



Università
Ca' Foscari
Venezia

**Scuola Dottorale di Ateneo
Graduate School**

**Dottorato di ricerca Chimica
Ciclo XXV
Anno di discussione 2013**

***L'USO DI GLYCYRRHIZA GLABRA L., ACHILLEA
MICRANTHA WILLD. ED HELICRYSUM ARENARIUM L. PER LA
PREPARAZIONE DI PRODOTTI CON PROPRIETÀ
ANTIBATTERICHE***

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: SSD CHIM 01 Chimica Analitica.

Tesi di Dottorato di Oxana Astafyeva, matricola 982114

**Coordinatore del Dottorato
Prof. Maurizio Selva**

**Tutore del Dottorando
Prof. Mikhael Egorov**

Co-tutori del Dottorando

**Prof. Oreste Piccolo
Prof. Gabriele Capodaglio**

INDICE

INTRODUZIONE.....	6
CAPITOLO 1. ANALISI DELLA LETTERATURA.....	12
1.1. Biologia e ecologia delle piante studiate.....	12
1.1.1. Caratteristica dell'attecchimento e dello sviluppo di achillea <i>Achillea micrantha</i> Willd.....	12
1.1.2. Caratteristica biologica di liquirizia <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.....	14
1.1.3. Caratteristica biologica ed ecologica di elicriso <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench.....	22
1.2. I gruppi principali delle sostanze biologicamente attive nelle piante studiate.....	24
1.2.1. Caratteristiche e funzioni dei terpeni e terpenoidi	26
1.2.2. Glicosidi: proprietà e metodi per la loro estrazione.....	29
1.2.3. Caratteristica e funzioni delle saponine.....	32
1.2.4. I flavonoidi: classificazione, proprietà e funzioni.....	37
1.2.5. I fitormoni: funzioni e meccanismi di azione.....	41
1.3. Tecnologie per ottenere gli estratti e i componenti biologici dal materiale vegetale.....	46
CAPITOLO 2. MATERIALI E METODI.....	56
2.1. Struttura della ricerca.....	56
2.2. Oggetti studiati (i materiali di ricerca).....	57
2.3. Metodi di estrazione dei componenti chimici delle piante.....	58
2.4. I metodi chimici di analisi per valutare gli estratti delle piante.....	59
2.4.1. Spettrofotometria UV.....	59
2.4.2. La cromatografia su strato sottile (TLC).....	59
2.4.3. La cromatografia liquida su colonna.....	60
2.4.4. La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).....	61

2.4.5. La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR).....	65
2.4.6. La gas-cromatografia – spettrometria di massa (GC-MS).....	65
2.5. I metodi microbiologici.....	65
2.5.1. Il metodo di diffusione in agar con l'uso di dischetti di carta (Sukhenko L.T., 1999; Dzerginskaya I.S., 2004).....	66
2.5.2. Il metodo di diffusione in agar con l'uso di un pozzetto (Sukhenko L.T., 1999; Dzerginskaya I.S., 2004).....	66
2.5.3. Determinazione dell'attività antibatterica mediante conta delle unità formanti colonie (UFC).....	67
2.5.4. Le tecnica di diluzioni progressive in terreno liquido (Alesciukina A.V., 2003; Netrusov A.I., 2005).....	67
2.6. Metodi statistici.....	68
CAPITOLO 3. VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA DEGLI ESTRATTI OTTENUTI DALLE PIANTE USATE.....	69
3.1. I risultati delle analisi di spettrometria UV degli estratti studiati.....	69
3.2. I risultati della cromatografia su strato sottile (TLC) degli estratti e delle frazioni cromatografiche di estratti delle piante.....	71
3.3. Frazioni principali ottenute mediante cromatografia su colonna da estratti delle piante.....	78
3.4. Ricerca di contenuto acido glicirrizico (glicirrizina) e 18 β acido glicirretico nelle frazioni di estratto etanologico al 50% della radice di <i>Glycyrrhiza glabra</i> mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).....	80
3.5. Risultati comparativi del contenuto di glicirrizina e 18 β acido glicirretico in estratti con solventi diversi dalle radici di <i>Glycyrrhiza glabra</i> , che crescono nella regione di Astrakhan (Russia) e in Calabria (Italia) mediante il metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).....	83

3.6 Risultati comparativi del contenuto di glabridin negli estratti delle radici di liquirizia <i>Glycyrrhiza glabra</i> , che crescono nella regione di Astrakhan (Russia) e in Calabria (Italia).....	85
3.7. Ricerca di sostanze biologicamente attive negli estratti di infiorescenze di achillea mediante gas-cromatografia-spettrometria di massa (GS-MS).....	85
3.8. Ricerca di sostanze biologicamente attive degli estratti di infiorescenze di elicriso mediante gas-cromatografia–spettrometria di massa (GS-MS).....	87
CAPITOLO 4. RICERCA DELLE PROPRIETÀ ANTIBATTERICHE DEGLI ESTRATTI DELLE PIANTE STUDIATE.....	89
4.1. Ricerca comparativa dell'attività antibatterica degli estratti etanolic (50%) e acquoso delle infiorescenze di elicriso e achillea e della radice di liquirizia.....	89
4.2. I risultati dell'attività antibatterica degli estratti delle piante studiate ottenuti mediante conta delle unità formanti colonie (UFC).....	98
4.3. Valutazione comparativa dell'attività antibatterica degli estratti di liquirizia cresciuta in regioni diverse.....	99
4.4. I risultati della ricerca sulle variazioni di attività antibatterica dopo frazionamento degli estratti di <i>Gl. glabra</i> dalla Calabria e dalla regione di Astrakhan.....	108
4.5. Valutazione comparativa dell'attività antibatterica del Glabridin e degli estratti di liquirizia.....	113
CAPITOLO 5. IL PROCESSO TECNOLOGICO DEL PRODUZIONE DEGLI ESTRATTI LIQUIDI DALLA RADICE DI LIQUIRIZIA, DALLE INFIORESCENZE DI ACHILLEA E DI ELICRISO.....	115
5.1. La tecnologia di produzione di un estratto liquido di infiorescenze di Achillea.....	117

5.2. La tecnologia di produzione di un estratto liquido di infiorescenze di Elicriso.....	119
5.3. La tecnologia di produzione di un estratto liquido di radice di Liquirizia.....	121
CONCLUSIONI.....	124
BIBLIOGRAFIA.....	128
Riassunto della tesi di dottorato.....	173
ALLEGATI.....	174

INTRODUZIONE

Attualità della ricerca. L'uso di piante officinali da parte dell'uomo ha una lunga storia, ma finora sono state studiate le caratteristiche di numero relativamente piccolo di specie di piante. Inoltre i dati sulla sicurezza e sull'efficacia dell'uso delle piante officinali sono disponibili per un numero limitato di preparati (Gammerman et al, 1990; Vasilev et al, 2006).

All'inizio del XIX secolo sono state estratte le sostanze biologicamente attive dalle piante e sono stati fatti i primi tentativi per ottenerle mediante sintesi chimica (Golyshenkov et al, 1990; Muraveva et al, 2002). E durante il XIX ed il XX secolo i farmaci estratti da piante sono stati progressivamente sostituiti da quelli ottenuti mediante sintesi chimica (Gammerman et al, 1990; Zorina, 2010; Piccolo et al, 2001; Tyrkov et al, 2002; Velicorodov et al, 2003). L'efficacia del farmaco non è sempre aumentata con la sua purificazione. Per esempio, l'acido ascorbico chimicamente puro non ha gli effetti fisiologici tali da poter sostituire l'uso dell'estratto dal frutto della rosa canina. Questo perché il frutto della rosa canina contiene una combinazione di diversi principi attivi (oltre la vitamina C ci sono anche le vitamine B2, K, PP, tannino, zucchero, acido citrico). Le sostanze isolate da piante possono avere quindi alcuni vantaggi rispetto alle controparti di sintesi. Medicine naturali ottenute dalle piante generalmente operano più lentamente, dolcemente, non si accumulano nel corpo, possono avere minori effetti collaterali che spesso si verificano con l'uso di sostanze ottenute per sintesi. Per questi motivi le medicine di origine naturale sono spesso usate per le malattie croniche. Un importante vantaggio dei prodotti naturali che hanno un effetto terapeutico positivo è che le piante, che sono il prodotto di alimentazione umana e animale, e quindi parte integrante del mondo vivente, contengono complessi di sostanze biologicamente attive, che hanno avuto per milioni di anni effetti sugli organismi viventi (Goldacre, 2007). Sono questi complessi, costituiti forse da una dozzina o più di singoli composti chimici ad avere degli effetti

positivi mentre i singoli composti isolati dalla pianta possono risultare (Golyshev et al., 1990, Vasilev et al., 2006).

Pertanto, l'uso di farmaci antimicrobici naturali al posto di quelli sintetici è la direzione attuale della medicina moderna, della farmacologia e della cosmetologia. L'attività degli estratti è in gran parte dovuta alla presenza in essi di alcune classi di composti chimici (Georgievskij et al, 1990; Muraveva et al, 2002; Castleman, 2001; Schulz et al, 2001; Cseke et al, 2006; Hopkins, 2008; Burlando et al., 2010) quali vitamine, flavonoidi, terpeni, ormoni, saponine, alcaloidi (Vojtkevich, 1999; Muraveva et al, 2002; Egorov, 2007; Sukhenko, 2011; Greger, 1984; Bajguza et al, 2003;. Wangchuk, 2004; Grotewold, 2006; Chang et al, 2007; Baiani et al, 2010; El-Sakka, 2010; Asimova et al, 2012).

L'obiettivo di questo studio, cioè l'estrazione di componenti biologicamente attivi da estratti di piante per il fabbisogno delle industrie cosmetiche, farmaceutiche e altre, è molto importante economicamente per la regione di Astrakhan. Originalità e novità dell'estrazione e produzione di estratti biologicamente attivi con proprietà antibatteriche dalle piante della regione di Astrakhan dipende anche nelle condizioni ambientali naturali. Le condizioni sono un forte irraggiamento, temperatura elevata e bassa umidità che contribuiscono alla formazione di sostanze biologicamente attive con alte concentrazioni (Sukhenko, 2006).

L'unicità della regione d'Astrakhan è dovuta ad un insieme di particolari caratteristiche climatiche e idrologiche e da fattori biotici (Sagalaev, 2003; Sukhenko, 2010) che favoriscono l'accumulo nelle piante selvatiche di una gamma completa di sostanze biologicamente attive. Questo è un fattore che può essere determinante per la produzione di nuovi farmaci e prodotti cosmetici a base di erbe con un più alta attività antibatterica. Le piante di crescono qui (Pilipenko et al, 2002; Zakutnova et al, 2004) accumulano un gran numero di sostanze biologicamente attive con varia struttura chimica (Sukhenko et al, 2000; Sukhenko, 2010). Queste sostanze biologicamente attive determinano l'attività antimicrobica, antibatterica,

immunoprotettiva ed antiossidante degli estratti di queste piante (Brykalov et al, 1999; Brykalov et al, 2000; Sukhenko, 2011). Interessante può risultare anche il confronto tra la composizione chimica e le proprietà degli estratti di piante di una specie che cresce nella regione dell'Astrakhan e in Calabria (Italia), ad esempio fra la liquirizia russa (*Glycyrrhiza russa* - *Glycyrrhiza glabra* var *gladulifera*) e liquirizia spagnola o italiana - *Glycyrrhiza glabra* var *tipico*) (Nomura et al., 2002).

La liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, l'achillea *Achillea micrantha* e l'elicriso *Helichrysum arenarium* sono i rappresentanti tipici delle piante della zona arida della regione dell'Astrakhan. Le scorte di queste piante sono sufficienti per poterle utilizzare come materia prima per la produzione di estratti con proprietà antibatteriche (Nozdrachev et al, 2008; Sukhenko, 2011).

I metodi più promettenti per la determinazione qualitativa e quantitativa della composizione degli estratti sono la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la gas-cromatografia – spettrometria di massa (GC-MS) (Styskin et al, 1986, Alto et al, 1988; Sychev et al, 2002; Capodaglio et al, 2008; Ceyhun et al, 2010).

Lo scopo e gli obiettivi della tesi. Lo scopo della tesi è stato quello di studiare la possibilità di utilizzare alcune piante – liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, achillea *Achillea micrantha*, elicriso *Helichrysum arenarium* - per ottenere estratti di piante con proprietà antibatteriche. Per raggiungere questo scopo occorre eseguire le seguenti attività:

1. Motivare la scelta delle piante (*Glycyrrhiza glabra*, *Achillea micrantha*, *Helichrysum arenarium*) per l'uso pratico al fine di ottenere estratti di singoli componenti attivi o di miscele biologicamente attive come agenti antimicrobici.

2. Definire il sistema per la separazione estrattiva per isolare le sostanze biologicamente attive da infiorescenze di *Achillea micrantha* e *Helichrysum arenarium* e dalla radice di *Glycyrrhiza glabra*.

3. Motivare la scelta della separazione cromatografica e dei reattivi chimici necessari per lo studio degli estratti.

4. Studiare la composizione qualitativa e quantitativa di estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra*, che cresce in regioni diverse.

5. Studiare le proprietà antimicrobiche degli estratti e delle frazioni cromatografiche ottenute. Motivare la dipendenza del grado di attività antimicrobica con il contenuto di alcune sostanze biologicamente attive.

6. Elaborare lo schema tecnologico per ottenere gli estratti liquidi da infiorescenze di *Achillea micrantha* e *Helichrysum arenarium* e da radice di *Glycyrrhiza glabra*.

Novità scientifica. Abbiamo comparato la composizione chimica e le proprietà antimicrobiche degli estratti di tre specie di piante - *Glycyrrhiza glabra* (radice), *Achillea micrantha* (infiorescenze), *Helichrysum arenarium* (infiorescenze) che crescono nella regione di Astrakhan.

Per la prima volta è stato effettuato il confronto tra la composizione chimica e le proprietà antimicrobiche dell'estratto tal quale e di frazioni ottenute dall'estratto mediante separazione cromatografica delle radici di due specie di liquirizia, in crescita in Russia (regione di Astrakan) e in Italia (regione Calabria).

Infine è stato elaborato uno schema tecnologico per ottenere estratti liquidi di radice di *Glycyrrhiza glabra*, di infiorescenza di *Helichrysum arenarium* e di infiorescenze di *Achillea micrantha*.

Il significato pratico del lavoro. I risultati della ricerca sono la base per lo sviluppo dei nuovi metodi per la standardizzazione degli estratti liquidi delle piante studiate. I componenti biologicamente attivi isolati degli estratti che hanno promettenti proprietà farmacologiche possono essere proposti per sintesi chimica in laboratorio e nelle applicazioni industriali. I risultati possono essere argomento dei corsi "Introduzione alla biotecnologie" e "Biotecnologie generale" per gli studenti di discipline biologiche.

I punti essenziali di ricerca:

1. Le specie usate di piante - liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, achillea *Achillea micrantha*, elicriso *Helichrysum arenarium* - sono promettenti per la produzione di agenti antimicrobici e di altri composti biologicamente attivi aventi proprietà desiderate.

2. La soluzione di etanolo (50%) è un buon solvente per estrarre gli ingredienti antimicrobici dalla radice di *Glycyrrhiza glabra*, da infiorescenza di *Achillea micrantha* e di *Helichrysum arenarium*, ma anche altri solventi sono stati individuati come promettenti per la radice di *Glycyrrhiza glabra*

3. Gli estratti tal quali e alcune frazioni sono risultati promettenti per l'attività antimicrobica

4. Un diverso grado di attività antimicrobica è stato riscontrato negli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* (dalla regione di Astrakhan e dalla Calabria, Italia) che dipende principalmente da un diverso contenuto dei principi attivi mentre la composizione qualitativa sembra la stessa.

5. È stato elaborato un possibile schema tecnologico per ottenere gli estratti liquidi da radice di *Glycyrrhiza glabra*, da infiorescenza di *Achillea micrantha* e di *Helichrysum arenarium*.

Pubblicazione. Sul tema di tesi sono state pubblicati 16 lavori.

Volume e struttura della tesi. La tesi si compone di una introduzione, analisi della letteratura, descrizione dei materiali e metodi di ricerca, da tre capitoli dei risultati delle ricerche sperimentali, dalle conclusioni e dalla bibliografia. Il volume totale contiene 198 pagine, 22 tabelle e 37 figure. Bibliografia comprende 357 riferimenti, 264 dei quali in lingue straniere (inglese e italiano).

La ricerca è stata realizzata secondo l'accordo di cooperazione per l'attuazione di una co-tutela di tesi di dottorato tra l'Università Ca 'Foscari (Venezia, Italia) e l'Università Statale di Astrakhan (Astrakhan, Russia). La ricerca è stata svolta presso il dipartimento di biotecnologie e bioecologia dell'Università Statali d'Astrakhan

(ASU). Gli esperimenti sono stati svolti presso il laboratorio di biotecnologia dell'ASU e nei laboratori chimici del Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica e del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca 'Foscari (Venezia, Italia).

L'autore esprime la sua profonda gratitudine al tutor prof. Mikhail Egorov, ai co-tutor prof. Gabriele Capodaglio e prof. Oreste Piccolo, alla docente Lyudmila Sukhenko, a tutti i dipendenti del dipartimento di biotecnologia e bioecologia e di laboratorio di biotecnologie dell'Università Statali d'Astrakhan, del Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica e del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca 'Foscari (Venezia, Italia), per la loro assistenza nell'organizzazione e nella conduzione di studi sperimentali, consulenze, preziosi consigli e commenti durante la ricerca.

CAPITOLO 1. ANALISI DELLA LETTERATURA

1.1 Biologia e ecologia delle piante studiate

1.1.1. Caratteristica dell'attecchimento e dello sviluppo di achillea *Achillea micrantha* Willd

Genere – *Achillea*, famiglia – *Asteraceae*. È una pianta perenne. La parte sotterranea (ipogeo) del fusto presenta dei rizomi ad andamento orizzontale, le cui estremità possono eventualmente germinare in una parte aerea con foglie e fiori, e degli stoloni ipogei. La parte aerea (epigeo) si presenta striata pubescente (pelosa), ed eretta in modo tormentoso e ramificata alta fino a 50 – 100 cm.

Le foglie sono da due (tre) volte pennatosette con lobi molto lanceolati (ma spaziati tra di loro) a 2 a 2 simmetrici rispetto all'asse principale. Possono raggiungere i 20 cm di lunghezza. Larghezza massima 3 – 5 cm. Quelle basali sono picciolate e più lunghe delle cauline, hanno inoltre la rachide stretta e non alata (dimensione massima 1,2 mm). Le foglie cauline sono più piccole e sessili, inoltre sono più spaziate di quelle inferiori.

Capolini larghi fino a 8 mm. Involucro ovoide composto da squame ovate con margine membranoso. Lunghezza dell'involucro: fino a 5 mm. Fiori esterni dell'infiorescenza: 5 fiori tridentati (a tre lobi) femminili ligulati bianchi o rosa. Dimensione della ligula: 2 mm. Fiori centrali dell'infiorescenza: tubulosi a 5 petali bianco-giallognoli ermafroditi. Dimensione del tubulo: 2 mm. Frutto achenio indeiscente senza pappo. Dimensione dell'achenio: 1,7 – 2 mm. La pianta è in fiore in giugno-agosto; i frutti maturano in agosto-settembre.

Cresce nei boschi misti e di conifere, in zone sabbiose e diventate steppa, nei pascoli, nei prati salini. È una pianta fotofila. Il millefoglie è diffuso in Ucraina, nella parte europea della Russia (tutte le regioni eccetto le regioni di Carelia, Murmansk, Dvinsko-Peciorskiy, del Baltico, della Volga superiore), in Siberia Occidentale (la

regione di Tobolsk superiore e di Irtyš), in Caucaso, in Asia Centrale, in Kazakistan (Georgievskij et al., 1990; Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006; Azimova S.S., 2012).

La composizione chimica dell' achillea non è molto nota. Nella medicina di solito si usa l'erba e l'infiorescenza dell'*Achillea millefoglie*.

Alcuni autori hanno identificato alcune sostanze chimiche dalle infiorescenze e dall'erba dell' achillea, come lattoni: achilin, artilesin, grossmisin, micrantin, kaempferol 3-ramnoside, kampesterin (Neshta et al., 1976; Adekenov et al., 1987); lattoni di sesquiterpeni: sintenin e micrantin (Porzel et al. 1992); oli essenziali (Hakimov et al., 1986; Azimova et al., 2012); flavonoidi (Hatam et al., 1994; Valant-Vetschera et al., 1996; Valant-Vetschera, 1999).

L'insieme dei flavonoidi contenuti nell' achillea può essere proposto per la creazione di farmaci antiflogistici e emostatici.

La medicina scientifica usa delle cime delle piante fiorite, di rado foglie oppure capolini come rimedio emostatico, in caso di emorragia interna, malattie del tratto gastroenterico, emorragia esterna, infiammazione dell'utero, e come anticonvulsivo in caso di disordini metabolici (Muraveva et al., 2002; Prija et al., 2002; Houghton et al., 2005; Yakovlev et al., 2006; Saedina et al., 2011).

Alcuni autori anche hanno scoperto l'attività antiossidante degli estratti etanolic - acquoso di achillea (Mantle et al., 2000; Konyalioglu et al., 2005; Saedina et al., 2011), anche l'attività estrogena (Chandler et al., 1982; Schulz et al., 2001; Innocentia et al., 2007), l'attività antiulcerosa (Baggio et al., 2002; Cavalcanti et al., 2006; Potrich et al., 2010), l'attività antimicrobica (Holetz et al., 2002; Dhia Hassawi et al., 2006; de Santanna et al., 2009; Sukhenko et al., 2010; Sukhenko, 2011), l'attività antiflogistica (Greger, 1984; Nemeth, 2005).

La medicina popolare ritiene achillea come un rimedio emostatico e diaforetico e la applica in caso di tisi, ulcera, gastrite, calcoli renali, malaria, emorroidi, malattie femminili, enuresi notturna, affezione epatica, anemia, cefalea,

raffreddore, malattie nervose e ipertensione. Le foglie fresche e giovani si trituranò e si usano come un rimedio emostatico per ferite esterne e emorragia da naso. Il succo appena spremuto e mescolato con miele si beve per aumentare l'appetito e per il miglioramento del metabolismo e in caso di affezione epatica. L'infiorescenza si usa in caso di ernia, le foglie in caso di scabbia e tigna scagliosa.

L'olio essenziale di achillea è giallo chiaro, ha un forte odore di canfora. L'olio è buono ad usare nella produzione di liquori, nell'industria vinicola e in profumeria (Muraveva et al., 2002; Nemeth, 2005; Paduch et al., 2008).

Come materia prima vegetale ad uso medicinale si usa più frequentemente *Achillea millefoglie*. *Achillea micrantha* non è invece considerata una pianta medicinale.

1.1.2. Caratteristica biologica di liquirizia *Glycyrrhiza glabra* L.

Liquirizia è una pianta erbacea perenne dalla famiglia *Leguminose (Fabaceae)* con il gambo dell'altezza da 50 a 150 cm (in qualche comunità fino a 2 metri), che diventa legnosa alla fine dell'estate. Come la maggioranza delle piante tipiche dei semideserti e delle steppe, ha una radice (rizoma pluricapi, polloni-stoloni sotterranei ed estesi in profondità) con la massa che notevolmente supera la massa fuori della terra.

Liquirizia è una specie polimorfa, le varietà si differenziano per i gambi e le radici (Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006; Alternative Medicine Review, 2005).

Liquirizia (tutte le varietà) è diffusa lungo il basso corso dei fiumi Don e Volga, nelle pianure alluvionali e nelle valli di fiumi delle regioni steppose e semideserte dell'Asia Centrale, Kazakistan Occidentale, Caucaso Settentrionale, in Transcaucasia Orientale, nelle regioni centrali e meridionali europee, nella zona del Mediterraneo, nei Balcani, in Asia Minore, Iran, Iraq, Afghanistan; in particolare c'è

molta liquirizia nel bacino del fiume Amurdari, iniziando con gli affluenti in Tagikistan e fino al mare d'Aral (Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006). È coltivato in Europa Occidentale e Meridionale, Turchia, India, Pakistan, Cina, Giappone e nel sud di Stati Uniti d'America (Vulf et al., 1969; Hayashi et al., 2005). Una particolarità del suo luogo di dimora è il livello d'acque sotterranee relativamente alto e l'allagamento temporaneo di primavera e d'estate. Cresce anche lungo le rive e nei greti di fiumi prosciugati, lungo le rive di ruscelli con poca acqua, in canali e fossi. Liquirizia vive sia in spazi di pianura tra fiumi che sui versanti montani preferendo generalmente degli avvallamenti e incavi non grandi. Essendo una pianta infestante dannosa si trova spesso in zone seminate, ma anche in terreni incolti. Sulle montagne, dove le radici possono raggiungere le acque sotterranee, la pianta si trova fino a 2000 m sopra il livello del mare.

In Italia liquirizia vegeta principalmente al sud. Si trova in misura ineguale sul territorio italiano ma praticamente dappertutto in Sicilia, Calabria e Abruzzo (Prihoda, 1993; Castelman, 2001; Stati et al., 2004; Massarelli et al., 2011).

Liquirizia ha qualche varietà, ad esempio *G. glabra* varietà Typical (liquirizia spagnola) e *G. glabra* varietà glandulifera (liquirizia russa) (Hayashi et al., 2008).

Gli organi sotterranei della pianta sono la materia prima per ammassi e sono composti dalla radice madre, dai rizomi verticali e orizzontali che formano una rete da molte file con viluppi e si rafforzano nel suolo con aiuto delle radici addizionali. Le radici della liquirizia penetrano alla profondità di 8 m, raggiungendo di solito il livello delle acque sotterranee. I polloni sopraelevati si allontanano sia dalla radice che dai rizomi verticali e orizzontali con l'aiuto dei quali organismi separati crescono in modo vegetativo sulla superficie di qualche decina di metri quadri. I pezzi dei rizomi si acclimatano bene e grazie a questo fatto la moltiplicazione vegetativa è il metodo principale di rinnovo di liquirizia e di diffusione delle sue boscaglie. Il sistema di radice tipico si vede così: il gambo di una pianta annosa si modifica sotto la superficie della terra in un pollone verticale che si trasforma di solito nella profondità

di 30-40 cm in una radice principale verticale che penetra nella profondità del suolo e ramifica di sotto. Nelle parte diverse dal rizoma si allontanano i polloni orizzontali in forte crescita che si chiamano stoloni. Su questi stoloni ad una certa distanza dalla pianta madre (50-100 cm e oltre) dalle gemme finali si sviluppano le nuove piante, dalle quali si allontanano radici giù e su, ossia i rizomi verticali che si trasformano nei gambi sopraelevati con foglie all'uscita dalla terra. A loro volta generano i polloni sotterranei con gemme dalle quali si sviluppano nuove piante ecc. (Muraveva et al., 2002).

Come risultato con gli anni si formano sotto il suolo i complessi sistemi di radice, che occupano grandi spazi; le boscaglie di liquirizia dalla densità diversa (che si distendono sulle grandi distanze) sono lo sviluppo delle radici sul terreno. il danneggiamento dell'integrità dei sistemi di radice (lacerazione o aridità degli stoloni) non si riflette nella velocità di moltiplicazione vegetativa di liquirizia.

I gambi sopraelevati sono nudi o con peluria corte e non densa, in generale con spine ferruginose radamente distribuite. Le foglie hanno la lunghezza di 5-20 cm, con 3-10 paia di fitte lucide foglioline oblunghe ovoidali o lanceolate, appiccicose a causa dell'abbondanza di cellule ricche di ferro. L'infiorescenza è composta di mazzi abbastanza soffici della lunghezza di 5-12 cm, con il gambo della lunghezza di 3-7 cm. I fiori sono irregolari, uniti a mazzi, della lunghezza di 8-12 mm, con un'areola violetta biancastra e con un calice con denti acuti. Il frutto ha una forma oblunga, una fava retta o un po' ricurva con 1-8 semi, della lunghezza di 3,5 cm, nuda o con spine ferruginose. Liquirizia è in fiore in maggio - giugno, i frutti maturano in agosto – settembre. Il fabbisogno della materia prima per l'industria farmaceutica si soddisfa grazie alla raccolta delle piante selvatiche. Il fabbisogno mondiale di radice di liquirizia è pari a 20.000-25.000 t in un anno. Oltre ai paesi di CSI (la Comunità degli Stati Indipendenti) un fornitore importante della radice di liquirizia è la Spagna (Yakovlev et al., 2006; Hayashi et al., 2008).

Il numero dei componenti (compreso quelli idrosolubili) ricavato dalla liquirizia che costituisce il complesso biologicamente attivo è pari al 40-50% del peso totale secco.

La glicirrizina (detta anche acido glicirrizico) è un glicoside saponinico triterpenoide che rappresenta il principio attivo dell'estratto di liquirizia. In forma acida non è particolarmente solubile in acqua, ma il suo sale di ammonio risulta solubile per valori di $\text{pH} > 4.5$.

In ambito farmacologico questo composto viene sfruttato come espettorante e come gastroprotettore nell'ulcera peptica. Trova anche utilizzo come dolcificante alimentare, essendo fino a 50 volte più dolce del saccarosio e rispetto a quest'ultimo il gusto dolce viene percepito più tardi ma rimane più a lungo in bocca. Rispetto al dolcificante sintetico aspartame continua a conferire gusto dolce anche in seguito a riscaldamento. Effetti collaterali dovuti a sovradosaggio sono l'ipertensione e l'edema, dovuti all'accumulo di ioni sodio e acqua. L'uso è comunque sconsigliato per chi soffre di ipertensione arteriosa (Wang et al., 2004; Czep et al., 2005; Fu et al., 2005; Gupta et al., 2008; Gavrillin et al., 2009; Jayaprakasam et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Qiungying et al., 2009; Dikumar et al., 2011). L'acido glicirrizico si trova solo nella radice, nella parte aerea della pianta non è stato trovato (Muraveva et al., 2002).

La radice di liquirizia possiede molti mono- e disaccaridi. Il loro numero può raggiungere il 20%. La radice contiene sostanze pectiniche (4-6%) e resinose (2-4%), lipidi (3-4%), sostanze amare (2-4%), tracce di olio essenziale. Tra le sostanze di riserva nella radice si trova amido che può costituire, tenendo conto della fase di vegetazione, il 6-34%, ancora proteine vegetali circa 10% (Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006; Qiungying et al., 2009; Burlando et al., 2010).

La parte fuori terra di liquirizia secondo gli autori (Muraveva et al., 2002; Statti et al., 2002; Nomura et al., 2002; Statti et al., 2004; Yakovlev et al., 2006; Wang et al., 2007; Qiungying et al., 2009; Seo et al., 2010) contiene saponine,

tannini, oli essenziali, zuccheri, pigmenti e altre sostanze. Questo fatto apre delle prospettive per l'uso in medicina anche della parte aerea della liquirizia come possibile materia prima per creazione dei preparati antiinfiammatori, antispasmodici e antivirali.

Il colore giallo di liquirizia è legato al contenuto di flavonoidi nella pianta. questi includono likiritin, isolikiritin (calcone) e altri componenti. Isoflavoni di glabridin e ghispaglabridin A e B possiedono considerevole attività antiossidante (Vaya et al., 1996; Hayaski et al., 2006; Chin et al., 2007; Qiungying et al., 2009; Burlando et al., 2010; Malekinijad et al., 2010), sia glabridin e glabren possiedono attività estrogeno simile (Nomura et al., 2002; Czap et al., 2005). Il numero di flavonoidi può raggiungere il 3-4% (Muraveva et al., 2002; Fukai et al., 2002; Nomura et al., 2002; Fu et al., 2005; Wang et al., 2007; Gupta et al., 2008; Jayaprakasam et al., 2009; Qiungying et al., 2009; Burlando et al., 2010; Simons, 2011).

Le radici e i rizomi di piante perenni di liquerizia selvatica raccolti nelle diverse stagioni diverse si usano come materia prima di farmaci. Nella pratica medica si usano le radici di liquirizia non decorticate (*Radices Glycyrrhizae naturales*) e le radici private dal sughero (*Radices Glycyrrhizae mundatae*) (Yakovlev et al., 2006).

Dalle radici di liquirizia si producono degli estratti (concentrato e secco) e degli altri preparati galenici (sciroppo, elisir ecc.); si usa anche la radice stessa decorticata e tritata sotto forma di polveri e compresse. I preparati di liquirizia si usano come un rimedio espettorante e attenuante in caso di affezione catarrale delle vie respiratorie; come purgante in caso di stitichezza cronica e come aroma per correggere il gusto di molti farmaci. Le caratteristiche emulsionanti dell'estratto si usano per la produzione di compresse e pozioni (Muraveva et al., 2002).

La radice di liquirizia in forma di decotto, infuso, estratto o polverina si utilizzano come un rimedio espettorante in caso di affezioni dei polmoni accompagnati con tosse; come antiflogistico e antispasmodico in caso di iperacidità

gastrica, ulcera gastrica e duodenale; nella composizione delle miscele medicinali si utilizza come purgante e come rimedio diuretico. Le forme galeniche di liquirizia si utilizzano in qualità di rimedio ausiliario in caso di malattia di Addison, ipofunzione di corteccia renale. Liquirizia si utilizza in caso di lupus sistemico, dermatite allergica, ecc. con lo scopo di stimolazione della corteccia renale. La polverina della radice di liquirizia si usa largamente nella pratica farmaceutica come base per compresse e come rimedio che migliora il gusto e l'odore dei farmaci.

Durante le ricerche dettagliate della composizione chimica e dell'azione biologica delle specie di liquirizia, che Muravev e sui colleghi ed anche V.S. Sokolov, K.Z. Zakirov, V.I. Litvinenko ecc. hanno condotto, sono state identificate nuove proprietà e sono stati ottenuti preparati con diverse azioni farmacologiche (Muraveva et al., 2002).

Gliziram è il principale farmaco medicinale di liquirizia prodotto dall'industria ed è costituito dal sale monoammonico dell'acido glicirizzico. Gliziram si usa in caso di asma bronchiale, ipofunzione delle sostanze corticali surrenali causata dalla terapia di lunga durata con glucocorticoidi, in caso di eczema, dermatite allergica e altre affezioni per le quali si prescrivono preparati di sostanze corticali surrenali; anche per l'eliminazione dei sintomi di astinenza dopo cessazione di trattamento con glucocorticoidi o con lo scopo di diminuire la dose di questi ultimi.

Questa influenza benefica di liquirizia può essere spiegata dai seguenti meccanismi: glicirrizina e acido glicerretico inibiscono la crescita e le patologie di cellule di RNA- e DNA-virus, compreso epatite A e C, herpes zooster, HIV, Herpes Herpes simplex, CMV (Czap et al., 2005).

Glicirrizina e i suoi metaboliti inibiscono metabolismo epatico di aldosterone e reprimono la 5- β -reductase, che possiede le proprietà di suscitare la sindrome pseudoaldosterone. È emersa la somiglianza delle strutture dell'acido glicerretico e degli ormoni che la corteccia surrenale secreta con attività mineralcorticoide e

glucocorticoide (Wang et al., 2004; Czap et al., 2005; Fu et al., 2006; Burlando et al., 2010).

Liquirizia mostra attività antiflogistica uguale a quella dell' idrocortisone. Ciò è legato all'inibizione dell'attività della fosfolipasi A (un enzima importante nei processi infiammatori). Le ricerche *in vitro* hanno mostrato che l'acido glicirrizico inibisce l'attività cicloossigenasi e la formazione di prostaglandine (in particolare prostaglandina E), ed indirettamente inibisce l' aggregazione di trombociti che sono tutti fattori importanti nei processi di infiammazione.

Qualche specie di liquirizia possiede rilevanti proprietà antiossidanti e epatoprotettrici. Glicirrizina e glabridin, come agenti antiflogistici, inibiscono la formazione di forme attive di ossigeno (AFO) con l'aiuto di neutrofili. Le ricerche *in vitro* hanno mostrato che isoflavoni, gispaglabridin A e B da liquirizia inibiscono l'ossidazione dei lipidi nelle cellule epatiche dei ratti. Altre ricerche (Burlando et al., 2010) mostrano che glicirrizina diminuisce l'ossidazione dei lipidi nel fegato degli animali. La liquirizia possiede un'azione epatoprotettrice per ridurre il livello degli enzimi epatici nel siero.

Glicirrizina e gli altri componenti di liquirizia evidentemente possiedono proprietà anticancerogene. I meccanismi precisi si stanno studiando ma le ricerche hanno mostrato che questi composti reprimono la proliferazione anomala delle cellule e la formazione e la crescita dei tumori del seno, del fegato (epatoma) e della pelle (epitelioma) (Czap et al., 2005).

La glicirrizina della liquirizia si usa per il trattamento delle ulcere e non reprime l'acido gastrico come gli altri farmaci contro questa malattia ma piuttosto favorisce il processo di guarigione della membrana mucosa a causa dell'aumento della produzione delle cellule e del rifornimento di sangue alla mucosa gastrica che migliora la mucosa (Nomura et al., 2002; Czap et al., 2005; Hayashi et al., 2006; Wang et al., 2007).

Molti farmaci sono stati ideati sulla base dei flavonoidi da liquirizia (ad esempio lekviriton e flakarbin (per trattamento dell'ulcera gastrica e duodenale). Prospettive si aprono anche in riferimento all'utilizzazione possibile dell'erba di liquirizia per la produzione di farmaci da saponine e flavonoidi (Yakovlev et al., 2006). Isoflavoni, calconi, isoflavonoidi e alcuni altri componenti fenolici che si ottengono dall'estratto di liquirizia possiedono attività antiossidante (Vaya et al., 1996; Nakagawa et al., 2004; Fu et al., 2005; Chin et al., 2007; Jayaprakasam et al., 2009; Burlando et al., 2010; Seo et al., 2010; Malekinijad et al., 2010; Simons, 2011).

Secondo alcuni autori l'estratto di liquirizia possiede attività antimicrobica e antitubercolare (Mitscher et al., 1980; Mitscher et al., 1988; Mitscher et al., 1998; Kent et al., 2002; Moller et al., 2002; Fukai et al., 2002; Statti et al., 2004; Sukhenko, 2007; Gupta et al., 2008; Qingying et al., 2009; Burlando et al., 2010; Sukhenko, 2011).

Prikhodko con i coautori (1975) e Grinkevic con i coautori (1983) hanno ottenuto dati interessanti durante la ricerca delle proprietà della liquirizia, in particolare gli estratti alcolici e oli essenziali impediscono la crescita di *Candida albicans* (200-250 µg/ml), *Trichophyton gypseum* (100-250 µg/ml) e *Microsporum lanosum* (10-100 µg/ml). Gli oli essenziali risultano un po' più attivi degli estratti alcolici. La prova di frazionamento dell'olio essenziale per recuperare i componenti fenolici, acidi e sostanze neutre ha dimostrato che la frazione dei fenoli era meno abbondante rispetto all'estratto alcolico.

Gli estratti di liquirizia e di molti derivati di glicirrizina hanno trovato ampia applicazione nel campo della cosmetica in diversi paesi (Giappone, Italia, America, Russia e altri). Sia glicirrizina che la polvere delle radici di liquirizia, l'estratto di liquirizia, l'acido glicerretico 3-β-O-emisuccinato (carbenoxolone) si applicano per creare preparati ad uso cosmetico grazie a loro effetto antiflogistico. Inoltre i flavonoidi contenenti glabridin isolati da *Gl. glabra* si applicano nei preparati cosmetici per lo sbiancamento della pelle e come componenti antiflogistici e

antisensibilizzanti (Hayashi et al., 2006; Wang et al., 2007; Hayashi et al., 2008; Burlando et al., 2010).

Le caratteristiche antiflogistiche e antisetliche hanno trovato applicazione per il trattamento delle malattie cutanee e per le infezioni della cavità orale. L'attività uguale a quella del cortisone si applica contro le dermatiti da contatto, eczemi e psoriasi. Gli estratti vegetali possiedono anche un effetto protettivo e di prevenzione contro le infezioni ustionate e si usano nei prodotti cosmetici come agenti antiossidanti e per lenire le irritazioni (Willuhn, 1994; Burlando et al., 2010).

L'estratto vegetale fa parte dei preparati per alopecia e per depigmentazione. L'azione dell'acido 18 β -glicerretico si usa contro l'acne e la glicirizzina, funzionando come i leucociti, contrasta la comparsa delle affezioni follicolari create dai radicali liberi (Burlando et al., 2010).

1.1.3. Caratteristica biologica ed ecologica di elicriso *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

È una pianta erbacea annuale della famiglia delle astracee di Cina (fiori composti) - *Asteraceae* (*Compositae*) con peluria di feltro biancastro della altezza di 20-40 cm. Le foglie alla radice sono oblunghe inversamente ovoidali; le foglie del gambo sono lanceolate, lineari, regolari, della lunghezza di 2-6 cm. I fiori nei capolini sferici della larghezza di 5-6 mm sono riuniti nelle folte scope a forma di corimbo; i petali - involucri sono secchi, di color giallo limone, più raramente arancio. I fiori, di forma rotonda e a petali sottili, sono riuniti in capolini di vario colore dal giallo, al rosa, al rosso. Il frutto è un achenio.

Elicriso è in fiore in luglio-agosto, dà i frutti in agosto-settembre.

È ampiamente diffuso nelle regioni della steppa della parte europea dei paesi CSI, in Caucaso Settentrionale, in Asia Centrale e Siberia Meridionale ed è tipico nei secchi boschi di pino. Vegeta principalmente nelle pinete con muschio e brugo, dove

la falda acquifera è presente al di sotto di due metri. Elicriso è una pianta fotofila, vegeta nei luoghi aperti, in praticelli, bordure, pinete di pini con ramificazioni non compatte; si incontra principalmente nei versanti orientali e meridionali di burroni e dirupi.

Oltre a *Helichrysum arenarium* esiste Elicriso italiano (*H. italicum*) che cresce nelle regioni mediterranee ed è coltivato anche in Crimea. I fiori si usano come materia prima con gli stessi usi di elicriso.

Le infiorescenze di elicriso secondo gli autori (Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al, 2006; Bryksa-Godzisz et al., 2006; Eroğlu et al., 2009; Albayrak et al., 2010) contengono il flavone Naringenina tal quale o come 5-monoglucoside, che si chiama Salipurposide, ed il flavone Kaemferolo come 3-diglucoside. Contengono anche alcuni derivati dell'anidride ftalica quali l'anidride 5,7-diossiftalica, la 5-metossi-7-ossiftalica, la 5-metossi-7-glucosilftalica. Sono state individuate altre sostanze: vitamina K, tracce di olio essenziale (0,04%).

Elicriso si usa in caso di affezioni epatiche acute croniche, affezioni cistiche. Si producono l'estratto liquido e il nuovo farmaco galenico "Flavina". I fiori entrano a far parte di composizioni coleretiche (Muraveva et al., 2002).

Le forme galeniche di elicriso migliorano la coleresi, diminuiscono la concentrazione degli acidi biliari, alzano il contenuto di colato e di bilirubina nel fiele.

L'estratto dell'infiorescenza di elicriso ha una azione antispasmodica sui muscoli lisci dell'intestino, sulle vie biliari, sulla vescica biliare e sui vasi sanguigni. Queste caratteristiche sono dovute ai componenti flavonoidi nelle infiorescenze (Muraveva et al., 2002).

I preparati di elicriso stimolano la secrezione del succo gastrico, attivano la capacità secretore del pancreas ed aumentano la diuresi.

Durante l'attività di ricerca del nostro gruppo è stata scoperta l'azione antibatterica dei fiori di elicriso (Sukhenko et al., 2009; Sukhenko, 2010).

Nella pratica veterinaria si usa l'estratto dei fiori e l'infuso di elicriso in caso di affezioni epatiche acute croniche ed affezioni cistiche.

Fin dall'antichità elicriso si usa per l'aromatizzazione di bevande, come spezia e per la produzione di un olio etereo. Ogni anno in Francia ottengono fino a 100 kg dell'olio etereo per l'industria dei profumi (Vojtkevich, 1999).

1.2. I gruppi principali delle sostanze biologicamente attive nelle piante studiate

Il valore terapeutico delle piante medicinali è determinato dalle sostanze biologicamente attive, che entrano nella composizione delle piante e che possono influire sui processi biologici nell'organismo (Muraveva et al., 2002). Dal punto di vista medico-farmaceutico e tecnologico i prodotti delle piante si suddividano in sostanze attive, sostanze di supporto e in sostanze non utili. In alcuni casi gli stessi prodotti possono essere non utili oppure essere le sostanze attive (per esempio, enzimi, pectine e tannini). La suddivisione dipende dalla materia prima vegetale e dei farmaci prodotti da essa (Minina et al., 2004).

Le sostanze attive (o biologicamente attive) sono i composti che hanno un effetto terapeutico specifico sull'organismo umano. La loro presenza determina il valore di ogni tipo di farmaco (Minina et al., 2004). Molto spesso le sostanze biologicamente attive sono metaboliti secondari, i cui gruppi principali sono tre: alcaloidi, terpeni e composti fenolici. Ognuno di questi gruppi è composto da alcune migliaia di sostanze ed è suddiviso in numerosi sottogruppi. I metaboliti secondari nelle piante non sono mai presenti in forma "pura", di regola, entrano a far parte di miscele complesse. Le miscele simili come composizione e la loro localizzazione nella piante fanno sì che molto spesso hanno un proprio nome storico (Ermakov et al.; 2005).

Gli oli essenziali, di regola, sono le miscele degli isoprenoidi evaporabili (mono- e sesquiterpeni).

Le resine sono costituite principalmente dai diterpeni.

Le gomme sono composte in prevalenza da polisaccaridi, ma spesso nella loro composizione sono anche contenuti alcaloidi e composti fenolici (Ermakov et al., 2005).

Sostanze diverse possono poi avere un forte effetto stimolante o inibente sulla crescita delle piante superiori e sui microorganismi. Alcune si usano ampiamente in medicina per il controllo di protogeni (Kretovich, 1980).

I prodotti del metabolismo primario sono: proteine, acidi nucleici, carboidrati e lipidi.

Le proteine e gli amminoacidi delle piante medicinali hanno un effetto non specifico sul paziente. Influiscono sulla sintesi delle proteine, creando le condizioni per l'aumento della sintesi dei corpi immuni che porta alla crescita delle difese dell'organismo. La sintesi migliorata delle proteine comprende anche la sintesi intensificata di enzimi per il miglioramento del metabolismo. Le ammine biogene e gli amminoacidi svolgono il ruolo importante nella normalizzazione dei processi nervosi (Kretovich, 1980; Severin, 2004).

Al momento presente non abbiamo sostanze di origine vegetale, l'utilizzazione delle quali sarebbe determinata principalmente dalla presenza di specifiche proteine. Tuttavia, è possibile che in futuro proteine vegetali modificate possono essere utilizzate come agenti per la regolazione del metabolismo nell'organismo umano. Per esempio, gli scienziati hanno studiato il ruolo delle lectine proteiche nella attività antitubercolare degli estratti (Nazarova et al., 2008; Sukhenko, 2010; Sukhenko, 2011).

I prodotti del metabolismo secondario sono molti popolari nella medicina moderna. Questo è spesso dovuto ad un effetto farmacologico tangibile e sorprendente.

1.2.1. Caratteristiche e funzioni dei terpeni e dei terpenoidi

I terpeni sono comuni nelle piante medicinali; costituiscono un gruppo omogeneo biologicamente ed una famiglia di composti strettamente correlati. I terpenoidi sono composti correlati ai terpeni e possono includere eteroatomi quali l'ossigeno e avere una diversa disposizione strutturale. Lo scheletro carbonioso di tutti i terpeni è costituito da elementi isoprenoidi ramificati (metilbutadieni): $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, e contiene (a seconda della complessità della struttura dei singoli derivati) un numero multiplo dell'unità a cinque atomi di carbonio originato da un precursore comune, l' isopentenil difosfato (o isopentenil pirofosfato) (Muraveva et al., 2002; Cseke et al., 2006; Yakovlev et al., 2006).

Sono commercialmente importanti per il loro largo impiego in un numero assai elevato di prodotti industriali, come aromi, prodotti farmaceutici, fragranze insetticide e composti antimicrobici. Nella natura svolgono il ruolo importante nell'interazione delle piante con l'ambiente, con altre piante, con insetti ed animali (Ilusia et al., 1996; Pichersky et al., 2002; Bernàth., 2006; Cheng et al., 2007; Zwenger et al., 2008). I terpeni si usano in vari settori dell'agricoltura. Villalba con i coautori, studiando le pecore, ha proposto per una loro più alta produttività di aumentare il consumo di terpeni incrementando la quantità di cereali nella loro dieta. Hanno, inoltre, dimostrato che i terpeni possono influire sulle piante. Infine i terpeni possiedono effetti antimicrobici (Islam et al., 2003). Questo è importante a causa dell'aumento dei batteri resistenti agli antibiotici che si verifica su scala globale e con alta velocità. L'aggiunta di terpeni nel mangime può sostituire l'uso dei comuni antibiotici con conseguente rallentamento della capacità di resistenza dei batteri agli antibiotici medesimi (Zwenger et al., 2008).

Le funzioni di alcuni terpeni nelle piante sono state ben studiate e possono essere collocate fra i composti del metabolismo primario, piuttosto che fra le sostanze del metabolismo secondario. Per esempio, fitormoni quali l'acido abscissico e le

gibberelline sono rispettivamente sesqui- e diterpeni; il sitosterolo, un componente importante delle membrane vegetali, ha origine da triterpeni (C-30 composti), mentre i carotenoidi sono derivati di tetraterpeni (Medvedev, 2004; Hopkins, 2008). La maggior parte dei vari terpeni delle piante sono però metaboliti secondari e proteggono le piante in quanto tossici e repellenti per la maggior parte degli insetti e di alcuni animali erbivori (Medvedev, 2004).

L'influenza di alcuni terpeni sui microorganismi si è iniziata a studiare seriamente a partire dagli anni 80 (Andrews et al., 1980). Gli oli vegetali, che contengono i terpeni, hanno dimostrato la capacità di sopprimere alcuni tipi di batteri in esperimenti in vivo. Per esempio, l'olio di cannella ha un ampio spettro di attività contro *Pseudomonas aeruginosa* (Prabuseenivasan et al., 2006). La composizione dei terpeni può variare a seconda del tipo della pianta. Per esempio, John e coautori (2007) hanno estratto gli oli vegetali dalla *Neolitsea foliosa*, che hanno proprietà antibatteriche, ed i terpeni ivi contenenti sono sesquiterpeni (β -cariofilleni), ma non sono presenti i monoterpeni.

I terpeni sono parte importante di molte piante medicinali e di materiali che contengono oli essenziali, resine e balsami, glicosidi cardiaci, saponine steroidiche, glicosidi amari, carotenoidi, gomma (Muraveva et al., 2006).

Gli oli essenziali sono miscele liquide volatili di sostanze organiche, prodotte dalle piante e composti da vari composti organici, principalmente da terpenoidi (composti ossigenati dei terpeni), e più raramente da composti aromatici ed alifatici. Fra questi si ritrovano gli idrocarburi, gli alcoli, i chetoni, le aldeidi, i fenoli, i lattoni, gli acidi, gli eteri, esteri, ecc (Grinkevich et al., 1990; Medvedev, 2004; Hopkins, 2008). Per la volatilità e la proprietà di essere distillati in corrente di vapore di acqua sono chiamati "essenziali" e "oli" per la consistenza simile agli oli vegetali. Tuttavia la composizione chimica e le proprietà fisiche degli oli essenziali sono completamente diverse da quelle degli oli grassi vegetali.

Gli oli essenziali conosciuti attualmente sono più di mille.

Tuttavia, i composti terpenici predominanti appartengono alle sottoclassi di monoterpenoidi, sesquiterpenoidi, diterpenoidi occasionalmente, ma abbastanza comunemente, con l'aggiunta di "terpenoidi aromatici" e di fenilpropanoidi (Yakovlev et al., 2006). Secondo questo criterio gli oli essenziali possono essere divisi nei gruppi che contengono: 1) monoterpeni aciclici; 2) monoterpeni monociclici; 3) monoterpeni biciclici; 4) sesquiterpeni; 5) composti aromatici (Muraveva et al., 2002).

Gli oli essenziali spesso contengono anche composti alifatici (grassi). Tra questi ricordiamo: idrocarburi (eptano, ecc), alcoli (alcol isoamilico, alcol undecilico), aldeidi e chetoni (aldeide isovalerica, metileptilchetone, ecc), acidi (angelico, ecc) (Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006).

Le piante, contenenti oli essenziali, sono ben rappresentate nella flora mondiale. Le piante, ricche degli oli essenziali, particolarmente sono nei tropici e nei climi secchi subtropicali. In grande quantità gli oli essenziali sono in piante delle famiglie delle Labiatae, Umbelliferae, Cupressaceae, Brassicaceae, Myrtaceae, Rosaceae, Rutaceae, Compositae, Pinaceae.

