, ma le analisi alla GC-MS hanno evidenziato un'elevata percentuale di acido miristico (con una percentuale del 95% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), il quale ha indubbiamente alterato i risultati delle analisi. L'elevata concentrazione di acido grasso ha, infatti, diluito le rimanenti componenti, che risultano quindi in proporzioni minori, oltre ad essere stato presumibilmente utilizzato come fonte di nutrizione per i microrganismi.

L'olio essenziale di rosmarino utilizzato presenta nella sua composizione un'alta percentuale di etere di petrolio (derivante da una probabile estrazione mediante solventi), che ha probabilmente alterato i risultati delle analisi. Inoltre, il suo principio attivo principale è l'eucaliptolo (con una percentuale del 57% rispetto ai picchi gascromatografici considerati), un etere ciclico monoterpenico con un $\log P_{\text{eucaliptolo}} = 2,82$, che, essendo un ossido, non risulta avere un effetto antimicrobico efficiente quanto i monoterpeni alcolici o fenolici.

3.3. MICROSCOPIA

È doveroso innanzitutto precisare che per mere questioni logistiche, legate al momento storico, non si è potuto fare una analisi a microscopio stereo e ottico approfondita quanto si era prestabilito. L'idea iniziale era, infatti, di verificare l'induzione da parte degli oli essenziali, oltre ad un effetto biocida e/o biostatico, di

- una possibile azione di cambiamento morfologico su ide e/o spore (esame qualitativo),
- una possibile variazione nella numerosità di spore (conidi) prodotte (esame qualitativo),
- l'eventuale presenza/assenza, rispetto al bianco, dei classici morfotipi telomorfici delle muffe, ovvero la presenza/assenza di spore sessuate.

Quello che si è potuto accertare tramite analisi a microscopio stereo e ottico sulle tre muffe in esame, infatti, è confinato alle piastre Petri con le prove dei Test S riguardanti gli oli di basilico, bergamotto, lavanda, mandarino, rosmarino e tea tree, analisi che per le prove preliminari eseguite, non hanno dato alcuna evidenza in merito ai tre punti sopra riportati. Il che significa che:

- non sono stati rilevati cambiamenti morfologici a livello microscopico,
- non è stato possibile verificare una differente numerosità di conidi presenti,
- non sono state osservate strutture a cleistotecio o simili, a riprova di fenomeni di sessualità, ovvero di ricombinazione genica, in atto.

Al contrario, per quanto riguarda l'azione operata dagli oli essenziali sul lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è stato possibile operare con un'analisi microscopica, che verrà qui di seguito esplicitata per tutti gli oli tranne che le prove con timo e chiodi di garofano (ovviamente, avendo avuto azione inibitoria totale).

3.3.3. OLIO ESSENZIALE DI BASILICO

Saccharomyces cerevisiae

Le cellule di lievito entrate in contatto con l'olio essenziale di basilico presentano, in buona parte, malformazioni cellulari [Fig.182a e 182b e, per il confronto con le cellule di lievito del campione di controllo, Fig. 183]. È possibile vedere come alcune cellule risultino vuote, accartocciate, con i bordi irregolari. Parte delle cellule presentano un vacuolo che occupa più della metà del citoplasma cellulare, rispetto ai lieviti di confronto. Questo potrebbe essere la conseguenza di uno stress osmotico subito dalla cellula. Osservando la capsula Petri nel suo insieme, inoltre, appare evidente che le UFC sono veramente poche, indicando un potere biocida quasi totale nel confronto del lievito.

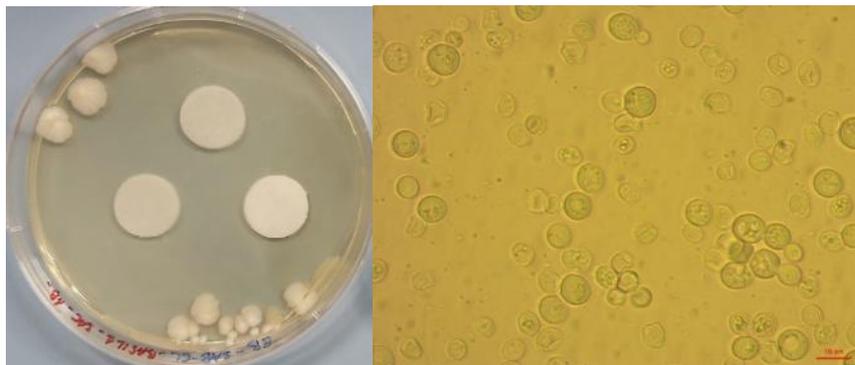


Figura 182: a) Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di basilico, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

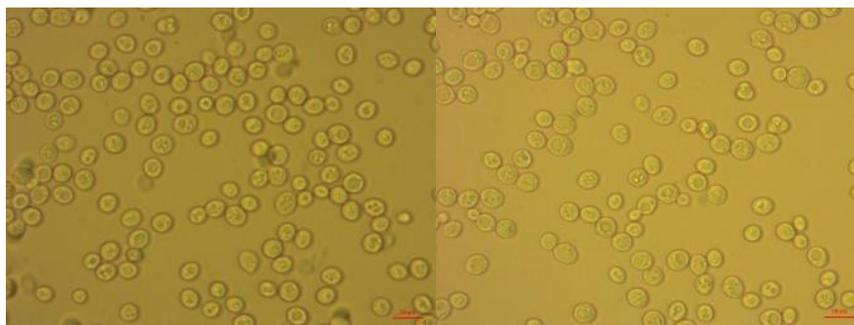


Figura 182 b) Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di basilico, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X.

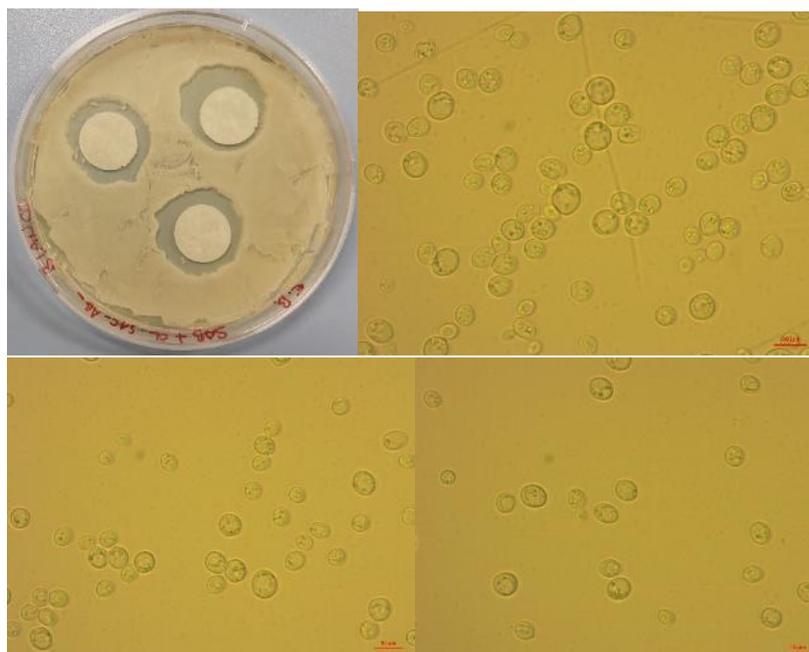


Figura 183: Cellule di *S. cerevisiae* del campione di controllo, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

3.3.4. OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO

Saccharomyces cerevisiae

Le cellule di lievito entrate in contatto con l'olio essenziale di bergamotto non presentano differenze morfologiche vistose rispetto a quelle di controllo [Fig.184. Per il confronto con le cellule di lievito del campione di controllo vedere Fig. 183]. Si è riscontrato, invece, come la riproduzione per gemmazione sia stata compromessa: sono presenti svariate cellule madri che non sono riuscite a separarsi dalle figlie, rimanendo così attaccate, forse per difficoltà nel processamento della parete o per problemi al citoscheletro nell'apporto di materiale di chiusura della cellula. Rispetto ai lieviti di confronto, il vacuolo della maggior parte delle cellule occupa buona parte del citoplasma cellulare. Questo potrebbe essere la conseguenza di uno stress osmotico subito dalla cellula.

Osservando la capsula Petri nel suo insieme, inoltre, appare evidente come le UFC di contorno all'alone di diffusione siano in numero esiguo; inoltre, una attenta osservazione sia di per sè che al microscopio stereoscopico mette in evidenza che un certo potere biocida si fa sentire anche più lontano, essendo evidenti colonie più piccole ma distanziate e riconoscibili come unità a sè stanti.

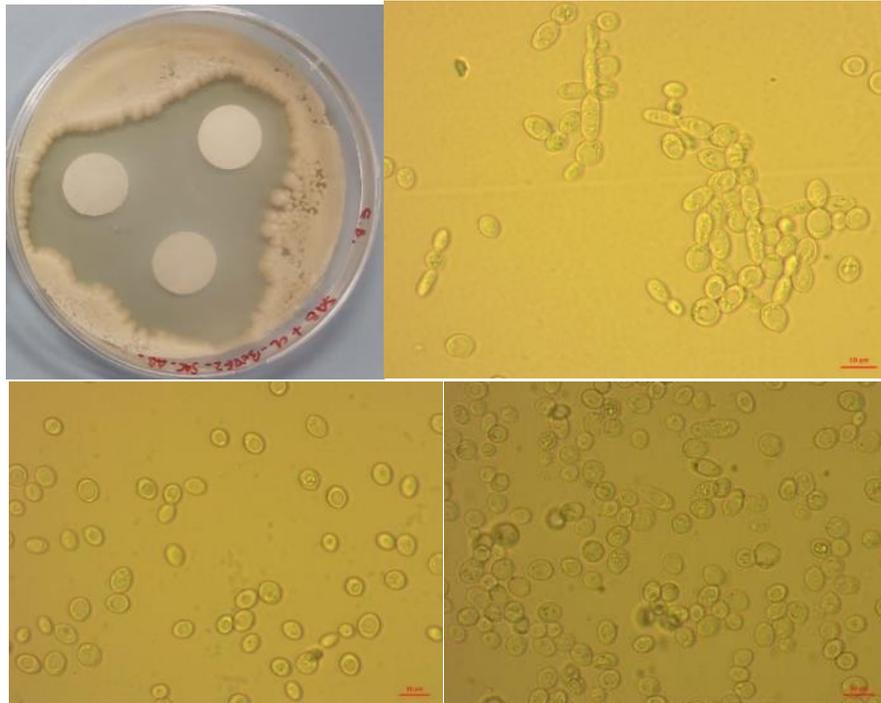


Figura 184: a) Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di bergamotto, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

3.3.5. OLIO ESSENZIALE DI LAVANDA

Saccharomyces cerevisiae

Le cellule di lievito entrate in contatto con l'olio essenziale di lavanda presentano, in parte, malformazioni cellulari, mostrandosi di forma tondeggiante, più che ovoide [Fig.185 e, per il confronto con le cellule di lievito del campione di controllo, Fig. 183].

