



A.D. MDLXII

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI**  
**DIPARTIMENTO DI AGRARIA**  
**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE**

# **Orientamenti preliminari per la coltivazione del lentisco (*Pistacia lentiscus* L.)**

**Relatore:**

**Prof. Maurizio Mulas**

**Correlatore:**

**Dott.ssa Leonarda Dessena**

**Elaborato finale di:**

**Marco Talu**

**ANNO ACCADEMICO 2016/2017**

## INDICE

RIASSUNTO .....	3
INTRODUZIONE	
Il lentisco .....	4
Le potenzialità di domesticazione .....	11
OBIETTIVI DEL TIROCINIO .....	14
MATERIALI E METODI	
Analisi chimiche delle bacche di lentisco .....	15
Estrazione dell'olio di lentisco .....	17
RISULTATI .....	21
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	29
BIBLIOGRAFIA .....	31

## RIASSUNTO

Il lentisco (*Pistacia lentiscus*) è una delle essenze più rappresentative della macchia mediterranea, data la sua resistenza alla siccità e alle poche esigenze pedologiche, oltre ad essere considerata una specie miglioratrice del terreno per il recupero di zone degradate.

In natura si propaga per seme, anche se sono stati effettuati vari tentativi di propagazione agamica per l'ottenimento di genotipi con determinate caratteristiche morfologiche ed ornamentali al fine di avviare la sua coltivazione a livello intensivo, con risultati ancora non soddisfacenti, essendo una specie recalcitrante alla radicazione.

In antichità ha avuto una larga utilizzazione per molteplici scopi, in particolare l'olio ottenuto dalle bacche e il mastice estratto dalla corteccia. Anche se oggi il suo utilizzo è più limitato rispetto al passato, si stanno riscoprendo le sue proprietà benefiche, soprattutto dell'olio in quanto ricco di sostanze molto apprezzate in cosmesi, ma anche in campo farmaceutico e alimentare, lo studio condotto ha permesso di approfondirne le conoscenze e di valutare le proprietà chimiche dell'olio al fine di individuarne possibili futuri utilizzi.

## ABSTRACT

The lentisk (*Pistacia lentiscus*) is one of the most representative species of Mediterranean maquis, given its resistance to drought and little soil needs, as well as being considered as a soil improvement agent for the recovery of degraded areas.

In nature, it propagates by seed, although several attempts have been made to propagate agamically to obtain genotypes with certain morphological and ornamental characteristics. This in order to start its cultivation at intensive level but with still unsatisfactory results being a recalcitrant species.

In antiquity, it has been widely used for many purposes, in particular the oil obtained from berries and the mastic extracted from the cortex. Although today's use is more limited than in the past, its beneficial properties are being rediscovered, especially as it is rich in highly-valued substances in cosmetics, but also in the pharmaceutical and food fields. The study led to further exploration knowledge and to evaluate the chemical properties of the oil in order to identify possible future uses.

## INTRODUZIONE

### Il lentisco

#### *Botanica ed ecologia*

Il lentisco (*Pistacia lentiscus*) appartiene alla famiglia delle Anacardiacee. È una specie sempreverde arbustiva che in determinate condizioni raggiunge gli 8-9 m di altezza, molto ramificata, con rami contorti e corteccia cenerina o rossastro-bruna (Fig. 1). Rami giovani con leggera peluria. Foglie alterne, paripennate lunghe 3-8 cm, con rachide strettamente alata e con 3-8 paia di foglioline di 8-10 x 7-30 mm, ovate od ovato-lanceolate, sessili, coriacee, consistenti, mucronate all'apice della rachide, con margine intero ispessito. Infiorescenze in racemi nascenti alla base delle foglie sui rami dell'anno precedente. (Camarda e Valsecchi, 2008).

Le infiorescenze sono unisessuali su piante diverse (pianta dioica). Il calice è breve a 5 sepali denticolati e corolla nulla. Fiori maschili con 5 antere rosso-porporine, sub-sessili; femminili in amenti più lassi con 3 stili persistenti nel frutto. Drupa ovoidea o sub-globosa di 5-7 mm, rosso-porporina o rosso-scura, bianca, o per lo più nera a maturità con un solo seme. Fiorisce a marzo-aprile e i frutti completano la maturazione nel periodo invernale (Fig. 2).

L'areale del lentisco comprende tutte le aree costiere del Mediterraneo, del Portogallo e delle Canarie. In Sardegna occupa gran parte della superficie anche nelle zone basse interne.

Specie eliofila, termofila e xerofila, vegeta soprattutto lungo le zone costiere su qualsiasi tipo di substrato geopedologico. In Sardegna è comune fino a 400-500 m di altitudine, ma spesso vive anche a 700 m di quota e, in alcune aree calcaree del Sarcidano e dei calcari costieri sino a 800 m di quota. Il lentisco resiste bene ai venti più forti e, in prossimità del mare, assume spesso un caratteristico portamento "pettinato", sviluppando il fusto con lentissima crescita e aderente al suolo (Camarda e Valsecchi, 2008).

Il lentisco caratterizza l'Oleo-Lentiscetum, che è il tipo di macchia di sclerofille sempreverdi più frequente nella fascia costiera, e altre associazioni forestali termofile costiere (Clematido cirrhosae-pistacietum lentisci, Myrto-Lentiscetum, Pistacio-Quercetum ilicis).

In condizioni di piena naturalità, il lentisco è un albero che può raggiungere dimensioni ed età considerevoli. L'esemplare di maggiori dimensioni oggi esistente si trova a Li Espi, presso la chiesa campestre di San Baltolu di Luras; esso raggiunge i 9 metri di altezza e 470 cm di circonferenza del fusto.



Figura 1. Esemplare di lentisco.



Figura 2. Particolare della fruttificazione del lentisco.

Nei calcari dei Supramonti centro-orientali, in prossimità della costa e in luoghi poco accessibili, si trovano sporadici grandi alberi, spesso residui delle antiche formazioni forestali a macchia-foresta, come a Orgoduri (7 m di altezza e 230 cm di circonferenza) in territorio di Baunei. Altri alberi notevoli si ritrovano ancora a Samugheo, poco lontano dal centro abitato verso il castello della Medusa, ad Antas, presso il tempio punico-romano di Fluminimaggiore, a San Leone di Capoterra, a Erula in Anglona, a Siniscola in Baronìa, nella Giara e ovunque vi siano luoghi di difficile accesso con residui ancestrali delle formazioni di sclerofille sempreverdi (Fig. 3).

Si diffonde per seme. Oltre alla forma prevalentemente arbustiva assume spesso un portamento arboreo di dimensioni apprezzabili con chioma rotondeggiante e fusto generalmente contorto. Nel sottobosco i polloni sono eretti, esili, ma ben sviluppati in altezza. Il lentisco potrebbe avere un ruolo molto importante nella ricostituzione del manto vegetale sia per le sue alte capacità pedogenetiche dovute al forte contenuto in basi delle sue foglie (particolarmente idonee alla correzione dei terreni acidi della Gallura) che facilitano l'umificazione del terreno, sia per la sua adattabilità a tutti i tipi di substrato.

La terra sotto i cespi di lentisco è particolarmente vantaggiosa nel giardinaggio. Nel periodo estivo è limitato nello sviluppo dalla carenza idrica, ma se opportunamente irrigato cresce vigoroso per gran parte dell'anno. Si presta bene a costituire siepi, sebbene per questo scopo sia raramente utilizzato. Data la sua notevole capacità di ricaccio basale è una pianta molto resistente agli incendi, ed è rifiutato dal bestiame, tranne che per i suoi frutti, ricercati anche dagli uccelli, per il loro contenuto in grassi. Si presta ad essere modellato per siepi e bordure di giardino e a ricoprire scarpate e tagli stradali nelle zone di bassa quota o di collina.

Il legno è di un colore bianco, bianco-giallognolo nell'alburno e rossastro al centro, è un ottimo combustibile di elevato potere calorifico, a causa della presenza di sostanze oleose e resinose che ne accelerano la combustione (Camarda e Valsecchi, 2008).

#### *Usi e prodotti del lentisco*

Il lentisco è una specie conosciuta ed apprezzata da tutti i popoli fin dall'antichità.

