

OLI ESSENZIALI FRA AUTENTICITÀ E SICUREZZA

Stefania Benvenuti, Eleonora Truzzi, Lucia Marchetti, Davide Bertelli

Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

Introduzione

L'Olio Essenziale (OE) è una miscela ottenuta da droghe vegetali, costituita da numerose componenti di origine per lo più terpenica, risultato di un metabolismo complesso e specie-specifico.

Biosintesi ed estrazione dell'OE consistono in un percorso articolato, costituito da numerosi stadi in cui risultano coinvolti svariati fattori che possono influire sulla resa e sulla composizione chimica.

Oltre le ben note differenze di genere e specie botanica, è comune trovare chemiotipi differenti, correlati a diverse *cultivar*, indice di patrimoni genetici che inducono la produzione di un corredo enzimatico e vie metaboliche diversamente espresse nella pianta aromatica. In questo contesto, considerato che i metaboliti secondari che compongono l'OE sono molecole prodotte in risposta a stimoli ambientali, anche l'adattamento evolutivo, seppur molto lento, può incidere sulla variabilità.

Fattori pedoclimatici, agronomici nonché la copresenza di altre specie vegetali e lo stesso microbioma del suolo influiscono inoltre sulla composizione chimica degli OE, modulando le sequenze metaboliche sia in maniera proattiva che depressiva.

È inoltre da considerare che l'OE, ottenuto mediante tecniche di distillazione e estrazione, è comunque un artefatto, sicuramente differente dall'insieme dei costituenti presenti nei tessuti di secrezione e produzione della pianta.

La definizione fornita dalla Farmacopea di prodotto ottenuto per distillazione o per estrazione meccanica (1), limita le modalità, ma non le differenze introdotte dall'applicazione della tecnica estrattiva sulla composizione dell'essenza prodotta dalla pianta; nell'ambito poi della medesima metodica, la variazione di parametri, quali la pressione e il tempo di distillazione, nonché le caratteristiche della droga sottoposta al processo, induce cambiamenti fra le componenti estratte e i loro rapporti quantitativi.

Per garantire migliori caratteristiche organolettiche e conservabilità, sono inoltre ammessi trattamenti di post-distillazione che concorrono a modificare il prodotto vegetale.

Il risultato finale è quindi un prodotto ad alto valore, non solo per gli sforzi tesi ad aumentarne la resa, ma per quelli sperimentati e messi in atto al fine di ottenere un prodotto idoneo agli impieghi fitoterapici, cosmetici e alimentari, ossia con un profilo quali- e quantitativo specifico.

Qualità degli oli essenziali

Gli OE sono miscele di sostanze chimiche pure, delle quali alcune sono funzionali alla solubilizzazione di altre, e quindi vanno trattati come tutti i *chemicals*, ossia sottoposti al Regolamento (CE) 1907/2006 (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*, REACH), che stabilisce le procedure per l'acquisizione e la valutazione dei dati sulle proprietà e sui pericoli delle sostanze) e il Regolamento (CE) 1272/2008 sulla classificazione,

l'etichettatura e l'imballaggio (*Classification, Labelling and Packaging, CLP*) come materie prime; il loro utilizzo nella cosmetica o in fitoterapia va poi adeguatamente descritto, vista la presenza di sostanze anche tossiche e allergizzanti; è quindi richiesto per questi estratti un'ideale etichettatura, che indichi il corretto uso, smaltimento e rischio.

Tecniche analitiche per il controllo degli oli essenziali

La descrizione di un OE, spesso introdotta da un'analisi organolettica, passa quindi attraverso la determinazione di parametri chimico-fisici ben precisi, misurati con metodi standardizzati: indice di rifrazione, densità, rotazione ottica, punto di congelamento o di ebollizione, ecc.

I testi ufficiali quali la Farmacopea Europea o certificazioni International Organization for Standardization (ISO) riportano per le singole monografie questi valori, che devono essere rispettati affinché l'OE possa dirsi conforme a questi requisiti di qualità.