Nelle piante gli oli essenziali possono essere accumulati in fiori, frutti, foglie, scorza, organi sotterranei, legno (Muraveva et al., 2002; Medvedev, 2004; Yakovlev et al., 2006; Oussalah et al., 2006; Hopkins, 2008). La quantità degli oli essenziali nelle piante varia da quantità centesimali fino al 20%. Diversi tipi delle piante hanno raramente composizione uguale degli oli. La fase della vegetazione, fattori naturali ed agricoli (latitudine geografica, insolazione, umidità, altitudine, ecc) (Vickanova et al., 1971) influenzano la presenza e la composizione degli oli essenziali.

Le piante con oli essenziali si usano in medicina ed anche in altri settori della economia nazionale: profumeria, industria alimentare, industria di sapone, industria di cosmetici, industria liquoristica, ecc.

Gli oli essenziali possono avere anche attività antibatterica. Molti studi di laboratorio hanno dimostrato l'alta efficienza dell'olio essenziale contro agenti

patogeni alimentari e contro i batteri che causano il deterioramento degli alimenti (Smith-Palmer et al., 1998, Hammer et al., 1999; Elgayyar et al., 2001; Dorman et al., 2002). J. Gutierrez e i coautori (2008) hanno studiato le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali di alcune piante nei confronti dei ceppi di *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* IL323 e *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2.2. Glicosidi: proprietà e metodi per la loro estrazione

I glicosidi sono una forma diffusa di molte sostanze naturali (eterosidi). Sono prodotti con struttura più o meno complessa, caratterizzati da una parte zuccherina, detta glicone, legata ad una non zuccherina, detta aglicone o genina. Gli zuccheri nella struttura dei glicosidi sono ciclici.

La forma ciclica del glucosio ha dei gruppi OH di tipo alcolico ed un gruppo OH diverso dovuto alla formazione di un derivato emiacetalico durante la ciclizzazione (reazione del gruppo aldeidico con un gruppo OH alcolico). L'idrossile emiacetalico è più reattivo degli altri idrossili ed è coinvolto nella formazione del legame glicosidico. Si ottengono quindi dei composti acetalici che sono idrolizzati facilmente dagli acidi e di solito sono stabili in ambiente alcalino.

Se le reazioni del gruppo zuccherino con l'aglicone si realizzano mediante un atomo di ossigeno, che è la reazione più comune, tali glicosidi sono chiamati O-glicosidi. Però la parte zuccherifera può essere anche collegata attraverso atomi di carbonio, zolfo o azoto. In questo modo a seconda della natura degli atomi legati distinguiamo: O-glicosidi, C-glicosidi, S-glicosidi e N-glicosidi.

Gli O-glicosidi sono molti frequenti in natura. La loro diversità dipende dalla natura dell'aglicone e dalla struttura del componente zuccherino, che può essere a seconda del numero di strutture zuccherine un mono-, bi-, tri- o oligo saccaride.

A seconda poi della forma tautomerica dei monosaccaridi si distinguono i glicopiranosidi (anello esagonale) e i glicofuranosidi (anello pentagonale).

A seconda della α - o β -configurazione dell'idrossile emiacetalico del monosaccaride che permette il collegamento con l'aglicone si distinguono α - e β -glicosidi.

Per la natura del componente zuccherino si distinguono pentosidi (arabinosidi, xilosidi, ecc). Come residuo zuccherino ci possono essere anche gli acidi uronici (glucuronico, galatturonico, ecc) (Kretovic, 1980).

La grande varietà di O-glicosidi è condizionata dalla natura dell'aglicone, che può essere un gruppo alchilico semplice (per esempio metile ottenendo così un metilglucoside) o un gruppo molto complesso. La classificazione dei glicosidi si basa sulla struttura chimica dell'aglicone. Tra i glicosidi che hanno come aglicone un terpenoide (isoprenoido), distinguiamo come importanti prodotti farmacologicamente attivi:

- 1) glicosidi cardioattivi, i cui agliconi sono derivati del 1,2-ciclopentanoperidrofenantrene (steroidi cardiotonici, steroidi);
- 2) saponine che sono glicosidi con la struttura triterpenica o steroidale;
- 3) glicosidi amari, i cui agliconi sono composti monoterpenici (iridoidi).

Sotto forma di glicosidi in natura abbiamo anche sostanze di altre classi di composti (glicoalcoloidi, antraglicosidi e molte sostanze fenoliche) (Severin E.S., 2004).

I glicosidi si trovano nelle diverse parti delle piante. Sono sciolti nella linfa cellulare e possono essere rilevati con specifiche reazioni microchimiche. I glicosidi, isolati dalle piante in forma pura, sono in gran parte sotto forma cristallina. Nella forma cristallina non sono ottenute solo alcune saponine. I glicosidi sono solubili in acqua e più difficilmente in etanolo e quasi insolubili nei solventi organici apolari (etere, ecc), sono fatti precipitare da una soluzione di piombo acetato, da acqua di barite, da una soluzione di tannino (Minina et al., 2004).

I glicosidi hanno una maggiore mobilità e reattività rispetto alle stesse sostanze nella forma non glicosilata. La sintesi ed idrolisi dei glicosidi nella cellula vegetale sono catalizzate da enzimi quali glicosidasi, galattosidasi, fruttosidasi, ecc.

I glicosidi sono idrolizzati anche da acidi e alcuni di loro durante la bollitura con acqua. Questo non succede ai C-glicosidi che sono resistenti all'idrolisi (Minina S.A., Kauhova I.E., 2004).

La labilità dei glicosidi richiede attenzione nel trattare materie prime medicinali, contenenti glicosidi, nel processo di raccolta, essiccazione e stoccaggio. L'idrolisi enzimatica dei glicosidi inizia con l'atrofia della piante, pertanto le materie prime raccolte devono essere asciugate al più presto. Non è conveniente tenerle in un mucchio, perché questo porta ad un auto-riscaldamento della massa fresca e la creazione delle condizioni ottimali per l'azione degli enzimi. L'essiccazione deve essere veloce a 50-70 °C. L'essiccazione lenta può causare l'idrolisi graduale dei glicosidi cardioattivi, quando dai glicosidi primari iniziano gradualmente a separarsi molecole di monosaccaridi, formando glicosidi con impoverimento della parte zuccherina che dimostrano, di regola, effetti farmacologici differenti. Più alto è il quantitativo di zucchero migliore è la solubilità, quindi più facile l'assorbimento dei glicosidi. Anche se lo stoccaggio è nei condizioni di alta umidità, l'attività degli enzimi riprende con conseguente idrolisi dei glicosidi. I glicosidi che sono stati ottenuti da piante diverse hanno attività antitubercolare (Barnes et al., 2003), attività antiossidante (Raj, 2012), antimicrobica (Polombo et al., 2001; Rojas et al., 2003; Motlhanka et al., 2010), fungicida (Hsu et al., 2009; Motlhanka et al., 2010; Wang et al., 2012), antivirale (Ouyang et al., 2007).

1.2.3. Caratteristiche e funzioni delle saponine

Le saponine sono dei glicosidi con attività emolitica e superficiale (detergenti) ed anche tossicità per gli animali a sangue freddo. Sono generalmente composti

incolori, più o meno facilmente solubili in acqua. Le loro soluzioni acquose o l'estrazione dalle materie prime sotto agitazione porta a formazione di schiume abbondanti e resistenti che hanno fatto sì che all'inizio del secolo scorso queste sostanze sono state chiamate saponine (dal latino Sapo - sapone). Le saponine si sciolgono in etanolo e metanolo diluiti (60-70%) a freddo, e negli alcoli concentrati (80-90%) solo mediante riscaldamento ma riprecipitano per raffreddamento, sono insolubili in etere, cloroformio, acetone, benzene ed altri solventi organici. Alcune saponine non hanno la totalità delle caratteristiche sopra elencate. Alcune di loro sono insolubili in acqua, altre non mostrano alcuna attività emolitica, ecc (Minina et al., 2004).

A seconda della struttura dell'aglicone (sapogenina) si distinguono le saponine steroidee e quelle triterpeniche. La parte zuccherina delle saponine può contenere da 1 a 11 monosaccaridi. I più comuni sono: D-glucosio, D-galattosio, D-xilosio, L-ramnosio, L-arabinosio, alcuni D-acidi come l'acido D-galatturonico e l'acido D-glucuronico. Si possono formare catene lineari o ramificate con legami tra gruppi ossidrilici o carbossilici dell'aglicone (Yakovlev et al., 2006).

Le saponine steroidee sono un gruppo ampio di composti naturali. La particolarità della struttura delle sapogenine steroidee è la presenza di un atomo di ossigeno legato al C-16, e talvolta anche nelle posizioni 1,2,5 e 12 (Muraveva et al., 2002).

La maggior parte di esse hanno un gruppo spirochetale per l'ossidazione della catena laterale di otto atomi di carbonio che coinvolge il gruppo 16-OH. Molte sapogenine nelle posizioni 5,6 hanno un doppio legame. In dipendenza dell'orientamento dell'anello spirochetale le saponine steroidee sono suddivise in composti di tipo "normale" o "iso" (fig.1).

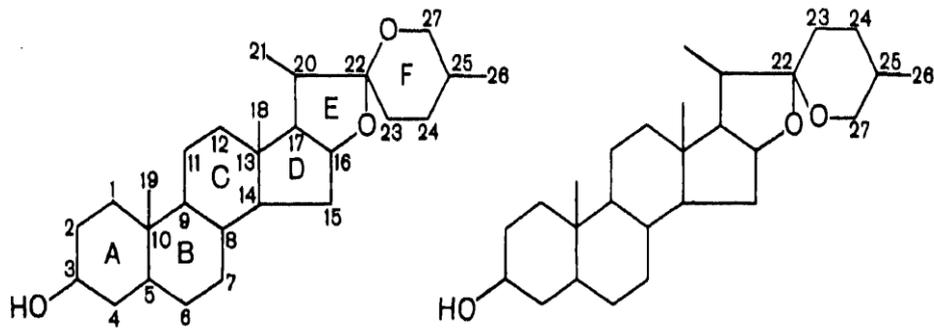


Fig. 1. Le saponine steroidee in forma “normali” o “iso”

Le saponine steroidee hanno come caratteristica la capacità di formare con gli alcoli superiori (in particolare, colesterolo) dei composti complessi, insolubili in acqua, ma solubili in etanolo. In altre proprietà (la formazione di schiuma, emolisi di eritrociti) le saponine steroidee non differiscono dalle triterpeniche (Muraveva et al., 2002).

La struttura steroidale delle saponine può essere confermata con la spettroscopia IR dopo l'isolamento delle saponine dalle materie prime e la loro l'idrolisi.

Le saponine steroidee sono tipiche nelle piante delle seguenti famiglie: Liliacee, Amaryllidacee, Dioscoreacee, Schophulariacee, ma si trovano anche nelle piante di altre famiglie: Fabacee, Zygophyllacee, Ranunculacee, Solanacee. Non sono tossiche per gli animali a sangue caldo, ma uccidano gli animali a sangue freddo, per esempio, i pesci. Le saponine steroidee sono importanti come materie prime a basso costo per la sintesi di ormoni steroidei.

Le saponine triterpeniche hanno spesso la formula generalizzata $C_{30}H_{48}$. Più spesso sono composti pentaciclici e raramente composti tetraciclici. Ci sono anche saponine triterpeniche con agliconi, che hanno la struttura di triterpene tetraciclico.

La maggior parte delle saponine triterpeniche con la struttura pentaciclica è di tipo β -amirina che si basa sullo scheletro di carbonio dell'oleonino. Possono essere presenti oltre ai gruppi ossidrilici anche altri gruppi funzionali: carbossili, lattoni,

esteri, e gruppi carbonilici. Il doppio legame è più comunemente nelle posizioni 12-13.

Il gruppo carbossilico, se presente, si trova più frequentemente legato a C-28. Questo si osserva nei composti il tipo di β -amirina e il tipo di α -amirina (acido ursolico). Però anche altri atomi di carbonio possono avere un gruppo carbossilico.

Certe sapogenine possono avere contemporaneamente gruppi funzionali diversi, per esempio, l'acido glicirretico contiene i gruppi OH a C-3, O- a C-11 e COOH a C-30.

Nella composizione della parte zuccherina delle saponine triterpeniche entrano i monosaccaridi, trovati generalmente nelle piante: D- glucosio, D-galattosio, D-xilosio, acidi D- glucuronici e D-galatturonico, L-arabinosio, L- ramnosio, L-fucosio.

Nella catena del carboidrato ci possono essere da 1 a 10 monosaccaridi diversi, caratterizzati dal punto di giunzione e dal tipo di legame. Molte sapogenine hanno le due catene di zucchero libere (spesso nelle posizioni 3 e 28). La catena di zucchero di alcune saponine triterpeniche è ramificata (es. gipsosida) e la ramificazione si verifica nel monosaccaride, direttamente collegato con l'aglicone. La catena zuccherina si trova generalmente in C-28 e talvolta in C-16.

Le proprietà fisico-chimiche delle saponine triterpeniche cambiano in ampi limiti. Sono principalmente sostanze amorfe che non hanno una temperatura di fusione tipica (di solito con decomposizione). Nella forma cristallina sono stati ottenuti solo singoli membri che consistevano in non più di 4 residui di monosaccaridi. Con la quantità dei monosaccaridi aumenta la solubilità in acqua e in altri solventi polari. Le saponine con 1-4 residui di monosaccaridi risultano poco solubili in acqua.

Le saponine triterpeniche possono essere composti neutri o acidi. La natura acida è dovuta alla presenza di gruppi carbossilici, presenti nella molecola della

sapogenina e negli acidi uronici, se questi ultimi entrano a far parte dello zucchero della sapogenina.

Le sapogenine triterpeniche pentacicliche sono ampiamente distribuite nel mondo vegetale. Secondo gli ultimi dati vi appartengono non meno di 70 famiglie e più di 150 generi. La maggior parte dei generi triterpenici sono in Fabacee, Sapotacee, Caryophyllacee, Asteracee, Araliacee, Primulacee, Poligalacee, Apiacee, Laminacee, ecc.

I glicosidi triterpenici, trovati in quasi tutti gli organi vegetali, è presumibile che partecipino ai processi biochimici delle piante. Evidentemente le saponine triterpeniche influenzano la permeabilità delle cellule vegetali a causa della loro attività superficiale. Si è trovato che opportune concentrazioni di alcune specifiche sapogenine accelerano la germinazione delle sementi, la crescita e lo sviluppo delle piante, mentre soluzioni più concentrate, al contrario, ostacolano questi fenomeni; il loro effetto somiglia quindi a quello degli ormoni della crescita (il meccanismo d'effetto diverso) (Muraveva et al., 2002; Astuti et al., 2011).

La maggior parte delle saponine triterpeniche si accumula negli organi sotterranei: tuberi, rizomi, radici. Si trovano nella linfa cellulare e il loro contenuto può essere fino a 20% (per massa secca delle materie prime). Nel caso di elevato contenuto di saponine triterpeniche si evidenziano al microscopio in forma di grumi incolori ed informi nelle cellule.

Le saponine trovate non solo nelle radici ma anche nelle foglie (Yongmok et al., 2009) hanno effetto antimicrobico, antibatterico ed antivirale (Harborne, 1973). Le saponine stimolano la formazione del collagene, proteina che ha un ruolo importante nel processo di cicatrizzazione delle ferite (Suratman et al., 1996), Le saponine isolate hanno mostrato effetti diversi, come anti-tumorali, anti-colesterolo, immunomodulanti, antibatterici (Attele et al., 1999), antiossidanti (Blumert et al., 2003) e capaci di favorire l'abbassamento del rischio delle malattie coronariche del cuore (Achinrwhu, 1983). Molte saponine usate come farmaci dalla etnomedicina

possono essere trovate come metaboliti secondari nelle piante medicinali (Astuti et al., 2011).

La crescente importanza delle saponine triterpeniche in medicina ed in altre branche dell'economia nazionale richiede l'incremento alle ricerche scientifiche per lo studio del loro contenuto nelle piante (a secondo della loro importanza applicativa) in funzione delle fasi di vegetazione e dei fattori ambientali. Queste piante sono in particolare le specie di liquirizia (*Glycyrrhiza*) ed alcuni membri di *Araliacee*, *Caryophyllacee* e *Cucurbitacee*.

L'ampio spettro degli effetti farmacologici delle saponine triterpeniche è il motivo del loro uso (come pure quello delle piante che le contengono) per il trattamento di varie malattie (Attele et al., 1999; Uematsu et al., 2000; Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006; Yucekutlu et al., 2008; Astuti et al., 2011). Tutti i farmaci, contenenti saponine triterpeniche, sono usati, di solito, per via enterale, perché in questo caso la loro attività emolitica non è mostrata. Inoltre, in presenza delle saponine, altri farmaci potranno essere assorbiti più facilmente. Le proprietà emulsionanti delle saponine sono ampiamente utilizzate per la stabilizzazione dei vari sistemi dispersi (emulsioni, sospensioni) (Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006; Price et al., 1987; Konoshima et al., 1995; Burger, 1998).

La possibilità delle saponine triterpeniche e delle materie prime che le contengono di formare schiume permette un loro utilizzo nell'industria alimentare durante la preparazione di khalva, dolci e bevande effervescenti (Muraveva et al., 2002; Medicinale..., 2006; Konoshima et al., 1995; Burger, 1998; Sparg et al., 2004; Ceyhun et al., 2010). Grazie alle proprietà emulsionanti, le saponine hanno azione detergente ma si distinguono dai saponi.

1.2.4. I flavonoidi: classificazione, proprietà e funzioni

I flavonoidi sono un gruppo numeroso dei composti biologicamente attivi derivati del benzo- γ -pirone, che si basano su uno scheletro, costituito da C₆-C₃-C₆ atomi di carbonio (Grinkevich et al., 1983) (fig.2):

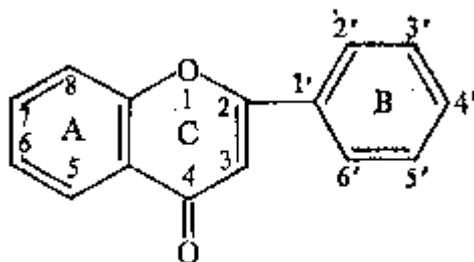


Fig.2 Struttura di flavonoidi

Il nome deriva dalla parola latina “flavus” – giallo, perchè i primi flavonoidi ricavati dalle piante erano gialli.

I flavonoidi sono ampiamente diffusi nelle piante superiori e raramente nei microorganismi e negli insetti.

Circa il 40% dei flavonoidi vengono dal gruppo dei derivati flavonoli, un pò piccolo è il gruppo dei derivati flavonici; flavononi,calconi, auronni si riscontrano invece raramente.

Le più ricche di flavonoidi sono le piante delle specie Fabacee, Asteracee, Apiacee, Lamiacee, Rosacee, Poligonacee, Betulacee, Rutacee, ecc. Nelle piante i flavonoidi si localizzano prevalentemente in fiori, foglie e frutti, raramente in radici e steli; il contenuto dei flavonoidi nelle piante varia dallo 0,5 al 30%. In genere i flavonoidi nelle piante si trovano nella linfa cellulare. La concentrazione massima dei flavonoidi è nelle parte sopraelevate delle piante durante il germogliamento e la fioritura (Grinkevich et al., 1983).

I flavonoidi sono divisi in sei sottoclassi, a seconda del grado di ossidazione dell’anello piranico centrale: i flavoni, i flavononi, gli isoflavoni, le antocianidine, e i

flavonoli (catechine e proantocianidine). Più di 4000 flavonoidi sono stati identificati nelle piante, e l'elenco cresce costantemente. Ciò è dovuto alla possibile e numerosa varietà di sostituenti ed al fatto che alcuni sostituenti (in particolare i gruppi ossidrilici) possono essere a loro volta modificati mediante glicosilazione o acilazione, così da creare struttura ancor più complesse (D'Archivio et al., 2007) (fig. 3).

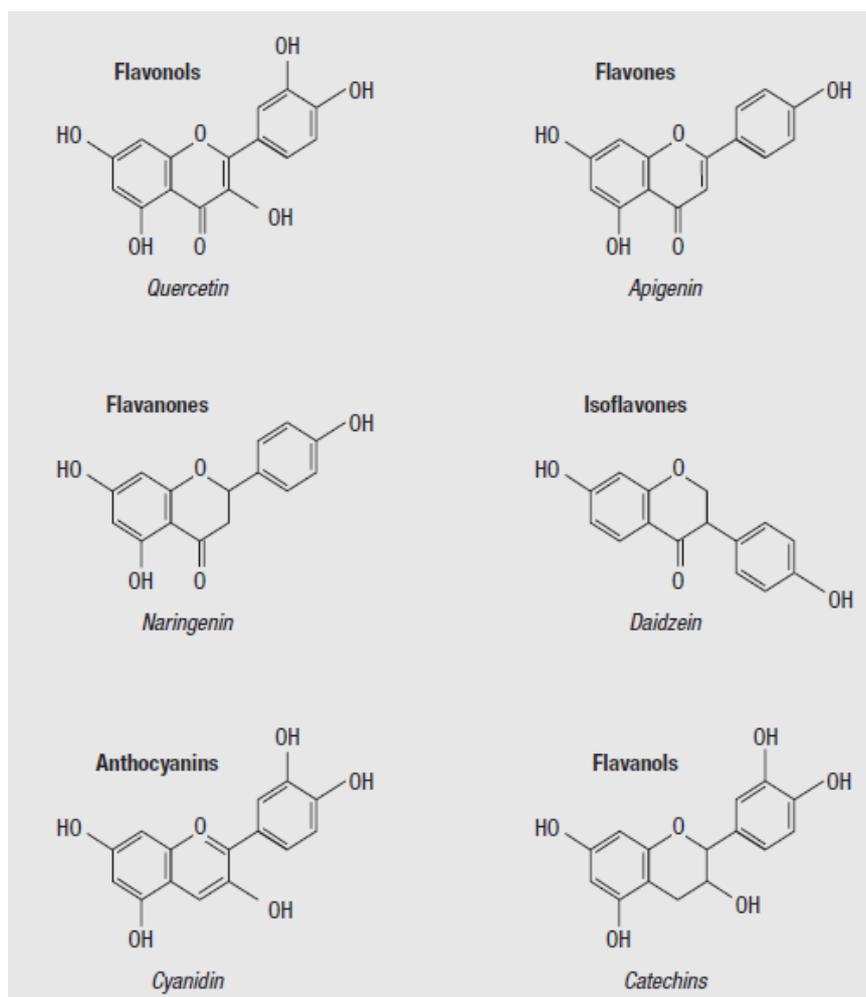


Fig. 3 Classificazione dei flavonoidi

I flavonoli hanno il doppio legame tra C_2 e C_3 con il gruppo ossidrilico nella posizione C_3 . Rappresentano il tipo dei flavonoidi più comune nei prodotti di alimentazione con la quercetina come composto più diffuso. Le fonti principali dei

flavonoli sono: cipolla (fino a 1,2 g/kg di peso fresco), cavolo, porro, broccoli e mirtillo (D'Archivio et al., 2007). È importante notare che la biosintesi dei flavonoli è stimolata dalla luce, così si accumulano nei tessuti ricoprenti ed aerei dei frutti. È interessante che la differenza di concentrazione può osservarsi tra i frutti sull'albero ed anche tra le diverse parti del frutto, a seconda dell'effetto della luce solare.

I flavoni hanno un doppio legame tra C₂ e C₃ e sono un piccolo gruppo dei flavonoidi. Il prezzemolo e il sedano sono le uniche importanti fonti dei flavoni. La buccia dei frutti contiene una grande quantità dei flavoni polimetossilati, per esempio, nella buccia di mandarino il loro contenuto è fino a 6,5 g/l nell'olio essenziale (D'Archivio et al., 2007).

I flavanoni si caratterizzano per la presenza della catena tricarbonica satura e l'atomo di ossigeno a C₄. Si glicosilano fino a un disaccaride in posizione C₆. I flavanoni sono in concentrazioni elevate solo negli agrumi, ma si trovano anche nei pomodori ed alcune piante aromatiche come la menta (D'Archivio et al., 2007).

Gli isoflavoni sono strutturalmente simili agli estrogeni, cioè hanno i gruppi ossidrilici in posizione C₇ e C₄, come nella molecola dell'estradiolo. Gli isoflavoni possono essere legati ai recettori dell'estrogeno e sono classificati come fitoestrogeni. Gli isoflavoni si trovano esclusivamente nei legumi (D'Archivio et al., 2007).

Gli antociani sono i pigmenti solubili in acqua che causano i colori rosso, blu, violetto della maggior parte di frutti, verdure, fiori ed altri prodotti vegetali. Sono principalmente sotto forma di glicosidi i cui agliconi sono chiamati antocianidine, con i gruppi zuccherini in posizione 3 dell'anello C o in posizione 5-7 dell'anello A. Più raramente si ha la glicosilazione anche nelle posizioni 3'-, 4'- e 5'-posizioni dell'anello B. I gruppi zuccherini possono essere acilati con acidi aromatici o alifatici; l'agente acilante più comune è l'acido cinnamico (D'Archivio et al., 2007).

I flavanoli contengono le catene tricarboniche sature con il gruppo idrossilico legato al terzo atomo di carbonio. Esistono nella forma di monomeri e polimeri

(catechine e proantocianidine). A differenza di altre classi dei flavonoidi, i flavanoli sono glicosilati negli alimenti (D'Archivio et al., 2007).

I flavonoidi in forma pura sono composti cristallini con una specifica temperatura di fusione, sono di colore giallo (flavoni, flavonoli, calconi, ecc), o sono incolori (isoflavoni, catechine, flavanoni, flavanoli), o di colore rosso o blu (antociani) a seconda del pH. In ambiente acido hanno le sfumature dei colori rosso o roseo; in ambiente alcalino blu (Grinkevich et al., 1983).

Gli agliconi dei flavonoidi si sciolgono in etere etilico, acetone, alcoli e sono praticamente insolubili in acqua. I glicosidi di flavonoidi contenenti più di tre residui zuccherini si sciolgono in acqua e sono insolubili in etere e cloroformio (Grinkevich et al., 1983).

Gli agliconi ed i glicosidi dei flavonoidi sono inodori; alcuni di loro hanno sapore amaro.

I glicosidi dei flavonoidi mostrano attività ottica. Una delle caratteristiche dei glicosidi flavonoidi è la possibilità di idrolisi ma le condizioni di reazione sono diverse per i diversi gruppi di flavonoidi. Così, i flavono-3-glicosidi sono facilmente idrolizzati a caldo con minime quantità di acidi minerali (0,1-1%), i flavono-7-glicosidi sono idrolizzati a caldo con acidi minerali in quantità maggiore (5-10%) in qualche ora. I C-glicosidi dei flavonoidi non si idrolizzano mediante l'uso di enzimi o di acidi diluiti; la loro idrolisi si realizza utilizzando la miscela di Kiliani (miscela degli acidi cloridrico e acetico concentrati).

I flavonoidi, secondo un certo numero degli autori, hanno diversa attività fisiologica, per questo si chiamano anche bioflavonoidi. Alcuni autori hanno trovato le seguenti attività dei flavonoidi: antispastica, capacità di rafforzamento dei capillari, antiulcera, coleretica, diuretica, antitumorale, ipoazotemica, antiipossiemia, antibiotica. Per la maggior parte delle suddette attività si parla di effetto della vitamina P (aumento dell'elasticità, fragilità ridotta, permeabilità delle pareti capillari). Questa proprietà è più spiccata nei flavoni e flavanoni, soprattutto nella

rutina. Per l'attività biologica è richiesta la presenza di due gruppi ossidrilici nelle posizioni 3' e 4' del radicale fenilico. In combinazione con l'acido ascorbico i flavonoidi hanno effetto anti-infiammatorio e vengono prescritti per il trattamento delle infezioni delle vie respiratorie, per l' influenza, per malattie da radiazione, ecc. Molti composti flavonoidi hanno effetti antimicotici, antimicrobici, antivirali. Gli isoflavonoidi hanno attività estrogenica (Prihodko et al., 1975; Grinkevich et al., 1983; Georgievskij et al., 1990; Minina et al., 2004; Muraveva et al., 2002; Yakovlev et al., 2006; Peterson et al., 1998; Ricciuti et al., 2002; Firenzuoli et al., 2004; D'Archivio et al., 2007; Cotton et al., 2009; Baiano et al., 2010).

1.2.5. I fitormoni: funzioni, meccanismi di azione

I fitormoni sono sostanze organiche a basso peso molecolare che si formano in piccole quantità in alcune parti delle piante pluricellulari e funzionano in altre parti delle piante, come regolari e coordinatori della crescita e dello sviluppo. Gli ormoni appaiono negli organismi pluricellulari più complessi, compreso le piante, come molecole di regolamentazione per la realizzazione delle funzioni fisiologiche ed essenziali, che richiedono la funzione coordinata di varie cellule, tessuti ed organi, che sono spesso lontani gli uni dagli altri. I fitormoni influenzano l'insieme dei processi mediante i quali si compie lo sviluppo biologico (ontogenesi) delle piante pluricellulari.

Il sistema ormonale delle piante è meno specializzato in confronto di quello degli animali. Gli ormoni degli organismi animali si formano nelle ghiandole endocrine speciali e hanno effetti specifici a una certa distanza dal punto di sintesi. Gli animali hanno più ampia gamma di ormoni ed uno più perfezionato sistema di trasporto e regolazione delle attività. I fitormoni sono sintetizzati nei tessuti dell'organismo vegetale e si trasportano in altri, provocando alterazioni funzionali di

questi organi e tessuti. Però, in contrasto con gli animali, nelle piante gli ormoni possono funzionare direttamente nei posti dove si formano (Medvedev, 2004).

La specificità della risposta ormonale nei tessuti vegetali è determinata principalmente del tipo di cellule, su cui ha effetto il fitormone. L'effetto dello stesso ormone su tessuti diversi delle piante può dare risultati differenti. Nonostante il fatto che ogni fitormone può influenzare molti processi fisiologici, l'effetto di ogni fitormone è in qualche modo specifico. Dall'altra parte, nella regolazione dello stesso processo possono partecipare più fitormoni. Si possono formare complessi inattivi che si conservano per lungo tempo nei tessuti. È necessario prendere in considerazione che gli effetti fisiologici dei fitormoni dipendano dalle loro concentrazioni e dalle condizioni ambientali in cui si trova la pianta (Kefeli, 1974; Kretovich, 1980; Yakushina, 1980; Polevoi, 1989; Medvedev, 2004; Ermakov et al., 2005; Taiz et al., 2002; Hopkins et al., 2008).

I gruppi dei fitormoni attualmente noti comprendano auxina, citochinina, gibberelline, acido abscissico, etilene, brassinosteroidi, acidi salicilico e jasminico e sistemi polipeptidici (Kefeli, 1974; Medvedev, 2004; Ermakov et al., 2005; Taiz et al., 2002; Hopkins, 2008). I fitormoni molto raramente funzionano da soli. Anche se i tessuti subiscono l'azione di un fitormone, l'effetto osservato è determinato non solo da questo fitormone, ma anche da altri ormoni endogeni. Gli ormoni principali delle piante hanno massa molecolare che varia da 28(etilene) a 346(acido gibberellico). Molti fitormoni ed altri regolatori della crescita delle piante sono acidi deboli. L'acido indolacetico è un derivato dell'indolo sintetizzato dal triptofano nella cima del pollone e si sposta lungo lo stelo dall'alto verso il basso (Taiz et al., 2002; Medvedev, 2004; Ermakov et al., 2005; Hopkins, 2008). Le citochinine sono derivati dell'adenina, sono sintetizzate principalmente nelle punte delle radici e si trasferiscono da lì a tutte le parti delle piante tramite i canali di trasporto (Kefeli, 1974; Taiz et al., 2002; Hopkins, 2008). Le gibberelline sono un grande gruppo di composti con struttura tetraciclica riconducibile a quella dei diterpeni e possono

contenere gruppi acidi carbossilici. Sono sintetizzate in molti organi particolarmente in quelli in forte crescita : giovani foglie, brattee, parti di fiori, sementi formate e germogliate, ecc. La luce stimola la formazione delle gibberelline. L'acido abscissico è un sesquiterpene (sostanza con 15 atomi di carbonio), derivato dal farnesolo, alcool polinsaturo. Si forma principalmente nelle foglie e nelle radici in due modi o mediante sintesi dall'acido mevalonico o dalla disintegrazione dei carotenoidi (Taiz et al., 2002; Hopkins, 2008). L'etilene si sintetizza dalla metionina attraverso l'acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico, che può essere trasportato lungo la piante. L'etilene si forma in tutti gli organi e tessuti, ma è più attivo nelle zone dei meristemi, foglie invecchiate, frutti maturati, e durante situazioni di stress o trauma (Kulaeva, 1998). Chimicamente i brassinosteroidi sono poliossisteroidi, strutturalmente simili all'ecdisona, che è un ormone della muta e della metamorfosi degli insetti. Si è accertato che il brassinolide (il primo rappresentante dei brassinosteroidi) appartiene alla classe degli steroidi ed ha la struttura lattonica del ciclo B, unica per questa serie, ed è caratterizzato da una giunzione trans tra gli anelli A e B, dalla presenza nella catena laterale di un sistema 22R, 23R diolico e anche da un gruppo α -cis-diolo nel ciclo A. Subito dopo la scoperta del brassinolide 1 da fonti vegetali diverse, sono stati individuati altri rappresentanti dei brassinosteroidi che differiscono gli uni dagli altri nella struttura e nel livello di attività biologica. Per molti brassinosteroidi si osservano gli stessi sostituenti nello scheletro steroidale e nella catena laterale del brassinolide 1 (Egorov, 2007; Russinova et al., 2004; Russinova et al., 2011; Gudesblat et al., 2012). I brassinosteroidi hanno una gamma molto ampia di attività biologica e possono influenzare diversi processi fisiologici nelle piante. Questi effetti rendono possibile la stimolazione per stiramento e scissione delle cellule. Tali effetti, legati alla crescita delle cellule e l'accumulo di biomassa, sono tipici dei brassinosteroidi e si ritrovano in piante diverse (Egorov, 2007; Egorov, 2012).

I fitormoni controllano tutte le fasi dell'ontogenesi delle piante. La scissione delle cellule, che è la base dei tutti processi di crescita e morfogenesi, è controllata da auxine e citochinine; per questo la mancanza completa di questi fitormoni è letale per le piante. La forma generale (architettura) della piante è determinata dalle auxine e citochinine, ma anche dalle gibberelline. Le auxine inibiscono la crescita delle gemme laterali (dominanza apicale), mentre le citochinine sono responsabili della ramificazione (Magnus et al., 1999; Ferro et al., 2007; Pandey et al., 2011; Nakayama et al., 2012). Le gibberelline migliorano la crescita delle piante, attivando i meristemi apicali ed intercalari (Han et al., 2010). I brassinosteroidi hanno le attività delle gibberelline e delle auxine (Egorov, 2007; Egorov, 2009; Egorov, 2010). Le auxine contribuiscono alla formazione delle radici, determinano le flessioni adattive della pianta in conformità della direzione della luce o del vettore della forza di gravità (foto- e geotropismo). La formazione dell'apparato della fotosintesi e la traspirazione delle piante sono regolate dagli ormoni-antagonisti, le citochinine e l'acido abscissico. Le citochinine provocano la differenziazione dei cloroplasti e l'apertura degli stomi, mentre l'acido abscissico inibisce entrambi processi. Per molte piante fitormoni diversi (gibberelline, citochinine, etilene) sono induttori o stimolatori della fioritura. La partecipazione successiva dei fitormoni è necessaria per la formazione normale dei frutti e dei semi. La formazione dell' ovario e la crescita dei frutti è stimolata dalle auxine, gibberelline e citochinine, prodotte dagli ovuli o dai semi. La maturazione e la caduta dei frutti e anche delle foglie è dovuta all' etilene e all' acido abscissico. Fattori negativi sulle piante causano l'aumento della quantità di etilene e la scarsità di acqua provoca la formazione dell'acido abscissico (Ikram et al., 2004; Tayal et al., 2008; Scheller et al., 2011). Citochine, gibberelline, e, in alcuni casi, etilene contribuiscono alla germinazione dei semi di molte piante e aumentano la loro potenza germinativa. I tumori delle piante, provocati di alcuni microorganismi patogeni (*Agrobacterium tumefaciens* et al.), producono concentrazioni

anormalmente elevate di auxine e citochinine, prodotte dai patogeni (Kulaeva,1998; Kumar et al., 2009).

Il meccanismo della attività dei fitormoni in termini generali, e anche in molti “dettagli” molecolari, è simile a quello della attività degli ormoni negli animali, ma è stato studiato molto meno. Le cellule sensibili percepiscono l'ormone grazie a recettori specifici, che si trovano principalmente nella membrana plasmatica. Dopo l'interazione con l'ormone i recettori cambiano la loro conformazione (forma speciale) e in qualche modo trasmettano un segnale nella cellula. Come negli animali, i trasmettitori del segnale (intermediari secondari) nella piante possono essere dovuti a: proteinchinasi/proteinfosfatasi, diacilglicerolo, acidi fosfatidici ed acidi grassi, calcio, nucleotidi ciclici, ossido nitrico, perossido di idrogeno. Il segnale ormonale, lungo il percorso determinato fino alle strutture effettrici, di solito aumenta molto. L'obiettivo finale dei fitormoni nella cellula sono i geni, ed a seconda del tipo di fitormone e del tipo di tessuto, si attiva o si reprime completamente l'uno o l'altro dei geni sensibili (competenti). Durante l'effetto i fitormoni si formano presso i geni bersagli, o, al contrario, scompaiono i rispettivi enzimi. Anche se i geni sensibili sono una piccola frazione del numero totale dei geni attivi, il cambiamento della loro attività è in genere sufficiente per attivare o disattivare il programma metabolico controllato dal fitormone (Medvedev, 2004; Ermakov et al.,2005; Taiz et al., 2002; Hopkins, 2008).

Data la attività importante e diversa sulla crescita e la morfogenesi delle piante, i fitormoni e i loro analoghi sono oggetto di studio e sono usati in biotecnologia ed agricoltura. I fitormoni (auxine e citochinine) sono necessari per la coltivazione delle linee cellulare e per la realizzazione delle piante transgeniche (Shevelukha et al., 2008). Le auxine e loro analoghi spesso sono utilizzate per la prevenzione della caduta dei frutti prima della raccolta e per il radicamento delle talee durante la moltiplicazione vegetative delle piante (Polevoi, 1982). I produttori di etilene (cioè le sostanze la cui decomposizione forma l'etilene nei tessuti delle piante) sono utilizzati

per accelerare la maturazione e la raccolta dei frutti, per la defogliazione del cotone, per il rafforzamento dello scorrere del lattice dagli alberi di hevea e per molti altri scopi (Kulaeva,1998). L'attività di molti ritardanti (le sostanze che inibiscono la crescita delle piante in altezza) è ampiamente utilizzata per la prevenzione dell'allettamento dei cereali, ed è basata sull'inibizione della sintesi delle gibberelline endogene nelle piante. D'altra parte il trattamento delle gibberelline induce la fioritura di molte piante e permette di aumentare il raccolto della uva senza semi. Negli ultimi anni sono state create forme transgeniche delle piante coltivate con un modificato metabolismo dei fitormoni. Sono divenuti popolari i pomodori a lunga conservazione con la biosintesi inibita dell'etilene. I lavori per la realizzazione di piante con modifiche mirate dei sistemi di regolazioni ormonali hanno buone prospettive per la produzione di forme nuove di piante utili.

I fitormoni influiscono non solo sulle piante, ma anche su altri organismi viventi. È stata trovata l'influenza inibitoria dei brassinosteroidi in relazione all'ecdisterone. I preparati a base dei brassinosteroidi hanno influenza su organismi quali api, pesci (per esempio, storioni), animali da fattoria (Egorov, 2007; Egorov, 2009).

Basati su sostanze biologicamente attive di origine vegetale è possibile preparare una grande quantità di farmaci promettenti, che possono essere rimedi efficaci di importanza nei settori dell'economia nazionale.

1.3. Tecniche per ottenere gli estratti e i componenti biologici dal materiale vegetale

L'estrazione è un metodo per ottenere una sostanza da una soluzione o da miscela secca usando un solvente estrattore adeguato. A seconda del solvente usato gli estratti possono essere acquosi, alcoolici, essenziali ecc., e in base alla consistenza possono essere liquidi, semi-liquidi, densi e secchi (Ponomarev, 1976).

In letteratura sono descritti molti metodi di estrazione di sostanze biologicamente attive dal materiale vegetale (Ponomarev, 1976; Baghirova et al., 2001).

Le tecniche classiche di estrazione delle sostanze biologicamente attive dal materiale vegetale sono basate sulla scelta di un solvente adeguato in combinazione con riscaldamento ed agitazione della miscela (Ponomarev, 1976). Le tecniche di estrazione classiche utilizzate per isolare le sostanze biologicamente attive da piante comprendono: estrazione con apparecchiatura Soxlet, idrossilazione e macerazione con una soluzione idroalcolica o con sostanze grasse calde (Wang et al, 2006).

L'estrazione mediante Soxlet è un metodo semplice e ben consolidato, che è superiore ad altre tecniche convenzionali di estrazione, ma ha dei limiti applicativi quando le sostanze da trattare sono sensibili al calore (Wang et al., 1998).

Di solito nel sistema Soxhlet il materiale vegetale viene posto in un recipiente di estrazione e riempito con solvente proveniente da un pallone attraverso riscaldamento e condensazione. Quando il liquido raggiunge il livello di guardia, il solvente assieme alle sostanze estratte viene pompato attraverso un sifone dal recipiente di estrazione e ricaricato nel pallone di distillazione. L'operazione procede e si ripete più volte e, considerando che solo il solvente può distillare, si ha l'accumulo nel pallone delle sostanze estratte dalla massa vegetale solida (Handa et al., 2008).

I vantaggi dell'estrazione Soxhlet sono la variazione continua dell'equilibrio fra solvente fresco a contatto con la fase solida, la possibilità di mantenere una temperatura di estrazione relativamente elevata riscaldando il pallone di distillazione e non è richiesta filtrazione dopo la percolazione. Inoltre il metodo Soxhlet è molto semplice ed economico (Wang et al., 2006).

I principali svantaggi di estrazione Soxhlet tradizionale sono il tempo lungo di estrazione, l'uso di grandi quantità di solvente che poi andrà concentrato per recuperare il prodotto estratto, l'impossibilità di una miscelazione che non può essere

eseguita per aumentare la velocità del processo, la possibilità di decomposizione termica del prodotto desiderato sia durante i lunghi tempi di estrazione sia durante la concentrazione finale del solvente. Alcuni dei solventi spesso utilizzati nel metodo Soxhlet sono stati poi recentemente messi in discussione a causa della loro tossicità.

Macerazione e percolazione sono alcune altre metodiche tradizionali di estrazione, spesso utilizzate nella preparazione di medicinali a base di erbe (Handa et al., 2008). La macerazione è un vecchio modo di estrarre (Minina et al., 2004). Intero o tritato il materiale vegetale grezzo viene posto in un contenitore chiuso con un solvente e tenuto a temperatura ambiente per almeno 3 giorni con frequenti agitazioni per sciogliere le sostanze solubili. La miscela viene quindi travasata e chiarificata mediante filtrazione o decantazione (Handa e al., 2008).

I vantaggi di questo metodo sono la disponibilità e la facilità di estrazione. Suoi svantaggi includono la durata del processo di estrazione, l'estrazione talvolta incompleta di sostanze attive dal materiale vegetale a causa di un equilibrio non favorevole tra materiale vegetale solido e solvente liquido, il trasferimento nell'estratto, durante la durata dell'infusione, di grandi quantità delle sostanze non utili. In relazione agli inconvenienti sopra elencati tale metodo viene utilizzato solo quando esistono difficoltà ad usare altri metodi (per esempio, per estrarre da pianta medicinale avente grandi quantità di sbavatura o di polvere) (Minina et al., 2004).

Il metodo della macerazione con la temperatura superiore alla temperatura ambiente è una forma di macerazione, in cui un calore blando viene utilizzato durante il processo di estrazione. Questo metodo viene utilizzato a temperature moderatamente elevate. Ciò aumenta l'efficienza del solvente (Handa et al., 2008).

Il metodo di rimacerazione (più fasi di infusione) è spesso usato per accelerare il processo di estrazione e per aumentare la resa dei principi attivi. Il materiale vegetale viene trattato con una porzione del volume totale di estraente; dopo aver decantato o filtrato l'infusione iniziale sul materiale vegetale viene versata una seconda porzione uguale di estraente e si procede nella medesima maniera, ecc. Alla

fine il medesimo volume totale di solvente viene usato ma la capacità di estrazione è migliore. È possibile utilizzare anche durante il processo di rimacerazione una agitazione occasionale.

Estrazione di acqua-alcol fermentazione

Alcuni medicinali ayurvedici sono preparati con tecniche di fermentazione per estrarre i principi attivi. L'estrazione mediante questo metodo comprende l'ammollo delle materie prime medicinali in polvere o sminuzzate per un periodo di tempo durante il quale il materiale vegetale viene fatto fermentare per formare l'alcool che facilita l'estrazione dei principi attivi contenuti nelle piante. L'alcool formato in questo modo serve anche come conservante (Handa et al., 2008).

Estrazione a ultrasuoni

Le onde sonore, che hanno frequenze superiori a 20 kHz, causano vibrazioni meccaniche in solidi, liquidi e gas. A differenza delle onde elettromagnetiche, le onde sonore si muovono nella materia con cicli di espansione e contrazione. L'espansione fa sì che le molecole si respingono tra di loro mentre la contrazione li spinge una verso l'altra. L'espansione può creare bolle nel liquido e produrre una pressione negativa. Si formano delle bolle che crescono fino a che si distruggono. Vicino alla superficie solida, la distruzione delle bolle è asimmetrica e produce alta velocità nel liquido. Questo fenomeno ha una forte influenza sui substrati solidi (Luque-Garcia et al, 2003).

Ci sono due sistemi semplici di estrazione con ultrasuoni : bagno a ultrasuoni o estrattori chiusi dotati di un trasduttore ad ultrasuoni. Effetti meccanici di penetrazione degli ultrasuoni causano un maggiore effetto solvente nei materiali cellulari e migliorano il trasferimento di massa. Gli ultrasuoni nell'estrazione possono destabilizzare le pareti cellulari biologiche, facilitando il rilascio del contenuto. L'effettiva distruzione delle cellule e l'efficace trasferimento della massa sono i due fattori principali che stanno portando ad un maggiore utilizzo nelle procedure di estrazione degli ultrasuoni (Mason et al, 1996). La microscopia elettronica a

scansione (SEM) ha fornito dati sulla azione meccanica degli ultrasuoni, principalmente mostrando la distruzione delle pareti cellulari e il rilascio del contenuto della cella. A differenza dell'estrazione comune, gli estratti vegetali compenetrano attraverso le pareti cellulari a causa dell'influenza degli ultrasuoni e ciò provoca l'apoptosi della cellula in un più breve periodo. (Toma et al., 2001; Chemat et al, 2004; Li et al, 2004).

L'estrazione mediante ultrasuoni è relativamente economica, semplice ed efficace rispetto ai metodi tradizionali di estrazione. I principali vantaggi dell'uso di ultrasuoni nell'estrazione solido-liquida e liquida sono l'aumento della quantità del rendimento d'estrazione e della velocità. Gli ultrasuoni possono anche ridurre le temperature di esercizio che accompagnano l'estrazione dei composti termolabili. In confronto a metodi nuovi di estrazione, per esempio l'estrazione mediante microonde, l'attrezzatura per gli ultrasuoni è più economica e semplice da utilizzare. Inoltre l'estrazione mediante ultrasuoni come pure l'estrazione Soxhlet può usare un qualsiasi solvente per estrarre una vasta gamma di composti naturali (Wang et al., 2006).

L'estrazione ad ultrasuoni è stata utilizzata per l'estrazione di nutraceutici dalle piante, come gli oli essenziali e grassi (Chemat et al, 2004; Cravotto, et al, 2004; Li et al, 2004; Luque-Garcia et al, 2004; Sharma et al, 2004) ed integratori alimentari (Bruni et al, 2002; Melecchi et al, 2002; Wu et al, 2001). Reviews sull'utilizzo degli ultrasuoni in tecnologia alimentare (Mason et al, 1996) e sulla applicazione nella estrazione di sostanze biologicamente attive da piante sono state pubblicate (Vinatoru, 2001).

Gli ultrasuoni possono aumentare la resa, ad es. la resa di olio estratto dalla soia è aumentato significativamente sotto l'influenza di ultrasuoni (Li et al., 2004). Analogamente con l'estrazione ad ultrasuoni di saponine da ginseng si è osservato che il rendimento totale e la resa di saponine è aumentato fra il 15 e il 30% (Hui et al., 1994).

Gli ultrasuoni possono aumentare la cinetica del processo di estrazione e anche migliorare la qualità degli estratti. Cravotto et al. (2004) hanno rilevato che l'estrazione di olio da crusca di riso può essere efficacemente effettuata in 30 minuti mediante trattamento ad ultrasuoni ad alta intensità con un miglioramento rispetto all'estrazione tradizionale con esano o con una soluzione acquosa basica.

L'estrazione ad ultrasuoni è un metodo efficace per l'ottenimento di principi attivi da salvia, *Salvia officinalis* (Salisova et al, 1997) e da infiorescenze di ibisco, *Hibiscus tiliaceus* L. (Melecchi et al., 2002), di antiossidanti dal rosmarino, *Rosmarinus officinalis* (Albu et al, 2004) e di steroidi e triterpenoidi da Composita Chresta (Schinor et al, 2004). L'uso di ultrasuoni come supplemento all'estrazione comune per l'estrazione di semi di amaranto, *Amaranthus caudatus*, fornisce un prodotto di alta qualità con una metodologia ben definita ed in maniera molto più veloce e anche più economica (Bruni et al, 2002).

Vantaggi e svantaggi di estrazione a microonde

L'estrazione con microonde (MAE) offre velocemente una quantità elevata di energia al volume totale del materiale vegetale e del solvente in modo efficiente e uniforme. Poiché l'acqua dal materiale vegetale assorbe l'energia delle microonde, la distruzione delle cellule è promossa dallo sviluppo di calore interno che facilita il desorbimento di sostanze chimiche dalle materie prime e il miglioramento nel recupero di prodotti nutraceutici (Kaufmann et al, 2001).

MAE è considerata come una potenziale alternativa al sistema tradizionale di estrazione solido-liquido e liquido-liquido per l'ottenimento di metaboliti dalle piante. Questo metodo viene utilizzato per l'estrazione di nutraceutici per diversi motivi: la riduzione del tempo di estrazione, la riduzione dell'uso di solventi e l'aumento dei rendimenti. MAE è comparabile con altri moderni metodi di estrazione, come l'estrazione con fluido supercritico, grazie alla relativa semplicità del processo e al basso costo. Per gli aspetti economici e pratici MAE è una tecnica nuova e potente di estrazione di sostanze biologicamente attive (L. Wang et al, 2006),

anche se ci sono ancora problemi tecnologici da risolvere se si vuole utilizzare in impianti industriali.

Tuttavia, rispetto a SFE (estrazione con fluido supercritico), nel caso si vogliano usare le microonde, spesso sono necessari trattamenti di filtrazione supplementari o di centrifugazione per rimuovere i solidi. Inoltre con alcuni composti o solventi non polari o quando ci sono prodotti volatili il metodo con MAE è poco efficiente.

Anche se l'estrazione a microonde di composti organici da prodotti naturali e il trattamento supplementare di cessione di materiali in metallurgia sono stati ampiamente studiati (Al-Harashseh et al, 2004; Barriada-Pereira et al, 2003; Spar Eskillsson et al., 2000; Tomaniova et al., 1998), i risultati pubblicati sull'estrazione di sostanze biologicamente attive sono ancora molto pochi anche se in crescita. Una review di pubblicazioni sul MAE di prodotti naturali è stata fatta da Kaufmann ed al (2002).

L'estrazione a microonde da materiali vegetali di nutraceutici può essere realizzata in modo più veloce rispetto ai convenzionali sistemi di estrazione solido-liquido. 12 minuti di estrazione a microonde sono in grado di rimuovere il 92,1% di artemisinina dall' assenzio dolce, *Artemisia annua* L., mentre usando un Soxhlet per molte ore si ottiene circa il 60% di estratto (Hao et al, 2002). In 4-5 minuti MAE (etanolo-acqua) può estrarre più acido glicirrizico dalla radice di liquirizia che in estrazione (etanolo-acqua) a temperatura ambiente per 20 -24 ore (Pan et al, 2000).

Estrazione con fluidi supercritici

L'estrazione con un fluido supercritico (SFE) è un processo tecnologico che consiste nel trasferimento di uno o più componenti di una miscela solida o liquida in un "liquido supercritico". Il prodotto d'interesse contenuto nella miscela viene a contatto con un gas estraente a temperature e pressioni superiori al punto critico. I metodi più diffusi usano come estraenti CO₂, etano, etilene, propano, H₂O, SF₆, ecc.