In Oriente, soprattutto nell'isola di Chio, dal lentisco e dal terebinto, gli abitanti ottenevano una particolare resina (o mastice), utilizzata per la cura dei denti e delle gengive, e molto probabilmente il suo epiteto "lentiscus" derivi da "dentiscus", sotto il cui nome in alcune zone è conosciuto per il suo uso in dentiscalpia. Anche in Ogliastra i contadini ricavano il mastice dalle incisioni sui rami per dare ristoro alle parti doloranti del corpo (Fig. 4) (Camarda e Valsecchi, 2008).



Figura 3. Maestoso esemplare di lentisco.



Figura 4. Particolare della resina o mastice che si produce dalla corteccia del lentisco.

In tutto il Mediterraneo e in tutta la Sardegna, sin dal periodo nuragico, come sembrano attestare i reperti archeologici a Barumini, e sino a pochi decenni or sono, dall'ebollizione e spremitura delle drupe si otteneva un olio per le lampade, utilizzato anche nell'alimentazione umana (Fig. 5).

In alcune zone la raccolta dei frutti era regolamentata da ordinanze prefettizie, proprio per l'importanza che rivestiva soprattutto per i meno abbienti. Nel 1832, la ditta scozzese "Machintosh di Glasgow" ebbe la concessione dell'estrazione e purificazione dell'olio di lentisco della Gallura.

L'olio grezzo o crudo, ossia non purificato, di colore verdastro scuro, destinato soprattutto all'illuminazione, si otteneva con mezzi primitivi, per semplice spremitura. Una tecnica anch'essa primitiva abbinava la spremitura al trattamento con acqua bollente. Il liquido oleoso così ottenuto, raccolto in un recipiente, veniva lasciato decantare e infine con un mestolo o per colatura si prelevava l'olio che rimaneva a galla sul restante liquido acquoso. A scopo alimentare-condimentario l'olio grezzo così ottenuto veniva depurato mediante ribollitura.

L'olio di lentisco depurato è stato largamente utilizzato a scopo alimentare dalle popolazioni sarde probabilmente già dai protosardi del periodo nuragico, nel periodo medioevale, e comunque prima che si diffondesse la coltura dell'olivo, ma anche in seguito fino agli anni successivi alla seconda Guerra Mondiale, come surrogato o almeno integrativo dei grassi animali e dell'olio d'oliva, in particolare dalle famiglie povere, pastori, servitù, e in periodi di guerra e di carestia. Veniva utilizzato soprattutto per le frittiture, ma anche come condimento dei legumi ed altri cibi. Veniva impiegato anche per curare scottature, bruciate, ferite da taglio e screpolature da freddo (Atzei, 2003).

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato proprietà chemiopreventive, chemioterapiche e antiangiogeniche dell'olio di lentisco, con riduzioni massime fino al 56% di massa tumorale senza tossicità per i tessuti sani, stabilendo così una sua futura applicazione in terapie oncologiche (Magkouta *et al.*, 2009).

Le sanse residue dalla preparazione dell'olio e i frutti acerbi che rimanevano a galla in acqua venivano date in cibo agli animali.

Nella medicina popolare sarda venivano e vengono tuttora utilizzati, i vari organi della pianta. Nel territorio di Tempio tutte le parti della pianta vengono impiegate contro gengiviti e faringiti. La resina ottenuta dalla corteccia trovava impiego nell'applicazione su ferite, come emostatico, cicatrizzante e antisettico. Poteva essere essiccata e polverizzata e si impiegava contro i dolori intestinali (Atzei, 2003).





Figura 5. Particolare dei frutti e dell'olio di lentisco.

La pianta del lentisco inoltre é stata oggetto di uno studio da parte dell'Università degli Studi di Cagliari nel 2013. Lo studio era rivolto a valutare le ripercussioni ambientali che l'intensa attività estrattiva ha apportato al distretto minerario tra Iglesias e Gonnese (Sardegna sud-occidentale), con particolare riferimento al suolo e a possibili interventi di fitorisanamento.

Il progetto ha focalizzato l'indagine su vari aspetti legati all'inquinamento ambientale da parte di Zn, Pb, Hg in seguito alle attività minerarie. Sono stati analizzati i quantitativi di inquinanti in vari comparti abiotici, nei suoli e nelle soluzioni del suolo, e biotici, ovvero in *Pistacia lentiscus*, largamente diffusa in quelle zone.

Si é proceduto al campionamento di *Pistacia lentiscus*, su cui sono stati determinati, separatamente per radici, fusti e foglie, i contenuti di Zn, Pb e Hg. In generale, si é osservato che le concentrazioni dei metalli decrescono nell'ordine radici>fusti>foglie, con la parziale eccezione del Hg ove localmente si osserva un arricchimento nelle foglie, forse influenzato dall'assorbimento fogliare del Hg volatilizzato dai suoli.

Il contenuto dei metalli nei tessuti vegetali, essendo tuttavia nettamente inferiore a quello nel suolo, dimostra l'attitudine della specie *P. lentiscus* a vegetare in suoli contaminati da metalli pesanti, quindi particolarmente adatta ad interventi di rivegetazione finalizzati alla fitostabilizzazione dei suoli (Concas, 2013).

## **Le potenzialità di domesticazione**

### *La propagazione*

La specie *Pistacia lentiscus* si propaga in natura e nell'attività vivaistica quasi esclusivamente per seme. Sono molto frequenti fenomeni di aborto dell'embrione e partenocarpia durante lo sviluppo dei frutti. La germinazione dei semi vitali non é possibile senza l'allontanamento dell'epicarpo e del mesocarpo che, nel frutto maturo sono ricchi di olio e sostanze aromatiche (Scortichini, 1987).

I semi presentano una germinazione di tipo epigeo con cotiledoni interi. La plantula presenta le prime foglioline imparipennate, mentre le successive sono paripennate.

Mulas *et al.* (1999) nel 1995/96 hanno effettuato delle prove sperimentali per valutare la germinabilità dei semi della specie *Pistacia lentiscus*. Le prove di germinazione sono state svolte entro un mese dalla raccolta del campione, utilizzando 3 repliche di 50 semi per ogni ecotipo analizzato. I semi dopo essere stati ricoperti con pochi mm di terriccio, sono stati mantenuti in una camera climatizzata alla temperatura di 27 °C per 60 giorni, con fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 di oscurità.

I risultati di questo esperimento hanno mostrato germinabilità dopo 56 giorni nei diversi ecotipi da 0 al 56%, 15 ecotipi su 33 cioè il 45% non hanno mostrato nessuna germinazione dei semi, e solo 6 ecotipi hanno mostrato germinabilità maggiore del 30%.

Il tempo medio dei 18 ecotipi che hanno mostrato capacità di germinazione era compreso tra 7,3 e 32,7 giorni con media della popolazione di 20,4 giorni. Solo 5 ecotipi avevano tempo medio di germinazione al di sotto di 15 giorni e solo 4 ecotipi al di sopra di 25 giorni.

Nel caso di *Pistacia lentiscus*, l'endocarpo rappresenta una barriera in quanto ostacola l'assorbimento dell'acqua. Tuttavia il problema é risolvibile tramite la scarificazione meccanica o la vernalizzazione.

Il lentisco si propaga difficilmente per talea, dato che la radicazione avventizia risulta scarsa o assente. Sono state avviate prove di propagazione per talea al fine di valutare l'attitudine alla radicazione, l'influenza delle diverse epoche di prelievo delle talee e la risposta a trattamenti ormonali per promuovere la rizogenesi (Mulas *et al.*, 1999).

Sono state utilizzate 6 epoche di prelievo: 3<sup>a</sup> decade di luglio, settembre e novembre 2001; 3<sup>a</sup> decade di gennaio, marzo e maggio 2002, sono state utilizzate sia talee apicali che subapicali.

Le talee sono state sottoposte a trattamento rizogeno a base di acido-3-indolbutirrico (IBA) per immersione, in una soluzione alla concentrazione di 5000 p.p.m, per la durata di un'ora. Sono state poste a radicare, impiegando come substrato una miscela di terriccio e agriperlite, e sono state poste in una serra di propagazione su bancali riscaldati alla temperature di 25 °C e impianto di nebulizzazione automatico impostando l'U.R al 60%.