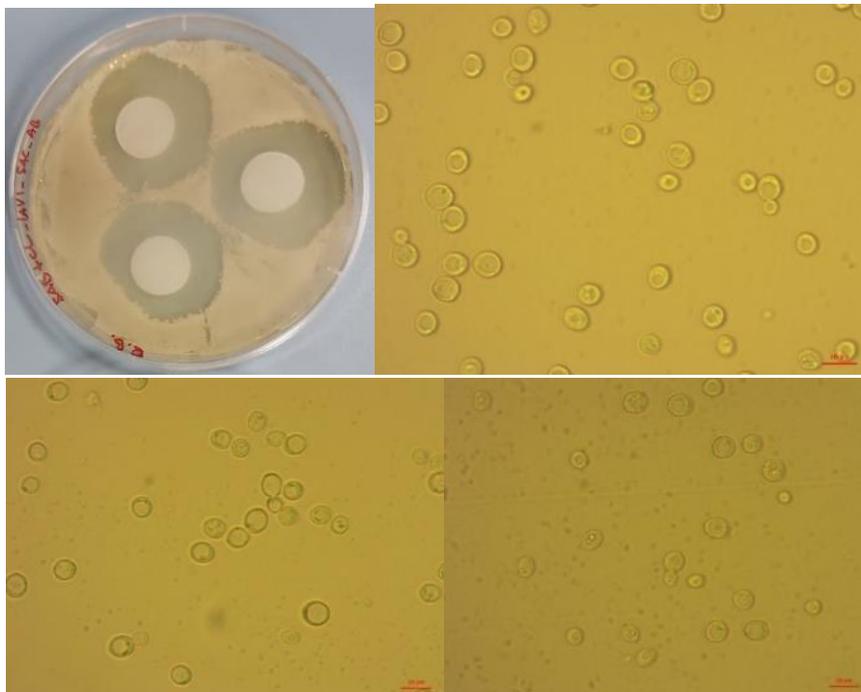


Figura 185: Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di lavanda, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

È possibile vedere come alcune cellule risultino accartocciate, con perimetri irregolari. Rispetto ai lieviti di confronto, il vacuolo della maggior parte delle cellule occupa buona parte del citoplasma cellulare. Questo potrebbe essere la conseguenza di uno stress osmotico subito dalla cellula.

3.3.6. OLIO ESSENZIALE DI MANDARINO

Saccharomyces cerevisiae

Le cellule di lievito entrate in contatto con l'olio essenziale di mandarino non presentano differenze morfologiche visibili con quelle del lievito di confronto [Fig.186 e, per il confronto con le cellule di lievito del campione di controllo, Fig. 183]. La crescita di UFC di lievito anche nel punto di confluenza dei tre aloni (virtualmente il più concentrato) fa affermare che tale olio essenziale non si prefigura come biocida naturale di elezione nei confronti del *Saccharomyces*.

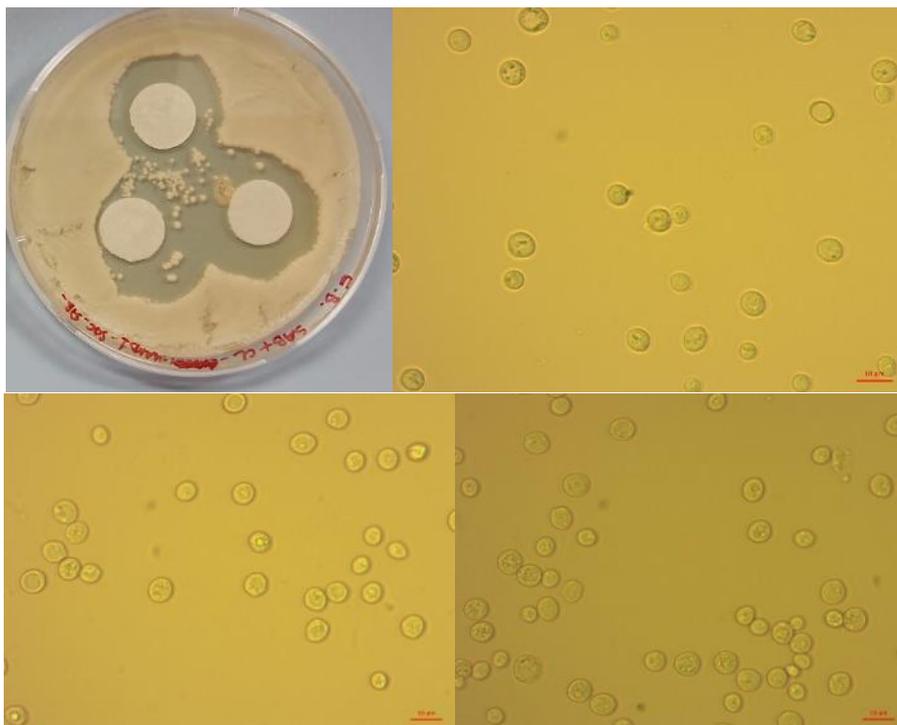


Figura 186: Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di mandarino, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

3.3.7. OLIO ESSENZIALE DI ROSMARINO

Saccharomyces cerevisiae

Le cellule di lievito entrate in contatto con l'olio essenziale di rosmarino non presentano differenze morfologiche visibili con quelle del lievito di confronto [Fig.187 e, per il confronto con le cellule di lievito del campione di controllo, Fig. 183]. Anche in questo caso, si assiste ad una certa qual crescita di UFC di lievito anche nel punto di confluenza dei tre aloni (virtualmente il più concentrato) e ciò fa affermare che tale olio essenziale non si prefigura come biocida naturale di elezione nei confronti del *Saccharomyces* pur avendo un alone molto netto e marcato di inibizione.

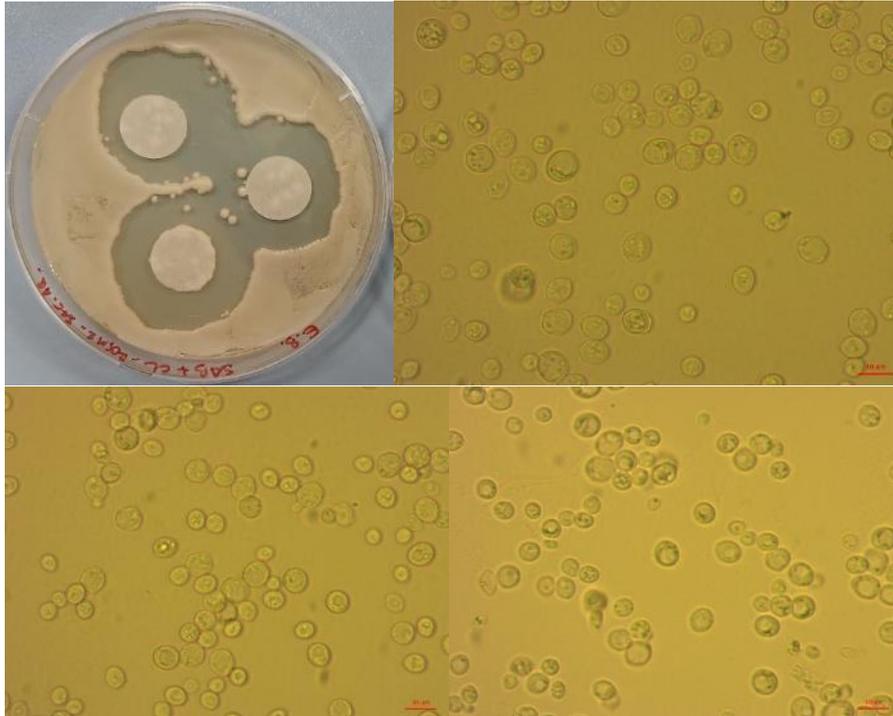


Figura 187: Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di rosmarino, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

3.3.8. OLIO ESSENZIALE DI TEA TREE

Saccharomyces cerevisiae

Le cellule di lievito entrate in contatto con l'olio essenziale di teatree non presentano differenze morfologiche visibili con quelle del lievito di confronto, a parte la parete cellulare che risulta meno spessa [Fig.188a, Fig.188b e, per il confronto con le cellule di lievito del campione di controllo, Fig. 183]. La crescita di UFC di lievito anche nel punto di confluenza dei tre aloni (virtualmente il più concentrato) farebbe affermare anche per questo olio una cattiva azione come biocida naturale di elezione nei confronti del *Saccharomyces*. D'altra parte, non si può non tenere in conto i risultati ottenuto dalle analisi al GC-MS che lo indentificano come un prodotto non affidabile.

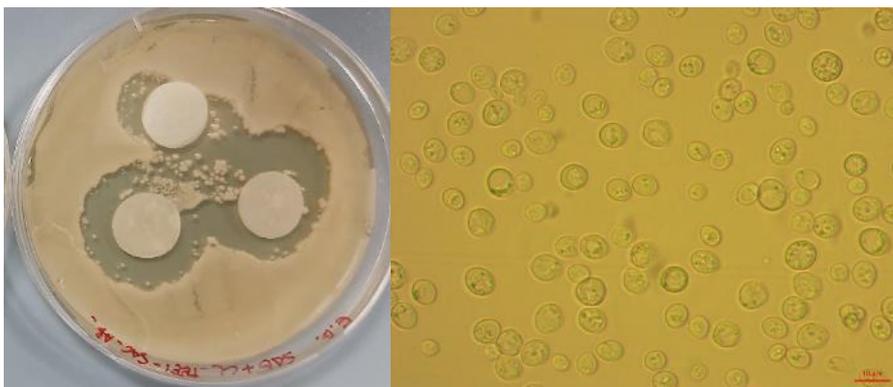


Figura 188: a) Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di tea tree, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

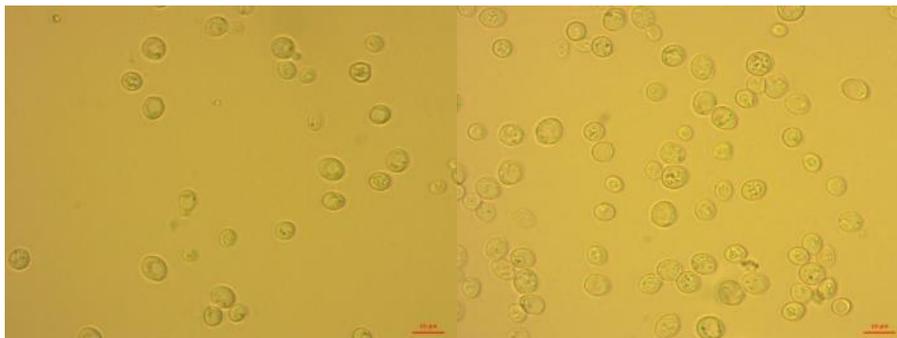


Figura 188: b) Cellule di *S. cerevisiae* in presenza di olio essenziale di tea tree, prelevate durante la sesta ricognizione (54° giorno). Ingrandimento 400X. In alto a sinistra: fotografia della piastra Petri da dove è stato prelevato il campione.

3.3.9 DISCUSSIONE GENERALE DELLE ANALISI MICROSCOPICHE

Come considerazione generale all’approccio microscopico fin qui riportato per evidenziare i potenziali effetti avversi degli oli essenziali su *S. cerevisiae*, risulta evidente che le cellule di lievito hanno mostrato evidenti malformazioni in quanto:

- a capacità di eseguire correttamente la riproduzione per gemmazione,
- a mantenere la forma *in toto*,
- a completare l’ispessimento parietale,
- a regolare il contenuto citoplasmatico di inclusioni e, non ultimo,
- a regolare grandezza e forma del vacuolo centrale.

È interessante (e significativo) sottolineare che tali malformazioni sono tanto più presenti microscopicamente dove è più evidente macroscopicamente una forma anomala delle colonie.

Nel concetto di UFC – Unità Formante Colonia – risiede infatti l’assunto che una singola cellula dia sviluppo moltiplicandosi (per gemmazione nel caso dei lieviti, quindi mantenendo il corredo genetico tra cellula madre e cellula figlia) ad una colonia di cellule sue simili. Pare quindi che l’olio essenziale, avendo effetto avverso nello sviluppo/moltiplicazione/apporto di materiale anabolico in prima istanza sulle singole cellule inoculate all’inizio del test, determini quindi lo sviluppo di unità formanti colonia che non sono nello status di normalità, portando perciò alla formazione di una colonia diversa da quelle del controllo.

3.4. DIFFUSIONE DELL'OLIO ESSENZIALE IN FASE VAPORE SUL BENE CULTURALE

Purtroppo, anche questa parte del lavoro di ricerca ha dovuto essere ridimensionata per le contingenze del periodo storico.

È stato possibile eseguire delle prove con olio essenziale di timo e di basilico, testati in fase di vapore in condizioni controllante e in ambiente chiuso [vedasi par. 2.7 per i dettagli della sperimentazione].