SFE è una potenziale alternativa ai metodi tradizionali di estrazione con solventi organici per l'estrazione di componenti bioattivi da piante (Modey et al, 1996; Choi et al, 1997; Dean et al, 2000; Szentmihályi et al, 2002; Ellington e altri, 2003; Hamburger et al, 2004; Andras et al, 2005). Questa tecnica può essere utilizzata per estrarre componenti vegetali, in particolare i lipidi (Bernardo-Gil et al, 2002), oli essenziali (Berna et al, 2000; Coelho et al, 2003; Marongiu et al 2003) e composti aromatici (Wang et al., 2006).

SFE può prevenire l'ossidazione dei lipidi. Bernardo-Gil et al (2002) hanno scoperto che gli acidi grassi liberi, trigliceridi, steroli e tocoferoli contenuti nell'olio di nocciola possono essere estratti con il metodo di SFE o mediante l'estrazione con esano. Tuttavia nell'estrazione con il fluido supercritico l'olio risulta protetto meglio dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi rispetto all'estrazione con esano. L'olio estratto con il metodo di SFE è anche più naturale rispetto all'estrazione con esano.

La tecnica SFE permette di ottenere una resa superiore ed oli essenziali di qualità superiore, con un contenuto aromatico superiore rispetto a quelli ottenuti per distillazione convenzionale (Wang et al., 2006).

La percentuale di utilizzo della tecnica SFE con CO₂ supercritica per l'estrazione di sostanze biologicamente attive da materiale vegetale su scala industriale rimane ancora modesta a parte l'importante processo industriale per la rimozione della caffeina dal caffè. Ciò è dovuto alla natura lipofila della CO₂ supercritica per cui molte sostanze vegetali attive complementari, quali composti fenolici, alcaloidi e glicosidi, risultano scarsamente solubili e quindi non recuperabili (Hamburger et al, 2004). Come alternativa si possono usare miscele di CO₂ supercritica con opportuni solventi polari quale ad es. etanolo oppure acqua in condizioni subcritiche.

Utilizzo di vari metodi cromatografici.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è ampiamente utilizzata nell'industria farmaceutica per l'analisi accurata dei componenti chimici in prodotti di

vario genere. Recentemente l'espansione sistematica del processo analitico su scala preparativa e l'ulteriore sviluppo su scala industriale, già attuato per l'isolamento di alcuni farmaci, può rendere possibile anche l'isolamento e la purificazione di fitofarmaci di interesse terapeutico e commerciale (Gupta et al., 2008)

Il termine cromatografia liquida (LC) si riferisce ad una serie di sistemi cromatografici, incluse la cromatografia liquido-solido, la cromatografia di esclusione liquido-liquido, lo scambio ionico. Cromatografia su colonna è un esempio di una classica cromatografia liquida in cui la fase mobile per gravità passa attraverso una colonna di vetro riempita con una fase stazionaria con un supporto solido finemente suddiviso. Cromatografia liquida, in particolare ad alte prestazioni (HPLC), permette una serie di vantaggi quali (Handa et al., 2008):

- 1) alta risoluzione
- 2) separazione rapida
- 3) misurazione qualitativa e quantitativa ed estrazione
- 4) l'automazione delle procedure di analisi e dati.

Attualmente HPLC è ampiamente usata per l'isolamento e l'analisi dei diversi gruppi di principi attivi estratti da piante (Antipova et al, 2004; Tereshina et al, 2006; Shelemeteva, 2009; Kurkina, 2011; Dinana et al, 2001; Nagavani et al., 2010; Vitalini et. al, 2011).

La cromatografia flash (cromatografia preparativa a bassa pressione) è veloce ed è basata sul passaggio di una fase eluente lungo una fase stazionaria. Questo metodo viene utilizzato anche per separare in maniera preparativa i diversi gruppi di componenti biologicamente attivi delle piante (Alabaster et al, 2001; Ivanova et al, 2004; Munkombwe et al, 2003).

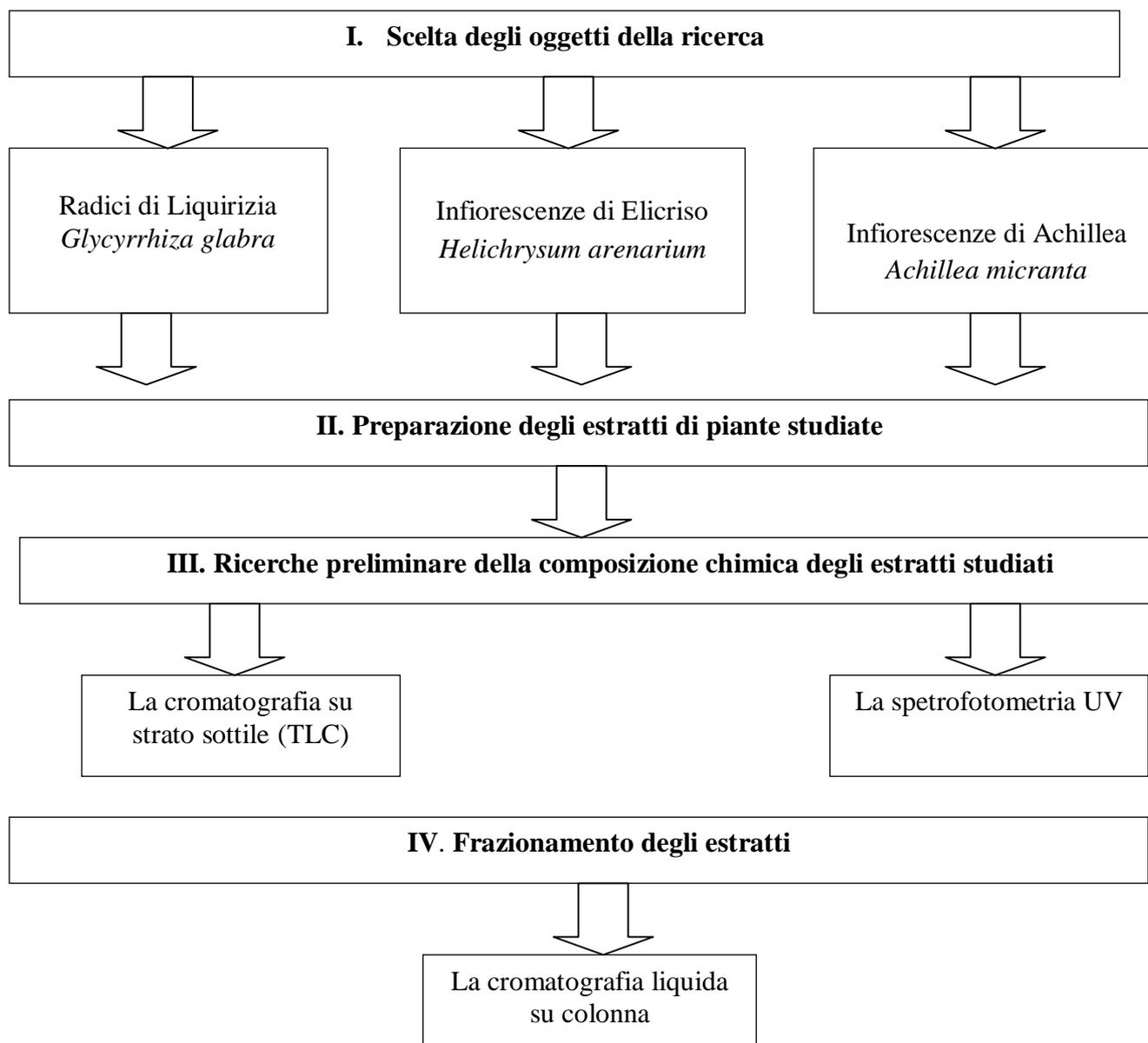
Una tecnica ulteriore sfrutta una serie di colonne cromatografiche in serie, disposte in modo da formare un ciclo chiuso, con il punto di iniezione e di raccolta che si sposta così simulando un movimento della fase stazionaria. Si tratta della

SMB-Chromatography (o cromatografia a letto mobile simulato) che permette separazioni più efficienti per velocità e per risparmio dell'eluente.

CAPITOLO 2. MATERIALI E METODI

2.1. Struttura della ricerca

La ricerca è stata realizzata presso il laboratorio di biotecnologia del dipartimento di biologia dell'Università Statali di Astrakhan (Russia) e presso i laboratori dei dipartimenti di Scienze Molecolari e Nanosistemi (DSMN) e di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica (DAIS) dell'Università Ca' Foscari (Venezia, Italia). La strutturazione del lavoro di ricerca per la determinazione dell'attività antibatterica degli estratti delle piante e composti biologicamente attivi di alcune piante della regione d'Astrakhan, e anche dei metodi per il loro isolamento (estrazione) è riportata nello schema seguente (fig. 4):



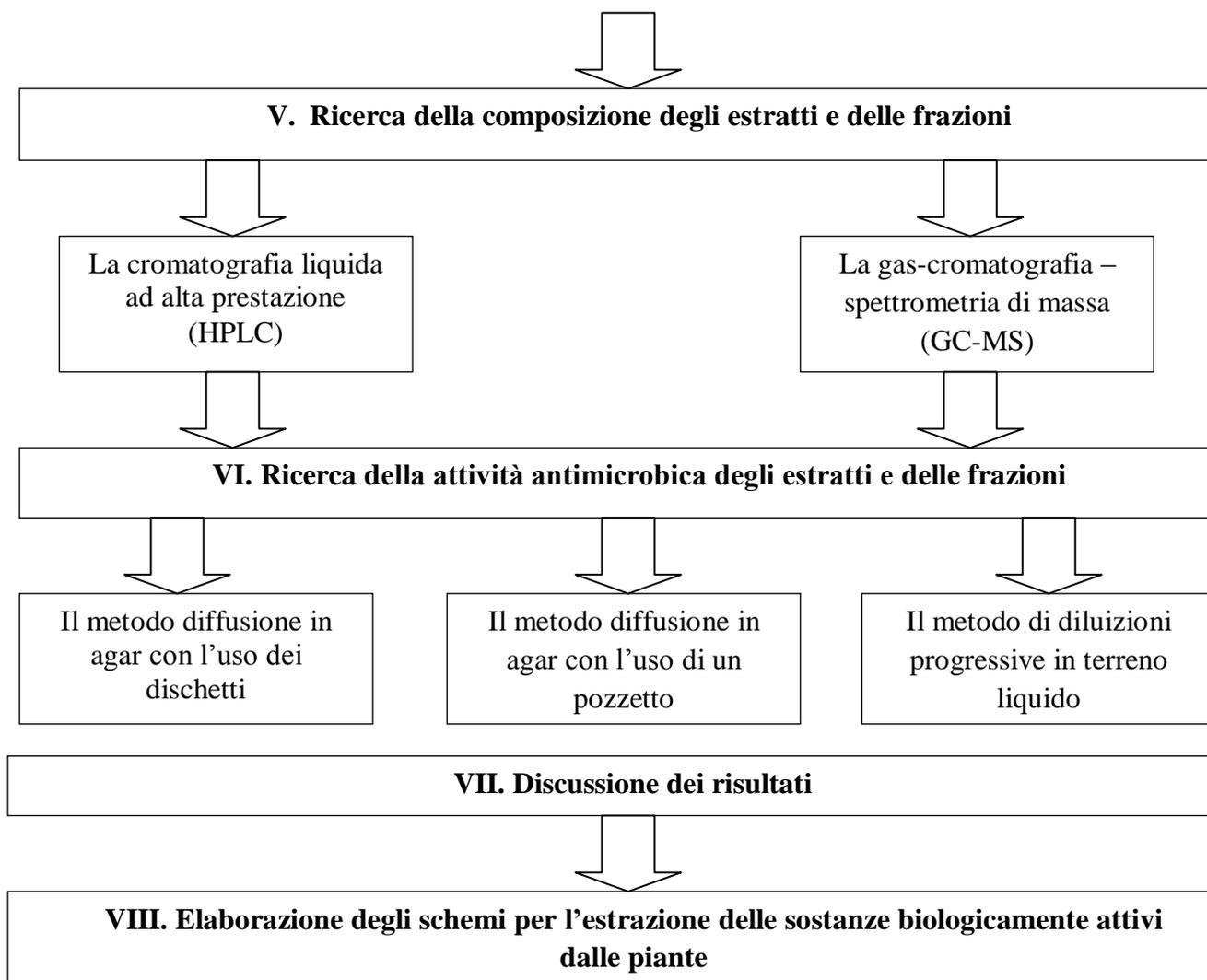


Fig. 4. Struttura della ricerca

2.2. Oggetti studiati (i materiali di ricerca)

Gli oggetti studiati sono state le infiorescenze di achillea *Achillea micranta*, le infiorescenze di elicriso *Helicrysum arenarium*, e le radici di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*. Queste piante sono state prese nel territorio della regione di Astrakhan. Le infiorescenze dell'achillea e dell'elicriso sono state raccolte fra i mesi di maggio e giugno, mentre la radice di liquirizia è stata raccolta nel mese di aprile o in quello di ottobre. Lo studio della composizione chimica e delle proprietà antibatteriche è stato fatto su piante raccolte nello stesso luogo e nello stesso momento.

Come oggetto di confronto con la liquirizia russa è stata usata la radice di *Glycyrrhiza glabra*, che cresce nella regione Calabria (Italia).

Per i test di attività antibatterica sono stati utilizzati i ceppi standard di *Staphylococcus aureus* (BKIM B-1899), *Escherichia coli* (CK BKIM B-1911) e *Bacillus subtilis* (BKIM B-1919), provenienti dalla “Genetica” di Fundamental Research to Industrial Biotechnology (Scientific Center of Russian Federation, Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms).

2.3. Metodi di estrazione dei componenti chimici delle piante

Uno dei modi usati è stata l'estrazione mediante uso di una soluzione acquoso-etanolica al 50%. Una volta preparata la soluzione acquosa di etanolo, questa è stata usata per l'estrazione delle sostanze biologicamente attive di elicriso, di achillea e di liquirizia. L'estrazione è stata condotta operando un rapporto soluzione:massa delle materie vegetali 1: 5 o 1: 10. Ad esempio 20 g di materie prime sono stati estratti con 100 ml di soluzione idroalcolica al 50% (rapporto 1:5) oppure 10 g di materie prime sono stati estratti con 100 ml di soluzione idroalcolica al 50% (rapporto 1:10). Dopo estrazione, la miscela ottenuta è stata rimescolata e conservata in un contenitore di vetro scuro per 7-10 giorni al buio e sotto agitazione. Dopo questo periodo tempo di estrazione, gli estratti sono filtrati e sterilizzati in stufa a secco (dry heat sterilisator). Per l'estrazione delle sostanze biologicamente attive dalle piante esaminate è stata utilizzata come solvente anche acqua.

Un altro metodo usato è basato su una ricetta tradizionale usata per preparare un liquore a base di liquirizia.

300 g di radici di liquirizia proveniente dalla Calabria in pasta solida nera commerciale sono stati sciolti in 2 litri di acqua scaldando; poi sono stati aggiunti 800 g di zucchero di canna; quando tutto è risultato sciolto a caldo sotto agitazione, la miscela è stata un po' raffreddata ed è stato aggiunto 1 litro di alcool etilico 98%; la

miscela è stata poi riportata a temperatura ambiente e conservata in un recipiente di acciaio con coperchio appoggiato su per 40 giorni; poi il liquido è stato recuperato.

Infine sono stati preparati gli estratti delle radici di liquirizia di Astrakhan e di Calabria usando come solventi etanolo al 98%, etilacetato o dietilcarbonato operando come segue: 30 g di radici sminuzzate sono state sospese in 150 ml di solvente in un pallone munito di refrigerante e lasciate per 48 h alla temperatura di riflusso della miscela. La miscela è stata poi riportata a temperatura ambiente e quindi filtrata recuperando il liquido.

2.4. I metodi chimici di analisi per valutare gli estratti delle piante

2.4.1. Spettrofotometria UV

Per le analisi spettrofotometriche è stato utilizzato uno spettrofotometro UV/Vis Beckman DU 640 fornito di celletta termostabile (Hellma, QS1000) con cammino ottico di 1cm. La temperatura di lavoro è stata garantita da un termostato Haake D1.

2.4.2. La cromatografia su strato sottile (TLC)

Come attività preliminare sono state eseguite numerose analisi TLC con varie miscele eluenti a differente polarità e pH degli estratti acquosi ed idroalcolici delle tre piante e si è individuata come promettente per separare alcuni componenti l'etanolo acquoso al 90% contenente 1% di ammoniaca (tabella 1). Abbiamo usato le lastre (Macherey-Nagel) con fase stazionaria a base di silice. L'osservazione dei risultati è stata fatta dopo sviluppo delle lastre in camere di iodio.

È possibile confrontare fra loro le sostanze, presenti in TLC, attraverso i loro R_f (Fattori di Ritardo) cioè in base al rapporto tra la distanza percorsa dalla

sostanza e la distanza percorsa dal solvente (Kirhner, 1981; Berezkinet al., 1994; Stolyarov et. al., 2002; Cseke et. al., 2006).

Tabella 1

Sistemi di solventi studiati per la scelta del giusto sistema di eluizione

Nº	Solventi	Proporzione
1	Etanolo – acqua	90 : 10
2	Etanolo – acqua – acido acetico	90: 10 : 1
3	esano – etanolo	90 : 10
4	esano – etanolo	10 : 90
5	esano – etilacetat	20:80
6	Etanolo – acqua – ammoniacca	90 : 10 : 1
7	Acetone	1
8	Acetone – metanolo	80 : 20
9	Isopropanolo	1
10	Acetonitrile	1

2.4.3. La cromatografia liquida su colonna

Tutti gli estratti sono stati frazionati su colonne cromatografiche ($h = 25$ sm , $d = 2,5$ sm) utilizzando come fase stazionaria la silice (Merck Silica gel Grade 10184, pore size 100 Å, 70-230 mesh SigmaAldrich) oppure la XAD1600 (Rohm&Haas). Come fase mobile è stato usato etanolo acquoso al 90% contenente 1% di ammoniacca. Sono state raccolte numerose frazioni che poi sono state riunite a secondo del profilo analitico su TLC in modo da poter arrivare ad ottenere alcuni componenti arricchiti che successivamente sono stati oggetto di indagine mediante HPLC e HPLC/massa. Sulle frazioni più pulite è stata eseguita una cristallizzazione frazionata come una ulteriore purificazione del componente principale solido per poter anche studiarne la struttura mediante analisi NMR, ma con risultati poco significativi.

2.4.4. La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

Gli estratti acquosi e idroalcolici di radici di liquirizia sono stati oggetto di analisi HPLC/UV (Stiskin et al., 1986; Orlov, 1997; Stolyarov et al., 2002; Skoog et al., 2009) utilizzando un cromatografo liquido Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) dotato di rivelatore UV. Le lunghezze d'onda monitorate sono 254 nm, 280 nm, 275 nm, 330 nm e 350 nm. Il metodo cromatografico ha previsto l'utilizzo di una colonna Phenomenex Synergi 4 μ m Hydro-RP 80 Å; LC column 50 x 4.6 mm (Fase stazionaria: C18 con polar endcapping Supporto solido: Fully porous silica Tecnica separativa: Reversed-phase Massima contropressione: 650 psi Range di pH: 1.5-7.5) e di acetonitrile ed acqua come fase mobile. Sono state utilizzate due diverse corse cromatografiche, una più breve per verificare la composizione degli estratti ed una più lunga per ottenere una migliore separazione dei composti presenti.

Tabella 2

Corsa breve di HPLC

Min	H ₂ O	Acetonitrile
0	100%	0
2	100%	0
12	0	100%
22	0	100%
24	100%	0
34	100%	0

Tabella 3
Corsa lunga di HPLC

Min	H ₂ O	Acetonitrile
0	100%	0
2	100%	0
22	80%	20%
37	60%	40%
52	0	100%
56	0	100%
64	100%	0
74	100%	0

Per l'analisi delle frazioni degli estratti idroalcolici al 50% di liquirizia e degli estratti delle radici di liquirizia di Astrakhan e di Calabria con tutti i solventi impiegati è stato utilizzato un HPLC (Agilent 1200 series, Agilent, Waldbronn, Germany) accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada), dotato di una sorgente Electrospray operante in modalità negativa. È stato inizialmente messo a punto un metodo spettrometrico individuando i seguenti ioni da monitorare per l'identificazione dei composti:

Tabella 4

	Ione molecolare	Frammenti
Glicirrizina	822,6	351,2
		193
Acido 18 β glicirretico	469,6	425
		409,33
		355,2
Glabridin	324,4	

Dato l'insuccesso del metodo utilizzato precedentemente, in questo caso è stata impiegata una colonna Phenomenex Synergi 4 μ m Hydro-RP 80 Å; LC column 50 x 4.6 mm (Fase stazionaria: C18 con polar endcapping Supporto solido: Fully porous silica Tecnica separativa: Reversed-phase Massima contropressione: 650 psi Range di

pH: 1.5-7.5) e come eluenti metanolo e acido formico 0.05% in acqua. Il flusso utilizzato è stato di 0.5 mL/min e il volume di iniezione di 10 microlitri. La corsa cromatografica utilizzata è la seguente:

Tabella 5

Min	Acido formico 0,05%	MeOH
0	100%	0
2	100%	0
12	0	100%
22	0	100%
26	100%	0
36	100%	0

Come lo standard sono state usate le soluzioni di glicirrizina (fig. 5, A), di acido 18 β glicirretico (fig. 5, B) e di glabridin (fig. 6).

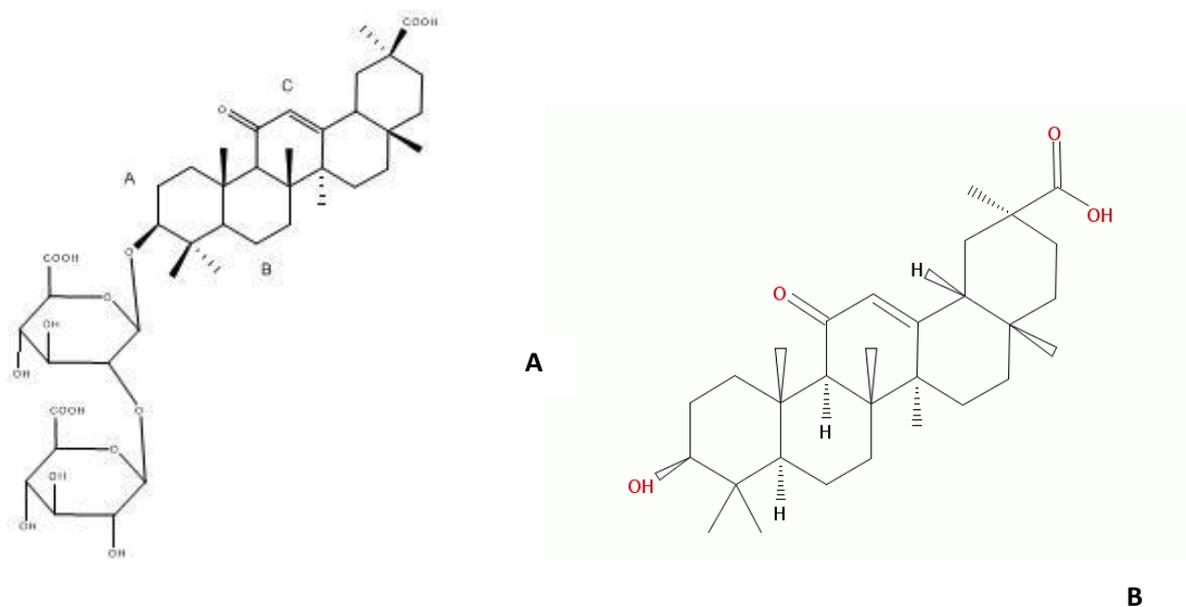


Fig. 5. Glicirrizina (A) e acido 18 β glicirretico (B)

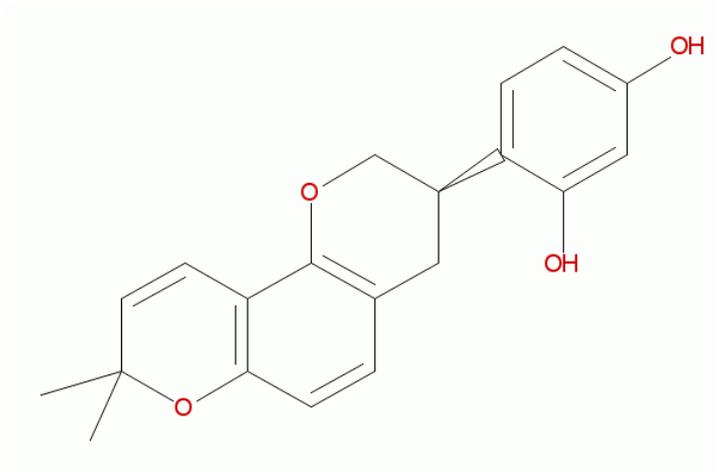


Fig.6. Glabridin

È stata effettuata l'analisi utilizzando una retta di calibrazione esterna, sulla base di coefficiente angolare e intercetta, verificando così anche la linearità strumentale.

Per la retta sono state analizzate 6 soluzioni a concentrazione crescente di entrambi gli standard e precisamente: 1 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 100 pg/ μ L, 500 pg/ μ L, 1 ng/ μ L.

Le varie frazioni sono state pesate (10 mg circa), sciolte in una miscela di EtOH:H₂O e diluite opportunamente. È stata inoltre effettuata una purificazione utilizzando una colonna SPE con fase stazionaria C18 (Maxi-Clean 300 mg, C18, Grace, Belgium), precedentemente condizionata con acqua e metanolo. Da ogni frazione sono state quindi ricavate altre due frazioni, eluite rispettivamente con 3 mL di acqua e 1,5 mL di MeOH 80%/ acqua 20%, in modo da separare i composti meno polari (flavonoidi, polifenoli) da quelli più polari (saponine). Dopo aver verificato attraverso l'utilizzo dei composti standard la distribuzione degli analiti nelle due frazioni raccolte, si è deciso di analizzare solamente le frazioni in metanolo 80%/ acqua 20%. Nella frazione acquosa non è stata riscontrata una quantità significativa degli analiti.

2.4.5. La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)

Alcune frazioni da cromatografia su colonna degli estratti di radici di liquirizia sono stati esaminati con il metodo della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) (Ciang, 1980; Breitmaier, 2002) utilizzando uno spettrofotometro NMR Bruker – 500 (Germania).

2.4.6. Gas-cromatografia – spettrometria di massa (GC-MS)

Gli estratti idroalcolici al 50% delle infiorescenze di achillea e di elicriso sono stati studiati mediante gascromatografia – spettrofotometria di massa (GC-MS) utilizzando un gascromatografo di massa Shimadzu GC/MS (QP-5050A, Shimadzu, Giappone). Il metodo cromatografico ha previsto l'utilizzo di una colonna DBI, 30 m; 0,53mm (identificatore) \times 1,5 μ m (J&W, USA). È stato usato elio come fase mobile. La corsa cromatografica utilizzata è la seguente: temperatura iniziale di 50°C mantenuta per 1 minuto, rampa di 10°C al minuto fino a 150°C mantenuti per 1 min, rampa di 5°C al minuto fino a 250°C mantenuti per 5 min, rampa di 3,5°C al minuto fino a 270°C mantenuti per 2 minuti. Temperatura dell'iniettore: 280°C e temperatura del detector di 250°C. Il flusso utilizzato è stato di 20 mL/min e il volume di iniezione di 2 microlitri.

2.5. Metodi microbiologici

Per testare l'attività antibatterica degli estratti sono stati impiegati i seguenti microrganismi: *Staphylococcus aureus* (BKПM B-1899), *Escherichia coli* (CK BKПM B-1911) e *Bacillus subtilis* (BKПM B-1919). La sensibilità dei microrganismi agli estratti studiati si definisce mediante l'uso di due metodi: il metodo della

diffusione in agar (il metodo della diffusione in agar con l'uso dei dischetti e il metodo della diffusione in agar con l'uso di un pozzetto) e il metodo della diluizioni progressive in un terreno liquido. Il metodo di diffusione in agar è un metodo qualitativo. Il metodo delle diluizioni progressive è un metodo quantitativo più preciso (Alesciukina, 2003). Per ogni campione sono stati fatti tre saggi.

2.5.1. Il metodo di diffusione in agar con l'uso i dischetti di carta (Sukhenko, 1999; Dzerginskaya, 2004)

Per le prove microbiologiche è stato usato un terreno all'agar. Come controllo sono stati usati dischetti di carta impregnati con antibiotici di produzione industriale (tetraciclina, cloramfenicolo, streptomycin).

I dischetti di carta sterili di 6 mm (carta da filtrato) sono stati impregnati con 10 µl di ogni soluzione studiata (gli estratti e le frazioni). Sul terreno all'agar in una piastra di Petri è stato depositato 1 mL di coltura analizzata. I dischetti sono stati collocati sulla superficie dell'agar. Le piastre di agar sono state esaminate dopo 24 ore di incubazione a 37° per valutare gli aloni di inibizione. Per ogni campione sono stati fatti tre saggi.

2.5.2. Il metodo di diffusione in agar con l'uso di un pozzetto (Sukhenko, 1999; Dzerginskaya, 2004)

Sulla superficie di un terreno all'agar in piastre di Petri, è stato seminata la coltura saggiata; mediante tubi di vetro sterilizzato (diametro 6-8 mm) sono stati creati dei pozzetti(6) che si dispongono a raggiera sulla piastra di agar ad una distanza di 2,5 cm dal centro e ad un angolo di 60° tra loro e ad una distanza di 1,5 - 2 cm dal bordo della piastra.

Nei pozzetti sono stati messi 20 µl di soluzione esaminata (l'estratto o la frazione). Le piastre sono state poi incubate in un termostato per 24 ore a 37⁰. Dopo l'incubazione è stato valutato il diametro gli aloni di inibizione.

L'attività antibatterica della soluzione esaminata è direttamente proporzionale alle zone d'inibizione di crescita delle colture di batteri.

Per ogni campione degli estratti e delle frazioni sono stati fatti tre saggi.

2.5.3. Determinazione dell'attività antibatterica mediante conta delle unità formanti colonie (UFC)

Per studiare l'effetto degli estratti sulla crescita di microrganismi è stato usato un terreno all'agar, che è stato cotto con estratti di piante. È stato preparato il terreno all'agar secondo il metodo standard (Sukhenko, 1999), ma invece dell'acqua distillata abbiamo usato gli estratti acquosi ottenuti dalle piante studiate. Il terreno preparato è stato filtrato attraverso carta da filtro e versato in piastre Petri. Sulla superficie di agar solidificato è avvenuta la semina in sospensione dei microrganismi (Dzerzhinskaya, 2004). La sospensione è stata preparata in soluzione fisiologica sterile. Un ml di sospensione contiene circa 2 miliardi di cellule. È stata seminata la sospensione di microrganismo con distribuzione uguale sulla superficie dell'agar. Poi le piastre sono state incubate in un termostato a 37 °C per 24 ore. I risultati della determinazione quantitativa dei microrganismi sono stati espressi in UFC - unità formanti colonie (Netrusov et al, 2005.). I campioni degli estratti sono stati testati tre volte.

2.5.4. Le tecnica di diluzioni progressive in terreno liquido (Alesciukina, 2003; Netrusov, 2005)

Nelle prove mediante diluizione la sensibilità di microrganismi viene valutata in base alla loro crescita o meno in un terreno di coltura, solido o liquido, contenente

diverse concentrazioni dei farmaci. Questo metodo è quantitativo e consente di determinare accuratamente oltre alla MIC (la concentrazione minima inibente) anche la MBC (la concentrazione minima battericida), ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di distruggere la totalità dei batteri.

Nel test di diluizione in brodo di coltura è stata preparata una serie di provette di terreno (brodo) contenenti diverse concentrazioni di estratti o frazioni e ad esse è stata aggiunta una quantità definita del microrganismo da testare. I ceppi sono stati coltivati su agar. Ogni ceppo è stato testato con i campioni, diluiti in brodo in modo da ottenere concentrazioni comprese in un intervallo tra 1000 µg/ml e 1,9 µg/ml. I campioni sono stati prelevati ed inoculati con 1 ml di soluzione fisiologica contenente 10^5 - 10^6 cellule batteriche ed incubati per 24h alla temperatura di 37° C. I valori della MIC sono stati determinati come la più bassa concentrazione di estratto studiato che non permetteva alcuna visibile crescita di microrganismi, dopo incubazione. Come controllo positivo, è stata usata una coltura contenente solo soluzione fisiologica sterile tamponata.

Dopo l'incubazione a 37° C, le provette sono state osservate per rilevare l'assenza di crescita batterica e quindi l'azione battericida dei campioni. I campioni sono stati testati tre volte.

2.6. I metodi statistici

L'analisi statistica è stata effettuata mediante metodi standard della statistica matematica (Lakin, 1990; Kozak, 1995). Per l'analisi dei dati ottenuti e raccolti in tabelle e la costruzione dei grafici e per ottenere alcuni parametri statistici sono stati usati Microsoft Excel 2003 e Statistica 6.1.

CAPITOLO 3. VALUTAZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA DEGLI ESTRATTI OTTENUTI DALLE PIANTE USATE

Le proprietà delle piante (antimicrobici, antiossidanti, ecc), così come i diversi prodotti di origine vegetale, dipendono, in primo luogo, dalla composizione chimica quantitativa e qualitativa.

Questo capitolo riporta informazioni qualitative o quantitative sulla composizione chimica degli estratti delle piante studiate – achillea, *Achillea micrantha*, elicriso, *Helichrysum arenarium*, e liquirizia, *Glycyrrhiza glabra*, così come su alcune delle frazioni ottenute mediante separazione cromatografica.

3.1. I risultati delle analisi di spettrometria-UV degli estratti studiati

Gli spettri in figura 7 mostrano l'assorbanza (Abs) degli estratti di liquirizia al variare della lunghezza d'onda della radiazione UV o Visibile (da 200 a 600 nm). L'assorbanza nell'intervallo di lunghezza d'onda considerato può considerarsi direttamente legata alla presenza di composti organici contenenti gruppi cromoforici, quali il carbossilico, il carbonilico, il fenolico, e quindi alla presenza di principi attivi come saponine e flavonoidi. Negli spettri si vede che l'assorbanza risulta simile per gli estratti acquosi e per quelli idroalcolici. Per *Achillea micrantha* l'assorbanza risulta più elevata per l'estratto acquoso, con un picco a 261 nm mentre per *Glycyrrhiza glabra* l'assorbanza risulta più alta per l'estratto idroalcolico, con due massimi a 270 e 317 nm. I risultati delle analisi spettrofotometrica sembrerebbero indicare che gli estratti acquosi o idroalcolici delle piante studiate - *Gl. glabra* (radici), *A. micrantha* (infiorescenze) e *H. arenarium* (infiorescenze) contengono composti fenolici (flavonoidi). La presenza negli estratti di queste sostanze potrebbe determinare le proprietà antimicrobiche di tali estratti come sarà descritto nel Capitolo 4.

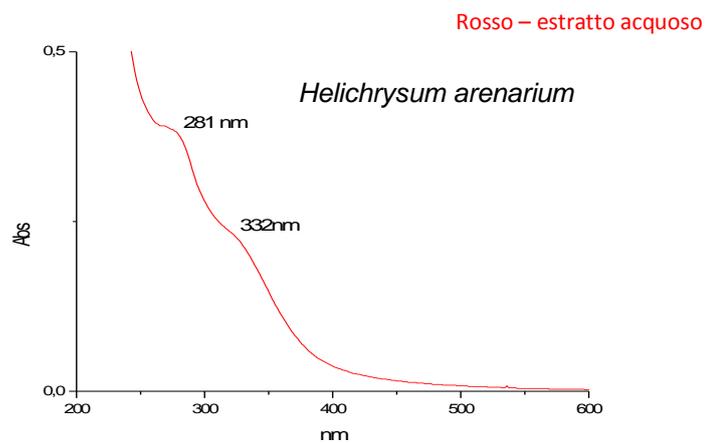
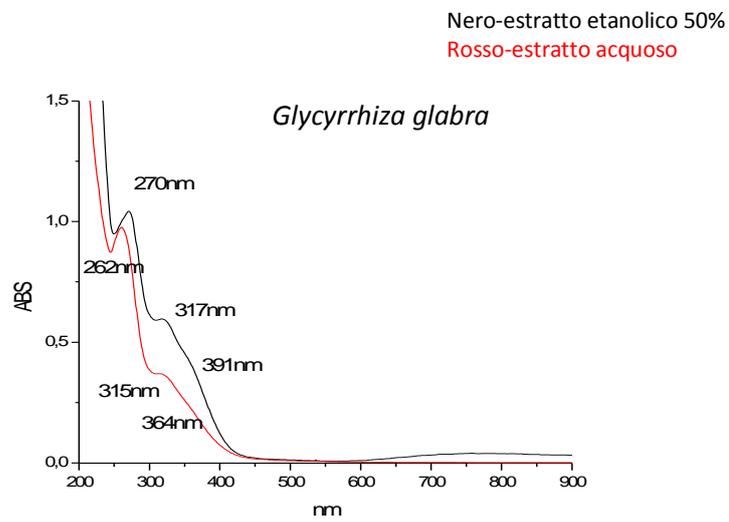
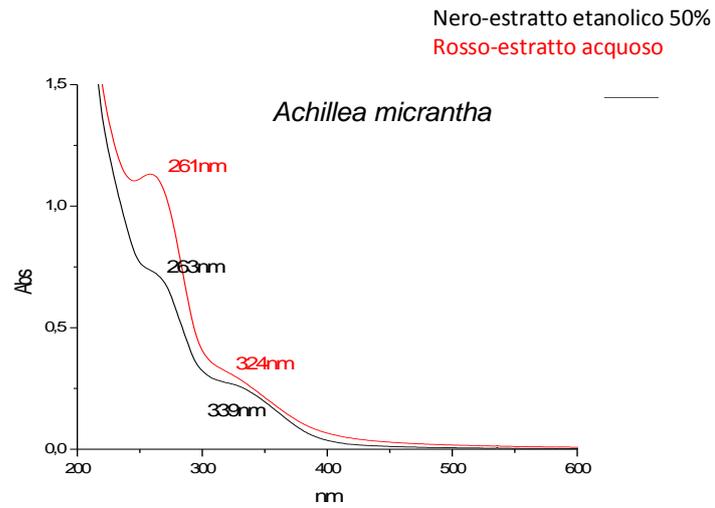


Fig. 7. Spettri UV degli estratti delle piante studiate

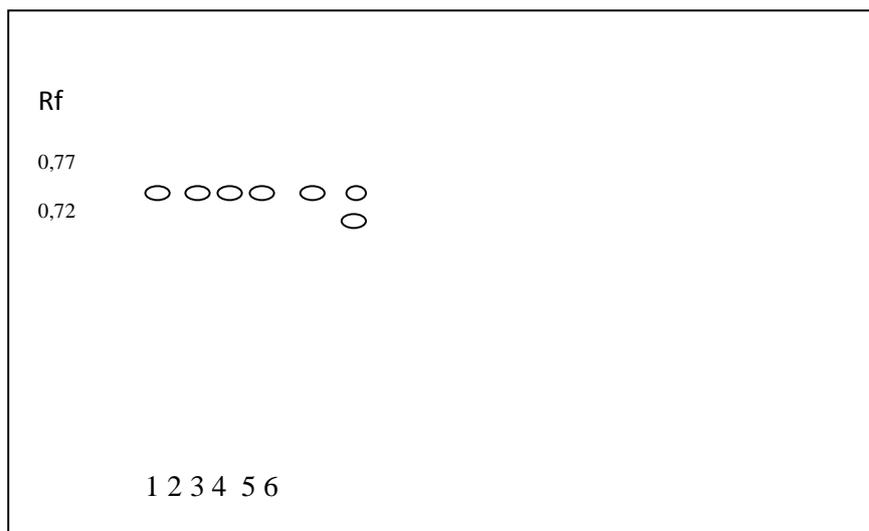


Fig. 9. TLC delle frazioni dell'estratto acquoso di infiorescenze di *Helichrysum arenarium*

In figura 9 sono riportati i risultati TLC del frazionamento mediante cromatografia su colonna dell'estratto acquoso di infiorescenze di *H. arenarium*. Cinque delle frazioni raccolte contenevano un gruppo di composti chimici (ca. a $R_f = 0,74$) mentre la sesta frazione evidenziava la presenza di due gruppi diversi ad R_f molto vicino.

I risultati TLC delle 8 frazioni raccolte durante il frazionamento dell'estratto idroalcolico al 50% di infiorescenze *H. arenarium* (fig. 10) hanno evidenziato un comportamento anomalo rispetto a quanto visto in precedenza nell'estratto non frazionato, forse dovuto a decomposizione/trasformazione avvenuta o nel campione usato per il frazionamento o su colonna. Sono state infatti evidenziate solo macchie corrispondenti a gruppi di sostanze a bassi valori di R_f . Sarà necessario un eventuale futuro approfondimento dell'indagine su questo tipo di campione.

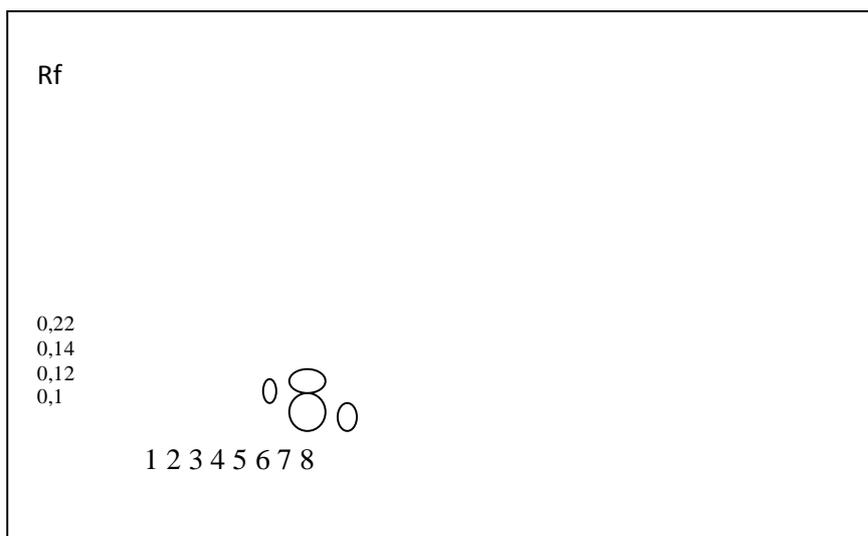


Fig. 10. TLC delle frazioni di estratto etanolic (50%) di infiorescenze di *Helichrysum arenarium*

Per l'estratto idroalcolico di infiorescenze di *A. micrantha* sono state raccolte cinque frazioni, la cui analisi TLC è riportata in fig. 11. Come si può vedere il frazionamento non è stato efficiente in quanto in quasi tutte le frazioni, ad eccezione della quinta, si hanno miscele di sostanze con simili composizioni.

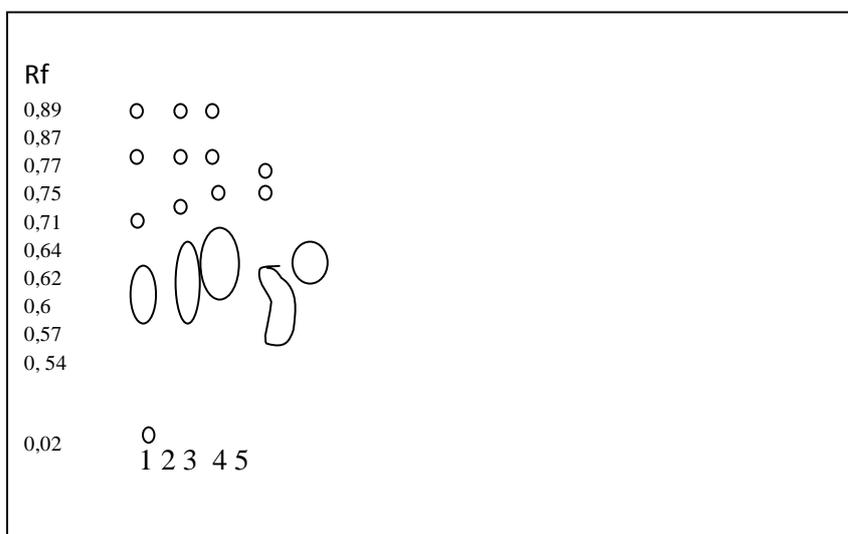


Fig. 11. TLC delle frazioni dell' estratto etanolic (50%) di infiorescenze di *Achillea micrantha*

In figura 12 si riportano i risultati ottenuti riguardanti nove frazioni ottenute su colonna cromatografica eluendo l'estratto idroalcolico al 50% delle radici di *Gl. glabra* con il sistema eluente scelto. Si osserva che sono state ottenute più sostanze appartenenti a più di un gruppo. Nelle frazioni 1, 2 e 3 sono presenti due gruppi di sostanze ($R_f = 0,8$ e $R_f = 0,87$), nelle frazioni 4,5,6 è presente un solo gruppo di sostanze ($R_f \approx 0,6$), nella settima frazione forse un nuovo gruppo di sostanze ($R_f \approx 0,67$), nelle frazioni 8 e 9 a parte un nuovo gruppo di sostanze ($R_f \approx 0,56$) sono riapparse macchie corrispondenti a valori alti di R_f , probabile indizio di qualche decomposizione in colonna.

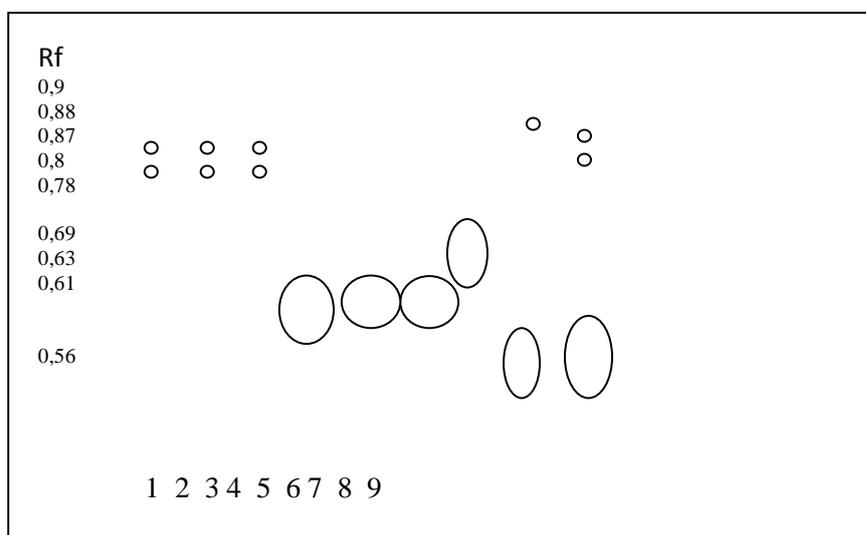


Fig. 12. TLC delle frazioni di estratto etanologico 50% delle radici di *Glycyrrhiza glabra* (la fase stazionaria è XAD 1600)

Molto poco efficiente è risultato invece il frazionamento sulla stessa fase stazionaria XAD 1600 dell'estratto acquoso delle radici di *Gl. glabra* dove come evidenzia la TLC si sono ottenute sempre miscele complesse di prodotti (fig. 13).

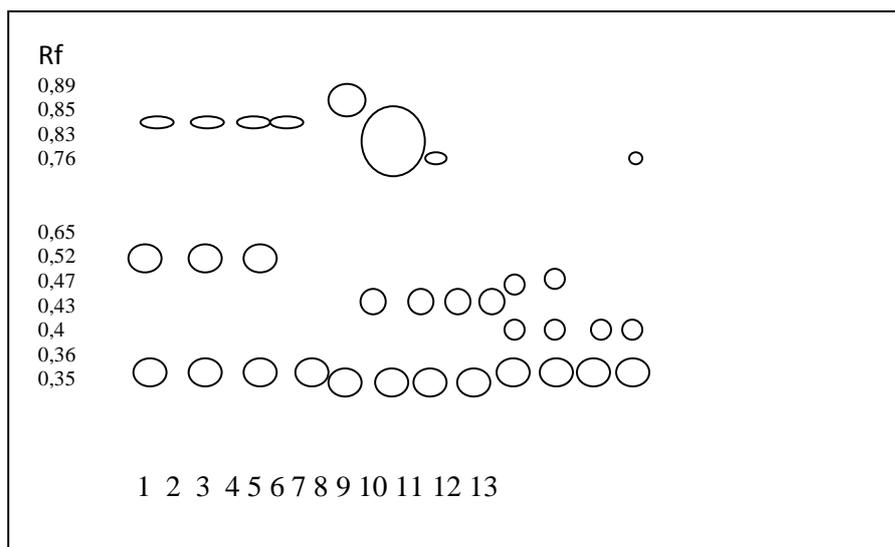


Fig.13. TLC delle frazioni di estratto acquoso delle radici di *Glycyrrhiza glabra* (fase stazionaria è XAD 1600)

È stato fatto anche un tentativo di frazionare su silice l'estratto idroalcolico al 50% delle radici del *Gl. glabra* raccogliendo 21 diverse frazioni per vedere di isolare qualche prodotto puro; i risultati (fig. 14) non sono stati molto incoraggianti anche se apparentemente alcune frazioni (5-9, 16-17, 18-19, 20) evidenziavano un unico segnale; è possibile che ci sia stata qualche degradazione/trasformazione in colonna così da giustificare forse il risultato delle frazioni 20 e 21.

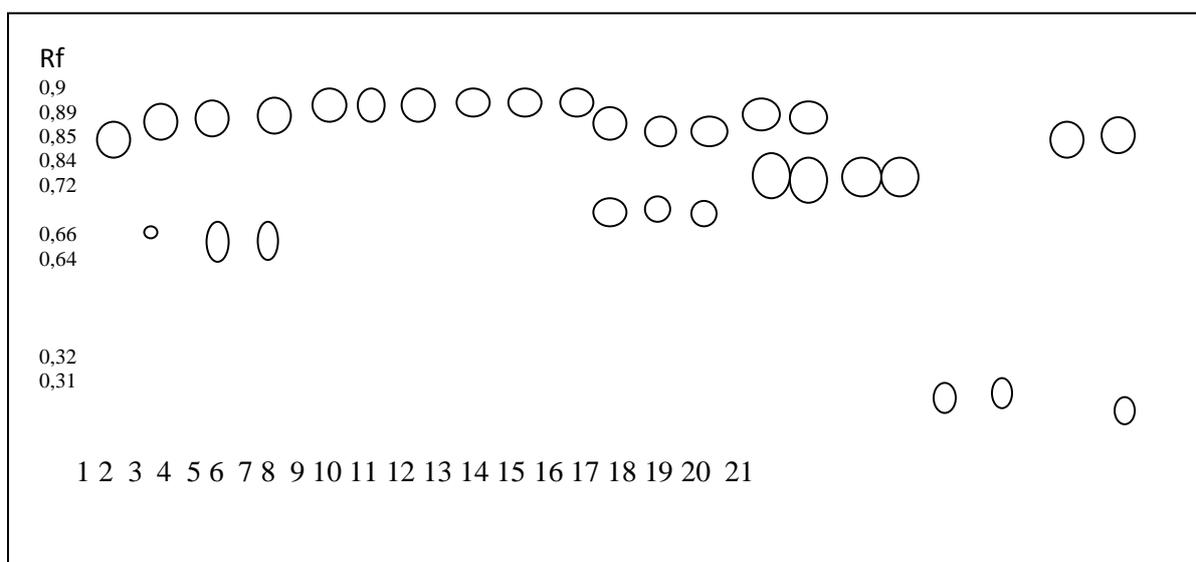


Fig.14. TLC di frazione (fasi stazionaria - silicagel) degli estratti etanolici di radici di *Glycyrrhiza glabra* (regione di Astrakhan)

La figura 15 mostra i risultati delle frazioni di TLC ottenute a partire dalla pasta di liquirizia da *Gl. glabra* (Calabria, Italia) usando il procedimento con acqua ed etanolo in presenza di zucchero, mediante cromatografia su colonna usando gel di silice come fase stazionaria.