La specie ha mostrato scarsa attitudine alla radicazione, infatti, delle 6 epoche di prelievo sono stati ottenuti risultati solo per quella di gennaio con un valore medio della percentuale di radicazione dell'8%. La propagazione per talea risulta quindi particolarmente difficoltosa soprattutto per la bassissima percentuale di radicazione.

La micropropagazione potrebbe essere una tecnica utile per superare le difficoltà di propagazione agamica, ed ottenere del materiale omogeneo da piante madri che presentano particolari caratteristiche morfologiche e ornamentali.

Sono stati individuati, all'interno di una popolazione spontanea nella riserva naturale di Monte Catalfano (Bagheria, PA) 3 ecotipi, 2 di sesso maschile e 1 di sesso femminile, che possedevano determinate caratteristiche ornamentali (Fascella *et al.*, 2004). Dai rami più giovani sono state prelevate talee uni e binodali, e dopo essere state sterilizzate, sono state messe in un mezzo di coltura. Una volta accertata l'assoluta asepsi delle stesse, queste sono state trasferite in un substrato di moltiplicazione con citochinine.

Questo studio preliminare ha dimostrato che é possibile mettere a punto un protocollo di sterilizzazione che permette di ottenere più del 98% degli espianti aseptici e almeno 20% di germogli vitali (Fascella *et al.*, 2004). Il perfezionamento di questa tecnica potrà consentire l'ottenimento di materiale vegetale omogeneo da utilizzare sia per opere di rimboschimento che per lo sfruttamento vivaistico-ornamentale di questa interessante pianta della macchia mediterranea.

#### *La variabilità intraspecifica*

Secondo Fiori (1925) e Baroni (1969), nel territorio nazionale sono presenti 3 varietà di lentisco: *tipica*, con foglie formate da 8-10 foglioline ovato-oblunghe, larghe 7-15 mm con drupe subglobose, obliquamente apicolate; var. *gamma-latifolia*, con 4-8 foglioline oblunghe od obovate, lunghe 25-45 mm, subrotonde o smarginate all'apice e con drupe più grosse; var. *beta-massiliensis* diffusa nella Sicilia meridionale con foglioline strettamente lineari larghe 4-7 mm.

Secondo Zanghieri (1976) sono presenti invece una varietà *latifolia* e una *angustifolia* a foglie più corte e strette. Sono segnalate anche la varietà *marginata* e la varietà *Chia*, tipica

dell'isola di Chio. Da notare l'ibrido naturale *P. lentiscus* x *P. terebinthus* presente nella Liguria occidentale e in Sardegna.

Si é riscontrata inoltre una correlazione tra vigore delle piante e la germinabilità dei semi (Mulas *et al.*, 1997) che costituisce un fattore importante per l'individuazione di ecotipi più efficienti nella colonizzazione di nuovi siti ambientali.

## **OBIETTIVI DEL TIROCINIO**

In questi ultimi anni l'aumento del consumo e della domanda di prodotti naturali e biologici da parte della popolazione mondiale ha spinto le industrie farmaceutiche, cosmetiche ed alimentari a utilizzare per la propria produzione essenze estratte dalla flora spontanea. La specie *Pistacia lentiscus* è tra le più diffuse nel territorio sardo, e grazie alle sue innumerevoli proprietà, sia le foglie che le bacche possono essere utilizzate per l'estrazione di oli ricchi di antiossidanti di uso alimentare, cosmetico o medicinale.

L'obiettivo del tirocinio è stato quello di approfondire le conoscenze relative a questa specie, in particolare determinando la quantità di olio potenzialmente estraibile dalle bacche e le proprietà chimiche di questo, per valutarne la commestibilità o eventualmente gli ulteriori utilizzi. Durante il tirocinio è stato anche possibile approfondire le conoscenze sulle principali metodologie utilizzate in un laboratorio di analisi chimiche.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento ed analisi fisiche delle bacche*

Il tirocinio è stato svolto presso l'Azienda Sperimentale e Didattica "Antonio Milella" del Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell'Università di Sassari sita a Fenosu (OR) e nel laboratorio del Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell'Università di Sassari.

Il materiale vegetale necessario per condurre l'attività di ricerca è stato prelevato da piante di *Pistacia lentiscus* collezionate in un campo sperimentale dell'azienda, impiantato nel 1997. La ricerca ha interessato un singolo ecotipo (OSL2/10), originario del territorio di Osilo, scelto tra i tanti per la maggiore produttività in termini di bacche.

Le bacche di lentisco relative a questo ecotipo sono state campionate il 3 ottobre 2016, quando ancora erano immature, un secondo campionamento è stato effettuato nel mese di novembre a completa maturazione, mentre nel mese dicembre non è stato possibile effettuare un ulteriore campionamento in quanto il quantitativo di bacche era insufficiente per effettuare le analisi.

In laboratorio si è provveduto mediante una bilancia alla determinazione del peso fresco delle bacche, successivamente una parte di queste sono state poste in stufa a 60 °C per 24 ore per la determinazione del contenuto di sostanza secca, la restante parte è stata conservata a -18 °C sino al momento delle analisi chimiche.

### **Analisi chimiche delle bacche di lentisco**

#### *Determinazione del pH e dell'acidità delle bacche*

L'acidità totale delle bacche di lentisco si esprime in grammi di acido citrico presenti in 100 gr di prodotto. Si parte dal presupposto che in una reazione tra un acido debole e una base forte si raggiunge un equilibrio chimico nel momento in cui le funzioni carbossiliche dell'acido sono salificate dalle funzioni ossidriliche della base. Questo equilibrio si raggiunge quando la soluzione da analizzare ha raggiunto un valore di pH pari a 8,2, per cui con l'ausilio di un pHmetro possiamo stabilire il contenuto in acido citrico. Per tale determinazione si

prelevano 10 gr di bacche di lentisco si pongono in un becker e a questi si aggiungono 50 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, e attraverso il pHmetro si determina il pH. In seguito si titola con NaOH 0,1N sino ad arrivare a pH 8,2, annotando la quantità di soda utilizzata.

Per il calcolo dell'acidità totale (%) è stata applicata la seguente formula:

$$\text{Acidità totale} = (\text{ml NaOH} * \text{N} * 64 * 100) / (10 * 1000)$$

Dove:

ml NaOH: sono gli ml di soda utilizzati per portare il pH a 8,2;

N: è la normalità della soda (0,1);

64 è il peso molecolare dell'acido citrico;

10 sono i grammi di bacche utilizzate per la determinazione.

### *Preparazione degli estratti alcolici*

Parte delle bacche fresche campionate sono state utilizzate per l'ottenimento degli estratti metanolici. Per ciascun campionamento di bacche sono stati preparati 3 estratti metanolici. Ciascun estratto è stato preparato mettendo in infusione 10 gr di bacche macinate in 100 ml di metanolo acidificato con HCl. Il tutto è stato posto in barattoli ermetici di vetro e conservato al buio e a temperatura ambiente per un'ora. Successivamente gli estratti metanolici sono stati filtrati con carta da filtro e sono stati conservati in freezer a -18 °C. Tali estratti sono stati utilizzati per la determinazione del contenuto di polifenoli totali, di antociani e di tannini.

### *Analisi dei polifenoli totali*

I polifenoli totali sono stati determinati mediante il metodo colorimetrico Folin-Ciocalteu. Questo metodo sfrutta la reazione redox in ambiente basico tra composti fenolici e il reattivo di Folin-Ciocalteu. Da tale reazione si formano complessi blu di ossidi di W<sub>8</sub>O<sub>23</sub> e Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub> che presentano un massimo di assorbimento nel visibile a circa 750 nm.

Per l'analisi 0,5 ml di estratto diluito con un rapporto di 0.5:10 è stato posto in matracci da 50 ml, a questo sono stati aggiunti 35 ml di acqua deionizzata, 2,5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu's e, dopo 3 minuti, 5ml di Carbonato di Sodio al 20%. La soluzione è stata successivamente riscaldata a 70 °C per 20 minuti, lasciata quindi raffreddare e portata a un volume di 50 ml con acqua deionizzata. Infine i campioni sono stati filtrati per eliminare l'eventuale torbidità conferita dalla deposizione del Carbonato di Sodio. A questo punto è stata effettuata la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 750 nm usando come riferimento l'acqua deionizzata.



