

OpThymus

Piante officinali e territorio: attività innovative per lo sviluppo e la valorizzazione della filiera dei timi spontanei delle Alpi occidentali



Relazione finale redatta nel dicembre 2021 da Francesca **Madormo**, Laura **Thedy** e Mauro **Bassignana** (Institut Agricole Régional), con l'essenziale contributo di Sophie **Ghirardi** (consulente), Valentina **Scariot** e Michele **Lonati** (DISAFA) e Luca **Merisi** (La Maison du Bien Boire).

Sommario

1.	Il progetto OpThymus: contesto, obiettivi, partner e collaboratori	2
1.1.	Nota introduttiva	2
1.2.	Contesto	2
1.3.	Obiettivo	3
1.4.	Partner e collaboratori	3
2.	Metodologia adottata	4
2.1.	Identificazione e raccolta di popolazioni di timo sul territorio valdostano	4
2.1.1.	Campionamento del materiale vegetale	6
2.1.2.	Essiccazione	6
2.1.3.	Raccolta del materiale vegetale per la propagazione	6
2.2.	Allestimento dei campi sperimentali	6
2.3.	Estrazione e caratterizzazione dell'olio essenziale	8
2.3.1.	Estrazione dell'olio essenziale	8
2.3.2.	Caratterizzazione dell'olio essenziale	9
2.4.	Estrazione e caratterizzazione fitochimica degli estratti vegetali	9
2.4.1.	Essiccazione	9
2.4.2.	Estrazione a ultrasuoni	10
2.4.3.	Decozione	10
2.4.4.	Analisi spettrofotometriche	10
2.5.	Valutazione dell'efficacia antibatterica degli oli essenziali di timo	11
2.6.	Produzione di liquore e analisi sensoriale	14
3.	Risultati	15
3.1.	Cure colturali e potenziale ornamentale	15
3.1.1.	Campo sperimentale in Valle d'Aosta	15
3.1.2.	Campo sperimentale in Piemonte	16
3.2.	Olio essenziale da timi autoctoni	17
3.2.1.	Distillazione dell'olio essenziale	17
3.2.2.	Caratterizzazione dell'olio essenziale	18
3.3.	Valutazione dell'efficacia antibatterica degli oli essenziali di timo e degli estratti acquosi ²⁴	24
3.3.1.	Valutazione degli aloni di inibizione	24
3.3.2.	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) e Minimum Bactericidal Concentration (MBC)	25
3.4.	Estratti vegetali da timi autoctoni e caratterizzazione	26
3.4.1.	Confronto tra due metodi di essiccazione	26
3.4.2.	Contenuto totale di polifenoli (metodo Folin- Ciocâlteu)	27
3.4.3.	Attività antiossidante (metodo FRAP)	29
3.4.4.	Attività antiossidante (metodo ABTS)	30
3.4.5.	Attività antiossidante (metodo DPPH)	31
3.5.	Liquori a base di timo	33
4.	Comunicazione dei risultati del progetto	36
5.	Conclusioni	37
6.	Bibliografia	40
7.	Allegato 1. Comunicazione di accettazione dell'erogazione	42
8.	Allegato 2. Risultati delle analisi sensoriali sui liquori a base di timo	44

1. Il progetto OpThymus: contesto, obiettivi, partner e collaboratori

1.1. Nota introduttiva

Il lavoro svolto nell'ambito del progetto OpThymus è stato realizzato grazie al contributo economico della **Fondazione Cassa di Risparmio di Torino**, il cui supporto è stato determinante nel sostenere le spese e, di conseguenza, raggiungere gli obiettivi.

Come da nostra comunicazione del 23/01/2019 (vedi Allegato 1), l'assegnazione di un contributo sensibilmente inferiore a quello richiesto ha reso necessaria una rimodulazione economica del progetto, contenendo il numero di accessioni di timo prese in considerazione, ma mantenendo invariati gli obiettivi del progetto, la sua articolazione temporale e le attività prestabilite.

Il progetto, avviato nel 2019, avrebbe dovuto concludersi nel dicembre 2020. A fronte dell'emergenza sanitaria, la Fondazione CRT ha reso possibile un differimento di un anno della data di chiusura del progetto, portandola a dicembre 2021.

Nei file allegati sulla piattaforma di rendicontazione <https://rol.fondazionecrt.it> sono riportate dettagliatamente le attività di comunicazione messe in atto, nonché tutti i documenti di carattere amministrativo relativi alla realizzazione del progetto.

1.2. Contesto

I prodotti derivati dalla coltivazione e dalla trasformazione delle piante officinali stanno riscontrando un crescente interesse da parte dei consumatori, sempre più attenti al benessere, ai prodotti naturali e alla loro origine. Il timo, in particolare, ha numerosi impieghi: può essere utilizzato come pianta viva nel settore alimentare, in porzioni fresche o essiccate nell'industria alimentare e liquoristica e come olio essenziale nell'industria cosmetica e profumiera. Proprio l'olio essenziale risulta avere spiccate proprietà antisettiche e antibatteriche, trovando impiego nella cura di problematiche del tratto gastro-intestinale, oro-faringeo e cutaneo.

Le specie del genere *Thymus* presenti lungo l'arco alpino occidentale sono numerose, di difficile riconoscimento e con caratteristiche chimico-organolettiche diverse.

Di fatto, il *T. vulgaris* è la specie più facilmente distinguibile e più utilizzata a livello alimentare. In Valle d'Aosta è diffusa soprattutto sulla sinistra orografica della valle centrale, da Verrès a Quart, con stazioni isolate in altre zone. Cresce da 375 a 1600 m s.l.m. e forma fitti e bassi cespugli in zone aride e soleggiate.

Il *T. serpyllum* costituisce, invece, un gruppo polimorfo di specie. In Valle d'Aosta sono frequenti *T. praecox* subsp. *polytrichus*, dai fusti lungamente reptanti e peli deflessi, e *T. pulegioides*, i cui fusti si presentano pseudoreptanti e pelosi solo sugli angoli; queste due specie si distribuiscono da 500 fino a quasi 3000 m s.l.m. soprattutto in ambienti aridi.

1.3. Obiettivo

L'obiettivo del progetto OpThymus è la valorizzazione dei timi autoctoni dell'arco alpino occidentale attraverso la loro coltivazione, la caratterizzazione e la valutazione dell'efficacia antibatterica dell'olio essenziale, la caratterizzazione e la valutazione delle potenzialità antiossidanti degli estratti vegetali, la valutazione delle potenzialità liquoristiche, allo scopo di contribuire all'innovazione di prodotto e di processo nel settore delle piante officinali e di fornire informazioni tecniche alle aziende di trasformazione locali.

1.4. Partner e collaboratori

Partner del progetto sono l'Institut Agricole Régional (capofila) e l'Università degli Studi di Torino - Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari. Al progetto hanno collaborato altri soggetti con professionalità specifiche:

- il *Parco Nazionale Gran Paradiso* ha messo a disposizione le competenze botaniche della dott.ssa Laura Poggio e del dott. Andrea Mainetti per l'individuazione e il riconoscimento delle specie di timo spontanee in Valle d'Aosta e ha allestito il campo sperimentale di timo a Campiglia (Valprato Soana, TO);
- il vivaio *Vivai valdostani* di Sarre ha effettuato la propagazione del materiale vegetale raccolto allo stato spontaneo;
- la *Fondazione Sistema Ollignan Onlus* ha messo a disposizione il terreno per il campo sperimentale di timo e ha collaborato alla coltivazione; ha inoltre ospitato l'evento finale di presentazione dei risultati del progetto;
- il liquorificio *La Maison du Bien Boire* ha prodotto i liquori sperimentali.

2. Metodologia adottata

2.1. Identificazione e raccolta di popolazioni di timo sul territorio valdostano

La raccolta spontanea di specie vegetali in Valle d'Aosta è regolamentata dalla Legge Regionale n. 45 del 7 dicembre 2009 "Disposizioni per la tutela e la conservazione della flora alpina", con relativi allegati.

Della specie *T. vulgaris*, che rientra nell'Allegato D "Specie per uso officinale a raccolta regolamentata" è consentita la raccolta di non più di 200 g di fiori e foglie a persona.

I timi del gruppo serpillone (*Thymus serpyllum* aggr.) rientrano nell'Allegato E "Specie di flora spontanea autoctona", la cui raccolta, ad uso familiare, commestibile od officinale, non è soggetta a limitazioni.

Sulla base di attività sperimentali svolte dall'Institut Agricole Régional, sono state selezionate 2 popolazioni di *Thymus vulgaris*, una nel comune di Quart, in località Vignolaz, l'altra a Saint-Denis, in località Grand Bruson (Tab. 1 e Fig. 1). La classificazione delle fasce di vegetazione (fasce bioclimatiche) secondo Pignatti (1979) colloca queste aree nella "fascia montana inferiore". Entrambi i siti sono localizzati sul versante esposto a sud/sud-ovest della valle centrale della Valle d'Aosta. Il sito di Saint-Denis si trova in prossimità della Zona Speciale di Conservazione (ZSC) IT1205090. I siti di raccolta ricadono nell'habitat "6110 Formazioni erbose rupicole calcicole e basofile dell'*Alyso-Sedion albi*", ovvero in prati xerotermofili discontinui, colonizzati da vegetazione pioniera di terofite e di succulente, con muschi calciofili e licheni.

Tabella 1. Luoghi, altitudine e date di raccolta delle 3 specie di timo spontaneo (coordinate geografiche WGS84)