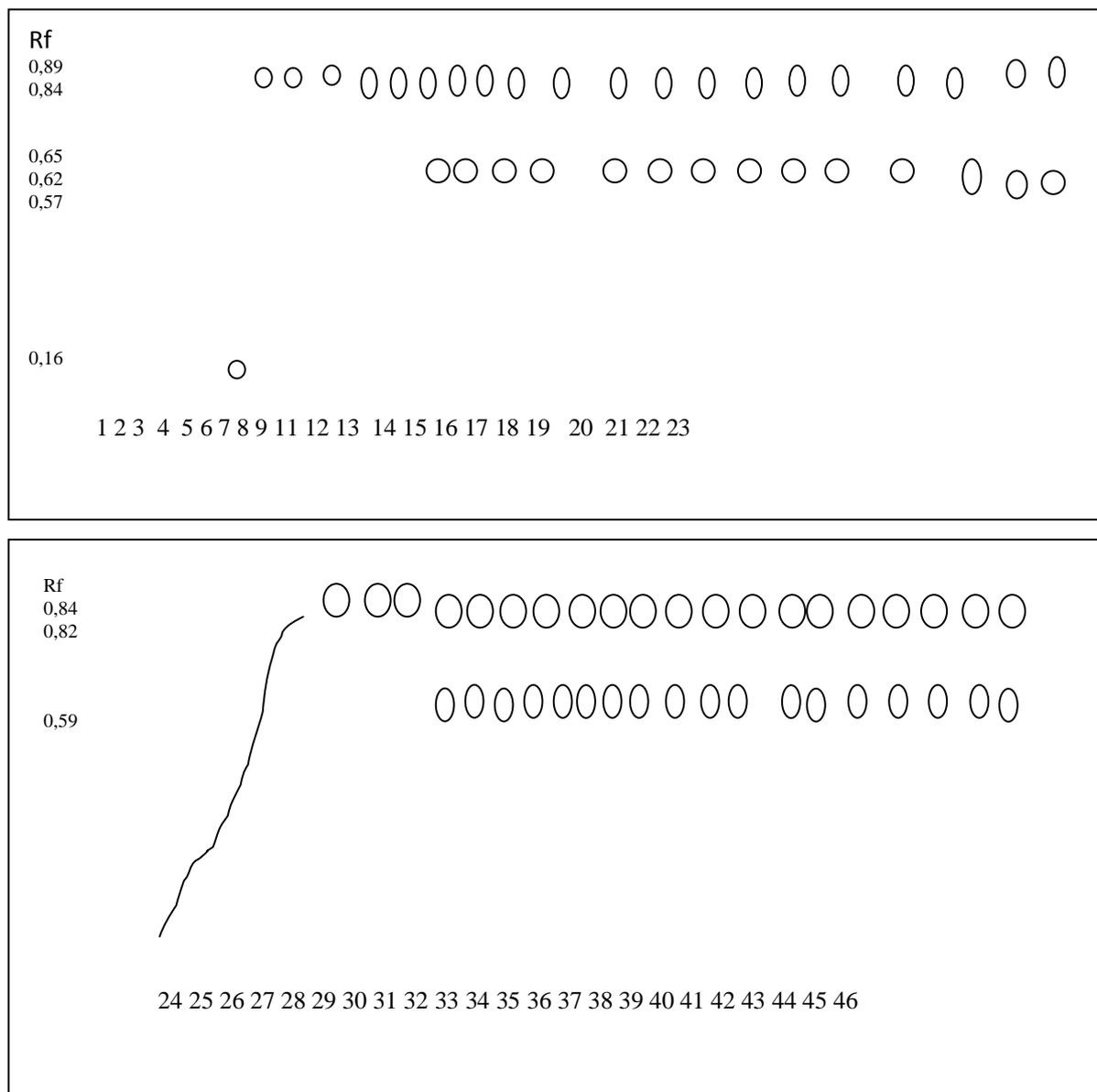
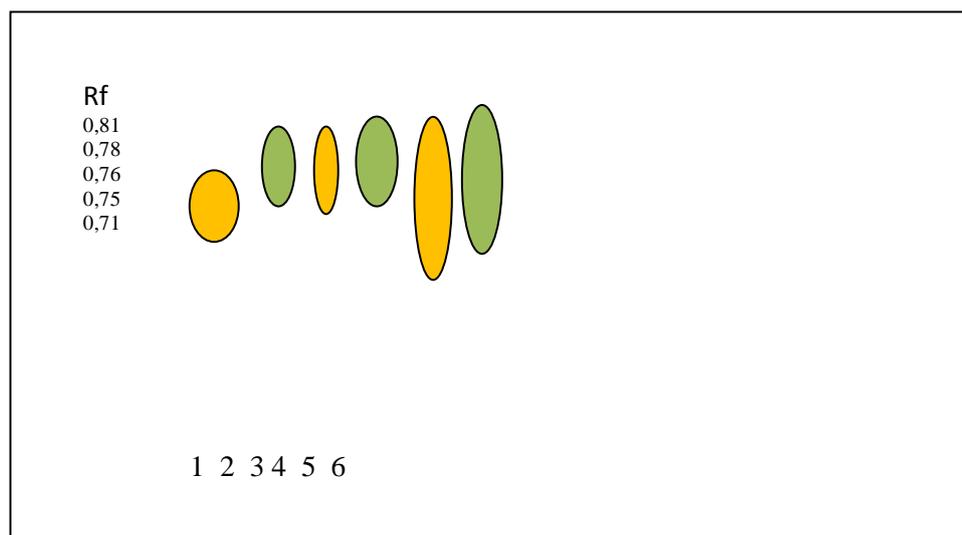


Fig. 15. TLC di frazione (fase stazionaria -silicagel) di estratto idroalcolico al 50% delle radici di *Glycyrrhiza glabra* (Calabria, Italia)

Anche in questo caso la maggior parte delle numerose frazioni rivela un mancato frazionamento con due gruppi di sostanze a $R_f \approx 0,84$ e $R_f \approx 0,6$. È da notare che il frazionamento era stato inizialmente interrotto dopo 20 frazioni ed alla ripresa della eluizione le prime frazioni hanno riprodotto la situazione iniziale con un solo gruppo di sostanze a $R_f \approx 0,84$.

Confrontando i risultati delle frazioni di TLC di estratti di radice di liquirizia, che cresce nella regione di Astrakhan (fig. 14) e da pasta nera commerciale ottenuta da radice di liquirizia della Calabria (Italia meridionale) (fig. 15) uno stesso gruppo di sostanze a $R_f = 0,85$ risulta presente mentre sostanze diverse si osservano nei due campioni. Ciò può essere dovuto a diversi motivi, tra cui sicuramente importante potrebbe essere la lavorazione industriale effettuata con spremitura ad acqua per ottenere la pasta nera che potrebbe eliminare alcuni componenti presenti inizialmente nelle radici. È stato pertanto deciso di acquisire direttamente campioni di radici di liquirizia dalla Calabria per un migliore confronto a parità di condizioni di estrazione con i campioni di radici di liquirizia raccolti nella regione di Astrakhan (Russia), anche usando solventi di estrazione differenti da quelli tradizionali.

La figura 16 mostra i risultati TLC di estratti di radice di vari tipi di *Gl. glabra*, raccolti nella regione di Astrakhan (Russia) e nella regione della Calabria (Italia), usando tre diversi sistemi di estrazione al riflusso del solvente: etil acetato; etanolo 100% ; dietilcarbonato. Come si può vedere, in etilacetato le radici dei due tipi di *Gl. Glabra* risultano significativamente differenti, mentre gli estratti in etanolo 100% e in dietilcarbonato dall'analisi qualitativa TLC non mostrano significative differenze.



- 1 l'estratto in etilacetato da radici di *Glycyrrhiza glabra* (regione di Astrakhan) ;
 2 l'estratto in etilacetato da radici di *Glycyrrhiza glabra* (regione Calabria) ;
 3 l'estratto in etanolo (100%) di radice di *Glycyrrhiza glabra* (regione di Astrakhan) ;
 4 l'estratto in etanolo (100%) di radice di *Glycyrrhiza glabra* (regione Calabria) ;
 5 l'estratto in dietilcarbonato da radici di *Glycyrrhiza glabra* (regione di Astrakhan) ;
 6 l'estratto in dietilcarbonato da radici di *Glycyrrhiza glabra* (regione Calabria).

Fig.16. TLC degli estratti di radici di *Glycyrrhiza glabra*

3.3. Frazioni principali ottenute mediante cromatografia su colonna da estratti delle piante

I risultati del frazionamento degli estratti studiati mediante cromatografia su colonna sono presentati nella tabella № 6.

Tabella 6

L'estratto	Peso secco (mg)/ peso estratto liquido (g)	Fase stazionaria	Fase mobile	Frazione	peso secco (g)
50% etanolo di infiorescenze di <i>H. arenarium</i>	13,40mg/5g	XAD 1600	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (4) II (5) III (6)	0,85 0,92 0,4
acquoso di infiorescenze di <i>H.arenarium</i>	11,38mg/5g	XAD 1600	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (1-5) II (6)	1,87 0,95
50 % etanolo di infiorescenze di <i>A.micrantha</i>	16,14mg/5g	XAD 1600	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (1-7) II (8-10) III (11-15)	2,98 1,32 0,50
50% etanolo di radice <i>Gl. glabra</i> (regione di Astrakhan)	25,24mg/5g	XAD 1600	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (1) II (2-3) III (4-7) IV (8-9) V (10-12)	0,7 0,493 0,726 0,072
acquoso di radice di <i>Gl. glabra</i> (regione di Astrakhan)	24,4mg/5g	XAD 1600	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (1-4) II (5) III (6-7) IV (8) V (9-11)	0,84 0,032 0,05 0,0085 1,07
50% etanolo di radice di <i>Gl. glabra</i> (regione di Astrakhan)	25,24mg/5g	Silice	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (1) II (2-5) III (6-11) IV (12-18) V (19-20) VI (21-23)	0,2128 0,04 0,0192 0,0052 0,015 0,0942
idralcolico & zucchero da pasta nera da <i>Gl. glabra</i> (Calabria)	16,5mg/5g	silice	etanolo:acqua: ammoniaca 90:10:1	I (4) II (5) III (6-8) IV (9-20) V (21-23) VI (24-28) VII (29-31) VII (32-46)	0,0041 0,0059 0,2506 1,06 0,237 0,179 0,0311 2,547

Alcune di queste frazioni sono state poi esaminate mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e spettroscopia-NMR.

3.4. Ricerca del contenuto di acido glicirrizico (glicirrizina) e 18 β acido glicirretico nelle frazioni di estratto etanologico della radice di *Glycyrrhiza glabra* mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

I risultati dell'indagine mediante HPLC sul contenuto di questi due prodotti nelle frazioni raccolte da estratto etanologico al 50% di radice di *Gl. glabra* (E1-E5) utilizzando standard di acido glicirrizico e acido 18 β glicirretico sono presentati in tabella 7.

Tabella 7

Frazioni di estratti	Concentrazione in solido (ng/ μ l)	Quantità acido glicirrizico (area)	Quantità 18 β acido glicirretico (area)
E1	2,5	12064	67600
E2	1	8575	54210
E3	1,1	8345	9781
E4	2	5735	21690
E5	0,8	59737	410750

Come si può vedere dalla tabella 7 la maggior concentrazione di acido glicirrizico (glicirrizina) e 18 β acido glicirretico è stata riscontrata nella frazione E5. Tuttavia la presenza dei medesimi composti in tutte le frazioni conferma un frazionamento non efficiente.

Per la determinazione quantitativa è stata utilizzata una retta di calibrazione esterna, sulla base di coefficiente angolare e intercetta, verificando così anche la linearità strumentale.

Per la retta sono state analizzate 6 soluzioni a concentrazione crescente di entrambi gli standard e precisamente: 1 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 100 pg/ μ L, 500 pg/ μ L, 1 ng/ μ L. Di seguito si riportano le due rette di calibrazione degli analiti, l'equazione della retta e R² (fig. 17).

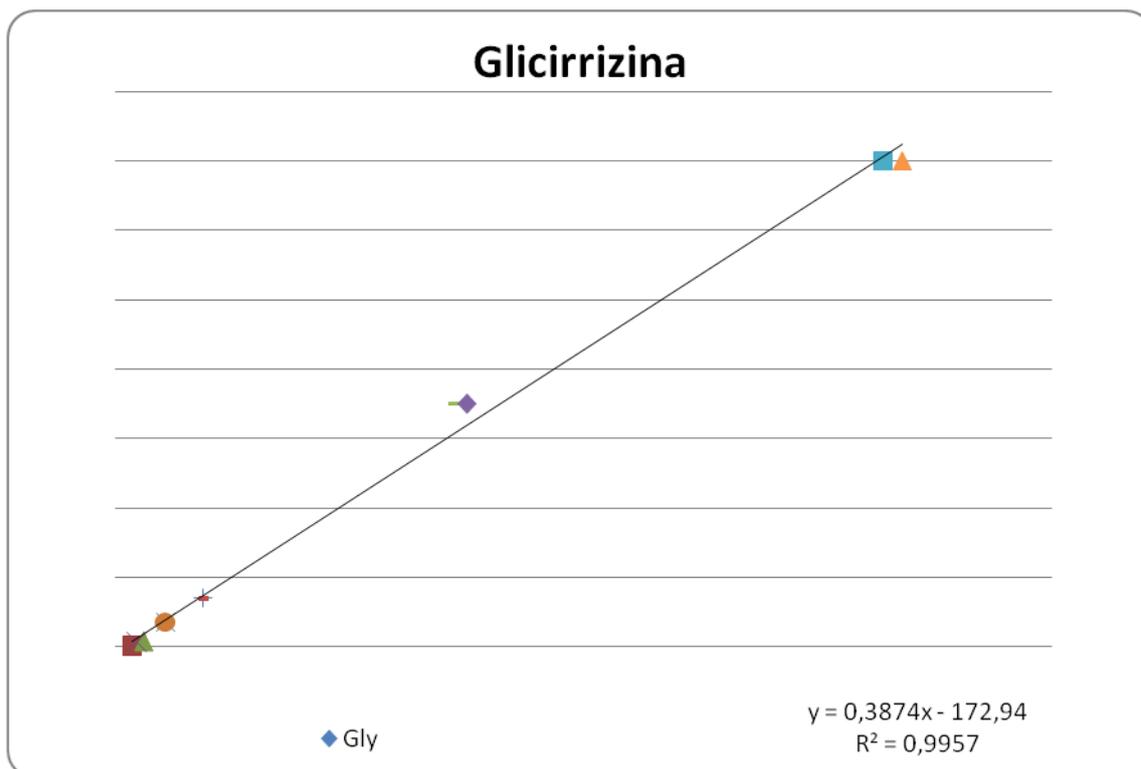


Fig. 17 La retta di calibrazione di glicirrizina (acido glicirrizico)

Il limite di rivelabilità (LOD) strumentale è stato calcolato come tre volte il rapporto segnale/rumore alla concentrazione più bassa degli standard analizzata, ovvero il punto più basso della retta di calibrazione (1 pg/ μ L) (tabella 8).

Tabella 8

Il calcolo del limite di rivelabilità cromatografica per soluzioni standard di glicirrizina e di 18 β acido glicirretinico

Limite di rivelabilità strumentale	Glicirrizina (pg)	Acido 18 beta glicirretinico (pg)
LOD (s/n=3)	8,6	2,2

Tabella 9

Il contenuto quantitativo di glicirrizina e acido 18 β glicirretico in frazioni di estratto etanolo 50% di radice di *Glycyrrhiza glabra* (regione di Astrakhan)

Frazioni	Concentrazione mg composto/gr solidi		Percentuale in peso del composto su peso secco campione (%)	
	Glicirrizina	acido 18 β glicirretico (intervallo)	glicirrizina	acido 18 β glicirretico
E1	3,4	4×10^{-4} - 1×10^{-3}	0,34	-
E2	2,5	1×10^{-3} - 3×10^{-3}	0,25	-
E3	4,7	9×10^{-4} - 1×10^{-3}	0,47	-
E4	4,6	5×10^{-4} - 2×10^{-3}	0,46	-
E5	5,2	1×10^{-3} - 4×10^{-3}	0,52	-

I risultati presentati in tabella 9 (e fig. 18) mostrano che la più alta concentrazione di glicirrizina è stato rilevato nella frazione di E5, ma quantità di poco inferiori si ritrovano anche nelle frazioni E3 ed E4. 18 β - acido glicirretico era presente in quantità minima, al limite della rivelabilità, nella maggior parte delle frazioni valutate.

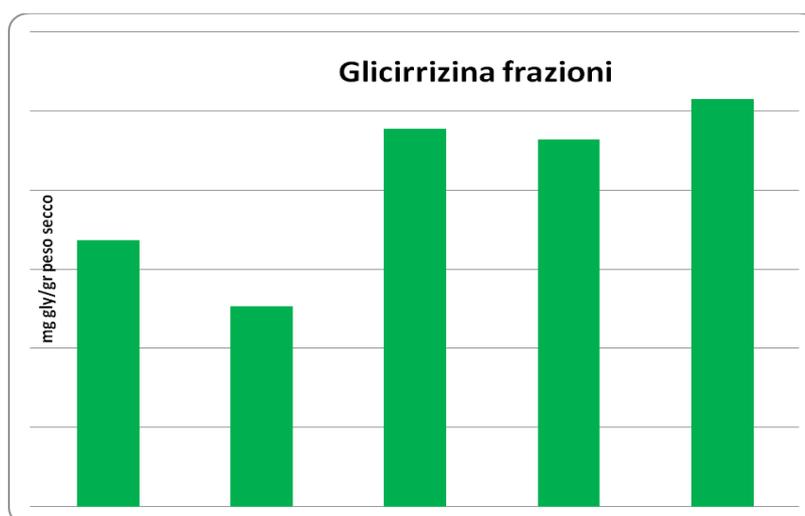


Fig. 18. Contenuto di glicirrizina nelle frazioni di estratto etanolico al 50% di radici di liquirizia della regione di Astrakhan

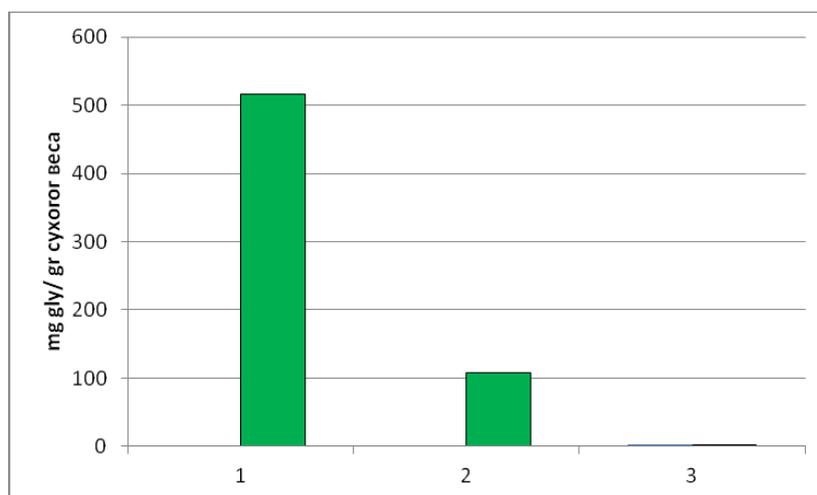
3.5. Risultati comparativi del contenuto di glicirrizina e 18 β acido glicirretinico in estratti con solventi diversi dalle radici di *Glycyrrhiza glabra*, che crescono nella regione di Astrakhan (Russia) e in Calabria (Italia) mediante il metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

In Tabella 10 (e visivamente in fig.19) sono riportati alcuni interessanti dati preliminari relativi al contenuto di questi due prodotti valutando sia il solvente usato per l'estratto sia l'origine della radice di liquirizia usata. Come si può vedere l'etanolo al 50% è molto più efficiente del dietilcarbonato nell'estrarre la glicirrizina, mentre una situazione opposta si ha nell'estrarre l'acido 18 β glicirretico. Il risultato era prevedibile per il fatto che la glicirrizina ha nella sua struttura una parte zuccherina molto più polare ed idrofila che la rende quindi molto più solubile in etanolo al 50% rispetto ad un solvente meno polare quale il dietilcarbonato. Sorprendente invece il fatto che entrambi i componenti indagati risulterebbero molto più abbondanti nella radice di liquirizia che cresce nella regione di Astrakhan rispetto ai medesimi nella radice di liquirizia che cresce in Calabria. Questo dato potrebbe però essere stato determinato da diversi fattori: situazioni climatiche particolari, differente periodo di raccolta o diversa età della radice campione e pertanto tale indagine andrà ulteriormente approfondita in futuro per valutare su più campioni la varianza del dato. Tale parametro è infatti fondamentale per una applicazione industriale.

Tabella 10

Il contenuto quantitativo di glicirrizina e 18 β acido glicirretico negli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra*, cresciuta nella regione di Astrakhan (Russia) e in Calabria (Italia)

Estratti	Concentrazione mg composto/gr solidi		Percentuale in peso del composto su peso secco campione (%)	
	Glicirrizina	acido18 β glicirretico (range)	glicirrizina	acido18 β glicirretico
Etanolo 50% (regione di Astrakhan)	516	1×10^{-4} - 4×10^{-4}	51,6	-
Dietilcarbonato estratto (regione di Astrakhan)	108	10,81	10,8	1,1
Dietilcarbonato estratto (regione di Calabria)	0,42	5×10^{-4} - 1×10^{-3}	0,04	-



- 1 l'estratto in etanolo 50% da radici di liquerizia (regione di Astrakhan) ;
- 2 l'estratto in dietilcarbonato da radici di liquirizia (regione di Astrakhan) ;
- 3 l'estratto in dietilcarbonato da radici di liquirizia (regione Calabria).

Fig. 19. Il contenuto di glicirrizina negli estratti della radice di *Gl. glabra*

3.6. Risultati comparativi del contenuto di glabridin degli estratti della radice di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, che crescono nella regione Astrakhan (Russia) e in Calabria (Italia)

Proseguendo nel confronto tra le radici cresciute in regioni diverse, si è deciso di indagare su un altro composto, il glabridin, che in letteratura (Gupta et al., 2008) era indicato come particolarmente importante per determinare le proprietà antibatteriche degli estratti di liquirizia.

Le concentrazioni nei due estratti sono state ricavate attraverso l'equazione della retta, sulla base dell'area del picco ottenuta dall'analisi cromatografica HPLC e riferita ad uno standard puro. La concentrazione di Glabridin nei estratti di liquirizia della Calabria e della regione di Astrakhan, riferita al volume di estratto, è risultata essere 35 ng/ μ L nell'estratto di liquirizia calabrese e 33 ng/ μ L di liquirizia russa. I due valori risultano quindi estremamente simili e la differenza non può considerarsi significativa.

3.7. Ricerca di sostanze biologicamente attive negli estratti etanolicci 50% di infiorescenze di *A.micrantha* mediante gascromatografia- spettrometria di massa (GC-MS)

Sono state identificate 19 diverse sostanze nell'estratto di etanolo 50% di infiorescenze di achillea *A.micrantha* mediante GC-MS (tabella 11).

Tabella 11

Composizione dell' estratto etanolic 50% di infiorescenze di achillea

Nº	Sostanze	Indice di ritenzione	%
1.	α -pinene	939	2,46
2.	β -pinene	982	2,1
3.	Canfene	945	0,5
4.	Sabinene	974	0,1
5.	Limonene	1029	1,3
6.	1,8-eucaliptolo	1043	8,47
7.	γ -terpinene	1179	4,9
8.	Linalolo	1097	0,56
9.	Mentenolo	1132	2,93
10.	Canfora	1156	10,62
11.	Borneolo	1169	1,37
12.	Terpineolo	1174	1,53
13.	Piperitone	1224	34,15
14.	Bornilacetato	1237	1,32
15.	Carvone	1242	24,93
16.	β -sitosterolo		0,7
17.	Stigmasterolo		0,24
18.	Butilftalato		1,37
19.	Acido stearico		0,45

Tra le 19 sostanze, che sono stati trovate nell' estratto etanolic (50%) di infiorescenze di achillea, 17 sono terpeni, di cui i più abbondanti sono il Piperitone (34.15%) e il Carvone (24,93%).

I composti chimici individuati sono di solito inclusi negli oli essenziali. Nell'industria queste sostanze si usano come aromi alimentari (piperitone, carvone, limonene, bornilacetato), come componenti in profumi (piperitone, 1,8-cineolo, borneolo), in olio aromatico (linalolo), in prodotti cosmetici (linalolo, acido stearico), ovvero si usano per la sintesi di altre sostanze (per esempio, il piperitone si usa per la sintesi del mentolo; i pineni per la sintesi di canfora; il linalolo per la

sintesi del linalilacetato), per la produzione di insetticidi (canfene), in aromaterapia (carvone, canfora), in medicina (1,8 - cineolo, canfora, β -sitosterolo, stigmasterolo).

Il piperitone, il carvone e il terpineolo (1,4%) risultano avere proprietà antimicrobiche.

3.8. Ricerca di sostanze biologicamente attive negli estratti etanolic 50% di infiorescenze di *H.arenarium* mediante gascromatografia- spettrometria di massa (GC-MS)

Sono state identificate 17 diverse sostanze nell' estratto di etanolo 50% di infiorescenze di elicriso *H.arenarium*, mediante GC-MS (tabella 12).

Tabella 12

Composizione dell'estratto etanolic 50% di infiorescenze di elicriso

Nº	Sostanze	Indice di ritenzione	%
1.	β -pinene	979	1,8
2.	1,8-cineolo	1035	5,9
3.	Linalolo	1095	0,8
4.	Nonale	1104	1,7
5.	Terpineolo	1164	1,5
6.	Decanale	1203	1,6
7.	Carvacrolo	1298	1,4
8.	Nerilacetato	1362	54,3
9.	α -copaene	1377	2,7
10.	Tetradecane	1402	1,6
11.	Trans-cariofillene	1418	8,3
12.	α -humulene	1455	1,9
13.	β -farnesene	1459	2,4
14.	δ -muurolene	1481	1,7
15.	β -ionene	1490	0,8
16.	δ -cadinene	1515	3,7
17.	Octyl ftalate		7,9

Tra 17 sostanze che sono state determinate nell'estratto etanolo (50%) di infiorescenze di elicriso, 13 sono terpeni, di cui il più abbondante è il neril acetato. Il Carvacrolo (1,4%) è noto inibire la crescita di *E. coli* e di *B. cereus*.

I composti chimici individuati sono di solito inclusi negli oli essenziali. Nell'industria queste sostanze si usano nella sintesi di sostanze pregiate (β -pinene per sintetizzare sostanze aromatiche; terpineolo per la sintesi di sostanze aromatiche), come componenti di oli essenziali (1,8-cineolo), di aromi (terpineolo, nonale, decanale), di profumi (nonale, decanale, neril acetato, cariofillene, α -humulene, β -farnesene, β -ionone), in medicina (1,8-cineolo, carvacrolo) come componenti in cosmetici (α -copaene).

È da notare che sebbene la composizione sia qualitativamente e quantitativamente simile a quella dei corrispondenti oli essenziali, il metodo qui usato di estrazione con soluzione di etanolo al 50% delle infiorescenze di elicriso e achillea è più facile. Per qualche componente, come ad esempio il nerilacetato, l'estrazione permette di ottenerne un quantitativo superiore a quello presente nell'olio essenziale; infatti nell'olio essenziale di elicriso, varietà *Helichrysum angustifolium*, il contenuto di neril acetato arriva al 40%, nell'olio essenziale della varietà *Helichrysum italicum* è compreso tra il 36,6% ed il 47,5%, mentre nell'estratto etanolo (50%) di infiorescenze di *Helichrysum arenarium* raggiunge il 54,3%.

CAPITOLO 4. RICERCA DELLE PROPRIETÀ ANTIBATTERICHE DEGLI ESTRATTI DELLE PIANTE USATE

Sono state studiate nel corso della presente ricerca le proprietà antibatteriche degli estratti delle seguenti piante - liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, achillea *Achillea micrantha* ed elicriso *Helichrysum arenarium*. Inoltre la dipendenza dell'azione antimicrobica della composizione quantitativa e qualitativa delle frazioni isolate e degli estratti è stata verificata.

Per valutare l'attività antibatterica sono state fatte tre prove per ogni campione.

4.1. Ricerca comparativa dell'attività antibatterica degli estratti idroalcolici al 50% e acquosi delle infiorescenze di Elicriso e Achillea e delle radici di Liquirizia

L'attività antibatterica degli estratti acquosi ed idroalcolici al 50% delle infiorescenze di *H. arenarium*, di *A. micrantha* e delle radici di *Gl. glabra* è stata esaminata mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso dei dischetti (Tabella 13) e mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso del pozzetto (Tabella 14). Nello studio dell'attività antibatterica degli estratti delle piante mediante il metodo di diffusione in agar con i dischetti è stato utilizzato come controllo i dischetti standard impregnati di antibiotici commerciali.

Tabella 13

Studi comparativi dell'attività antibatterica degli estratti acquosi ed idroalcolici al 50% di piante studiate (metodo di diffusione in agar con l'uso dei dischetti)

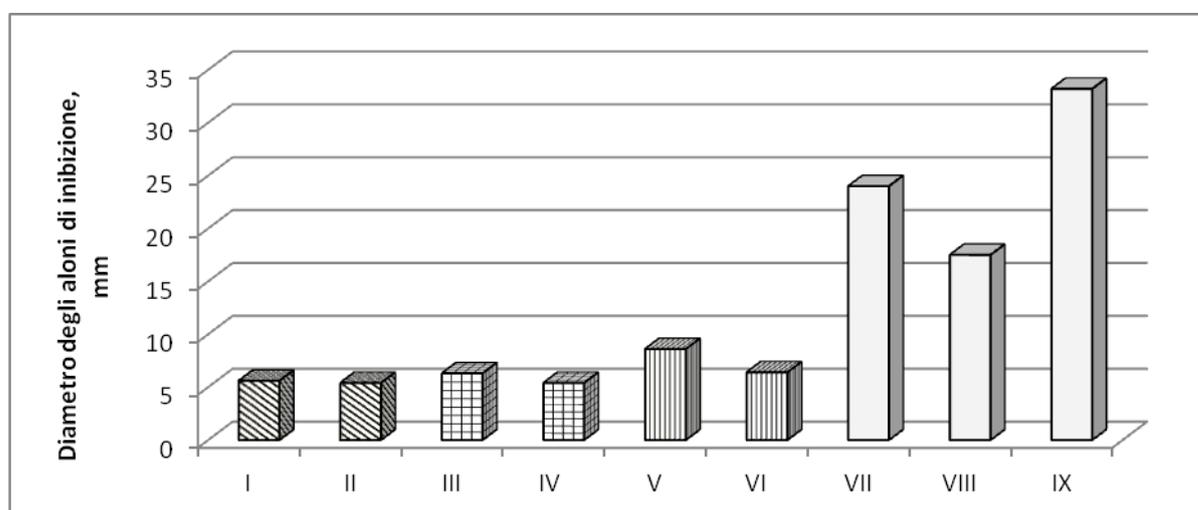
Gli estratti	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
etanologico (50%) di infiorescenze di <i>A. micrantha</i> (I)	5,6±0,5	5,8±0,4	6,5±0,9
acquoso di infiorescenze di <i>A. micrantha</i> (II)	5,4±0,2	4,3±0,2*	4,6±0,5
etanologico(50%) di infiorescenze di <i>H. arenarium</i> (III)	6,3±0,7	6,9±1,3	8,25±3,6
acquoso di infiorescenze di <i>H.arenarium</i> (IV)	5,4±0,3	5,5±0,9*	3,6±0,8
etanologico (50%) di radice di <i>Gl. glabra</i> (V)	8,6±2,1	8,0±2,1	5,2±0,9
acquoso di radice di <i>Gl. glabra</i> (VI)	6,4±0,2	6,7±0,4*	4,6±1,1
Streptomicina (VII)	24,0±2,8	22,0±3,0	11,0±2,3
Tetraciclina (VIII)	17,5±1,9	8,0±1,2	12,6±3,2
Cloramfenicolo (IX)	33,2±3,1	23,3±1,5	7,8±1,9

* - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$;

Come si può vedere dai dati inseriti in tabella 13, la più alta attività contro le colture di *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis* è stata osservata per i seguenti antibiotici: Streptomicina, Tetraciclina e Cloramfenicolo. Nelle diverse piante fra gli estratti acquosi ed etanolici (50%), questi ultimi hanno sempre mostrato una attività antibatterica più alta, probabilmente per una maggiore quantità di principi attivi di media polarità (flavonoidi) che possono risultare meglio estratti da etanolo acquoso e non da sola acqua. Tuttavia è possibile che l'attività antibatterica dell'estratto acquoso sia determinata o compensata dalla maggiore quantità di sostanze polari come saponine, glicosidi e in particolare glicirrizina. Mentre l'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra* si è mostrato il più attivo dei tre estratti di piante nei confronti di *E. coli* e di *St. aureus*, l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di

H.arenarium è risultato il più efficace nei confronti di *B. subtilis*. Gli estratti acquoso ed etanologico di infiorescenze *A. micrantha* contro tutti tre ceppi di microrganismi (*E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*) hanno invece mostrato l'attività antibatterica più bassa sia rispetto agli altri estratti sia verso gli antibiotici. Sebbene gli antibiotici hanno un maggiore effetto antibatterico (Tabella 13) contro colture rispetto agli estratti, quest'ultimi presentano una più prolungata azione antimicrobica (Sukhenko et al., 2010).

Contro ceppi di *E.coli* l'effetto antibatterico più efficace è stato trovato per l'estratto idroalcolico al 50% della radice di *Gl. glabra* (V) (fig. 20).

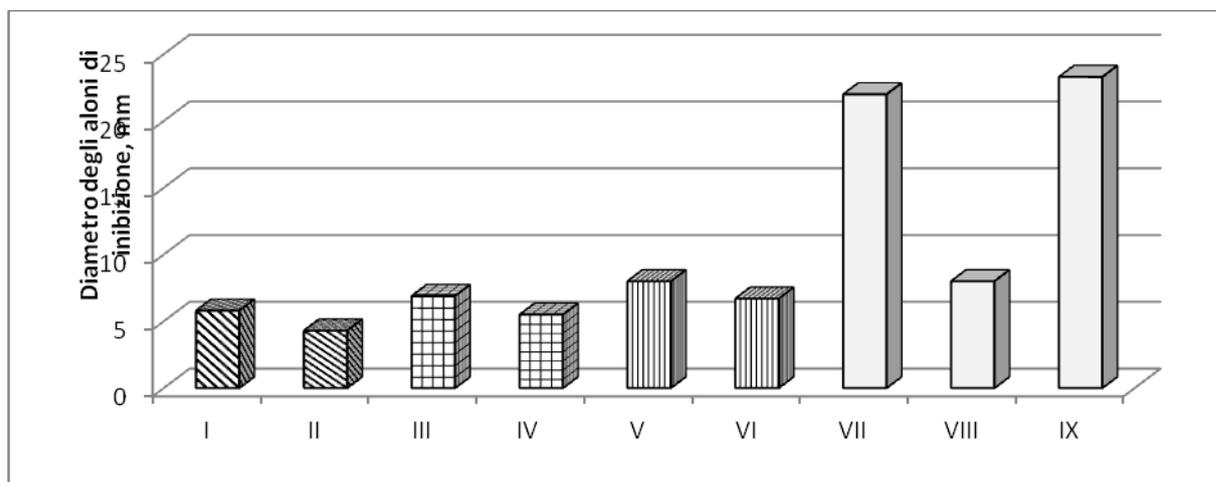


- I- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *A. micrantha*
- II- l'estratto acquoso di infiorescenze di *A. Micrantha*
- III- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *H. arenarium*
- IV- l'estratto acquoso di infiorescenze di *H.arenarium*
- V- l'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra*
- VI- l'estratto acquoso di radice di *Gl. glabra*
- VII- streptomicina
- VIII- tetraciclina
- IX- cloramfenicolo

Fig. 20. L'azione degli estratti studiati sulla crescita di *E.coli* (il metodo di diffusione con l'uso dei dischetti)

L'estratto idroalcolico al 50% delle radici di *Gl. glabra* (V) ha anche mostrato una forte attività antibatterica contro i ceppi di *St. aureus* comparabile a quella della Tetraciclina (VIII). L'estratto idroalcolico al 50% delle infiorescenze di *H. arenarium*

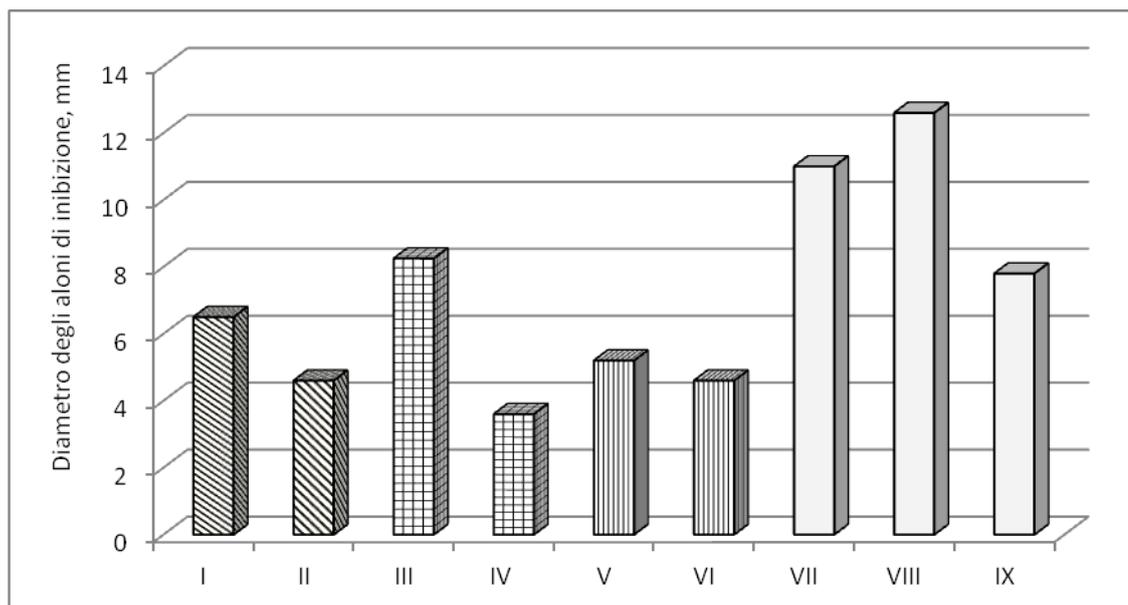
(III) ha mostrato un'attività leggermente inferiore rispetto a quella dell'estratto di radice *Gl. glabra* (V) (fig. 21).



- I- l'estratto etanólico (50%) di infiorescenze di *A. micrantha*
- II- l'estratto acquoso di infiorescenze di *A. Micrantha*
- III- l'estratto etanólico (50%) di infiorescenze di *H. arenarium*
- IV- l'estratto acquoso di infiorescenze di *H.arenarium*
- V- l'estratto etanólico (50%) di radice di *Gl. glabra*
- VI- l'estratto acquoso di radice di *Gl. glabra*
- VII- streptomicina
- VIII- tetraciclina
- IX- cloramfenicolo

Fig. 21. L'azione degli estratti studiati sulla crescita di *St. aureus* (il metodo di diffusione con l'uso dei dischetti)

Contro il ceppo di *B.subtilis* l'estratto etanólico al 50% di infiorescenze di *H.arenarium* (III) ha avuto l'attività antibatterica più alta, superiore a quella del Cloramfenicolo (IX) (fig.22).



- I- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *A. micrantha*
 II- l'estratto acquoso di infiorescenze di *A. Micrantha*
 III- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *H. arenarium*
 IV- l'estratto acquoso di infiorescenze di *H.arenarium*
 V- l'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra*
 VI- l'estratto acquoso di radice di *Gl. glabra*
 VII- streptomicina
 VIII- tetraciclina
 IX- cloramfenicolo

Fig. 22. L'azione degli estratti studiati sulla crescita di *B. subtilis* (il metodo di diffusione con l'uso dei dischetti)

L'effetto antibatterico degli estratti acquosi ed idroalcolici al 50% delle infiorescenze di *H. arenarium* e di *A. micrantha* e delle radici di *Gl. glabra* è stato studiato anche mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso del pozzetto (Tabella 14). I risultati ottenuti sono simili a quelli ottenuti con il metodo di diffusione in agar con l'uso dei dischetti. Tuttavia, gli indicatori del diametro degli aloni di inibizione ottenuti con il metodo con l'uso dei pozzetti sono superiori ai dati ottenuti con il metodo con l'uso dei dischetti. Nel metodo con l'uso dei pozzetti l'estratto diffonde direttamente nel terreno di coltura. E nel metodo con l'uso dei

dischetti l'estratto diffonde fuori dal disco di carta ma su questo potrebbe rimanere una parte dei principi attivi delle piante.

In questo caso per confronto è stato usato sia un estratto di propolis al 10%, le cui proprietà antibatteriche dovute principalmente a due flavonoidi, pinocembrina e pinostrombina, sono ben note, (Fabris et al., 2012). sia il solo etanolo al 50% .

Tabella 14

Studi comparativi dell'attività antibatterica degli estratti acquosi ed acquosi di etanolo al 50% delle piante (mediante metodo di diffusione in agar con l'uso dei pozzetti)

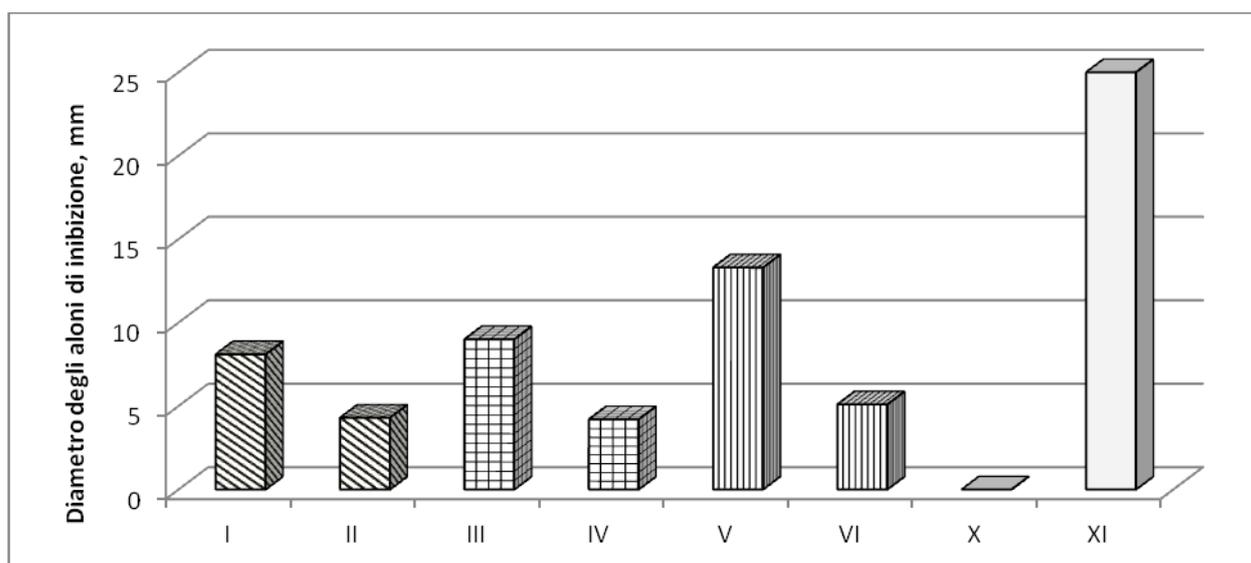
Gli estratti	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
etanolico (50%) di infiorescenze di <i>A. micrantha</i> (I)	8,1±0,6	7,0±0,3*	7,5±0,1*
acquoso di infiorescenze di <i>A. micrantha</i> (II)	4,3±0,2	6,7±0,2*	6,4±0,5
etanolico(50%) di infiorescenze di <i>H. arenarium</i> (III)	9,0±1,0	7,5±1,2	9,6±0,2*
acquoso di infiorescenze di <i>H.arenarium</i> (IV)	4,2±0,3	5,4±1,2*	4,6±0,8
etanolico (50%) di radice di <i>Gl. Glabra</i> (V)	13,3±2,1	9,8±1,2	6,5±0,3*
acquoso di radice di <i>Gl. glabra</i> (VI)	5,1±0,3	8,9±0,5*	5,6±0,9
50% etanolo (X)	0	0	0
propolis 10% (XI)	25,0±1,2	18,8±1,3	13,5±2,1

* - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$; 0-assenza di un'azione antimicrobica

La tabella 14 mostra che l'estratto etanolico (50%) di radice di liquirizia è risultato il più efficace contro due dei tre i ceppi microbici testati (*E. coli* e *St. aureus*), ma in particolare contro *E.coli*, mentre l'estratto etanolico (50%) di infiorescenze di elicriso ha avuto l'attività antibatterica più alta contro ceppi di *B. subtilis*. Risulta poi significativo che gli estratti acquoso e etanolico (50%) di radice

di liquirizia contro *St. aureus* hanno dimostrato un elevato e comparabile effetto inibitorio. Tuttavia molto più efficace è risultato l'estratto di propolis al 10%.

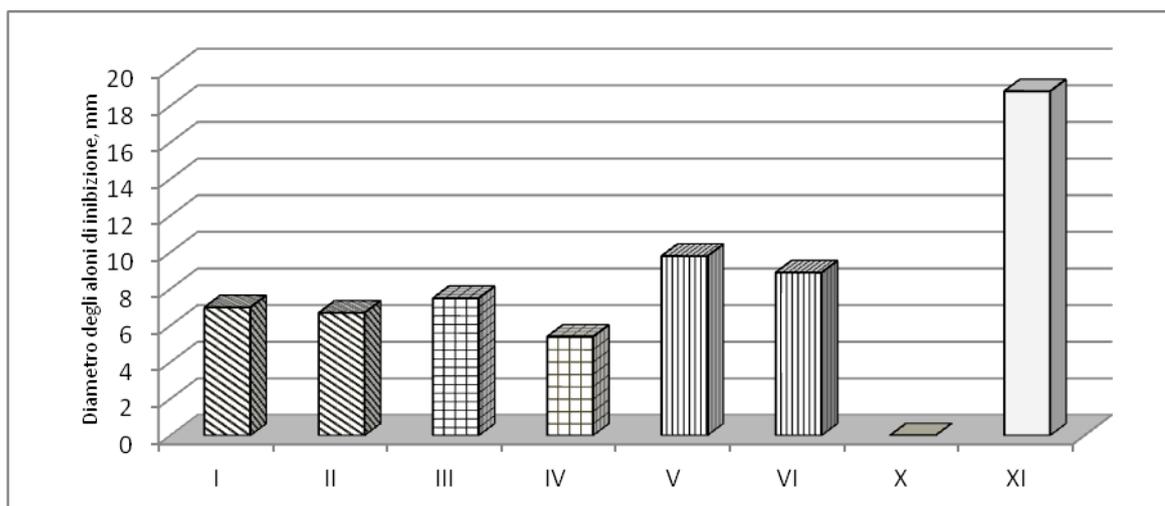
Nella figura 23 ci sono i risultati dello studio dell'attività antibatterica contro *E.coli* degli estratti studiati, ottenuti dal metodo di diffusione in agar con l'uso dei pozzetti.



- I- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *A. micrantha*
- II- l'estratto acquoso di infiorescenze di *A. Micrantha*
- III- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *H. arenarium*
- IV- l'estratto acquoso di infiorescenze di *H.arenarium*
- V- l'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra*
- VI- l'estratto acquoso di radice di *Gl. glabra*
- X - 50% etanolo
- XI - propolis 10%

Fig. 23. L'azione degli estratti studiati sulla crescita di *E.coli* (il metodo di diffusione con l'uso del pozzetto)

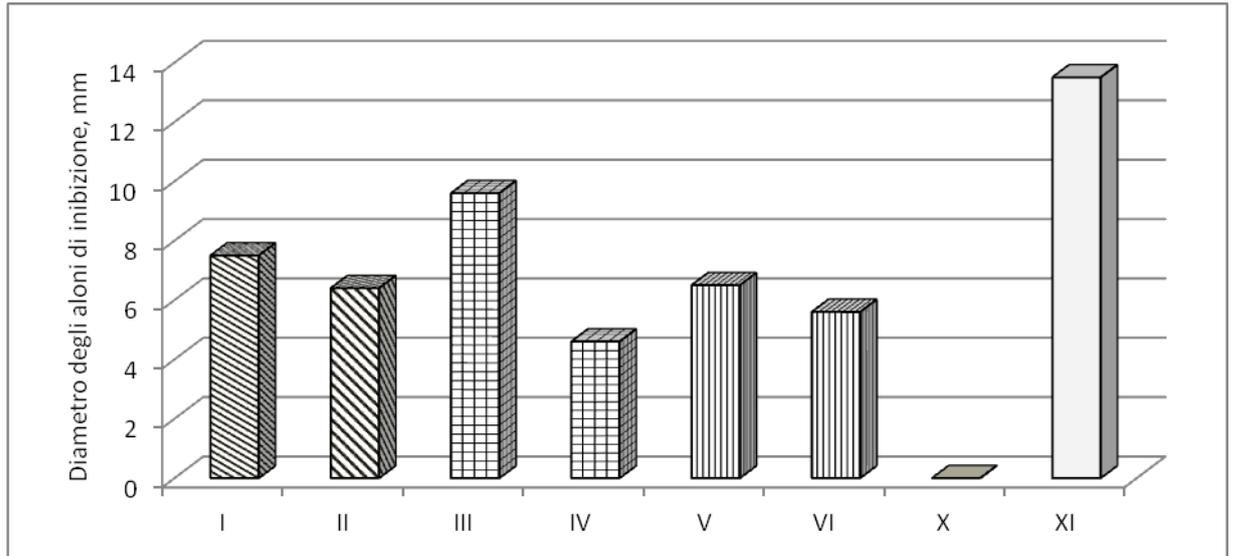
La figura 23 mostra i risultati ottenuti nello studio dell'attività antibatterica contro *E.coli* degli estratti mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso del pozzetto. L'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra* (V) mostra l'attività antimicrobica più alta tra gli estratti di piante.



- I- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *A. micrantha*
 II- l'estratto acquoso di infiorescenze di *A. Micrantha*
 III- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *H. arenarium*
 IV- l'estratto acquoso di infiorescenze di *H.arenarium*
 V- l'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra*
 VI- l'estratto acquoso di radice di *Gl. glabra*
 X – 50% etanolo
 XI – propolis 10%

Fig. 24. L'azione degli estratti studiati sulla crescita di *St. aureus* (il metodo di diffusione con l'uso del pozzetto)

Gli estratti idroalcolici al 50% ed acquosi delle radici di liquirizia (V e VI) contro *St. aureus* hanno mostrato un'attività antibatterica più elevata (fig. 24). Gli estratti acquosi ed etanologici al 50% delle infiorescenze di elicriso e di achillea hanno mostrato una simile attività antibatterica più bassa e paragonabile.



- I- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *A. micrantha*
- II- l'estratto acquoso di infiorescenze di *A. micrantha*
- III- l'estratto etanologico (50%) di infiorescenze di *H. arenarium*
- IV- l'estratto acquoso di infiorescenze di *H. arenarium*
- V- l'estratto etanologico (50%) di radice di *Gl. glabra*
- VI- l'estratto acquoso di radice di *Gl. glabra*
- X - 50% etanolo
- XI - propolis 10%

Fig. 25. L'azione degli estratti studiati sulla crescita di *B. subtilis* (il metodo di diffusione con l'uso del pozzetto)

L'estratto etanologico al 50% delle infiorescenze di elicriso (III) ha dimostrato l'attività antibatterica più alta contro la coltura di *B. subtilis*, più che doppia rispetto al corrispondente estratto acquoso.

Questa indagine ha dimostrato che ceppi diversi di batteri sono differemente sensibili ai componenti estratti dalle piante studiate.

4.2. I risultati dell'attività antibatterica degli estratti di piante studiate ottenuti mediante conta delle unità formanti colonie (UFC)

È stata studiata l'attività antibatterica degli estratti acquosi delle infiorescenze di *Helichrysum arenarium* e di *Achillea micrantha* e delle radici di *Glycyrrhiza glabra* mediante conta delle unità formanti colonie (UFC), verso colture test di microrganismi (*E. coli*, *St. aureus*, *B. Subtilis*) (tabella 15).

Tabella 15

Attività comparativa antibatterica degli estratti acquosi di piante in un terreno di coltura (UFC)

Estratti	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>H. arenarium</i> (infiorescenze)	4,7±0,3*	7,5±0,3*	1,7±0,2*
<i>A. micrantha</i> (infiorescenze)	10,3±0,2*	5,1±1,6*	4,7±1,03*
<i>Gl. glabra</i> (radici)	3,0±0,1*	Nessuna crescita della coltura	Nessuna crescita della coltura
Controllo	244,9±5,6*	139,6±1,9*	200,2±2,5*

* - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$

Dei dati inseriti nella tabella 15 si osserva che in un terreno di coltura, cotto con l'estratto acquoso delle radici di liquirizia, non si trovano colonie di microrganismi, cioè c'è stata un'attività antibatterica completa contro tutti tre i ceppi dei microrganismi (*E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*). L'effetto antibatterico contro il ceppo di *E.coli* si trova negli estratti acquosi delle infiorescenze di achillea e di elicriso. La crescita di colonie di *St.aureus* esposte ad estratti acquosi delle infiorescenze di *A. micrantha* e di *H. arenarium* è diminuita di 27,3 e 18,6 volte rispettivamente, rispetto al controllo. Come controllo è stata usata una sospensione dei microrganismi. In presenza degli estratti acquosi delle infiorescenze di *A. micrantha* e *H. arenarium* la crescita di *B. subtilis* è diminuita di 43 e 118 volte

rispettivamente rispetto al controllo. Come si può vedere, i ceppi Gram positivi (*St. aureus* e *B. subtilis*) sono più sensibili agli estratti acquosi delle piante studiate (*Achillea micrantha*, *Helichrysum arenarium*, *Glycyrrhiza glabra*), rispetto ai ceppi Gram negativi di *E. coli*. La buona attività antibatterica degli estratti acquosi ottenuti con questo metodo può essere spiegata col fatto che negli estratti sono presenti dei composti ad attività antibatterica molto attivi. È quindi necessario capire quali sono tali composti presenti negli estratti.