### *Analisi degli Antociani*

Dall'estratto alcolico ottenuto in precedenza e conservato in frigorifero, è stata prelevata una certa quantità necessaria per la diluizione. L'entità della diluizione dipendeva dalla concentrazione in antociani del campione. Gli estratti ottenuti dalle bacche del primo campionamento non sono stati diluiti, mentre l'estratto relativo alle bacche del secondo campionamento è stato diluito con un rapporto di 5:10. Una volta eseguita la diluizione per ogni replica di ciascun campione sono state utilizzate due provette in vetro, una con 1 ml del campione diluito, 1 ml di etanolo acidificato e 10 ml di acido cloridrico 1N, nell'altra provetta (il confronto) si poneva 1 ml del campione diluito, 1 ml di etanolo acidificato e 10 ml di soluzione tampone a pH 3,5. Quest'ultima soluzione è stata preparata utilizzando il fosfato bisodico 0,2M e l'acido citrico 0,1M.

Dopo circa 30 minuti è stata effettuata la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 525 nm usando come riferimento la provetta contenente la soluzione tampone.

### *Analisi dei Tannini*

Il metodo di analisi dei tannini è basato sul fatto che la vanillina, aldeide stabile a elevate concentrazioni di acido solforico e acido cloridrico, reagendo con l'anello di floroglucinolo della catechina, determina la formazione del complesso vanillina - catechina che a 500-520 nm produce una colorazione rossa.

Per la determinazione del contenuto di tannini negli estratti metanolici è stato necessario effettuare la diluizione con un rapporto di 1:25.

Per la preparazione del campione, 4 ml di estratto diluito è stato posto in provette da 10 ml, a questo sono stati addizionati 2 ml di alcool etilico e 4 ml di reattivo alla vanillina. Contemporaneamente, utilizzando lo stesso campione, è stato preparato il confronto, utilizzando 4 ml di estratto diluito, addizionando a questo 2 ml di alcool etilico e 4 ml di acido solforico al 70 %. La soluzione è stata successivamente posta al buio a temperatura ambiente per 20 minuti. A questo punto è stata effettuata la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 500 nm usando come riferimento il campione confronto.

### **Estrazione dell'olio di lentisco**

L'estrazione della frazione lipidica presente nelle bacche di lentisco è stata effettuata seguendo il metodo Folch e apportando alcune modifiche. Questo metodo di estrazione è particolarmente indicato per qualsiasi tipo di indagine sulla componente lipidica in quanto

permette l'estrazione dei lipidi totali finalizzata all'analisi qualitativa degli stessi e nel contempo può essere utilizzata per la determinazione quantitativa del grasso.

Per ciascun campionamento di bacche sono state eseguite 3 estrazioni. Ciascun estratto è stato preparato omogeneizzando per 1 minuto 20 g di bacche fresche assieme a 100 ml di reagente di Folch (2 parti di cloroformio, 1 parte di metanolo, 0,8 parti di acqua deionizzata). Successivamente la soluzione è stata posta in delle falcon e centrifugata a 6000 rpm. All'interno delle falcon si sono formate due fasi: il pellet (nella parte superiore) e la soluzione contenente la frazione lipidica (sul fondo della falcon). E' stato quindi possibile prelevare la soluzione mediante una micropipetta. Il pellet è stato recuperato, ri-omogeneizzato con altri 100 ml di reagente di Folch e ri-centrifugato per poter recuperare la restante soluzione contenente i lipidi. La precedente operazione è stata ripetuta per un totale di 3 volte.

Il metodo di Folch originale prevedeva per la separazione delle fasi l'utilizzo di filtri di carta, noi abbiamo preferito separare le due fasi mediante centrifugazione in quanto i filtri si intasavano e anche utilizzando la pompa del vuoto era impossibile separare le due fasi.

Una volta recuperata, la fase cloroformica contenente i lipidi è stata posta in un imbuto separatore, per facilitare l'ulteriore separazione delle fasi sono stati aggiunti 50 ml di acqua deionizzata contenenti 1 g di ammonio solfato, il tutto è stato agitato manualmente e lasciato riposare per una notte. Il giorno successivo la frazione cloroformica (accumulata sul fondo dell'imbuto) è stata posta in un pallone di vetro, precedentemente posto in stufa per eliminarne l'umidità e successivamente pesato mediante una bilancia analitica. Mediante l'utilizzo di un rotavapor è stato possibile portare a secco la soluzione, ottenendo così l'olio di lentisco. Effettuando una doppia pesata del pallone è stato possibile determinarne la quantità e la resa percentuale sul peso fresco. L'olio ottenuto è stato conservato in freezer, addizionato di un antiossidante (BDT) e utilizzato per le successive analisi chimiche.

#### *Acidità libera dell'olio di lentisco*

Il grado di acidità è un parametro a specifico che misura gli acidi grassi liberi negli oli e che viene espressa convenzionalmente in % di acido oleico. Il grado di acidità non è, per ovvie ragioni, caratteristico dei singoli oli, essendo la sua variabilità piuttosto legata alla provenienza del grasso ad al suo stato di conservazione. Ma la sua importanza è però fondamentale, perché in relazione ad esso stabilita l'attitudine dei grassi alla commestibilità nonché la classificazione commerciale.

La determinazione del grado di acidità è basata sulla titolazione della soluzione del grasso attraverso una soluzione acquosa di NaOH (titolazione acido debole-base forte). Trattandosi di titolazione di acido debole come indicatore è stato utilizzato la fenoftaleina.

Per la determinazione, una certa aliquota di olio, è stata addizionata di una miscela di etere etilico e alcool etilico, miscela 1:2 in volume. Subito dopo, è stata effettuata una titolazione con NaOH (0.1 N) fino a viraggio dell'indicatore (colorazione rosa della fenoftaleina).

Per il calcolo dell'acidità dell'olio (% di acido oleico) è stata applicata la seguente formula:

$$\text{Acidità \%} = (\text{ml NaOH} * \text{N} * 282 * 100) / (\text{m} * 1000)$$

Dove:

ml NaOH: sono gli ml di soda utilizzati per portare la soluzione a viraggio di colore;

N: è la normalità della soda (0,1);

282: è il peso molecolare dell'acido oleico;

m: sono i grammi di olio utilizzati per la determinazione.

#### *Analisi spettrofotometrica dell'olio di lentisco*

L'esame di un olio con la spettrofotometria ultravioletta consente di ottenere indicazioni sulla sua qualità, sul suo stato di conservazione e sulle modificazioni indotte da processi tecnologici. Inoltre la spettroscopia ultravioletta, utilizzata per l'olio di oliva, offre un efficace mezzo diagnostico per svelare sofisticazioni. In quest'analisi si misurano gli assorbimenti alle lunghezze d'onda tipiche dei sistemi dienici e trienici coniugati. Mentre, il doppio legame isolato ed i sistemi di doppi legami non coniugati non presentano bande caratteristiche nella zona spettrale compresa tra 210 e 300 nm, i doppi legami coniugati hanno un assorbimento a 232 nm, ed i trieni coniugati hanno una banda a 270 nm. Noi abbiamo voluto valutare che tipo di assorbimenti avesse l'olio di lentisco alle medesime lunghezze d'onda prese in esame per l'olio di oliva.

Per la determinazione, in un matraccio da 25 ml sono stati pesati 0,25 g di olio, portati a volume con isoottano. Successivamente lo spettrofotometro UV è stato azzerato con il solvente puro e sono state impostate le diverse lunghezze d'onda prese in esame (232, 262, 268, 274 nm).

La soluzione dell'olio in isottano è stata posta all'interno di una cuvetta in quarzo di 1 cm di spessore e sono state misurate le diverse estinzioni usando come riferimento l'isottano.

I valori di estinzione specifica alle varie lunghezze d'onda sono stati determinati con la seguente formula:

$$K(\lambda) = A(\lambda) / (C * b)$$

Dove:

( $\lambda$ ): estinzione specifica alla lunghezza d'onda  $\lambda$ ;

A ( $\lambda$ ): assorbanza misurata alla lunghezza d'onda  $\lambda$  nm;

C: concentrazione della soluzione espressa in g / 100 ml;

b : spessore della cuvetta in cm (1);

Un altro parametro preso in considerazione soprattutto per gli oli di oliva è il  $\Delta K$  inteso come:

$$\Delta K = K_{268} - ((K_{262} + K_{274})/2)$$

#### *Analisi dei dati*

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il software MSTAT-C. La separazione delle medie è stata ottenuta tramite applicazione del Multiple Range Test di Duncan. Le differenze sono riportate per  $p < 0,01$ .

