



UNIONE EUROPEA
Fondo europeo di sviluppo regionale



STATO ITALIANO



Région Autonome Vallée d'Aoste
Regione Autonoma Valle d'Aosta



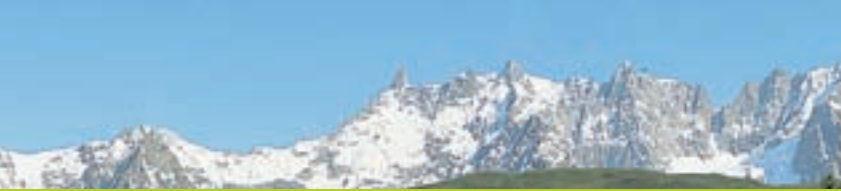
CONFEDERATION SUISSE
Soutenu par des contributions
financières de la Confédération suisse



Canton du Valais

Sauvegarde des ressources végétales de l'arc alpin

Programme
d'initiative
communautaire
Interreg III A
Italie-Suisse
Projet n° 6 A



Sauvegarde des ressources végétales de l'arc alpin



Editorial

Par principe, la culture des plantes officinales est intéressante pour les régions alpines comme la Vallée d'Aoste ou le Valais car elle permet de diversifier la production montagnarde en valorisant les terrains de montagne caractérisés par des dimensions modestes et situés à des altitudes élevées.

Les essais réalisés et les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont permis de définir les caractéristiques des terrains et les meilleures techniques culturales pour la production de variétés de genépi adéquates pour notre marché mais également des sélections de variétés de thym autochtones et de valoriser d'autres espèces bien qu'endémiques mais encore présentes de manière naturelle sur le territoire alpin (par exemple la sauge sclérée et la sauge d'Ethiopie). En outre, ces nouvelles techniques culturales devraient contribuer à la sauvegarde de la biodiversité de l'espèce végétale et à la réalisation d'une agriculture diversifiée donc plus facilement éco-compatible. D'autre part, des tests d'infusion et de dégustation pour l'obtention des liqueurs de genépi ont permis de constater que le genépi contient une quantité, même minime, de thuyone qui satisfait pleinement les exigences des liquoristes et des consommateurs qui apprécient tout particulièrement la saveur douceâtre que ce composé confère au produit fini.

L'expérience et la recherche plus avancée conduite par nos partenaires suisses ont été à nouveau une excellente motivation et un exemple pour notre région. De plus, les essais menés sur notre territoire ont enrichi les données déjà en possession de nos collègues. Les échanges constants effectués durant le projet ont été très profitables et ont permis de mettre sur pied un secteur de production valable avec des bases communes comme il est coutume de faire pour les régions limitrophes avec des caractéristiques géographiques similaires.

Dans la Vallée d'Aoste, nous avons constaté un réveil de l'intérêt pour les plantes officinales au point qu'une association de producteurs très motivés a vu le jour.

Editoriale

La coltivazione delle piante officinali è particolarmente interessante per le regioni alpine quali la Valle d'Aosta e il Vallese, in quanto consente di diversificare i prodotti di montagna valorizzando i terreni montani caratterizzati da dimensioni modeste e situati ad alta quota.

Grazie ai test e ai risultati ottenuti nell'ambito del progetto, è stato possibile definire le caratteristiche dei terreni e le migliori tecniche colturali per produrre varietà di genepi adatte al nostro mercato, ma anche per selezionare varietà autoctone di timo e valorizzare altre specie endemiche ancora presenti in modo naturale sul territorio alpino (es.: Salvia moscatella e Salvia aethiopis). Inoltre, le nuove tecniche culturali dovrebbero contribuire alla tutela della biodiversità delle specie vegetali nonché alla realizzazione di un'agricoltura diversificata, quindi più facilmente ecocompatibile. I test d'infusione e degustazione per ottenere liquori a base di genepi hanno evidenziato che il genépi contenente una quantità anche minima di tuione è in grado di soddisfare pienamente le esigenze di liquoristi e consumatori che apprezzano in modo particolare il sapore dolciastro che tale composto conferisce al prodotto finito.

L'esperienza e la ricerca più avanzata condotta dai nostri *partner* svizzeri hanno rappresentato ancora una volta un'eccellente motivazione ed un esempio per la nostra regione. Inoltre, i test eseguiti sul nostro territorio hanno arricchito i dati già in possesso dei nostri colleghi. Gli scambi costanti effettuati nel corso del progetto si sono rivelati molto efficaci ed hanno consentito di dare vita ad un valido settore di produzione con basi comuni, com'è abitudine fare tra le regioni limitrofe con caratteristiche geografiche simili.

In Valle d'Aosta, si è constatato un tale rinnovato interesse per le piante officinali al punto da dar vita ad un'associazione di produttori molto motivati.

Giuseppe Isabellon
Assesseur à l'agriculture
et aux ressources naturelles





Introduction

Le présent projet s'inscrit dans une volonté stratégique de sauvegarder et de valoriser les plantes alpines et officinales. Il s'agit d'en exploiter tout le potentiel tant thérapeutique que nutritionnel. Cette valorisation des plantes et des régions de montagne ne peut se développer et s'optimiser que lorsque les conditions de leur exploitation seront connues et maîtrisées, à savoir :

- ▶ la reconnaissance des vertus et bienfaits des plantes alpines et officinales,
- ▶ la maîtrise de la domestication des plantes potentiellement intéressantes,
- ▶ la maîtrise des coûts d'exploitation des cultures (performance des plants et du paillage),
- ▶ la valorisation et la diffusion des herbes via la recherche de nouveaux débouchés ou de nouvelles applications commerciales.

La première étape du travail a consisté à définir une liste de nouvelles plantes potentiellement intéressantes tant sur le plan commercial que celui phytosanitaire. Une étude approfondie de pharmacognosie (analyse bibliographique) a été entreprise. Sur cette base, une rencontre entre partenaires industriels (analyse de marché) a été organisée et quelques plantes alpines dont le potentiel de valorisation semble important ont été mises en évidence et sélectionnées, à savoir:

- | |
|------------------------------|
| ▶ le genépi |
| ▶ la sauge sclérée |
| ▶ le thym vulgaire |
| ▶ la sarriette des montagnes |
| ▶ l'impératoire |
| ▶ la sauge d'Ethiopie |
| ▶ le genévrier |
| ▶ la gentiane |
| ▶ le cumin |
| ▶ autres variétés |

Le présent compte rendu n'est pas exhaustif de tous les travaux entrepris dans le cadre de ce projet et ne rapporte que les travaux les plus aboutis et dont les résultats ont pu être exploités.

Introduzione

Il progetto s'inserisce nella strategia di favorire nell'arco alpino la protezione e la valorizzazione delle piante officinali alpine. Si tratta di sfruttare tutto il potenziale sia terapeutico sia nutrizionale per favorire il benessere umano. La valorizzazione delle piante e delle regioni montane potranno svilupparsi e migliorare solo quando saranno conosciute le caratteristiche della loro coltivazione:

- ▶ Il riconoscimento delle virtù e dei benefici delle piante alpine officinali,
- ▶ La conoscenza e capacità d'addomesticamento delle piante potenzialmente interessanti,
- ▶ La conoscenza dei costi di produzione delle colture (risultati delle prove dell'adattamento e della pacciamatura),
- ▶ la valorizzazione e la diffusione delle piante attraverso la ricerca di nuovi sbocchi o nuove applicazioni commerciali.

La prima tappa del lavoro è stata la definizione di una lista di nuove piante potenzialmente interessanti sia sul piano commerciale sia sul piano fitosanitario. Si è proceduto ad uno studio approfondito di farmacognosia (analisi bibliografica). Su questa base, è stato organizzato un incontro tra *partner* industriali (analisi di mercato) e sono state selezionate e poste in evidenza alcune piante alpine con un importante potenziale di valorizzazione, ovvero:

- | |
|--------------------------|
| ▶ il genépi |
| ▶ la salvia moscatella |
| ▶ il timo |
| ▶ la santoreggia montana |
| ▶ l'imperatoria |
| ▶ la salvia aethiopis |
| ▶ il ginepro |
| ▶ la genziana |
| ▶ il cumino |
| ▶ altre varietà |

La presente relazione non ha la pretesa di essere esaustiva di tutti i lavori intrapresi nell'ambito del progetto e riporta soltanto i lavori di maggiore successo e di cui è stato possibile utilizzare i risultati.

Genépi blanc

Genepi bianco

Artemisia umbelliformis Lam.

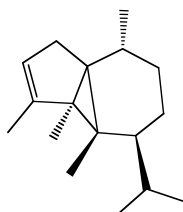
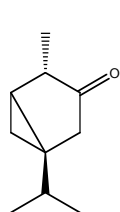


Pharmacognosie

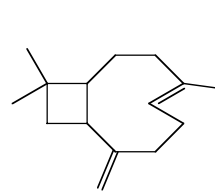
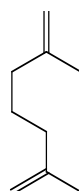
Le marché du genépi est presque exclusivement la li-
quoristerie. Localement, la tisane est connue pour ses
propriétés digestive et tonique et son action contre les
refroidissements. La plante renferme de l'huile essen-
tielle à grande variabilité chémotypique : thuyone (jus-
qu'à 76 %), 1,8 cinéol (0-36 %), β -pinène (0-47 %),
bornéol (0-58 %), α -myrcène (0-30 %), *trans*-caryo-
phyllène, etc. ; des principes amers, composés lipophi-
les, des lactones sesquiterpéniques (costunolide > 80
%) et des flavonoïdes. (Rey *et al.*, 1997)

Farmacognosia

Il mercato del genepi è quasi esclusivamente rappre-
sentato dalle liquorerie. Localmente, la tisana è nota
per le sue proprietà digestive e toniche e la sua azio-
ne contro i raffreddori. La pianta contiene olio essen-
ziale a grande variabilità chemiotipica: tuione (76%
max), 1,8 cineolo (0-36%), β -pinene (0-47%), bor-
neolo (0-58%), α -mircene (0-30%), *trans*-cario-
fillene, ecc.; principi amari, composti lipofili, latto-
ni sesquiterpenici (costunolidi > 80%) e flavonoidi.
(Rey *et al.*, 1997)



α -thuyone, costunolide, myrcène, caryophyllène



α -tuione, costunolidi, mircene, cariofillene

Objectif

La première phase de cet axe consiste à poursuivre les
essais entrepris sur le genépi les années précédentes. Il
s'agissait donc de répéter ces expériences mais en frac-
tionnant l'apport d'azote sur plusieurs périodes de l'an-
née afin de déterminer le moment propice de la fumu-
re. A cet effet, une parcelle de genépi a été mise en
culture à 1300m d'altitude à Liddes (VS) et un pro-
gramme particulier de fumure a été élaboré (tab. 1.1).
Les récoltes ainsi que l'analyse des plants ont été effec-
tuées sur deux ans.

Obiettivo

La prima fase di studio riguardante questa specie è con-
sistita nel proseguire i test avviati sul genepi negli anni
precedenti. Sono stati ripetuti gli stessi esperimenti ma
frazionando l'apporto di azoto su diversi periodi del-
l'anno, allo scopo di determinare il momento propizio
alla concimazione. A tal fine, a Liddes (VS) è stata mes-
sa a coltura una particella di genepi a 1300 metri s.l.m.
e predisposto un particolare programma di concimazio-
ne (tab. 1.1). I raccolti e le analisi delle piantine si sono
ripetuti per due anni.