4.3. Valutazione comparativa dell'attività antibatterica degli estratti di liquirizia, cresciuti in regioni diverse

In questa ricerca è stata esaminata in maniera comparativa l'attività antibatterica degli estratti etanoliche di radice di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, che cresce nella regione di Astrakhan (Russia) e in Calabria (Italia) (tabella 16).

Tabella 16

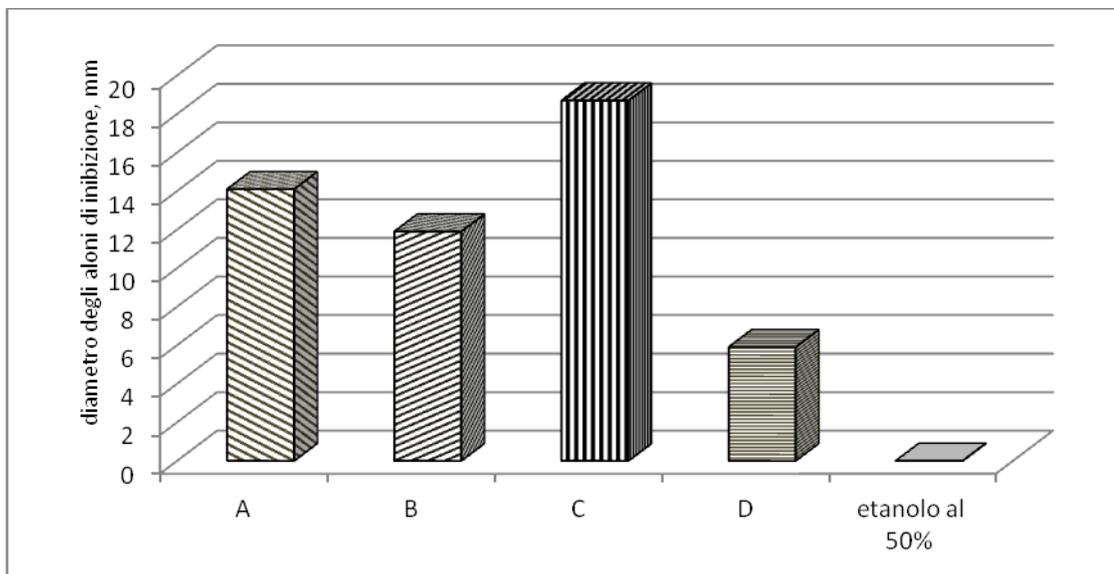
L'attività antibatterica comparativa degli estratti di etanolo al 50% delle radici di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*

Gli estratti di radici di <i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
Proveniente di Astrakhan (40 g/l) (A)	14,1±3,6*	11,5±2,3*	10,5±6,8*
Proveniente di Astrakhan (20 g/l) (B)	11,9±0,5*	4,0±0,6*	13,7±5,2*
Proveniente di Calabria (40 g/l) (C)	18,7±3,6*	4,6±1,3*	8,7±5,9*
Proveniente di Calabria (20 g/l) (D)	5,9±0,7*	0	4,2±0,4*
etanolo al 50%	0	0	0

* - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$; 0- assenza di un'azione antimicrobica

Come si vede nella tabella 16, alcuni risultati presentano un intervallo di incertezza molto elevato per cui trarre conclusioni risulta difficile soprattutto per gli esperimenti con un più alto contenuto di estratto. Probabilmente i due estratti hanno

attività comparabile su *E.coli* e *B.subtilis* se si lavora a concentrazioni alte, mentre è sicuramente più attivo l'estratto della liquirizia russa su *St.aureus*. Se si confrontano invece le prove lavorando con concentrazioni più diluite il margine di incertezza è significativamente più basso e l'attività antibatterica rispetto a tutti e tre i ceppi risulta superiore usando l'estratto di radice di liquirizia della regione di Astrakhan (B) rispetto a quello della Calabria (D) (fig. 26). Va rimarcato il fatto che lavorando a più bassa concentrazione il campione (D) è risultato inattivo nei confronti di *St.aureus* (fig.27).



A - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Astrakhan (40 g/l)

B - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Astrakhan (20 g/l)

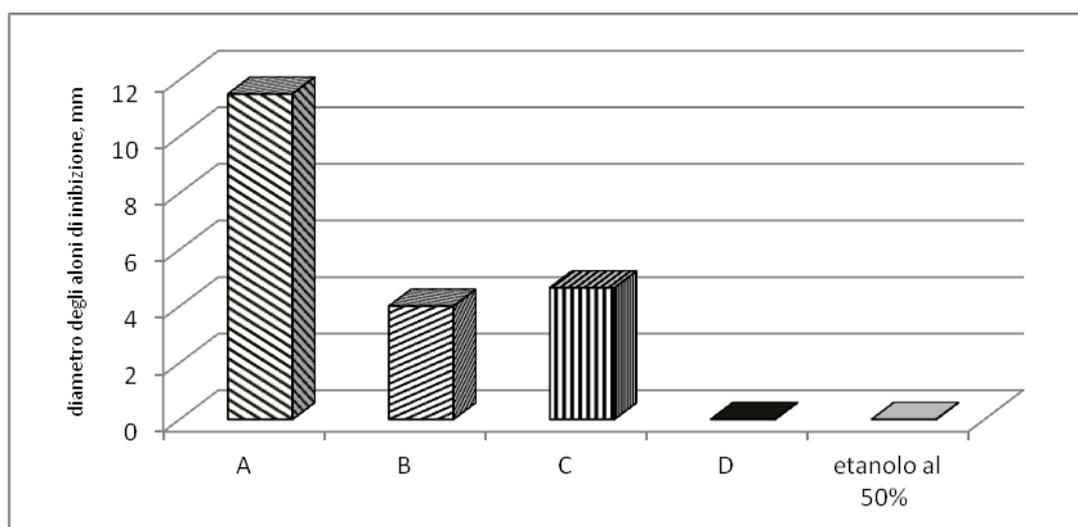
C - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Calabria (40 g/l)

D - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Calabria (20 g/l)

Fig. 26. L'attività comparativa antibatterica degli estratti di etanolo (50%) di radice di liquirizia *Glycyrrhiza glabra* contro *E.coli*

Contro i ceppi di *B. subtilis* l'estratto etanolico di radice di liquirizia di regione di Astrakhan non solo ha mostrato maggiore attività antibatterica degli estratti di radice di liquirizia di Calabria (Italia) ma sorprendentemente la diminuzione della concentrazione di sostanze attive nel mezzo (campione B) non ha causato minore

attività antibatterica ma attività comparabile o addirittura superiore (fig.28). Questo risultato suggerisce l'utilità di studiare l'attività antibatterica degli estratti mediante il metodo di diluizioni seriali per determinare la concentrazione minima inibente (MIC).



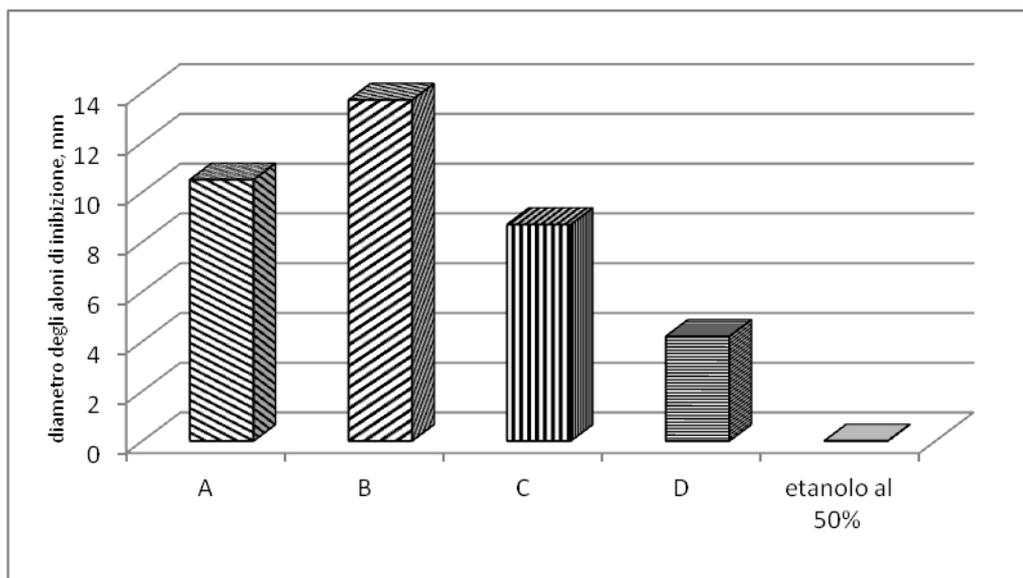
A - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Astrakhan (40 g/l)

B - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Astrakhan (20 g/l)

C - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Calabria (40 g/l)

D - Gli estratti di radice di *Glycyrrhiza glabra* di regione di Calabria (20 g/l)

Fig.27. L'attività comparativa antibatterica degli estratti di etanolo (50%) di radice di liquirizia *Glycyrrhiza glabra* contro *St. aureus*



A - Gli estratti di radice di Glycyrrhiza glabra di regione di Astrakhan (40 g/l)

B - Gli estratti di radice di Glycyrrhiza glabra di regione di Astrakhan (20 g/l)

C - Gli estratti di radice di Glycyrrhiza glabra di regione di Calabria (40 g/l)

D - Gli estratti di radice di Glycyrrhiza glabra di regione di Calabria (20 g/l)

Fig.28. L'attività comparativa antibatterica degli estratti di etanolo (50%) di radice di liquirizia Glycyrrhiza glabra contro *B. subtilis*

Inoltre l'attività antibatterica di estratti di radici di liquirizia raccolte nella regione di Astrakhan ed in Calabria, ottenuti per trattamento delle radici medesime con vari solventi (etanolo assoluto, etilacetato e dietilcarbonato) è stata anche determinata ottenendo risultati interessanti ed innovativi. I risultati dell'attività degli estratti contro i medesimi microrganismi, espressi in valore di diametro degli aloni di inibizione, sono presentati nella tabella 17.

Tabella 17

L'attività comparativa antibatterica degli estratti ottenuti con solventi diversi di radice di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*

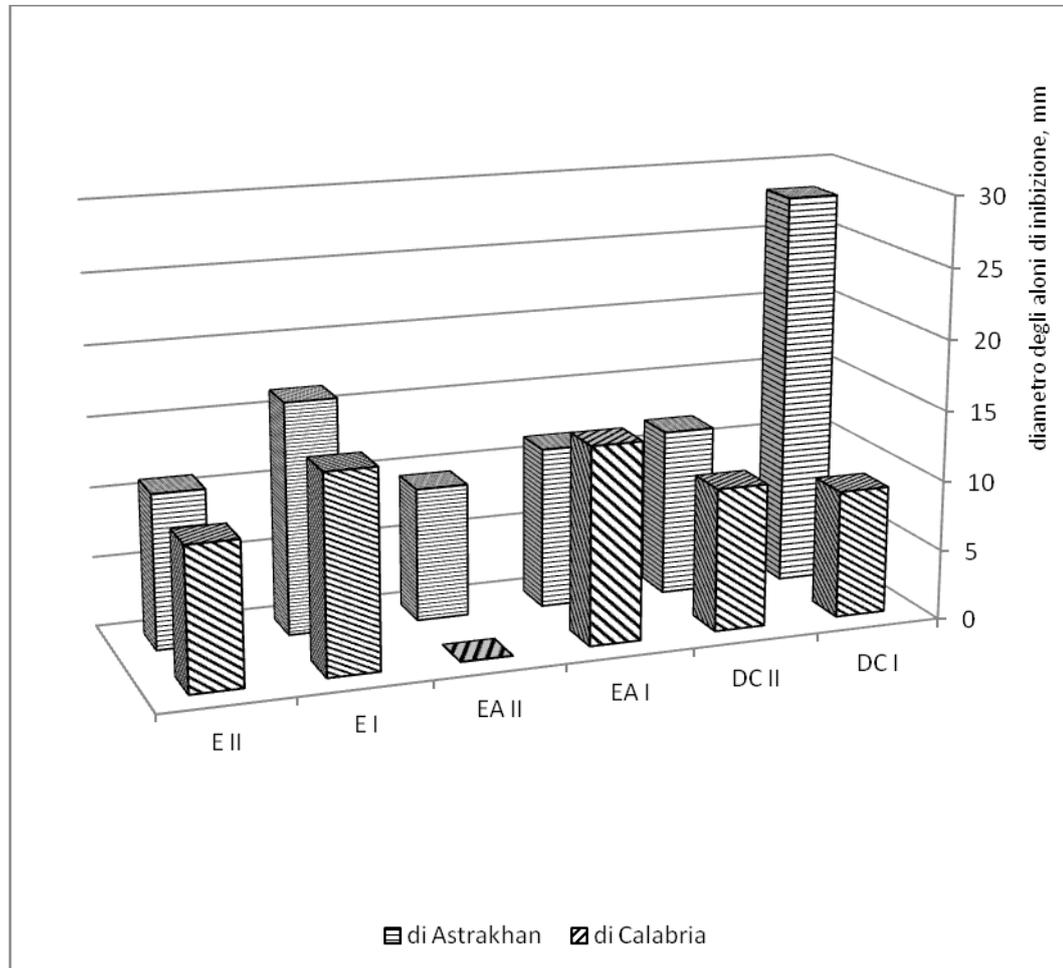
Gli estratti	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
in dietilcarbonato (DC)			
Liquirizia della regione di Astrakhan (11,4 g/l)- I	28,2±1,6 [2,5] [°]	25,3±2,8 [2,2] [°]	24,8±4,02 [2,2] [°]
Liquirizia della regione di Astrakhan (5,7 g/l)- II	11,9±2,5 [2,1] [°]	10,0±0,8 [1,8] [°]	14,8±5,9 [2,6] [°]
Liquirizia della regione Calabria (13,68 g/l) – III	9,1±0,9 [0,7] [°]	9,5±1,2 [0,7] [°]	11,1±0,8 [0,8] [°]
Liquirizia della regione Calabria (6,84 g/l) – IV	10,2±3,1 [1,5] [°]	5,8±1,3 [0,8] [°]	7,8±2,3 [1,1] [°]
in etilacetato (EA)			
Liquirizia della regione di Astrakhan (4 g/l) – I	11,5±0,7 [2,9] [°]	9,5±2,3 [2,4] [°]	9,5±2,3 [2,4] [°]
Liquirizia della regione di Astrakhan (2 g/l) – II	9,5±0,7 [4,8] [°]	5,6±0,7 [2,8] [°]	9±1,7 [4,5] [°]
Liquirizia della regione Calabria (16,84 g/l) – III	14,1±0,8 [0,8] [°]	13,6±4,2 [0,8] [°]	13,8±1,7 [0,8] [°]
Liquirizia della regione Calabria (8,42 g/l) – IV	0	8,2±1,5 [1,0] [°]	11,7±2,4 [1,4] [°]
in etanolo (E)			
Liquirizia della regione di Astrakhan (11,5 g/l) – I	16,5±2,1 [1,4] [°]	8,5±0,7 [0,7] [°]	10,2±1,8 [0,9] [°]
Liquirizia della regione di Astrakhan (5,75 g/l) – II	11,0±1,6 [1,9] [°]	0	9,5±1,7 [1,6] [°]
Liquirizia della regione Calabria (21,2 g/l) – III	14,1±0,8 [0,7] [°]	11,3±5,2 [0,5] [°]	9,1±2,7 [0,4] [°]
Liquirizia della regione Calabria (10,6 g/l) – IV	10,2±2,9 [1,0] [°]	0	7,8±1,2 [0,7] [°]
Etanolo	0	0	0
Etilacetato	0	0	0
Dietilcarbonato	0	0	0

[°] valori medi normalizzati per g/l di estratto; 0-assenza di un'azione antimicrobica

Come si vede, la massima attività antibatterica contro tutti tre i ceppi di microrganismi è stato mostrato dagli estratti di radice di liquirizia di regione di Astrakhan rispetto agli analoghi da radice di liquirizia della Calabria, in tutti e tre i solventi indagati. Inoltre attività comparabile, o addirittura superiore, si è riscontrata in questi estratti di radice di liquirizia di regione di Astrakhan dimezzando la quantità di principio attivo utilizzato nelle prove, se si esclude il caso dell'esperimento su *St.aureus* dove il dimezzamento porta ad una mancata attività antibatterica. Particolarmente elevata è risultata l'attività batterica degli estratti in dietilcarbonato e in etil acetato, soprattutto se, per questo secondo solvente, si fa riferimento al valore medio normalizzato a parità di quantitativo usato negli esperimenti. Tale attività risulta superiore a quella ottenuta usando etanolo puro come solvente. Considerando che la maggior concentrazione di glicirizina (516 mg /g) è stata trovata in estratti di etanolo 50% di liquirizia di regione di Astrakhan mentre in dietilcarbonato tale prodotto era presente in quantità assai minore (108 mg /g) (Tab.10, Cap.3), si può dedurre con sicurezza che non è questo composto il principale responsabile dell'attività antibatterica. Al contrario l'estratto in dietilcarbonato di radice di liquirizia di regione di Astrakhan si è visto che contiene acido 18 β - glicirretico in quantità molto superiori (10,81 mg /g); pertanto tale composto potrebbe giocare un ruolo significativo nell'attività antibatterica. L'ipotesi è supportata dal fatto che tale composto è presente solo in minima quantità nell'estratto in dietilcarbonato della radice di liquirizia della Calabria utilizzata nelle prove. Tuttavia altri composti di media polarità, quali ad es. alcuni flavonoidi, più facilmente estraibili in solventi quali dietilcarbonato ed etile acetato potrebbero avere un'importanza ancora superiore. Infine è da sottolineare se si confrontano i dati di attività batterica ottenuti usando etanolo puro (Tab.17 campione I(E)) ed etanolo acquoso al 50%, (Tab.16 campione B), i risultati ottenuti con l'etanolo puro risulterebbero migliori.

La Figura 29 mostra i dati non normalizzati contro i ceppi di *E.coli* degli estratti nei diversi solventi [dietilcarbonato, etil acetato ed etanolo puro] di radice di

liquirizia, che cresce nella regione di Astrakhan (campioni I, ad alta concentrazione, e II, a bassa concentrazione) ed in Calabria (campioni III, ad alta concentrazione, e IV, a bassa concentrazione).



DC – estratto in dietilcarbonato

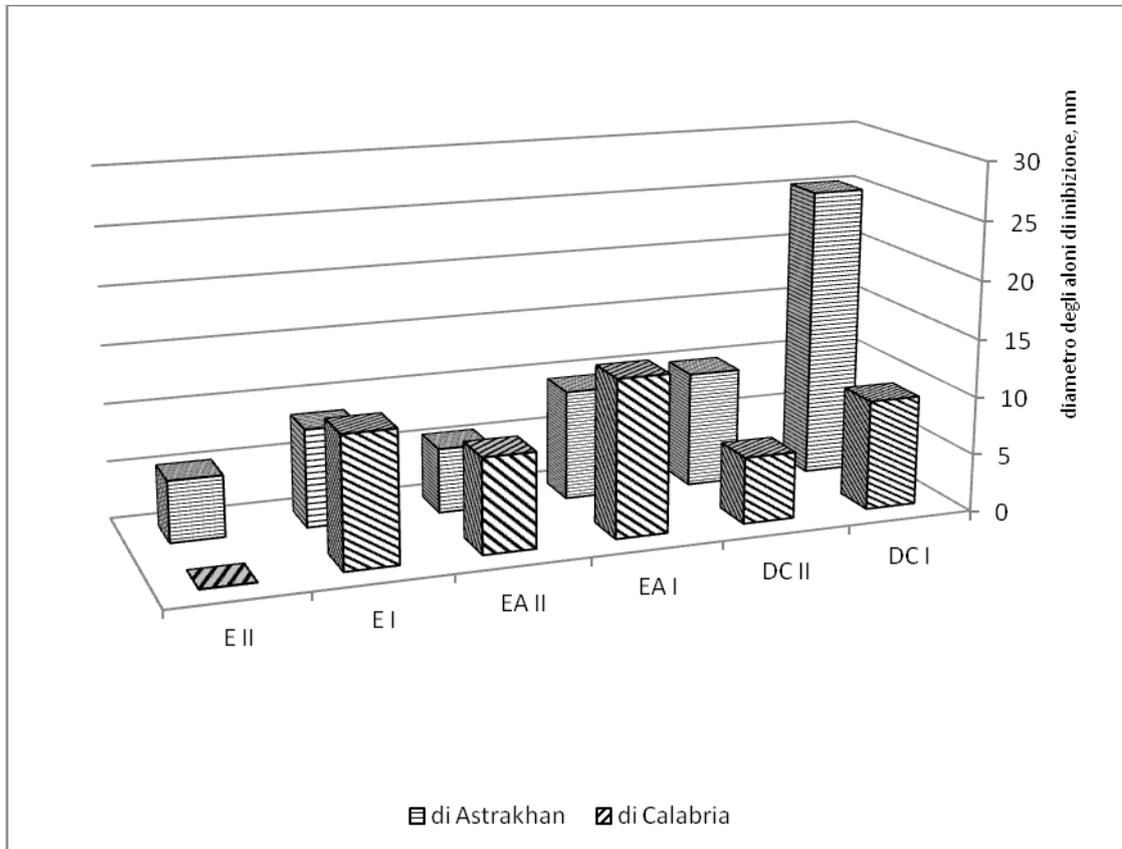
EA – estratto in etilacetato

E – estratto in etanolo

Fig.29. Studi comparativi degli effetti di estratti di liquirizia (di Astrakhan e di Calabria) sulla crescita di *E.coli*

La Figura 30 mostra i dati non normalizzati contro i ceppi di *St. aureus* degli estratti nei diversi solventi [dietilcarbonato, etil acetato ed etanolo puro] di radice di liquirizia, che cresce nella regione di Astrakhan (campioni I, ad alta concentrazione, e

II, a bassa concentrazione) ed in Calabria (campioni III, ad alta concentrazione, e IV, a bassa concentrazione).



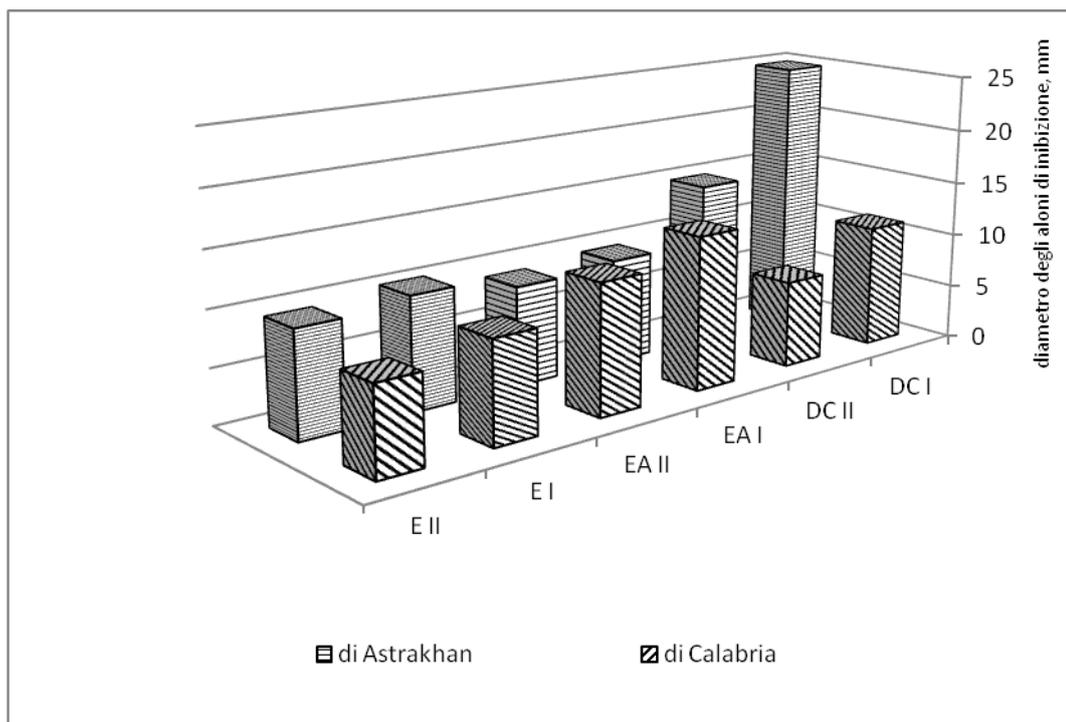
DC – estratto in dietilcarbonato

EA –estratto in etilacetato

E – estratto in etanolo

Fig. 30. Studi comparativi degli effetti di estratti di liquirizia (di Astrakhan e di Calabria) sulla crescita di *St. aureus*

La Figura 31 mostra i dati non normalizzati contro i ceppi di *B. subtilis* degli estratti nei diversi solventi [dietilcarbonato, etil acetato ed etanolo puro] di radice di liquirizia, che cresce nella regione di Astrakhan (campioni I, ad alta concentrazione, e II, a bassa concentrazione) ed in Calabria (campioni III, ad alta concentrazione, e IV, a bassa concentrazione).



DC – estratto in dietilcarbonato

EA –estratto in etilacetato

E – estratto in etanolo

Fig. 31. Studi comparativi degli effetti di estratti di liquirizia (di Astrakhan e di Calabria) sulla crescita di *B. subtilis*

I risultati qui presentati risultano importanti e degni di approfondimento visto che taluni estratti dalla radice di liquirizia raccolta nella regione di Astrakhan presentano una espressione significativa della attività antibatterica contro *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis* confrontabile con quella di antibiotici commerciali. Inoltre l'utilizzo di solventi non consueti rispetto a quelli tradizionalmente impiegati (acqua o miscele idroalcoliche) per l'estrazione di principi attivi di origine vegetale e decisamente più efficaci di questi ultimi apre nuove prospettive e potenziali applicazioni industriali. Tuttavia andrà sviluppata la tecnologia di rimozione di detti solventi dal prodotto estratto finito se si vogliono sviluppare nuove medicine.

4.4. I risultati della ricerca sulle variazioni di attività antibatterica dopo frazionamento degli estratti di *Gl. glabra* (Calabria, Italia e la regione di Astrakhan, Russia)

L'attività antibatterica delle frazioni principali degli estratti etanoliche al 50% di radice di *Gl. glabra* della regione di Astrakhan (Russia) e della Calabria (Italia) ottenute durante la presente ricerca mediante cromatografia su colonna è stata valutata contro microrganismi non patogeni mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso del pozzetto e mediante il metodo di diluizione seriale (MIC). Questa ricerca preliminare aveva lo scopo di valutare la convenienza di un frazionamento rispetto all'estratto tal quale ed eventualmente correlare la struttura dei gruppi di sostanze isolate con la maggiore attività antibatterica. Le frazioni E1-E5, di cui erano state valutate precedentemente le concentrazioni di glicirizzina e di acido 18 β glicirretinico (Tabella 9 del cap.3), sono state sottoposte ad indagine; i campioni E1-E4 erano solidi mentre la frazione E5 era un liquido. I risultati dello studio dell'attività antibatterica di queste frazioni mediante il metodo di diffusione in agar espresso in diametro degli aloni di inibizione in mm sono riportati in tabella 18, mentre i dati quantitativi in MIC, espressi come mg/ml, e determinati con il metodo delle diluizioni in serie sono in tabella 19.

Tabella 18

L'effetto antibatterico di frazioni di estratto etanoliche al 50% delle radici di liquirizia (proveniente di Astrakhan) (mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso del pozzetto)

Frazione (1mg/ml)	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
E1	0	0	0
E2	16,0 \pm 3,4*	0	6,5 \pm 3,1*
E3	14,5 \pm 2,3*	0	6,6 \pm 2,8*
E4	15,8 \pm 0,7*	6,7 \pm 1,2*	12,1 \pm 1,3*
E5	0	8,3 \pm 0,9*	0

* - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$; 0-assenza di un'azione antimicrobica

Come si può vedere dalla tabella 18, la frazione E4 è risultata attiva contro tutti e tre i ceppi testati e la frazione E5 solo nei confronti di *St.aureus* ; al contrario le frazioni E2 ed E3, inattive contro la cultura di *St. aureus* , hanno mostrato effetto antibatterico contro i ceppi di *E. coli* e *B. subtilis*. I dati riconfermano ulteriormente che la glicirizzina presente in tutti e 5 i campioni ha un effetto modesto o nullo. Per quanto riguarda il ruolo dell'acido 18 β glicirretico, essendo esso presente in tutti e 5 i campioni in quantità assai modeste , non è possibile trarre alcuna conclusione. Risulta invece evidente che altri componenti non ancora identificati e presenti verosimilmente in quantità diverse nelle frazioni ottenute possono essere importanti e selettivi verso i batteri indagati.

Tabella 19

L'effetto antibatterico di frazioni di estratto etanolico al 50% di radici di liquirizia (proveniente di Astrakhan) (mediante metodo MIC)

Frazione	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	MIC, $\mu\text{g/ml}$		
E1	1000,0 \pm 0	1000,0 \pm 0	1000,0 \pm 0
E2	62,5 \pm 9,5*	1000,0 \pm 0	1000,0 \pm 0,0
E3	125,0 \pm 19,4*	1000,0 \pm 0	62,5 \pm 13,9*
E4	62,5 \pm 11,3*	62,5 \pm 8,9*	1000,0 \pm 0,0
E5	1000,0 \pm 0	250,0 \pm 21,3*	1000,0 \pm 0

Nota: * - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$

La concentrazione minima inibente (MIC) nei confronti di *E. coli* (62,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) è stata determinata nelle frazione E2 ed E4, nei confronti di *St.aureus* (62,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) è stata determinata nella frazione E4, mentre contro *B. subtilis* (62,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) è stata individuata nella frazione E3. Ciò conferma che il frazionamento, anche se non è stato efficiente e richiederebbe una ulteriore indagine ed una ottimizzazione, separa componenti aventi diversa selettività nei confronti dei batteri testati e probabilmente diversa concentrazione nelle frazioni isolate

Nella figura 32 sono riportati i risultati dallo studio dell'attività antibatterica delle frazioni dell'estratto idroalcolico al 50% della radice di liquirizia proveniente di regione di Astrakhan.

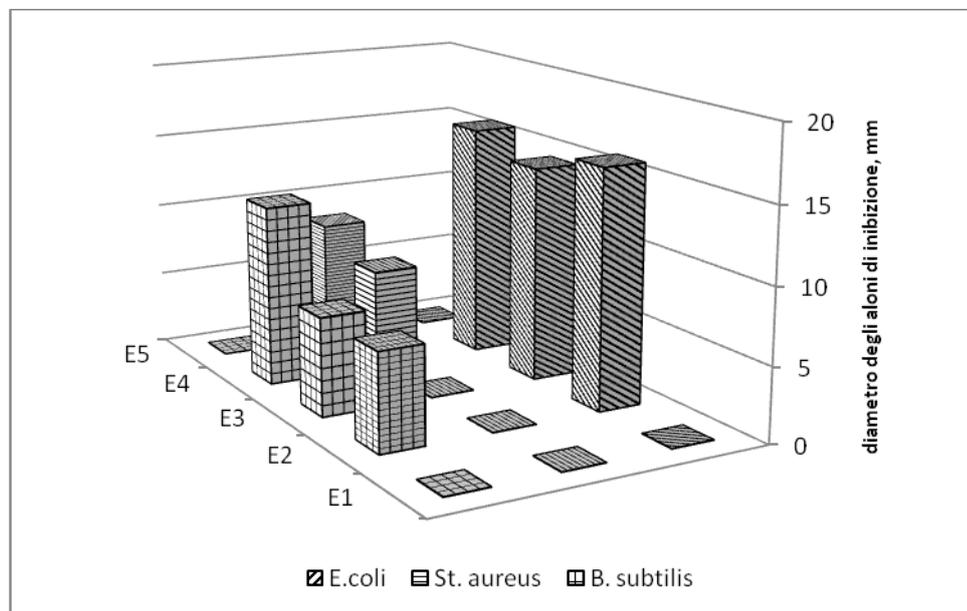


Fig. 32. Studi comparativi dell'attività antibatterica delle frazioni di estratto etanolico al 50% della radice di liquirizia *Gl. glabra* (proveniente di Astrakhan) (mediante metodo di diffusione in agar)

Se si confrontano i dati del diametro degli aloni di inibizione contro *E. coli* trovati nelle frazioni di E2, E3 e E4 (Tab.18) con quelli dell'estratto non frazionato (tab.14), si osserverebbe un leggermente più pronunciato effetto antibatterico di ciascuna delle 3 frazioni. La frazione E4 contro *B. subtilis* risulterebbe ben due volte più efficace dell'estratto non frazionato. Una maggiore attività di singole frazioni era da attendersi perché il frazionamento aumenta la % in peso delle specie biologicamente attive in una o più frazioni rispetto alla % in peso presente nell'estratto non frazionato. Al contrario nei confronti di *St. aureus* l'estratto ha mostrato un effetto antibatterico più forte delle singole frazioni. Questo dato non facilmente prevedibile potrebbe forse indicare che il frazionamento o porta a parziale degradazione delle specie biologicamente attive o impedisce un effetto sinergico tra

vari composti, se separati mediante frazionamento, che invece è possibile nell'estratto di partenza. Questa indagine preliminare indica che il frazionamento può essere importante ma richiede un ulteriore approfondimento. Un analogo studio sull'effetto antibatterico delle frazioni dell'estratto etanolic 50% di radice di liquirizia (Calabria) è stato effettuato mediante il metodo di diffusione in agar con l'uso di pozzetto (tabella 20) e mediante il metodo delle diluizioni in serie (tabella 21). Le frazioni G1, G5 e G6 hanno mostrato azione antimicrobica (batteriostatica) contro i ceppi di *E. coli* e di *St. aureus*, le frazioni G2 G3 e G4 solo contro la coltura di *E.coli*, la frazione G7 solo contro *St. aureus*. La più grande attività antibatterica contro il *St. aureus* si è avuta con le frazione G5 e G6. Tutte le frazioni non hanno mostrato alcuna attività antibatterica contro i ceppi di *B.subtilis*. Visti i risultati alquanto strani il frazionamento dell'estratto etanolic 50% da radice di liquirizia di Calabria e i test biologici andrebbero ripetuti in un prossimo futuro per una verifica.

Tabella 20

L'effetto antibatterico di frazioni di estratto di etanolo al 50% di radice di liquirizia calabrese (mediante metodo di diffusione in agar)

Frazione (1mg/ml)	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
G1	9,5±1,2*	6,0±1,4*	0
G2	7,5±0,7*	0	0
G3	6,2±0,9*	0	0
G4	6,1±1,1*	0	0
G5	5,5±0,7*	18,5±8,1*	0
G6	5,4±0,8*	12,3±4,4*	0
G7	0	5,8±0,9*	0
G8	0	0	0
G9	0	0	0

* - le differenze con il controllo sono attendibili con $p \leq 0,05$; 0-assenza di un'azione antimicrobica

Il valore della concentrazione minima inibente è quasi la stessa per tutte le frazioni dell'estratto di etanolo al 50% della radice di liquirizia calabrese (tabella 21) e non si osservano significative variazioni tra le varie frazioni.

Tabella 21

L'effetto antibatterico di frazioni di estratto etanolic al 50% di radice di liquirizia calabrese (mediante metodo MIC)

Frazione (1mg/ml)	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
	MIC, $\mu\text{g/ml}$		
G1	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G2	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G3	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G4	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G5	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G6	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G7	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G8	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0
G9	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0	1000,0 \pm 0,0

I risultati dello studio dell'attività antimicrobica delle frazioni dell'estratto etanolic al 50% della radice di liquirizia calabrese sono riportati anche in figura 33.

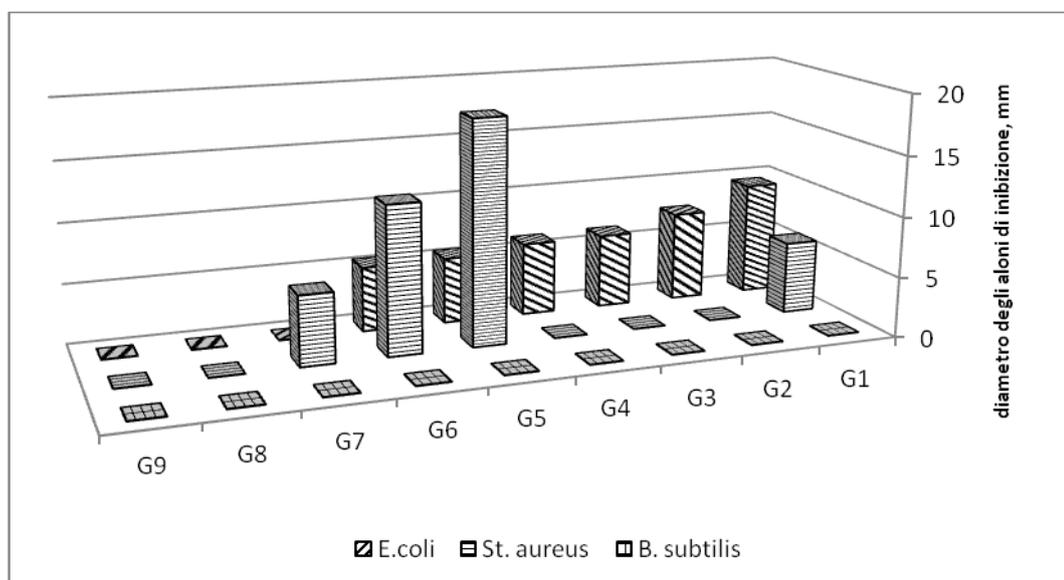


Fig. 33. Studi comparativi dell'attività antibatterica delle frazioni dell'estratto etanolic al 50% della radice di liquirizia *Gl. glabra* proveniente di Calabria

4.5. Valutazione comparativa dell'attività antibatterica del glabridin e degli estratti di liquirizia

Infine è stata studiata l'attività antibatterica di una soluzione di glabridin (prodotto commerciale) in concentrazione 30 ng/ μ l e 40 ng/ μ l simile alla concentrazione del medesimo composto che è stato trovato negli estratti di radici di liquirizia di Astrakhan (33 ng/ μ l) e di Calabria (35 ng/ μ l). Tale composto era stato considerato da studi precedenti di altri autori come uno dei principali componenti antibatterici della radice di liquirizia. I risultati sono riportati in tabella 22.

Tabella 22

L'attività comparativa antibatterica di Glabridin puro e degli estratti di radice di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*

	<i>E.coli</i>	<i>St.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>
	diametro degli aloni di inibizione, mm		
Glabridin 30 ng/ μ l	7,5 \pm 0,6	0	4,5 \pm 0,5
Glabridin 40 ng/ μ l	6,7 \pm 0,4	0	4,6 \pm 0,5
Estatto di etanolo acquoso al 50% di liquirizia (Astrakhan)	14,1 \pm 3,6	11,5 \pm 2,3	10,5 \pm 6,8
Estratto di etanolo acquoso al 50% di liquirizia (Calabria)	18,7 \pm 3,6	4,6 \pm 1,3	8,7 \pm 5,9

La tabella 22 mostra che gli estratti di liquirizia sono risultati più attivi della soluzione di Glabridin contro tutti e tre i ceppi batterici. Inoltre Glabridin puro non ha mostrato sorprendentemente alcuna azione inibitoria contro *St. aureus*, contrariamente a quanto precedentemente riportato in letteratura. I risultati ottenuti nella presente indagine indicano sia una possibile azione sinergica all'attività

antibatterica di più componenti presenti negli estratti sia che il prodotto puro di origine commerciale non è sicuramente sempre dotato di attività antibatterica.

I risultati ottenuti indicano che l'azione antibatterica è determinata dalla presenza negli estratti non solo dai composti noti come il glabridin e la glicirrizina e l'acido 18 β glicirretico la cui attività antibatterica è conosciuta, ma anche dalla presenza negli estratti di altri composti antibatterici che non sono stati determinati in questa ricerca; da qui la necessità di continuare la ricerca in collaborazione tra le due università per determinare quali sono questi componenti.

Esaminando gli studi effettuati su tutti gli estratti delle piante (*Gl. glabra*, *A. micrantha* e *H. arenarium*) si è osservata un'attività antibatterica più o meno elevata. Tutti gli estratti delle piante studiate hanno mostrato l'attività antibatterica più alta contro la coltura di ceppi di *E. coli*.

Questi risultati permettono potenzialmente di usare gli estratti ottenuti dalle piante selezionate come componenti antibatterici di prodotti biologici con applicazioni differenti (cosmetico, farmaceutico, ecc).

CAPITOLO 5. IL PROCESSO TECNOLOGICO PER LA PRODUZIONE DI ESTRATTI LIQUIDI DALLE RADICI DI LIQUIRIZIA, DALLE INFIORESCENZE DI ACHILLEA E DI ELICRISO

Una delle fasi principali della produzione di estratti con proprietà antimicrobiche è l'elaborazione di uno schema tecnologico di produzione e di applicazioni degli estratti. In questa ricerca sono stati prodotti i seguenti estratti: un estratto liquido delle infiorescenze di *Achillea A. micrantha*, un estratto liquido delle infiorescenze di Elicriso *H. arenarium* e un 'estratto liquido delle radici di Liquirizia *Gl. glabra*. È stato elaborato quindi uno schema tecnologico di produzione degli estratti liquidi delle piante studiate come mostrato in figura 34 (in questo caso il solvente estraente è etanolo acquoso al 50%).

La fase iniziale per la produzione di tutti tre tipi di estratti è indicata come pre-produzione, che comprende la sanificazione industriale o delle strutture di laboratorio, il rispetto di standard igienico-sanitari e la bonifica delle attrezzature. Il passo successivo è quello di preparare il materiale vegetale e estraente e idonei contenitori in vetro o in altro materiale idoneo.

Dopo il lavoro preparatorio c'è il processo principale, che è l'ottenimento degli ingredienti attivi dal materiale vegetale sotto forma di estratto liquido. Dopo filtrazione ed evaporazione dell'etanolo dal prodotto, quest'ultimo viene sterilizzato, imballato, confezionato ed etichettato. Sulle etichette applicate alle bottiglie e all'imballaggio va scritto il fabbricante indicabile anche con il proprio marchio, il nome del farmaco in latino e in russo, il volume o il peso della preparazione, la data di stoccaggio, il numero di registrazione e il numero di serie. Inoltre sulle etichette apposte sulle bottiglie è necessario scrivere la data di scadenza del preparato ed il codice a barre.

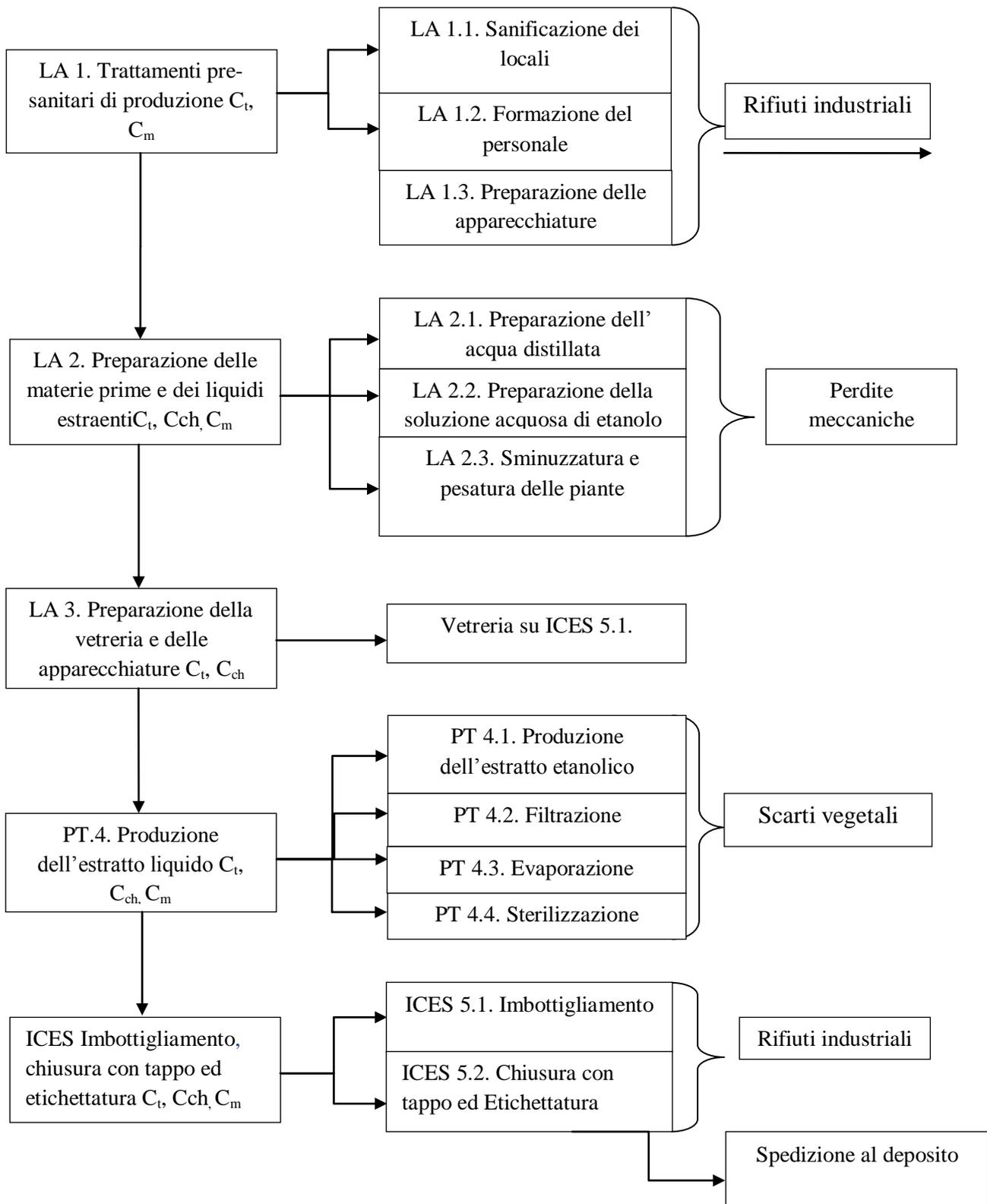


Fig. 34. Schema tecnologico di produzione di un estratto liquido
 LA – lavori accessori, PT – processo tecnologico, ICES – imbottigliamento, chiusura, etichettatura, spedizione, C_{ch} – controllo chimico, C_t – controllo tecnico, C_m – controllo microbiologico

5.1. La tecnologia di produzione di un estratto liquido di infiorescenze di Achillea

1. Raccolta, lavorazione ed essiccazione del materiale vegetale (infiorescenze di achillea). Il materiale vegetale raccolto è stato accuratamente lavato ed essiccato in un luogo fresco, stendendone un sottile strato (2-3 cm) sulla carta.

2. Preparazione del materiale vegetale : sminuzzamento e pesatura della quantità necessaria di materiale vegetale per le operazioni successive.

3. Preparazione del liquido estrattore. Come liquido estrattore è stata scelta una soluzione acquosa di etanolo al 50%, in quanto fornisce una estrazione di molti gruppi di sostanze biologicamente attive (flavonoidi, terpenoidi e lattoni).

4. Produzione dell'estratto liquido delle infiorescenze di achillea. Il materiale vegetale è stato tritato fino ad ottenere una pezzatura di 3-5 mm. I pezzetti di infiorescenza così ottenuti sono stati posti in contenitori di vetro con vetro scuro, riempiti con una miscela di etanolo acquoso al 50% (1:10 peso parte vegetale: peso del solvente) e lasciati estrarre per 7 giorni ad agitazione costante. La miscelazione è stata garantita da un miscelatore (PE - 6300 M) operante ad una velocità media (105 giri / min). La temperatura di lavoro è stata quella ambiente (20-25 ° C).

5. Purificazione dell'estratto dagli scarti mediante filtrazione su carta da filtro.

6. Riempimento delle bottigliette di vetro scuro con 30 ml di soluzione ottenuta.

7. Sterilizzazione dell'estratto ed evaporazione dell'etanolo in sterilizzatrice con riscaldamento a secco (sterilizzatore d'aria GP-40 MO) a 85 ° C. L'operazione è stata eseguita tre volte per 15 minuti ciascuna.

8. Standardizzazione dell'estratto liquido ottenuto da infiorescenze di achillea, mediante determinazione del contenuto delle sostanze attive o dell'attività biologica. Il contenuto viene determinato con metodi chimico-fisici. La quantificazione dei composti flavonoidi è stata effettuata mediante spettrometria-UV. Più precisa, ma più

costosa, è risultata la tecnica HPLC. L'attività biologica del liquido estratto risultante dalle infiorescenze di achillea è stata determinata con tecniche biologiche. In questo caso, l'estratto è stato indagato per valutare l'attività antimicrobica verso i test colture *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*. È stato usato il metodo delle diluizioni seriali (Aleshukina, 2003) o il metodo di diffusione in agar (Sukhenko, 1999, Dzerzhinskaya, 2005).

9. Imbottigliamento in bottiglie in polietilene con tappo in materiale plastico.

La produzione di un estratto liquido di infiorescenze di achillea è riportato nel seguente schema (fig. 35).

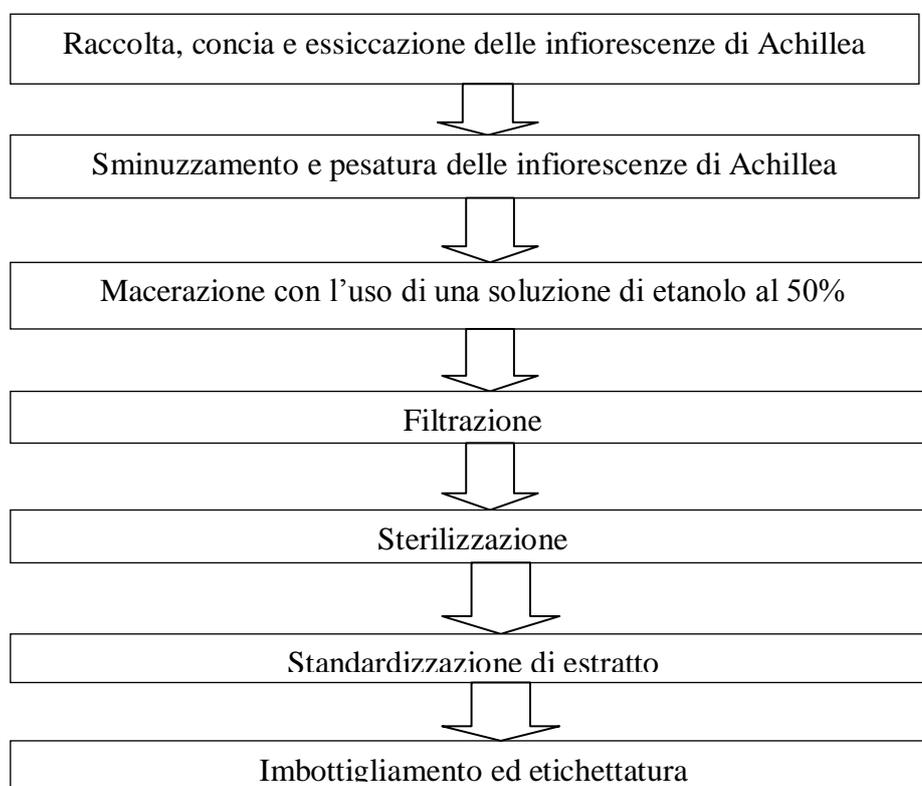


Fig. 35. Le fasi del processo per ottenere un estratto liquido di infiorescenze di *Achillea Achillea micrantha*

5.2. La tecnologia di produzione di un estratto liquido di infiorescenze di Elicriso

1. Raccolta, lavorazione ed essiccazione materiale vegetale (infiorescenze dell'elicriso). Il materiale vegetale raccolto è stato accuratamente lavato ed essiccato in un luogo fresco sulla carta.

2. Preparazione del materiale vegetale - sminuzzamento e pesatura la quantità necessaria per le successive operazioni.

3. Preparazione del liquido estrattore. Come liquido estrattore è stata scelta una soluzione acquosa di etanolo al 50%, in quanto fornisce una estrazione di molti gruppi di sostanze biologicamente attive (flavonoidi, terpenoidi e lattoni).

4. Produzione dell'estratto liquido delle infiorescenze di elicriso. Il materiale vegetale è stato tritato fino ad ottenere una pezzatura di 3-5 mm. I pezzetti di infiorescenza così ottenuti sono stati posti in contenitori di vetro con vetro scuro, riempiti con una miscela di etanolo acquoso al 50% (1:10 peso parte vegetale: peso del solvente) e lasciati estrarre per 7 giorni ad agitazione costante. La miscelazione è stata garantita da un miscelatore (PE - 6300 M) operante ad una velocità media (105 giri / min). La temperatura di lavoro è stata quella ambiente (20-25 ° C).