## RISULTATI

Dalle analisi fisiche delle bacche è risultato un contenuto in sostanza secca maggiore per le bacche relative al secondo campionamento. Infatti la percentuale di sostanza secca variava da un minimo di 38,7% (primo campionamento) a un massimo di 45% (secondo campionamento) (Fig. 6).

Le analisi chimiche effettuate sulle bacche evidenziavano una netta diminuzione dell'acidità totale (% acido citrico) con la maturazione dovuta alla degradazione dell'acido citrico durante tale processo. Infatti nelle bacche del 1° campionamento è stata riscontrata una acidità totale media del 10,79%, mentre nelle bacche del 2° campionamento la media dell'acidità era del 5,88% (Fig. 7).

Anche per quanto riguarda il contenuto di polifenoli totali delle bacche, è stata osservata una diminuzione durante la maturazione, seppur in misura meno marcata rispetto all'acidità delle bacche. Negli estratti alcolici relativi alle bacche del 1° campionamento si aveva una quantità di polifenoli di 27861,43 mg/kg, mentre negli estratti del 2° campionamento il contenuto era di 22903,88 mg/kg (Fig. 8).

Per quanto riguarda il contenuto in antociani è stato osservato un notevole aumento della loro quantità durante la maturazione delle bacche. Negli estratti del 1° campionamento la quantità di antociani è risultata molto bassa (287,36 mg/kg), infatti le bacche visivamente si presentavano di colore chiaro, mentre gli estratti del 2° campionamento presentavano una quantità di antociani notevolmente superiore (1942,5 mg/kg) e la colorazione delle bacche era molto più intensa (Fig. 9).

Il contenuto di tannini invece diminuiva nel corso della maturazione. Infatti negli estratti del 1° campionamento il contenuto era di 4572,86 mg/kg, per arrivare ai 3207,41 mg/kg negli estratti relativi alle bacche del 2° campionamento (Fig. 10).

La resa in olio é risultata nettamente più alta per le bacche del 2° campionamento. Le bacche del 1° campionamento sono state raccolte ancora immature, la loro resa in olio infatti era dell'8%, mentre per le bacche del 2° campionamento la resa era del 20% (Fig. 11).

L'acidità libera dell'olio tendeva a diminuire durante la maturazione. Nell'olio estratto dalle bacche del 1° campionamento il valore dell'acidità era del 9,62%, mentre l'olio estratto

dalle bacche del 2° campionamento risultava avere un'acidità inferiore, ovvero del 4,92% (Fig. 12).

Dall'analisi spettrofotometrica, l'estinzione specifica alla lunghezza d'onda di 232 nm, è risultata di 3,9 per quanto riguarda la soluzione all'1% di olio in isoottano del 1° campionamento, e di 3,82 per la soluzione del 2° campionamento. Come si può notare dalla figura non esistevano differenze marcate tra i due campionamenti (Fig. 13).

Alla lunghezza d'onda di 262 nm, le letture spettrofotometriche i valori di assorbanza variavano da 4,15 per la soluzione relativa al 1° campionamento, e di 3,68 per il secondo campionamento (Fig. 14).

Le letture alla lunghezza d'onda di 268 nm, hanno mostrato differenze ancora maggiori tra le 2 soluzioni, con valore di assorbanza di 4,2 relativo al 1° campionamento, e valore di 3,3 del 2° campionamento (valore più basso tra le letture) (Fig. 15).

Anche la lettura alla lunghezza d'onda di 274 nm ha evidenziato differenze, seppur in misura minore rispetto alla precedente lettura. Il valore di lettura relativo al 1° campionamento è di 4,45 (valore più alto tra le letture) (Fig. 16).

Dai dati delle estinzioni specifiche ottenuti dalle 4 diverse lunghezze d'onda, è stato possibile calcolare il  $\Delta K$  dell'olio di lentisco, per i 2 diversi campionamenti. Il valore calcolato per l'olio del 1° campionamento era di -0,09, mentre per l'olio del 2° campionamento è risultato di -0,44. Come è possibile notare, il valore dei  $\Delta K$  è risultato negativo in entrambi i casi (Fig. 17).

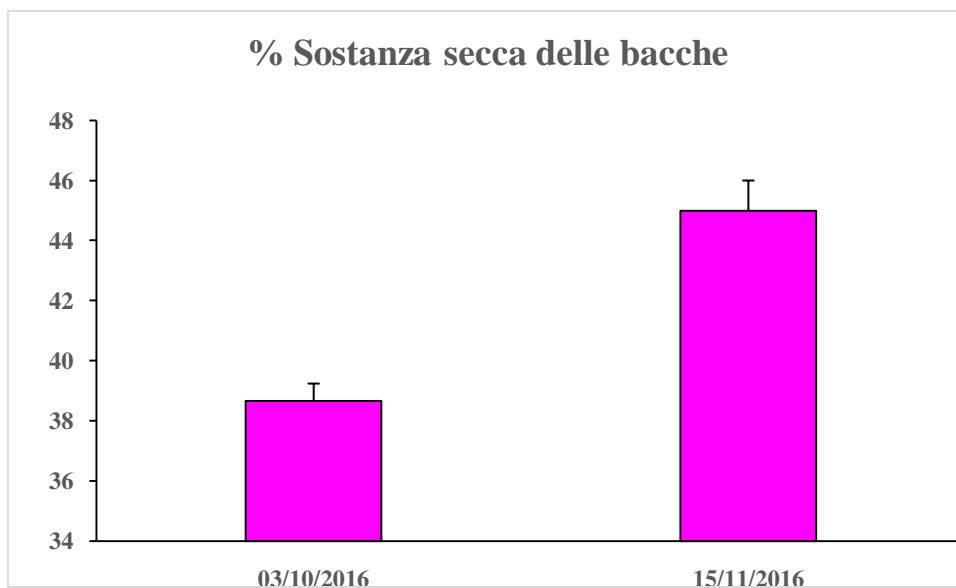


Figura 6. Contenuto di sostanza secca (%) nelle bacche di *Pistacia lentiscus*.

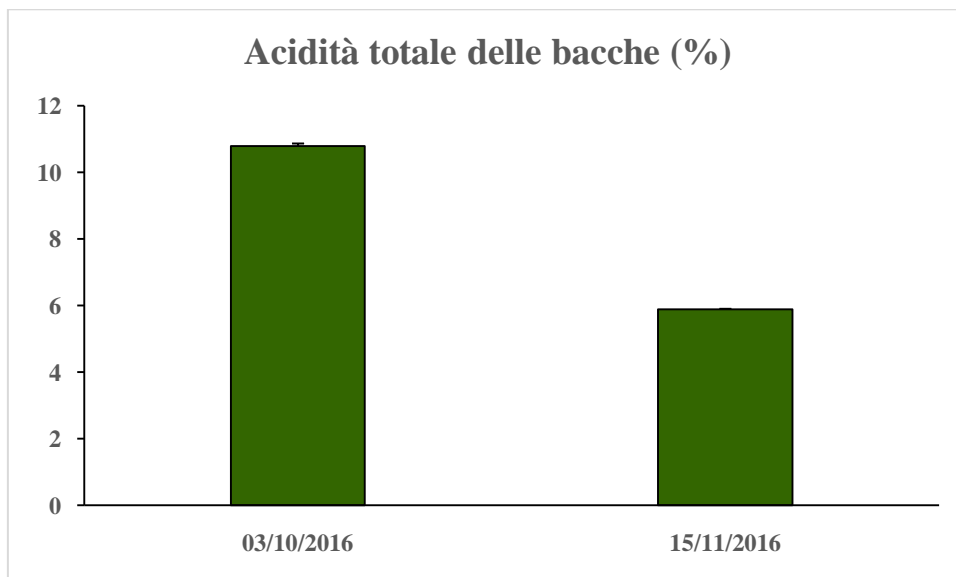


Figura 7. Acidità libera totale delle bacche (%).