Fumure du genépi blanc

Tableau 1.1

Plan de fumure 2003-2004

Variantes	Azote organique		Autres éléments		
	kg N/ha		kg/ha (printemps)		
	Printemps	après récolte	P ₂ O ₅ sol satisfaisant	K ₂ O sol pauvre	Mg
0/0	0	0	30	90	10
0/60	0	60	30	90	10
30/30	30	30	30	90	10
60/0	60	0	30	90	10

Concimazione Genepi bianco

Tabella 1.1

Programma di concimazione 2003-2004



Résultats

Tableau 1.2

Observations/rendements de l'essai fumure azotée du genépi, Liddes 2004

Variantes	Perte	Hauteur	Diamètre	Régularité	Vigueur	Poids frais	Poids sec	Poids sec	Poids sec/Poids vert
	%	cm	cm	(1-9)	(1-9)	g	g	g/m²	%
0/0	47,5	5-15	15-30	4,0	5,0	941	295	28,9 b	31,5
0/60	42,6	5-20	15-30	4,5	5,5	1130	363	35,5 b	32,0
30/30	33,0	5-20	15-30	6,3	5,8	1483	473	46,3 a	31,9
60/0	39,5	5-20	15-30	4,8	5,5	1410	458	44,9 a	32,8

Les petites lettres indiquent les différences significatives : Fischer LSD
Notes: 1 = médiocre; 9 = excellent

Conclusions

La perte de plants a été importante (de 33-47,5 %) et les rendements faibles (de 29 à 46 g/m²). Néanmoins, l'effet de la fumure est sensible et les procédés 30/30 et 60/0 se distinguent (tab. 1.2). Compte tenu de ces résultats et du peu d'exportation de cette espèce, la recommandation est de fractionner en deux l'apport de la fumure azotée, avec une application au départ de la végétation (en mai) et la seconde après la récolte. Pour la 1^{ère} année de récolte, la teneur et la composition de l'huile essentielle sont stables et on note peu de différences entre les procédés (tab. 1.3). En 2003 les résultats ont été similaires.

Tableau 1.3

Résultats analytiques (32 échantillons) de l'essai fumure azotée du genépi, Liddes 2004

Variantes	Huile essentielle %	Composition de l'huile essentielle %						
		α-Pinène	Myrcène	1.8 Cinéol	Bornéol	Terpinène-4-ol	Bornyl acétate	β-Caryo-phyllène
0/0	1,1	15,4	13,7	17,1	10,6	5,0	2,7	1,6
0/60	1,1	14,3	13,2	16,0	14,3	4,4	2,8	2,0
30/30	1,2	16,8	14,3	16,9	12,0	6,3	2,2	1,9
60/0	1,1	15,3	12,2	17,4	14,5	5,4	2,7	1,8

Perspectives

Le regain d'intérêt pour cette espèce et les demandes croissantes en semence, notamment pour des sélections à thuyone, incitent à réorganiser et à augmenter la production de graines vers 2 sélections : le RAC12 (sélection sans thuyone) et le RAC 18 (sélection à thuyone), l'objectif étant de disposer de 200 à 500 grammes par variété en 2007.

Risultati

Tabella 1.2

Osservazioni/rese del test di concimazione azotata del genepi, Liddes 2004

Variantes	Perte	Hauteur	Diamètre	Régularité	Vigueur	Poids frais	Poids sec	Poids sec	Poids sec/Poids vert
	%	cm	cm	(1-9)	(1-9)	g	g	g/m²	%
0/0	47,5	5-15	15-30	4,0	5,0	941	295	28,9 b	31,5
0/60	42,6	5-20	15-30	4,5	5,5	1130	363	35,5 b	32,0
30/30	33,0	5-20	15-30	6,3	5,8	1483	473	46,3 a	31,9
60/0	39,5	5-20	15-30	4,8	5,5	1410	458	44,9 a	32,8

Le lettere piccole indicano differenze significative: Fischer LSD
Score: 1 = mediocre ; 9 = eccellente

Conclusioni

Si è constatata una perdita notevole di piantine (33-47,5%) e rese deboli (da 29 a 46 g/m²). Tuttavia l'effetto della concimazione è sensibile e si evidenziano gli apporti 30/30 e 60/0 (tab. 1.2). Visti questi risultati e lo scarso assorbimento di questa specie, si raccomanda di frazionare in due l'apporto del concime azotato, con una prima applicazione all'inizio della stagione vegetativa (in maggio) ed una seconda dopo il raccolto. Come nel primo anno di raccolto, il contenuto e la composizione dell'olio essenziale restano stabili e si notano poche differenze in rapporto agli elementi apportati (tab. 1.3). Nel 2003 i risultati sono stati simili.

Tabella 1.3

Risultati analitici (32 campioni) del test di concimazione azotata del genepi, Liddes 2004

Variantes	Huile essentielle %	Composition de l'huile essentielle %						
		α-Pinène	Myrcène	1.8 Cinéol	Bornéol	Terpinène-4-ol	Bornyl acétate	β-Caryo-phyllène
0/0	1,1	15,4	13,7	17,1	10,6	5,0	2,7	1,6
0/60	1,1	14,3	13,2	16,0	14,3	4,4	2,8	2,0
30/30	1,2	16,8	14,3	16,9	12,0	6,3	2,2	1,9
60/0	1,1	15,3	12,2	17,4	14,5	5,4	2,7	1,8

Prospettive

Il rinnovato interesse per questa specie e la crescente richiesta di sementi, in particolare per la selezione con thuyone, spronano a riorganizzare ed aumentare la produzione di semi per 2 selezioni diverse: la RAC12 (selezione senza thuyone) ed la RAC 18 (selezione con thuyone), dato che l'obiettivo è disporre da 200 a 500 grammi di semi per varietà nel 2007.





Le genépi dans la Vallée d'Aoste

Les cultures expérimentales de genépi ont été réalisées afin de vérifier le comportement agronomique de certaines variétés en fonction de divers environnements. Les essais se sont déroulés sur des terrains mis à disposition de privés sélectionnés parmi des personnes motivées et intéressées à poursuivre la production des espèces même à la fin des essais expérimentaux. En ce qui concerne le genépi et, tenant compte des résultats obtenus lors des essais précédents, les cultures ont été réalisées à des altitudes supérieures à 1300 m où de telles espèces semblent avoir des caractéristiques productives et qualitatives supérieures aux basses altitudes. Les variétés testées ont été sélectionnées sur la base des résultats obtenus lors des essais précédents. En ce qui concerne la variété RAC déjà mise en culture, la sélection RAC12 a été choisie afin de confirmer les rendements obtenus par cette variété dans les essais précédents. Cependant, vu que cette variété ne contient pas de thuyone, qui confère un goût douceâtre caractéristique aux liqueurs commerciales, il est apparu opportun d'introduire également la culture expérimentale d'une variété d'*Artemisia umbelliformis* contenant cette molécule comme la sélection RAC18 fournie par Agroscope ACW Centre des fourgères (tab. 1.4). Les travaux agronomiques ont été entrepris par les agriculteurs sous la supervision des techniciens du service de production végétale. Toujours en se basant sur les résultats obtenus avec les essais précédents, et avec le souci d'optimiser et de simplifier les techniques culturales, il a également été décidé de tester un paillage en plastique de couleur noir et vert.

Tableau 1.4
Réalisation de 6 sites
expérimentaux pour la culture du genépi

N°	Localité	Essai
1	Valtournenche, hameau Pécou, 1350 m	vérification du comportement cultural de la variété RAC18 de genépi avec et sans paillage.
2	Valsavarenche, hameau Bois de Clin, 1380 m	vérification du comportement cultural de la variété RAC18 de genépi avec et sans paillage.
3	St-Pierre, hameau Meod, 1500 m	vérification du comportement cultural de la variété RAC12 et du RAC18 de genépi avec et sans paillage.
4	Chatillon, Nissod, 1380 m	vérification du comportement cultural de la variété RAC12 et du RAC18 de genépi avec et sans paillage.
5	Quart, hameau Trois villes 1376 m	vérification du comportement cultural de la variété RAC12 de genépi avec et sans paillage.
6	Ayas, hameau Bisous, 1800 m	vérification du comportement cultural de la variété RAC18 de genépi sans paillage.

Résultats

A partir des essais effectués, il a pu être établi que le comportement cultural et la production du RAC12 et RAC18 sont très similaires. Les plants de RAC18 ont seulement montré un retard de maturation d'une semaine par rapport au RAC12. Le comportement des plants a été bon et cela tant sur le terrain nu que sur le terrain couvert avec le paillage noir et vert. Sans paillage, le rendement final a été légèrement inférieur (concurrence avec les mauvaises herbes). Le rendement moyen du produit séché/plante varie d'un minimum d'environ 6g à un maximum d'environ 12g.

Il genepi in Valle d'Aosta

Le coltivazioni sperimentali di genepi sono state realizzate per verificare il comportamento agronomico di alcune varietà in funzione di diversi ambienti. I test si sono svolti su terreni messi a disposizione da privati scelti tra persone motivate ed interessate a continuare la produzione delle specie anche a sperimentazione conclusa. Per quanto riguarda il genepi, e visti i risultati ottenuti nei test precedenti, le colture sono state realizzate a quote superiori ai 1300 metri s.l.m., dove specie di questo tipo sembrano avere caratteristiche produttive e qualitative superiori rispetto alle basse quote. Le varietà testate sono state selezionate tenuto conto dei risultati ottenuti nei test precedenti. Per quanto riguarda la varietà RAC già messa a coltura, è stata scelta la selezione RAC 12 al fine di confermare le rese ottenute da questa varietà nei test precedenti. Tuttavia, dato che questa varietà è priva di thuyone, che conferisce quel gusto dolciastro caratteristico dei liquori commerciali, è sembrato opportuno introdurre altresì in via sperimentale la coltivazione di una varietà di *Artemisia umbelliformis* contenente questa molecola, quale la selezione RAC 18 fornita dall'Agroscope ACW Centre des fourgères - CH (tab. 1.4). I lavori agronomici sono stati effettuati dagli agricoltori con la supervisione dei tecnici del Servizio di produzione vegetale. Sempre sulla base dei risultati ottenuti nei test precedenti e con l'intento di ottimizzare e semplificare le tecniche colturali, si è anche deciso di testare una pacciamatura in plastica di colore nero e verde.

Tabella 1.4
Realizzazione di 6 siti
sperimentali per la coltivazione del genepi

Risultati

I test effettuati hanno messo in evidenza che il comportamento colturale e la produzione del RAC 12 e RAC 18 sono molto simili. Le piantine di RAC 18 hanno registrato un ritardo di maturazione di una sola settimana rispetto al RAC 12. Il comportamento delle piantine è stato buono sia sul terreno nudo che su quello pacciato con teli plastici neri e verdi. Senza pacciamatura, la resa finale è stata leggermente inferiore a causa della concorrenza con le erbe infestanti. La resa media di prodotto secco per pianta varia da un minimo di 6g ad un massimo di circa 12g.



Dégustation de grappa aromatisée au genépi

Méthode

La dégustation (7 personnes) a été effectuée avec 10 infusions d'*Artemisia umbelliformis*, RAC12 dans de la grappa à 42° dont 5 avaient été préparées à partir d'une récolte effectuée le matin à Valtournenche et les 5 autres à partir d'une récolte effectuée l'après-midi à Valsavarenche.

Les infusions ont été préparées en introduisant dans des bouteilles de 500 ml respectivement 1, 2, 4, 8 et 16 inflorescences de genépi.

Résultats

L'interprétation des formulaires d'évaluation n'a pas fourni les résultats escomptés. On suppose que les dégustateurs ne savaient pas si l'on devait considérer ce nouveau produit en tant que grappa ou en tant que genépi. Cependant, en tenant compte des impressions générales, on peut faire les commentaires suivants :

- ▶ Ajouter du sucre pour affiner le goût et l'arôme
- ▶ La grappa de Torrette de bonne qualité n'est pas adaptée pour ce genre d'essai
- ▶ La plus belle couleur se trouve dans les échantillons présentant le plus grand nombre d'inflorescence. Tandis que le meilleur goût se trouve dans les échantillons qui en contiennent le moins.
- ▶ Les liqueurs élaborées avec des inflorescences récoltées à Valsavarenche l'après midi ont été, en moyenne, jugées meilleures que celles produites avec les inflorescences matinales récoltées à Valtournenche.