5. Purificazione dell'estratto dagli scarti mediante filtrazione su carta da filtro.

6. Riempimento delle bottigliette di vetro scuro con 30 ml di soluzione ottenuta.

7. Sterilizzazione dell'estratto ed evaporazione dell'etanolo in sterilizzatrice mediante essiccamento a secco (sterilizzatore d'aria GP-40 MO) a 85 ° C. L'operazione è stata eseguita tre volte per 15 minuti ciascuna.

8. Standardizzazione dell'estratto liquido delle infiorescenze di elicriso. La standardizzazione è stata condotta delle sostanze sostanze attive con attività biologica. Il contenuto viene determinato con metodi chimico-fisici. La quantificazione dei composti flavonoidi è stata effettuata mediante spettrometria-UV.

Più precisa, ma più costosa è risultativa la tecnica HPLC. L'attività biologica del liquido estratto risultante dalle infiorescenze di achillea è stata determinata con tecniche biologiche. In questo caso, l'estratto è stato indagato per valutare l'attività antimicrobica verso i test colture *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*. È stato usato il metodo delle diluizioni seriali (Aleshukina, 2003) o il metodo di diffusione in agar (Sukhenko, 1999, Dzerzhinskaya, 2005).

9. Imbottigliamento in bottiglie in polietilene con tappo in materiale plastico.

La produzione dell'estratto liquido delle infiorescenze di achillea è riportato nel seguente schema (fig. 36).

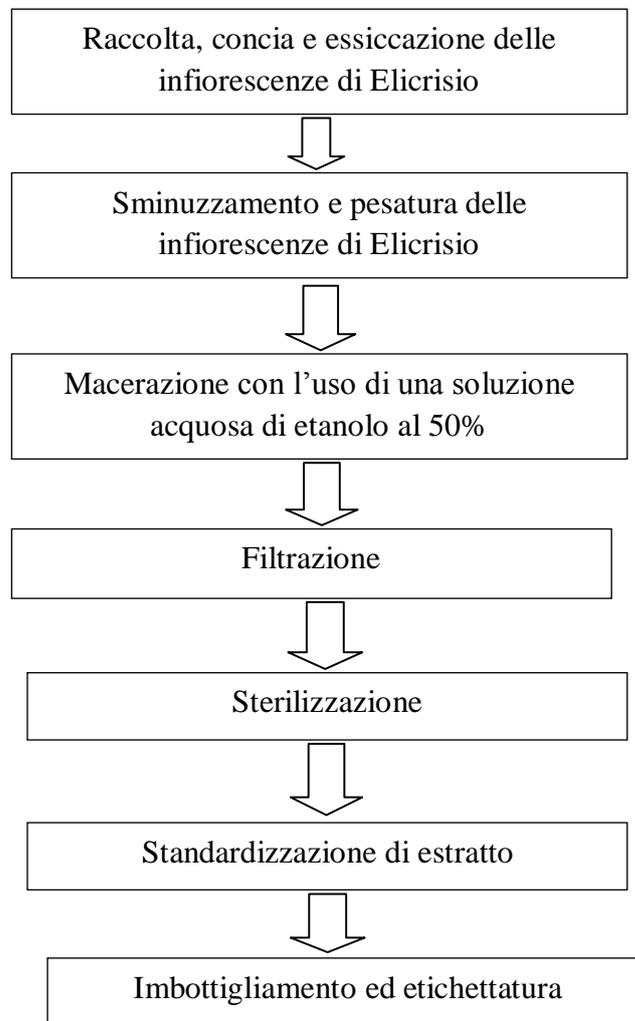


Fig. 36. Le fasi del processo per ottenere un estratto liquido delle infiorescenze di Elicriso *Helichrysum arenarium*

5.3. La tecnologia di produzione di un estratto liquido della radice di Liquirizia

1. Raccolta, lavorazione ed essiccazione materiale vegetale (radice di liquirizia). Il materiale vegetale raccolto è stato accuratamente lavato ed essiccato in un luogo fresco.

2. Preparazione del materiale vegetale: sminuzzamento e pesatura la quantità necessaria per le successive operazioni.

3. Preparazione del solvente estraente. Come estraente è qui indicato l'etanolo acquoso al 50%, che è stato inizialmente scelto in quanto permette l'estrazione di molti gruppi di sostanze biologicamente attive (flavonoidi, glicosidi, saponine). Alla luce della presente ricerca altri solventi potrebbero essere usati in alternativa.

4. Produzione dell'estratto liquido di radice di liquirizia. Il materiale vegetale è stato tritato fino ad ottenere una pezzatura di 3-5 mm I pezzetti di radici così ottenuti sono stati posti in contenitori di vetro con vetro scuro, riempiti con una miscela di etanolo acquoso al 50% (1:10 peso sostanza vegetale: peso solvente) e lasciati estrarre per 7 giorni ad agitazione costante. La miscelazione è stata garantita da un miscelatore (PE - 6300 M) operante ad una velocità media (105 giri / min.). La temperatura di lavoro è stata quella ambiente (20-25°C).

5. Purificazione dell'estratto dagli scarti mediante filtrazione su carta da filtro.

6. Riempimento delle bottigliette di vetro scuro con 30 ml di soluzione ottenuta.

7. Sterilizzazione dell'estratto ed evaporazione dell'etanolo in sterilizzatrice mediante essiccamento a secco (sterilizzatore d'aria GP-40 MO) a 85° C. L'operazione è stata eseguita tre volte per 15 minuti ciascuna.

8. Standardizzazione dell'estratto liquido delle radici di liquirizia. La standardizzazione è stata condotta sul contenuto delle sostanze attive con attività biologica. Il contenuto viene determinato con metodi chimico-fisici. La

quantificazione dei composti flavonoidi è stata effettuata mediante spettrometria-UV. Più precisa, ma più costosa è risultata la tecnica HPLC. L'attività biologica del liquido estratto risultante delle radici di liquirizia è stata determinata con tecniche biologiche. In questo caso, l'estratto è stato indagato per valutarne l'attività antimicrobica verso i tre colture *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*. È stato usato il metodo delle diluizioni seriali (Aleshukina, 2003) o il metodo di diffusione in agar (Sukhenko, 1999, Dzerzhinskaya, 2005).

9. Imbottigliamento in bottiglie in polietilene con tappo in materiale plastico.

La produzione dell'estratto liquido di radice di liquirizia è riportato nel seguente schema (fig. 37).

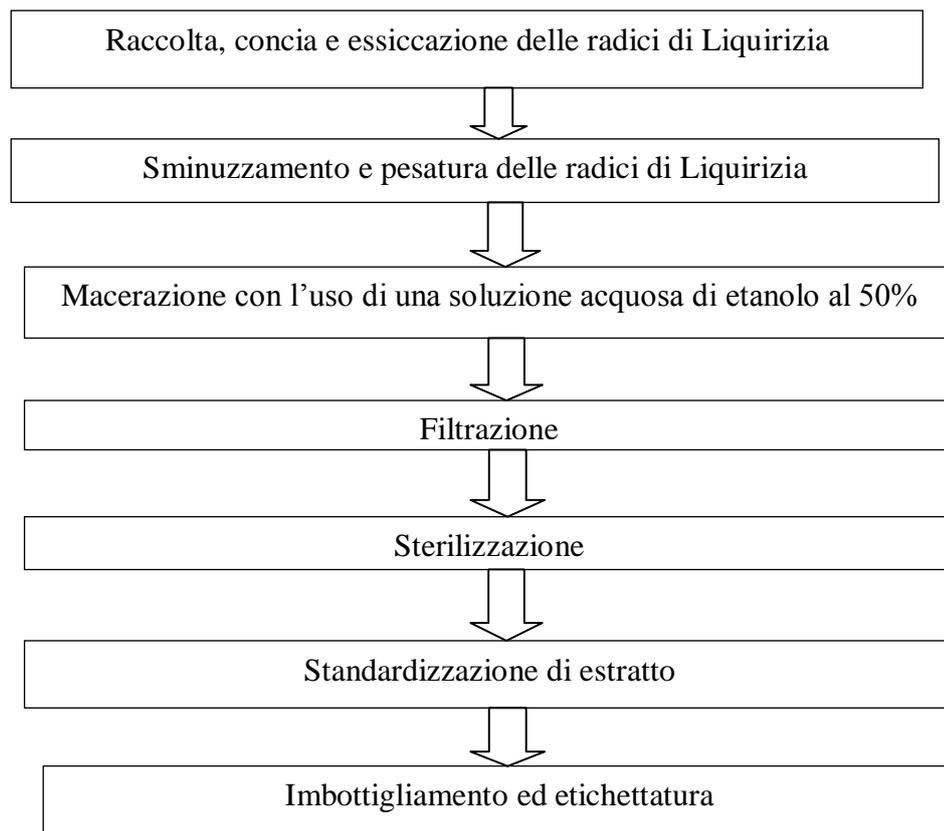


Fig. 37. Fasi del processo per ottenere un estratto liquido di radici di liquirizia *Glycyrrhiza glabra*

Gli estratti liquidi ottenuti di radice di liquirizia *Gl. glabra*, e di infiorescenze di achillea *A. micrantha* e di elicriso *H. arenarium*, con proprietà antimicrobiche possono essere utilizzati come componenti di prodotti biologici per uso cosmetico e farmaceutico o per altre possibili applicazioni di interesse industriale. Nel caso in cui il processo tecnologico per ottenere un estratto liquido di radice di liquirizia voglia utilizzare un solvente estraente diverso dall'etanolo al 50%, al fine di ottenere un estratto liquido con proprietà antimicrobiche superiori, come dimostrato dalla presente ricerca, è necessario probabilmente modificare il processo finale di sterilizzazione e di essiccamento al fine di eliminare completamente il solvente usato e di sostituirlo eventualmente alla fine con etanolo al 50%.

CONCLUSIONI

La presente indagine si inserisce in una ricerca di interesse crescente relativa all'individuazione ed estrazione da piante di noti e nuovi composti biologicamente attivi, puri o in miscela, dotati di proprietà diverse (antimicrobiche, antiossidanti, immunoprotettive, ecc) per l'utilizzo pratico dei medesimi a scopi farmaceutici, cosmetici, nutraceutici e per altre applicazioni. I principali obiettivi riguardavano: a) l'individuazione di più efficienti condizioni di estrazione, di frazionamento degli estratti e di analisi qualitativa e quantitativa dei principali componenti; b) la messa a punto di metodiche per valutare le proprietà biologiche, con confronto sia con prodotti commerciali sia con estratti da piante uguali ma cresciute in habitat naturali differenti; c) la risoluzione di problemi teorici e pratici nell'utilizzo delle piante a fini applicativi.

Le piante da cui sono stati estratti principi attivi sono tipiche della regione di Astrakhan (Russia), crescono spontaneamente e sono: achillea *Achillea micrantha*; elicriso *Helycrisum arenarium*; liquirizia *Glycyrrhiza glabra*. Delle prime due sono stati ottenuti gli estratti da infiorescenze, la terza estratti da radice. Per quest'ultima pianta è stata usata per confronto la radice della medesima pianta che cresce in Calabria (Italia).

Gli estratti idroalcolici con acqua/etanolo in rapporto 1/1 delle infiorescenze di achillea ed elicriso sono stati analizzati e la loro composizione è stata definita mediante GC-massa; i composti identificati sono tendenzialmente terpeni e terpenoidi. La composizione della miscela risulta confrontabile con quelle dei corrispondenti oli essenziali ottenuti dalle medesime piante, ma il procedimento qui usato risulta più semplice e conveniente per uno sviluppo su scala applicativa. Come risultato del lavoro qui svolto, è stato stabilito che gli estratti delle infiorescenze di achillea ed elicriso hanno una buona attività antimicrobica nei confronti tutti e tre i ceppi di microrganismi (*E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*) utilizzati come test ed in alcuni

casi essa non è inferiore a quella dell' estratto di radice di liquirizia, la cui attività antimicrobica era già stata identificata e indagata. In particolare l'estratto idroalcolico di *Helycrisum arenarium* è risultato particolarmente efficace nei confronti di *B. subtilis* e la sua attività antibatterica è risultata la più alta tra gli estratti delle piante esaminate e superiore a quella dell'antibiotico commerciale Cloramfenicolo.

Per quanto riguarda i principi attivi da liquirizia, nella presente ricerca è stata approfondita l'indagine : a) utilizzando solventi di estrazione differenti; b) tentando un frazionamento a gruppi di sostanze mediante cromatografia su colonna, riempita con un idoneo supporto solido, XAD 1600, ed usando come eluente una miscela etanolo/acqua/ammoniaca/ (90/10/1); c) quantificando mediante HPLC le percentuali di 3 noti principi attivi, quali glicirrizina, acido 18 β glicirretico, glabridin, negli estratti tal quali e in alcune frazioni e per confronto nei corrispondenti estratti e frazioni derivanti da radice cresciuta in Calabria; d) valutando l'attività antimicrobica degli estratti e di alcune frazioni su tutti e tre i ceppi di microrganismi (*E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis*) utilizzati come test e tentando di correlarla al contenuto dei tre suddetti principi attivi per stabilire una relazione struttura del principio attivo/ attività antimicrobica.

I principali risultati ottenuti sono i seguenti:

- i) La miscela estraente tradizionalmente usata, etanolo 50%, risulta efficace e comoda da usare tal quale o dopo concentrazione del solvente per la sua attività antimicrobica in applicazioni farmaceutiche, cosmetiche, ecc. e contiene un buona quantità di glicirrizina, che è normalmente considerata il principale principio attivo estratto da liquirizia. Tuttavia, usando come estraenti, solventi di media polarità quali etil acetato o dietilcarbonato, il cui uso non era stato descritto in precedenza, è stato possibile ottenere estratti con una significativamente più alta attività antibatterica, probabilmente per la più elevata presenza di flavonoidi e/o di acido 18 β glicirretico, mentre risulterebbe dimostrato

che la glicirrizina, presente in quantità trascurabili in questi estratti, non contribuisce come tale all'attività antibatterica contro questi tre ceppi microbici. La glicirrizina, potrebbe forse funzionare come *pro-drug* in quanto, dopo deglicosilazione, si ottiene da essa l'acido 18β glicirretico.

- ii) Sebbene le prove di frazionamento su colonna richiedano un'ulteriore indagine ed ottimizzazione, è risultato che: a) il frazionamento separa componenti aventi diversa selettività nei confronti dei batteri testati e probabilmente diversa concentrazione delle specie attive nelle frazioni isolate; b) alcune frazioni degli estratti etanolici (50%) di radice di liquirizia hanno mostrato una più alta attività antibatterica verso i ceppi microbici esaminati dell'estratto tal quale; c) nei confronti di *St. aureus* l'estratto tal quale, al contrario, ha evidenziato un effetto antibatterico più forte delle singole frazioni, forse dovuto ad un effetto sinergico tra vari composti, che risulterebbero differentemente frazionati su colonna. Dal momento che l'estratto tal quale è un complesso di differenti strutture chimiche aventi proprietà biologiche differenti e potrebbe inoltre contenere alcune impurezze in grado di diminuire o addirittura inibire l'azione delle specie attive, un parziale frazionamento su colonna cromatografica a gruppi di sostanze, potrebbe essere probabilmente vantaggioso per alcune applicazioni, ma sicuramente non in tutti i casi. Per quanto riguarda il glabridin, uno tra i principali flavonoidi contenuti nell'estratto della radice di liquirizia e considerato nella letteratura scientifica tra le specie biologicamente più attive come antibatterico, la presente ricerca ha dimostrato che il prodotto isolato e commercialmente disponibile risulta meno attivo o addirittura inattivo rispetto agli estratti, che lo contengono e che invece mostrano ottima attività antimicrobica. Questo potrebbe essere dovuto alla co-presenza di specie sinergiche oppure la specie più attiva è un flavonoide diverso. Tale aspetto

richiederà in futuro la migliore caratterizzazione degli estratti andando ad identificare anche specie presenti in minore quantità che però potrebbero essere le reali responsabili dell'attività biologica osservata.

- iii) Lo studio comparativo della attività antimicrobica, accoppiato all'indagine sul contenuto qualitativo e quantitativo dei principali noti componenti attivi di estratto di radice di liquirizia, coltivate in diverse regioni, la regione di Astrakhan (Russia) e la regione Calabria (Italia), ha evidenziato un più marcato effetto antimicrobico dell'estratto di liquirizia dalla regione di Astrakhan. Non vi è dubbio che la composizione qualitativa e quantitativa di sostanze biologicamente attive di piante possa essere influenzata da numerosi fattori, quali ad es. le condizioni climatiche e geografiche dei luoghi di crescita, la stagionalità, l'età della pianta, i metodi di lavorazione, asciugatura, etc. In particolare, la zona arida della regione di Astrakhan, con clima tendenzialmente costante durante tutto l'anno, potrebbe favorire un più alto contenuto di principi attivi nelle piante locali. I risultati andranno confermati in futuro con campionamenti diversi e verifiche sul contenuto analitico e attività battericide degli estratti, evidenziando soprattutto eventuali variabilità di contenuto, che possono essere di fondamentale importanza per talune applicazioni di tipo farmaceutico, cosmetico, ecc.
- iv) I risultati della presente ricerca possono essere la base per lo sviluppo di nuovi metodi di normalizzazione e produzione di efficienti estratti liquidi dalle piante utilizzate. È stato quindi proposto uno schema tecnologico di produzione, imbottigliamento, etichettatura dei liquidi estratti da infiorescenze di *Achillea micrantha*, di *Helichrysum arenarium* e da radice di *Glycyrrhiza glabra*, che ha potenziali ricadute economiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Алебастров, О.В. Получение и структура трихлорпроизводного сесквитерпенового лактона ахиллина / О.В. Алебастров, В.А. Ралдугин, И.Ю. Багрянская, Ю.В. Гатилов, М.М. Шакиров, А.Т. Кулыясов, С.М. Адекенов, Г.А. Толстиков // Химия в интересах устойчивого развития. – 2001. - №9. – С. 519-522.
2. Алехина, Н.Д. Физиология растений: учебник для студентов вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко и др.; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 640 с.
3. Алешукина, А.В. Медицинская микробиология / А.В. Алешукина. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2003. - С. 20 – 83.
4. Алякин, А.А. Динамика выделения и компонентный состав эфирного масла тысячелистника обыкновенного пригорода Красноярска / А.А. Алякин, А.А. Евремов, С.В. Качин, Е.Г. Струкова // Химия растительного сырья. – 2009. - №4. – С.73-78.
5. Багирова, В.Л. Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация / В.Л. Багирова, В.А. Северцев. - С.–Петербург: СпецЛит., 2001. - 223 с.
6. Березкин, В.Г. Количественная тонкослойная хроматография / В.Г. Березкин, А.С. Бочков. - М.: Наука, 1994. - 183 с.
7. Биохимия: Учебник / под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР, 2004. – 784 с.
8. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В.Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.
9. Брыкалов, А.В. Антимикробная активность биологически активных препаратов из маклей сердцевидной / А.В. Брыкалов, Е.В. Белик // Тезисы докладов региональной конференции по биотехнологии. - Краснодар, 2000. - С. 61.

10. Брыкалов, А.В. Биоантиоксидантные свойства препаратов из маклей сердцевидной и солодки голой / А.В. Брыкалов, Е.В. Белик // Тезисы докладов региональной конференции по биотехнологии. - Ставрополь, 1999. - С. 61.

11. Васильев, А.С. Лекарственные средства растительного происхождения / А.С. Васильев, Г.И. Калинкина, В.Н. Тихонов. - Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2006. – 122с.

12. Вичканова, А. Лекарственные растения. К вопросу об изучении антимикробных свойств эфирных масле / А. Вичканова, Л.В. Макаров, М.А. Рубинчик, В.В. Адгина.– М.: Колос, 1971. - С. 221-230.

13. Войткевич, С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии/ С.А. Войткевич. - М.: Издательство «Пищевая промышленность», 1999. - 284 с.

14. Вульф, Е.В. Справочник. Мировые ресурсы полезных растений / Е.В. Вульф, О.Ф. Малеева. – Л.: Наука, 1969. – 390 с.

15. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / под ред. А. Хеншен. - М.: Мир, 1988. - 688 с.

16. Гаврилин, М.В. Совершенствование способов оценки качества корней и сиропа солодки голой / М.В. Гаврилин, С.П. Сенченко, А.М. Тамирян, А.В. Печенова // Химия растительного сырья. – 2009. - №4. – С. 147-150.

17. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растений (Растения-целители) Справ. Пособие / А.Ф. Гаммермаен, Г.Н. Кадаев, А.А. Яценко-Хмелевский. - М.: Высшая школа, 1990. - С. 3-33.

18. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. - Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. - 333с.

19. Голышенков, П.П. Краткий очерк изучения и применения лекарственных растений. Курс лекций / П.П. Голышенков, С.П. Голышенков. – Саранск: Изд-во Саратовского университета, Саранский филиал, 1990. - 44 с.
20. Гончарова, Т.А. Энциклопедия лекарственных растений. Лечение травами / Т.А. Гончарова. - М.: Изд. МСП, 1997 - С. 7-21.
21. ГОСТ 22839-88. Корни и корневища солодки. – Москва. – С. 27-30.
22. ГОСТ 22840-77. Экстракт солодкового корня. – Москва. – С. 31-36.
23. ГОСТ 6077-80. Сырье лекарственное растительное. – Москва. – С. 98-101.
24. Государственная фармакопея Российской Федерации, том 1 / М.: «Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
25. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации//Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/> . – свободный. – Яз. рус.
26. Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. - М.: «Высшая школа», 1983. - 176 с.
27. Держинская, И.С. Методы выделения, исследования и определения антибиотической активности микроорганизмов, обладающих антагонистическими свойствами: Методические указания к практическим работам по дисциплине Антибиотики для студентов специальности 012400 «Микробиология» / И.С. Держинская. – Астрахань: АГТУ, 2005. - С. 54- 64.
28. Дикусар, Е.А. Синтез и изучение фунгицидной активности аминовых солей глицирризиновой кислоты / Е.А. Дикусар, В.И. Поткин,

Н.Г. Козлов, Р.А. Гаджилы, Р.Т. Тлегенов, А.П. Ювченко, Р.А. Желдаков // Химия растительного сырья. – 2011. - №4. – С. 53-56.

29. Егоров, М.А. Физиологические особенности действия фитогормона эпибрассинолида на организм животных в раннем онтогенезе: монография / М.А. Егоров. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. - 248 с.

30. Журба, О.В. Травник / О.В. Журба. - М.: Арнадия, 1997. - С. 3 – 11.

31. Законодательство о препаратах на основе лекарственных растений. Обзор мировой практики // пер. Сотниковой О. - Провизор (онлайн-журнал). – 2002. - №16. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N16/art_21.php. - свободный. - Яз. рус.

32. Законодательство о препаратах на основе лекарственных растений. Обзор мировой практики (продолжение) // Пер. Сотниковой О. Провизор (онлайн-журнал). – 2002. - №17. - Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N17/art_34.php- свободный. - Яз. рус.

33. Законодательство о препаратах на основе лекарственных растений. Обзор мировой практики (продолжение) // Пер. Сотниковой О. Провизор (онлайн-журнал). – 2002. - №18. - Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N18/art_22.php. - свободный. - Яз. рус.

34. Законодательство о препаратах на основе лекарственных растений. Обзор мировой практики (оканчание) // Пер. Сотниковой О. Провизор (онлайн-журнал). – 2002. - №19. - Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2002/N19/art_05.php- свободный. - Яз. рус.

35. Закутнова, В. И. Мониторинг лишайников дельты Волги: монография / В. И. Закутнова, Т. А. Пилипенко. — Астрахань, 2004. — 115 с.
36. Зорина, О. Будущее официальной фитотерапии и фитофармакологии в России / О. Зорина // Провизор (он-лайн-журнал). — 2010. — №6. — Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2010/N06/fitot_0610.php?part_code=37&art_code=7593. — свободный. — Яз.рус.
37. Иванова, С.З. Получение флаванов из флаванолов / С.З. Иванова, Т.Е. Федорова, С.В. Федоров, В.А. Бабкин // Химия растительного сырья. — 2004. - №3. — С. 5-9.
38. Каухова, И.Е. Особенности экстрагирования биологически активных веществ двухфазной системой экстрагентов при комплексной переработке лекарственного растительного сырья / И.Е. Каухова // Растительные ресурсы. — 2006. — Т. 42., вып. 1. - С. 82-91.
39. Кефели, В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны / В.И. Кефели. - М.: «Наука», 1974. - 253 с.
40. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: в 2 т. / Ю. Кирхнер, под ред. В.Г. Березкина. - М.: Мир, 1981. — 616 с.
41. Киселев, А.В. Риски, возникающие при применении лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на его основе / А.В. Киселев, А.Э. Габидова, В.А. Галынкин, К.В. Айрапетян // Гигиена и санитария. — 2010. - №6. — С. 78-80.
42. Козак, М.Ф. Биометрия / М.Ф. Козак. - Астрахань: Изд-во «Волга», 1995. - 160 с.
43. Кретович, В.Л. Биохимия растений / В.Л. Кретович. - М.: Высшая школа, 1980. — 445 с.

44. Кулаева, О.Н. Этилен в жизни растений /О.Н. Кулаева // Соросовский образовательный журнал. – 1998. - №11. – С. 78-84.
45. Куркина, А.В. Исследование компонентного состава цветков *Helichrysum arenarium* (L.) Moench./ А.В. Куркина // Химия растительного сырья. – 2011. - №2. – С. 113-116.
46. Лакин, Г.Ф. Биометрия – Учеб.пособие для ВУЗов / Г.Ф. Лакин. - М.: «Высшая школа», 1990. - 352 с.
47. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева – СПб: СпецЛит, 2006. - 845 с.
48. Лекарь, А.В. Масс-спектрометрическое исследование молекулярного комплексообразования растительных гликозидов со стрептоцидом (сульфаниламидом) / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко, Л.А. Яковшин, В.И. Гришковец // Химия растительного сырья. - 2011. - №2. - С. 103-106.
49. Маслов, А.К. Влияние экстракта из корня солодки на функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей, зараженных внутрибрюшинно микобактериями туберкулеза / А.К. Маслов, Г.Н. Назарова, Л.Т. Сухенко // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. - Т.15, №4. – С. 212-213.
50. Медведев, С.С. Физиология растений :Учебник / С.С. Медведев. –СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета, 2004. – 336 с.
51. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004 – 560 с.
52. Моргунова, Е.М. Экстракция натурального растительного сырья повышенной биологической ценности / Е.М. Моргунова, Н.А. Шелегова, М.Л. Микулинич // Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья. – 2010 - №11. – С.11-15.

53. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: «Медицина», 2002. - 656 с.
54. Назарова, Г.Н. Влияние экстрактов некоторых растений Астраханской области на клетки микобактерий туберкулеза / Г.Н. Назарова, Л.Т. Сухенко, А.К. Маслов//Вестник новых медицинских технологий. – 2007. - Т. 14, №4. - С. 44-45.
55. Назарова, Г.Н. Предпосылки использования экстракта из корня солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*) в терапии лепры / Г.Н. Назарова, А.К. Маслов, Л.Т. Сухенко, С.А. Лужнова // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. - Т.15, №2. - С. 218-219.
56. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студентов высш.учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др., под ред. Нетрусова А.И. – М.: Издательский центр «Академия», 2005 – 608 с.
57. Ноздрачев, В.Я. Сырьевые запасы некоторых лекарственных растений Прикаспийского региона Астраханской области/ В. Я. Ноздрачев, Л.Т. Сухенко// Материалы 1й международной конференции по изменениям среды Каспийского региона (24-25 августа 2008). – Балбосар, Иран, 2008. – С. 21-25
58. Отраслевой стандарт «91500.05.001.00 – Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» // Утвержден Приказом Министерства здравоохранения России от 01.11.2001 №388 «О государственных стандартах качества лекарственных средств».
59. Оуди, П. Полный медицинский травник /П. Оуди. - Лондон: Дорлинг Киндерсли, 2000. - С. 6 -23.
60. Пешкова, В.М. Практическое руководство по спектрофотометрии и колориметрии / В.М. Пешкова, М.И. Громова. - М.:Издательство Московского университета, 1965. - 228 с.

61. Пилипенко, В.Н. Лекарственные растения Астраханской области / В.Н. Пилипенко, Д.Л. Теплый и др. – Астрахань: Изд-во АГПУ, 1997– С. 6-68.
62. Пилипенко, В.Н. Лекарственные растения Нижнего Поволжья / Пилипенко В.Н., Каюков Ф.В. Пилипенко Т.А. // Материалы доклада итоговой научной конференции. – Астрахань, 1993. – С 60.
63. Пилипенко, В.Н. Современная флора дельты Волги / В.Н. Пилипенко, А.Л. Сальников, С.Н. Перевалов. – Астрахань: Изд-во АГПУ, 2002. – 138 с.
64. Покровская, И.С. Хематоксономия тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / И.С. Покровская, О.В. Мазова, Н.Н. Апыхтин, В.В. Племенков // Химия растительного сырья. – 2009. - №3. - С. 85-88.
65. Полевой, В.С. Физиология растений / В.С. Полевой. - М.:Высшая школа, 1989. - 464 с.
66. Пономарев, В.Д. Экстрагирование растительного сырья / В.Д. Пономарев. – М.: Медицина, 1976. – 210 с.
67. Руженкова, И.В. Основы фитотерапии/ И.В. Руженкова. - Ростов-на-Дону: «Феликс», 2005. - С. 5 -10.
68. Сагалаев, В.А. Характерные черты систематической структуры аридной флоры степей и пустынь Юго-Востока европейской части России/В.А. Сагалаев//Известия Волгоградского государственного педагогического университета. Серия «Естественные и физико-математические науки». – 2003 - № 3 (04). - С. 82-93.
69. Садек, П. Растворители для ВЭЖХ/ П. Садек. - .М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 704 с.

70. Сажина, Н.Н. Измерение суммарного содержания фенольных соединений в различных частях лекарственных растений / Н.И. Сажина, В.М. Мисин // Химия растительного сырья. – 2011. - №3. - С. 149-152.
71. Серкеров, С.В. Новый компонент *Achillea filipendulina* Lam. / С.В. Серкеров, С.Дж. Мустафаева // Химия растительного сырья. – 2009. - №2.- С. 101-103.
72. Столяров, Б.В. Практическая газовая и жидкостная хроматография: Учеб. пособие/Б.В. Столяров, И.М. Савинов, А.Г. Витенберг. - СПб: Издательство Санкт-Петербургского университета, 2002. - 616 с.
73. Струкова, Е.Г. Воздействие эфирных масел сибирского региона на условно-патогенные микроорганизмы / Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова, Л.С. Соколова // Химия растительного сырья. – 2009. - №4. - С.79-82.
74. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография/Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. - М.:Химия, 1986. - 213 с.
75. Сухенко, Л.Т. Аллелопатические признаки лектиноподобных белков растений Астраханского региона / Л.Т.Сухенко, Г.Н.Назарова, А.В.Ковалева // Аллелопатія та счасна біологія: Матеріали міжнародної наукової конференції – Київ, 2006. – С. 131-135.
76. Сухенко, Л.Т. Биологически активные вещества некоторых растений и механизмы их противомикробной активностью / Л.Т. Сухенко // Естественные науки. – 2010. - №3. - С. 166-176.
77. Сухенко, Л.Т. Изучение биологически активных веществ некоторых растений в условиях Астраханского региона / Л.Т. Сухенко // Вестник Московского Государственного Областного Университета, Серия «Естественные науки». - №2. - 2006. - с. 69-71.

78. Сухенко, Л.Т. Лабораторно-практические занятия по микробиологии с основами вирусологии, в 2 ч. / Л.Т. Сухенко. - Астрахань: Изд-во АГПУ, 1999.

79. Сухенко, Л.Т. Перспективы выделения противомикробных биологически активных веществ из некоторых дикорастущих растений Астраханской области / Л.Т. Сухенко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. - №123. – С. 98-102.

80. Сухенко, Л.Т. Разработка фитопрепаратов «ГЛИЦИР-ФИТ» с противомикробной активностью на основе растений Астраханского региона / Л.Т. Сухенко // Естественные науки. – 2010. - №3. - С. 145-149.

81. Сухенко, Л.Т. Сравнительная бактерицидная активность некоторых растений дикорастущей флоры Астраханской области / Л.Т. Сухенко, Н.А. Иванова, А.В. Великородов, А.Г. Тырков, В.Я. Ноздрачев, В.Н. Пилипенко // Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия: Материалы 3 Всероссийской научной конференции (4-8 октября 2000). - Астрахань, 2000. - С. 207-209.

82. Сухенко, Л.Т. Усиление активности перитонеальных макрофагов мышей, зараженных *Mycobacterium tuberculosis* H37RV, леченных препаратом «ГЛИЦИРФИТ» из *Glycyrrhiza glabra* / Л.Т. Сухенко // Естественные науки. – 2011. - №2. - С. 172-175.

83. Сычев, С.Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография на микроколончатых хроматографх серии «Милихром»: монография / С.Н. Сычев, К.С. Сычев, В.А. Гаврилина. - Орел: ОрелГТУ, 2002. - 134 с.

84. Темердашев, З.А. Оценка стабильности фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях в процессе их хранения / З.А. Темердашев, Н.А. Фролова, Т.Г. Цюпко, Д.А. Чупрынина // Химия растительного сырья. – 2011. - №4. – С.193-198.

85. Тырков, А.Г. Антимикробная активность эфирных масел, выделенных из растений Астраханского региона / А.Г. Тырков, Л.Т. Сухенко, Э.Р. Акмаев // Вестник Алтайского государственного университета. – 2012. - Т.88, №2. – С. 57-59.

86. Филипенко, Т.А. Антиоксидантное действие экстрактов лекарственных растений и фракций их фенольных соединений / Т.А. Филиппенко, Н.Ю. Грибова // Химия растительного сырья. – 2012. - №1. – С.77-81.

87. Хакимов, М.Х. Эфирное масло *Achillea micrantha* / М.В. Хакимов, И.П. Цукерваник // Труды института химии АН УзССР. – 1986. - вып.1. – С. 27 – 33.

88. Чанг, Р. Физическая химия с приложениями к биологическим системам/ Р. Чанг. – М: Мир, 1980. - 663 с.

89. Чуешов, В.И. Технология биологически активных веществ : учеб. пособие для вузов. В 2 ч. Ч.2. Промышленная технология производства ГЛС и фитопрепаратов / В.И. Чуешов. – Харьков: Изд. НФАУ: Золотые страницы, 2002. – 96 с.

90. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др.: под ред. В.С. Шевелухи – М.: Высшая школа, 1998. – 416 с.

91. Шелеметьева, О.В. Определение содержания витаминов и биологически активных веществ в растительных экстрактах различными методами / О.В. Шелеметьева, Н.В. Сизова, Г.Б. Слепченко // Химия растительного сырья. - 2009. - №1. – С.113-116.

92. Шемерякина, Т.Б. Требования к стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на его основе / Т.Б. Шемерякина, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева // Вопросы

биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. - №3. – С. 9-12.

93. Якушина, Н.И. Физиология растения / Н.И. Якушина. - М.: Просвещение, 1980. - 303 с.

94. Abrahamian, P. Effect of vitamins on *in vitro* organogenesis of plant / P. Abrahamian, A. Kantharajah // American journal of plant sciences. - 2011. - №2. –P. 669-674.

95. Achinrwhu, S.C. The saponins Content of Some Nigerian Oil Seeds/S.C. Achinrwhu // Qual Plant Foods Human Nutr. – 1983. - №33. – P. 3-9.

96. Adekenov, S.M. Terpenoids of *Achillea micrantha* / S.M. Adekenov, N.M. Gafurov, A. Zh. Turmukhambetov, V.I. Iulev // Chemistry of Natural Componds. – 1987. - Vol. 23, №2. – P. 258.

97. Agyare, C. Antimicrobial Activity and Phytochemical Studies of Some Medicinal Plants from Ghana / C. Agyare, A.Y. Mensah, A.S. Osei // Boletin, Latiamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. – 2006. - №5. – P. 113-117.

98. Albayrak, S. Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey / S. Albayrak, A. Aksoy, O. Sağıç, U. Budak // Turkish Journal of Biology. – 2010. - №34. – P. 463-473.

99. Albu, S. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry / S. Albu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, T.J. Mason // Ultrasonics Sonochemistry. – 2004. - №11. – P. 261–265.

100. Al-Harshseh, M. Microwave-assisted leaching—A review / M. Al-Harshseh, S.W. Kingman // Hydrometallurgy. – 2004. - №73. – P. 189–203.

101. Ameyaw, Y. The alkaloid contents of the ethno-plant organs of three antimalarial medicinal plant species in the eastern region of Ghana / Y. Ameyaw, G. Duker-Eshuna // International Journal of Chemical Sciences. – 2009. – Vol.7, №1. – P. 48-58.

102. Amjad, L. Potential activity of the *Achillea wilhelmsii* leaves on bacteris / L. Amjad, M. Mohammadi-Sichani, M. Mohammadi-Kamalabadi // International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. – 2011. - Vol.1, №3. - P. 216 – 218.

103. Andras, C.D. Supercritical carbon dioxide extraction of okra (*Hibiscus esculentus* L) seeds / C.D. Andras, B. Simandi, F. Orsi, C. Lambrou, D. Missopolinou-Tatala, C. Panayiotou et al. // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2005. - №85. – P. 1415–1419.

104. Andrews, R.E. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms / R.E. Andrews, L.W. Parks, K.D. Spence // Applied and Environmental Microbiology. – 1980. - №40. – P. 301-304.

105. Asato, L. Vitamin C content of representative plant food used by horticulturalists in the Zaire Basin and its Evaluation / L. Asato, J. Takeda, H. Sato, G. Idani and T. Kano // Humans and Nature. 1995. - №5. - P. 13-24.

106. Asimova, S.S. Lipids, lipophilic components and essential oils from plant sources. Vol.1. / S.S. Asimova, A.I. Glushenkova, V.I. Vinogradova. – Springer: Berlin, 2012 – 992 p.

107. Astuti, S.M. Determination of saponin compound from *Anredera cordifolia* (ten) steenis plant (binahong) to potential treatment for several diseases / S. M. Astuti // Journal of Agricultural Science. – Vol.3. - №4. – P. 224-232.

108. Attele, A.S. Ginseng pharmacology. Multiple constituents and multiple actions / A.S. Attele, J.A. Wu, C.S. Yuan // Biochemical Pharmacology. – 1999. - №58. – P.1685–1693.

109. Babaei, M. Antimotility effect of hydroalcolic extract of yarrow (*Achillea millefolium*) on the Guinea-Pig Ileum / M. Babaei, M.E. Abarghoei, M.M. Akhavan, R. Ansari, A.A. Vafaei, A.A. Taherian, S. Mousavi, J. Toussy // Pakistan Journal of Biological Sciences. 2010. – Vol. 10, №20. - P. 3673-3677.

110. Baggio, C.H. Action of crude aqueous extract of leaves of *Achillea millefolium* L. (Compositae) on gastrointestinal tract / C.H. Baggio, C.S. Freitas, P.F. Nhaducue, L. Rieck, M.C.A. Marques // Revista Brasileira de Farmacognosia – 2002. - №12. – P. 31-33.

111. Baiano, A. I composti fenolici negli alimenti. Classificazione, distribuzione, metodi di estrazione ed analisi / A. Baiano, C. Terracone. - Roma : MMX ARACNE editrice S.r.l., 2010. - 155 p.

112. Bajguza, A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants / A. Bajguza, A. Tretynb // Phytochemistry. – 2003. - №62. – P. 1027-1046.

113. Bari, R. Role of plant hormones in plant defence responses / R. Bari, J. D.G. Jones // Plant Molecular Biology. -2009. – №69. - P.473-488.

114. Baris, O. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan (Asteraceae) / O. Baris, M. Gulluce, F. Sahin, H. Ozer, H. Kilic, H. Ozkan, M. Sokmen, T. Ozbek // Turk Journal Biology. – 2006. – №30. - P. 66-73.

115. Barnes, C.C. Characterization of an Anti-tuberculosis Resin Glycoside from the Prairie Medicinal Plant *Ipomoea leptophylla* / C. C. Barnes, M. K. Smalley, K. P. Manfredi, K. Kindscher, H. Loring, D.M. Sheeley // Journal of Natural Products. – 2003. - №66. – P. 1457-1462.

116. Barriada-Pereira, M. Microwave-assisted extraction versus soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants / M. Barriada-Pereira, E. Concha-Grana, M.J. Gonzalez-Castro, S. Muniategui-

Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez et al. // Journal of Chromatography A. – 2003. - №1008. – P. 115–122.

117. Baser, K.H.C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida* / K.H.C. Baser, B. Demirci, F. Demirci, S. Kocak, C.Akinci, H.Malyer, G. Guleryuz // Planta Med. – 2008. – №68. - P. 941-943.

118. Benetis, R. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* Wild populations in Lithuania / R. Benetis, J. Radusiene, V. Janulis // Medicina (Kaunas). – 2008. – Vol.44, № 10. – P. 775 – 781.

119. Berkov, S. Alkaloids of *Datura ceratocaula*/S. Berkov // Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen. - 2003. – Vol.1. - P. 455 – 458.

120. Berna, A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel: Effect of the height of the bed / A. Berna, A. Tarrega, M. Blasco, S. Subirats // Journal of Supercritical Fluids. – 2000. - №18. – P. 227–237.

121. Bernardo-Gil, M. G Supercritical fluid extraction and characterization of oil from Hazelnut / M.G. Bernardo-Gil, J. Grenha, J. Santos, P. Cardoso // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2002. - №104. – P. 402–409.

122. Bernath, J. Cultivated plants, primarily as food sources / J. Bernath. – EOLSS, 2006. – P. 1-9.

123. Bernini, R. A Convenient and Safe *O*-Methylation of Flavonoids with Dimethyl Carbonate (DMC) / R. Bernini, F. Crisante, M.C. Ginnasi // Molecules. – 2011. - №16. – P.1418-1425.

124. Bhakuni, D.S. Alkaloids from Indian medicinal plants and their biosynthesis / D.S. Bhakuni // Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci). -1984. - Vol. 93, №4. – P. 661-676.

125. Biffignandi, P. The new attitude of the European regulatory authorities about herbal medicinal products / P. Biffignandi, L. Carletto // *Drug Information Journal*. – 2000. - № 34. – P. 801-808.

126. Blumert, M. Jiaogulan. (Gynostemma pentaphyllum): China's Immortality Herb / M. Blumert, J. Liu. - Badger, California: Torchlight Publishing, Inc., 2003. - 80 p.

127. Boakye-Yiadom, K. Antimicrobial Properties of Cryptolepis / K. Boakye-Yiadom // *Journal of Pharmaceutical Science*. – 1979. - №68. – P. 435 – 447.

128. Braun, S. 150 and more Basic NMR Experiments. A practical course / S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger. - Weinheim (Federal Republic of Germany): WILEY-VCH, 1998. - 596 p.

129. Breitmaier, E. Structure elucidation by NMR in organic chemistry / E. Breitmaier. – Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 2002. - 258 p.

130. Bruni, R. Rapid techniques for the extraction of vitamin E isomers from *Amaranthus caudatus* seeds: Ultrasonic and supercritical fluid extraction / R. Bruni, A. Guerrini, S. Scalia, C. Romagnoli, G. Sacchetti // *Phytochemical Analysis*. – 2002. - №13. – P. 257–261.

131. Bryksa-Godzisz, M. Phenolic compounds in yellow everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) growing wild in the middle part of the Bug river valley / M. Bryksa-Godzisz, Z. Weglarz, J. Przybyl // *Kerla Polonica*. – 2006. – Vol.52, №4. – P. 26-31.

132. Burlando, B. Herbal principles in cosmetics. Properties and mechanisms of action / B. Burlando, L. Verotta, L. Cornara, E. Bottini-Massa. – Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis group, 2010. - P.226-231.

133. Bylka, W. Natural flavonoids as antimicrobial agents / W. Bylka, I. Matlawska, N.A. Pilewski // *Journal of American Nutraceutical Association's* . – 2004. -Vol.7, № 2. - P. 24-31.

134. Capodaglio, G. Speciation Analysis Of Mercury In Seawater From The Lagoon Of Venice By On-Line Pre-Concentration Hplc-Icp-Ms / G. Capodaglio, W. Cairns, M. Ranaldo, R. Hennebelle, C. Turetta, C. Ferrari, A. Dommergue, P. Cescon, C. Barbante // In *Analytica Chimica Acta*. – 2008. - Vol. 622. – P. 62-69.

135. Carange, J. 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP⁺-Induced Oxidative Stress and Apoptosis/J. Carange, F. Longpré, B. Daoust, M.-G. Martinoli//*Journal of Toxicology*. – 2011. – 13 p. – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/jt/2011/392859/>, СВОБОДНЫЙ. – ЯЗ. АНГЛ.

136. Castleman, M. The new healing herbs / M. Castleman. –New York: St. Martin's Press, 2001. – P. 271 – 275.

137. Cavalcanti, A.M. Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats / A.M. Cavalcanti, C.H. Baggio, C.S. Freitas, L. Rieck, R.S. de Sousa, J.E. Da Silva-Santos, S. Mesia-Vela, M.C.A. Marques // *Journal of Ethnopharmacology* – 2006. - №107. – P.277-284.

138. Ceyhun, S.A.E. Determination of Saponin content in Turkish Tahini Halvah by using HPLC / S.A.E. Ceyhun, N. Artic // *Advance Journal of Food Science and Technology*. – 2010. – Vol.2, №2. – P. 109-115.

139. Chandler, R.F. Herbal remedies the maritime Indians: sterols and triterpenes of *Achillea millefolium* L. (yarrow) / R.F. Chandler, S.N. Hooper, D.L. Hooper, W.D. Jamieson, C.G. Flinn, L.M. Safe // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1982. - №71. – P. 690-693.

140. Chemat, S. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds / S. Chemat, A. Lagha, H. AitAmar, P.V. Bartels, F. Chemat // *Flavour and Fragrance Journal*. – 2004. - №19. – P. 188–195.

141. Cheng, A.-X. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions / A.-X. Cheng, Y.-G. Lou, Y.-B. Mao, Sh. Lu, L.-J. Wang, X.-Y. Chen // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2007. - Vol.49, №2. – P. 179–186.

142. Chin, Y.-W. Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) / Y.-W. Chin, H.-A. Jung, Y. Liu, B.-N. Su, J.A. Castoro, W.J. Keller, M. Pereira, A.D. Kinghorn // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2007. - №55. –P. 4691-4697.

143. Choi, Y. H. Comparison of supercritical carbon dioxide extraction with solvent of nonacosan-10-ol, a-amyrin acetate, squalene and stigmasterol from medicinal plants // J. Kim, M.J. Noh, E.S. Choi, K.P. Yoo // *Phytochemical Analysis*. - 1997. - № 8. – P. 233–237.

144. Coelho, J. A. P. Supercritical carbon dioxide extraction of *Foeniculum vulgare* volatile oil / J.A.P. Coelho, A.P. Pereira, R.L. Mendes, A.M.F. Palavra // *Flavour and Fragrance Journal*. – 2003. - №18. – P. 316–319.

145. Cravotto, G. Improving solvent-free extraction of policosanol from rice bran by high-intensity ultrasound treatment / G. Cravotto, A. Binello, G. Merizzi, M. Avogadro // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2004. - №106. – P. 147–151.

146. Cseke, L. J. *Natural Products from Plants* second edition / L. J. Cseke, A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, S. L. Warber, J. A. Duke, H. L. Briemann. - Boca Raton, London, New York: Taylor and Francis Group, 2006. - P. 286-288.

147. Cushinie, T.P.T. Antimicrobial activity of flavonoids / T.P.T. Cushinie, A.J. Lamb // *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005. - №26. – P. 343-356.

148. D'Archivio, M. Polyphenols, dietary sources and bioavailability / M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, R. Masella // *Ann Ist Super Sanità*. - 2007. - Vol.43, №4. - P. 348-361.

149. de Santanna, J.R., Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans* / J.R.de Santanna, C.C. Franco, C.T. Miyamoto, M.M. Cunico, O.G. Miguel, L.C. Cocco, C.I. Yamamoto, C.C. Junior, M.A. de Castro-Prado // *Phytotherapy Research*. – 2009. - №23. – P. 231-235.

150. Dean, J. R. Supercritical fluid extraction of Chinese herbal medicines: Investigation of extraction kinetics / J.R. Dean, B. Liu // *Phytochemical Analysis*. - 2000. - №11. – P. 1–6.

151. Di Rubbo, S. PP2A Phosphatases: The “on-off”regulatory switches of brassinosteroid signaling / S. Di Rubbo, N. Irani, J. Russinova, E. Russinova // *Science Signaling*. - 2011. – №4. - P. 25.

152. Dinana, L. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids / L. Dinana, J. Harmathab, R. Lafonic // *Journal of Chromatography A*. – 2001. - № 935. – P. 105–123.

153. Dorman, H.J.D Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils / H.J.D. Dorman, S.G. Deans // *Journal of Applied Microbiology*. – 2000. - № 88. – P. 308-316.

154. Egorov, M.A. Antioxidant action of biologically active substance of brassinosteroids class – phytohormone epibrassinolide / M.A.Egorov // *Biotechnology in Medecine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology*, Science Nova Publishers. - 2011. - P. 23-31.

155. Egorov, M.A. Brassinosteroids as possible nanoregulators of biological systems / M.A. Egorov // *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development Binding: Hardcover*, Science Nova Publishers. - 2012. -P. 143-146.

156. Egorov, M.A. Physiological peculiarities of the phytohormone epibrassinolide influence on organisms of animals in early ontogenesis / M.A. Egorov. – Astrakhan: Publishing House “Astrakhan University”, 2009. – 247 p.

157. El-Banna, E.N. Effect of foliar application with organic compounds on growth, yield and tubers quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) / E.N. El-Banna, S.A. Ashour, H.Z. Abd Al-Salam // Journal of Agricultural Sciences. – 2006. – №31 (2). - P. 1165-1173.

158. Elgayyar, M. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms / M. Elgayyar, F.A. Draughon, D.A. Golden, J.R. Mount // Journal of Food Protection. – 2001. - №64. - P. 1019-1024.

159. Ellington, E. Supercritical carbon dioxide extraction of colchicines and related alkaloids from seeds of *Colchicum autumnale* L. / E. Ellington, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina // Phytochemical Analysis. - 2003. - № 164. –P. 169.

160. El-Sakka, M.A. Phytochemistry (3) alkaloids / M.A. El-Sakka. – Cairo, Egypt: Al-Azhar University, 2010. – 122 p.

161. Emam, M.M. Efficiencies of some vitamins in improving yield and quality of flax plant / M.M. Emam, A.H. El-Sweify, N.M. Helal // African journal of agricultural research. – 2011. - Vol.6, №18. - P. 4362-4369.

162. Eroglu, H.E. Cytogenic effects of *Helichrysum arenarium* in human lymphocytes cultures // H.E. Eroglu, E. Hamzaoglu, A. Aksoy, U. Budak, S. Albayrak // Turkish Journal of Biology. – 2010. - №34. – P. 253-259.

163. European Pharmacopoeia Online 7th edition//EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare). – Режим доступа: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>. – свободный. – Яз. англ.

164. Farag, M.A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques / M.A. Farag, A. Porzel, L.A. Wessjohann // *Phytochemistry*. - 2012. – №76. - P. 60-72.

165. Fathiazad, F. Study on the in vitro antimicrobial activity of *Achillea millefolium* and *Equisetum arvense* / F. Fathiazad, F. Lotfipour // *Pharmaceutical Sciences (Journal of Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences)*. - 2004. - №1. – P.135-140.

166. Ferro, N. Chemical space of auxins, their multi-phenomenology and multiple protein interaction / N. Ferro, P. Bultinck, Th. Bredow, Th. Reinard // *Computational Biophysics to Systems Biology*. – 2007. - Vol.36. – P. 103-107.

167. Firenzuoli, F. Flavonoidi: rischi o opportunità terapeutiche? / F. Firenzuoli, L.Gini, A. Grupi, D. Neri // *Recenti Progressi in Medicina*. – 2004. - №95. – P. 345 – 351.

168. Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications / edited by Ø.M. Andersen, K.R. Markham. – Boca Raton, FL, USA: Taylor&Francis Group, LLC, CRC Press, 2006. – P. 1212.

169. Fu, B. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase / B. Fu, H. Li , X. Wang, F.S.C. Lee, S. Cui // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. - №53. - P. 7408-7414.

170. Fu, B. The application of macroporous resins in the separation of licorice and glycyrrhizic acid / B. Fu, J. Liu, H. Li, L. Li, F.S.C. Lee, X. Wang // *Journal of Chromatography A*. – 2005. - №1089. – P. 18-24.

171. Fukai, T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / T. Fukai, A. Marumoo, K.

Kaitou, T. Kanda, S. Terada, T. Nomura // *Fitoterapia*. – 2002. - №73. – P. 536-539.

172. Garba, S. Antimicrobial activities of total alkaloids extracted from some Nigerian medicinal plants / S. Garba, S.O. Okeniyi // *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. – 2012. - Vol.4, №3. - P. 60-63.