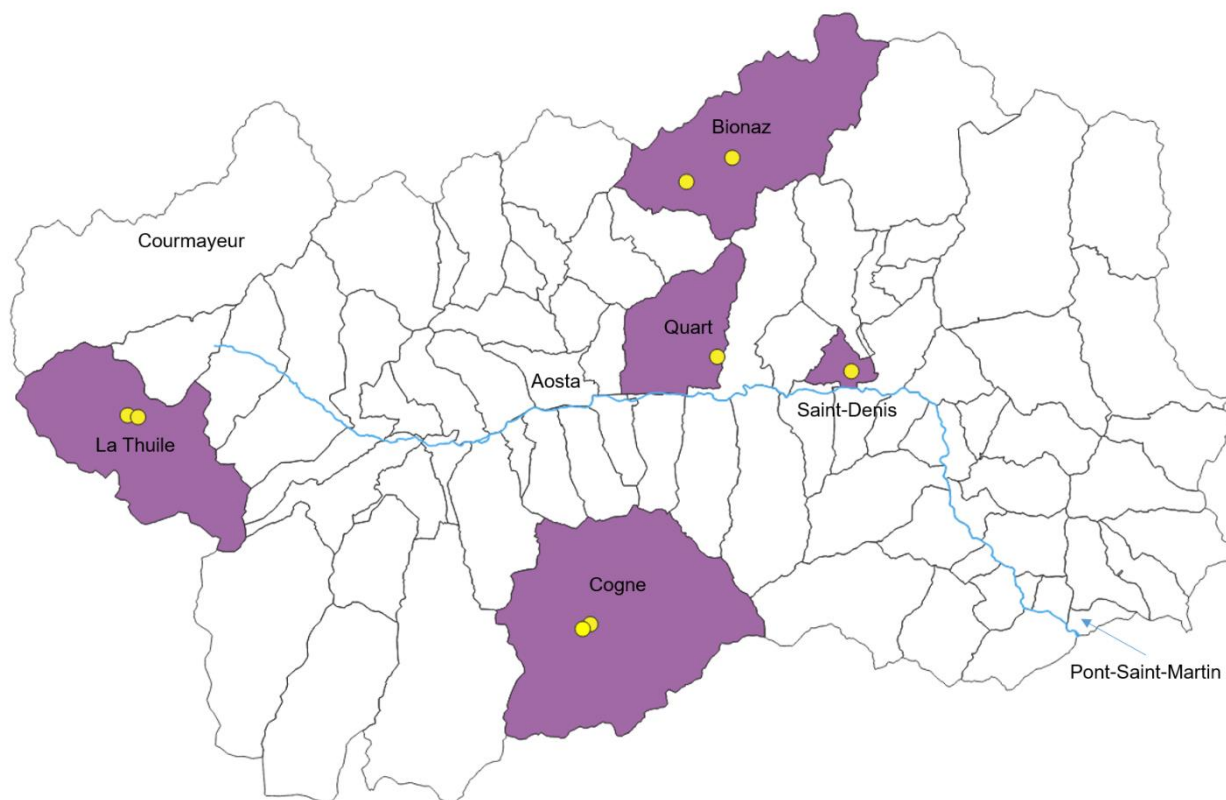
Specie	Comune	Località	Data raccolta	Lon.	Lat.	Altitudine (m s.l.m.)
<i>Thymus vulgaris</i>	Quart	Vignolaz	30/04/2019	7,45708	45,7635	1038
	Saint-Denis	Grand Bruson	21/05/2019	7,58167	45,7558	1193
<i>Thymus praecox</i>	Bionaz	Chamin e Léchère	04/07/2019	7,4675	45,8928	1794
	Cogne	Valnontey	04/07/2019	7,34461	45,5885	1676
	La Thuile	Pont Serrand e Alpe Orgères	04/07/2019	6,91214	45,7169	1892
<i>Thymus pulegioides</i>	Bionaz	Chamin e Léchère	17/07/2019	7,42539	45,8766	1662
	Cogne	Valnontey	17/07/2019	7,33761	45,5853	1684
	La Thuile	Pont Serrand e Alpe Orgères	17/07/2019	6,92183	45,7159	1763

Per le specie del gruppo serpillone, sono state selezionate 3 popolazioni di *Thymus praecox* e 3 popolazioni di *Thymus pulegioides* a Cogne in loc. Valnontey, a La Thuile tra Pont Serrand e l'Alpe Orgères e a Bionaz tra Chamin e Léchère; in ogni zona di raccolta erano presenti entrambe le specie del gruppo serpillone. Le zone scelte sono situate a quote più

elevate rispetto a *T. vulgaris* (tra 1670 e 1905 m) e localizzate nella “Fascia subalpina”. Il sito di raccolta di Cogne si trova all’interno del Parco Nazionale del Gran Paradiso (ZSC IT1201000) e la raccolta è stata realizzata previa autorizzazione da parte dello stesso Ente gestore. Entrambe le due specie crescono in condizioni xeriche, esposte a Sud. Nei siti di raccolta si nota una parziale differenziazione ecologica nell’habitat ottimale di crescita, che potrebbe avere ripercussione pratiche nelle tecniche di coltivazione delle due specie: *T. praecox* predilige habitat rocciosi, macereti, rupi, ecc., mentre *Thymus pulegioides* predilige habitat erbosi secchi (es. pascoli e praterie aride, a dominanza di *Bromus erectus* o altre graminee termo-xerofile).

Il riconoscimento delle specie oggetto di studio si è basato sui caratteri morfologici descritti nella recente revisione del genere *Thymus* in Italia (Bartolucci, 2018; Bartolucci, 2019). Tutti i campioni di erbario sono stati raccolti con la supervisione di Fabrizio Bartolucci (Università di Camerino, Centro Ricerche Floristiche dell’Appennino, Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga), che ha confermato la corretta determinazione.

Figura 1. Localizzazione delle zone di raccolta delle tre specie di timo spontaneo; i punti gialli corrispondono alle zone di prelievo del materiale vegetale; le aree viola corrispondono ai territori dei Comuni di raccolta.



2.1.1. Campionamento del materiale vegetale

Per ogni specie e popolazione precedentemente indicata, il campionamento del materiale vegetale è avvenuto durante il periodo di fioritura. Sono stati prelevati gli apici durante la piena fioritura. All'arrivo sui siti del campionamento si è proceduto con la divisione dell'area in 3 appezzamenti, con registrazione della posizione tramite GPS. Durante la raccolta il materiale vegetale è stato pesato e segnato con cartellini identificativi. Al termine del campionamento si è proceduto a riporre i campioni all'interno di borse termiche che ne assicurassero il trasporto fino alle strutture del Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali dell'Università di Torino.

Per gli approfondimenti analitici previsti da questa ricerca, sono state campionate diverse popolazioni per ciascuna delle tre specie oggetto di studio. La prima ad aver raggiunto il momento ottimale di raccolta, corrispondente alla fioritura, è stata il *T. vulgaris* di Quart, raccolto ad aprile 2019, seguita dal *T. vulgaris* di Saint-Denis, raccolto a maggio. Nel luglio 2019 sono stati raccolti i timi del gruppo serpillone: il *T. praecox* subsp. *polytrichus* è stato raccolto una settimana prima rispetto al *T. pulegioides* in tutte le aree selezionate (Bionaz, Cogne e La Thuile).

2.1.2. Essiccazione

Subito dopo la raccolta, il materiale vegetale è stato collocato in essiccatoi a temperatura ambiente (essiccazione naturale), per 2-3 settimane, con rivoltamento manuale periodico. Il materiale vegetale essiccato è stato destinato alla distillazione e alla preparazione di liquori.

2.1.3. Raccolta del materiale vegetale per la propagazione

Il prelievo del materiale vegetale per la propagazione in vivaio è avvenuto a fine agosto (19 e 20 agosto 2019), negli stessi luoghi oggetto della raccolta degli apici fiorali. Sono state prelevate un centinaio di talee per ogni specie presa in esame, costituite da 10-15 cm di parti erbacee e, nel caso del *T. vulgaris*, anche di parti legnose. Il materiale prelevato è stato mantenuto al fresco fino alla consegna presso i Vivai Valdostani di Sarre. In ogni alveolo è stata collocata una sola talea, con un totale di circa 100 piantine radicate per ogni specie. Le piante sono state mantenute in vivaio fino alla primavera successiva.

2.2. Allestimento dei campi sperimentali

Il materiale propagato è stato utilizzato per l'allestimento di due campi sperimentali, uno in Valle d'Aosta, l'altro in Piemonte.

In Valle d'Aosta, il campo è situato nel Comune di Quart, presso i terreni della Fondazione Sistema Ollignan Onlus, a 700 m s.l.m., con esposizione Sud.

Il trapianto è avvenuto a inizio giugno 2020, in ritardo rispetto a quanto programmato, a causa di impedimenti derivanti dall'emergenza sanitaria. Sono state messe a dimora, su telo pacciamante, oltre 400 piantine, delle diverse popolazioni di ciascuna delle tre specie (Tab. 2 e Fig. 2).

Tabella 2. Impianto delle 3 specie di timo autoctono presso Quart (AO).

Specie	Provenienza	N. piante	Sesto d'impianto
<i>T. praecox</i>	Bionaz	57	30 cm x 60 cm
	Cogne	"	"
	La Thuile	"	"
<i>T. pulegioides</i>	Bionaz	57	"
	Cogne	"	"
	La Thuile	"	"
<i>T. vulgaris</i>	Quart	51	30 cm x 35 cm
	Saint-Denis	"	"

Figura 2. Trapianto delle 3 specie di timo autoctono presso Quart (AO).



In Piemonte, le specie oggetto di studio sono state messe a dimora in un'area sperimentale (Fig. 3) presso il centro visitatori del Parco Nazionale Gran Paradiso "L'uomo e i coltivi" (Campiglia Soana, TO), in sinergia con il progetto *Camp2it - Coltivi Innovativi e Tradizionali per lo sviluppo rurale in Aree Montane*, finanziato dalla Fondazione CRT (n. 2019.0479).

A settembre 2020 è stata valutata la dimensione di 3 piante per specie, misurandone il diametro maggiore e quello minore; l'altezza è stata misurata solo in *T. vulgaris*, in quanto parametro di difficile valutazione in *T. pulegioides* e *T. praecox*, specie dal portamento strisciante. Inoltre, è stato valutato il colore del fogliame e dei fiori, determinato mediante le carte colorimetriche della Royal Horticultural Society (RHS).

Figura 3. Area sperimentale di timo a Campiglia Soana (TO). Nelle tre fasce centrali sono stati messi a dimora i timi oggetto di studio.



2.3. Estrazione e caratterizzazione dell'olio essenziale

2.3.1. Estrazione dell'olio essenziale

Per l'estrazione dell'olio essenziale è stata applicata una distillazione in corrente di vapore utilizzando un'apparecchiatura di tipo Clevenger (Clevenger, 1928) (Fig. 4). La metodica di estrazione è stata messa a punto utilizzando *T. vulgaris* autoctono e *T. vulgaris* commerciale proveniente da un campo coltivato presso i terreni della Fondazione Sistema Ollignan Onlus.

Ogni distillazione è partita da 35-40 g di timo essiccato (foglie e fiori), posti in 600 ml di acqua; per ogni campione sono state svolte tre distillazioni.

Per i campioni di *T. vulgaris* la distillazione è durata mediamente 2 ore, mentre per i campioni di *T. praecox* e *T. pulegioides* è durata mediamente 3 ore.

Gli oli essenziali sono stati stoccati in frigo e, in seguito, consegnati al laboratorio chimico dell'Institut Agricole Régional per le analisi di caratterizzazione e al laboratorio chimico del DISAFA dell'Università degli Studi di Torino per la valutazione dell'efficacia antibatterica.

Figura 4. Olio essenziale di timo distillato con apparecchiatura Clevenger.



2.3.2. Caratterizzazione dell'olio essenziale

Nell'ottica della valorizzazione della filiera dei timi spontanei della regione Valle d'Aosta, si è proceduto alla caratterizzazione dell'olio essenziale estratto dalle differenti accessioni, provenienti dalle colonie spontanee selezionate, utilizzando la gascromatografia sia a ionizzazione di fiamma (GC/FID) che accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS).

Inizialmente, sono stati separati e identificati i composti organici volatili costituenti tutti gli oli essenziali estratti in triplo da ciascun campione in esame, mediante la tecnica cromatografica GC/MS (Thermo Fisher Scientific Trace1300 - TSQ9000) secondo il metodo descritto da Pavela *et al.* (2019), con una colonna HP-5ms (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,10 µm f. t., Agilent). I composti individuati per ciascuna specie sono stati raggruppati e classificati in base alla loro struttura chimica, in monoterpeni, monoterpeni ossigenati, sesquiterpeni, sesquiterpeni ossigenati, composti fenolici ed altri composti. Successivamente i composti volatili identificati, sono stati quantificati, in triplo per ciascuna delle tre ripetizioni di olio essenziale ottenuto da ciascun campione raccolto, tramite analisi GC/FID (Thermo Fisher Scientific Trace1300) utilizzando la stessa colonna capillare e le stesse condizioni cromatografiche applicate per l'analisi qualitativa. I risultati sono stati espressi come area percentuale relativa al totale delle sostanze identificate.