Sono stati inoculati con biodeteriogeni fungini (gli stessi di questo lavoro di ricerca) dei ritagli, di area superficiale simile, prelevati dal campione del Facsimile dell'opera di Caravaggio (eseguito dalla ditta Factum Arte, vedasi par. 2.1 per maggiori informazioni) secondo la colorazione del pigmento superficiale.

Tali ritagli sono stati oltretutto pretrattati con:

- trattamento spinto di irradiazione UV (tre mesi di insolazione al naturale e circa 30 ore sotto lampada UV)
- stropicciamenti del ritaglio stesso, così da ricreare forzatamente una simulazione di abrasione meccanica, tale da favorire il potenziale attaccamento di biodeteriogeni.

Una volta pronti, sono stati inoculati con prelievi circolari (di diametro 0,5 cm) di terreno agarizzato portante culture pure di Funghi (*Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium sp.*) e sono stati messi ad incubare a temperatura ambiente. Nel giro di poche settimane le colonie fungine si sono espanse a tutto il ritaglio con maggiore o minore velocità di crescita e di intensità a seconda della colorazione, del trattamento di abrasione e del trattamento UV, trovando nello stesso, nonostante tutto, un ottimo substrato di crescita [*N.B. dati non facenti parte di questo lavoro di tesi*].

Alcuni di questi ritagli del Facsimile, ben colonizzati da Funghi, sono stati quindi prelevati e utilizzati per essere inseriti nelle microcamere ermetiche ideate allo scopo, nelle quali è stato possibile ottenere un'atmosfera satura di vapore dell'olio essenziale [Fig. 189]

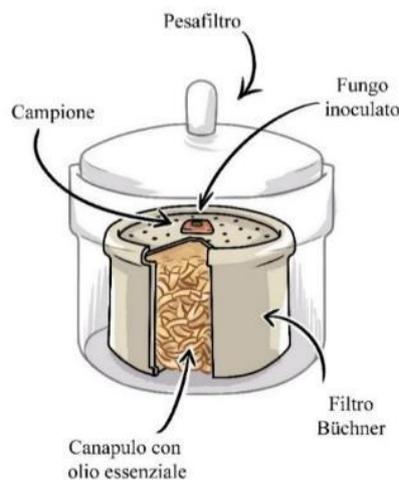


Figura 189: Schema del sistema attuato.

Anche se i dati ottenuti risultano parziali in quanto non è stato possibile eseguire esami microscopici del biodeteriogeno e di replica a diversa concentrazione di olio essenziale per la valutazione della MIC (minima concentrazione di inibizione), appare comunque evidente che in presenza dei vapori di timo la crescita degli inoculi dei Funghi è stata con chiarezza bloccata [Fig. 190]. Le muffe testate sono rimaste ad oggi in una condizione di quiescenza in quanto a sviluppo di nuove ife o di conidiofori, né è stata registrata una crescita volumetrica della/e colonia/e esistenti o passaggio a fase vegetativa di spore presenti sulla superficie del ritaglio.

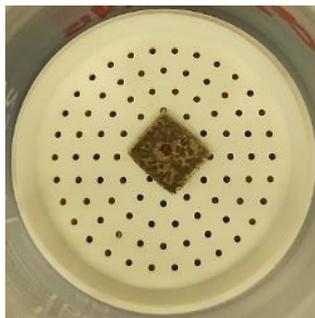


Figura 190: Campione con inoculo di *Penicillium sp.* in presenza di vapori di olio essenziale di timo.

I vapori di olio di basilico, invece, pare abbiano un'azione piuttosto altalenante, con periodi di inibizione della crescita alternati a fasi di ripresa, ma nel complesso mostrano una buona capacità di frenare lo sviluppo di nuove spore e di passaggio alla fase vegetativa.

In generale, quindi, i risultati di queste prove preliminari non contrastano per nulla con quanto ottenuto dalle prove *in vitro* discusse nei paragrafi precedenti, ma anzi ne confermano la validità pratica.

Seppur con la necessità di approfondimento e di valutazioni più quantitative, tali risultati si mostrano comunque molto incoraggianti per poter prendere in considerazione gli oli essenziali mirati come biocidi e/o biostatici nei confronti dell'azione di biodeteriogei anche in campo artistico.

4. CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti mediante GC-MS si può stabilire che:

- gli oli essenziali scelti per questo lavoro di ricerca sono composti da una miscela di molecole di derivazione terpenica a basso peso molecolare;
- la composizione chimica degli oli essenziali pur provenienti dalla stessa specie presenta un'elevata variabilità, sia in termini quantitativi (percentuali differenti degli stessi principi attivi), che qualitativi (presenza o assenza di principi attivi differenti), ovvero si conferma la necessità che sempre sia definito il chemotipo di appartenenza per avere poi prove confrontabili fra di loro. Paragonando i risultati ottenuti in questa ricerca con quelli presenti in altri studi, il range di variabilità più vasto è stato riscontrato nell'olio essenziale di basilico;
- la scelta della tecnica della gascromatografia associata alla spettrometria di massa si è dimostrata fondamentale per stabilire la qualità dell'olio essenziale che si andrà ad utilizzare,
 - ✓ stabilendo se le componenti rientrano nei parametri dettati dagli standard commerciali,
 - ✓ per scovare le adulterazioni più grossolane (in particolare nell'olio essenziale di tea tree analizzato, dove è stata riscontrata un'abbondante presenza di acido miristico),
 - ✓ per acquisire preziose informazioni sui processi di estrazione utilizzati ed eventualmente non specificati in etichetta (in particolare la presenza di etere di petrolio nell'olio essenziale di rosmarino, sia, in percentuali minori, di tea tree, riconducibile ad un processo di estrazione mediante solventi e non alla dichiarata distillazione in corrente di vapore).

In merito ai risultati ottenuti mediante i test *in vitro* di crescita fungina in presenza di olio essenziale, si può stabilire che:

- l'effetto antimicotico maggiore è stato riscontrato con l'olio essenziale di timo al chemotipo timolo, il quale ha inibito totalmente la crescita di ogni specie fungina per tutta la durata dell'analisi (99 giorni), seguito dall'olio essenziale di chiodi di garofano e quello di basilico;
- l'effetto antimicotico è riconducibile alla composizione chimica dei principi attivi principali che compongono la miscela dell'olio essenziale, in particolar modo i monoterpeni fenolici timolo ed eugenolo, il primo presente come componente principale nell'olio essenziale di timo, il secondo come componente principale dell'olio essenziale di chiodi di garofano e terziaria del basilico,
- l'effetto antimicotico di un olio essenziale risulta differente in base al Fungo su cui viene testato. Una maggiore resistenza è stata riscontrata nei campioni con *Penicillium sp.*

Per quanto riguarda i risultati ottenuti mediante il test *in vivo* di diffusione dell'olio essenziale di timo e di basilico in fase vapore sui campioni di dipinto contaminato, si può stabilire che:

- i vapori di olio essenziale di timo arrestano totalmente la propagazione delle specie fungine esaminate, mentre quelli di basilico ne rallentano la crescita, in conformità con i risultati ottenuti mediante i test *in vitro*;
- il metodo risulta efficace per mantenere una condizione controllata della crescita micotica sulla superficie del campione. Se opportunamente modificato per accogliere oggetti di dimensioni maggiori, il metodo potrebbe essere potenzialmente applicabile in ambito della conservazione dei Beni Culturali.

Sarebbe comunque opportuno valutare la possibilità di effettuare ulteriori analisi per una completa comprensione e valutazione dell'effetto antimicotico degli oli essenziali per una possibile applicazione in ambito dei Beni Culturali, tra cui:

- ripetere i test *in vitro* con oli essenziali di tea tree e rosmarino di brand commerciali differenti;
- effettuare i test *in vivo* a diverse concentrazioni, in modo da quantificare la MIC, non solo degli oli essenziali di timo e basilico, ma anche di quelli di chiodi di garofano, lavanda, bergamotto, mandarino, rosmarino e tea tree che, per problemi inerenti al periodo storico corrente, non è stato possibile eseguire;
- implementare i test di inoculo del micelio arrestato dall'azione della diffusione di olio essenziale in fase vapore sui campioni di dipinto, in modo da valutare se l'azione è stata di tipo biocida o biostatica;
- effettuare i test *in vitro* e *in vivo* con i soli principi attivi caratterizzanti gli oli essenziali utilizzati in questa ricerca: timolo, eugenolo, linalolo, terpinen-4-olo, limonene e 1-8-cineolo. Confrontando i valori di MIC ottenuti, si potrebbe stabilire se l'effetto antimicotico dei singoli principi attivi è paragonabile a quello della miscela dell'olio essenziale di provenienza. L'utilizzo del solo principio attivo potrebbe essere importante in ambito dei Beni Culturali, in quanto
 - ✓ può risolvere il problema dell'elevata variabilità compositiva degli oli essenziali che influisce pesantemente sulla riproducibilità e la ripetibilità di un metodo scientifico;
 - ✓ può portare ad una completa conoscenza della composizione chimica del prodotto, fondamentale in ambito della conservazione e del restauro;
- test di tipo colorimetrico e meccanico da applicare ai campioni di diversa provenienza (dipinti, materiali cartacei, ignei, plastici, etc...), prima e dopo il trattamento con gli oli essenziali o con i singoli principi attivi, per stabilire se i composti risultano sicuri per un possibile utilizzo su casi reali o se, invece, causano scolorimenti, ingiallimenti e/o degrado strutturale, in particolar modo per quanto riguarda le superfici preziose e potenzialmente delicate che sono caratteristica principale per la maggior parte dei Beni Culturali.

5. RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo lavoro di tesi, ci sono diversi ringraziamenti che vorrei esprimere alle persone che hanno contribuito al raggiungimento di questo importante traguardo.

In primis, i miei più sentiti ringraziamenti vanno alla mia relatrice, la Prof.ssa Sabrina Manente, che non ha mai smesso di sostenermi ed incoraggiarmi, soprattutto quando la pandemia mi ha precluso l'entrata nei laboratori e il mio morale era decisamente a terra; grazie per l'infinita disponibilità, pazienza ed entusiasmo.

Un sincero ringraziamento va, inoltre, ai co-relatori di questo lavoro di tesi: il Prof. Renzo Ganzerla e il Dr. Matteo Bertoldini, per la loro disponibilità e per il loro fondamentale aiuto con le analisi.

Un caloroso ringraziamento alla mia famiglia ed in particolare a mia mamma Paola, per il loro costante supporto ed affetto, che, fin dalla scuola materna, non ha mai mancato di accompagnarmi in tutti questi anni scolastici e accademici.

Un ringraziamento speciale ai miei fantastici amici per avermi sempre sostenuta ed in particolare a Giorgia che, anche nei momenti più bui, è riuscita a spronarmi a continuare.

Dopo tutti questi ringraziamenti meritatissimi, chi invece non posso assolutamente ringraziare è il Covid-19 e la conseguente pandemia mondiale, che mi ha impedito di frequentare, operare e portare a termine buona parte delle analisi di questa tesi. Anche se ce l'ha messa tutta per ostacolarci, ce l'ho fatta lo stesso! Urrà!