Une dégustation successive effectuée par un groupe de dégustateurs de la cave des Onze Communes (Aymavilles Vallée d'Aoste), a jugé la préparation valable à tel point qu'une première ligne de production a été initialisée et une première grappa aromatisée mise sur le marché.

Optimisation des stades de récoltes

But

La qualité des plants dépend grandement de la teneur en huile essentielle ainsi que de sa composition. Afin de définir la meilleure période de cueillette du genépi, l'incidence du stade de la récolte sur la qualité des plants a été étudiée. La période idéale s'est révélée brève. Une qualité optimale passe par une récolte en début de floraison. Le suivi des cultures commerciales a laissé rapidement apparaître des variations importantes des 2 principaux critères de qualité que sont les huiles essentielles (composés aromatiques) et la costunolide (principe amer). Des récoltes hebdomadaires réalisées sur la commune valaisanne de Liddes (1400 m alt.) de hampes florales se sont échelonnées depuis le stade bouton jusqu'à la floraison passée (1 mois).

Résultats (fig. 1.1)

Des concentrations maximales en huile essentielle (1.76%) et en costunolide (3.0%) ont été mesurées au début de la floraison. La teneur en huile essentielle chute ensuite très rapidement pour perdre 30 à 60% de son potentiel une semaine plus tard (pleine floraison) et fina-

Degustazione di grappa aromatizzata al genepi

Metodi

La degustazione è stata effettuata da 7 persone su 10 infusioni di *Artemisia umbelliformis*, RAC12 in grappa a 42°, di cui 5 preparate a partire da un raccolto effettuato al mattino a Valtournenche e 5 a partire da un raccolto effettuato al pomeriggio a Valsavarenche.

Le infusioni sono state preparate introducendo in bottiglie da 500 ml contenenti grappa, rispettivamente 1, 2, 4, 8 e 16 infiorescenze di genepi.

Risultati

L'interpretazione dei moduli di valutazione non ha fornito risultati scontati. Si presuppone che i degustatori non sapessero se trattare questo nuovo prodotto come grappa o genepi. Tuttavia, tenendo conto delle impressioni generali, si possono fare i seguenti commenti:

- ▶ È opportuno aggiungere zucchero per migliorare il gusto e l'aroma,
- ▶ La grappa di Torrette di buona qualità non è adatta a questo genere di test,
- ▶ Il colore migliore si trova nei campioni con il maggior numero d'infiorescenze, mentre il gusto migliore si trova nei campioni che ne contengono meno,
- ▶ I liquori elaborati con infiorescenze raccolte nel pomeriggio a Valsavarenche sono stati, in media, giudicati migliori rispetto a quelli prodotti con le infiorescenze raccolte di mattina a Valtournenche.

Una degustazione successiva effettuata da un gruppo di degustatori della Cave des Onze Communes (Aymavilles, Valle d'Aosta) ha ritenuto il preparato valido al punto da avviare la prima linea di produzione e lanciare sul mercato una prima grappa aromatizzata.

Ottimizzazione dello stadio di raccolta

Scopo

La qualità delle piantine dipende in larga misura dal tenore e dalla composizione dell'olio essenziale. Per definire il periodo migliore di raccolta del genepi, è stata studiata l'incidenza dello stadio di raccolta sulla qualità delle piantine. Il periodo ideale è risultato breve. La qualità ottimale è riscontrata con un raccolto ad inizio fioritura.

Il monitoraggio delle coltivazioni ha fatto emergere delle variazioni importanti dei 2 principali criteri di qualità: gli oli essenziali (composti aromatici) e i costunolidi (principi amari). In Vallese nel comune di Liddes (1400 m s.l.m.), sono stati realizzati raccolti settimanali di steli fiorali dalla prefioritura fino a fine fioritura (1 mese).

Risultati (fig. 1.1)

Ad inizio fioritura si sono registrate le massime concentrazioni di olio essenziale (1,76%) e costunolidi (3,0%). Il contenuto di olio essenziale crolla, in seguito, molto rapidamente per perdere dal 30 al 60% del suo potenziale una settimana dopo (piena fioritura) e fino al 70%





lement 70% en fin de floraison (2 à 3 semaines après le début de la floraison). La teneur en costunolide a suivi une évolution similaire à celle de l'huile essentielle.

Critère important pour le producteur, le rendement en hampes florales sèches par mètre carré croît continuellement pour doubler entre le début et la fin floraison. Les parties ligneuses des hampes florales doublent également pendant la même période pour atteindre 25 à 30% en fin de floraison.

En conclusion, le compromis pour la production entre qualité optimale et rendement maximal passe en partie par une bonne valorisation de la qualité auprès des acheteurs.

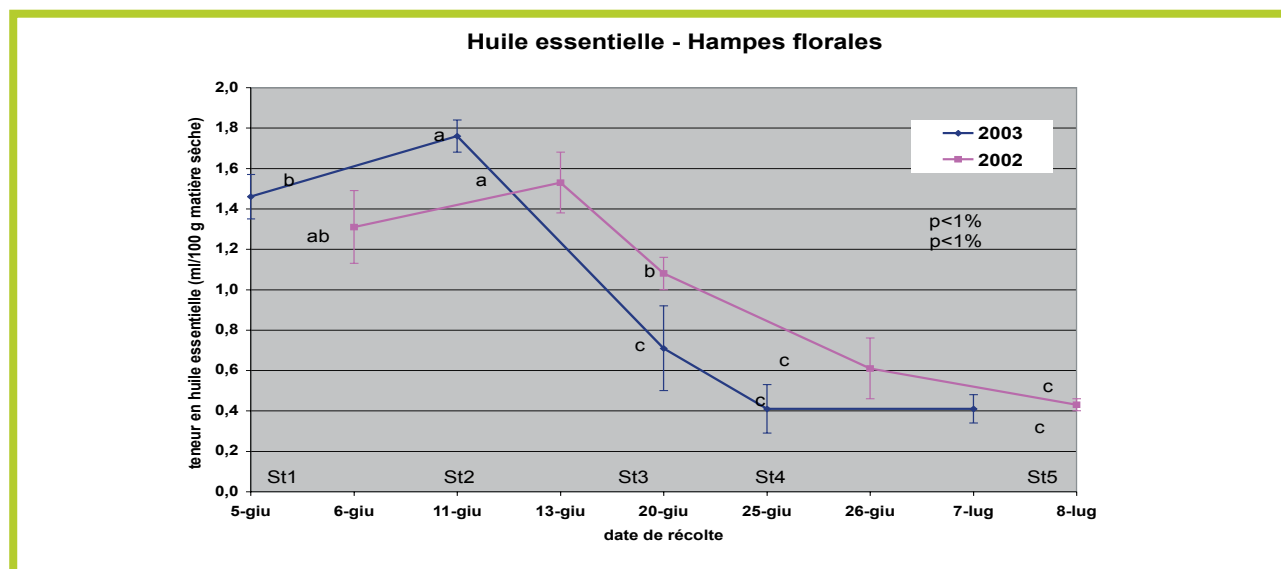
Figure 1.1
Evolution de l'huile essentielle
en fonction des dates de récolte

alla fine della fioritura (da 2 a 3 settimane dopo l'inizio della fioritura). Il tenore di costunolidi ha seguito un trend simile a quello dell'olio essenziale.

Per il produttore è importante la resa degli steli florali essiccati per metro quadrato che continua a crescere fino a raddoppiare tra l'inizio e la fine della fioritura. Le parti legnose degli steli florali raddoppiano altresì durante lo stesso periodo per raggiungere il 25-30% a fine fioritura.

In conclusione, un buon compromesso di produzione tra qualità ottimale e massima resa presuppone, in parte, una buona valorizzazione della qualità presso l'acquirente.

Figura 1.1
Evoluzione dell'olio essenziale
in funzione della data di raccolta



Authenticité et caractérisation des liqueurs de genépi

Buts

Dans l'optique de développer une méthode analytique permettant de mettre en évidence l'authenticité des produits élaborés à partir de plantes alpines, la liqueur de genépi a été choisie car elle pourrait faire l'objet d'une demande d'AOC. Il faut tout d'abord établir que les liqueurs de genépi ont bien été élaborées à partir d'*Artemisia umbelliformis* (sélection RAC12) et non pas à partir d'un mélange de plante ou même à partir d'autres herbes présentant des similitudes gustatives (Arquebuse). Pour ce faire, une méthode basée sur la SPME suivie d'une analyse GC a été mise au point. Plusieurs infusions alcooliques de genépi ont été préparées à partir de plants authentiques et leur teneur en terpènes analysés et comparés avec les herbes ayant servis à leur élaboration.

Une « empreinte digitale » des liqueurs de genépi comprenant plus de 30 composés a ainsi été établie à partir des plants authentiques de genépi provenant du Val d'Aoste et du Valais et extraits à partir de deux méthodes différen-

Autenticità e caratterizzazione dei liquori di genepi

Scopi

Allo scopo di sviluppare un metodo analitico che consenta di mettere in evidenza l'autenticità dei prodotti elaborati a partire da piante alpine, si è scelto il liquore di genepi poiché potrebbe essere oggetto di una richiesta di DOC. Prima di tutto, va evidenziato che i liquori di genepi sono stati ottenuti da *Artemisia umbelliformis* (selezione RAC12) e non da miscele di piante o erbe con analogie gustative (Arquebuse). A questo scopo, si è messo a punto un metodo basato sulla Solid Phase Micro Extraction (SPME) seguito da analisi gas cromatografica (GC). Sono state preparate varie infusioni alcoliche di genepi a partire da piantine autentiche, se ne è poi analizzato il contenuto in terpeni e raffrontato con l'analisi delle piante servite alla loro elaborazione.

È stata quindi messa a punto un'«impronta digitale» dei liquori di genepi comprendente più di 30 composti riscontrati sia nelle piante autentiche di genepi provenienti dalla Valle d'Aosta e dal Vallese, sia nei liquori ottenuti per infusione di genepi mediante 10 metodi diversi



tes correspondant aux procédés habituellement utilisés par l'industrie des liquoristes (macération dans de l'alcool pur et macération dans une solution 40% d'alcool sucré).

Résultats

Tous les macérats présentent un chromatogramme similaire, seule la concentration des différents composants change d'une liqueur à l'autre.

Tableau 1.5

Concentrations moyennes des composés volatiles des liqueurs de genépi

Composés	RAC12 authentiques	liqueurs interprofession	RAC18 authentique
	Concentration moyenne [%]	Concentration moyenne [%]	Concentration moyenne [%]
P	0,4	0,3	0,9
α -pinène	5,7	1,7	4,7
camphène	6,3	0,4	3,3
U	0,8	0,9	1,9
β -pinène	29,8	14,0	18,4
β -myrcène	5,9	2,2	20,5
α -terpinène	0,1	0,4	0,3
p-cymène	1,8	3,9	2,9
limonène	1,7	1,0	1,5
cinéol	30,3	6,6	4,0
γ -terpinène	6,5	2,0	1,7
terpinolène	1,1	0,4	0,1
α -thujone	3,2	34,3	64,1
β -thujone	2,1	17,3	14,4
camphre	1,4	0,4	0,6
bornéol	12,6	1,4	0,9
terpinèn-4-ol	7,8	1,5	1,5
R	11,4	0,4	0,0
α -terpinéol	1,2	2,1	0,5
M	2,0	1,3	0,3
bornyl acétate	3,1	4,0	0,2
terpinyl acétate	17,6	1,6	0,6
T	2,5	0,2	0,1
N	8,0	0,0	0,0
S	0,8	6,5	0,0
V	0,9	3,3	1,7
caryophyllène	1,9	1,2	2,2

Commentaires

Les concentrations moyennes données dans le tableau 1.5 ne permettent pas de déterminer avec précision l'origine et l'espèce de plantes utilisées mais représentent les cas étudiés (le type de macération influence déjà fortement les concentrations α -pinène, β -pinène, β -myrcène, cinéol, bornyl et terpinyl acétate). La macération dans de l'alcool à 60% favorise nettement l'extraction des composés peu volatiles alors que les composés volatiles s'extraient facilement dans l'alcool à 40% sucré.