I risultati di tali misure sono specifici per i differenti OE e i valori ottenuti sono la sommatoria degli effetti dei singoli costituenti presenti.

Per valutare però la qualità intrinseca dell'OE come il risultato della somma vettoriale dei singoli componenti, è indispensabile valutare il profilo metabolomico sia a livello qualitativo che quantitativo, mediante tecniche analitiche separative per verificare quali sono i componenti terpenoidici presenti nell'OE e i loro rapporti; dagli stessi enti certificatori, nelle specifiche monografie, ma anche da ogni responsabile fornitore, nelle relative schede tecniche, vengono riportati i risultati ottenuti dall'applicazione delle metodiche analitiche più idonee a questi scopi; sicuramente la cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography, TLC*), rappresenta un sistema di analisi semplice, rapido e *user-friendly*, e che può fornire utili informazioni sulla composizione qualitativa dell'OE. Per questo non mancano fonti bibliografiche, di facile interpretazione e applicazione (2).

A livello quantitativo, la Gascromatografia (GC), accoppiata a un semplice rivelatore a ionizzazione di fiamma (*Flame Ionization Detector, FID*) rappresenta la tecnica di elezione, prevista anche dagli enti certificatori, vista la volatilità dei componenti dell'OE e quindi la loro facile separazione su colonne capillari; in questo caso è necessario però una strumentazione adatta e personale adeguatamente formato a svolgere le analisi e soprattutto a elaborare i risultati, compito di non facile esecuzione vista la complessità chimica di questa matrice e la competenza richiesta in campo fitochimico.

Questa stessa tecnica può avvalersi anche di un rivelatore di spettrometria di massa o gascromatografia-spettrometria di massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS*) che permette il riconoscimento della struttura chimica, attraverso la valutazione del peso molecolare della molecola separata e dei frammenti ottenuti dalla ionizzazione della stessa. Grazie a tecniche analitiche consolidate, è quindi possibile controllare la qualità di un OE e di conseguenza stabilire i relativi settori di applicazione nell'ambito dei prodotti per la salute.

Attualmente gli OE, grazie alle loro innumerevoli attività biologiche, sono utilizzati come eccipienti e come ingredienti attivi in diverse formulazioni; la copresenza di sostanze intensamente bioattive con altre componenti modulanti, riduce la tossicità ed esalta l'azione terapeutica.

Come in una orchestra, è necessario che tutti i principi siano presenti in rapporti bilanciati; per questo è fondamentale che tutto il processo di produzione degli OE segua protocolli standardizzati, al fine di ottenere un derivato di qualità: dalla coltivazione della pianta aromatica, alla sua distillazione, fino al confezionamento e conservazione.

Problematica delle adulterazioni: nuove tecniche di indagine

La grande richiesta da parte del mercato e l'alto costo di produzione hanno fatto emergere la pratica illegale di adulterazione degli OE.

Diversi tipi di manipolazioni fraudolente sono state riscontrate in prodotti presenti sul mercato, come ad esempio l'aggiunta di composti specifici, sintetici e/o naturali, per avere un prodotto finale a composizione standardizzata, magari partendo da OE di bassa qualità.

Inoltre, ben nota è l'aggiunta di altri OE, per migliorare la qualità olfattiva, o le proprietà biologiche, fino alla formulazione completa dell'intera miscela a partire da composti sintetici.

Sicuramente l'adulterazione più diffusa è la diluizione con oli fissi, vegetali o minerali, e solventi, attuata per lo più per motivi economici.

Al fine di riconoscere queste pratiche si possono applicare tecniche analitiche in grado di riconoscere tutte le componenti caratteristiche dell'OE e i loro rapporti, o individuare uno o più *marker* specifici, come ad esempio un isomero ottico prodotto selettivamente dal metabolismo vegetale.

La diluizione non è identificabile mediante GC poiché essa analizza solo la porzione volatile dell'OE e non la componente fissa.