173. General guidelines for methodologies on research and evaluation traditional medicine / WHO/EDM/TRM/2000.1. – Geneva: World Health Organization, 2000. – 74 p. – Режим доступа: http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf. – свободный. - Яз. англ.

174. George, E.F. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients, V. 1, Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition. / E.F. George, M.A. Hall, C.-J. de Klerk. – Dordrecht: The Background, Springer-Verlag, 2008. - P. 65-113.

175. Ghoshal, S. Antiamoebic activity of piper longum fruits against *Entamoeba histolytica* in vito and in vivo / S. Ghoshal, B.N. Krishna, V. Lakshmi // *Journal of Ethnopharmacology*. – 1996. - №50. – P. 167-170.

176. *Glycyrrhiza glabra*. Monograph // *Alternative Medicine Review*. – 2005. - Vol.10, №3. -P. 230-237.

177. Goldacre, B. Benefits and risks of homoeopathy / B. Goldacre// *The Lancet*. - 2007. - №370. – P. 1672-1673.

178. González-Garcia, M. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots / M. González-Garcia, J. Vilarrasa-Blasi, M. Zhiponova, F. Divol, S. Mora-Garcia, E. Russinova, Cano-Delgado // *A DEVELOPMENT*. – 2011. – №138. – P. 849-859.

179. Greger, H. Alkamides: Structural relationship, distribution and biological activity / H. Gereger // *Planta Medica*. – 1984. - №50. – P. 366-375.

180. Grotewold, E. The science of flavonoids / E. Grotewold. – New-York, USA: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. – 274 p.

181. Gudesblat, G. Speechless integrates brassinosteroid and stomata signaling pathways / G. Gudesblat, J. Schneider-Pizon, C. Betti, J. Mayerhofer, I. Vanhoutte, W. Van Dongen, S. Boeren, M. Zhiponova, S. De Vries, C. Jonak, J. Russinova // *Enature Cell Biology*. – 2012. – №14. – P. 548-554.

182. Gupta, V.K. Antimicrobial potential of Glycyrrhiza glabra roots/ V.K. Gupta, A. Fatima, U. Faridi, A.S. Negi, K. Shanker, J.K. Kumar, N. Rahuja, S. Luqman, B. S. Sisodia, D. Saikia, M.P. Darokar, S.P.S. Khanuja // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2008. – №116. - P. 377-380.

183. Gutierrez, J. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients / J. Gutierrez, C. Barry-Ryan, P. Bourke // *The International Journal Of Food Microbiology*. – 2008. – Vol.124, Iss.1. – P. 91-97.

184. Hadi, S. Initial Studies on Alkaloids from Lombok Medicinal Plants / S. Hadi, J.B. Bremner // *Molecules*. – 2011. – №6. –P. 117-129.

185. Hamburger, M. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants—Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances / M. Hamburger, D. Baumann, S. Adler // *Phytochemical Analysis*. - 2004. - №15. – P. 46–54.

186. Hammer, K.A. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts / K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley // *Jornal of applied Microbiology*. – 1999. - №86. – P. 985-990.

187. Handa, S. S. Extraction technologies for madicinal and aromatic plants / S.S. Handa, S.P.S. Khanuja, G. Longo, D.D. Rakesh. - Trieste (Italy): International centre for science and high technology, 2008. - 266 p.

188. Hao, J. Y. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L./ J.Y. Hao, W. Han, S.D. Huang, B.Y. Xue, X. Deng // *Separation and Purification Technology*. – 2002. - №28. – P. 191–196.
189. Harborne, J.B. *Phytochemical method* / J.B.Harborne. – London: Chapman and Hall, Ltd., 1973. – P. 49-188.
190. Harwansh, R.K. Pharmacological studies on *Glycyrrhiza glabra*: a review / R.K. Harwansh, K.C. Patra, S.K. Pareta, J. Singh, R. Biswas // *Pharmacologyonline*. – 2011. – №2. -P. 1032-1038.
191. Hassawi, D. Antimicrobial activity of some medicinal against *Candida albicans* / D. Hassawi, A. Kharma // *Journal of Biological Sciences*. – 2006. – Vol.6, №1. - P. 109-114.
192. Hatam, N.A.R. Sesquiterpene lactones from *Achillea micrantha* / N.A.R. Hatam, N.J.Yousif, A. Porzel, K. Seifert // *Phytochemistry*. – 1992. - Vol. 21, Iss.6. -P. 2160-2162.
193. Hatan, N.A. Flavonoids from *Achillea micrantha* / N.A. Hatan, K. Seifert // *Planta Med*. – 1994. –Vol.60, №6. – P. 600.
194. Hatano, T. Minor flavonoids from licorice / T. Hatano, Y. Aga, Y. Shintani, H. Ito, T. Okuda, T. Yoshida // *Phytochemistry*. -2000. – №55. - P. 959-963.
195. Hayashi, H. Economic importance of licorice / H. Hayashi, H. Sudo // *Olant biotechnology*. – 2004. - №26. - P. 101-104.
196. Hayashi, H. Molecular biology of secondary metabolism: case study for *Glycyrrhiza* plants / H. Hayashi, A. Kirakosyan, P.B. Kaufman // *Recent Advances in Plant Biotechnology*. – 2009. - Vol.1 - P. 89-103.
197. Helal, F.A. Studies on grown, yield and its components and chemical composition under effect of vitamin C, vitamin B1, boric acid and sulphur on pea (*Pisum sativum* L.) plants / F.A. Helal, S.T. Farag, S.A. El-

Sayed // Journal of Agricultural Sciences. – 2005. – Vol.30, №6. – P. 3343-3353.

198. Hemmati, A.A. Yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract impairs the fibrogenic effect of bleomycin in rat lung / A.A. Hemmati, A. Arzi, A. Adinehvand, N.E. Mostofi, A.R. Mozaffari, A. Jalali // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. -Vol. 5, №10. – P. 1843-1849.

199. Herbert, C.G. Mass spectrometry basics / C.G. Herbert, R.A.W. Johnstone. – Boca Raton: CRC Press LLC, 2003. - 474 p.

200. Hirsch, A.M. Plant hormones and nodulation: what's the connection? / A.M. Hirsch, Y. Fang // Plant Molecular Biology. – 1994. – №26. - P. 5-9.

201. Holetz, F.B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases / F.B. Holetz, G.L. Pessini, N.R. Sanches, D.A.G. Cortez, C.V. Nakamura, B.P.D. Filho // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2002. - №97. – P. 1027-1031.

202. Hopkins, W. G. Introduction in plant physiology / W. G. Hopkins, N.P.A. Huner. – USA: Inc. John Wiley and sons, 2008. - 523 p.

203. Horton, R.H. Principles of Biochemistry, (4th ed.) / R.H. Horton, L.A. Moran, K.G. Scrimgeour, M.D. Perry, J.D. Rawn. - New York: Pearson International Edition, 2006. - P. 254-255.

204. Houghton, P.J. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example / P.J. Houghton, P.J. Hylands, A.Y. Mensah, A. Hensel, A.M. Deters // Journal of Ethnopharmacology. – 2005. - №100. – P. 100-107.

205. Hsu, F.L. Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi / F.L. Hsu, P.S. Chen, H.T. Chang, S.T. Chang // International Biodeterioration & Biodegradation. - 2009. - №5. – P. 543–547.

206. Hui, L. Effects of ultrasound on the extraction of saponin from ginseng / L. Hui, O. Etsuzo, I. Masao // Japanese Journal of Applied Physics. - 1994. - № 33(5B). – P. 3085–3087.

207. Hussain, I. Comparative study of vitamin C contents in fruits and medicinal plants / I. Hussain, L. Khan, G.A. Marwat, N. Ahmed, M. Saleem // Journal of the Chemistry Society of Pakistan. – 2008. - Vol. 30, №3. - P. 406-409.

208. Iann, M. Antimicrobial activity of essential oil of endemic *Achillea monocephala* Boiss and Bal. / M. Iann, S. Kirici, C. Karamenderes, N.U. Karabay // “Ovidius” University Annals of Medical Science – Pharmacy. – 2003. - Vol.1., №2. – P.33-39.

209. Ikram, N. Cytokines / N. Ikram, K. Hassan, S. Tufail // International Journal of Pathology. 2004. – Vol.2, №1. – P. 47-58.

210. Innocentia, G. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. / G. Innocentia, E. Vegetob, S. Dall-Acquaa, P. Cianab, M. Giorgettia, E. Agradib, A. Sozzib, G. Ficoc, F. Tomec // Phytomedicine. – 2007. - №14. – P. 147-152.

211. Irani, N. Receptor endocytosis and signaling in plants / N. Irani, J. Russinova // ECURRENT OPINION IN PLANT BIOLOGY. -2009. –№12. – P. 653-659.

212. Islam, A.K. An antimicrobial terpenoid from *Caesalpinia pulcherrima* Swartz.: Its characterization, antimicrobial and cytotoxic activities / A.K. Islam, M.A. Ali, A. Sayeed, S.M. Salam, A. Islam, M. Rahman, G.R. Khan, S. Khatun // Asian Journal of Plant Sciences. – 2003. - №2. – P. 17-24.

213. Jatav, V.S. Recent pharmacological trends of *Glycyrrhiza glabra* Linn / V.S. Jatav, K.S. Singh, P. Khatri, A. K. Sharma // International Journal of Pharmaceutical Frontier Research. – 2011. – Vol.1, №1. – P. 170- 185.

214. Javidnia, K. Composition of the volatile oil of *Achillea Wilhelmsii* C. Koch from Iran / K. Javidnia, R. Miri, H. Sadeghpour // DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2004. - Vol.13, № 2. - P. 63-66.

215. Jayaprakasam, B. Licorice flavonoids inhibit eotaxin-1 secretion by human fetal fibroblasts in vitro / B. Jayaprakasam, S. Doddaga, R. Wang, D. Holmes, X.-M. Li // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2009. - №57. – P. 820-825.

216. Jeong, S.T. Effects of plant hormones and stading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins / S.T. Jeong, N. Golo-Yamamoto, S. Kobayashi, M. Esaka // Plant Science. – 2004. – №167. – P. 247-252.

217. John, A.J. Chemical composition antibacterial activity of *Neolitsea foliosa* (Nees) Gamble var. *caesia* (Meisner) Gamble / A.J. John, V.P. Karunakran, V. George // Journal of Essential Oil Research. – 2007. - №19. – P. 498-500.

218. Karaalp, C. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea* L. flower head extracts / C. Karaalp, A.N. Yurtman, N.U.K. Yavasoglu // Pharmaceutical Biology. -2009. – Vol.47, №1. - P. 86-91.

219. Karlovà, K. Accumulation of flavonoid compounds in flowering shoots of *Achillea collina* Becker ex. Rchb. Alba during flower development / K. Karlovà // Hortcoltural science Agricultural Journals (Prague). – 2006. – Vol.33, №4. - P. 158-162.

220. Kaufmann, B. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction / B. Kaufmann, P. Christen // Phytochemical Analysis. - 2002. - №13. – P. 105–113.

221. Keller, K. Herbal medicinal products in Germany and Europe: experiences with national and European assessment / K. Keller // Drug Information Journal. - 1996. – №130. – P. 933-948.

222. Kent, U.M. The licorice root derived isoflavan glabridin inhibits the activities of human cytochrome P450S3A4.2B6 and 2C9 / U.M. Kent, M. Aviram, M. Rosenblat, P.F. Hollenberg // Drug Metabolism and Disposition. – 2002. - №30. – P.709 – 715.

223. Kharma, A. The Antimicrobial activity and genetic relationship of *Achillea* species / A. Kharma, D. Hassawi // Biotechnology. – 2006. – Vol.5, № 4. - P. 501-507.

224. Kimura, Y. Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy-and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant production 5-deoxyflavonoids / Y. Kimura, T. Aoki, S.-I. Ayabe // Plant Cell Physiology. – 2001. – Vol.42, №10. - P. 1169-1173.

225. Konoshima Anti aids agents, 21 triterpenoid saponins as anti HIV principles from fruits of *Gleditsia japonica* and *gymnocladus chine sis*, and a structure activity correlation / Konoshima, T. Yasudo, Y. Kashiwada, L. Cosentino, L.K. Hsiung // Journal of Natural Products. – 1995. – Vol.58, №9. – P. 1372-1377.

226. Konyalioglu, S. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes / S. Konyalioglu, C.F. Karamenderes // Journal of Ethnopharmacology. - 2005. - №102. – P. 221-227.

227. Kordali, S. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (*Astaraceae*) / S. Kordali, A. Gakir, T.A. Arkin, E. Mete,

A. Arkin, T. Aydin, H. Kilic // *Industrial Groups and Products*. – 2009. - №29. - P. 562 – 570.

228. Kotan, R. Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato / R. Kotan, F. Dadasoglu, S. Kordali, A. Cakır, N. Dikbas, R. Cakmakcı // *Journal of Agricultural Technology*. – 2007. – Vol.3, №2. – P. 299-306.

229. Krenn, L. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. / L. Krenn, A. Miron, E. Pemp, B. Kopp // *Z. Naturforsch.* – 2003. - №58. –P. 11-26.

230. Kumar, V. AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator / V. Kumar, G. Parvatam, G.A. Ravishankar // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2009. – Vol.12, №2. – Режим доступа: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol12/issue2/full/1/> , СВОБОДНЫЙ. – ЯЗ. АНГЛ.

231. Kupeli, E. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Hleichrysum gaertner* species (*Asteraceae*) / E. Kupeli, A. Tosun, O. Bahadir // *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2006. – Vol.3, №3. – P.141-149.

232. Kupeli, E. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive of five Anatolian *Achillea* species / E. Kupeli, I. Orhan, S. Kusmenoglu, E. Yesilada // *Turkish. J. Pharm.* – 2007. – Vol.4, № 2. - P. 89 – 99.

233. Lakshimi, T. Yarrow (*Achillea millefolium* Linn.) a herbal medicanl plant with broad therapeutic use – a rewiw / T. Lakshimi, R.V. Geetha, A. Roy A., S. A. Kumar // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. – 2011. - Vol.9, Iss. 2. – P. 136 – 141.

234. Lang, Q. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—A practical review /Q. Lang, C.M. Wai // *Talanta*. – 2001. - №53. – P. 771–782.

235. Li, H. High intensity ultrasoundassisted extraction of oil from soybeans / H. Li, L. Pordesimo, J.Weiss // Food Research International. – 2004. - № 37. –P. 731–738.

236. Lopes, F.C.M. Effect of the essential oil of *Achillea millefolium* L. in the production of hydrogen peroxide and tumor necrosis factor- α in murine macrophages / F.C.M. Lopes, F.P. Benzatti, C.M.J. Junir, R.R.D. Moreira, I.Z. Carlos // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. - 2005. - Vol. 31, №.3. – P. 401-405.

237. Luque de Castro, M. D. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future // M.D. Luque de Castro, L.E. Garcia-Ayuso // Analytica Chimica Acta. – 1998. - № 369. – P. 1–10.

238. Luque-Garcia, J. L. Ultrasound: A powerful tool for leaching /J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro // Trends in Analytical Chemistry. – 2003. - №22. – P. 41–47.

239. Magiatis, P. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three greek *Achillea* species / P. Magiatis, A.-L. Skaltsounis, S.A. Haroutounian // Z. Naturforsch. – 2002. - №57. - P. 287-290.

240. Magnus, V. Auxin. Structure and activity / V. Magnus, B. Kojic-Prodic // Phyton (Austria). Special issue: “Plant Physiology”. – 1999. – Vol.39. – Fasc. 3. – P. 19-23.

241. Mahmoud, A.A. A new epimeric sesquiterpene lactone from *Achillea ligustica* / A.A. Mahmoud, S.S. Al-Shihry, M.-E. F. Hegazy // Records of natural products. – 2012 . –Vol.6, №1. – P. 21-27.

242. Malekinejad, H. The protective effect of liquorice plant extract on CCl₄-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*) / H. Malekinejad, A. Alizadeh, H. Cheraghi, S. Meshkini, F. Dardmen // Veterinary Research Forum. – 2010. - Vol.1, №3. – P. 158-164.

243. Mantle, D. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro / D. Mantle, F. Eddeb, A.T. Pickering // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2000. - №72. – P.47-51.

244. Marongiu, B. Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: Influence of some process parameters and biological activity / B. Marongiu, S. Porcedda, A. Caredda, B. De Gioannis, L. Vargiu, P. La Colla // *Flavour and Fragrance Journal*. - 2003. - №18. – P. 390–397.

245. Marr, R. Use of supercritical fluids for different processes including new developments—A review / R. Marr, T. Gamse // *Chemical Engineering and Processing*. - 2000. - № 39. –P.19–28.

246. Mason, T. J. The uses of ultrasound in food technology / T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer // *Ultrasonics Sonochemistry*. - 1996. - №3. – P. 253–260.

247. Massarelli, C. La liquirizia (*Glycyrrhiza glabra* L.) spontanea nel Bosco dell'Incoronata (Foggia) / C. Massarelli, O. Panzarino // *Rivista di Teoria e Ricerca Sociale, Studi Ecologici, Ethnoscienze*. – 2011. - №4. – P. 87-89.

248. Meireles, A. Supercritical extraction from solid: Process design data (2001–2003) / A. Meireles, M. Angela // *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. - 2003. - №7. – P. 321–330.

249. Melecchi, M. I. S. Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers: A study of extraction methods / M.I.S. Melecchi, M.M. Martinez, F.C. Abad, P.P. Zini, I.N. Filho, E.B. Caramao // *Journal of Separation Science*. – 2002. - №25. –P. 86–90.

250. Menghini, L. Valutazione dell'efficacia di due estratti commerciali titolati e standardizzati di *Vaccinium macrocarpon* Ait / L. Menghini, L.

Leporini, N. Scanu, R. La Rovere, E.S. Di Filippo, T. Pietrangelo, S. Fulle // *Phytogyn.* -2010. - Vol.1, №3. – P. 3 – 10.

251. Mitscher, L.A. A search for novel chemotherapy against tuberculosis amongst natural products / L.A. Mitscher, W.R. Baker // *Pure and Applied Chemistry.* – 1998. - №70. – P. 365 – 371.

252. Mitscher, L.A. Antimicrobial agents from higher plants, *Glycyrrhiza glabra* L. I. Some antimicrobial isoflavans, isoflavones, flavanones and isoflavones / L.A. Mitscher, S. Park, S. Omoto, G.W. Clark, D. Clark // *Heterocycles.* – 1978. - №9. – P. 1533-1537.

253. Mitscher, L.A. Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *Typica* / L. A. Mitscher, Y. H. Park, D. Clark, J. L. Beal // *Journal of Natural Products.* – 1980. - №43. – P. 259-269.

254. Modey, W. K. Analytical supercritical fluid extraction of natural products / W.K. Modey, D.A. Mulholland, M.W. Raynor // *Phytochemical Analysis.* - 1996. - №7. –P. 1–15.

255. Moler, A.F. *In vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots / A.F. Moler, M. Chen, K. Fursted, S.B. Christensen, A. Kharazmi // *Planta Medica.* – 2002. - №68. – P. 416-419.

256. Motlhanka, D. A novel pentacyclic triterpene glycoside from a resin of *Commiphora glandulosa* from Botswana / D. Motlhanka, P. Houghton, A. Miljkovic-Brake, S. Habtemariam // *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 2010. - Vol.4, №8. - P. 549-554.

257. Munkombwe, N.M. Phenylpropanoid glycosides of *Gnidia polycephala* / N.M. Munkombwe, P. Galebotswe, K. Modibesane, N. Morebodi // *Phytochemistry.* – 2003. - №64. – P. 1401–1404.

258. Nakagawa, K. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A^y Mice / K. Nakagawa, H. Kishida, N. Arai, T. Nishiyama, T. Mae // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2004. – Vol.27, №11. – P. 1775 – 1778.

259. Nakayama, N. Mechanical regulation of auxin-mediated growth / N. Nakayama, R.S. Smith, T. Mandel, S. Robinson, S. Kimura, A. Boudaoud, C. Kuhlemeier // *Current Biology*. – 2012. - №22. – P. 1-9.

260. Nascimento, G.G.F. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria / G.G.F. Nascimento, J. Locatelli, P.C. Freitas, G.L. Silvia // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2000. - №31. – P. 247-256.

261. Nassiri, M. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. And its bioactive compounds / M. Nassiri, H. Hosseinzadeh // *Phytotherapy research*. -2008. – №22. – P. 709 – 724.

262. Natori, S. *Advances in Natural Product Chemistry* /S. Natori, Ikekawa, Nand Suzuki. – Tokyo, Japan: Kadansha Ltd., 1981. – P. 275-287.

263. *Natural Products Isolation* / Edited by S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray. – Totowa, New Jersey:Humana Press Inc., 2006. – 529 p.

264. Navagani, V. Evaluation of antioxidant potential and identification of polyphenols by RP-HPLC in *Michelia champaca* flowers / V. Navagani, T. Raghava Rao // *Advances in Biological Research*. – 2010. –Vol.4, № 3. – P. 159-168.

265. Nemeth, E. Essential oil composition of species in the genus *Achillea*/E. Nemeth // *Journal of Essential Oil Research*. - 2005. - №17. – P. 501-512.

266. Neshta, I.D. Lactones of *Achillea micrantha* / I.D. Neshta, K.S. Rybalka, O.A. Konovalova, O.K. Ivanenko // *Chemistry of Nature Compounds*. – 1976. - Vol.12, №3. - P. 347-348.

267. Niazmand, S. The effects of *Achillea wilhelmsii* extract on rat's gastric motility at basal and vagal stimulated conditions / S. Niazmand, E. Khoshnood // Iranian Journal of Basic Medicinal Sciences. – 2010. - Vol.14, № 2. – P.151 – 157.

268. Nomura, T. Chemistry of phenolic compounds of licorice (*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cytotoxic activities / T. Nomura, T. Fukai, T. Akiyama // Pure and Applied Chemistry. – 2002. - Vol.74, №7. – P. 1199-1206.

269. Oussalah, M. Inhibitory effects of selected 23 plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* / M. Oussalah, S. Caillet, L. Saucier, M. Lacroix // Food Control. - Vol.18, №5.- P. 414-420.

270. Ouyang, M.A. Inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV) replication of pinoresinol and syringaresinol lignans and their glycosides from the root of *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. / M.A. Ouyang, Y.S. Wein, Z.K. Zhang, Y.H. Kuo // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2007. - № 16. – P. 6460–6465.

271. Özçelik, B. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum -Lactamase (ES_L)-Producing *Klebsiella pneumonia* / B. Özçelik, D. Deliorman Orhan, S. Özgen, F. Ergun // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. - 2008. – Vol.7, №4. – P. 1151-1157.

272. Paduch, R. Essential oil composition and in vitro biological activity of *Achillea millefolium* L. extracts / R. Paduch, G. Matysik, M. Nowak-Krycka, P. Niedziela // Journal of Pre-Chemical and Clinical Research. – 2008. - Vol. 2, №1. – P. 49 – 58.

273. Paiva, P.M.G. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectines from plants / P.M.G. Paiva, F.S. Gomes, T.H. Napoleao, R.A. Sa,

M.T.S. Correia, L.C.B.B.Coelho // Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010, Vol. 1, №2, P. 396-406.

274. Pan, X. Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root / X. Pan, H. Liu, G. Jia, Y.Y. Shu // Biochemical Engineering Journal. - 2000. - №5. – P. 173–177.

275. Pandey, A. Role of auxin on adventitious root formation and subsequent growth of cutting raised plantlets of *Ginkgo biloba* L. / A. Pandey, S. Tamta, D. Giri // International Journal of Biodiversity and Conservation. – 2011. - Vol.3, №4. – P.142-146.

276. Peterson, J. Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece // J. Peterson, P. Laqiou, E. Samoli, A. Laqiou, K. Katsouanni, C. La Vecchia, J. Dwyer, D. Trichopoulos // British Journal of Cancer. – 2003. – Vol.89, №7. – P.1255-1259.

277. Phillipson, J.D. New leads for the Treatment of Protozoal infections based on Natural Product Molecules / J.D. Phillipson, M.J. Neill // Acta Pharmaceutica Nature. – 1987. - №.1. – P. 131-144.

278. Piccolo, O. Synthesis Of Biologically Active Indole Derivatives By Hydroformylation / O. Piccolo, C. Botteghi, M. Marchetti, F. Moratti, S. Paganelli // Convegno Second European Catalysis Symposium. - Pisa (Italia), 2001.

279. Pichersky, E. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense / E. Pichersky, J. Gershenzon // Current opinion in plant biology. – 2002. - №5. – P. 237.

280. Plazonic, A. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry / A. Plazonic, F. Bucar, Z. Males, A.

Mornar, B. Nigovic, N. Kujundzic // *Molecules*. – 2009. – №14. – P. 2466-2490.

281. Polombo, E.A. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants / E.A. Polombo, S.J. Semple // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2001. - №77. – P. 151-157.

282. Potrich, F.B. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L. involvement of the antioxidant system / F.B. Potrich, A. Allemand, L.M. da Silva, A.C. dos Santos, C.H. Baggio, C.S. Freitas, D.A.G.B. Mendes, E. Andre, M.F. de Paula Werner, M.C. Marques // *Journal of Ethnopharmacology* – 2010. - №130. – P. 85-92.

283. Prabuseenivasan, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils / S. Prabuseenivasan, M. Jayakumar, S. Ignacimuthu // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2006. - №6. – P.39.

284. Price, K.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs / K.R. Price, I.T. Johnson, G.R. Fenwick // *Critical Reviews Food Science Nutrition*. – 1987. - №26. – P. 27–135.

285. Priya, K.S. Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats / K.S. Priya, A. Gnanamani, N. Radhakrishnan, M. Babu // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2002. - №83. – P. 193-199.

286. Rahman, S.Z. Problems in Pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them / S.Z. Rahman, K.C. Singhal // *Uppsala-Reports*. – 2002. - №17 (Suppl). – P. 1- 4.

287. Raj, M. Natural antioxidant (flavone glycoside) from *Emilia songhifolia* Dc. And its potential activity / M. Raj // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2012. - Vol.4, S.3. - P.159-162.

288. Rajeswara Rao, B.R. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.) / B.R. Rajeswara Rao, P.N. Kaul, K.V. Syamasundar, S. Ramesh //

Industrial crops and products an international journal. – 2005. - №21. – P. 121-127.

289. Ricciuti, S. Flavonoidi. Profilo farmacologico e terapeutico. I Flavonoidi: chimica e farmacologia / S. Ricciuti, C. Cardini. – Режим доступа: <http://www.farmaciaeuropa.eu/wp-content/uploads/2011/03/Flavonoidi-Policlinico.pdf>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. ит.

290. Rojas, R. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants / R. Rojas, B. Bustamante, J. Bauer, I. Fernandez, J. Alban, O. Lock // Journal of Ethnopharmacology. – 2003. – Vol. 88. – P. 199-204.

291. Russinova, E. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors / E. Russinova, J. Borst, M. Kwaaitaal, A. Cano-Delgado, Y. Yin, J. Chory, De Vries // BR11 and AtSERK3 (BAK1) SPLANT CELL. – 2004. - №16. – P. 3216-3229.

292. Rustaiyan, A. Sesquiterpene lactones from *Achillea micrantha* / A. Rustaiyan, Z. Sharif, A. Tajarodi, A.S. Sadjadi // Phytochemistry. – 1987. – Vol.26, Iss. 10. – P. 2856-2857.

293. Saeidina, S. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea* / S. Saeidina, A.R. Gohari, N. Mokhber-Derfuli, F. Kiuchi // DARU. – 2011. - Vol.19, №3. – P. 173 – 186.

294. Saeidina, S. Cytotoxic flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss. / S. Saeidina, F. Moradi-Afrapoli, A.R. Gohari, M. Malmir // Journal of Medicinal Plants. – 2009. - Vol. 8, №5. - P. 52 -56.

295. Saeidna, S. Composition of the volatile oil of *Achillea conferta* Dc. from Iran / S. Saeidna, A.R. Gohari, N. Yassa, A. Shafiee // DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2005. - Vol.12, №1. - P. 34 – 36.

296. Salvagnini, L. E. Evaluation of efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis* / L.E.

Salvagnini, K.F. Migliato, V.L.B. Isaac, M.A. Correa, N.R.N. Salgado, R.C.L.R. Pietro // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2006. - №37. – P. 75-77.

297. Saxena, S. *Glycyrrhiza glabra*: Medicine over the millennium / S. Saxena // *Natural Product Radiance*. – 2005. - Vol.4, № 5. - P. 358-367.

298. Scheller, J. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, St. Rose-John // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. - №1813. – P. 878-888.

299. Schinor, E. C. Comparison of classical and ultrasoundassisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. / E.C. Schinor, M.J. Salvador, I.C.C. Turatti, O.L.A.D. Zucchi, D.A. Dias // *Ultrasonics Sonochemistry*. - 2004. - №11. – P. 415–421.

300. Schulz, V. In: *Rational Phytotherapy: A Physician's guide to Herbal Medicine* / V. Schulz, R. Hansel, V.E. Tyler. - Berlin: Springer, 2001. - 294 p.

301. Seo, J.Y. Dehydroglyasperin C isolated from licorice caused nrf2-mediated induction of detoxifying enzymes / J.Y. Seo, Y.S. Lee, H.L. Kim, S.S. Lim, J. Lim, I.A. Lee, C.H. Lee, J.H.Y. Park, J.-S. Kim // *Journal of Agricultural and food chemistry*. – 2010. - №58. – P. 1603-1608.

302. Shafaghat, A. Composition and antimicrobial activity of the volatile oils from different parts of *Achillea tenuifolia* Lam. from Iran / A. Shafaghat // *Journal of Medicinal Plants*. - 2009. - Vol.8, №31. - P. 93-98.

303. Shamsa, F. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants / F. Shamsa, H. Monsef, R. Ghamooshi, M. Verdian-rizi // *Thai Journal Pharmaceutical Sciences*. – 2008. - №32. – P. 17-20.

304. Sharififar, F. Immunomodulatory activity of aqueous extract of *Achillea wilhelmsii* C. Kosh. in mice / F. Sharififar, S. Pournourmohammadi,

M. Arabnejad // Indian Journal of Experimental Biology. – 2009. - Vol.47 - P. 668-671.

305. Sharma, A. Oil extraction from almond, apricot and rice bran by three-phase partitioning after ultrasonication / A. Sharma, M.N. Gupta // European Journal of Lipid Science and Technology. - 2004. - №106. – P. 183–186.

306. Shehata. S.A. Toxicity Reduction of Aflatoxin B1 by Vitamin C in Fish / S.A. Shehata, Kh. M. El-Melegy, M.S. Ebrahim // Journal of the Arabian Aquaculture society. – 2009. – Vol.4, №2. – P. 73-86.

307. Simons, R. Agonistic and antagonistic estrogens in licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) / R. Simons, J.P. Vincken, L.A. Mol, S.A. The, T.F. Bovee, T.J.Luijendijk, M.A. Verbruggen, H. Gruppen // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2011. – Vol.401, №1. – P.305-313

308. Singh, A. P. Short review: Distribution of steroid like Compound in Plant Flora / A.P. Singh // Pharmacognosy magazine. – 2006. – Vol.2, №6. – P. 87-89.

309. Smith, R. M. Extractions with superheated water / R.M. Smith // Journal of Chromatography A. – 2002. - №975. – P. 31–46.

310. Smith-Palmer, A. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens / A. Smith-Palmer, J. Stewart, L. Fyfe // Letters in Applied Microbiology. – 1998. - №26. – P. 118–122.

311. Sohna, H.-Y. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai / H.-Y. Sohna, K.H. Sona, C.-S. Kwona, G.-S. Kwonb, S.S. Kangc // Phytomedicine. – 2004. - №11. – P. 666- 672.

312. Soouza, T.M. Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara – Sp / T.M. Soouza, V.L.B. Rangel, R.C.L. Rr. Pietro, L.E. Santos, R.R.D. Moreira // Revista Brasileira de Plantas Medicinai. – 2006. -Vol.8, Nºesp. – P. 151-154.
313. Spar Eskilsson, S. Analytical-scale microwave-assisted extraction / S. Spar Eskilsson, E. Bjorklund // Journal of Chromatography A. - 2000. - Nº902. –P. 227–250.
314. Sparg, S.G. Biological activities and distribution of plant saponins / S.G. Sparg, M.E. Light, J. van Staden // Journal of Ethnopharmacology. – 2004. - Nº 94. – P. 219–243.
315. Srabi, R.S. The bioactive and volatile compositions of *Achillea millifolium* using GS/MS and nano scale injection tequnich / R.S. Srabi, M.H. Meshkatalasadat // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructura. – 2010. - Vol.5, Nº3. – P.735 – 738.
316. Statti, G.A. Variability in the content of active constituents and biological activity of *Glycyrrhiza glabra* / G.A. Statti, R. Tundis, G. Sacchetti, M. Muzzoli, A. Bianchi, F. Menichini // Fitoterapia. – 2004. - Nº75. – P. 371-374.
317. Stojanovic, G. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (*Asteraceae*) extract / G. Stojanovic, N. Radulovic, T. Hashimoto, R. Palic // Journal of Ethno-Pharmacology . – 2005. - Nº101. – P. 185-190.
318. Sukhenko, L.T. Use of artificial antigens wits M. Leprae- PG L-1 propertiess for the studies in leprosy / L.T. Sukhenko // International J.Leprosy. – 1998. - Vol.57, Nº1. - P.
319. Sunar, S.P. Bioquimica / S.P. Sunar. – Madrid: Paz Montalvo, 1956. -1017 p.

320. Szentmihalyi, K. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods / K. Szentmihalyi, P. Vinkler, B. Lakatos, V. Illes, M. Then // *Bioresource Technology*. - 2002. - №82. - P.195–201.

321. Tackie, A.N. A unique spiro-noncyclic alkaloid isolated from *Cryptolepis Sanguinolenta* / A.N. Tackie, P.L. Schiff, Jr. Cryptospirolepine // *Journal of Natural Products*. - 1993. - №56. - P. 653–655.

322. Taiz, L. Plant physiology / L. Taiz, E. Zeiger. - Sunderland: Sinauer Associates, 2002. - 625 p.

323. Tayal, V. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics — An update / V. Tayal, B.S. Kalra // *European Journal of Pharmacology*. - 2008. - №579. - P. 1–12.

324. Thakur, M. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties / M. Thakur, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng // *Botanics: Targets and Therapy*. - 2011. - №1. - P. 19-29.

325. The International Pharmacopoeia 4th edition // World Health Organization. - Режим доступа: <http://apps.who.int/phint/en/p/about/>. - свободный. - Яз. англ.

326. The World Health Report. Reducing risks. Promoting healthy life / France: World Health Organization, 2002. - 248 p. - Режим доступа. - http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf. - свободный. - Яз. англ.

327. Tian, M. Extraction of glycyrrhizic acid and glabridin from licorice / M. Tian, H. Yan, H.K. Row // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2008. - №9. - P. 571 – 577.

328. Tiwari, P. Phytochemical screening and extraction: a review / P. Tiwari, B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, H. Kaur // *Internationale Pharmaceutica Scientia*. - 2011. - Vol.1, Iss.1. - P. 98-106.

329. Toma, M. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction / M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason // *Ultrasonics Sonochemistry*. - 2001. - №8. – P. 137–142.

330. Tomaniova, M. Microwave-assisted solvent extraction—A new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants / M. Tomaniova, J. Hajslova, J. Pavelka Jr, V. Kocourek, K. Holadova, I. Klimova // *Journal of Chromatography A*. – 1998. - №827. –P. 21–29.

331. Toncer, O. Chemical composition of essential oils of some *Achillea* species growing wild in Turkey / O. Toncer, S. Basbag, S. Karaman, E. Diraz, M. Basbag // *International Journal of Agriculture and Biology*. – 2010. - №12. – P. 527 – 530.

332. Turkoglu, I. Antioxidant and antimicrobial activities of turkish endemic *Achillea* species / I. Turkoglu, S. Turkoglu, S. Celik, N. Kahyaoglu // *African Journal of Microbiology Research*. – 2010. - Vol.4, № 19. – P. 2034-2042.

333. Tyrkov, A.G. Synthesis and antimicrobial activity ω -substituted 3-aryl-5-nitromethyl-1,2,4-oxadiazoles / A.G. Tyrkov, L.T. Sukhenko // *Pharmaceutical Chemistry Journal*,. – 2002. - Vol. 36, №1. - P. 14-15.

334. Tyrkov, A.G. Synthesis and antimicrobial activity ω -substituted nitro-1,2,4-oxadiazole-5-carbaldehydrazones / A.G. Tyrkov, L.T. Sukhenko // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2004. - Vol. 38, №7. – P. 376-378.

335. Uematsu, Y. Spectrophotometric determination of saponin in *Yucca* extract used as food additive / Y. Uematsu, K. Hirata, K. Saito, K // *Journal of AOAC International*. – 2000. – №83. – P.1451-1454.

336. Valant-Vetschera, K.M. Comparative analysis of leaf exudate flavonoids in *Achillea* subsect Filipendulinae / K.M. Valant-Vetschera, E. Wollenweber // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 1996. - Vol. 24, Iss. 5. – P. 435 – 446.

337. Valant-Vetschera, K.M. On the identity of five species of *Achillea* sect. *Millefolium* subsect Filipendulinae (*Compositae*, *Anthemideae*) / K.M. Valant-Vetschera // *Willdenowia*. – 1999. - № 29. - P. 141 – 146.

338. Vaya, J. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation / J. Vaya, P.A. Belinky, M. Aviram // *Free radical biology and medicine*. – 1997. - Vol.23, №2. – P. 302-313.

339. Velikorodov, A.V. Synthesis and antimicrobial activity ω -substituted 3,5-disubstituted isoxazol and isoxazoles with carbamate groups / A.V. Velikorodov, L.T. Sukhenko // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2003. -Vol.37, №1. – P. 22-24.

340. Verma, A. In vitro effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut / A. Verma, C.P. Malik, V.K. Gupta // *International Scholarly Research Network*. – 2012. – 8 p. – Режим доступа: <http://www.hindawi.com/isrn/agronomy/2012/356485/>., свободный. – яз. англ.

341. Verma, A. Simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine / A. Verma, I. Laakso, T. Seppänen-Laakso, A. Huhtikangas, M.-L. Riekkola // *Molecules*. – 2007. - №12. – P. 1307-1315.

342. Villalba, J.J. Terpenes and carbohydrate source influence rumen fermentation, digestibility, intake, and preference in sheep / J.J. Villalba, F.D. Provenza, K.C. Olson // *Journal of Animal Science* – 2006. - №84. – P. 2463-2473.

343. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs / M. Vinatoru // *Ultrasonics Sonochemistry*. - 2001. - № 8. – P. 303–313.

344. Vitalini, S. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. And their bioactivity / S. Vitalini, G. Beretta, M. Iriti, S. Orsenigo, N. Basilico, S. Dall'Acqua, M. Iorizzi, G. Fico // *Acta Biochimica Polonica*. – 2011. - Vol.58, №2. – P. 203-209.

345. Wang, D.-M. A New Isorhamnetin Glycoside and Other Phenolic Compounds from *Callianthemum taipaicum* / D.-M. Wang, W.-J. Pu, Y.-H. Wang, Y.-J. Zhang, Sh.-Sh. Wang // *Molecules*. – 2012. - №17. – P.4595-4603.

346. Wang, L. Recent advance in extraction of nutraceuticals from plants / L. Wang, C.L. Weller // *Trends in Food Science and Technology*. – 2006. - №17. - P. 300-312.

347. Wang, L.-B. Flavonones from *Helichrysi flos* syn / L.-B. Wang, H.-Y. Gao, M. Toshi, B.-H. Sun, J. Huang, Y. Masayuki, L.-J. Wu // *Chinese Journal of Natural Medicines*. – 2009. – Vol.7, №5. – P. 357-360.

348. Wang, Q.-e. Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) / Q.-e. Wang, S. Ma, B. Fu, F.S.C. Lee, X. Wang // *Biochemical Engineering Journal*. – 2004. - №21. – P. 285-292.

349. Wang, Y-C. Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC / Y.-C. Wang, Y.-S. Yang // *Journal of Chromatography B*. – 2009. - №850. – P. 392-399.

350. Wangchuk, P. Bioactive alkaloids from medicinal plants of Bhutan / P. Wangchuk A Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the award of the degree. – Wollongong, Australia, 2004. – 192 p.

351. Willuhn, G. *Liquiritiae radix*, in: N.G. Bisset (Ed.), *Herbal drugs and phytopharmaceuticals* / G. Willuhn. - London: Medpharm Scientific, Stuttgart/CRC Press, 1994. - P. 301–304.

352. Woods-Panzaru, S. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents described in traditional Ulster cures and remedies / S. Woods-Panzaru, D. Nelson, McCollum, L. M Ballard, C. B. Millar, Y. Maeda, C. E. Goldsmith, P. J Rooney, A. Loughrey, J. R Rao, J. E Moore // *Ulster Medical Journal*. – 2009. - Vol.78, №1. – P. 13-15.

353. Yang, D.-L. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellins signaling cascade / D.-L. Yang, J. Yao, C.-S. Mei, X.-H. Tong, L.-J. Zeng, Q. Li, L.-T. Xiao, T.-I Sun, J. Li, X.-W. Debg, C.M. Lee, M.F. Thomashow, Y. Yang, Z. He, S. He // *PNAS Early Edition. Plant Biology*. – 2012. – Vol.109, №9. – P. 1-9.

354. Yassa, N. Three phenolic glycosides and immunological properties of *Achillea millefolium* from Iran, population of Golestan / N. Yassa, S. Saeidnia, R. Pirouzi, M. Akbaripour, A. Shafiee // *DARU*.- 2007. - Vol.15, №1. – P. 49-52.

355. Yucekutlu, A.N. Determination of Plant Saponins and Some of *Gypsophila* Species: A review of the literature / A.N. Yucekutlu, I. Bildacı // *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. – 2008. – Vol.36. - №2. – P. 129-135.

356. Zhang, Q. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Gao (licorice) / Q. Zhang, M. Ye // *Journal of Chromatography A*. – 2009. - №1216. – P.1954-1969.

357. Zwenger, S. Plant terpenoids: application and future potentials / S. Zwenger, Ch. Basu // *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. – 2008. – Vol.3, №1. – P. 1-7.

Riassunto della tesi di dottorato

Studente: Oxana Astafyeva _____ matricola: 982114 _____

Dottorato: in chimico _____

Ciclo: XXV _____

Titolo della tesi: L'uso di *Glycyrrhiza glabra* L., *Achillea micrantha* Wild. ed *Helichrysum arenarium* L. per la preparazione di prodotti con proprietà antibatteriche

Abstract:

Lo scopo della tesi è stato quello di studiare la possibilità di uso di alcune piante – liquirizia *Glycyrrhiza glabra*, achillea *Achillea micrantha*, elicriso *Helichrysum arenarium* per estrarre principi attivi aventi attività antibatterica.

È stata valutata la composizione chimica e confrontato le proprietà antibatteriche degli estratti di tre specie di piante - *Glycyrrhiza glabra* (radice), *Achillea micrantha* (infiorescenze), *Helichrysum arenarium* (infiorescenze) - che crescono nella regione di Astrakhan.

Sono state inoltre confrontate la composizione chimica e le proprietà antibatteriche dell'estratto delle radici, sia tal quale sia dopo frazionamento su colonna cromatografica, di due specie di liquirizia, una che cresce in Russia (regione Astrakan) ed una che cresce in Italia (regione Calabria).

Sono stati elaborati possibili schemi tecnologici per potere effettuare e recuperare gli estratti liquidi dalle tre piante.

Firma dello studente

ALLEGATO

Per. № 523 / 2011 - Prot. n. 5620 - 11/12.

**ДОГОВОР О СОТРУДНИЧЕСТВЕ ПО ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ
СОВМЕСТНОГО РУКОВОДСТВА КАНДИДАТСКОЙ
ДИССЕРТАЦИЕЙ АСПИРАНТА МЕЖДУ ВЕНЕЦИАНСКИМ
УНИВЕРСИТЕТОМ КА ФОСКАРИ И АСТРАХАНСКИМ
ГОСУДАРСТВЕННЫМ УНИВЕРСИТЕТОМ**

На основании:

- Закона от 03 июля 1998 г. №210 согласно которому деятельность аспирантуры осуществляется отдельными университетами в абсолютной организационной, дидактической и научной автономии;
- Циркуляра Министерства образования, науки и техники республики Италии от 15 марта 1999 г.;
- Положения о специальностях аспирантуры, утверждённое Венецианским университетом Ка Фоскари приказом ректора № 1150 от 18/11/2005;
- Протокола Совета аспирантуры по направлению «Науки и технологии» от 28 октября 2010;
- Федерального закона Российской Федерации «О высшем и послевузовском профессиональном образовании» от 22.08.96 № 125 - ФЗ;
- Приказа Министерства общего и профессионального образования Российской Федерации от 27.03.98 № 814 «Об утверждении Положения о подготовке научно-педагогических и научных кадров в системе послевузовского профессионального образования в Российской Федерации».

МЕЖДУ

Университетом Ка Фоскари, находящимся по адресу: Дорсодуро, 3246, Венеция, Италия, представленным ректором, профессором Карлом Каррато, родившимся в г. Кампосанпьеро (Падуа) 17/05/1957, действующим согласно решению Учёного совета

И

Астраханским государственным университетом, находящимся по адресу: 414056, ул. Татищева 20 а, Астрахань, Россия, представленным ректором, профессором Александром Павловичем Лунёвым в целях развития научного сотрудничества между сторонами посредством мобильности аспирантов.

ДОГОВОР ВСТУПАЕТ В СИЛУ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ СЛЕДУЮЩИХ УСЛОВИЙ

Ст. 1

1. Договаривающиеся стороны согласовывают в соответствии с законами и положениями, имеющими силу в каждой стране или учреждении, организацию совместного руководства кандидатской диссертацией аспиранта Астафьевой Оксаны Витальевны, гражданки Российской Федерации, родившейся в г. Астрахани 19/09/1987, имеющей диплом специалиста по направлению «Биология», именуемого в дальнейшем «Аспирант», с целью написания и защиты кандидатской диссертации под названием «Изучение методов экстракции и характеристика некоторых активных веществ из природных источников».

Ст. 2

1. Аспирант, поступивший в аспирантуру в России, будет освобождён от предусмотренного государственного конкурсного отбора в Италии.

Ст. 3

1. Аспирант обязательно поступает в аспирантуру обоих образовательных учреждений, но платит за обучение (в случае обучения на коммерческой основе) только Астраханскому государственному университету. Аспирант, поступивший в названный иностранный университет, должен будет выплатить Венецианскому университету Ка Фоскари единственный годовой налог на право обучения в период пребывания в названном университете.

2. Начиная с 2010 – 2011 уч. г., аспирант зачислен в Венецианский университет Ка Фоскари на направление «Химия», цикл № 25.

3. Начиная с 2009 – 2010 уч. г., аспирант зачислен в аспирантуру Астраханского государственного университета по специальности 03.01.06 «Биотехнология (в т.ч. нанобиотехнология)».

Ст. 4

1. Аспирант будет проводить свои исследования под руководством трех научных руководителей следующим образом:

- Венецианский университет Ка Фоскари:
Принимающая структура: департамент естественных наук
Научный руководитель: проф. Габриэле Каподальо и проф. Оресте Пикколо
- Астраханский государственный университет:
Принимающая структура: кафедра биотехнологии и биоэкологии
Научный руководитель: проф. Михаил Алексеевич Егоров

2. Вышеназванные научные руководители совместно формируют надлежащие компетенции, несут ответственность и контролируют ход работы над диссертацией и обязаны полностью выполнять функции научного руководителя.

Ст. 5

1. Аспирант будет проводить свои исследования в обоих образовательных учреждениях поочередно; периоды будут согласованы с научными руководителями согласно следующему предварительному плану:

- В Венецианском университете Ка Фоскари:
 - 1 год обучения – Венецианский университет сделал перезачет первого года обучения в АГУ;
 - 2 год обучения – 6 месяцев;
 - 3 год обучения – 6 месяцев.
- В Астраханском государственном университете:
 - 1 год обучения – 12 месяцев;
 - 2 год обучения – 6 месяцев;
 - 3 год обучения – 6 месяцев.

Ст. 6

1. Осуществление совместного руководства кандидатской диссертации аспиранта будет продолжаться 3 года, не включая допускаемую отсрочку, предложенную обоими научными руководителями.
2. Договаривающиеся университеты в лице научных руководителей обязаны предоставлять всю информацию и документацию, необходимую для организации деятельности совместного руководства кандидатской диссертации аспиранта, являющегося объектом настоящего Договора.

Ст. 7

1. Кандидатская диссертация будет обсуждаться на итальянском и русском языках.
2. Положительный отзыв троих научных руководителей – обязательное условие приёма итогового экзамена.

Ст. 8

1. Комиссия/Совет для итогового экзамена назначается университетами-партнерами согласно их собственным положениям и состоит из равного количества научных представителей обеих стран. Она должна состоять не менее из 4 членов, среди которых – два научных руководителя.
2. Защита диссертации состоится в Астраханском государственном университете до конца 2013г.
3. Председатель Комиссии/Совета должен написать протокол экзамена на двух языках, который будет подписан всеми членами Комиссии/Совета.
4. Представительские траты Комиссии/Совета - в ведомстве основного университета.

Ст. 9

1. Образовательные учреждения обязаны признавать, в случае положительного исхода итогового экзамена, научную ценность кандидатской диссертации согласно постановлениям настоящего Договора.
2. Аспиранту будет выдано:
 - со стороны Венецианского университета: степень кандидата наук по направлению «Химия».
 - со стороны Астраханского государственного университета: степень кандидата биологических наук.

Ст. 10

1. Способы презентации научного вклада и воспроизведения диссертации будут осуществлены в каждой стране согласно имеющим силу положениям. Защита объекта диссертации, публикаций, использование и защита полученных результатов в процессе обучения аспиранта в университетах-партнёрах, будет соответствовать имеющим силу нормативным документам и защищены в соответствии со специальными процедурами каждой страны-участницы совместной аспирантуры. По запросу, соответствующие положения о защите прав интеллектуальной собственности могут быть включены в протоколы или специальные документы.
2. Для Венецианского университета Ка Фоскари для итогового экзамена аспирант должен следовать действующим административным инструкциям и должен будет предоставить 1 копию диссертации как на итальянском, так и на русском языках.

Ст. 11

1. Страховка и медицинская помощь будет обеспечена обоими образовательными учреждениями согласно предусмотренным процедурам и действующим нормам.
2. Что касается иных случаев, которые не покрывает предусмотренная законом страховка, аспирант должен будет самостоятельно принять меры посредством личной страховки.

Ст. 12

1. Настоящий Договор составлен в 4 оригинальных экземплярах, из них 2 - на итальянском языке и 2 - на русском языке, имеющих законную силу.
2. Настоящий Договор вступает в силу с даты его подписания обеими сторонами и будет действителен до получения аспирантом ученой степени.
3. В том случае, если кандидат не зачислен в один из университетов-участников Договора, или отказывается продолжать обучение в аспирантуре, или по решению одного или двух научных руководителей диссертации, ему/ей не разрешено продолжать подготовку диссертации в совместной аспирантуре, учреждения-участники Договора могут незамедлительно расторгнуть настоящий Договор.

Венеция, 15 MAR. 2011 (дата)

Астрахань, _____ (дата)

Ректор
проф. Карло Карраро



Ректор
проф. Александр Павлович Лунев



Для ознакомления научным руководителям:

Проф. Габриэле Каподальо/ проф. Оресте Пикколо

проф. Михаил Алексеевич Егоров

Для ознакомления аспиранту:

Асп. Оксана Астафьева

Депозит берен
The translation is authentic
Ученый №6 «СН» 02 (О.А. Астафьева)

(Handwritten signature)

Rep. n. 523/2011 - Prot. n. 5620 - 4/11.

**ACCORDO DI COOPERAZIONE PER L'ATTUAZIONE
DI UNA CO-TUTELA DI TESI DI DOTTORATO TRA
L'UNIVERSITÀ CA' FOSCARI VENEZIA
E
ASTRAKHAN STATE UNIVERSITY**

- La legge 3 luglio 1998 n. 210 con la quale si dispone che le procedure per l'attivazione dei dottorati di ricerca siano disciplinate dai singoli Atenei nella piena autonomia organizzativa, didattica e scientifica;
- La circolare del Ministero dell'Università e della Ricerca scientifica e Tecnologica italiano del 15 marzo 1999;
- Il regolamento in materia di dottorato di ricerca emanato dall'Università Ca' Foscari Venezia con Decreto Rettorale n. 1150 del 18/11/2005 e successive modificazioni;
- Il verbale del Consiglio della Scuola di dottorato in Scienze e tecnologie del 28 ottobre 2010;
- Legge federale della Federazione russa sull'istruzione universitaria e postlaurea del 22.08.96 n. 125- FZ;
- Decreto del Ministero generale e istruzione professionale Federazione Russa del 27.03.98 n. 814 sull'approvazione del Regolamento sulla preparazione dei quadri tecnico-pedagogici e scientifici nel sistema della formazione postlaurea nella Federazione Russa.