2.4. Estrazione e caratterizzazione fitochimica degli estratti vegetali

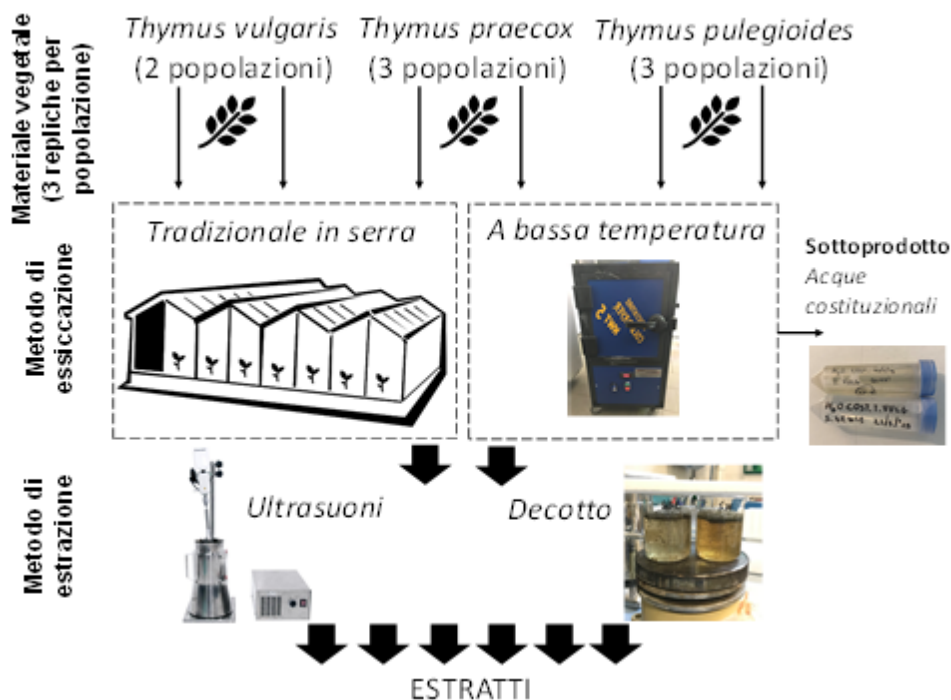
2.4.1. Essiccazione

Il materiale vegetale appartenente alle tre specie raccolto nei diversi siti è stato essiccato attraverso due diverse modalità: tramite essiccazione tradizionale in serra e tramite un essiccatore a bassa temperatura. Il materiale ottenuto da entrambe le essiccazioni è stato usato per produrre degli estratti vegetali mediante la tecnica degli ultrasuoni e la decozione (Figura 5).

L'essiccazione tradizionale in serra è stata effettuata all'interno di una serra del DISAFA, che presenta un buon ricircolo d'aria e una schermatura dai raggi diretti del sole, tramite telo ombreggiante. In tre repliche per ogni popolazione è stato rilevato il peso fresco ed il peso del materiale dopo essiccazione.

L'essiccazione a bassa temperatura è avvenuta utilizzando un essiccatore MOD. NWT-5 (NORTH WEST TECHNOLOGY, Boves, CN) in dotazione del DISAFA. Si tratta di un sistema più rapido del metodo tradizionale. L'essiccatore a freddo, tramite un sistema di circolazione di aria deumidificata, permette di ridurre il tempo di essiccazione a circa 24 ore, con temperature più contenute e stabili (circa 30-35 °C). Altri vantaggi di questa metodologia sono l'uniformità del risultato e la maggiore qualità del prodotto finale. Mediante questa tecnologia, inoltre, è possibile il recupero dell'acqua libera proveniente dalla disidratazione del materiale vegetale, definita "acqua costituzionale". Al termine di ogni ciclo di essiccazione, per ogni specie e popolazione sono stati raccolti almeno 200 ml di acqua costituzionale, che è stata conservata a -20 °C fino al momento delle analisi.

Figura 5. Schema di flusso delle attività condotte dal DISAFA per la produzione di estratti vegetali a partire dalla specie oggetto di studio.



2.4.2. Estrazione a ultrasuoni

I campioni di timo, ottenuti sia da essiccazione tradizionale che a bassa temperatura, sono stati polverizzati mediante l'uso di mortaio e pestello. Successivamente, sono stati posti 0,25 g di campione in 50 ml di acqua deionizzata all'interno di un estrattore ad ultrasuoni (Reus sarl, Drap, France) a una frequenza di 23 KHz per 15 minuti. La soluzione ottenuta dall'estrazione è stata filtrata con carta da filtro e successivamente riposta in congelatore a -20 °C per la conservazione fino alle analisi.

2.4.3. Decozione

Il decotto è stato preparato aggiungendo 1 grammo di campione essiccato (ottenuto da entrambe le tecniche di essiccazione precedentemente descritte) in 200 ml di acqua deionizzata, portata a ebollizione per 5 minuti. Dopo 20 minuti di raffreddamento, il decotto è stato filtrato con carta da filtro. Anche questi estratti sono stati conservati a -20 °C fino al momento delle analisi.

2.4.4. Analisi spettrofotometriche

Per valutare le caratteristiche fitochimiche degli estratti ottenuti dalle popolazioni delle tre specie studiate, i campioni sono stati sottoposti a diverse analisi spettrofotometriche usando lo strumento Cary 60 UV-VIS (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Determinazione del contenuto totale di polifenoli (metodo Folin-Ciocalteu)

Il metodo utilizzato per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) è basato sull'attività colorimetrica del Folin-Ciocalteu (reagente formato da due complessi: acidi fosfomolibdeno e fosfotungsteno) e sulla determinazione spettrofotometrica a 765 nm (Demasi, 2021). La curva di calibrazione standard è stata tracciata utilizzando acido gallico a concentrazioni di 0,02-0,1 mg/ml e i risultati sono stati espressi come mg di equivalenti di acido gallico (GAE) per 100 g di peso secco (PS).

Determinazione dell'attività antiossidante (metodo FRAP)

La determinazione dell'attività antiossidante dei campioni presi in esame è stata valutata tramite saggio FRAP-*Ferric Ion Reducing Antioxidant Power* (Demasi, 2021). Il metodo si basa sul trasferimento degli ioni ferro da Fe^{3+} a Fe^{2+} che, a pH basso e in presenza di TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazina), dopo aver mantenuto i campioni al buio a 37 °C per 30 minuti, creano un complesso che assume una colorazione blu. L'assorbanza delle soluzioni viene registrata a 595 nm e i risultati vengono espressi come millimoli di Fe^{2+} equivalenti per chilogrammo di peso secco.

Determinazione dell'attività antiossidante (metodo ABTS)

Il metodo ABTS permette di valutare la capacità antiossidante attraverso l'abilità di rimozione radicalica da parte del catione radicalico ABTS° (acido 2,2-azinobis-3-eilbenzotiazoline-6-solfonico) (Demasi, 2021). Il catione radicalico è caratterizzato da un'intensa colorazione blu-verde e l'assorbanza del campione viene letta ad una lunghezza d'onda di 734 nm, che permette di ottenere la percentuale di inibizione del ABTS operata dal campione. Mediante comparazione con una retta di taratura costruita con diverse concentrazioni di Trolox è stato possibile quantificare la capacità antiossidante dei campioni analizzati.

Determinazione dell'attività antiossidante (metodo DPPH)

Analogamente al metodo ABTS, il metodo DPPH valuta la capacità antiossidante attraverso l'abilità di rimozione radicalica da parte del catione radicalico DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) (Demasi, 2021). Il catione radicalico è caratterizzato da un'intensa colorazione blu-viola e l'assorbanza del campione viene letta ad una lunghezza d'onda di 515 nm, che permette di ottenere la percentuale di inibizione di DPPH operata dal campione. Mediante comparazione con una retta di taratura costruita con diverse concentrazioni di Trolox è possibile quantificare la capacità antiossidante dei campioni analizzati.

2.5. Valutazione dell'efficacia antibatterica degli oli essenziali di timo

Gli oli essenziali distillati nel laboratorio dell'Institut Agricole Régional sono stati oggetto di approfondimento sulla loro attività batterica; l'attività antifungina non è stata valutata a causa della bassa resa di estrazione, che non ha consentito di ottenere i quantitativi di olio necessari. Di seguito si riportano quindi le metodologie applicate.

L'attività antibatterica degli oli di timo è stata testata su cinque ceppi di batteri di interesse per l'industria alimentare, in particolare:

- *Bacillus cereus* (alterante degli alimenti);
- *Bacillus subtilis* (alterante degli alimenti);
- *Listeria monocytogenes* (patogeno);
- *Pseudomonas fluorescens* (alterante degli alimenti);
- *Yersinia enterocolitica* (patogeno).

Sono state utilizzate due metodiche di diffusione su piastra Petri (Boukhatem, 2014):

- Pozzetti (Fig. 6): formazione di due pozzetti sull'agar solidificato in cui è stato inoculato il batterio (concentrazione di 10^7 CFU/ml); inserimento di 30 μ l di olio da testare in un pozzetto e 30 μ l di acqua (controllo negativo) nell'altro; incubazione a 30 °C (*P. fluorescens*), o 37 °C (*B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*) per 24 h; misurazione del diametro dell'alone di inibizione della crescita batterica formatosi intorno al pozzetto.
- Diffusione dei vapori (Fig. 7): solidificazione dell'agar in cui è stato inoculato il batterio (concentrazione di 10^7 CFU/ml); capovolgimento della piastra Petri; posizionamento di 20 μ l di olio sul coperchio della piastra Petri; sigillatura piastre e incubazione a 30 °C (*P. fluorescens*) o 37 °C (*B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*) per 24 h; misurazione del diametro dell'alone di inibizione della crescita batterica formatosi sul terreno agarizzato.

Per ogni ceppo batterico e per ogni specie di timo sono state eseguite 3 repliche (3 piastre). Per confrontare i risultati ottenuti è stato testato anche un olio commerciale di *T. vulgaris* (KOS s.r.l., Comeana - PO) con le stesse metodiche, usato come controllo positivo.

La metodica dei pozzetti è stata anche utilizzata per testare l'efficacia antibatterica degli estratti acquosi delle specie oggetto di studio.

Figura 6. Metodica dei pozzetti in piastra Petri. Rappresentazione grafica tratta da Boukhatem *et al.*, 2014.