6. BIBLIOGRAFIA

- A.E. Aguilar-González, E. Palou e A. López-Malo, “*Antifungal activity of essential oils of clove (Syzygium aromaticum) and/or mustard (Brassica nigra) in vapor phase against gray mold (Botrytis cinerea) in strawberries*”, in *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 32, 181-185, 2015
- A. Ahmad, A. Khan, F. Akhtar, S. Yousuf, I. Xess, L.A. Khan e N. Manzoor, “*Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida*”, in *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 41-50, 2011
- A.F. Ahmed, F.A.K. Attia, Z. Liu, C. Li, J. Wei e W. Kang, “*Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (Ocimum basilicum L.) plants*”, in *Food Science and Human Wellness* 8, 299-305, 2019
- A.C. Aprotosoaic, M.Hăncianu, I.I. Costache e A. Miron, “*Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties*”, in *Flavour and Fragrance Journal* 29, 193-219, 2014
- J.K. Aronson, “*Meyler’s Side Effects of Drugs – The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions – 16th edition*”, Elsevier Inc., UK, 708 – 709, 2016
- J.M. Aronson, “*Cell Wall Chemistry, Ultrastructure and Metabolism*”, in *Biology of Conidial Fungi* Vol.2, Editori: G.T. Cole e B. Kendrick, Academic Press, 459-507, 1981
- R. Avila-Sosa, A.R. Navarro-Cruz, M.E. Sosa-Morales, A. López-Malo e E. Palou, “*Bergamot (Citrus bergamia) Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 247 – 252, 2016
- M. Bacanlı, A.A. Basaran e N. Basaran, “*Effect and Usage of a Citrus Compound, Limonene*”, in “*Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease (Second Edition)*, Elsevier Inc., 419-424, 2018
- F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck e M. Idaomar, “*Biological effects of essential oils – A review*”, in *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475, 2008
- S.K. Bardal, J.E. Waechter e D.S. Martin, “*Applied Pharmacology*”, Elsevier Inc., 2011
- I.H.N. Bassolé e H.R. Juliani, “*Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties*”, in *Molecules* 17, 3989-4006, 2012
- L.C. Becker, W.F. Bergfeld, D.V. Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, J.G. Marks Jr, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder e F.A. Anderson, “*Final Report of the Amended Safety Assessment of Myristic Acid and Its Salts and Ester sas Used in Cosmetics*”, in *International Journal of Toxicology* 29, Supplement 3, 162S-186S, 2010
- A. Ben Arfa, S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard e P. Chalier, “*Antibicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure*”, in *Letters in Applied Microbiology* 43, 149-154, 2006
- B. Bernhardt, L. Sipos, Z. Kókai, A. Gere, K. Szabò, J. Bernàth e Sz. Sàrosi, “*Comparison of different Ocimum basilicum L. gene bank accessions analyzed by GC-MS and sensory profile*”, in *Industrial Crops and Products* 67, 498-508, 2015
- M. Blackwell e J.W. Spatafora, “*Fungi and Their Allies*”, in *Biodiversity of Fungi – Inventory and Monitoring Methods*, Editore D. Cella, Elsevier Inc., 7-21, 2004
- I. Bonaccorsi, P. Dugo, A. Trozzi, A. Cotroneo e G. Dugo, “*Characterization of Mandarin (Citrus deliciosa Ten.) Essential Oil. Determination of Volatiles, Non-Volatiles, Physico-Chemical Indices and Enantiomeric Ratios*”, in *NPC – Natural Product Communicaions*, Vol.4, No.11, 1595-1600, 2009

- S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential application on food – review", in *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253, 2004
- K. Cal, "Aqueous Solubility of Liquid Monoterpenes at 293 K and Relationship with Calculated Log P Value", in *Yakugaku Zasshi* Vol.126, No.4, 307-309, 2006
- J.T. Callander e P.J. James, "Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Malaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*", in *Veterinary Parasitology* 184, 271-278, 2012
- A. Camporese, "Oli essenziali e malattie infettive. Terapia antimicrobica ragionata con gli oli essenziali", Tecniche Nuove, Milano, 1998
- N.N.R. Cardoso, C.S. Alviano, A.F. Blank, M.T.V. Romanos, B.B. Fonseca, S. Rozental, I.A. Rodrigues e D.A. Alviano, "Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. *Maria Bonita* and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis", in *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Hindawi Publishing Corporation, 2016
- C.F. Carson, K.A. Hammer e T.V. Riley, "Maleleuca alternifolia (Tea tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties", in *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.19, No.1, 50-62, 2006
- C.F. Carson e K.A. Hammer, "Chemistry and Bioactivity of Essential Oils", in "Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents", Editore H. Thormar, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 203-238, 2011
- H.J. Chang, H.J. Kim e H.S. Chun, "Quantitative structure – activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids", in *Life Sciences* 80, 835-841, 2007
- J. Chen, Q.D. Jiang, Y.P. Chai, H. Zhang, P. Peng e X.X. Yang, "Natural Terpene sas Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery", in *Molecules* 21, 1709, 2016
- F. Chidi, A. Bouhoudan e M. Khaddor, "Antifungal effect of the tea tree essential oil (*Malaleuca alternifolia*) against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum*", in *Journal of King Saud University – Science* 32, 2014 – 2045, 2020
- E. Chivandi, R. Dangarembizi, T.T. Nyakudya e K.H. Erlwanger, "Use of Essential Oils as a Preservative of Meat", in "Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety", Editore V.R. Preedy, Elsevier Inc., 85-91, 2016
- M. Chutia, P.D. Bhuyan, M.G. Pathak, T.C. Sarma e P. Boruah, "Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India", in *LWT – Food Science and Technology* 42, 777-780, 2009
- G.T. Cole e Y. Nozawa, "Dimorphism", in *Biology of Conidial Fungi* Vol.1, Editori: G.T. Cole e B. Kendrick, Academic Press, 97-133, 1981
- R. Costa, P. Dugo, M. Navarra, V. Raymo, G. Dugo e L. Mondello, "Study on the chemical composition variability of some processed bergamot (*Citrus bergamia*) essential oils", in *Flavour and Fragrance Journal* 25, 4-12, 2010
- S.D. Cox, J.E. Gustafson, C.M. Mann, J.L. Markham, Y.C. Liew, R.P. Hartland, H.C. Bell, J.R. Warmington e S.G. Wyllie, "Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*", in *Letters in Applied Microbiology* 26, 355-358, 1998
- H. Cui, C. Zhang, C. Li e L. Lin, "Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes*", in *Food Control* 94, 140-146, 2018

H. Curtis e N.S. Barnes, “*Invito alla biologia – quinta edizione*”, Vol.A, A cura di: L. Gandola e R. Odone, Zanichelli Editore S.p.a, Bologna, 2003

A.C. Da Rocha Neto, B.B. Navarro, L. Canton, M. Maraschin e R.M. Di Piero, “*Antifungal activity of palmarosa (Cymbopogon martinii), tea tree (Malaleuca alternifolia) and star anise (Illicium verum) essential oils against Penicillium expansum and their mechanism of action*”, in LWT – Food Science and Technology 105, 385 – 392, 2019

S. Da Silva Gündel, M.C. Belho, M.K. Diefenthaler, F.R. Favarin, P.M. Copetti, A. De Oliveira Forgaça, B. Klein, R. Wagner, A. Gündel, M.R. Sagrillo e A.F. Ourique, “*Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential*”, in Journal of Drug Delivery Science and Technology 46, 378 – 383, 2018

H.P. De Carvalho, N. Mesquita, J. Trovão, S.F. Rodríguez, A.C. Pinheiro, V. Gomes, A. Alcoforado, F. Gil e A. Portugal, “*Fungal contamination of paintings and wooden sculptures inside the storage room of a museum: Are current norms and reference values adequate?*”, in Journal of Cultural Heritage 34, 268 – 276, 2018

H.P. De Carvalho, S. Oliveira Sequeira, D. Pinho, J. Trovão, R.M.F. Da Costa, C. Egas, M.F. Macedo e A. Portugal, “*Combining an innovative non-invasive sampling method and highthroughput sequencing to characterize fungal communities on a canvas painting*”, in International Biodeterioration & Biodegradation 145, 104816, 2019

S. Delfine e G. Scippa, “*Tecnica colturale e resa di piante officinali*”, in Oli essenziali per la salute dell’uomo e la salvaguardia dell’ambiente, a cura di F. Mondello, A.M. Marella, M.G. Bellardi e M. Di Vito, Rapporti ISTISAN 15/6, Roma, 2015

K.S. De Lira Mota, F. De Oliveira Pereira, W.A. De Oliveira, I. Oliveira Lima e E. De Oliveira Lima, “*Antifungal Activity of Thymus vulgaris L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against Rhizopus oryzae: Interaction with Ergosterol*”, in Molecules 17, 14418-14433, 2012

M.I. De Oliveira Lima, A.C.A. De Medeiros, K.V.S. Silva, G.N. Cardoso, E. De Oliveira Lima, F. De Oliveira Pereira, “*Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolate of fluconazole resistant Trichophyton rubrum*”, in Journal de Mycologie Médicale 27, 195-202, 2017

K.P. Devi, S.A. Nisha, R. Sakthivel, S.K. Pandian, “*Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane*”, in Journal of Ethnopharmacology 130, 107-115, 2010

H.J.D. Dorman e S.G. Deans, “*Microbial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*”, in Journal of Applied Microbiology 88, 308-316, 2000

D. Dris, F. Tine-Djebbar, H. Bouabida e N. Soltani, “*Chemical composition and activity of an Ocimum basilicum essential oil on Culex pipiens larvae: Toxicological, biometrical and biochemical aspects*”, in South African Journal of Botany 113, 362-369, 2017

B.K. Ehlers e J. Thompson, “*Do co-occurring plant species adapt to one another? The response of Bromus erectus to the presence of different Thymus vulgaris chemotypes*”, in “Oecologia” 141, 511-518, 2004

Y. Elsayed e Y. Shabana, “*The effect of some essential oils on Aspergillus niger and Alternaria alternata infestation in archaeological oil paintings*”, in Mediterranean Archaeology and Archaeometry, Vol.18, No.3, 71-87, 2018

L.A.E. Erland e S.S. Mahmoud, “*Lavander (Lavandula angustifolia) Oils*”, in Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 501 – 508, 2016

- European Medicines Agency, “Assessment report on *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* Loefl. Ex. L., *aetheroleum*”, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2010
- European Medicines Agency, “Assessment report on *Lavandula angustifolia* Mill. *Aetheroleum* and *Lavandula angustifolia* Mill., *flos*”, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2011a
- European Medicines Agency, “Assessment report on *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry, *flos* and *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry, *floris aetheroleum*”, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2011b
- European Medicines Agency, “Assessment report on *Citrus bergamia* Risso et Poiteau, *aetheroleum*”, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), 2012
- M. Falkiewicz-Dulik, K. Janda e G. Wypych, “*Handbook of Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization 2nd Edition*”, ChemTec Publishing, Toronto, 2015
- M.R. Fidanza e G. Caneva, “*Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review*”, in *Journal of Cultural Heritage* 38, 271-286, 2019
- A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro e J.J.C. Scheffer, “*Physiological aspects of essential oil production*”, *Plant Sci.* 169(6), 1112–1117, 2005
- M.G. Fiorin, “*Microbiologia – Principi e Tecniche*”, Zanichelli editore S.p.a., Bologna, 1993
- F. Firenzuoli, “*Gli oli essenziali – Dai profumi all’aromaterapia*”, Tecniche Nuove, Milano, 2002
- C. Franz e J. Novak, “*Sources of Essential Oils*”, in “*Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*”, Editori K.H.C. Başer e G. Buchbauer, CRC Press – Taylor & Francis Group, 39-81, 2010
- P.M. Furneri, L. Mondello, G. Mandalari, D. Paolino, P. Dugo, A. Garozzo e G. Bisignano, “*In vitro antimycoplasmal activity of citrus bergamia essential oil and its major components*”, in *European Journal of Medicinal Chemistry* 52, 66-69, 2012
- F. Gallo, “*Il biodeterioramento dei libri e documenti*”, Centro di Studi per la Conservazione della Carta ICCROM, Roma, 1992
- T. Gao, H. Zhou, W. Zhou, L. Hu, J. Chen e Z. Shi, “*The Fungicidal Activity of Thymol against Fusarium graminearum via Inducing Lipid Peroxidation and Disruptin Ergosterol Biosynthesis*”, in *Molecules* 21, 770, 2016
- K.L. Garg, K.K. Jain e A.K. Mishra, “*Role of fungi in the deterioration of wall paintings*”, in *The Science of the Total Environment* 167, 255-271, 1995
- J. Garty, “*Influence of epilithic microorganisms on the surface temperature of building walls*”, in *Canadian Journal of Botany* Vol.68, N.6, 1349-1353, 2011
- S. Gatenby e P. Townley, “*Preliminary research into the use of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil) in museum conservation*”, in *Alccm Bulletin*, Editore: V. Daniel, Australia, 67-70, 2003
- M.G. Goñi, S.I. Roura, A.G. Ponce e M.R. Moreira, “*Clove (*Syzygium aromaticum*) Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 349 – 257, 2016
- A.A. Gorbushina, J. Heyrman, T. Dornieden, M. Gonzalez-Delvalle, W.E. Krumbein, L. Laiz, K. Petersen, C. Saiz-Jimenez e J. Swings, “*Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems*