En fonction de l'âge des liqueurs, certains composants disparaissent (β -myrcène) alors que d'autres augmentent (p-cymène). Ce phénomène, démontrant une transformation des terpènes en présence de lumière (photoxydation ou photoisomérisation), rend l'interprétation des chromatogrammes encore plus ardue. Ces résultats représentent une première analyse et devront encore être répétés sur

correspondenti ai processi abitualmente impiegati dall'industria dei liquori (macerazione in alcool puro e macerazione in una soluzione al 40% di alcool zuccherato).

Risultati

Tutti i macerati presentano un cromatogramma simile, soltanto la concentrazione dei diversi componenti cambia da un liquore all'altro.

Tabella 1.5

Concentrazione media dei composti volatili dei liquori di genepi

Commenti

Le concentrazioni medie indicate nella tabella 1.5 non consentono di determinare con precisione l'origine e la specie di piante utilizzate. Esse rappresentano i casi studiati (il tipo di macerazione esercita una notevole influenza sulle concentrazioni α -pinene, β -pinene, β -mircene, cineolo, bornil e terpinil acetato). La macerazione in alcool al 60% favorisce nettamente l'estrazione dei composti poco volatili mentre i composti volatili si estraggono facilmente nell'alcool zuccherato al 40%.

In funzione dell'età dei liquori, alcuni componenti scompaiono (β -mircene), ed altri aumentano (p-cymene). Questo fenomeno, che indica una trasformazione dei terpeni in presenza di luce (fotossidazione o fotoisomerizzazione) complica ancora di più l'interpretazione dei cromatogrammi. Questi risultati rappresentano una prima analisi e dovranno ancora essere ripetuti per



plusieurs années et surtout devront être comparés avec des liqueurs provenant de liquoristes. Cependant on peut considérer que toutes les liqueurs qui présentent des pics supplémentaires que ceux indiqués dans le tableau 1.5 sont à considérer comme atypiques des liqueurs élaborées à partir d'*Artemisia umbelliformis*.

Comme de nombreux composants volatiles du genépi se trouvent sous la forme d'énantiomères (image miroir l'un de l'autre), la suite du projet d'authentification a consisté à séparer ces derniers sur une colonne chirale afin de voir si leur rapport pouvait être un critère d'authenticité.

Détermination de l'authenticité des plantes aromatiques par chromatographie énantiosélective en phase gazeuse

Objectif

Afin de permettre un contrôle qualité du genépi et de protéger le matériel d'origine contre la contrefaçon, une méthode énantiosélective en chromatographie gazeuse a été développée. La différenciation stéréosélective simultanée de l' α -pinène, du bornéol et de l' α -terpinéol a été rendue possible en utilisant l'heptakis (2,3-di-O-méthyl-6-O-tert.-butyldiméthylsilyl)- β -cyclodextrine (Mosandl, 1995).

Pour l'isolation et la concentration des terpènes de l'huile essentielle, la SPME a été choisie permettant ainsi de s'affranchir d'une distillation coûteuse en temps. Tous les composés choisis sont bien résolus et leurs rapports énantiomériques ont pu être déterminés avec sûreté et sans interférences.

Tableau 1.6
Résultats obtenus pour plusieurs
genépi blanc d'origine différente

Provenance	Rapports énantiomériques (ee) des monoterpènes			
	bornéol	β -pinène	α -pinène	α -terpinéol
Fenis (I)	>99	92	73,5	73,5
Liddes (CH)	>99	96	90	79,5
Leschaux (F)	>99	93,5	80,5	80,5
Châtillon (I)	>99	91,5	78	73,5

Données expérimentales

1 gramme de plante séchée a été homogénéisé et placé dans un vial de 20 ml et laissé à l'équilibre. L'espace de tête a été absorbé par SPME (SUPELCO fibre polyacrylate 85mm). Une analyse GC-MS énantiosélective a ensuite été effectuée en utilisant une colonne contenant comme phase stationnaire de l'heptakis (2,3-di-O-méthyl-6-O-tert.-butyldiméthylsilyl)- β -cyclodextrine.

Discussion

On peut conclure que la pureté énantiomérique du bornéol, du β -pinène et de l' α -terpinéol sont des indicateurs fiables pour authentifier le matériel genépi. Le (S)-bornéol est présent en grand excès énantiomérique, et cela sans relation avec l'origine de la plante. Tous les autres monoterpènes analysés exhibent une variabilité naturel-

diverss anni e, soprattutto, dovranno essere raffrontati con liquori provenienti da liquoristi. Si può tuttavia ritenere che tutti i liquori che mostrano picchi supplementari rispetto a quelli indicati nella tabella 1.5 vanno considerati atipici rispetto ai liquori ricavati esclusivamente da *Artemisia umbelliformis*.

Dato che numerosi componenti volatili del genepi si trovano sotto forma di enantiomeri (immagini speculari), il seguito del progetto di autenticazione è consistito nel separare questi ultimi su una colonna chirale, allo scopo di vedere se il loro rapporto potesse essere un criterio di autenticità.

Determinazione dell'autenticità delle piante aromatiche mediante cromatografia enantioselettiva in fase gassosa

Obiettivo

Ai fini di un controllo della qualità del genepi e della protezione del materiale originale contro la contraffazione, è stato sviluppato un metodo enantioselettivo in cromatografia gassosa. La differenziazione stereoselettiva simultanea dell' α -pinene, del borneolo e dell' α -terpineolo è stata possibile grazie all'impiego dell'heptakis (2,3-di-O-metil-6-O-tert.-butyldimetilsilil)- β -ciclodestrine (Mosandl, 1995).

Per isolare e concentrare i terpeni dell'olio essenziale, si è optato per la SPME che consente di evitare una distillazione troppo onerosa in termini di tempo. Tutti i composti scelti sono stati isolati ed è stato possibile determinare con sicurezza e senza interferenze il loro rapporto enantiomerico.

Tabella 1.6
Risultati ottenuti da genepi
bianco di origine diversa

Dati sperimentali

1 grammo di pianta essiccata è stato omogeneizzato e introdotto in un vial da 20 ml. Lo spazio di testa è stato assorbito da SPME (SUPELCO fibra policrilata 85mm). È stata in seguito effettuata un'analisi GC-MS enantioselettiva utilizzando una colonna contenente come fase stazionaria heptakis (2,3-di-O-metil-6-O-tert.-butildimetilsilil)- β -ciclodestrina.

Discussione

Si può concludere che la purezza enantiomerica del borneolo, del β -pinene e dell' α -terpineolo sono indicatori affidabili per giudicare l'autenticità del liquore di genepi. Lo (S)-borneolo è presente in eccesso enantiomerico, senza nessuna relazione con l'origine della pianta. Tutti gli altri monoterpene analizzati presentano una variabilità naturale rispetto al loro eccesse-





le par rapport à leur excès énantiomérique. Le résultat le plus surprenant résulte dans le fait que, contrairement à l'opinion très répandue, la nature ne métabolise pas uniquement des composés énantiomériquement purs. De récents travaux ont montré que le rapport énantiomérique est déterminé par le taux d'activité de deux enzymes différentes de stéréospécificité opposée et peut être également influencé par des paramètres extérieurs agissant sur la physiologie et le métabolisme des plantes (Croteau et al., 2003). Cependant, en ce qui concerne les excès énantiomériques de l' α et du β -pinène, et du terpinéol dans le genépi blanc, il est possible de définir les limites de leur variabilité en tant que paramètres d'authenticité. Toute variation de ces paramètres d'authenticité peut être interprétée comme une falsification par addition de matériel végétal non authentique ou de matériel racémique. Dû à la variabilité naturelle des rapports énantiomériques, l'établissement d'une base de données plus importante comprenant des données provenant d'échantillons authentiques sur une période de plusieurs années est primordial. La méthode analytique ici présentée est le prélude pour atteindre ce but.

Partie expérimentale

Tableau 1.7

Analyse du genépi par chromatographie en phase gazeuse à l'aide de la technique SPME avec les conditions opératoires suivantes

PDMS 100 μ m (rouge)	Plante	Liqueur	Liqueur NaCl
Temps d'imprégnation [min]	10	15	30
Température d'imprégnation [°C]	30	50	50
Temps de désorption [min]	3	3	3
Quantité	80 mg	4 ml	4 ml

Tableau 1.8

Analyse par GC-FID

Les analyses sont réalisées par un chromatographe en phase gazeuse avec détection à ionisation de flamme FID (splitless) sous les conditions suivantes :

	Analyse normale	Analyse chirale
Colonne	HP5 ; 5% phenylmethylsiloxane	Chirale
Longueur nominale [m]	30	30
He, flux [ml/min]	1,0	1,0
Température four[°C]	40	40
Rampe	4 °C/min jusqu'à 150 °C 5 °C/min jusqu'à 220 °C	4 °C/min jusqu'à 150 °C 5 °C/min jusqu'à 220 °C
Température inj. [°C]	250	250
Température FID [°C]	300	300

so énantiomérique. Il risultato più sorprendente risiede nel fatto che, contrariamente all'opinione diffusa, la natura, a causa della biosintesi catalizzata enzimaticamente, non metabolizza solo composti enantiomerici puri. Recenti lavori hanno indicato che il rapporto enantiomerico è determinato dal tasso d'attività di due enzimi differenti con stereospecificità opposta e magari influenzato da parametri esterni che agiscono sulla fisiologia e il metabolismo delle piante (Croteau et al., 2003). Tuttavia, per quanto riguarda gli eccessi enantiomerici dell' α e del β -pinene e del terpineolo, è possibile definire il limite della loro variabilità in quanto parametri di autenticità. Qualunque variazione di questi parametri d'autenticità può essere interpretata come una contraffazione mediante aggiunta di materiale vegetale non autentico o materiale racemico. Vista la variabilità naturale dei rapporti enantiomerici, è assolutamente essenziale istituire una banca dati più ampia comprendente dati derivanti da campioni autentici su un periodo di più anni. Il metodo analitico presentato in questa sede potrà servire a raggiungere tale scopo.

Parte sperimentale

Tabella 1.7

Analisi del genépi con cromatografia in fase gassosa mediante tecnica SPME con le seguenti condizioni operative



Tabella 1.8

Analisi mediante GC-FID

Le analisi sono realizzate mediante cromatografo in fase gassosa con rilevamento a ionizzazione di fiamma FID (splitless) nelle seguenti condizioni:



Sauge sclarée

Salvia moscatella

Salvia sclarea L.