TRA

L'Università Ca' Foscari Venezia, Dorsoduro 3246, Venezia, Italia, rappresentata dal Rettore, prof. Carlo Carraro nato a Camposanpiero (PD), il 17/05/1957 a quanto segue autorizzato dal Senato Accademico

E

L'Università Statale di Astrakhan, 414056 – via Tatiščev, 20, Astrakhan, Russia rappresentata dal rettore, prof. Alexander Pavlovich Lunev.

allo scopo di sviluppare la cooperazione scientifica tra le parti attraverso la mobilità dei dottorandi.

SI CONVIENE QUANTO SEGUE

Art. 1

1. Le parti contraenti concordano, nel rispetto delle leggi e dei regolamenti in vigore in ciascun paese ed istituzione, di organizzare congiuntamente una co-tutela di tesi di dottorato a beneficio di Oxana Astafyeva di nazionalità russa, nata a Astrakhan, il 19.09.1987, in possesso di diploma di laurea magistrale in biologia, qui di seguito denominata la dottoranda, al fine di redigere e discutere una tesi di dottorato sull'argomento: "Studio di metodi d'estrazione e caratterizzazione di alcuni principi attivi da fonti naturali "

Art. 2

1. La dottoranda, iscritta ad un corso di dottorato in Russia, sarà dispensata dal sostenere il previsto concorso nazionale di selezione in Italia.

Art. 3

1. La dottoranda è iscritta obbligatoriamente in entrambe le istituzioni, ma pagherà le tasse di iscrizione esclusivamente presso l'Università Statale di Astrakhan. La dottoranda dovrà corrispondere all'Università Ca' Foscari di Venezia la sola tassa annuale del diritto allo studio nel periodo di soggiorno presso tale Ateneo.
2. A partire dall'a.a. 2010-2011 il dottorando è iscritto presso l'Università Ca' Foscari Venezia al II anno del corso di dottorato in Scienze chimiche, ciclo XXV.
3. A partire dall'a.a. 2009-2010 il dottorando è iscritto presso l'Università Statale di Astrakhan al corso di dottorato in 03.01.06 Biotecnologie (compreso bionanotecnologie).

Art. 4

1. La dottoranda svolgerà le proprie ricerche sotto la direzione di tre direttori di tesi secondo le seguenti modalità:
 - Università Ca' Foscari Venezia:
struttura d'accoglienza: Dipartimento di Scienze ambientali
Direttori di tesi: prof. Gabriele Capodaglio e prof. Oreste Piccolo
 - Università Statale di Astrakhan
struttura d'accoglienza: Dipartimento di Biotecnologie (Facoltà di Biologia)
Direttore di tesi: prof. Egorov Mikhail
2. I suddetti direttori di tesi esercitano congiuntamente le competenze attribuite in materia di responsabilità e di controllo dei lavori di tesi e si impegnano ad esercitare pienamente le funzioni di direttore di ricerca accanto alla dottoranda.

Art. 5

1. La dottoranda svolgerà le proprie ricerche di dottorato presso entrambe le istituzioni per periodi alterni di studio concordati con i direttori di tesi, in modo da garantire una ripartizione equilibrata delle attività tra i due Paesi e secondo le seguenti previsioni:
 - presso l'Università Ca' Foscari
 - 1 anno di dottorato: / mesi
 - 2 anno di dottorato: 6 mesi
 - 3 anno di dottorato: 6 mesi
 - presso l'Università Statale di Astrakhan
 - 1 anno di dottorato: 12 mesi
 - 2 anno di dottorato: 6 mesi
 - 3 anno di dottorato: 6 mesi.

Art. 6

1. La durata prevista per la preparazione della tesi è di 3 anni, salvo proroga concessa su proposta congiunta dei due direttori di tesi.
2. Le istituzioni contraenti, attraverso l'intermediazione dei rispettivi direttori di tesi, si impegnano a comunicarsi tutte le informazioni e la documentazione utile per l'organizzazione della co-tutela di tesi oggetto della presente convenzione.

Art. 7

1. La tesi di dottorato sarà discussa in lingua russa e italiana.
2. Il giudizio positivo di entrambi i Direttori di tesi è condizione necessaria per l'ammissione all'esame finale.

Art. 8

1. La Commissione giudicatrice per l'esame finale è nominata dalle Università partner secondo i propri regolamenti ed è composta in numero pari dai rappresentanti scientifici dei due Paesi. Essa è composta da almeno quattro membri, tra cui i direttori di tesi.
2. La discussione della tesi avverrà presso l'Università Statale di Astrakhan entro il 2013.
3. Il Presidente della Commissione redigerà un verbale d'esame nelle due lingue, che sarà controfirmato da tutti i componenti.
4. Le spese di missione della Commissione sono a carico dell'università di provenienza dello studente.

Art. 9

1. Le istituzioni si impegnano a riconoscere, a seguito dell'esito positivo dell'esame finale, il valore scientifico della tesi, secondo le disposizioni del presente accordo.
2. Al dottorando sarà rilasciato:
 - da parte dell'Università Ca' Foscari Venezia, il titolo di dottore di ricerca in Scienze chimiche
 - da parte dell'Università Statale di Astrakhan, il titolo di dottore di ricerca in Scienze biologiche.

Art. 10

1. Le modalità di presentazione di deposito e riproduzione delle tesi saranno effettuati in ogni paese secondo i regolamenti in vigore. La protezione dell'oggetto della tesi, così come la pubblicazione, lo sfruttamento e la protezione dei risultati ottenuti con lo studio di ricerca del dottorando nelle istituzioni contraenti, saranno assoggettati alla normativa in vigore e assicurati conformemente alle procedure specifiche di ciascun Paese coinvolto nella co-tutela. Qualora richiesto, le disposizioni relative alla protezione dei diritti di proprietà intellettuale potranno costituire oggetto di protocolli o documenti specifici.
2. Per l'Università Ca' Foscari Venezia, ai fini dell'esame finale, il dottorando dovrà attenersi alle indicazioni amministrative in vigore, compresa la procedura telematica di autoarchiviazione, e dovrà produrre una copia cartacea della tesi che sarà redatta sia in lingua italiana che in lingua russa.

Art. 11

1. La copertura assicurativa e l'assistenza sanitaria sarà assicurata da entrambe le istituzioni secondo le modalità previste e la normativa in vigore.
2. Per tutto quel che concerne gli ulteriori rischi non coperti da assicurazione prevista per legge, il dottorando provvederà autonomamente tramite una propria assicurazione personale.

Art. 12

1. Il presente accordo è redatto in 4 esemplari originali, di cui 2 in lingua italiana e 2 in lingua russa, aventi valore legale.

2. Il presente accordo entra in vigore alla data di firma di entrambe le parti e sarà valido fino al conseguimento del titolo.

3. Nel caso in cui il candidato non si iscrivesse presso una delle Università contraenti, oppure rinunciasse a proseguire il dottorato, oppure, a seguito della decisione di almeno uno o di entrambi i direttori di tesi, non fosse autorizzato a proseguire la preparazione della tesi in co-tutela, le istituzioni contraenti porranno fine congiuntamente e senza ritardo alle disposizioni del presente accordo.

Venezia, il 15 MAR. 2011

Astrakhan, il _____

Il Rettore
prof. Carlo Carraro



Per presa visione dei direttori di Tesi

prof. Gabriele Capodaglio/prof. Oreste Piccolo

Il Rettore
prof.



prof. Mikhail Fedorov

Per presa visione del dottorando
Oxana Astafyeva

ALLEGATO 2



Achillea micrantha



Helichysum arenarium





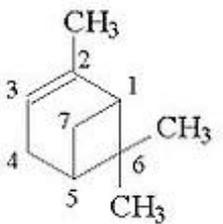
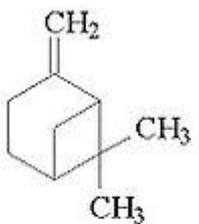
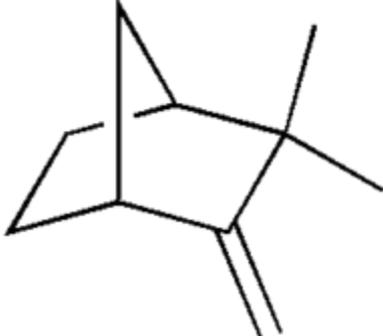
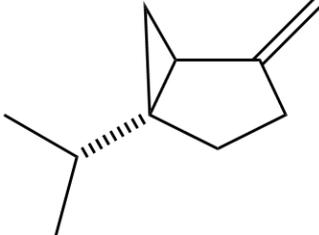
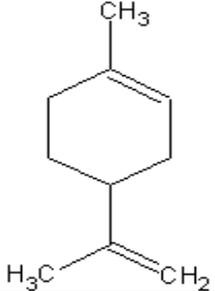
Glycyrrhiza glabra (regione Astrakhan, Russia)

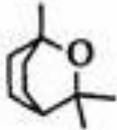
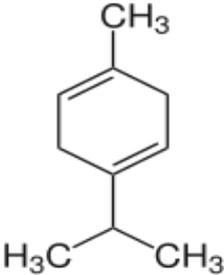
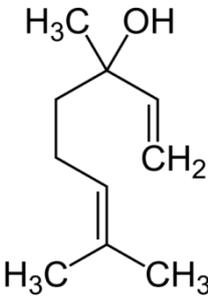
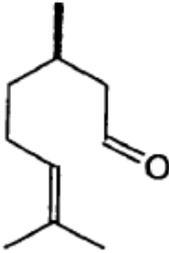
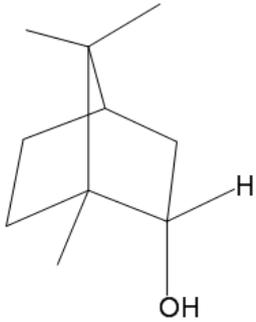


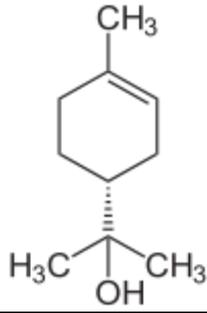
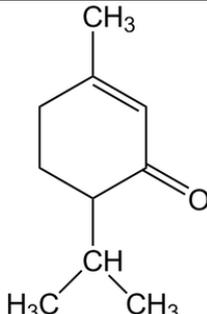
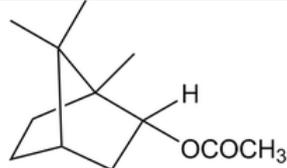
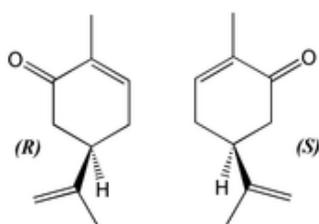
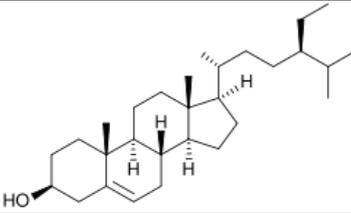
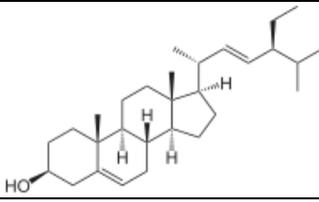
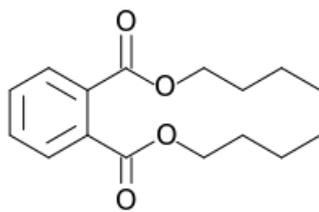
Glycyrrhiza glabra (regione Calabria, Italia)

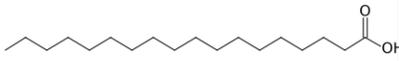
ALLEGATO 3

Componenti di estratto di 50% etanologico di infiorescenze di *Achillea micrantha*
(metodo GC/MS)

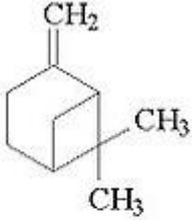
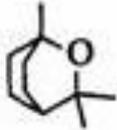
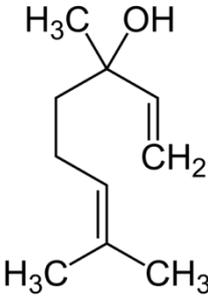
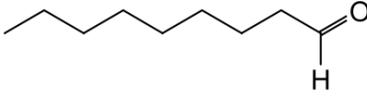
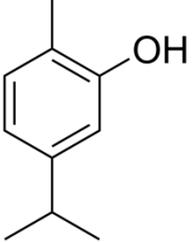
№	Componenti	Formula	Formula strutturale	Gruppa
1.	α -pinene	$C_{10}H_{16}$		Monoterpeni biciclici
2.	β -pinene	$C_{10}H_{16}$		Monoterpeni biciclici
3.	camphene	$C_{10}H_{16}$		Monoterpeni biciclici
4.	Сабинен	$C_{10}H_{16}$		Monoterpeni biciclici
5.	Limonene	$C_{10}H_{16}$		Monoterpene

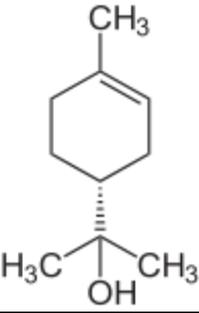
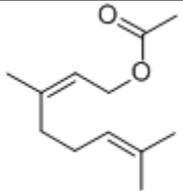
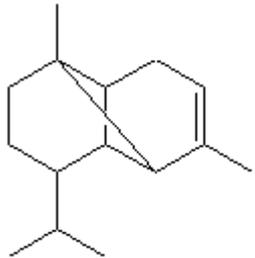
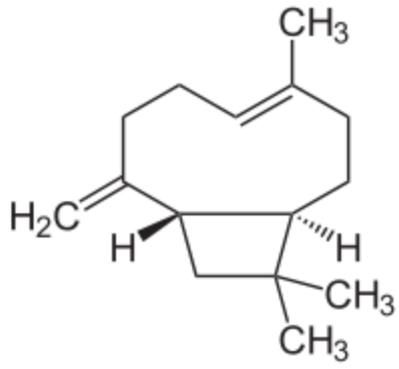
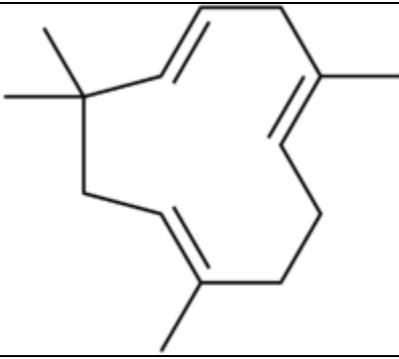
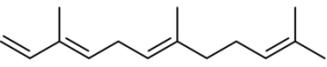
6.	1,8-cineole	$C_{10}H_{18}O$		Monoterpeni monociclici
7.	γ -terpinene	$C_{10}H_{16}$		Terpene
8.	linalool	$C_{10}H_{18}O$		Alcoli terpene
9.	Mentanol	$C_{10}H_{17}OH$		Alcoli terpene
10.	Canphor	$C_{10}H_{16}O$		Alcoli terpene
11.	Borneol	$C_{10}H_{18}O$		Alcoli terpene

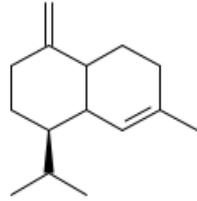
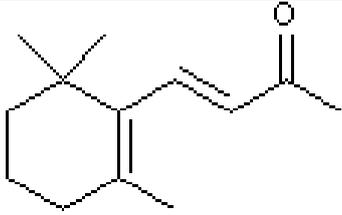
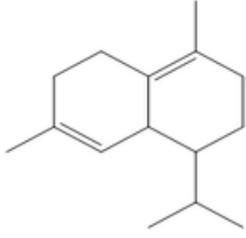
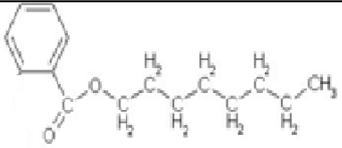
12.	terpineol	$C_{10}H_{18}O$		Alcoli terpene
13.	Piperiton	$C_{10}H_{16}O$		Terpeni, chetoni
14.	Bornyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$		Terpeni, esteri
15.	carvone	$C_{10}H_{14}O$		Terpeni
16.	β -sitosterol	$C_{29}H_{50}O$		Fitosteroli, terpeni
17.	stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$		Fitosteroli, terpeni
18.	Butyl phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$		Esteri

19.	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$		acido
-----	-------------------	-------------------	--	-------

Componenti di estratto di 50% etanologico di infiorescenze di *Helichrysum arenarium* (metodo GC/MS)

Nº	Componenti	Formula	Formula strutturale	Gruppa
1.	β -pinene	$C_{10}H_{16}$		Terpeni bicilici
2.	1,8-cineole	$C_{10}H_{18}O$		Terpeni monociclici
3.	Linalool	$C_{10}H_{18}O$		Alcoli terpene
4.	Nonanal	$C_9H_{18}O$		aldeidi
5.	Decanal	$C_{10}H_{20}O$		Aldeidi
6.	Carvacrol	$C_{10}H_{14}O$		Monoterpeni

7.	Terpineol	$C_{10}H_{18}O$		Alcoli terpene
8.	Neril acetate	$C_{12}H_{20}O_2$		Eteri
9.	α -copaene	$C_{15}H_{24}$		Terpeni treciclici
10.	Tetradecane	$C_{14}H_{30}$		Alcane
11.	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$		Terpeni biciclici
12.	α -humulene	$C_{15}H_{24}$		Terpeni monociclici
13.	β -farnesene	$C_{15}H_{24}$		Esteri

14.	δ -muurolene	$C_{15}H_{24}$		Acido
15.	β -ionene	$C_{13}H_{20}O$		Terpeni
16.	δ -cadinene	$C_{15}H_{24}$		Terpeni biciclici
17.	Octyl phtalate	$C_{16}H_{22}O_2$		etere

ALLEGATO 4

Risultati di HPLC

Polarity/Scan Type: Negative MRM

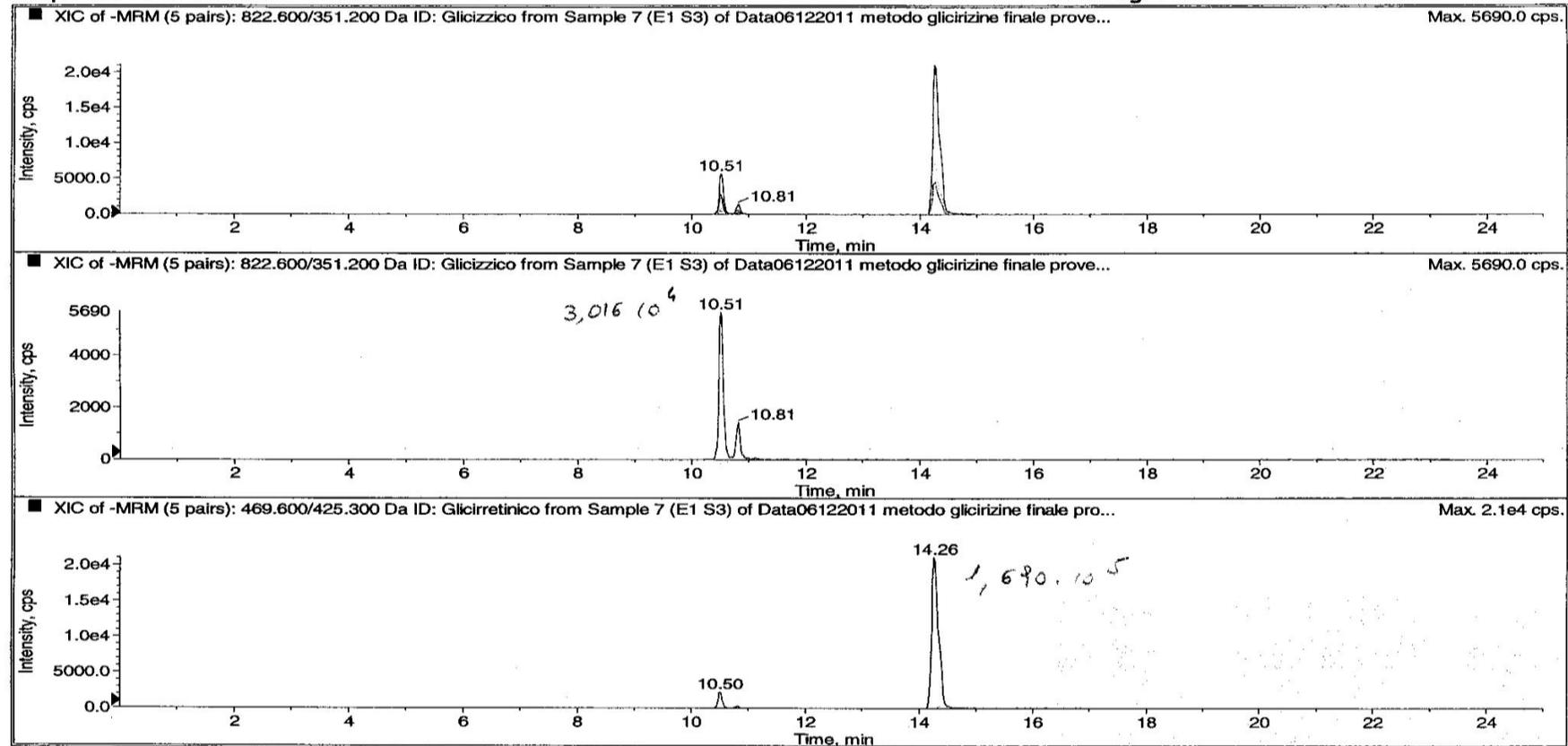
Acq. File: Data06122011 metodo

S2

in fase

Printing Date: Wednesday, December 07,

Printing Time: 9:12:35 AM



Sample Name: E1 S3

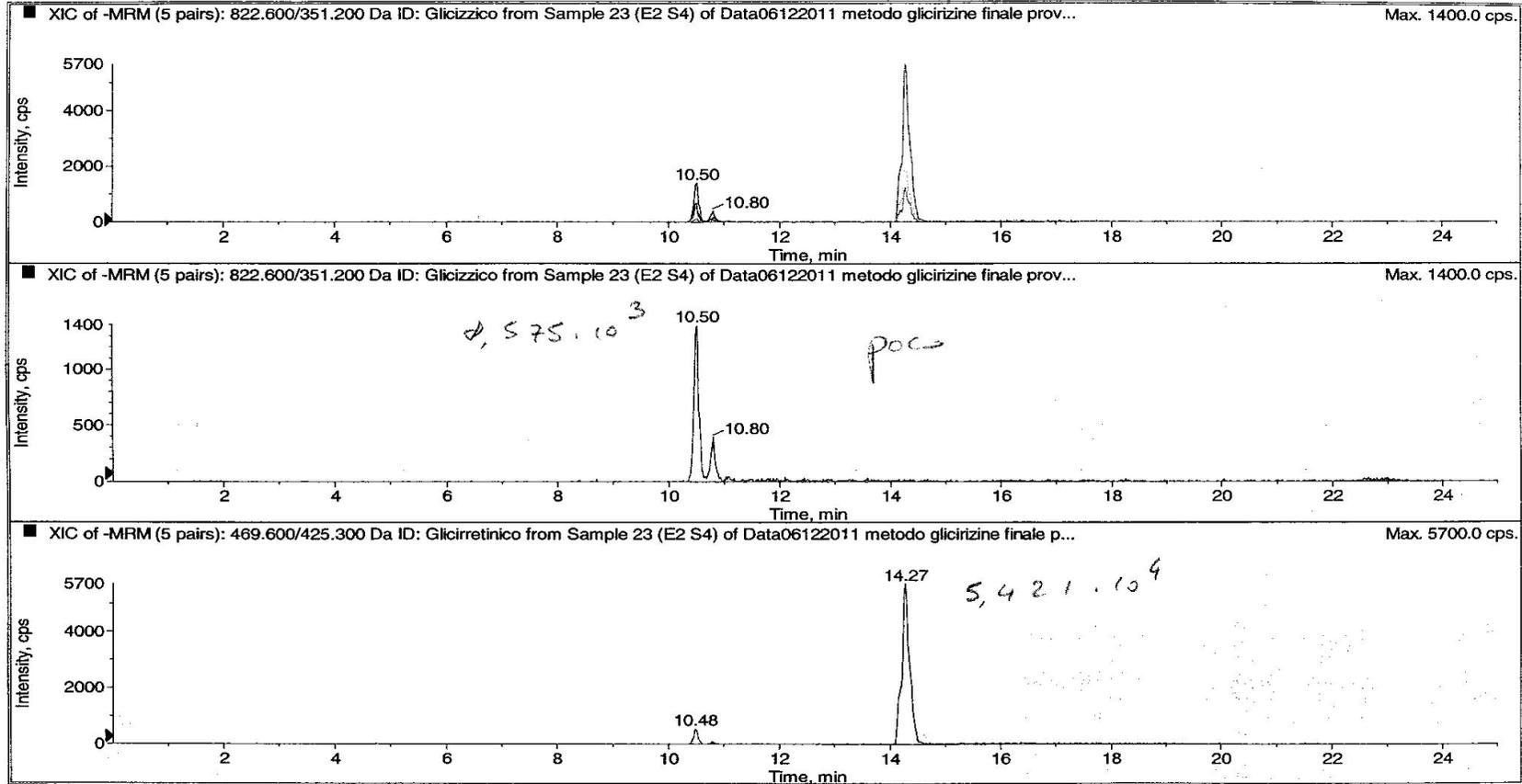
Frazione E1 di estratto etanólico (50%) di radice di liquirizia *Gl. glabra* (regione Astrakhan)

Polarity/Scan Type: Negative MRM

Printing Date: Wednesday, December 07,

Acq. File: Data06122011 metodo

Printing Time: 9:17:00 AM



Sample Name: E2 S4

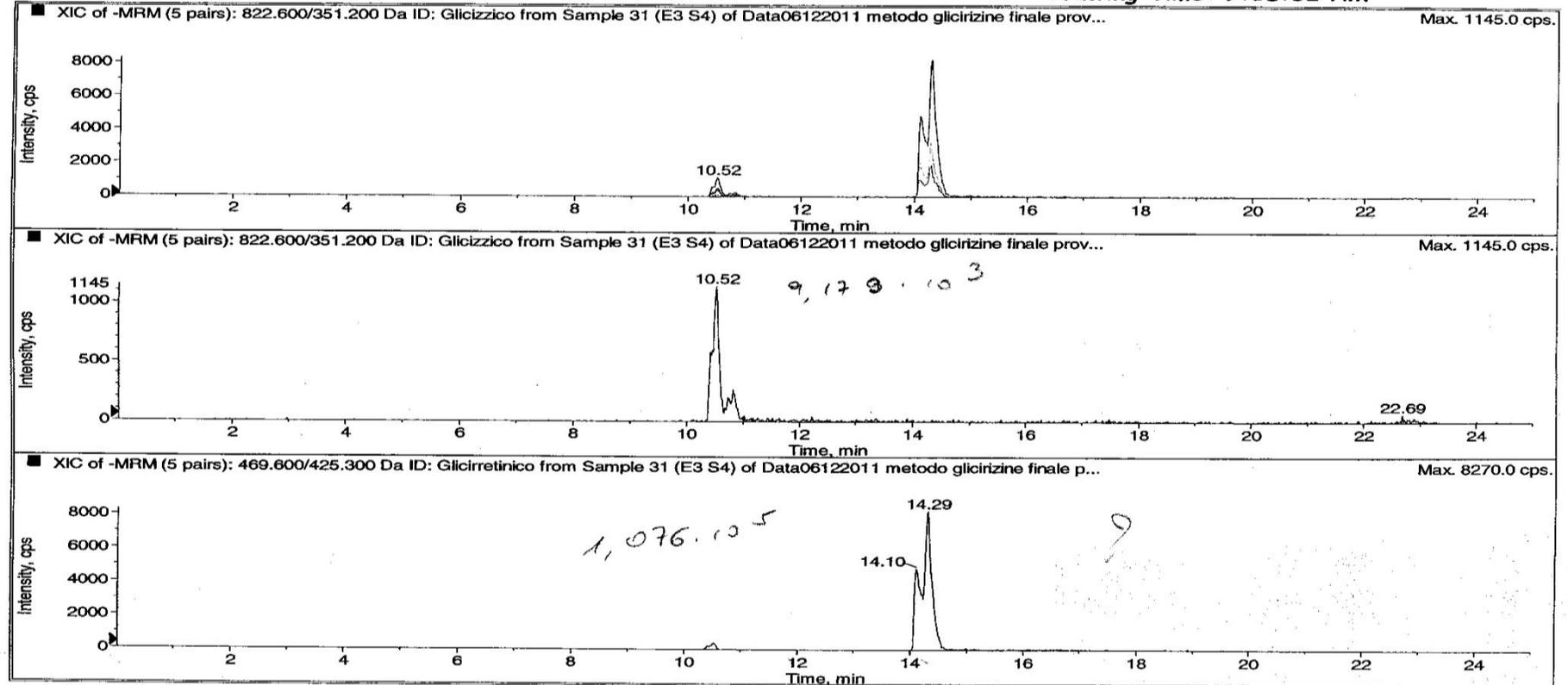
Frazione E2 di estratto etanólico (50%) di radici di liquirizia *Gl. glabra* (regione Astrakhan)

Polarity/Scan Type: Negative MRM

Printing Date: Wednesday, December 07,

Acq. File: Data06122011 metodo

Printing Time: 9:18:02 AM



Sample Name: E3 S4

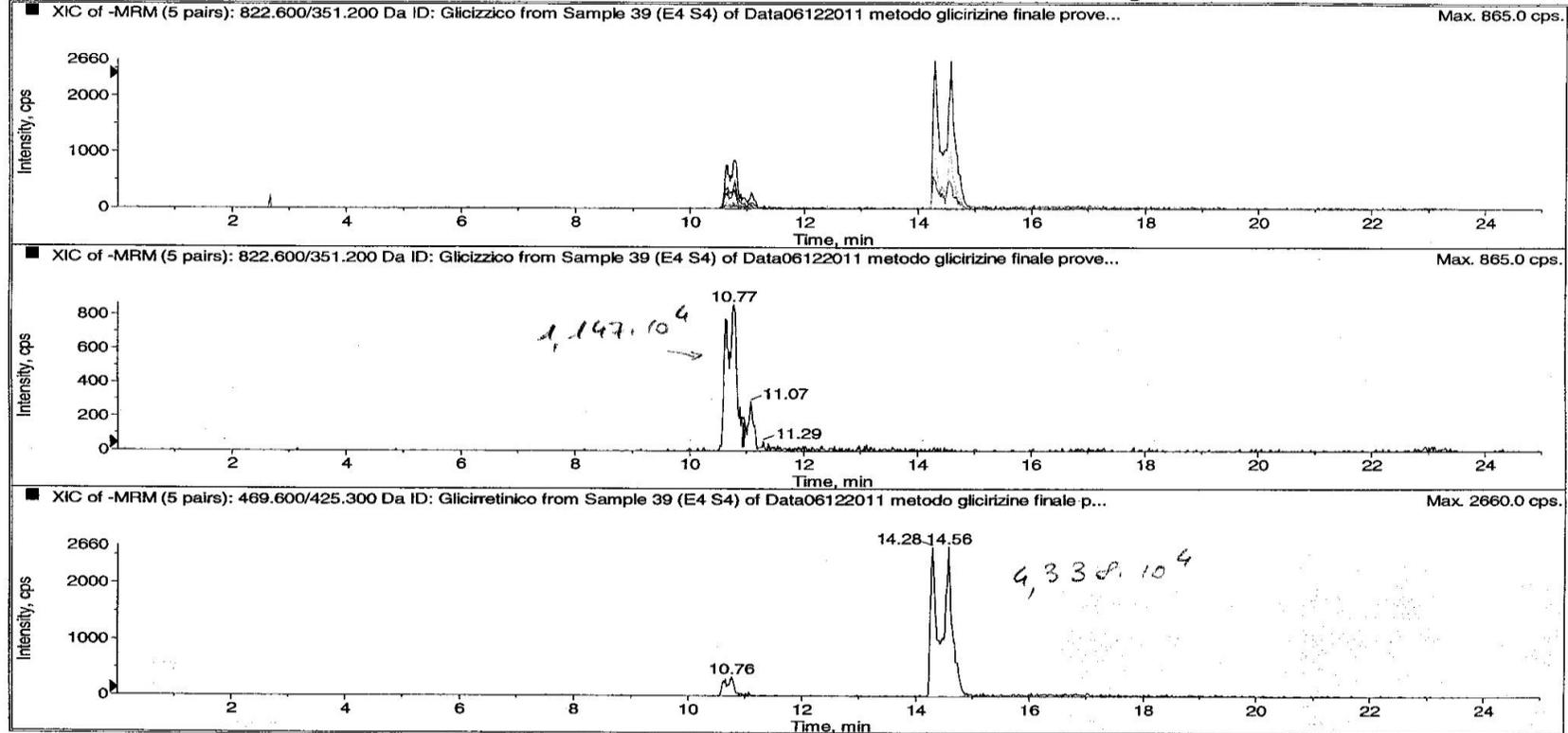
Frazione E3 di estratto etanologico(50%) di radice di liquirizia *Gl. glabra* (regione Astrakhan)

Polarity/Scan Type: Negative MRM

Printing Date: Wednesday, December 07,

Acq. File: Data06122011 metodo

Printing Time: 10:05:08 AM

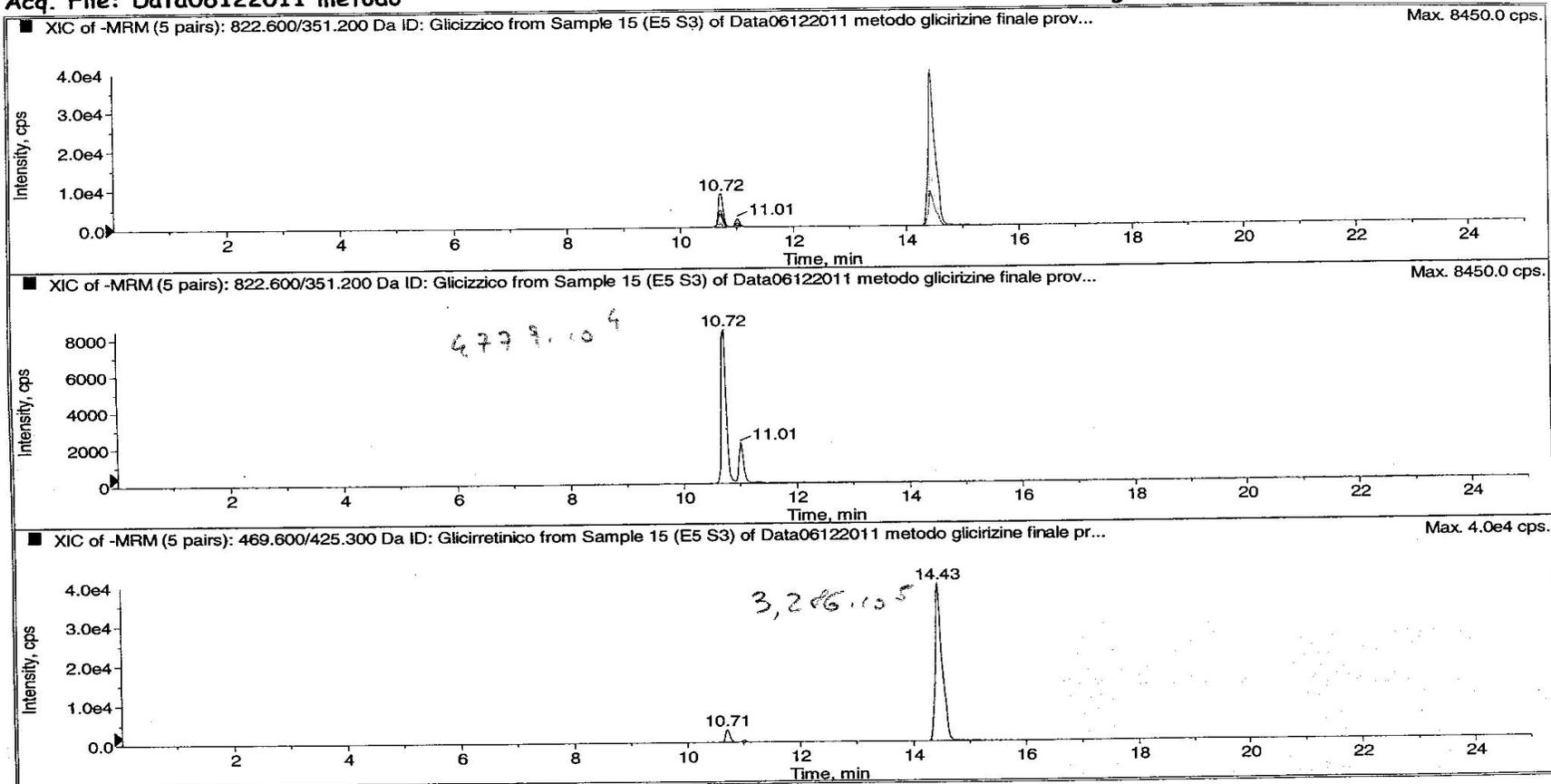
Frazione E4 di estratto etanólico (50%) di radici di liquirizia *Gl. glabra* (regione Astrakhan)

Polarity/Scan Type: Negative MRM

Printing Date: Wednesday, December 07,

Acq. File: Data06122011 metodo

Printing Time: 9:15:36 AM



Sample Name: E5 S3

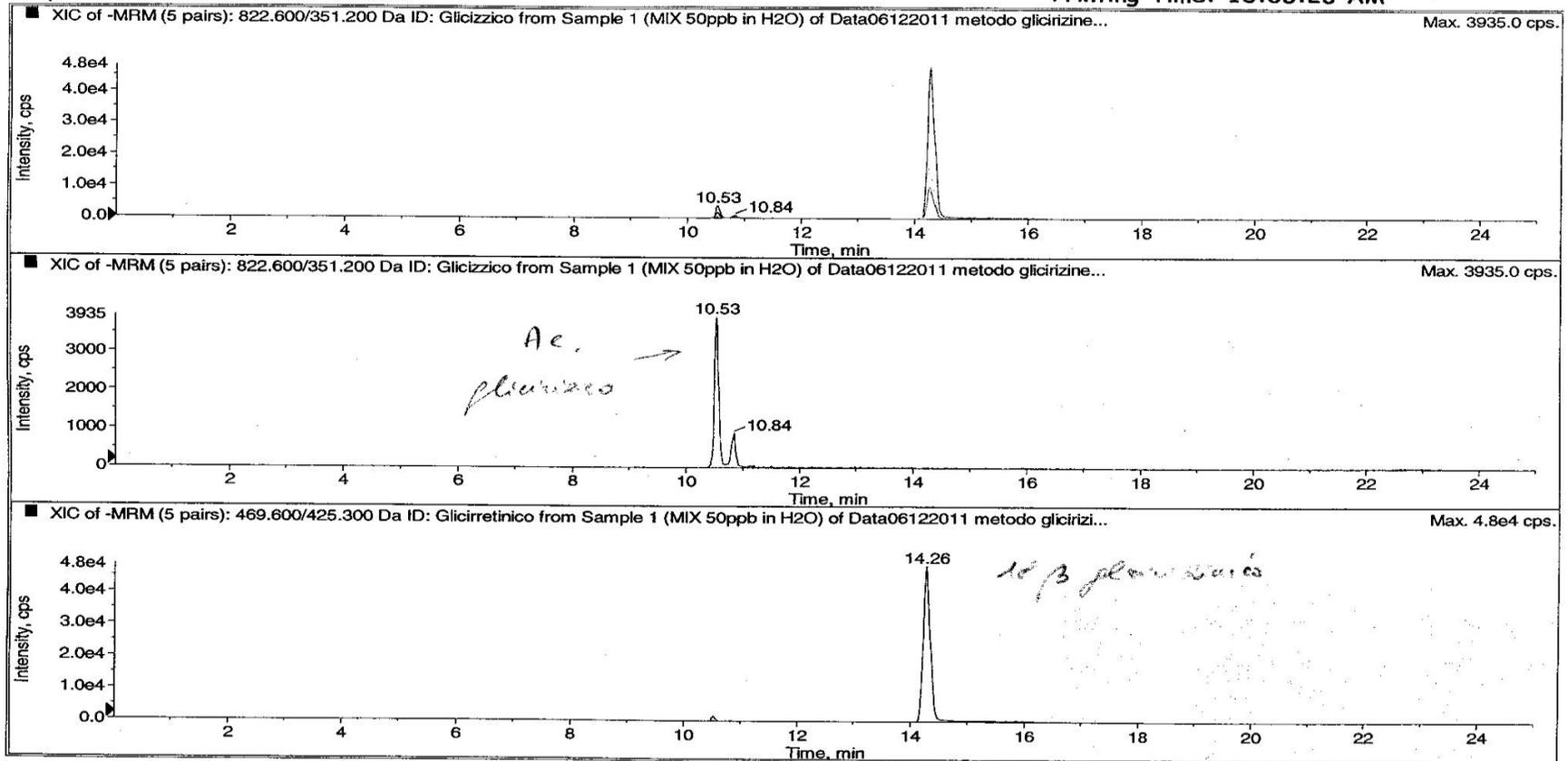
Frazione E5 di estratto etanolico(50%) di radice di liquirizia *Gl. glabra* (regione Astrakhan)

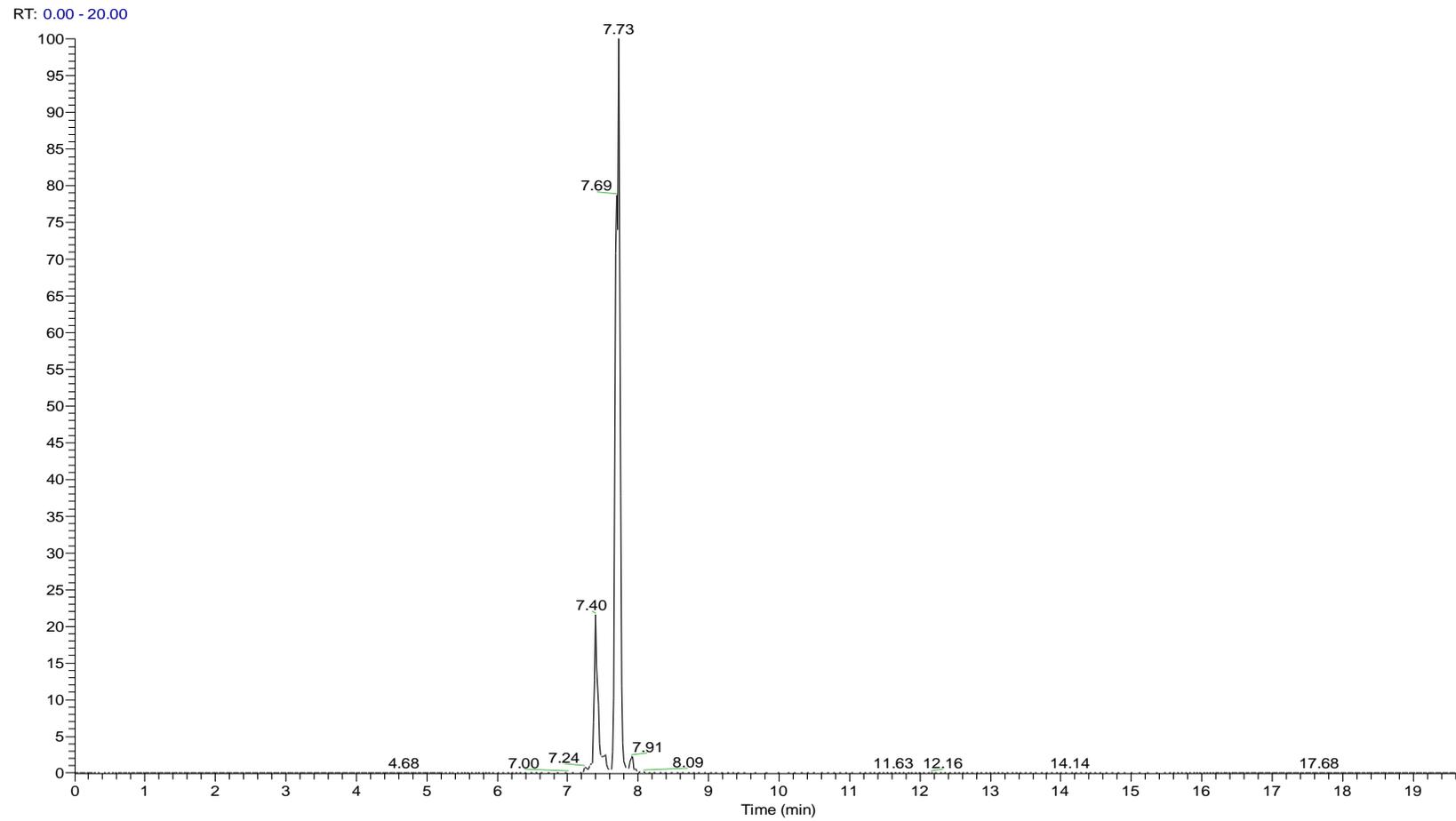
Polarity/Scan Type: Negative MRM

Printing Date: Wednesday, December 07,

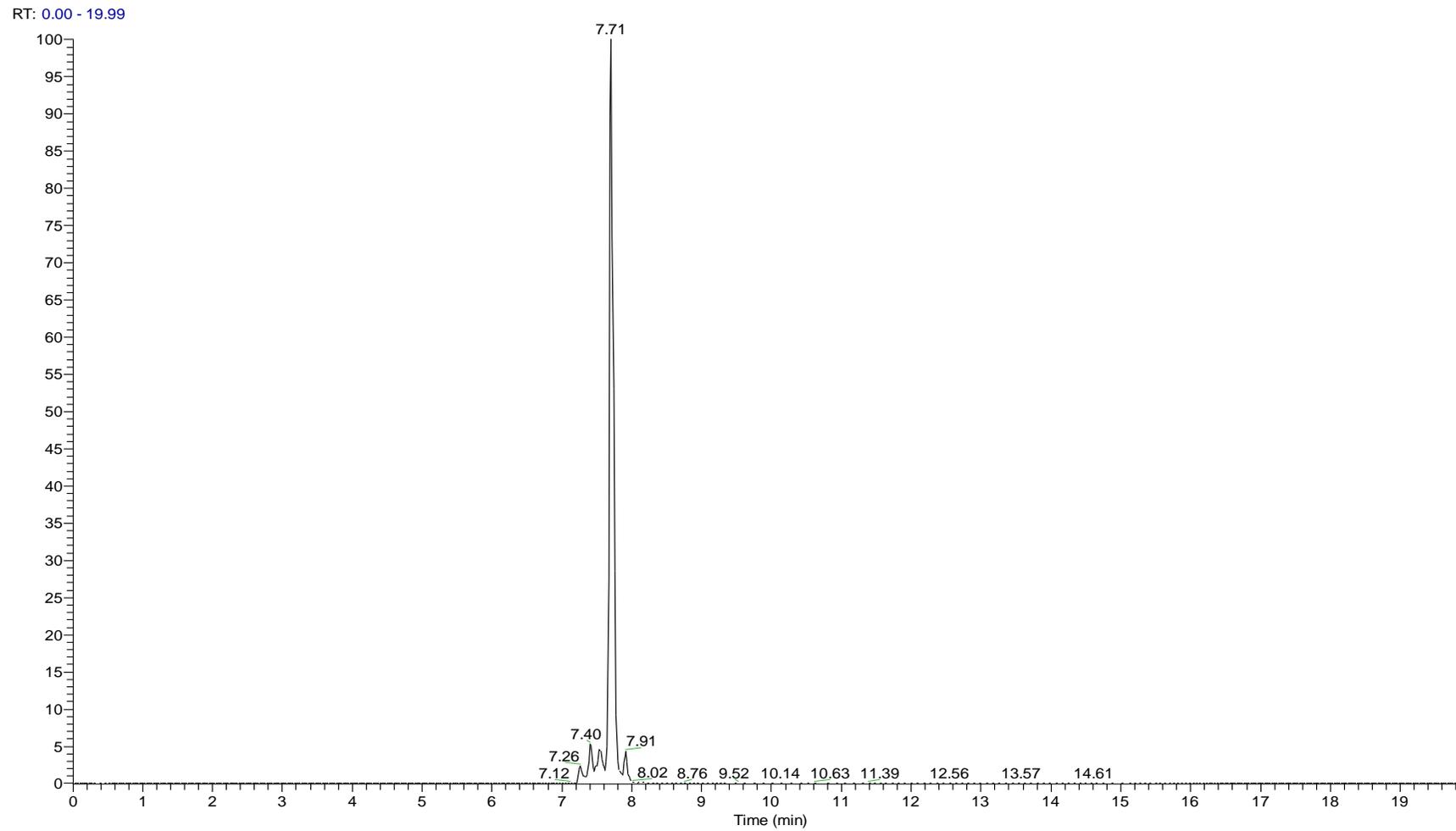
Acq. File: Data06122011 metodo

Printing Time: 10:03:23 AM

Sample Name: MIX 50ppb in H₂OL'estratto etanólico (50%) di radice di liquirizia *Gl. glabra* (regione Astrakhan)

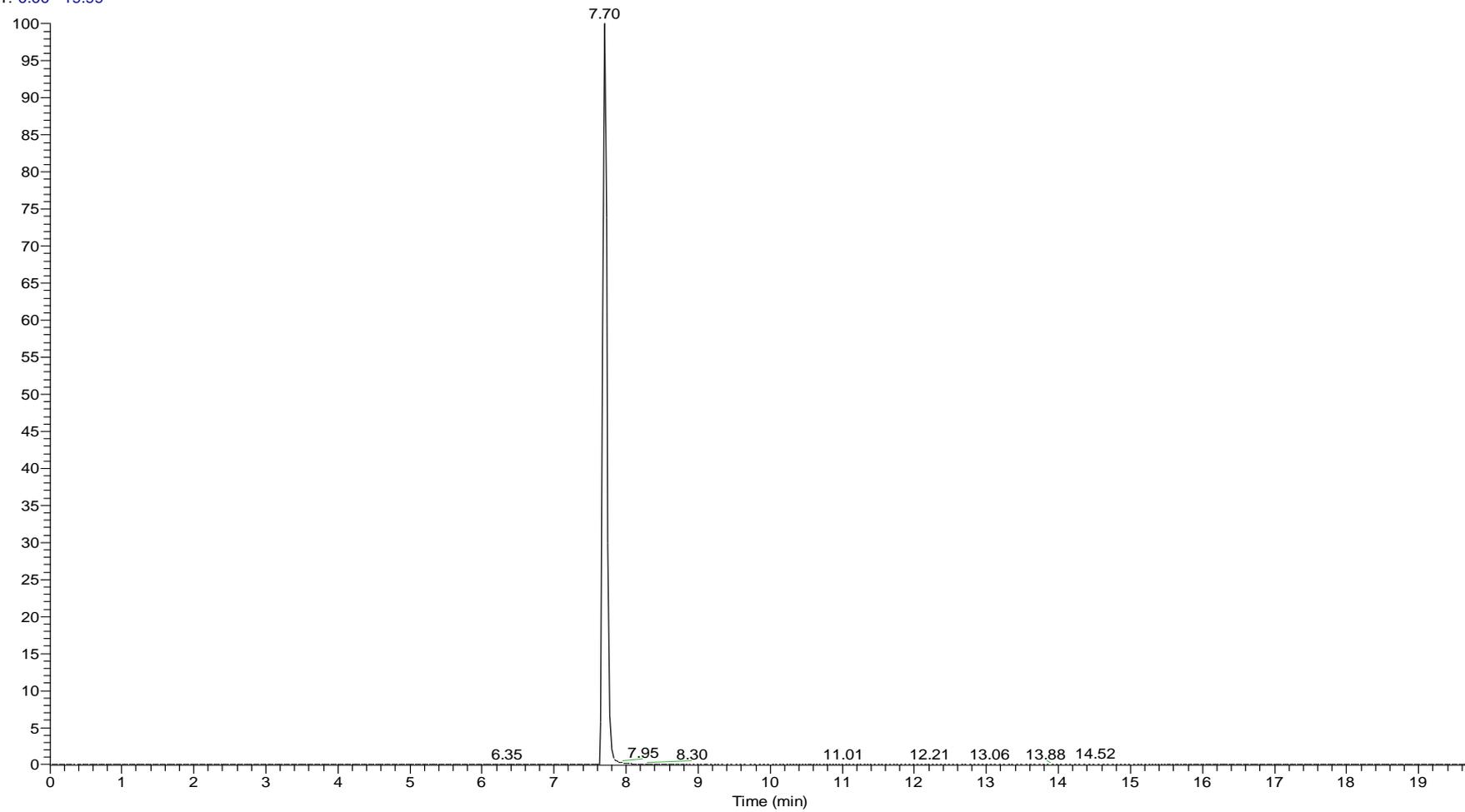


Contenuto di glabridin negli estratti etanolic 50% di liquirizia di regione Calabria



Contenuto di glabridin negli estratti etanolic 50% di liquirizia di regione Astrakhan

RT: 0.00 - 19.99



Glabridin standard