- in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany)*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 53, 13-24, 2004
- S. Hacquard, “*The Genomics of Powdery Mildew Fungi: Past Achievements, Present Status and Future Prospects*”, in *Advances in Botanical Research*, Vol.70, Editori: J.P. Jacquot e P. Gadal, Elsevier Ltd., UK, 109-142, 2014
- C.N. Hassiotis, F. Ntana, D.M. Lazari, S. Poullos e K.E. Vlachonasios, “*Environmental and developmental factors affect essential oil production and quality of Lavandula angustifolia during flowering period*”, in *Industrial Crops and Products* 62, 359-366, 2014
- M.D. Hernández, J.A. Sotomayor, Á. Hernández e M.J. Jordán, “*Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 677 – 688, 2016
- F. Hossain, P. Follett, K.D. Vu, S. Salmieri, C. Senoussi e M. Lacroix, “*Radiosensitization of Aspergillus niger and Penicillium chrysogenum using basil essential oil and ionizing radiation for food decontamination*”, in *Food Control* 45, 156 – 152, 2014
- C.C. Hsu, W.L. Lai, K.C. Chuang, M.H. Lee e Y.C. Tsai, “*The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in Candida albicans*”, in *Medical Mycology* 51, 473-482, 2013
- M. Hudaib, E. Speroni, A.M. Di Pietra e V. Cavrini, “*GC/MS evaluation of thyme (Thymus vulgaris L.) oil composition and variations during the vegetative cycle*”, in *Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis* 29, 691-700, 2002
- F. Hui, X.F. Tu, K. Thakur, F. Hu, X.L. Li, Y.S. Zhang, J.G. Zhang e Z.J. Wei, “*Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi*”, in *Food and Chemical Toxicology* 134, 110821, 2019
- M. Hyldgaard, T. Mygind e R.L. Meyer, “*Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components*”, in *Frontiers in Microbiology*, Vol.3, No.12, 1-24, 2012
- S. Javed, A. Javaid, S. Nawaz, M.K. Saeed, Z. Mahmood, S.Z. Siddiqui e R. Ahmad, “*Phytochemistry, GC-MS Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Potential of Essential Oil From Five Citrus Species*”, in *Journal of Agricultural Science* 6, 2014
- M.A. Kakakhel, F. Wu, J.D. Gu, H. Feng, K. Shah e W. Wang, “*Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 143, 104721, 2019
- D. Kalembe e A. Kunicka, “*Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils*”, in *Current Medicinal Chemistry* Vol.10, No. 10, 813-829, 2003
- N. Kimura e T. Tsuge, “*Gene Cluster Involved in Melanin Biosynthesis of the Filamentous Fungus Alternaria alternata*”, in *Journal of Bacteriology*, Vol.175, No.14, 4427-4435, 1993
- G.M. Kamal, F. Anwar, A.I. Hussain, N. Sarri e M.Y. Ashraf, “*Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels*”, in *International Food Research Journal*, Vol.18, No.4, 1275-1282, 2011
- C.J. Lee, L.W. Chen, L.G. Chen, T.L. Chang, C.W. Huang, M.C. Huang e C.C. Wang, “*Correlation of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation*”, in *Journal of food and drug analysis* 21, 169-176, 2013

- Q.X. Li e C.L. Chang, “*Basil (Ocimum basilicum L.) Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 231 – 238, 2016
- C.A. Lipinski, “*Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*”, in *Drug Discovery Today: Technologies*, Vol.1, No.4, 337-341, 2004
- J.D. Maia, R. La Corte, J. Martinez, J. Ubbink e A.S. Prata, “*Improved activity of thyme essential oil (Thymus vulgaris) against Aedes aegypti larvae using a biodegradable controlled release system*”, in *Industrial Crops & Products* 136, 110-120, 2019
- S. Mandal e M. debMandal, “*Tangerine (Citrus reticulata L. var.) Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 803 – 811, 2016a
- S. Mandal e M. debMandal, “*Thyme (Thymus vulgaris L.) Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 825 – 834, 2016b
- S. Manente, “*Principi di microbiologia: i Funghi*”, slides di lezione, corso di Microbiologia applicata al Restauro per il Corso di laurea triennale in Tecnologie per la Conservazione ed il Restauro, Ca’ Foscari, Venezia, A.A. 2018-2019
- K. Matusiak, W. Machnowski, H. Wrzosek, J. Polak, K. Rajkowska, K. Śmigielski, A. Kunicka-Styczyńska e B. Gutarowska, “*Application of Cinnamomum zeylanicum essential oil in vapour phase for heritage textiles disinfection*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 131, 88-96, 2018
- G. McDonnell e A. Denver Russel, “*Antiseptic and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance*”, in *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147-179, 1999
- N. Mesquita, A. Portugal, S. Videira, S. Rodríguez-Echeverría, A.M.L. Bandeira, M.J.A. Santos e H. Freitas, “*Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 626-629, 2009
- A. Michaelsen, F. Pinzari, K. Ripka, W. Lubitz e G. Piñar, “*Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 58, 133-141, 2006
- M. Michelozzi, “*Ruoli ecofisiologici di oli essenziali e variabilità nella composizione chimica: caratterizzazione di chemotipi di pregio per l’industria agro-alimentare e la difesa ecosostenibile delle piante*”, in “*Oli essenziali per la salute dell’uomo e la salvaguardia dell’ambiente*”, a cura di F. Mondello, A.M. Marella, M.G. Bellardi e M. Di Vito, Rapporti ISTISAN 15/6, Roma, 27-30, 2015
- N.P. Money, “*Fungal Diversity*”, in *The Fungi 3rd Edition*, Elsevier Inc., UK, 1-36, 2016a
- N.P. Money, “*Fungal Cell Biology and Development*”, in *The Fungi 3rd Edition*, Elsevier Inc., UK, 37-68, 2016b
- N.P. Money, “*Spore Production, Discharge, Dispersal*”, in *The Fungi 3rd Edition*, Elsevier Inc., UK, 67-97, 2016c
- I. Morelli, G. Flamini e L. Pistelli, “*Manuale dell’erborista – Biosintesi, estrazione e identificazione delle sostanze di origine vegetale*”, Tecniche Nuove, Milano, 2005
- R.R. Mouriño-Pérez, “*Septum development in filamentous ascomycetes*”, in *Fungal Biology Reviews* 27, 1 – 19, 2013
- B. Nabiha, E.O. Abdelfatteh, K. Faten, C. Hervé e C.M. Moncef, “*Chemical Composition of Bergamot (Citrus bergamia Risso) Essential Oil Obtained by Hydrodistillation*”, in *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 4, serial n.29, 60-62, 2010

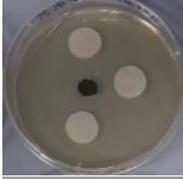
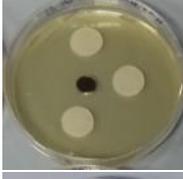
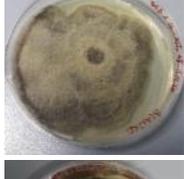
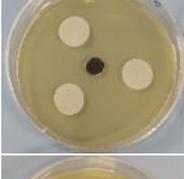
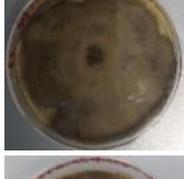
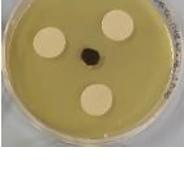
- E.M. Napoli, G. Curcuruto e G. Ruberto, “*Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary*”, in *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 659-670, 2010
- H. Nawaz, M.A. Hanif, M.A. Ayub, F. Ishtiaq, N. Kanwal, N. Rashid, M. Saleem e M. Ahmad, “*Raman spectroscopy for the evaluation of the effects of different concentrations of Copper on the chemical composition and biological activity of basil essential oil*”, in *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 185, 130-138, 2017
- R. Ogórek, A. Lejman, W. Pusz, A. Miłuch e P. Miodyńska, “*Characteristics and taxonomy of Cladosporium fungi*”, in *Mikologia Lekarska*, Vol.19, No.2, 2012
- J. Onken e R.G. Berger, “*Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete Pleurotus sapidus*”, in *Journal of Biotechnology* 69, 163-168, 1999
- S.O. Oyedemi, A.I. Okoh, L.V. Mabinaya, G. Pirochenva e A.J. Afolayan, “*The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris and Escherichia coli*”, in *African Journal of Biotechnology*, Vol.8, No. 7, 1280-1286, 2009
- Y. Ozogul, I. Yuvka, Y. Ucar, M. Dormus, A.R. Kösker, M. Öz e F. Ozogul, “*Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets during ice storage*”, in *Food Science and Technology* 75, 677-684, 2017
- D. Pangallo, L. Kravová, K. Chovanová, A. Šimonovičová, F. De Leo e C. Urzi, “*Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays*”, in *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012
- A. Patriarca, G. Vaamonde e V.F. Pinto, “*Alternaria*”, in *Encyclopedia of Food Microbiology* 2nd Edition, Vol.1, Editori: C.A. Batt e M.L. Tortorello, Elsevier Ltd, 54-60, 2014
- A. Pavić, T. Ilić-Tomić, A. Pačevski, T. Nedeljković, B. Vasiljević e I. Morić, “*Diversity and biodeteriorative potential of bacterial isolates form deteriorated modern combined-technique canvas painting*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 97, 40-50, 2015
- I. Pereira, P. Severino, A.C. Santos, A.M. Silva e E.B. Souto, “*Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems*”, in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 171, 566-578, 2018
- K. Pietrzak, A. Otlewska, D. Danielewicz, K. Dybka, D. Pangallo, L. Kraková, A. Puškárová, M. Bučková, V. Scholtz, M. Ďurovič, B. Surma-Ślusarska, K. Demnerová e B. Gutarowska, “*Disinfection of archival documents using thyme essential oil, silver nanoparticles misting and low temperature plasma*”, in *Journal of Cultural Heritage* 24, 69-77, 2017
- A.C. Pinheiro, B.P. Oliveira, C. Verissimo, J.C. Brandão, L. Rosado, V. Jurado e M.F. Macedo, “*Identification of a fungal community of gilded wood carved heritage*”, in *Journal of Cultural Heritage* 14, 76 – 81, 2013
- D. Pinna, M. Galeotti, B. Perito, G. Daly e B. Salvadori, “*In situ long-term monitoring of recolonization by fungi and lichens after innovative and traditional conservative treatments of archaeological stones in Fiesole (Italy)*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 132, 49 – 58, 2018
- A. Plata-Rueda, J.M. Campos, G. da Silva Rolim, L.C. Martínez, M.H. Dos Santos, F.L. Fernandes, J.E. Serrão e J.C. Zanuncio, “*Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic*