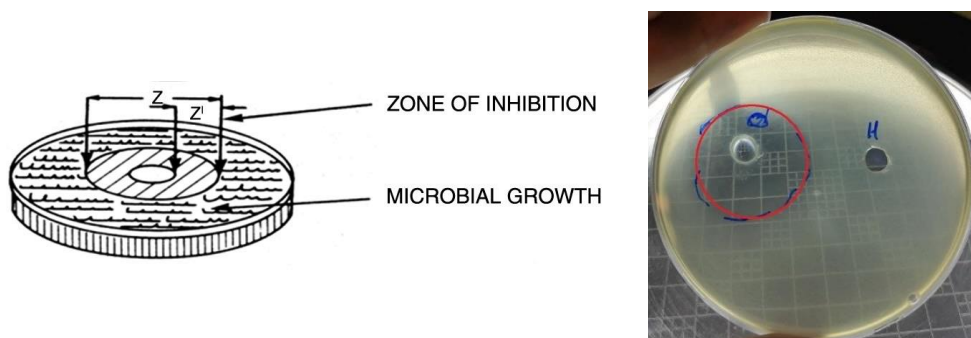
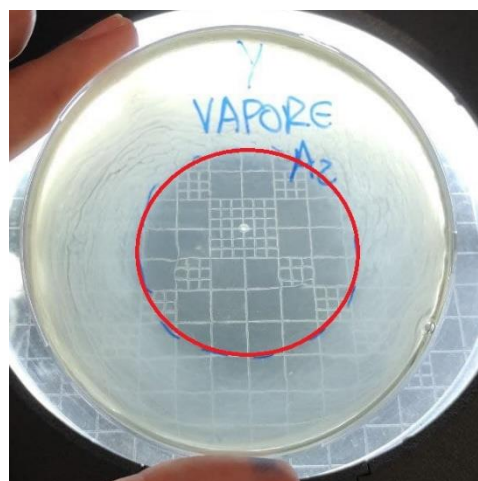
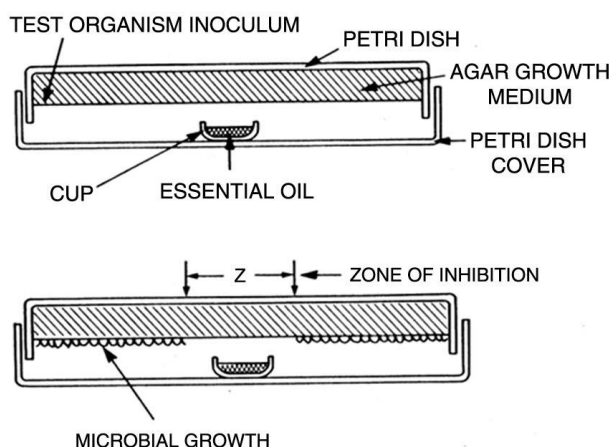


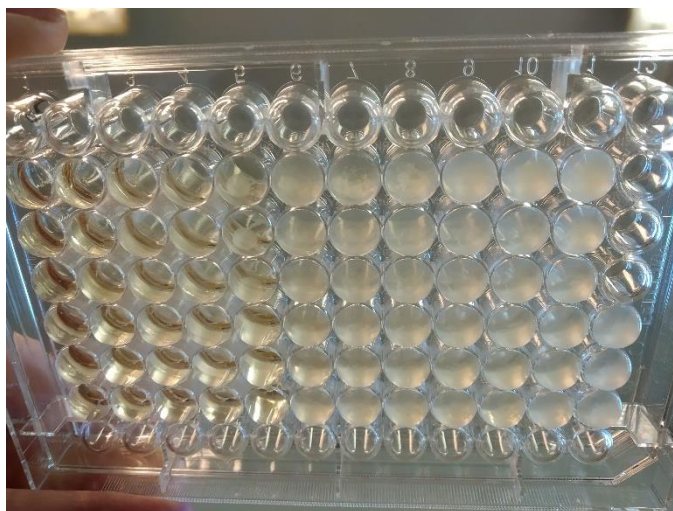
Figura 7. Metodica della diffusione dei vapori in piastra Petri. Rappresentazione grafica tratta da Boukhatem *et al.*, 2014.



Dopo la verifica dell'attività antibatterica su piastra, per ogni ceppo batterico e per ogni specie di timo si è proceduto alla valutazione dei seguenti parametri:

- concentrazione minima inibente (MIC; *Minimum Inhibitory Concentration*), corrispondente alla più bassa concentrazione del composto antibatterico in grado di inibire la crescita batterica visibile dopo 24 h. Sono state testate concentrazioni crescenti di olio (0,1–50 $\mu\text{l/ml}$) utilizzando micropiastre da 96 pozzetti (Fig. 8). Il valore di MIC corrisponde alla concentrazione in cui non si rileva crescita batterica visibile dopo 24 h.
- concentrazione minima battericida (MBC; *Minimum Bactericidal Concentration*), la più bassa concentrazione del composto antimicrobico in grado di inibire la crescita batterica di almeno il 99,9% della popolazione iniziale. Il materiale dei pozzetti in cui non è stata rilevata crescita batterica visibile (MIC) è stato posto su terreno di coltura e dopo 24 h di incubazione è stata verificata l'eventuale crescita batterica. Se non vi è crescita, il valore di MBC corrisponde al valore di MIC; se invece vi è crescita batterica, si piastrano e si osservano le concentrazioni più elevate rispetto alla MIC. La MBC corrisponde alla prima concentrazione più elevata in cui non si osserva crescita del batterio.

Figura 8. Micropiastra a 96 pozzetti utilizzata per la valutazione della concentrazione minima inibente (MIC).



2.6. Produzione di liquore e analisi sensoriale

La produzione dei liquori a base di timo è stata realizzata da Luca Merisi del liquorificio *La Maison du Bien Boire* (Sarre, AO).

L'attività ha previsto la produzione di liquori a base di timo a due estrazioni alcoliche differenti, a partire dalle 3 specie di timo, suddivise per località di raccolta. I liquori sono stati sottoposti ad analisi sensoriali basate sul sistema del *panel test*, allo scopo di identificare quali popolazioni di timo spontaneo risultassero più interessanti per la trasformazione in liquore.

Il prodotto di partenza era costituito dal materiale vegetale raccolto ed essiccato proveniente da tutte le popolazioni esaminate.

La produzione di liquore è avvenuta, partendo da 10 g circa di prodotto vegetale secco, tramite un'estrazione idroalcolica a diversa gradazione: 55% vol. e 70% vol. Il tempo di estrazione è stato di 20 giorni per le estrazioni al 70% vol., di 30 giorni per quelle al 55% vol. In tutti i casi, la gradazione alcolica finale ottenuta è stata del 38%, la concentrazione zuccherina del 15% e la quantità di pianta secca per ogni litro di liquore pari a 3 grammi.

L'analisi sensoriale comprendeva valutazione visiva (limpidezza), olfattiva (intensità, ricchezza e persistenza), gustativa (intensità ed equilibrio), retrogustativa (persistenza e intensità dell'amaro) e una valutazione globale, intesa non come media dei punteggi delle singole valutazioni, ma come indice di gradimento del liquore.

3. Risultati

3.1. Cure colturali e potenziale ornamentale

3.1.1. Campo sperimentale in Valle d'Aosta

A causa dell'andamento particolarmente caldo e siccitoso della stagione estiva 2020, è stato effettuato un intervento irriguo a settimana nei mesi più caldi (dal trapianto fino a metà agosto). Nel 2021, il maggior sviluppo dell'apparato radicale e il clima umido della prima parte della stagione estiva hanno reso necessari gli interventi irrigui solo nel mese di agosto.

Per quanto riguarda la gestione delle piante infestanti, durante la prima stagione di coltivazione sono state rimosse manualmente le piante emerse dai fori del telo pacciamante, con frequenza quindicinale. Nella seconda stagione di coltivazione, l'accrescimento vegetativo delle piante di timo, in particolare l'*habitus* tappezzante di quelle del gruppo serpillo, ha limitato la crescita delle malerbe, riducendo la frequenza degli interventi di estirpazione manuale. In Figura 9 viene mostrato il confronto tra la copertura vegetale dei timi del gruppo serpillo al trapianto (a sinistra), a due mesi dal trapianto (al centro) e un anno dopo il trapianto (a destra).

Figura 9. Confronto tra la copertura vegetale al trapianto e un anno dopo il trapianto per i timi del gruppo serpillo.



Thymus praecox

6 giugno 2020



Thymus pulegioides

31 luglio 2020



Thymus praecox

6 agosto 2021

A un anno dal trapianto, tutte le piante di *T. praecox* e *T. vulgaris* di tutte le località risultavano in buone condizioni, mentre *T. pulegioides* presentava una pianta morta e cinque avvizzite o poco rigogliose nei trapianti posti più a monte, dove parte dell'acqua proveniente dagli apporti idrici naturali o artificiali si perdeva per scorrimento sulla superficie del telo pacciamante.

Il timo raggiunge il massimo della produzione al terzo anno dall'impianto, per cui al momento non si è ancora proceduto alla raccolta delle specie coltivate. In futuro, il campo sperimentale di Ollignan sarà la base per approfondimenti tecnico-agronomici sulla coltivazione delle 3 specie autoctone di timo e permetterà di ripetere le analisi svolte nell'ambito del progetto OpThymus, osservando, a parità di condizioni ambientali e colturali, il comportamento delle diverse accessioni e confrontandolo con i risultati ottenuti con materiale raccolto allo stato spontaneo.

3.1.2. Campo sperimentale in Piemonte

L'aiuola sperimentale allestita all'interno del Centro visitatori del Parco Nazionale Gran Paradiso, è stata oggetto di valutazione del potenziale ornamentale delle 3 specie di timo autoctono.

Lo spazio occupato dalle piante è stato valutato misurando il diametro maggiore e il diametro minore della copertura vegetale; il portamento prostrato dei timi del gruppo serpillone non ha reso pertinente la misurazione dell'altezza delle loro piante (Fig. 10). Per quanto riguarda la superficie occupata dalle piante, le specie hanno mostrato differenze significative considerando entrambi i diametri (Tab. 3), con *T. praecox* che presenta diametri maggiori rispetto alle altre due specie.

Tabella 3. Dimensioni delle specie di timo studiate (lettere diverse corrispondono a differenze significative secondo il test di Tukey).

Specie	Diametro max (cm)	Diametro min (cm)	Altezza (cm)
<i>Thymus vulgaris</i>	21,7 ± 2,1 b	22,0 ± 6,6 b	16,7 ± 1,5
<i>Thymus pulegioides</i>	26,3 ± 5,5 b	27,7 ± 2,1 ab	-
<i>Thymus praecox</i>	49,0 ± 10,1 a	35,3 ± 5,0 a	-
Significatività	0,01	0,05	

Figura 10. Portamento delle 3 specie di timo autoctono (Campiglia Soana, TO).



Thymus vulgaris



Thymus pulegioides



Thymus praecox

Per quanto riguarda il colore delle foglie (Tab. 4), *T. pulegioides* e *T. praecox* sono risultati simili in quanto, secondo la classificazione RHS, entrambi i colori (137C e 137A) appartengono al gruppo di colore “Green”, mentre il colore di *T. vulgaris* (189A) si differenzia in quanto appartiene al gruppo “Greyed-Green”. Anche il colore dei fiori è risultato simile per i timi serpilli, appartenenti al gruppo Red-Purple (Fig. 11).

Tabella 4. Codice, nome e gruppo di colore di foglie e fiori delle specie di timo studiate, secondo la classificazione RHS.

Specie	Colore foglie			Colore fiore		
	Cod.	Nome	Gruppo	Cod.	Nome	Gruppo
<i>T. vulgaris</i>	189A	Dark Yellowish Green	Greyed-Green	no fiori		
<i>T. pulegioides</i>	137C	Moderate Yellow Green	Green	64C	Strong Purplish Red	Red-Purple
<i>T. praecox</i>	137A	Moderate Olive Green	Green	71B	Strong Purplish Red	Red-Purple

Figura 11. Fiori di *T. pulegioides* e *T. praecox* (Campiglia Soana, TO).