Solo recentemente è stato sviluppato un metodo innovativo che prevede l'analisi degli OE mediante tecnica infrarossi, ovvero la *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) (Figura 1), la successiva applicazione di metodi chemiometrici come la *Principal Component Analysis* (PCA) (Figura 2) e la *Partial Least Squares regression* (PLS) (Figura 3) in grado di elaborare gli spettri e risalire al contenuto di olio vegetale adulterante (3).

Con questa tecnica in pochi minuti è stato possibile quantificare oli vegetali fissi di diversa natura addizionati come diluenti a OE. Per identificare gli adulteranti è stata successivamente applicata per la prima volta nel controllo di qualità degli OE, la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).

Il metodo prevede le seguenti fasi: identificazione della presenza dell'adulterazione e riconoscimento dell'olio vegetale adulterante (4).

Il metodo è stato sviluppato e validato su miscele binarie composte da diversi OE nel range di adulterazione tra 0,8 e 50,0% p/p. Il riconoscimento dell'adulterazione tramite tecnica ¹H-NMR è avvenuta grazie all'individuazione dei segnali del glicerolo tipici dei trigliceridi presenti in tutti gli oli vegetali. L'identificazione dell'olio vegetale mediante ¹³C-NMR è invece basata sul "fingerprint" chimico.

Questo principio si basa sulla creazione di matrici ottenute dai rapporti delle aree dei segnali tipici degli acidi grassi negli oli vegetali puri più comuni (palmitico, oleico e linoleico).

Tali matrici possono essere utilizzate come impronte digitali e quindi essere confrontate con quelle ottenute da miscele binarie di prova appositamente allestite con OE e oli vegetali (Figura 4).

Il confronto delle matrici degli oli vegetali puri usati come standard con le matrici delle miscele "incognite" è avvenuto tramite *software* codificato su MATLAB, piattaforma di programmazione e calcolo numerico utilizzata da milioni di ingegneri e scienziati per l'analisi di dati e lo sviluppo di algoritmi. I risultati hanno dimostrato che il metodo è idoneo per tutte le miscele testate: la presenza di oli fissi è individuabile già a partire dallo 0,8%, mentre il riconoscimento dell'olio vegetale è possibile dal 3%, su tutte le tipologie di OE testate.

Il metodo applicato su 20 campioni di OE commerciali ha permesso di individuare un'adulterazione con olio di soia su *Mentha arvensis*, di olio di mais su *Cymbopogon martinii*, di olio di girasole in *Thymbra capitata* e di olio di mais su *Origanum vulgare*.

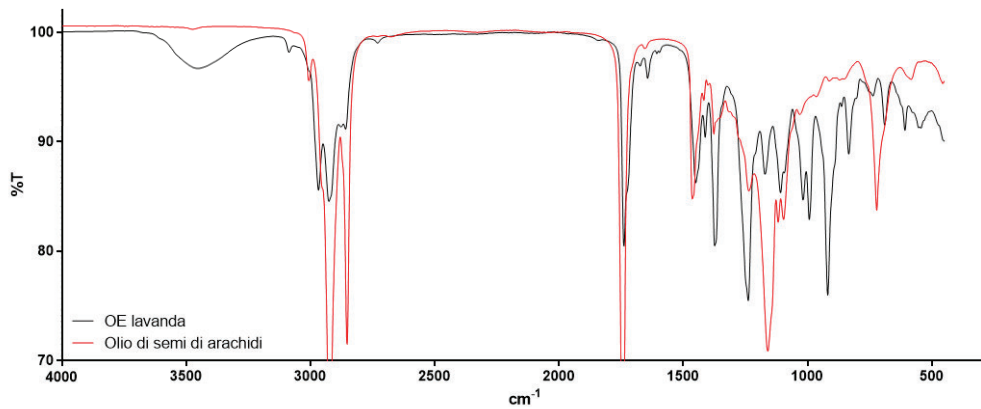


Figura 1. Spettri infrarosso (IR) di OE di *Lavandula angustifolia* e olio di semi di arachide