- effects and behavior repellency response on granary weevil, Sitophilus granarius*”, in *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156, 263-270, 2018
- M. Radünz, M.L.M. da Trindade, T.M. Camargo, A.L. Radünz, C.D. Borges, E.A. Gandra e E. Helbig, “*Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (Syzygium aromaticum, L.) essential oil*”, in *Food Chemistry* 276, 180-186, 2019
- R.A. Raguso, “*More lessons from linalool: insight gained from a ubiquitous floral volatile*”, in *Current Opinion in Plant Biology* 32, 31-36, 2016
- M.S. Rakotonirainy e B. Lavédrine, “*Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 55, 141-147, 2005
- I. Rasooli e P. Owlia, “*Chemoprevention by thyme oils of Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin production*”, in *Phytochemistry* 66, 2851-2856, 2005
- R.F. Reis, A. De Goes, S.N. Mondal, T. Shilts, F.C. Brentu e L.W. Timmer, “*Effect of Lesion Age, Humidity, and Fungicide Application on Sporulation of Alternaria alternata, the Cause of Brown Spot of Tangerine*”, in *Plant Disease*, Vol.90, No.8, 1051-1054, 2006
- F. Reyes-Jurado, T. Cervantes-Rincón, H. Bach, A. Lòpez-Malo e E. Palou, “*Antimicrobial activity of Mexican oregano (Lippia berlandieri), thyme (Thymus vulgaris), and mustard (Brassica nigra) essential oils in gaseous phase*”, in *Industrial Crops & Products* 131, 90 – 95, 2019
- R. Ribeiro-Santos, M. Andrade, N.R de Melo, F. R. dos Santos, I.D.A. Neves, M.G. De Carvalho e A. Sanches-Silva, “*Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging*”, in *Industrial Crops and Productis* 97, 201-210, 2017
- P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche e A. Lonvaud, “*Trattato di Enologia – Microbiologia del vino Vinificazioni Vol.1 – Quinta edizione italiana*”, A cura di: A. Bosso, M.C. Cravero, E.G. Moruno e M. Ubigli, Edagricole, Milano, 2017
- P.R. Rich, “*Chemiosmotic Theory*”, in *Bioenergetics*, Elsevier Inc., 467-472, 2013
- T. Rosado, M. Silva, L. Dias, A. Candeias, M. Gil, J. Mirão, J. Pestana e A. T. Caldeira, “*Microorganisms and the integrated conservation-intervention process of the renaissance mural paintings from Casas Pintadas in Évora – Know to act, act to preserve*”, in *Journal of King Saud University – Science* 29, 478-486, 2017
- D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti e G. Bisignano, “*Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes*”, in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.49, No.6, 2474-2478, 2005
- W. Sand, “*Microbial Mechanisms of Deterioration of Inorganic Substrates – A General Mechanistic Overview*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol.40, No. 2-4, 183-190, 1997
- M. Sapper, P. Wilcaso, M.P. Santamarina, J. Rosellò e A. Chiralt, “*Antifungal and functional properties of starch-gellan films containing thyme (Thymus zygis) essential oil*”, in *Food Control* 92, 505 – 515, 2018
- M. Sawamura, Y. Onishi, J. Ikemoto, N.T.M. Tu e N.T.L. Phi, “*Characteristic odour components of bergamot (Citrus bergamia Risso) essential oil*”, in *Flavour and Fragrance Journal* 21, 609-615, 2006
- C. Sell, “*Chemistry of Essential Oils*”, in “*Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*”, Editori K.H.C. Başer e G. Buchbauer, CRC Press – Taylor & Francis Group, 121-150, 2010

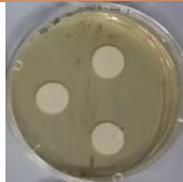
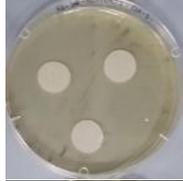
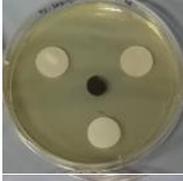
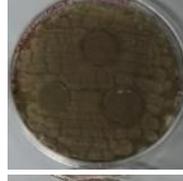
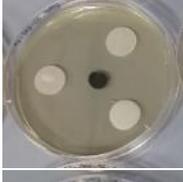
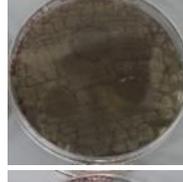
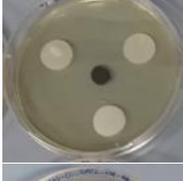
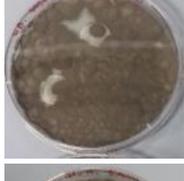
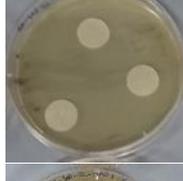
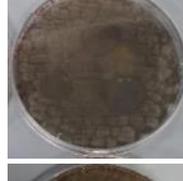
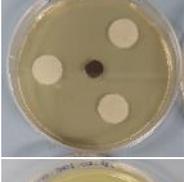
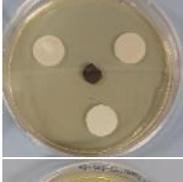
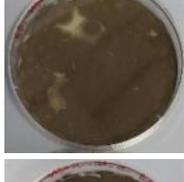
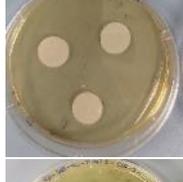
- E. Schmidt, “*Production of Essential Oils*”, in “*Handbook of Essential Oils – Science, Technology and Applications*”, Editori K.H.C. Başer e G. Buchbauer, CRC Press – Taylor & Francis Group, 83-119, 2010
- J. Sikkema, J.A.M. De Bont e B. Poolman, “*Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons*”, in *Microbiological Reviews*, Vol.59, No.2, 201-222, 1995
- J.E. Smith, J.G. Anderson, S.G. Deans e D.R. Berry, “*Biochemistry of Microcycle Conidiation*”, in *Biology of Conidial Fungi Vol.2*, Editori: G.T. Cole e B. Kendrick, Academic Press, 329-356, 1981
- A.C. Stratakos e A. Koidis, “*Methods for Extracting Essential Oils*”, in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Editore: V.R. Preedy, Elsevier Inc., UK, 31-38, 2016
- M. Stupar, M.Lj. Grbić, A. Džamić, N. Unković, M. Ristić, A. Jelikić e J. Vukojević, “*Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects*”, in *South Africa Journal of Botany* 93, 118-124, 2014
- A. Ultee, M.H.J. Bennik e R. Moezelaar, “*The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus*”, in *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.68, No.4, 1561-1568, 2002
- M. Valussi, “*Il grande manuale dell’aromaterapia. Fondamenti di scienza degli oli essenziali*”, Tecniche Nuove, Milano, 2005
- A. Vasanthakumar, A. DeAraujo, J. Mazurek, M. Schilling e R. Mitchell, “*Microbiological survey for analysis of the brown spots on the walls of the tomb of King Tutankhamun*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 79, 56-63, 2013
- A.J. Vieira, F.P. Beserra, M.C. Souza, B.M. Totti e A.L. Rozza, “*Limonene: Aroma of innovation in healt and disease*”, in *Chemico-Biological Interactions* 283, 97-106, 2018
- I. Vivar, S. Borrego, G. Ellis, D.A. Moreno e A.M. Garcia, “*Fungal biodeterioration of color cinematographic films of the cultural heritage of Cuba*”, in *Interantional Biodeterioration & Biodegradation* 84, 372 – 380, 2013
- J. Walentowska e J. Foksowicz-Flaczyk, “*Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles*”, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 407-411, 2013
- J. Xu, F. Zhou, B.P. Ji, R.S. Pei e N. Xu, “*The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli*”, in *Letters in Applied Microbiology* 47, 174-179, 2008
- J.G. Xu, T. Liu, Q.P. Hu e X.M. Cao, “*Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against Staphylococcus aureus*”, in *Molecules* 21, 1194, 2016
- M. Zabka e R. Pavela, “*Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxicogenic filamentous fungi*”, in *Chemosphere* 93, 1051-1056, 2013
- M. Zabka, R. Pavela e E. Prokinova, “*Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aereoallergenic fungi*”, in *Chemosphere* 112, 443-448, 2014
- J.C. Zak e M.R. Willing, “*Fungal Biodiversity Patterns*”, in *Advances in Botanical Research*, Vol.70, Editori: J.P. Jacquot e P. Gadal, Elsevier Ltd., UK, 59-75, 2014
- X. Zhang, H. Gao, L. Zhang, D. Liu e X. Ye, “*Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition*”, in *Industrial Crops and Products* 39, 162-169, 2012

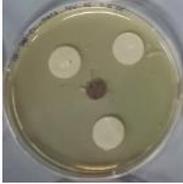
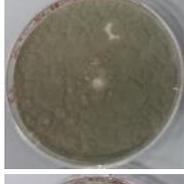
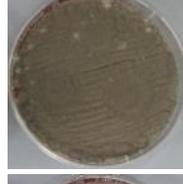
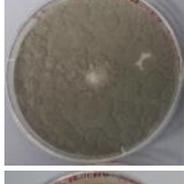
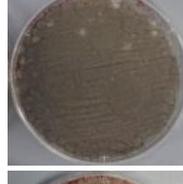
7. ALLEGATI

ALLEGATO 7.1. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di timo

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_TIMO1_ALT_AB	EB_SAB-CL_TIMO2_ALT_AB	EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_TIMO1_ALT_S	EB_SAB-CL_TIMO2_ALT_S	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

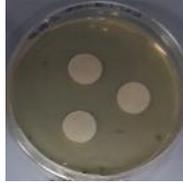
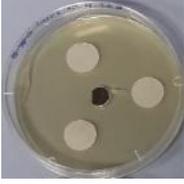
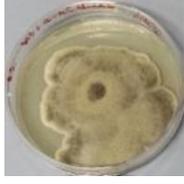
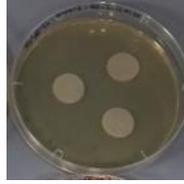
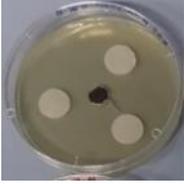
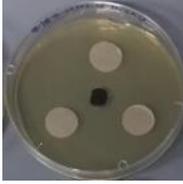
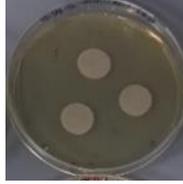
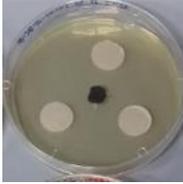
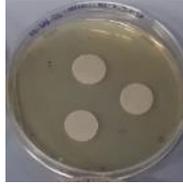
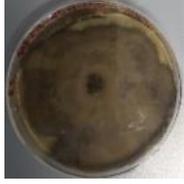
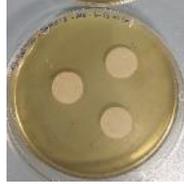
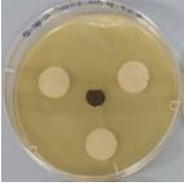
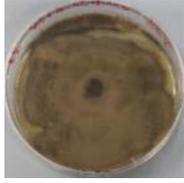
Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_TIMO1_CLA_ AB	EB_SAB- CL_TIMO2_CLA_ AB	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_TIMO1_CLA_S	EB_SAB- CL_TIMO2_CLA_S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

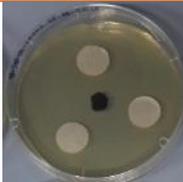
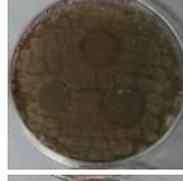
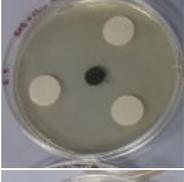
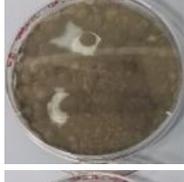
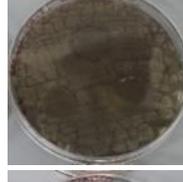
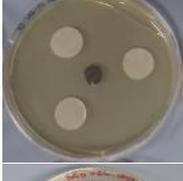
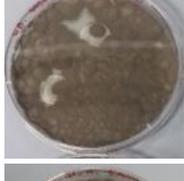
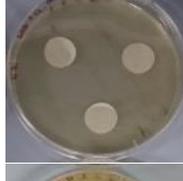
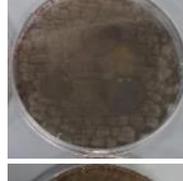
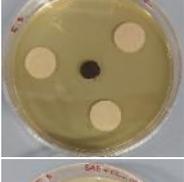
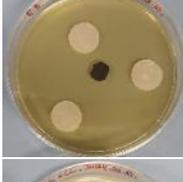
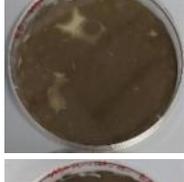
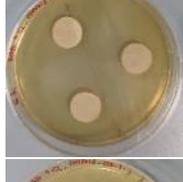
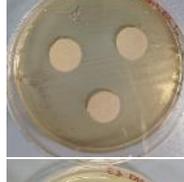
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_TIMO1_PEN_AB	EB_SAB-CL_TIMO2_PEN_AB	EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_TIMO1_PEN_S	EB_SAB-CL_TIMO2_PEN_S	EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