T. pulegioides



T. praecox

3.2. Olio essenziale da timi autoctoni

3.2.1. Distillazione dell'olio essenziale

Le rese in olio essenziale sono mostrate nella Tabella 5 e sono risultate statisticamente differenti tra le tre specie studiate. Il *T. vulgaris* è risultata la specie con la maggior resa in olio essenziale, pari al 2,24%; segue il *T. pulegioides* con 1,34% e il *T. praecox* con 0,59%.

Per quanto riguarda le diverse località di raccolta, sono emerse differenze statisticamente significative solo nel caso del *T. praecox*, in cui la popolazione di Bionaz ha dato una resa in olio essenziale superiore rispetto a quella di La Thuile (Tab. 6).

Tabella 5. Rese in olio essenziale derivanti dalle distillazioni delle popolazioni di *T. praecox*, *T. pulegioides* e *T. vulgaris* (lettere diverse tra loro corrispondono a differenze statisticamente significative secondo il test di Tukey; p-value = 0,000).

Specie	Peso secco (g)	OE (ml)	Resa (%)	
<i>T. praecox</i>	34,67	0,20	0,59	c
<i>T. pulegioides</i>	34,86	0,47	1,34	b
<i>T. vulgaris</i>	38,33	0,85	2,24	a

Tabella 6. Rese in olio essenziale derivanti dalle distillazioni delle popolazioni di *T. praecox*, *T. pulegioides* e *T. vulgaris* raccolte in differenti Comuni valdostani (lettere diverse tra loro corrispondono a differenze statisticamente significative secondo il test di Tukey).

Specie	Località di raccolta	Distillazioni (n.)	Peso secco (g)	OE (ml)	Resa (%)	p-value
<i>T. praecox</i>	Bionaz	7	34,88	0,24	0,70	a
	Cogne	6	33,69	0,17	0,50	ab 0,007
	La Thuile	8	35,74	0,21	0,58	b
<i>T. pulegioides</i>	Bionaz	6	35,22	0,41	1,17	a
	Cogne	6	35,83	0,48	1,50	a n.s.
	La Thuile	7	33,38	0,50	1,35	a
<i>T. vulgaris</i>	Quart	10	40,01	0,79	1,98	0,085
	Saint-Denis	10	36,65	0,90	2,46	

3.2.2. Caratterizzazione dell'olio essenziale

Le analisi condotte via GC/MS hanno riguardato l'aspetto qualitativo degli oli essenziali analizzati. Sono stati identificati 66 composti organici volatili (VOCs) in totale, considerando tutte e tre le specie oggetto di studio, suddivisibili in funzione della struttura chimica nelle seguenti classi: monoterpeni; monoterpeni ossigenati, che comprendono al loro interno i composti fenolici; sesquiterpeni; sesquiterpeni ossigenati e altri composti (Tab. 7).

Tabella 7. Classi di composti organici volatili (VOCs) identificati nell'olio essenziale estratto da tutte e tre le specie in esame mediante analisi GC/MS.

MONOTERPENI	MONOTERPENI OSSIGENATI	SESQUITERPENI	SESQUITERPENI OSSIGENATI
tricyclene	eucaliptolo	(-)- β -bourbonene	nerolidolo
α -thujene	cis-sabinene idrato	(E)-caryophyllene	spathulenolo
α -pinene	trans-sabinene idrato	beta-copaene	germacrene D-4-olo
camphene	linalolo	cis-muurolo-3,5-diene	caryophyllene ossido
sabinene	camphora	humulene	1,10-di-epi-cubenolo
β -pinene	endo-borneolo	alloaromadendrene	caryophylla-4(12),8(13)-dien-5- α -olo
β -myrcene	terpinen-4-ol	cis- β -farnesene	epi- α -cadinolo
alfa-phellandrene	p-cymen-8-olo	germacrene D	alfa-muurolo
delta-3-carene	α -terpineolo	beta- selinene	α -cadinolo
alfa-terpinene	nerolo	α -muurolene	shyobunolo
p-cymene	timolo metil etere	beta-bisabolene	
d-limonene	carvacrolo metil etere	delta-cadinene	
trans- β -ocimene	geraniolo	(E)- α -bisabolene	
cis- β -ocimene	geraniale		
γ -terpinene	bornyl acetato		
terpinolene	timolo (Comp. fenolici)		
p-cimenene	carvacrolo (Comp. fenolici)		
	alfa-terpinyl acetato		
	timolo acetato		
	geranyl acetato		
			ALTRI COMPOSTI
			butanoic ac. 2-metil, metil estere
			1-octen-3-olo
			3-octanone
			3-octanolo
			1-octen-3-yl-acetato
			3-octanol acetato

Le analisi condotte via GC/FID hanno riguardato invece l'aspetto quantitativo dei vari composti organici identificati negli oli essenziali analizzati. Dall'analisi dei risultati ottenuti si vede che le tre specie di timo studiate presentano poche analogie per quanto riguarda le principali classi di composti individuate. Infatti, l'unica classe che accomuna i timi del gruppo *serpyllum* è quella dei monoterpeni, per tutte le altre, le differenze osservate per ciascuna località risultano significative ($p < 0.05$). La classe dei sesquiterpeni ossigenati invece risulta l'unica classe ad accomunare il *Thymus pulegioides* con il *T. vulgaris* (Tab. 8, 9, 10).

Tabella 8. *Thymus pulegioides*: concentrazione percentuale media dell'olio essenziale estratto dalle tre popolazioni in esame, relativa al totale dei composti identificati, per classi di VOCs, determinata con analisi GC/FID.

Classi di composti	<i>T. pulegioides</i> Bionaz	<i>T. pulegioides</i> Cogne	<i>T. pulegioides</i> La Thuile
	MEDIA_Rel. Area identified %	MEDIA_Rel. Area identified %	MEDIA_Rel. Area identified %
Monoterpeni	15,27	20,04	40,15
Monoterpeni ossigenati	77,95	71,48	49,21
Sesquiterpeni	4,32	4,96	6,86
Sesquiterpeni ossigenati	0,45	0,94	0,85
Altri composti	2,09	2,68	3,46
Composti fenolici	14,16	34,49	41,66

Tabella 9. *Thymus praecox*: concentrazione percentuale media dell'olio essenziale estratto dalle tre popolazioni in esame, relativa al totale dei composti identificati, per classi di VOCs, determinata con analisi GC/FID.

Classi di composti	<i>T. praecox</i> Bionaz	<i>T. praecox</i> Cogne	<i>T. praecox</i> La Thuile
	MEDIA_Rel. Area identified %	MEDIA_Rel. Area identified %	MEDIA_Rel. Area identified %
Monoterpeni	20,06	28,45	19,16
Monoterpeni ossigenati	24,48	33,90	28,50
Sesquiterpeni	23,41	22,67	28,31
Sesquiterpeni ossigenati	37,77	19,60	22,27
Altri composti	1,61	1,16	1,99
Composti fenolici	3,63	12,92	16,95

Tabella 10. *Thymus vulgaris*: concentrazione percentuale media dell'olio essenziale estratto dalle due popolazioni in esame, relativa al totale dei composti identificati, per classi di VOCs, determinata con analisi GC/FID.

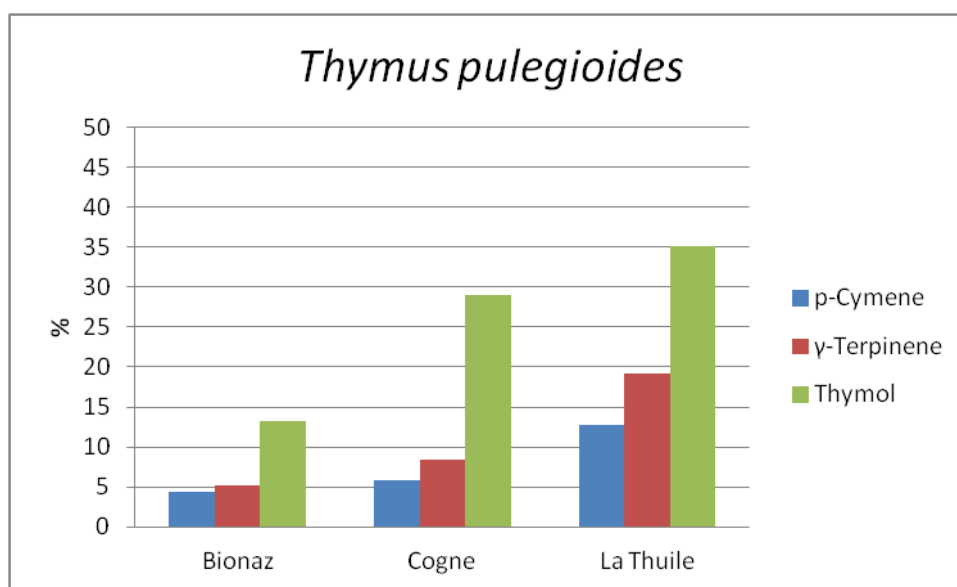
Classi di composti	<i>T. vulgaris</i> Quart	<i>T. vulgaris</i> St. Denis
	MEDIA_Rel. Area identified %	MEDIA_Rel. Area identified %
Monoterpeni	41,50	41,88
Monoterpeni ossigenati	55,32	54,46
Sesquiterpeni	1,73	1,90
Sesquiterpeni ossigenati	0,59	0,80
Altri composti	0,95	1,02
Composti fenolici	47,93	47,33

Olio essenziale estratto da *Thymus pulegioides*

Rispetto a quanto riportato in letteratura per la varietà *Thymus pulegioides* proveniente da altre regioni italiane, quali Sicilia e Campania (De Martino, 2009), quello valdostano risulta caratterizzato da una maggiore concentrazione di monoterpeni ossigenati, compresa fra il 49,2% della popolazione di La Thuile ed il 78,0 % della popolazione di Bionaz (Tab. 8). Le differenze di concentrazioni osservate fra le località non sono risultate significative. I composti fenolici, facenti parte dei monoterpeni ossigenati, risultano in percentuali simili per le due località, Cogne (34,5%) e La Thuile (41,7%) mentre in quantità significativamente inferiore nel timo raccolto a Bionaz (14,2%). Per quanto riguarda le prime due località, le concentrazioni riportate risultano superiori rispetto a quanto riportato per timi italiani, della stessa specie, provenienti da Sicilia e Campania (De Martino, 2009).

Considerando i precursori biosintetici del timolo, p-cymene e γ -terpinene, osserviamo delle concentrazioni significativamente superiori ($p < 0,05$) nel timo raccolto a La Thuile rispetto alle altre due località (Fig. 12) ed esse sono paragonabili a quanto riportato per il *Thymus pulegioides* siciliano (De Martino, 2009).

Figura 12. *Thymus pulegioides*: contenuto percentuale medio del timolo e dei suoi precursori biosintetici, nell'olio essenziale estratto dalle tre popolazioni in esame (analisi GC/FID, $p < 0,05$).



Per quanto riguarda i derivati dei composti fenolici, quali timolo e carvacrolo metil etere, osserviamo dei valori percentuali significativamente superiori nel timo raccolto a La Thuile, ma decisamente inferiori rispetto a quanto riportato in letteratura per timi della specie *T. pulegioides* italiani o europei (De Martino, 2009, Ložienė, 2003).