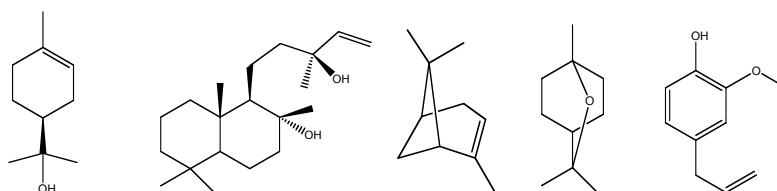


Pharmacognosie

La sauge sclarée est utilisée en liquoristerie pour aromatiser certains vins, dans l'industrie du tabac et en parfumerie ou dans la fabrication de savon pour ses propriétés fixatrices et son odeur musquée. Les pièces florales de la sauge sclarée renferment une huile essentielle, majoritairement composée d'acétate de linalyle (45-85 %) et de linalol (10-35 %) ; elle contient aussi du β -pinène, du 1.8-cinéol, de l' α -terpinéol, du nérol, du géraniol, de l'eugénol, du β -caryophyllène et du β -cubénène. L'oléorésine renferme principalement du sclaréol (jusqu'à 70 %), un diterpène peu volatile. (Teuscher et al. 2005 ; Bruneton, 2002)

Farmacognosia

La salvia moscatella è impiegata in liquoreria per aromatizzare alcuni vini, nell'industria del tabacco, in profumeria e nella fabbricazione del sapone, date le sue proprietà fissatrici e l'odore muschiato. Le infiorescenze racchiudono un olio essenziale, composto soprattutto da acetato di linalile (45-85%) e linalolo (10-35%); contiene altresì β -pinene, 1.8-cineolo, l' α -terpineolo, nerolo, geraniolo, eugenolo, β -cariofillene e β -cubene. L'oleoresina contiene principalmente sclareolo (fino al 70%), un diterpene poco volatile. (Teuscher e al., 2005 ; Bruneton, 2002)



α -terpinéol, sclaréol, β -pinène, 1.8 cinéol, eugénol

α -terpineolo, sclareolo, β -pinene, 1.8 cineolo, eugenolo

Objectif

En collaboration avec la Vallée d'Aoste et les producteurs d'huile essentielle de Bassins, un programme de sélection de la sauge sclarée a débuté en 2002 par l'étude de la biologie florale. Ce projet de sélection visait l'amélioration de la teneur en huile essentielle, la régularité morphologique et la rusticité de la sauge sclarée afin d'en développer la culture.

Obiettivo

Nel 2002, in collaborazione con la Valle d'Aosta ed i produttori di olio essenziale di Bassins, è stato avviato un programma di selezione della salvia moscatella per studiarne la biologia florale. Tale progetto di selezione aveva come obiettivo il miglioramento del contenuto in olio essenziale, della regolarità morfologica e della rusticità della salvia moscatella per incrementarne la coltivazione.

Sélection de la sauge sclarée

Matériel et méthodes

Des semences ont été prélevées sur 4 descendances de plantes notées MS (mâle stérile) et sur 3 descendances de plantes hermaphrodites mâle fertile (MF). Ces sélections ont été plantées à 920m d'altitude à Arbaz (VS) en comparaison avec la variété commerciale 'Jelitto' et la variété population de base, dans le but d'améliorer la qualité, la productivité et la régularité de cette espèce.

Selezione della salvia moscatella

Materiali e metodi

Sono state prelevate sementi su quattro discendenze di piante MS (maschio sterile) e su 3 discendenze di piante ermafrodite (MF). Queste selezioni sono state piantate a 920 m s.l.m. a Arbaz (VS) e raffrontate alla varietà commerciale "Jelitto" ed alla varietà popolazione di base allo scopo di migliorare la qualità, la produttività e la regolarità di tale specie.



Résultats

Tableau 2.1

Rendements de 7 descendance (MS-MF) comparées à 2 témoins de sauge sclarée, moyenne de 10 plantes, Arbaz 2004

Variétés		Nombre tige/plante	Mortalité/ gel %	Matière sèche* g/m ²	Huile essentielle* %
Témoins	Jelitto	15,9	45,0	709	0,33
	Lot base	11,2	52,5	527	0,22
Moyenne des descendance MS		13,9	43,1	684	0,28
Moyenne des descendance MF		13,5	52,5	693	0,31

* Les différences en matière sèche et en huile essentielle entre les lignées ne sont jamais significatives (Test de Tukey)

Commentaires

Cette espèce bisannuelle gélive a passablement souffert durant l'hiver 2003-2004. Les différences de rendements en matières sèches entre les descendance sont corrélées à la mortalité hivernale. La distribution spatiale de ces pertes avec un gradient de bas en haut et d'est en ouest rend difficile l'interprétation des ces résultats. La teneur en huile essentielle varie fortement entre les plantes et ne permet pas de donner de conclusion sur la supériorité d'une descendance par rapport aux autres.

La méthode de sélection par hybridation de clones n'a pas apporté les résultats escomptés. La descendance des lignées MS n'a pas été supérieure à celle des plantes hermaphrodites. Une sélection massale, basée sur la teneur en huile essentielle et la vigueur, devrait améliorer les variétés existantes.

L'huile essentielle se trouve principalement dans les pièces florales (tab. 2.1) et le stade de récolte optimale pour la production d'essence est à la période des 'fleurs fanées', juste avant la maturité des semences.

Sauge sclarée dans la Vallée d'Aoste

Cette plante traditionnellement utilisée dans la Vallée d'Aoste est aujourd'hui remise en valeur pour ses vertus reconnues. La variété locale va de nouveau être remise en culture. En 2003 on a commencé à récolter les graines de plantes spontanées qui ont permis de mettre en culture en 2004 un terrain de 1000 m² sur la commune de Chatillon. En août 2005, les premiers échantillons sur prairie ont été prélevés afin d'en déterminer leur teneur en huile essentielle. La germination des semences a été optimale, les rangées se présentaient de manière très régulières et les plants étaient bien développés. Le rendement moyen en matériel vert d'un plant se situe aux alentours de 500 g.

Conclusions et perspectives

La culture de la sauge sclarée est envisageable en Valais et en Vallée d'Aoste. Le développement de cette espèce passe par l'étude du marché.

Pour éviter le gel, le cadastre cultural devrait se limiter à l'adret en dessous de 900 m d'altitude ($\pm$ la zone viticole).

Ce programme se poursuit par l'évaluation de la sélection massale à Bassins. Un lot de semences de 250 g récoltés sur les 20 plantes les plus productives en huile essentielle (plus de 1ml/plante) est comparé avec le lot de base. La récolte est prévue en juillet 2006.

Risultati

Tabella 2.1

Rese di 7 discendenze raffrontate a 2 gruppi di controllo di salvia moscatella, media di 10 piante, Arbaz 2004

Variétés		Nombre tige/plante	Mortalité/ gel %	Matière sèche* g/m ²	Huile essentielle* %
Témoins	Jelitto	15,9	45,0	709	0,33
	Lot base	11,2	52,5	527	0,22
Moyenne des descendance MS		13,9	43,1	684	0,28
Moyenne des descendance MF		13,5	52,5	693	0,31

* Le differenze relative alla materia secca e all'olio essenziale tra le stirpi non sono mai significative (Test di Tukey)

Commenti

Questa specie biennale sensibile alle gelate ha discretamente sofferto durante la stagione invernale 2003-2004. Le differenze di resa di materia secca tra le discendenze sono fortemente correlate alla mortalità invernale. La distribuzione spaziale di queste perdite con un gradiente dal basso verso l'alto e da est a ovest rende difficile l'interpretazione dei risultati. Il contenuto in olio essenziale varia notevolmente tra le piante e non consente di trarre conclusioni sulla superiorità di una stirpe rispetto ad altre.

Il metodo di selezione mediante ibridazione non ha fornito risultati scontati. La discendenza delle stirpi MS non è stata superiore di quella delle piante ermafrodite. Una selezione massale, basata sul tenore in olio essenziale sul vigore, dovrebbe migliorare le varietà esistenti.

L'olio essenziale si trova principalmente nelle infiorescenze (tab. 2.1) e lo stadio di raccolta ottimale per la produzione dell'essenza è il periodo dei «fiori appassiti», poco prima della maturità delle sementi.

Salvia moscatella in Valle d'Aosta

Questa pianta tradizionalmente impiegata in Valle d'Aosta è oggi nuovamente valorizzata per le virtù che le vengono riconosciute. La varietà locale sarà ben presto rimessa a coltura. Nel 2003 si è iniziato a raccogliere i semi di piante spontanee, il che, nel 2004, ha consentito di mettere a coltura un terreno di 1000 m² nel comune di Châtillon. Nel mese di agosto del 2005 sono stati prelevati i primi campioni al fine di determinarne il tenore di olio essenziale. La germinazione delle sementi è stata ottimale con file molto regolari e piante ben sviluppate. La media di materiale verde per ogni singola piantina si situa intorno ai 500 g.

Conclusioni e prospettive

La coltivazione di salvia moscatella è quindi possibile in Vallese ed in Valle d'Aosta. Lo sviluppo della coltivazione di questa specie richiede un'indagine di mercato.

Per evitare le gelate, la zona vocata dovrebbe limitarsi ai versanti esposti a sud ad una quota inferiore ai 900 m s.l.m. ($\pm$ la zona viticola).

Il programma prosegue con la valutazione della selezione massale a Bassins. Un lotto di sementi di 250 g raccolti sulle 20 piante migliori produttrici di olio essenziale (più di 1ml/pianta) è raffrontato con il lotto di base. Il raccolto è previsto nel luglio 2006.



Thym vulgaire

Timo maggiore

Thymus vulgaris L.



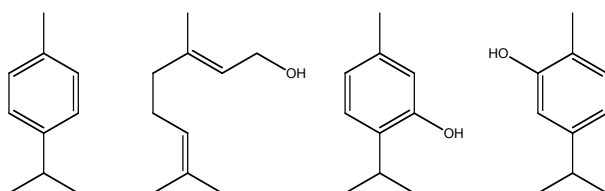
3

Pharmacognosie

Le thym vulgaire est reconnu et utilisé en cuisine, en tisane, en agroalimentaire, en médecine et en aromathérapie. Ses propriétés sont nombreuses: aromatique, cicatrisante, antibactérienne, antifongique, spasmolytique, vermifuge, carminative, expectorante, antioxydante, apéritive, etc. Son action puissante est essentiellement due à sa richesse en huile essentielle (jusqu'à 4-5 %), généralement constituée de thymol (30-60 %); le thym contient également des flavonoïdes, des principes amers (dérivés de l'acide hydroxycinnamique), des dérivés de l'acétophénone (hydroxy-4 acétophénone et hétérosides estérifiés) et des triterpènes (acide ursolique et acide oleanolique). (Teuscher et al. 2005). L'huile essentielle de thym se caractérise par son polymorphisme chimique. 7 races chimiques sont décrites : géraniol ; α -terpinéol ; *trans*-sabinène hydrate ou thuyanol-4; linalol; carvacrol; thymol et cinéol-1,8 (uniquement décrit en Espagne). (Passet, 1971 ; Vernet et al., 1986 ; Adzet et al., 1977). L'écotype valdôtain est un chémotype "à thymol".