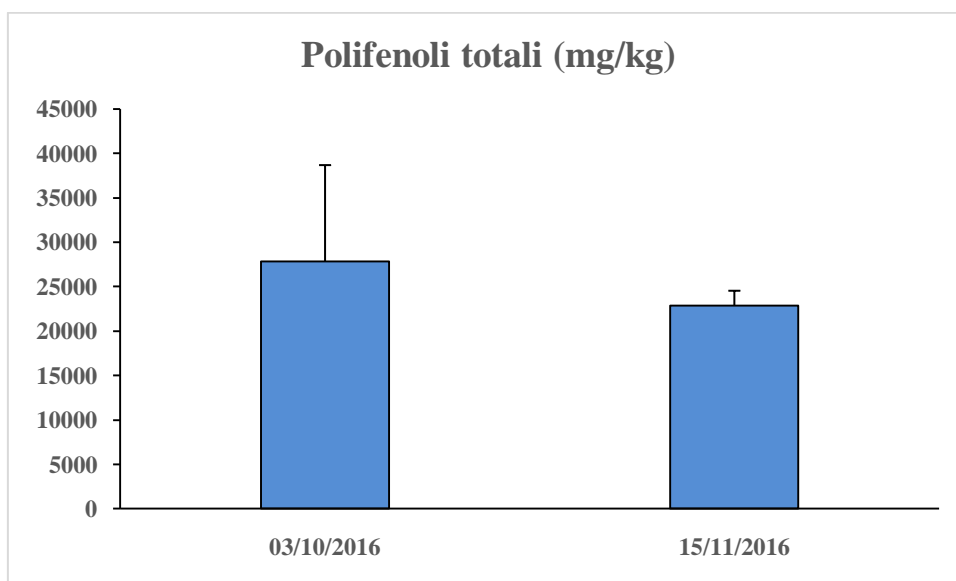


Figura 8. Contenuto di polifenoli totali (mg/kg peso fresco) nelle bacche di lentisco.

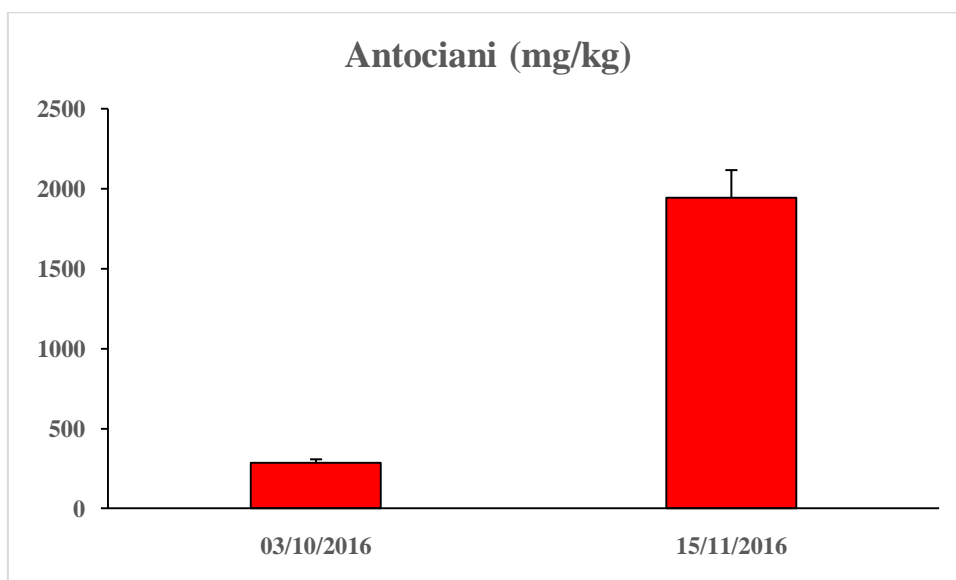


Figura 9. Contenuto di antociani (mg/kg peso fresco) nelle bacche di lentisco.



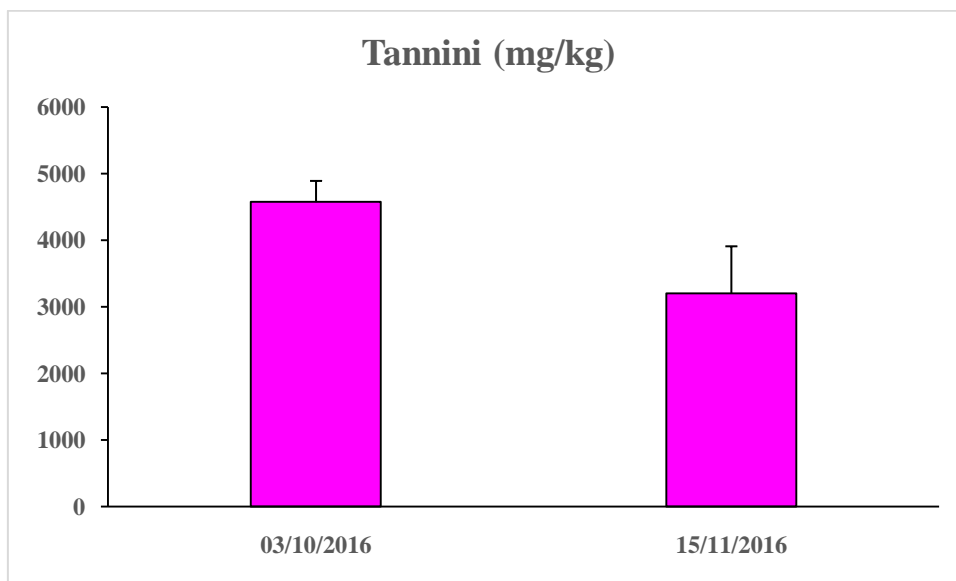


Figura 10. Contenuto di tannini (mg/kg peso fresco) nelle bacche di lentisco.

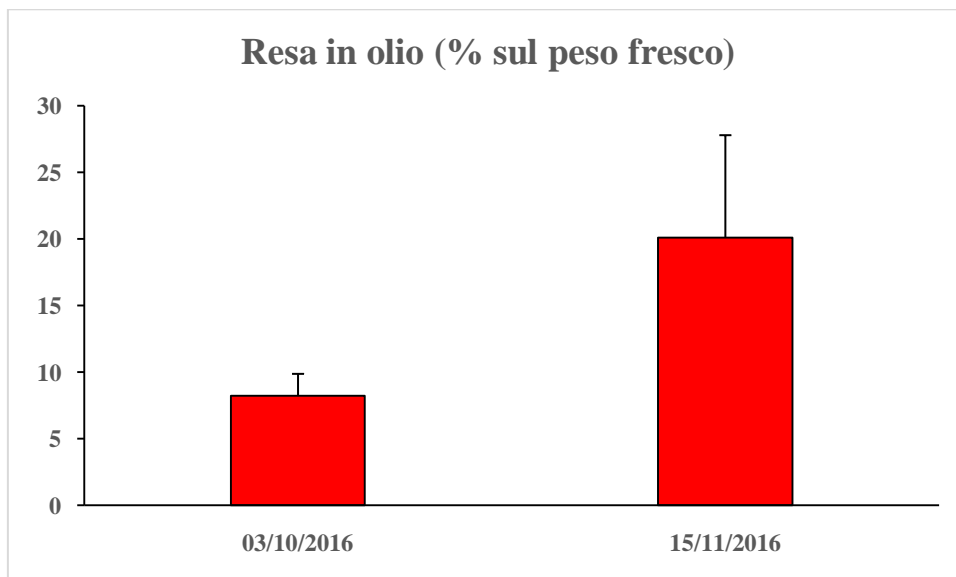


Figura 11. Resa in olio (%) delle bacche di *Pistacia lentiscus*.