Nel caso del timo raccolto a Bionaz, invece, il composto presente in maggior quantità fra i monoterpeni ossigenati risulta essere l'alfa-terpinyl acetato (45,8%). I valori riscontrati sono paragonabili a quelli riportati in letteratura per *Thymus pulegioides* che cresce nel distretto di Vilnius in Lituania (Mockutė, 2001).

In base a quanto emerso, solo due delle tre popolazioni di *Thymus pulegioides* raccolte sono a chemiotipo timolo, rispettivamente quella proveniente da Cogne e quella proveniente da La Thuile. Questo conferma quanto già osservato da diversi studi su popolazioni italiane di questa specie (De Martino, 2009; Senatore, 1996; Sárosi, 2012). Invece, per quanto riguarda il timo raccolto a Bionaz siamo di fronte alla prima osservazione in Italia di una popolazione a chemiotipo alfa-terpinyl acetato.

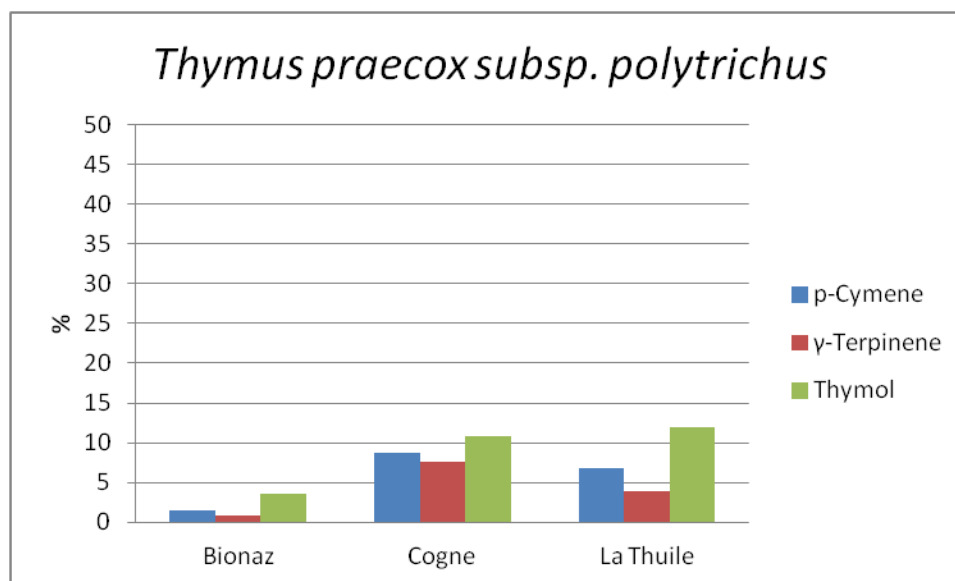
Olio essenziale estratto da *Thymus praecox*

Considerando le tre popolazioni di *Thymus praecox* subsp. *polytrichus*, osserviamo una concentrazione maggiore di sesquiterpeni ossigenati (37,8%) per il timo raccolto a Bionaz, rispetto alle altre classi di composti considerate. Questo è in accordo con quanto riportato per l'olio essenziale estratto da alcuni timi di questa specie provenienti dalle alpi tirolesi (Bischof-Deichnik, 2000). Si osserva, invece, solo una lieve predominanza di monoterpeni ossigenati (33,9%; 28,5%) per le altre due località rispetto alle altre classi di VOCs (Tab. 9). Considerando i composti fenolici, infatti, le piante raccolte a La Thuile e a Cogne mostrano concentrazioni significativamente superiori di timolo e dei suoi due precursori, p-cymene e γ -terpinene, rispetto al timo raccolto a Bionaz (Fig. 13).

Questo fa supporre che siamo di fronte a due biotipi differenti, come possibile visto l'elevato polimorfismo che caratterizza questa specie (Bischof-Deichnik, 2000). Contrariamente a quanto riportato, per popolazioni di timi di questa specie raccolti sui monti Sibillini (Valentini, 1987), in quelle valdostane non sono stati rilevati citronello ed isoeugenolo e solo concentrazioni intorno all'1% di nerolidolo. Nel *Thymus praecox* subsp. *polytrichus* raccolto a Bionaz sono il germacrene D-4-olo (13,4%), il (E)-caryophillene (8,5%) ed l' α -cadinolo (7,4%) i composti che maggiormente caratterizzano, mentre per Cogne e La Thuile, oltre al timolo e ai suoi precursori, è il solo (E)-caryophillene ad emergere nella composizione dell'olio essenziale (9,8-14,1%). Questo metterebbe in evidenza un legame fra le condizioni ecologiche delle stazioni di raccolta e la composizione chimica dell'olio essenziale (Valentini, 1987).

Per l'olio essenziale estratto dal *Thymus praecox* subsp. *polytrichus* proveniente dalle tre località, non essendo predominante nessun composto chimico, non è possibile fare una identificazione su base chimica, come già riportato in letteratura per timi di questa specie raccolti in habitat montani europei (Bischof 2000; Vidic, 2010).

Figura 13. *Thymus praecox*: contenuto percentuale medio del timolo e dei suoi precursori biosintetici, nell'olio essenziale estratto dalle tre popolazioni in esame (analisi GC/FID, $p < 0,05$).



Olio essenziale estratto da *Thymus vulgaris*

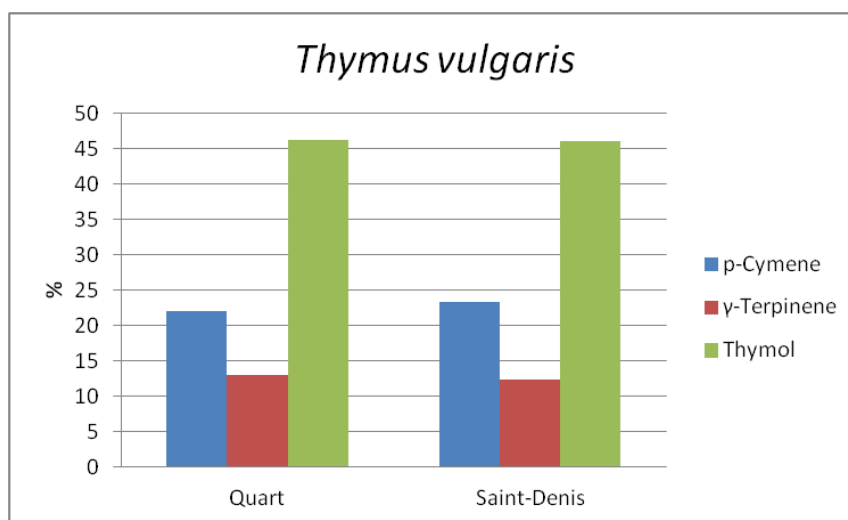
Per quanto riguarda il *Thymus vulgaris*, sono state studiate le due popolazioni risultate più interessanti da un precedente lavoro svolto dall'Institut Agricole Régional, che aveva l'obiettivo di confermare la presenza sul territorio valdostano del chemiotipo a timolo (Thedy, 2015). Osservando i dati raccolti per le due popolazioni scelte, per entrambe si nota che le due classi di composti caratterizzanti questa specie sono quella dei monoterpeni (~ 41%) e quella dei monoterpeni ossigenati (~ 54% circa). Non si osserva alcuna differenza significativa per la composizione degli oli essenziali provenienti dal timo raccolto a Quart rispetto a quello raccolto a Saint-Denis, se non per i sesquiterpeni ossigenati, la cui concentrazione risulta significativamente superiore nella popolazione campionata in quest'ultima località (Tab. 10).

Nella classe dei monoterpeni ossigenati il composto predominante è il timolo che, come prevedibile da quanto riportato in letteratura per *T. vulgaris* raccolto in Valle d'Aosta, risulta in concentrazioni superiori al 45% in entrambe le località (Rey, 1990; Thedy, 2015). Tali valori di timolo sono paragonabili a quelli riscontrati per *Thymus vulgaris* raccolto nel sud della Francia (Miladi, 2013) e notevolmente superiori ai valori riscontrati nel timo raccolto in altre regioni italiane (Piccaglia, 1991). Nella classe dei monoterpeni si evidenziano i due precursori del timolo, p-cymene e γ-terpinene, che risultano presenti in concentrazione di circa il 22% per il primo composto e il 12% per il secondo in entrambe le località di raccolta (Fig. 14).

Considerando i sesquiterpeni ossigenati, nel timo raccolto a Saint-Denis si osserva una concentrazione superiore di tutti i composti ivi raggruppati. Il caryophyllene ossido risulta, fra tutti, il composto più concentrato: 0,46% nell'olio essenziale di *Thymus vulgaris* raccolto a Quart e 0,51% in quello estratto dalla stessa specie raccolta a Saint-Denis; si tratta però dell'unico composto per cui la differenza non risulta significativa. Confrontando con i dati in letteratura, esso si trova in concentrazioni inferiori ai timi della stessa specie raccolti in

Campania (Mancini, 2015), ma in concentrazioni simili a timi raccolti nel sud della Francia e superiori rispetto al *Thymus vulgaris* spontaneo proveniente dalla Turchia (Özcan, 2004). Tale composto possiede un forte odore legnoso ed è presente in concentrazioni simili anche nel *Thymus pulegioides* studiato, mentre si trova in concentrazioni superiori nel *Thymus praecox* preso in esame.

Figura 14. *Thymus vulgaris*: contenuto percentuale medio del timolo e dei suoi precursori biosintetici, nell'olio essenziale estratto dalle due popolazioni in esame (analisi GC/FID).



3.3. Valutazione dell'efficacia antibatterica degli oli essenziali di timo e degli estratti acquosi

3.3.1. Valutazione degli aloni di inibizione

L'attività antibatterica è stata testata utilizzando sia gli oli essenziali, sia gli estratti acquosi delle specie oggetto di studio.

Per quanto riguarda gli estratti acquosi, non è stata rilevata attività antimicrobica nei confronti di nessuno dei cinque batteri selezionati. Nonostante siano stati preparati e testati nuovi estratti acquosi maggiormente concentrati, il risultato è rimasto invariato. Ulteriori approfondimenti futuri potrebbero prevedere diverse metodiche di preparazione degli estratti per cercare di concentrare maggiormente il prodotto, quali liofilizzazione o concentrazione mediante evaporatore rotante.

In merito agli oli essenziali, invece, tutte le specie hanno mostrato attività antibatterica nei confronti di tutti i ceppi testati (Tab.11 e Tab. 12) e sono sempre state evidenziate differenze significative tra gli oli. L'intervallo di valori riscontrato negli aloni di inibizione è risultato molto variabile, da 0,1 cm (vapori di *T. praecox* su *P. fluorescens* e *Y. enterocolitica*) a 6,40 cm (pozzetti di *T. vulgaris* su *L. monocytogenes*). Generalmente, la dimensione degli aloni è risultata inferiore nella metodica della diffusione dei vapori rispetto a quella del metodo dei pozzetti, evidenziando comunque un'interessante attività antibatterica dei composti volatili.