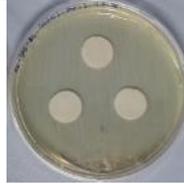
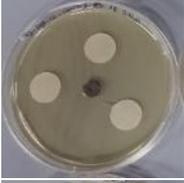
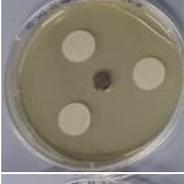
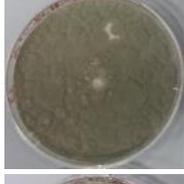
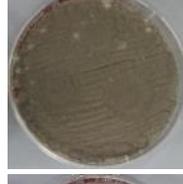
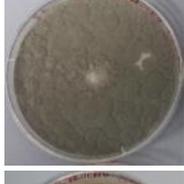
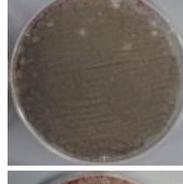
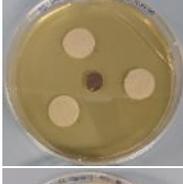
Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_TIMO1_SAC_S	EB_SAB- CL_TIMO2_SAC_S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

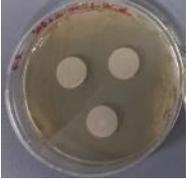
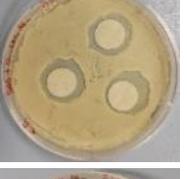
ALLEGATO 7.2. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di chiodi di garofano

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_CHIODI1_ALT_AB	EB_SAB-CL_CHIODI2_ALT_AB	EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_CHIODI1_ALT_S	EB_SAB-CL_CHIODI2_ALT_S	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

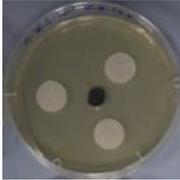
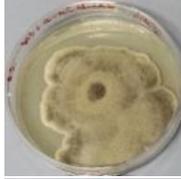
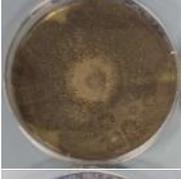
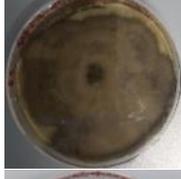
Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_CHIODI1_CLA _AB	EB_SAB- CL_CHIODI2_CLA _AB	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_CHIODI1_CLA _S	EB_SAB- CL_CHIODI2_CLA _S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

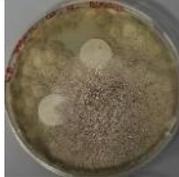
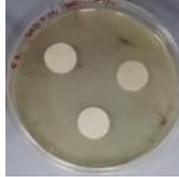
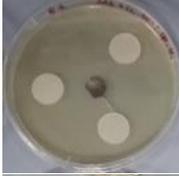
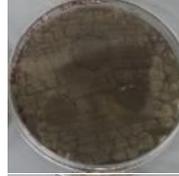
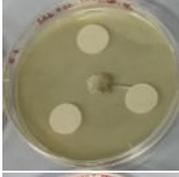
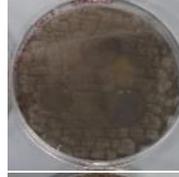
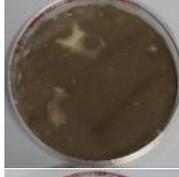
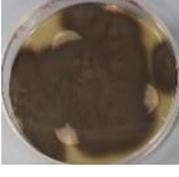
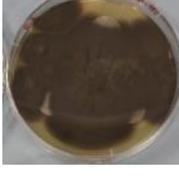
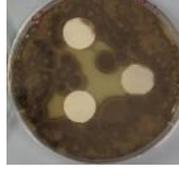
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_CHIODI1_PEN_AB	EB_SAB-CL_CHIODI2_PEN_AB	EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_CHIODI1_PEN_S	EB_SAB-CL_CHIODI2_PEN_S	EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

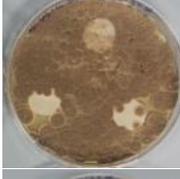
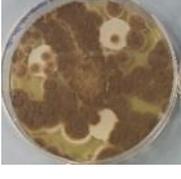
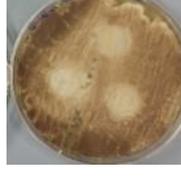
Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_CHIODI1_SAC _S	EB_SAB- CL_CHIODI2_SAC _S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

ALLEGATO 7.3. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di basilico

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_BASIL1_ALT_ AB	EB_SAB- CL_BASIL2_ALT_ AB	EB_SAB-CL_ ALT_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_BASIL1_ALT_ S	EB_SAB- CL_BASIL2_ALT_ S	EB_SAB-CL_ ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

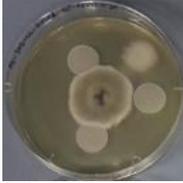
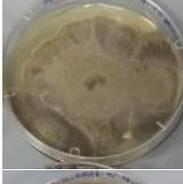
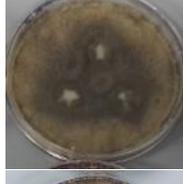
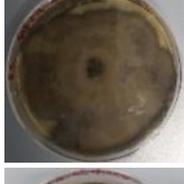
Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_BASIL1_CLA_ AB	EB_SAB- CL_BASIL2_CLA_ AB	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_BASIL1_CLA_ S	EB_SAB- CL_BASIL2_CLA_ S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

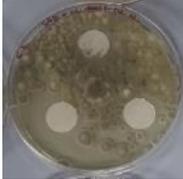
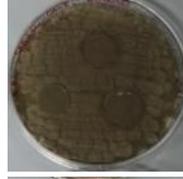
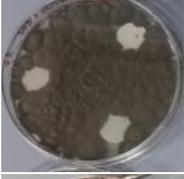
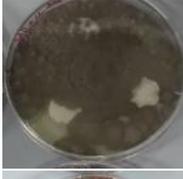
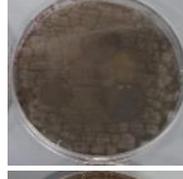
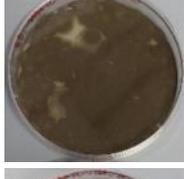
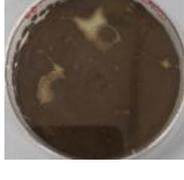
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_AB	EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_AB	EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_BASIL1_PEN_S	EB_SAB-CL_BASIL2_PEN_S	EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

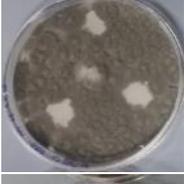
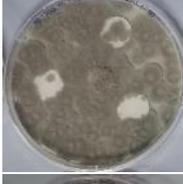
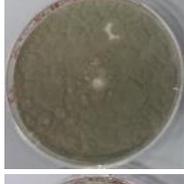
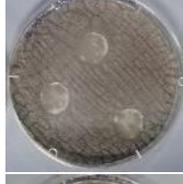
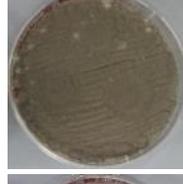
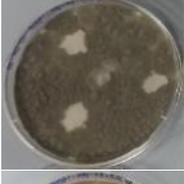
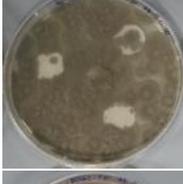
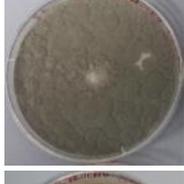
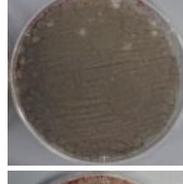
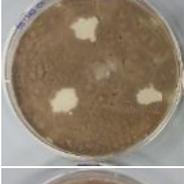
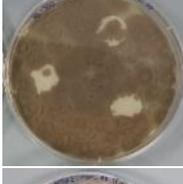
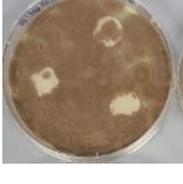
Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_BASIL1_SAC_ S	EB_SAB- CL_BASIL2_SAC_ S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

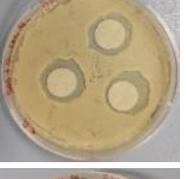
ALLEGATO 7.4. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di bergamotto

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_BERG1_ALT_AB	EB_SAB-CL_BERG2_ALT_AB	EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_BERG1_ALT_S	EB_SAB-CL_BERG2_ALT_S	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_BERG1_CLA_ AB	EB_SAB- CL_BERG2_CLA_ AB	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_BERG1_CLA_ S	EB_SAB- CL_BERG2_CLA_ S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

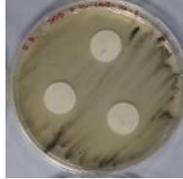
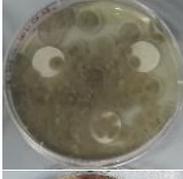
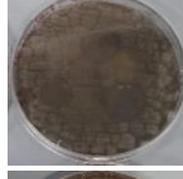
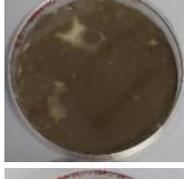
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_BERG1_PEN_AB	EB_SAB-CL_BERG2_PEN_AB	EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_BERG1_PEN_S	EB_SAB-CL_BERG2_PEN_S	EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

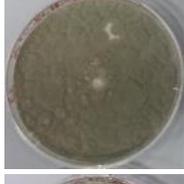
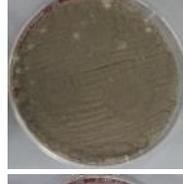
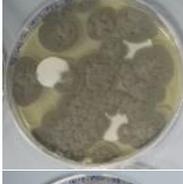
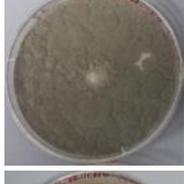
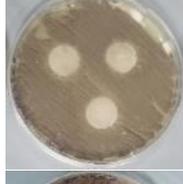
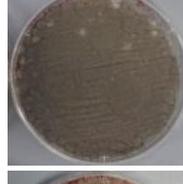
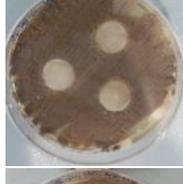
Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_BERG1_SAC_ S	EB_SAB- CL_BERG2_SAC_ S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

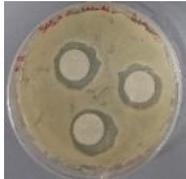
ALLEGATO 7.5. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di lavanda

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_LAV1_ALT_A B	EB_SAB-CL_LAV2_ALT_A B	EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_LAV1_ALT_S	EB_SAB-CL_LAV2_ALT_S	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

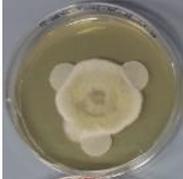
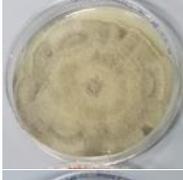
Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_LAV1_CLA_A B	EB_SAB- CL_LAV2_CLA_A B	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_LAV1_CLA_S	EB_SAB- CL_LAV2_CLA_S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