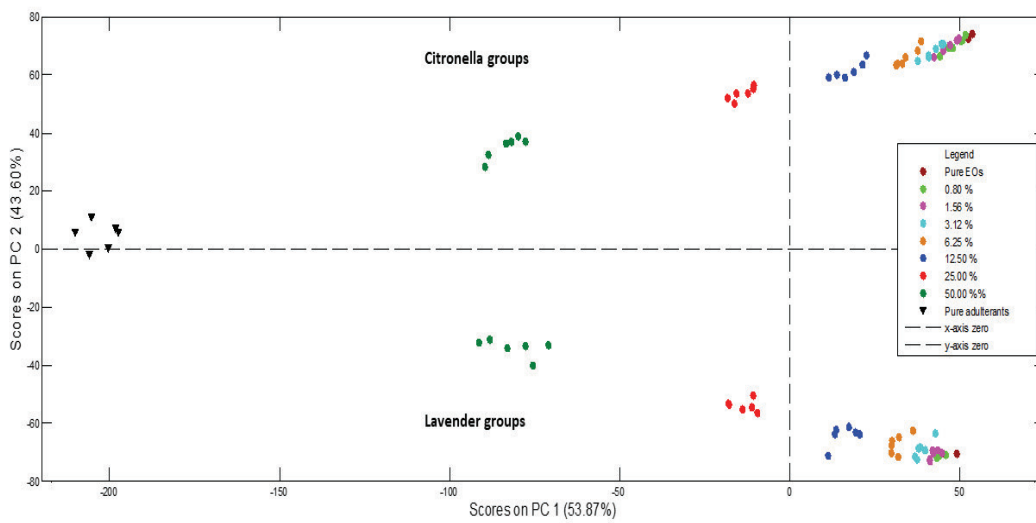


Figura 2. Analisi delle componenti principali (PCA) di citronella e lavanda

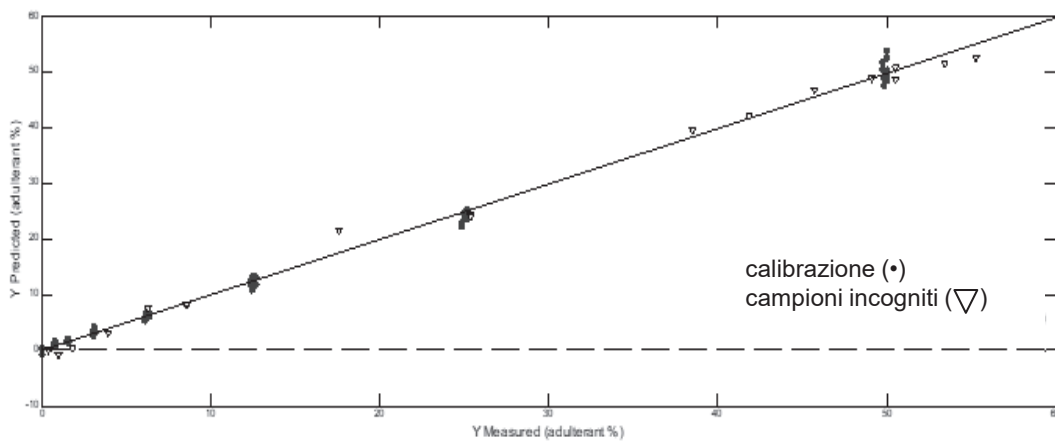


Figura 3. Modello di regressione *Partial Least Squares regression* (PLS)