Farmacognosia

Il timo maggiore è noto ed impiegato in cucina, per le tisane, nella produzione agro-alimentare, in medicina ed in aromaterapia. Ha numerose proprietà: aromatiche, cicatrizzanti, antibatteriche, antifungine, spasmolitiche, vermifughe, carminative, espettoranti, antiossidanti, aperitive, ecc. La sua potente azione è dovuta essenzialmente alla ricchezza di oli essenziali (fino al 4-5%), timolo soprattutto (dal 30 al 60%). Il timo contiene altresì flavonoidi, principi amari (derivati dall'acido idrocinnamico), derivati di acetofenone (idroxi-4 acetofenone e eterosidi esterificati) e triterpeni (acido ursolico e oleanolico) (Teuscher e al., 2005). L'olio essenziale del timo è caratterizzato da un proprio polimorfismo chimico. Sono descritte sette razze chimiche: geraniolo; α -terpineolo; *trans*-sabinene idrato o tuianolo -4; linalolo; carvacrolo; timolo e cineolol-1,8 (descritto solo in Spagna) (Passet, 1971 ; Vernet e al., 1986 ; Adzet e al., 1977). L'ecotipo valdostano è un chemiotipo a timolo.



p-cymène, géraniol, thymol, carvacrol

p-cimene, geraniolo, timolo, carvacrolo

La selezione del thym: la creazione di varietà ricche in géraniol, en thuyanol-4, et en linalol

Objectif

Le marché de l'aromathérapie demande de plus en plus des huiles essentielles caractérisées. Cette production s'obtient actuellement à partir de clones de chaque chémotype. Le désavantage de cette méthode de multiplication est le coût élevé du bouturage et des problèmes de dépérissements. Pour ces raisons, l'objectif de ce programme vise la production de semences de thym hybrides de différents chémotypes ; principalement ceux à géraniol, à thuyanol-4 (*trans*-sabinène hydrate) et à linalol qui sont les plus demandés. En 2003, lors de deux voyages dans la région de Montpellier et du sud-est de la France, des semences et quelques clones de

La selezione del timo: la creazione di varietà ricche di geraniolo, Tuianolo-4 e linalolo

Obiettivo

Il mercato dell'aromaterapia richiede un numero sempre crescente di oli essenziali caratterizzati. Questa selezione si ottiene oggi a partire da cloni di ogni singolo chemiotipo. Gli svantaggi di questo metodo di moltiplicazione sono il costo elevato della talea ed i problemi di deperimento. Per tali ragioni, l'obiettivo di questo progetto è la produzione di sementi di timo ibrido da diversi chemiotipi; principalmente quelli a base di geraniolo, tuianolo-4 (*trans*-sabinene idrato) e linalolo che sono i più richiesti. Nel 2003, in occasione di due viaggi nella regione di Montpellier e in Francia sud-orientale, sono state raccolti sementi ed alcuni cloni di timo volgare "tipicizzato". Dopo la pulitura,



thym vulgaire 'typés' ont été récoltés. Après nettoyage ces semences ont été semées et 850 plantons ont été mis en observation au champ à Arbaz au printemps 2004.

Une récolte de 85 clones a eu lieu en juin 2005 et les premiers résultats analytiques indiquent que nous disposons de clones hermaphrodites (MF) et mâle stérile (MS), riche en linalol (80-90 %) et en thuyanol-4 (> 40 %), ainsi qu'en thymol et en carvacrol (> 70 %). Ce matériel permettra d'envisager la réalisation d'un programme d'hybridation pour la période 2006-2008, à condition que l'hivernage soit bon.

Un autre volet de ce programme inclut la création d'hybrides à partir de *Thymus pulegioides* à odeur citronnée. Le matériel de base provient de Cuorné (Piémont). Six hybrides réalisés en été 2004, ont été plantés au printemps 2005 à Arbaz. La première récolte et les premiers résultats sont attendus pour 2006.

La Sélection d'un hybride de thym vulgaire 100 % valdôtain

Objectif

Ce programme visait la création d'un hybride de clone de thym vulgaire productif à partir de deux parents originaires du Val d'Aoste (tab. 3.1)

Tableau 3.1
Origine des hybrides de thym

Numéros	Origine de l'hybride
Varico 2	Obtention RAC (commercialisé par DSP)
4	Allemand x valdôtain (93.16.8 x 92.13.3)
11	France x valdôtain (5.55 x 11 AO)
13	valdôtain x valdôtain (4 AO x 11 AO)
14	valdôtain x valdôtain (92.13.6 x 11 AO)

Résultats

Tableau 3.2
Rendement en matière sèche et en huile essentielle de 5 hybrides de clones de thym vulgaire en 1^e année de culture, Arbaz 2003

Hybrides	Matière sèche g/m ²	Huile essentielle %	Composition de l'huile essentielle %						
			β-Pinène	para-Cymène	γ-Terpinène	Linalol	Thymol	Carvacrol	β-Caryophyllène
Varico2	153	3,72	1,63	8,17	14,8	2,19	57,4	2,86	2,04
4	115	4,94	2,04	13,5	19,8	1,58	48,6	3,04	1,53
11	94	5,38	1,90	11,0	17,4	2,51	36,0	22,2	1,95
13	133	4,45	1,71	10,9	15,9	1,87	56,8	2,82	0,97
14	94	4,13	1,76	13,4	20,5	1,63	49,4	2,34	1,47

nella primavera 2004, sono state piantate le sementi e messe sotto osservazione 850 piantine presso il campo di Arbaz.

Per gli altri chemiotipi, nel mese di giugno si è proceduto al raccolto di 85 cloni. I primi risultati analitici indicano che disponiamo di cloni ermafroditi (MF) e maschi sterili (MS), ricchi di linalolo (dall'80 al 90%) e thuyanol-4 (>40%), nonché di timolo e carvacrolo (>70%). Questo materiale consentirà di realizzare un programma d'ibridazione per il biennio 2006-2008, a condizione che lo svernamento sia buono.

Un'altra parte del progetto include la creazione di ibridi a partire da *Thymus pulegioides* che presenta un caratteristico profumo di limone. Il materiale di base proviene da Cuorné (Piemonte). Sei ibridi realizzati nell'estate 2004 sono stati piantati ad Arbaz nella primavera 2005. I primi raccolti e risultati saranno disponibili entro il 2006.

Selezione di un ibrido di timo 100% valdostano

Obiettivo

Il progetto prevedeva la creazione di un ibrido di clone di timo produttivo a partire da due ceppi parentali provenienti dalla Valle d'Aosta (tab. 3.1)

Tabella 3.1
Origine degli ibridi di timo



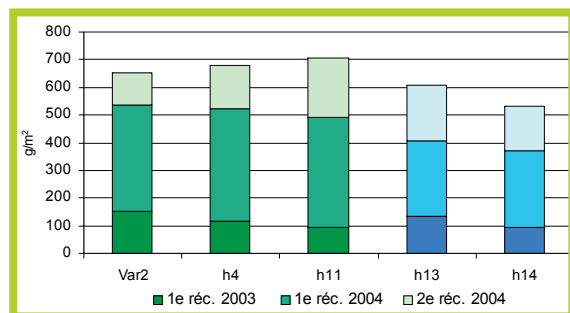
Risultati

Tabella 3.2
Resa di materia secca ed olio essenziale di 5 ibridi di cloni di timo maggiore durante il 1° anno di coltura, Arbaz 2003



Figure 3.1

Rendement en matière sèche de 5 hybrides de clones de thym vulgaire, cumul de 3 récoltes, Arbaz 2003-2004



Conclusions et perspectives

L'hybride 13 (100% Valdôtain) devrait répondre aux attentes des Valdôtains. Il se caractérise par son port érigé, sa couleur gris-bleu et sa régularité. Sa productivité en matière sèche en 2004 (tab. 3.2 et fig. 3.1) doit être pondérée car il a bénéficié d'un traitement différent des autres. Une récolte manuelle au sécateur qui a permis d'évaluer sa variabilité l'a favorisé ($\pm 25\%$ de gain en matière sèche, par rapport aux autres récoltes au Supercut). La production de semences est envisageable pour 2008, à condition que la demande soit suffisante. L'hybride 11 se distingue par sa haute teneur en huile essentielle et son profil aromatique différent. Il s'agit d'un chémotype thymol 36 % - carvacrol 22 %, très riche en huile essentielle qui pourrait intéresser le marché du condiment.

Les nouveaux hybrides confirment leur bonne production en matière sèche et en huile essentielle par rapport au standard 'Varico 2' et aux hybrides 100 % Valdôtain. Une comparaison variétale de thym vulgaire débutera en 2006 avec le nouvel hybride DSP/Agroscope et les meilleures variétés du marché.

Le thym Varico dans la Vallée d'Aoste

Dans l'attente de pouvoir disposer de graines de l'écotype typique de la Vallée d'Aoste que certains pharmaciens souhaitent à nouveau utiliser pour l'obtention d'huile essentielle, la variété Varico a été testée sur une superficie d'environ 3000 m². L'essai a été réalisé sur les communes de St-Vincent et de Chatillon durant le mois d'août 2004. La germination des semis a été bonne et les rangées sont assez homogènes. En 2005, des échantillons sur des plants déjà développés ont été prélevés afin de déterminer les rendements et les pourcentages en huile essentielle.

Figura 3.1

Rese di materia secca di 5 ibridi di cloni di timo maggiore, somma di 3 raccolti, Arbaz 2003-2004



Conclusioni e prospettive

L'ibrido 13 (100% valdostano) dovrebbe soddisfare le aspettative dei valdostani. Si caratterizza per il portamento eretto, il colore grigio-blu e la sua regolarità. Dato che ha beneficiato di un trattamento diverso rispetto agli altri ibridi, la sua eccellente produttività di materia secca nel 2004 (tab. 3.2 e fig. 3.1) deve essere registrata con cautela, essendo stato favorito dal raccolto manuale mediante cesoie che ha consentito di valutarne la variabilità ($\pm 25\%$ in più di materia secca) rispetto agli altri raccolti mediante Supercut. La produzione di sementi sarà possibile nel 2008, a condizione che la domanda si dimostri sufficiente.

L'ibrido 11 si distingue per il suo alto contenuto in olio essenziale ed un diverso profilo aromatico. Si tratta di un chemiotipo timolo 36% - carvacrolo 22% molto ricco di olio essenziale che potrebbe interessare il mercato delle condimentarie.

I nuovi ibridi confermano la buona produzione di materia secca ed olio essenziale rispetto allo standard "Varico 2" ed agli ibridi 100% valdostani. Un raffronto varietale di timo maggiore sarà avviato nel 2006 tra il nuovo ibrido DSP/Agroscope e le migliori varietà del mercato.

Il timo varico in Valle d'Aosta

Nell'attesa di disporre di semi dell'ecotipo valdostano, che alcuni farmacisti vorrebbero riutilizzare per la produzione dell'olio essenziale, si è testata la varietà Varico su una superficie di circa 3000 m². Il test è stato realizzato nei comuni di St-Vincent e di Châtillon nel mese di agosto 2004. La germinazione delle piantine è stata buona e le file erano abbastanza omogenee. Nel 2005 si è proceduto al prelevamento di campioni su piantine già sviluppate al fine di determinare le rese e le percentuali di olio essenziale.



Sarriette des montagnes

Santoreggia montana

Satureja montana L.

Pharmacognosie

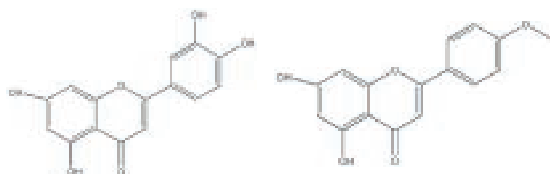
Cette lamiacée vivace aromatique, originaire du sud de l'Europe et de l'Afrique du Nord, est principalement connue comme épice. La drogue est utilisée pour ses propriétés antiseptique et antispasmodique dans le traitement des troubles digestifs (ballonnements, lenteur de la digestion, flatulence, etc...), en cas de rhume, en bain de bouche et pour le traitement de petites plaies. Son huile essentielle contient principalement du carvacrol (28-68 %), du thymol (jusqu'à 40 %), du *para*-cymène (jusqu'à 25%) et du γ -terpinène. (Bruneton, 2002).

Les feuilles contiennent également des flavonoïdes (lutéoline, acacétine et diosmétine ainsi que leurs dérivés glycosylés rutinosyle ou glucuronyle) et des acides phénols (acide rosmarinique et acide ursolique).