L'olio di *T. vulgaris* ha mostrato elevata attività antibatterica su tutti i ceppi con entrambe le metodiche, con risultati sempre paragonabili a quelli dell'olio commerciale, tranne nel caso dei pozzetti di *Y. enterocolitica*, in cui l'alone della specie spontanea (5,19 cm) è risultato statisticamente maggiore di quello dell'olio commerciale (3,47 cm), evidenziandone un maggior effetto inibente nei confronti del batterio.

In generale, *T. praecox* ha mostrato la minore attività antibatterica, mentre *T. pulegioides* ha mostrato risultati intermedi, se non nel caso di *L. monocytogenes*, in cui gli oli di queste due specie sono risultati paragonabili.

Tabella 11. Diametri (cm) degli aloni di inibizione prodotti dagli oli essenziali delle specie oggetto di studio e dall'olio commerciale su *B. cereus* e *B. subtilis*, testati con due metodiche differenti (lettere diverse tra loro corrispondono a differenze significative in base al test di Kruskal-Wallis con confronto graduale).

Olio essenziale	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
	Vapori	Pozzetti	Vapori	Pozzetti
<i>T. vulgaris</i> commerciale	3,44 a	4,42 a	5,40 a	5,37 a
<i>T. vulgaris</i>	2,90 a	5,36 a	5,39 a	5,87 a
<i>T. praecox</i>	0,48 b	0,99 c	1,82 c	1,41 b
<i>T. pulegioides</i>	3,14 a	3,02 b	3,82 b	3,70 ab
Significatività	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabella 12. Diametri (cm) degli aloni di inibizione prodotti dagli oli essenziali delle specie oggetto di studio e dall'olio commerciale su *L. monocytogenes*, *P. fluorescens* e *Y. enterocolitica*, testati con due metodiche differenti (lettere diverse tra loro corrispondono a differenze significative in base al test di Kruskal-Wallis con confronto graduale).

Olio essenziale	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Yersinia enterocolitica</i>	
	Vapori	Pozzetti	Vapori	Pozzetti	Vapori	Pozzetti
<i>T. vulgaris</i> commerciale	4,36 a	5,86 a	2,07 a	2,66 a	3,84 a	3,47 b
<i>T. vulgaris</i>	4,71 a	6,40 a	1,89 a	2,47 a	3,92 a	5,19 a
<i>T. praecox</i>	2,62 b	1,58 b	0,10 c	1,00 c	0,10 c	1,08 c
<i>T. pulegioides</i>	3,07 b	3,23 b	0,91 b	1,41 b	2,23 b	2,68 bc
Significatività	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

3.3.2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) e Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

I valori di *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) e di *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) degli oli testati sono riportati in Tabella 13, in cui si evince che la maggior parte delle volte MIC e MBC coincidono. Negli altri casi, poiché la MIC indica un effetto batteriostatico a 24 h, è necessaria una concentrazione più elevata di olio per ottenere un effetto battericida. Anche in quest'analisi si confermano le similitudini tra olio commerciale e olio di

T. vulgaris spontaneo, per i quali sono necessari, rispetto ai timi serpilli, quantitativi minori di olio per ottenere un'efficace attività antibatterica.

Tabella 13. Valori di *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) e *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ($\mu\text{l/ml}$) degli oli essenziali testati su ogni ceppo batterico.

Batterio	Olio essenziale	MIC ($\mu\text{l/ml}$)	MBC ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>T. vulgaris</i> commerciale	3,13	3,13
	<i>T. vulgaris</i>	3,13	6,25
	<i>T. praecox</i>	6,25	6,25
	<i>T. pulegioides</i>	12,5	12,50
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>T. vulgaris</i> commerciale	6,25	6,25
	<i>T. vulgaris</i>	6,25	6,25
	<i>T. praecox</i>	12,50	25,00
	<i>T. pulegioides</i>	12,50	12,50
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>T. vulgaris</i> commerciale	6,25	6,25
	<i>T. vulgaris</i>	6,25	6,25
	<i>T. praecox</i>	25,00	50,00
	<i>T. pulegioides</i>	12,50	12,50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>T. vulgaris</i> commerciale	9,37	9,37
	<i>T. vulgaris</i>	9,37	9,37
	<i>T. praecox</i>	12,50	12,50
	<i>T. pulegioides</i>	18,75	18,75
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>T. vulgaris</i> commerciale	3,13	50,00
	<i>T. vulgaris</i>	3,13	50,00
	<i>T. praecox</i>	12,5	50,00
	<i>T. pulegioides</i>	12,5	25,00

3.4. Estratti vegetali da timi autoctoni e caratterizzazione

3.4.1. Confronto tra due metodi di essiccazione

Nell'essiccazione tradizionale in serra, la percentuale di acqua presente all'interno delle specie oggetto di studio è risultata compresa tra il 52,5% in *T. vulgaris* (popolazione Saint-Denis) e il 68,2% in *T. pulegioides* (popolazione La Thuile) (Tab. 14). A livello di specie, *T. vulgaris* ha mostrato la minore percentuale di umidità (52,9%), significativamente inferiore rispetto a *T. praecox* (62,3%) e *T. pulegioides* (66,9) (test di Tukey: $p < 0,001$).

Tabella 14. Essiccazione tradizionale in serra: peso fresco, secco e variazione percentuale di peso per ogni popolazione delle specie di timo studiate.

Specie	Località di raccolta	Campioni (n)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Variazione (%)
<i>T. praecox</i>	Bionaz	3	62,2	26,1	56,4
	Cogne	3	42,2	14,0	65,2
	La Thuile	3	68,4	23,3	65,4
<i>T. pulegioides</i>	Bionaz	3	63,4	22,5	64,6
	Cogne	3	69,3	22,3	67,7
	La Thuile	3	94,0	29,9	68,2
<i>T. vulgaris</i>	Quart	3	237,3	112,7	52,4
	Saint- Denis	3	240,2	112,4	50,7

Con l'essiccazione a bassa temperatura per ogni popolazione è stato rilevato il peso fresco ed il peso del materiale dopo essiccazione (Tab. 15). La percentuale di acqua estratta mediante essiccazione a bassa temperatura è risultata essere compresa tra 52,7% in *T. vulgaris* (popolazione Quart) e 82,7% in *T. pulegioides* (popolazione Bionaz). A livello di specie, *T. vulgaris* ha mostrato la minore percentuale di umidità (53,4%), significativamente inferiore rispetto a *T. praecox* (67,7%) e *T. pulegioides* (70,2%) (test di Tukey: $p < 0,001$). Questi dati indicano che la tecnica di essiccazione a bassa temperatura ha permesso di estrarre maggiori quantitativi d'acqua rispetto all'essiccazione tradizionale.

Tabella 15. Essiccazione a bassa temperatura: peso fresco, secco e variazione percentuale di peso per ogni popolazione delle specie di timo studiate.

Specie	Località di raccolta	Campioni (n)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Variazione (%)
<i>T. praecox</i>	Bionaz	3	100,2	34,6	65,4
	Cogne	3	79,6	24,3	69,5
	La Thuile	3	147,7	46,8	68,2
<i>T. pulegioides</i>	Bionaz	3	65,4	11,3	82,7
	Cogne	3	68,0	25,8	61,7
	La Thuile	3	144,4	49,1	66,2
<i>T. vulgaris</i>	Quart	3	216,6	102,5	52,7
	Saint- Denis	3	260,0	119,0	54,1

3.4.2. Contenuto totale di polifenoli (metodo Folin- Ciocâlteu)

Dall'analisi dei dati emerge che gli estratti ottenuti dalle due popolazioni di *T. vulgaris* contengono quantità superiori di polifenoli rispetto alle altre due specie (3992,3 e 2656,3 mg di acido gallico equivalente GAE/100 g di peso secco nella popolazione di Quart e Saint-Denis, rispettivamente), con la popolazione di Quart significativamente maggiore (Tab. 16).

Poche differenze emergono invece tra le diverse popolazioni di *T. praecox* e *T. pulegioides* con un range di valori compresi tra 1739,9-1833,7 e 1444,6-2093,8 mg GAE/100 gPS, rispettivamente. Considerando in modo aggregato le diverse località di raccolta, *T. vulgaris* presenta un contenuto significativamente superiore (3324,3 mg GAE/100 g peso secco) rispetto a *T. praecox* e *T. pulegioides* (1796,6 e 1834,0 mg GAE/100 g peso secco, rispettivamente).

Tra i metodi di estrazione, il decotto ha estratto una quantità maggiore di polifenoli rispetto all'estrattore a ultrasuoni (2972,5 e 1412,6 mg GAE/100 g peso secco, rispettivamente). Mentre nessuna differenza è emersa tra i due metodi di essiccazione, 2240,5 e 2144,6 mg GAE/100 g peso secco tramite essiccazione tradizionale e a bassa temperatura, rispettivamente.

Tabella 16. Contenuto in polifenoli totali (TPC, mg GAE/100 g peso secco) in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate e in base al metodo di estrazione ed essiccazione applicato. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis post-hoc test.

Specie	Loc. di raccolta	TPC	Specie	TPC	Estrazione	TPC	Essiccazione	TPC
<i>T. vulgaris</i>	St-Denis	2656,3 b	<i>T. vulgaris</i>	3324,3 a	Decotto	2972,5	Tradizionale	2240,5
	Quart	3992,3 a	<i>T. praecox</i>	1796,6 b			Ultrasuoni	1412,6
<i>T. praecox</i>	La Thuile	1816,3 c	<i>T. pulegioides</i>	1834,0 b				
	Bionaz	1739,9 c						
	Cogne	1833,7 c						
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	1444,6 c						
	Bionaz	2093,8 bc						
	Cogne	1963,5 bc						
Significatività		<0,001			<0,001	<0,001	ns	

In merito al contenuto in TPC delle acque costituzionali, in Tabella 17 emerge come vi siano differenze significative tra le diverse popolazioni studiate, con valori minori nelle due popolazioni di *T. vulgaris* (0,5 e 0,9 mg GAE/100 g peso secco in Saint-Denis e Quart, rispettivamente). Mentre la popolazione di Bionaz di *T. praecox* ha mostrato i valori più elevati (17,5 mg GAE/100 g peso secco). Le acque costituzionali ottenute dalle due specie del gruppo serpillio hanno un contenuto in TPC significativamente superiore.

Tabella 17. Contenuto in polifenoli totali (TPC, mg GAE/100 gPS) nelle acque costituzionali ottenute in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis post-hoc test.

Specie	Loc. di raccolta	TPC	Specie	TPC
<i>T. vulgaris</i>	Saint-Denis	0,5 d	<i>T. vulgaris</i>	0,6 b
	Quart	0,9 d	<i>T. praecox</i>	10,3 a
<i>T. praecox</i>	La Thuile	4,7 c	<i>T. pulegioides</i>	11,1 a
	Bionaz	17,5 a		
	Cogne	8,8 b		
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	10,5 b		
	Bionaz	10,1 b		
	Cogne	12,4 b		
Significatività		<0,001	<0,001	

3.4.3. Attività antiossidante (metodo FRAP)

L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia poche differenze tra le diverse specie e popolazioni studiate con un range di millimoli di Fe^{2+} equivalenti per chilogrammo di peso secco compreso fra 434,0 e 573,2 in *T. vulgaris*, fra 430,1 e 495,3 in *T. praecox* e fra 442,6 e 688,2 in *T. pulegioides* (Tab. 18). La popolazione di Cogne di quest'ultima specie è risultata avere valori di FRAP significativamente superiori alle altre, tranne che per la popolazione di Quart di *T. vulgaris*. Complessivamente, *T. pulegioides* presenta un'attività antiossidante con metodo FRAP significativamente superiore rispetto al *T. praecox* (553,4 e 464,9 mM Fe^{2+} eq. kg^{-1} peso secco, rispettivamente).