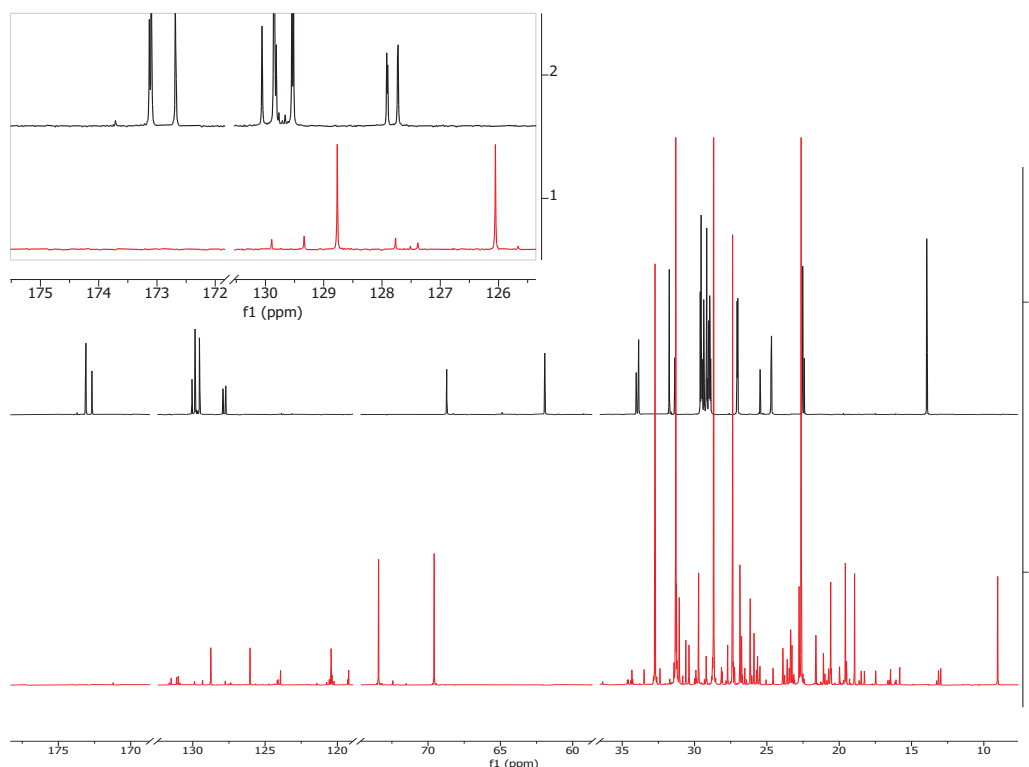


Figura 4. Spettro ^{13}C -NMR di OE di *Salvia rosmarinus* (rosso) e olio di soia (nero)

Conclusioni

La complessa natura degli OE rende l'analisi di queste miscele molto difficoltosa, inoltre la biosintesi dei metaboliti secondari è soggetta a importanti variazioni indotte dall'ambiente e dagli stress, anche all'interno dello stesso genere, specie e chemiotipo vegetale.

Questa estrema variabilità pone il problema di avere, per gli usi farmaceutici, OE a composizione standardizzata. Gli elevati costi di produzione, insieme a basse rese, inducono non di rado alla formulazione di OE non genuini, magari per arricchimento con componenti di origine sintetica e/o con addizione di altri oli.

Le moderne tecniche chimico-analitiche, associate a metodiche statistiche di elaborazione dei dati, consentono di individuare tali adulterazioni, al fine di garantire i requisiti di qualità di fitoderivati (quali gli OE) per la tutela della salute e del benessere dell'uomo e degli animali.

Bibliografia

1. The European Pharmacopoeia Commission. *The European Pharmacopoeia* 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2021. P. 864.
2. Wagner H, Baldt S, Zgainski EM. *Plant drug analysis*, New York: Springer; 1996.

3. Truzzi E, Marchetti L, Bertelli D, Benvenuti S. Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectroscopy coupled with chemometric analysis for detection and quantification of adulteration in lavender and citronella essential oils. *Phytochem Anal* 2021;32(6):907-920.
4. Truzzi E, Marchetti L, Benvenuti S, Ferroni A, Rossi MC, Bertelli D, Novel strategy for the recognition of adulterant vegetable oils in essential oils commonly used in food industries by applying ¹³C-NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2021;28;69(29):8276-286.