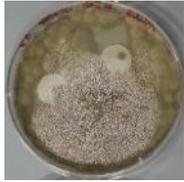
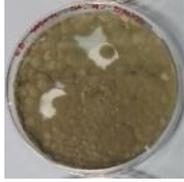
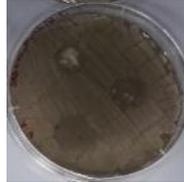
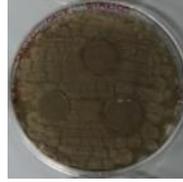
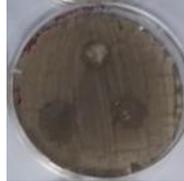
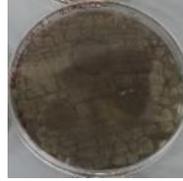
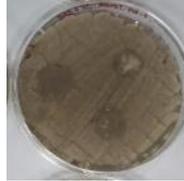
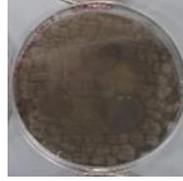
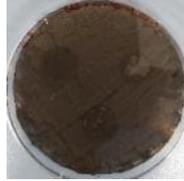
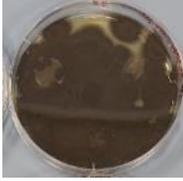
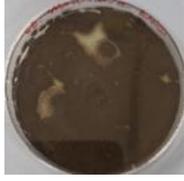
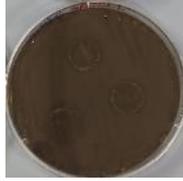
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_LAV1_PEN_A B	EB_SAB-CL_LAV2_PEN_A B	EB_SAB-CL_PEN_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_LAV1_PEN_S	EB_SAB-CL_LAV2_PEN_S	EB_SAB-CL_PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

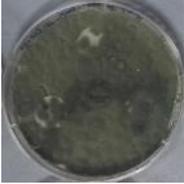
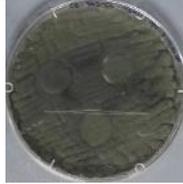
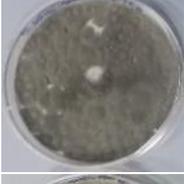
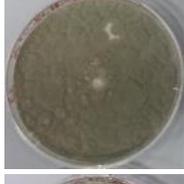
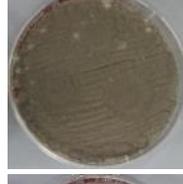
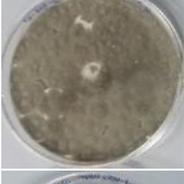
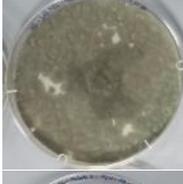
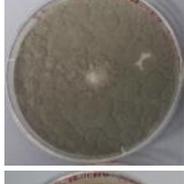
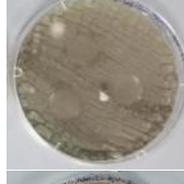
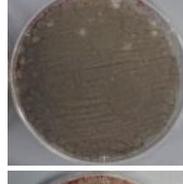
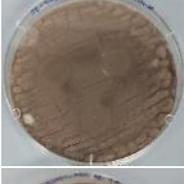
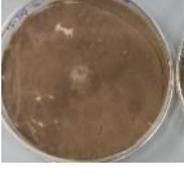
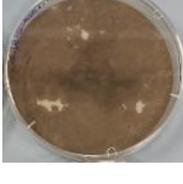
Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_LAV1_SAC_S	EB_SAB- CL_LAV2_SAC_S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

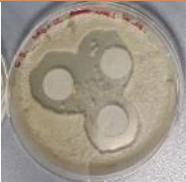
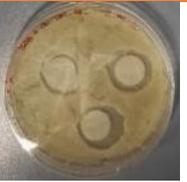
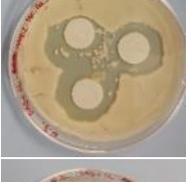
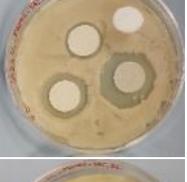
ALLEGATO 7.6. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di mandarino

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_MAND1_ALT_ AB	EB_SAB- CL_MAND2_ALT_ AB	EB_SAB-CL_ ALT_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_MAND1_ALT_ S	EB_SAB- CL_MAND2_ALT_ S	EB_SAB-CL_ ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

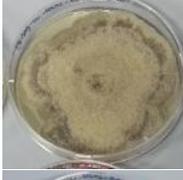
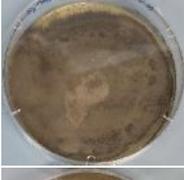
Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_MAND1_CLA_ AB	EB_SAB- CL_MAND2_CLA_ AB	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_MAND1_CLA_ S	EB_SAB- CL_MAND2_CLA_ S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

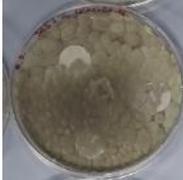
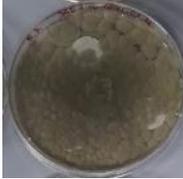
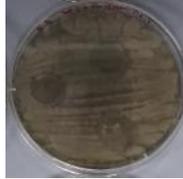
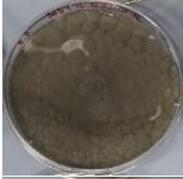
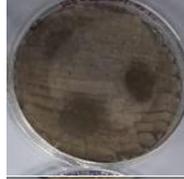
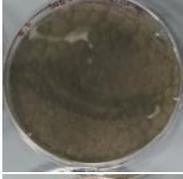
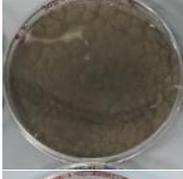
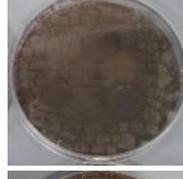
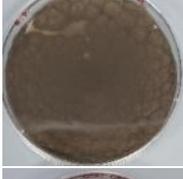
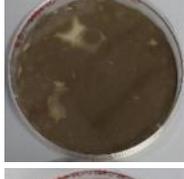
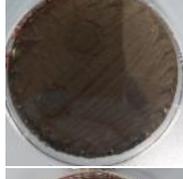
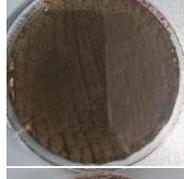
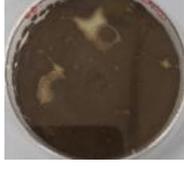
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_MAND1_PEN_ AB	EB_SAB- CL_MAND2_PEN_ AB	EB_SAB-CL_ PEN_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_MAND1_PEN_ S	EB_SAB- CL_MAND2_PEN_ S	EB_SAB-CL_ PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_MAND1_SAC_ S	EB_SAB- CL_MAND2_SAC_ S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

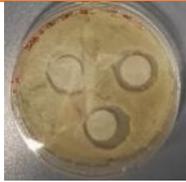
ALLEGATO 7.7. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di rosmarino

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_AB	EB_SAB-CL_ROSM2_ALT_AB	EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_ROSM1_ALT_S	EB_SAB-CL_ROSM2_ALT_S	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

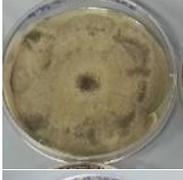
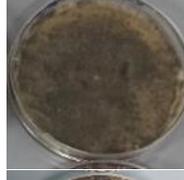
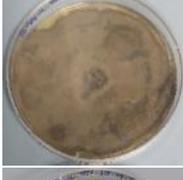
Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_ROSM1_CLA_ AB	EB_SAB- CL_ROSM2_CLA_ AB	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_ROSM1_CLA_ S	EB_SAB- CL_ROSM2_CLA_ S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

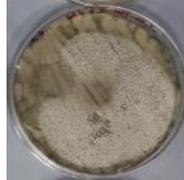
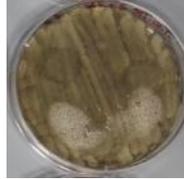
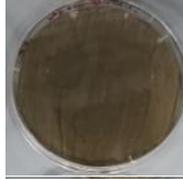
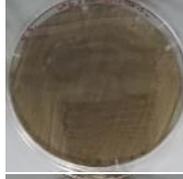
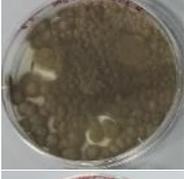
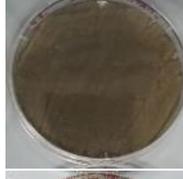
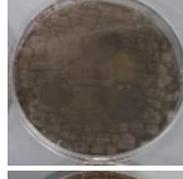
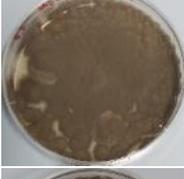
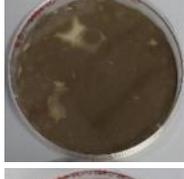
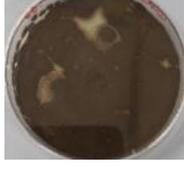
<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_ROSM1_PEN_ AB	EB_SAB- CL_ROSM2_PEN_ AB	EB_SAB-CL_ PEN_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_ROSM1_PEN_ S	EB_SAB- CL_ROSM2_PEN_ S	EB_SAB-CL_ PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

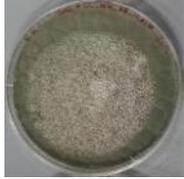
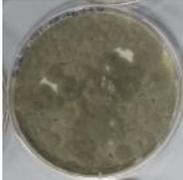
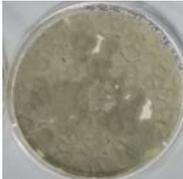
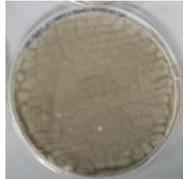
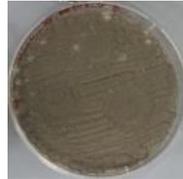
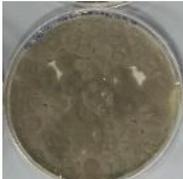
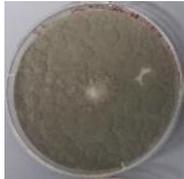
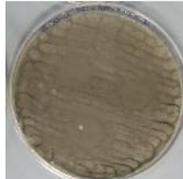
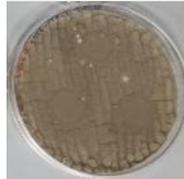
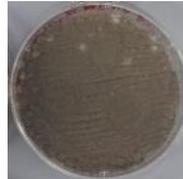
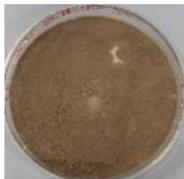
Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_ROSM1_SAC_ S	EB_SAB- CL_ROSM2_SAC_ S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			

ALLEGATO 7.8. Progressione della crescita micotica di *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Penicillium sp.* e *S. cerevisiae* trattati con olio essenziale di tea tree

<i>Alternaria alternata</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB-CL_TEE1_ALT_A B	EB_SAB-CL_TEE2_ALT_A B	EB_SAB-CL_ALT_AB_BIANCO	EB_SAB-CL_TEE1_ALT_S	EB_SAB-CL_TEE2_ALT_S	EB_SAB-CL_ALT_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

Cladosporium cladosporioides

ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_TEE1_CLA_A B	EB_SAB- CL_TEE2_CLA_A B	EB_SAB-CL_ CLA_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_TEE1_CLA_S	EB_SAB- CL_TEE2_CLA_S	EB_SAB-CL_ CLA_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

<i>Penicillium sp.</i>						
ricognizione	Test AB -1	Test AB -2	Bianco AB	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_TEE1_PEN_AB	EB_SAB- CL_TEE2_PEN_AB	EB_SAB-CL_ PEN_AB_BIANCO	EB_SAB- CL_TEE1_PEN_S	EB_SAB- CL_TEE2_PEN_S	EB_SAB-CL_ PEN_S_BIANCO
1° (7° giorno)						
2° (8° giorno)						
3° (12° giorno)						
4° (14° giorno)						
5° (16° giorno)						
6° (54° giorno)						
7° (99° giorno)						

Saccharomyces cerevisiae			
ricognizione	Test S -1	Test S -2	Bianco S
	EB_SAB- CL_TEE1_SAC_S	EB_SAB- CL_TEE2_SAC_S	EB_SAB-CL_ SAC_S_BIANCO
1° (7° giorno)			
2° (8° giorno)			
3° (12° giorno)			
4° (14° giorno)			
5° (16° giorno)			
6° (54° giorno)			
7° (99° giorno)			