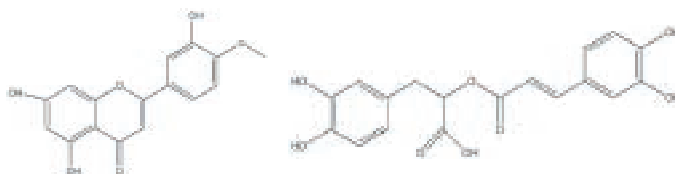
Farmacognosia

Laminacea vivace aromatica, originaria dell'Europa meridionale e dell'Africa settentrionale nota essenzialmente come spezia. La droga è impiegata per le sue proprietà antisettiche e antispasmodiche nel trattamento dei disturbi digestivi (ventre gonfio, digestione lenta, flatulenza, ecc...), in caso di raffreddore, per gargarismi e per trattare le piccole ferite. Il suo olio essenziale contiene principalmente carvacrolo (28-68%), timolo (fino al 40%), *para*-cimene (25%) max e γ -terpinene. (Bruneton, 2002).

Le foglie contengono altresì flavonoidi (luteolina, acacetina e diosmetina nonché i loro derivati glicosilati: rutinosile o glucuronile) e acidi fenolici (acido rosmarinico e acido ursolico).



Lutéoline, acacétine, diosmétine et acide rosmarinique.



Luteolina, acacetina, diosmetina e acido rosmarinico

Evaluation d'une méthode de sélection

Objectif

Suite à l'observation de la biologie florale de la sarriette des montagnes et à la création d'un hybride de clone entre un clone MS (mâle stérile) et un clone hermaphrodite, ce projet visait l'évaluation de la méthode de sélection par hybridation de clones. L'hybride 22 (Agroscope) a été comparé avec une obtention commerciale (FENACO) et une autofécondation.

Valutazione di un metodo di selezione

Obiettivi

In seguito all'osservazione della biologia florale della santoreggia montana ed alla creazione di un ibrido di clone tra un MS (maschio sterile) ed un clone ermafrodita, il progetto si proponeva di valutare un metodo di selezione mediante ibridazione di cloni. L'ibrido 22 (Agroscope) è stato raffrontato con un Prodotto commerciale (FENACO) ed un'autofecondazione.





Selection Résultats

Tableau 4.1

Rendements en matière sèche et en matière active de 3 variétés de sarriette des montagnes en 1^e année de culture, Arbaz 2003

Variétés	Répétition	Remarques	Matière sèche g/m ²	H.E. %	Principaux composés %			
					para- Cymène	γ-Terpinène	Thymol	Carvacrol
22 Hybride Agroscope	Moyenne	assez régulier et vigoureux, port oblique	138 ^a	2.03	5.26	12.9	28.1	42.3
Autofécondation	Moyenne	irrégulier, vigueur moyenne, port couché	65 ^b	1.60	4.17	11.5	4.76	62.9
Fenaco	Moyenne	assez régulier et très vigoureux, port érigé. Joli	164 ^a	1.75	4.53	9.87	0.44	74.2

Les petites lettres indiquent les différences significatives (Tukey test)

Conclusions

La méthode de sélection par hybridation de clone est prometteuse. La productivité en matière sèche et la régularité de l'hybride 22 sont clairement supérieures à celles de l'autofécondation du clone parental mâle. Malgré que la différence de productivité en matière sèche entre l'hybride 22 et la variété commerciale FENACO ne soit pas significative (tab.4.1), cette dernière s'est révélée la plus vigoureuse et la plus riche en carvacrol. Elle satisfait entièrement aux attentes des praticiens.

Caractérisation et quantification des actifs présents dans la drogue Objectif

Afin de valoriser les préparations à base de sarriette des montagnes, une identification suivie d'une quantification par épuisement de quelques polyphénols est entreprise sur la drogue (2^e année de récolte, Arbaz 2004). Cette étude cherche à mettre en avant les potentiels anti-radicalaire et anti-inflammatoires de certains composés de la sarriette des montagnes (voir paragraphe: Activités anti-radicalaire et anti-inflammatoires d'extraits bruts et raffinés standardisés).

Matériel et méthodes

Le premier système utilisé est un HP Series 1100 équipé d'un détecteur UV Series 1100 suivi d'un détecteur MS Series 1100 (Agilent Tech. Inc., Palo Alto, USA) et d'une colonne Macherey-Nagel CC 250/4 LiChrospher 100 RP-8 5 µm. Le programme d'élution (tab. 4.2) utilisé est composé d'eau (solvant A), d'une solution aqueuse 0.5% en acide formique p.a. (solvant C) et de méthanol LiChrosolv (solvant D). Le volume d'injection est de 10 µl avec un débit de solvant de 0.85 ml/min. Le signal est mesuré à 340 nm et les séparations sont faites à 25°C. Les paramètres du détecteur de masse sont en mode APCI négatif et positif, domaine de masse 120-1200 m/z, fragmenteur 100. L'appareil est piloté et les signaux acquis à l'aide d'un PC équipé du software Agilent Chemstation for LC/MS version A.08.04 [1008].

Selezione Risultati

Tabella 4.1

Rese di materia secca e principi attivi di 3 varietà di santoreggia montana in un anno di coltivazione, Arbaz 2003

Variétés	Répétition	Remarques	Matière sèche g/m ²	H.E. %	Principaux composés %			
					para- Cymène	γ-Terpinène	Thymol	Carvacrol
22 Hybride Agroscope	Moyenne	assez régulier et vigoureux, port oblique	138 ^a	2.03	5.26	12.9	28.1	42.3
Autofécondation	Moyenne	irrégulier, vigueur moyenne, port couché	65 ^b	1.60	4.17	11.5	4.76	62.9
Fenaco	Moyenne	assez régulier et très vigoureux, port érigé. Joli	164 ^a	1.75	4.53	9.87	0.44	74.2

Le lettere piccole indicano differenze significative (Tukey test)

Conclusioni

Il metodo di selezione mediante ibridazione di clone è promettente. La produttività di materia secca e la regolarità dell'ibrido 22 sono chiaramente superiori all'autofecondazione del clone parentale maschio. Anche se la differenza di produttività di materia secca tra ibridi 22 e la varietà commerciale FENACO non è significativa (tab. 4.1), quest'ultima si è rivelata più vigorosa e più ricca di carvacrolo e soddisfa appieno le aspettative degli operatori.

Caratterizzazione e quantificazione dei principi attivi presenti nella droga Obiettivi

Al fine di valorizzare le preparazioni a base di santoreggia montana, è stato avviato sulla droga un processo d'identificazione seguito da una quantificazione di alcuni polifenoli in ordine decrescente in base alla loro presenza (2^o anno di raccolto, Arbaz, 2004). Lo studio tenta di evidenziare le potenzialità anti radicaliche e antinfiammatorie di alcuni principi attivi della santoreggia montana (vedere paragrafo: Attività anti-radicaliche e antinfiammatorie di estratti grezzi e raffinati standardizzati).

Materiali e metodi

Il primo sistema impiegato è un HP series 1100 dotato di rilevatore UV Series 1100 seguito da un rilevatore MS series 1100 (Agilent Tech. Inc., Palo Alto, USA) e da una colonna Macherey-Nagel CC 250/4 LiChrospher 100 RP-8 5 µm. Il programma di eluzione (tab. 4.2) utilizzato è composto da acqua (solvente A), da una soluzione acquosa 0,5% in acido formico p.a. (solvente C) e metanolo LiChrosolv (solvente D). Il volume di iniezione è pari a 10 µl con un flusso di solvente di 0.85 ml/min. Il segnale è misurato a 340 nm e le separazioni sono eseguite a 25 °C. I parametri del rilevatore di massa sono in modalità APCI negativo e positivo, dominio di massa 120-1200 m/z, frammentatore 100. L'apparecchio è pilotato ed i segnali sono rilevati mediante un PC dotato del software Agilent Chemstation for LC/MS versione A.08.04 [1008].



Tableau 4.2

Gradient d'élution de l'analyse HPLC-MS
et de l'analyse HPLC-DAD avec solvant ABCD

Analyse HPLC-MS				Analyse HPLC-DAD		
temps [min]	A [%]	C [%]	D [%]	temps [min]	A [%]	B [%]
0	65	10	25	0	75	25
10	65	10	25	10	75	25
15	50	10	40	15	60	40
25	45	10	45	30	60	40
35	40	10	50	35	50	50
45	0	10	90	50	10	90
65	0	10	90	-	-	-

Le second système utilisé est un HP 1090 Series II avec un détecteur UV-DAD (Agilent Tech. Inc., Palo Alto, USA) et d'une colonne Macherey-Nagel CC 250/4 LiChrospher 100 RP-8 5 µm. Le programme d'élution (tab. 4.2) utilisé est composé d'une solution aqueuse 0,5 % en acide formique p.a. (solvant A) et de méthanol LiChrosolv (solvant B). Le volume d'injection est de 10 µl avec un débit de solvant de 0.85 ml/min. Le signal est mesuré à 210, 270 et 340 nm pour un balayage de 210 à 510 nm. La séparation a lieu à température ambiante. L'appareil est piloté et les signaux acquis à l'aide d'un PC équipé du software Agilent Chemstation for LC version A.08.03 [847].

La quantité des actifs suivis dans la drogue est déterminée par trois extractions successives sur la même cellule d'extraction par l'intermédiaire d'un extracteur à haute pression ASE 200 (Dionex Corp., Sunnyvale, USA) en milieu éthanolique à 30 % après découpe centrifuge par un broyeur Retsch ZM100 (Retsch GmbH & Co. KG; Haan, Allemagne). Chaque extrait des trois extractions est donc récolté séparément, pesé puis analysé. Une linéarisation permet ensuite de déterminer par extrapolation la quantité initiale de chacun des composés suivis.

Résultats

Les actifs du tableau 4.3 sont identifiés par leur RRT (relative retention time : $RRT = (RT_{comp} - RT_0) / (RT_{ref(*)} - RT_0)$) et leur masse molaire par analyse HPLC-MS, puis les maxima d'absorption confirment l'identification MS par la méthode importée sur HPLC-DAD. Tous les dosages de la caractérisation des extraits sont ensuite réalisés sur l'HPLC-DAD après filtration à 0,45 µm de l'extrait tel quel ou dilué.

Tableau 4.3

Identification de quelques actifs
de sarriette des montagnes, Arbaz 2004

Actifs	HPLC-MS		HPLC-DAD
	RRT [-]	M ⁺ [m/z]	RRT [-]
acide rosmarinique	1,00	361	1,00
diglucuronyl-4,7-lutéoline	0,74	639	0,72
glucuronyl-7-lutéoline	0,97	463	0,96
diosmine	1,24	609	1,29
linarine	1,72	593	1,77

Tabella 4.2

Gradiente di eluzione e analisi HPLC-MS e
analisi HPLC-DAD con solvente ABCD

Il secondo sistema utilizzato è un HP 1090 Series II con un rilevatore UV-DAD (Agilent Tech. Inc., Palo Alto, USA) e una colonna Macherey-Nagel CC 250/4 LiChrospher 100 RP-8 5 µm. Il programma di eluzione (tab. 4.2) utilizzato è composto da una soluzione acquosa 0,5% in acido formico p.a. (solvente A) e metanolo LiChrosolv (solvente B). Il volume d'iniezione è pari a 10 µl con un flusso di solvente di 0.85 ml/mn. Il segnale è misurato a 210, 270 e 340 nm per una scansione da 210 a 510 nm. La separazione ha luogo a temperatura ambiente. L'apparecchio è pilotato ed i segnali acquisiti mediante un PC dotato di software Agilent Chemstation for LC versione A.08.03 [847].

La quantità dei principi attivi monitorata nella droga è determinata mediante tre estrazioni successive sulla stessa cellula con un estrattore ad alta pressione ASE 200 (Dionex Corp., Sunnyvale, USA) in ambiente etanologico al 30%, dopo taglio centrifugo mediante trituratore Retsch ZM100 (Retsch GmbH & Co. KG; Haan, Germania). Ogni estratto risultante dalle tre estrazioni è quindi raccolto separatamente, pesato e poi analizzato. I risultati vengono poi riportati su un grafico e in seguito mediante estrapolazione si determina la quantità iniziale di ogni singolo composto monitorato.