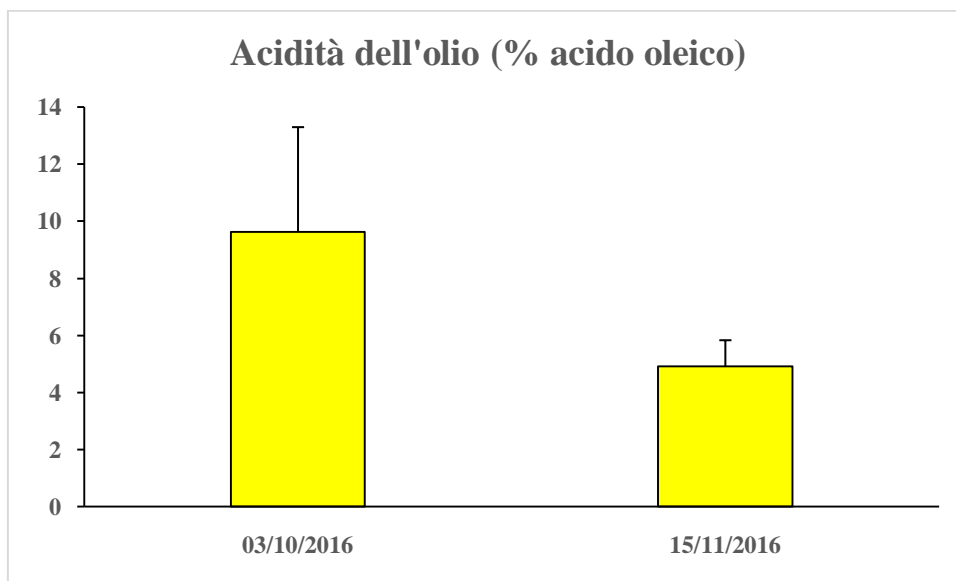


Figura 12. Acidità dell'olio di lentisco (% acido oleico).

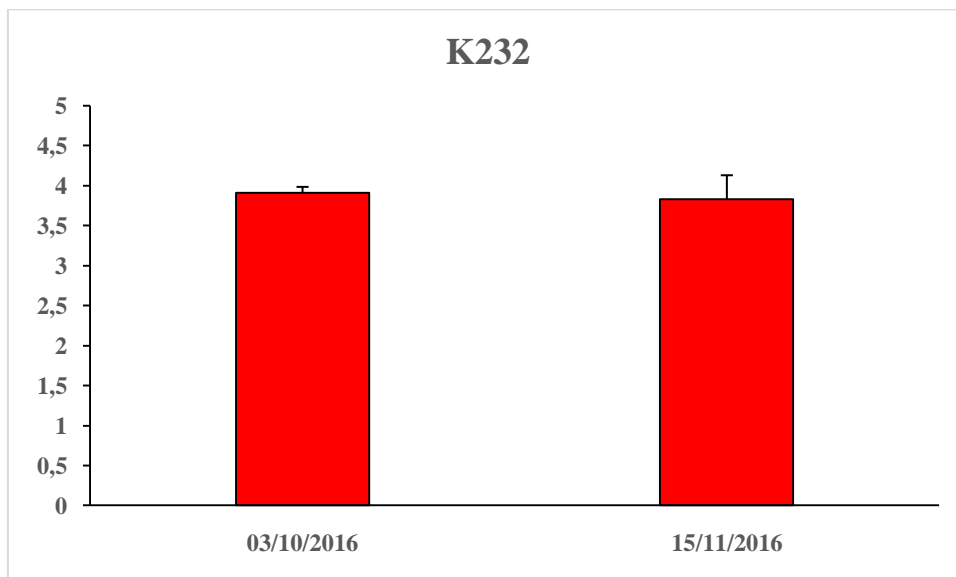


Figura 13. Estinzione specifica K alla lunghezza d'onda  $\lambda$  232.

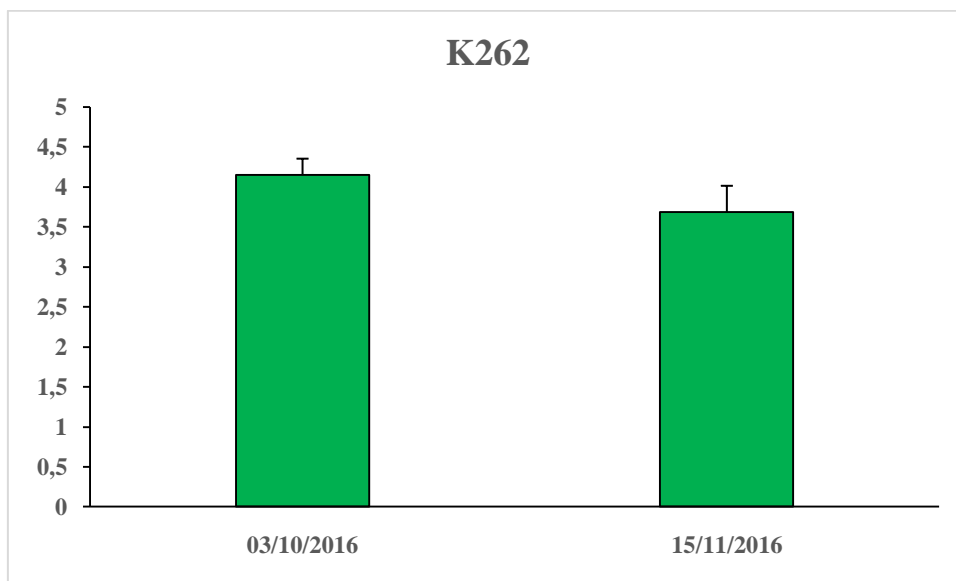


Figura 14. Estinzione specifica K alla lunghezza d'onda  $\lambda$  262.



Figura 15. Estinzione specifica K alla lunghezza d'onda  $\lambda$  268.

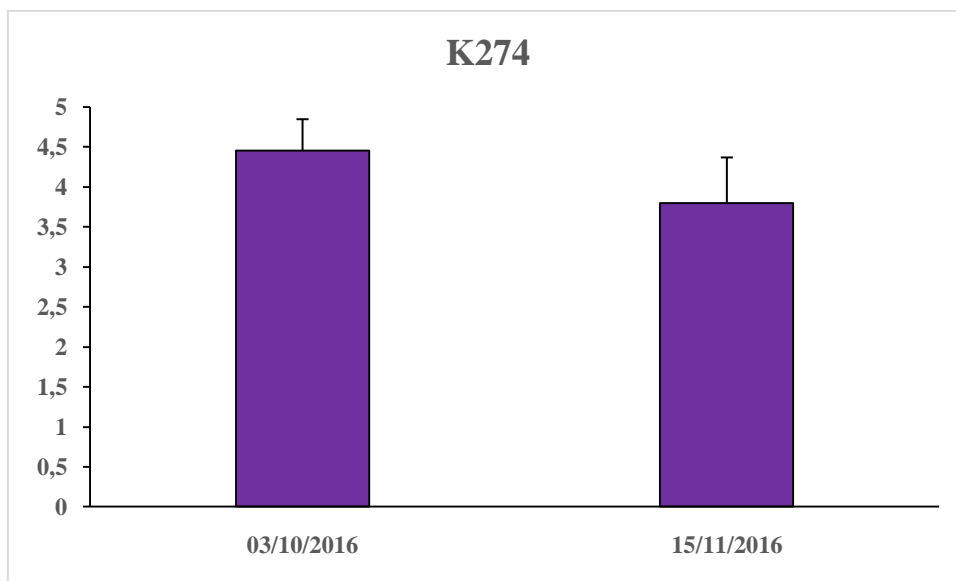


Figura 16. Estinzione specifica K alla lunghezza d'onda  $\lambda$  274.

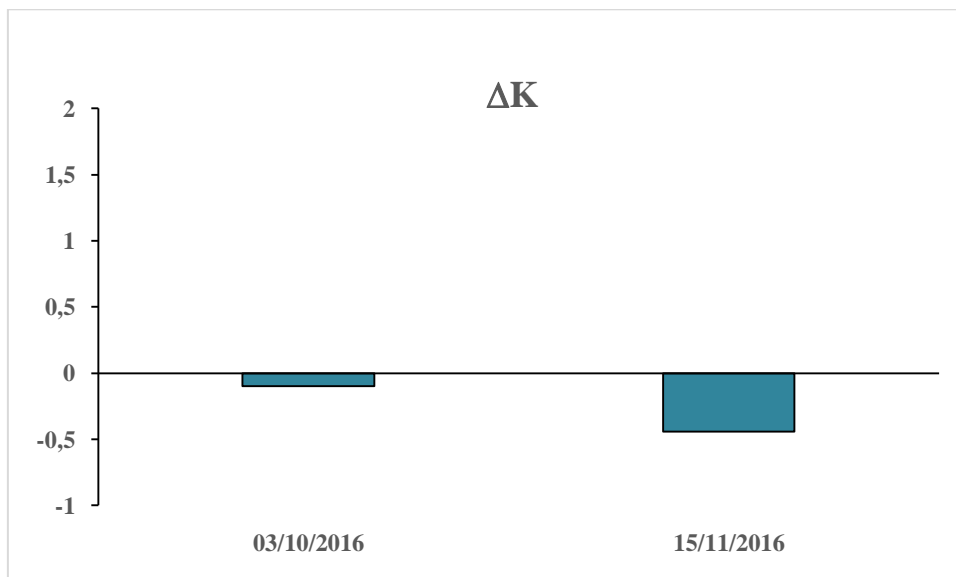


Figura 17.  $\Delta K$  dell'olio di lentisco.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il lavoro svolto ha consentito di approfondire le conoscenze sul lentisco, in particolare sui quantitativi di sostanze interessanti dal punto di vista cosmetico e farmaceutico, in due differenti stadi di maturazione delle bacche.

Come hanno evidenziato le analisi di laboratorio, nelle bacche di lentisco sono presenti alti quantitativi di polifenoli totali, antociani e tannini, seppur con variazioni rispetto al grado di maturazione delle bacche, e sarebbe opportuno sottolineare la rilevanza del potenziale chimico utilizzabile sia nella cosmesi, che in campo medico e alimentare.

Esistono diverse metodologie per l'estrazione dell'olio di lentisco. A seconda di quella utilizzata si possono avere differenze nella quantità dell'olio ottenuta e nella composizione chimica di questo.

I risultati hanno mostrato che estraendo l'olio dalle bacche di lentisco a freddo mediante l'utilizzo del solvente esano si otteneva una discreta resa in olio. Alcuni studi hanno confrontato l'estrazione dell'olio a freddo mediante solvente esano con l'estrazione per pressione a freddo e hanno valutato le differenze nella resa in olio e nella composizione chimica di questo. Boukeloua *et al.* (2016) hanno evidenziato come l'estrazione a freddo con solvente esano porti a rese in olio più elevate (25 %) rispetto all'estrazione in pressione a freddo (20%).

La nostra ricerca, utilizzando come solvente l'esano ha fatto registrare valori di resa in olio leggermente più bassi (20%), ma comunque variabili a seconda dell'epoca di maturazione delle bacche. Infatti studi precedenti riportano rese in olio maggiori per le bacche nere (32,8%) rispetto a quelle rosse (11,7%) (Charef *et al.*, 2008). Percentuali simili sono state riportate da Dhifi *et al.* (2013) che, per quanto riguarda le bacche nere, hanno trovato rese in olio leggermente superiori (35,3%).

Riguardo le analisi condotte sull'olio, in accordo con altri studi, l'olio estratto dalle bacche nere, quindi più mature, è risultato meno acido di quello estratto dalle bacche immature (Charef *et al.*, 2008). Da questi risultati si può evincere che l'acidità, seppur inferiore nell'estrazione del secondo campionamento, risulta ugualmente troppo elevata per

un diretto utilizzo alimentare, pertanto sarebbe necessario incrementare il lavoro di ricerca per renderla ulteriormente inferiore.

Gli acidi grassi dominanti nell'olio di lentisco secondo molti studi risultano essere 3 (Charef *et al.*, 2008; Mezni *et al.*, 2012): l'acido oleico, palmitico e linoleico seguiti dall'acido palmitoleico e stearico con percentuali simili utilizzando diversi tipi di estrazione.

Dai nostri risultati emerge l'elevato contenuto in polifenoli nelle bacche di lentisco, questi svolgono un ruolo fondamentale conferendo agli oli proprietà antiossidanti. Tra i tanti composti fenolici presenti ritroviamo l'acido gallico, l'acido digallico e l'acido 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose importantissimi grazie alle loro comprovate proprietà antimutagene (Bhourri *et al.*, 2010)

L'esame dell'olio con la spettrofotometria ultravioletta, che nel caso dell'olio di oliva consente di ottenere indicazioni sulla sua qualità, sul suo stato di conservazione e sulle modificazioni indotte da processi tecnologici o da eventuali sofisticazioni, nel caso dell'olio di lentisco è solamente confermato l'enorme diversità esistente tra i due oli. Infatti le letture alle diverse lunghezze d'onda (232 nm, 262 nm, 268 nm, 274 nm), utilizzate come riferimento per l'olio di oliva, hanno fatto registrare per l'olio di lentisco valori largamente superiori, non confrontabili con quelli relativi all'olio di oliva, confermando l'elevata specificità del prodotto.

In futuro sarebbe interessante approfondire gli studi sull'olio di lentisco, valutandone il profilo degli acidi grassi e le eventuali variazioni nella composizione in base all'epoca di maturazione delle bacche. Sarebbe interessante anche valutare la composizione minerale dell'olio, per capire l'eventuale apporto minerale che l'olio potrebbe garantire in seguito all'introduzione nella dieta. Inoltre le analisi effettuate durante il tirocinio hanno riguardato bacche provenienti da un solo clone, quindi sarebbe auspicabile effettuare analisi sulle produzioni relative a cloni ottenuti da piante spontanee originarie da diverse parti della Sardegna per valutare eventuali correlazioni tra l'ambiente di origine e la composizione chimica degli oli.

## BIBLIOGRAFIA

- ATZEI D., (2003). Le piante nella tradizione popolare della Sardegna. Carlo Delfino Editore, Sassari: 596.
- BARONI E., (1969). Guida alla botanica d'Italia.
- BHOURI W., DERBEL S., SKANDRANI I. et al., (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*, vol. 24 (2): 509-515.
- BOUKELOUA A., BELKHIRI A., YILMAZ M.A., TEMEL H., SABATINI S., (2016). Chemical profiling and total thickness-excised wound-healing activity of *Pistacia lentiscus* L. fruits growing in Algeria. *Cogent Biology* Vol. 2 , Iss. 1.
- CAMARDA I., VALSECCHI F., (2008). Alberi e arbusti spontanei della Sardegna. Carlo Delfino Editore, Sassari: 480.
- CHAREF M., YOUSFI M., SAIDI M., STOCKER P., (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (quercus), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 921–924.
- CONCAS S., (2013). Studio delle forme chimiche e mineralogiche e della mobilità/biodisponibilità di metalli pesanti in suoli, piante (*Pistacia lentiscus*) e soluzioni del suolo del Bacino del Rio San Giorgio (Iglesias-Gonnesa, Sardegna sud-occidentale, Italia) finalizzato allo sviluppo di strategie di *soil remediation*. Tesi di Dottorato. Università di Cagliari.
- DHIFI W., JELALI N., CHAABANI E., BEJI M., FATNASSI S., OMRI S., MNIF W., (2013). Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. *African Journal of Agricultural Research*, 8 (16): 1395-1400.
- FASCELLA G., AIRO' M., ZIZZO G., RUFFONI B., (2004). Prime osservazioni sulla coltivazione *in vitro* di lentisco (*Pistacia lentiscus* L.) *Italus Hortus*, 11(4): 141-143.
- FIORI A., (1925). Nuova Flora analitica d'Italia.
- MAGKOUTA S., STATHOPOULOS G.T., PSALLIDAS I., PAPAPETROPOULOS A., KOLISIS F.N., ROUSSOS C., LOUTRARI H., (2009). Protective effects of mastic

oil from *Pistacia lentiscus* variation chia against experimental growth of lewis lung carcinoma. *Nutritional Cancer*, 61(5): 640-648.

MEZNI F., MAAROUFI A., MSALLEM M., BOUSSAID M., LARBI KHOUJA M., KHALDI A. (2012). Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities of *Pistacia lentiscus* L. fruit oils. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6, 5266–5271.

MULAS M., ABELTINO P., BRIGAGLIA N., (1997). Studio della variabilità fenotipica di popolazioni spontanee di lentisco (*Pistacia lentiscus*).

MULAS M., ALBERTINO P., BRIGAGLIA N., (1999). Il lentisco (*Pistacia lentiscus* L.) nell'ambiente mediterraneo: biodiversità e potenziale ecologico. *Monti e Boschi* n. 21999 pp. 5-9.

SCORTICHINI M., 1987. Il lentisco. *Rivista di frutticoltura* (1): 35-40.

ZANGHIERI P., (1976). *Flora italica* vol I e II.