Risultati

I principi attivi della tabella 4.3 sono individuati mediante il loro RRT (relative retention time : $RRT = (RT_{comp} - RT_0) / (RT_{ref(*)} - RT_0)$) e la massa molecolare mediante analisi HPLC-MS. I livelli massimi di assorbimento confermano l'identificazione MS con il metodo importato su HPLC-DAD. Tutti i dosaggi della caratterizzazione degli estratti sono in seguito realizzati sull'HPLC-DAD dopo avere proceduto al filtraggio a 0,45 µm dell'estratto puro o diluito.

Tabella 4.3

Identificazione di alcuni principi attivi
di santoreggia montana, Arbaz 2004



La quantification des actifs de sarriette des montagnes est partielle. Leur dosage présenté au tableau 4.3 se fait donc en équivalent par rapport à un standard dont la structure principale est semblable. Tous les dosages sont faits en absorbance à 340 nm.

Tableau 4.4

Concentration initiale des quelques actifs de sarriette des montagnes, Arbaz 2004

Sarriette des montagnes	Concentration [mg/kg]	Standard
acide rosmarinique	10820	acide rosmarinique
diglucuronyl-4,7-lutéoline	3650	lutéoline
glucuronyl-7-lutéoline	2470	lutéoline
diosmine	1510	lutéoline
linarine	1070	lutéoline

Conclusions

Selon l'analyse de l'épuisement à 340 nm, le composé principal de la sarriette des montagnes (2^e année de récolte, Arbaz 2004) est l'acide rosmarinique, acide phénol présent en une quantité de 1,1 % dans la plante sèche. Le flavonoïde le plus présent est la lutéoline substituée de deux acides glucuroniques avec 0,4 %. Il est encore à noter qu'en plus des composés décrits dans le tableau 4.4, un composé principal supplémentaire de masse atomique 340 u n'a pas pu être identifié.

Activités anti-radicalaire et anti-inflammatoires d'extraits bruts et raffinés standardisés

Matériel et méthodes

Les extraits bruts sont obtenus comme mentionné (voir: Caractérisation et quantification des actifs présents dans la drogue). Au système brut, après filtration à 0,45 µm, est ajoutée une quantité équivalente de n-butanol (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le mélange est agité manuellement pendant quelques minutes, puis l'éthanol évaporé à 40° C et 175 mbar jusqu'à épuisement du distillat. Le résidu obtenu comporte deux phases qui sont séparées et lavées par respectivement environ 20 % des solvants engagés. La phase hydrophobe après concentration est l'extrait raffiné.

L'activité anti-radicalaire est déterminée à partir d'une solution de DPPH (radical diphényl-2,2-picryl-1-hydrazyle; Fluka, St. Louis, USA) à 40 mg/l dans du méthanol (Lavanchy; Prilly, Suisse). 10 ml de cette solution sont placés dans un erlenmeyer et 100 µl d'extrait sont ajoutés. Le mélange est laissé reposé pendant 30 min et l'absorption mesurée dans un spectromètre (Libra S12; BioChrom, Indiana, USA) à 517 nm. Pour le blanc, 100 µl de méthanol sont utilisés à la place de l'extrait et le standard est l'acide rosmarinique (purum; Fluka, St. Louis, USA).

Les activités anti-inflammatoires sont déterminées par inhibition enzymatique à partir de kits standardisés (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Les inhibitions de la 15-lipoxygénase (kit 760700) et des cyclo-oxygénases (kit 560131) sont comparées aux valeurs obtenues avec les standards acide caféique (> 98 %; Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) et indométacine (p.a.; Cayman Chemical, Ann Arbor, USA).

La quantification des principes actifs de santoreggia montana est partielle. Il leur dosage présenté dans la table 4.3, pur essendo parziale, è in equivalenti rapportati ad uno standard con struttura principale simile. Tutti i dosaggi sono fatti ad un'assorbanza di 340 nm.

Tabella 4.4

Concentrazione iniziale di alcuni principi attivi di santoreggia montana, Arbaz 2004

Sarriette des montagnes	Concentration [mg/kg]	Standard
acide rosmarinique	10820	acide rosmarinique
diglucuronyl-4,7-lutéoline	3650	lutéoline
glucuronyl-7-lutéoline	2470	lutéoline
diosmine	1510	lutéoline
linarine	1070	lutéoline

Conclusioni

Eseguito delle estrazioni successive allo sfinimento a 340 nm e analizzandole, il composto principale della santoreggia montana (2° anno di raccolto, Arbaz 2004) risulta essere l'acido rosmarinico, l'acido fenolico è presente in una quantità dell'1,1%, nella pianta essiccata. Il flavonoide maggiormente presente è la luteolina sostituita da acidi glucuronici allo 0,4%. Va notato ancora che oltre ai composti descritti nella tabella 4.4, non è stato possibile identificare un composto principale supplementare di massa atomica 340 u.

Attività anti-radicalica e anti-infiammatoria di estratti grezzi e raffinati standardizzati

Materiali e metodi

Gli estratti grezzi sono ottenuti come indicato (veda-si: Caratterizzazione e quantificazione dei principi attivi presenti nella droga). Al sistema grezzo, dopo avere proceduto al filtraggio a 0,45 µm, viene aggiunta una quantità di volume equivalente di n-butanol (Merck, Darmstadt, Germania). La miscela è sottoposta ad agitazione manuale per qualche minuto, successivamente viene fatto evaporare l'etanolo a 40° C e 175 mbar fino ad esaurimento del distillato. Il residuo ottenuto dà luogo a due fasi che vengono separate e lavate rispettivamente da circa 20% dei solventi impiegati. La fase idrofoba dopo concentrazione origina l'estratto raffinato.

L'attività anti-radicalica è determinata da una soluzione di DPPH (radical diphényl-2,2-picryl-1-hydrazyle; Fluka, St. Louis, USA) a 40 mg/l in méthanol (Lavanchy; Prilly, Svizzera). 10 ml di tale soluzione sono posti in un erlenmeyer a cui si aggiungono 100 µl d'estratto. La miscela è lasciata a riposo per 30 minuti e l'assorbimento misurato in uno spettrometro (Libra S12; BioChrom, Indiana, USA) a 517 nm. Per il bianco sono utilizzati 100 µl di metanolo invece dell'estratto e lo standard è l'acido rosmarinico (purum; Fluka, St. Louis, USA).

Le attività anti-infiammatorie sono determinate mediante inibizione enzimatica a partire da kit standardizzati (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Le inibizioni della 15-lipossigenasi (kit 760700) e delle ciclo-ossigenasi (kit 560131) sono raffrontate ai valori ottenuti con gli standard acido caffeico > 98%; Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) e indometacina (p.a.; Cayman Chemical, Ann Arbor, USA).



Résultats

Tableau 4.5

Activités d'extraits
de sarriette des montagnes, Arbaz 2004

		Activité anti-radicalaire	Activités anti-inflammatoires		
		EC50 _{DPPH} [µgMS/ml]	IC50 _{COX1} [µgMS/ml]	IC50 _{COX2} [µgMS/ml]	IC50 _{15-LO} [µgMS/ml]
Extrait brut		26,7	7600	7600	20900
Extrait aqueux		26,4	-	-	-
Extrait raffiné		7,3	-	-	47500
Références	indométacine	-	103	109	-
	acide caféique	-	-	-	0,9
	acide rosmarinique	3,6	-	-	-

Les valeurs EC50 respectivement IC50 sont les concentrations en matière sèche auxquelles 50 % de réaction respectivement 50 % d'inhibition sont produites (tab. 4.5). Les extraits raffinés de sarriette des montagnes montrent des propriétés anti-radicales intéressantes dont l'origine est à attribuer à leur concentration importante en acide rosmarinique, tandis que les extraits bruts participent fortement à l'inhibition enzymatique dans la biosynthèse des prostaglandines, contrairement à celle des lipoxines. L'origine de cette inhibition devrait être la présence marquée de dérivés de l'acacétine et de la lutéoline.

Conclusions

En comparaison avec d'autres extraits bruts ou raffinés de plantes, les résultats obtenus placent la sarriette des montagnes dans le peloton de tête des plantes médicinales ou aromatiques suite aux teneurs et qualités intéressantes en acides phénols et flavonoïdes présents. L'élaboration d'extraits purs de sarriette des montagnes est donc prometteur. Une attention toute particulière devrait être donnée à leurs propriétés antioxydante et anti-radicalaire.

Optimisation de l'extraction aqueuse

Objectifs

Comme les actifs polyphénoliques présents dans la sarriette des montagnes sont solubles à l'eau, en particulier les dérivés rutinosyles et glucuronyles flavoniques, une étude sur leur extraction aqueuse par macération agitée est entreprise afin de simplifier le procédé de mise en solution des actifs et, de ce fait, valoriser les préparations à base de sarriette des montagnes pour des applications en cosmétique.

Résultats

Les extraits aqueux obtenus sont caractérisés par leurs taux de recouvrement U [%], qui sont les pourcentages d'actifs extraits relatif à leur valeur initiale dans la plante, et par leurs sélectivités σ [-] représentées par des facteurs de concentration. Deux techniques d'extraction aqueuse semblables sont comparées, soit la première en macération standard (batch) et la seconde en continu. Les paramètres principaux étudiés (tab. 4.6) sont le temps t [h] et la température d'extraction T [°C], le coefficient de cisaillement ζ [%] et la vitesse de rotation des vis (i/t)

Risultati

Tabella 4.5

Attività degli estratti
di santoreggia montana, Arbaz 2004

I valori EC50 e IC50 sono le concentrazioni di materia secca alle quali sono prodotti rispettivamente il 50% di reazione il 50% d'inibizione (tab. 4.5). Gli estratti raffinati di santoreggia montana mostrano proprietà anti-radicali interessanti la cui origine va attribuita all'importante concentrazione di acido rosmarinico. Gli estratti grezzi, invece, contribuiscono fortemente all'inibizione enzimatica nella biosintesi delle prostaglandine, contrariamente a quella delle lipossine. L'origine di questa inibizione dovrebbe essere la notevole presenza di derivati di acacetina e luteolina.

Conclusioni

Rispetto ad altri estratti grezzi o raffinati di piante, i risultati ottenuti indicano che la santoreggia montana è tra le migliori piante medicinali od aromatiche dati i tenori e la qualità interessanti degli acidi fenolici e flavonoidici. Per la santoreggia montana, l'elaborazione di estratti puri è quindi promettente. Un'attenzione particolare meritano le proprietà anti-ossidanti e anti-radicali.

Ottimizzazione dell'estrazione acquosa

Obiettivi

Dato che i principi attivi polifenolici presenti nella santoreggia montana sono solubili in acqua, in particolare i derivati rutinosilici e glucuronilici flavonici, è stato avviato uno studio sull'estrazione acquosa mediante macerazione agitata per semplificare il processo di messa in soluzione dei principi attivi e, quindi, valorizzare i preparati a base di santoreggia montana per applicazioni nel settore della cosmesi.

Risultati

Gli estratti acquosi ottenuti sono caratterizzati dal relativo tasso di copertura U[%], che è la percentuale di principi attivi estratti relativa al suo valore iniziale nella pianta, e dalla selettività σ [-] rappresentata da un fattore di concentrazione. Sono raffrontate due tecniche simili di estrazione acquosa: la prima in macerazione standard (batch) e la seconda in continuo. I principali parametri studiati (tab. 4.6) sono il tempo t [h] e la temperatura d'estrazione T[°C], il coefficiente di taglio ζ [%] e la velocità di rotazione delle viti (i/t) [min⁻¹].