Il metodo di estrazione tramite decotto ha mostrato un quantitativo maggiore di 654,7 mM Fe^{2+} eq. kg^{-1} peso secco rispetto all'estrazione ad ultrasuoni (360,7 mM Fe^{2+} eq. kg^{-1} peso secco). Poche differenze sono emerse dai due metodi di essiccazione (526,9 e 488,67 mM Fe^{2+} eq. kg^{-1} peso secco tramite essiccazione tradizionale e essiccazione a bassa temperatura, rispettivamente).

Solo le acque costituzionali ottenute dalle due popolazioni di *T. vulgaris* hanno evidenziato attività antiossidante mediante il metodo FRAP, con valori di 0,037 e 0,045 mM Fe^{2+} eq. kg^{-1} peso in Saint-Denis e Quart, rispettivamente. Non sono emerse differenze significative.

Tabella 18. Valutazione dell'attività antiossidante mediante metodo FRAP (mM Fe²⁺eq. kg⁻¹ peso secco) in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate e in base al metodo di estrazione ed essiccazione applicato. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis post-hoc test).

Specie	Loc. di raccolta	FRAP	Specie	FRAP	Estrazione	FRAP	Essiccazione	FRAP
<i>T. vulgaris</i>	St-Denis	434,0 b	<i>T. vulgaris</i>	503,6 ab	Decotto	654,9	Tradizionale	526,9
	Quart	573,2 ab	<i>T. praecox</i>	464,9 b	Ultrasuoni	360,7	Freddo	488,7
<i>T. praecox</i>	La Thuile	495,3 b	<i>T. pulegioides</i>	553,4 a				
	Bionaz	430,1 b						
	Cogne	469,4 b						
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	442,6 b						
	Bionaz	528,6 b						
	Cogne	688,9 a						
Significatività		<0,001		<0,001		<0,001		ns

3.4.4. Attività antiossidante (metodo ABTS)

L'analisi dei risultati dimostra che, al contrario di quanto emerso per il contenuto totale in polifenoli, i timi del gruppo serpillo presentano un'attività antiossidante superiore rispetto agli estratti ottenuti da *T. vulgaris* (0,09 e 0,13 mmol TE/g peso secco a St. Denis e Quart, rispettivamente) con un range di valori compreso tra 1,06 e 1,40 millimoli di Trolox Equivalenti (TE) per grammo di peso secco (mmol TE/g peso secco) (Tab. 19). I valori di ABTS significativamente superiori sono stati infatti ottenuti nella specie *T. praecox* nei siti di Cogne e La Thuile (1,40 e 1,18 mmol TE/g peso secco, rispettivamente) e, in *T. pulegioides* nei siti di Bionaz e Cogne (1,37 e 1,34 mmol TE/g peso secco, rispettivamente). Emergono differenze anche tra l'estrazione con decotto e ultrasuoni, con valori superiori ottenuti mediante il primo metodo (1,18 e 0,70 mmol TE/g peso secco, rispettivamente). Nessuna differenza emerge invece tra i metodi di essiccazione con valori compresi fra 0,98 e 0,89 mmol TE/g peso secco con l'essiccazione tradizionale e l'essiccazione a basse temperature.

In Tabella 20 sono presentati i valori ottenuti nelle acque costituzionali. Nelle due popolazioni di *T. vulgaris*, nella popolazione di La Thuile di *T. praecox* e in quelle di Bionaz e Cogne di *T. pulegioides*, non è stata rilevata attività antiossidante con il metodo ABTS. Tra le restanti, valori significativamente superiori sono stati trovati in *T. praecox* di Cogne e *T. pulegioides* di La Thuile. Complessivamente, non sono emerse differenze tra le due specie del gruppo del serpillo.

Tabella 19. Valutazione dell'attività antiossidante mediante metodo ABTS (mmol TE/g peso secco) in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate e in base al metodo di estrazione ed essiccazione applicato. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis *post-hoc* test.

Specie	Loc. di raccolta	ABTS	Specie	ABTS	Estrazione	ABTS	Essiccazione	ABTS
<i>T. vulgaris</i>	Saint- Denis	0,09 d	<i>T. vulgaris</i>	0,11 b	Decotto	1,18	Tradizionale	0,98
	Quart	0,13 d	<i>T. praecox</i>	1,22 a	Ultrasuoni	0,70	Freddo	0,89
<i>T. praecox</i>	La Thuile	1,18 abc	<i>T. pulegioides</i>	1,21 a				
	Bionaz	1,06 bc						
	Cogne	1,40 a						
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	0,92 c						
	Bionaz	1,37 a						
	Cogne	1,34 ab						
Significatività		<0,001	<0,001		<0,001		ns	

Tabella 20. Valutazione dell'attività antiossidante mediante metodo ABTS (mmol TE/g peso secco) nelle acque costituzionali ottenute in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis *post-hoc* test (***) = 0,001; ns = non significativo).

Specie	Loc. di raccolta	ABTS	Specie	ABTS
<i>T. vulgaris</i>	Saint-Denis	-	<i>T. vulgaris</i>	-
	Quart	-	<i>T. praecox</i>	0,006
<i>T. praecox</i>	La Thuile	-	<i>T. pulegioides</i>	0,004
	Bionaz	0,006 b		
	Cogne	0,013 a		
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	0,010 a		
	Bionaz	-		
	Cogne	-		
Significatività		0,001	ns	

3.4.5. Attività antiossidante (metodo DPPH)

Similmente al metodo precedente, l'analisi preliminare dei dati evidenzia una maggiore attività antiossidante negli estratti ottenuti da *T. praecox* e *T. pulegioides* rispetto al *T. vulgaris* con un *range* di valori compresi fra 0,28-0,36 mmol TE/g peso secco, 0,24-0,34 mmol TE/g peso secco e 0,15-0,23 mmol TE/g peso secco, rispettivamente (Tab. 21). La popolazione di Cognie di *T. praecox* (0,36 mmol TE/g peso secco) risulta essere quella con maggiore attività antiossidante mediante metodo DPPH, ma senza differenze significative rispetto alle altre popolazioni relative al gruppo serpillo tranne che per il sito La Thuile di *T. pulegioides*. Mediamente, entrambe le specie presentano valori significativamente superiori rispetto a *T. vulgaris*.

Differenze emergono anche tra l'estrazione con decotto ed ultrasuoni, con valori superiori ottenuti mediante il primo metodo (0,38 e 0,17 mmol TE/g peso secco, rispettivamente). Nessuna differenza emerge invece tra i metodi di essiccazione con valori compresi fra 0,28 e 0,26 mmol TE/g peso secco con l'essiccazione tradizionale e l'essiccazione a basse temperature.

Tabella 21. Valutazione dell'attività antiossidante mediante metodo DPPH (mmol TE/g peso secco) in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate e in base al metodo di estrazione ed essiccazione applicato. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis post-hoc test.

Specie	Loc. di raccolta	DPPH	Specie	DPPH	Estrazione	DPPH	Essiccazione	DPPH
<i>T. vulgaris</i>	Saint- Denis	0,15 d	<i>T. vulgaris</i>	0,19b	Decotto	0,38	Tradizionale	0.28
	Quart	0,23 cd	<i>T. praecox</i>	0,30a	Ultrasuoni	0,17	Freddo	0.26
<i>T. praecox</i>	La Thuile	0,28 abc	<i>T. pulegioides</i>	0,30a				
	Bionaz	0,28 abc						
	Cogne	0,36 a						
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	0,24 bcd						
	Bionaz	0,32 abc						
	Cogne	0,34 ab						
Significatività		0,001		0,001		0,001		ns

L'attività antiossidante rilevata mediante tecnica DPPH nelle acque costituzionali è mostrata in Tabella 22. Anche per questo parametro, non è stata rilevata attività in entrambe le popolazioni di *T. vulgaris*. Differenze significative sono invece emerse fra le restanti popolazioni. *T. praecox* di Cogne ha mostrato valori significativamente superiori (1,142 mmol TE/g peso secco) rispetto alle altre popolazioni e anche agli estratti presentati in Tabella 21. Complessivamente non sono emerse differenze significative tra le due specie del gruppo serpillo con valori medi comparabili con quanto ottenuto con gli estratti in Tabella 21.

Tabella 22. Valutazione dell'attività antiossidante mediante metodo DPPH (mmol TE/g peso secco) nelle acque costituzionali ottenute in ognuna delle popolazioni delle specie di timo studiate. I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e soggetti a Kruskal-Wallis post-hoc test.

Specie	Loc. di raccolta	DPPH	Specie	DPPH
<i>T. vulgaris</i>	Saint-Denis	-	<i>T. vulgaris</i>	-
	Quart	-	<i>T. praecox</i>	0,383
<i>T. praecox</i>	La Thuile	0,005 c	<i>T. pulegioides</i>	0,290
	Bionaz	0,003 c		
	Cogne	1,142 a		
<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	0,864 b		
	Bionaz	0,005 c		
	Cogne	0,003 c		
Significatività		<0,001		ns

3.5. Liquori a base di timo

Sono stati prodotti e confrontati 16 liquori a base di timo, differenziati per specie, località di raccolta e gradazione dell'estrazione idroalcolica; in tutti i casi, la gradazione alcolica finale ottenuta è stata del 38%, la concentrazione zuccherina del 15%.

Le tre specie di timo si distinguono tra di loro per alcune caratteristiche organolettiche:

- i liquori a base di *T. praecox* risultano più dolci rispetto a quelli a base di *T. vulgaris* e *T. pulegioides*, annullando quasi totalmente la nota amara tipica della pianta (Tab. 23);
- i liquori a base di *T. vulgaris* sono quelli che mantengono la nota più amara e si avvicinano di più ai liquori di timo in commercio;
- i liquori a base di *T. pulegioides* risultano intermedi tra gli altri due in quanto, a parte un caso, mantengono una leggera nota dolce ma allo stesso tempo piacevole, e risultano più ricchi in profumi e aromi.

Tabella 23. Percezione durante la valutazione retrogustativa dei liquori a base di timo.

Specie	Valutazione retrogustativa: Test di Tukey	
	Amaro	
<i>Thymus praecox</i>	1,33	b
<i>Thymus pulegioides</i>	2,83	ab
<i>Thymus vulgaris</i>	4,50	a
Significatività	0,033	

Sono state riscontrate delle piccole differenze anche tra campioni appartenenti alla stessa specie, confermando che il luogo di origine della pianta è una discriminante nella scelta della materia prima.

Le estrazioni a concentrazioni di etanolo differenti hanno dato risultati differenti sotto diversi punti di vista e risultati delle analisi sensoriali sono riportati nell'Allegato 2.

Valutazione visiva: è stato riscontrato che, in tutti i casi, un'estrazione a 70 gradi risulta più aggressiva nei confronti della pianta, causando un maggiore sedimento nel liquido. Al contrario, il liquore prodotto con *T. pulegioides* raccolto a Bionaz, con un'estrazione a 55 gradi, risulta quasi completamente privo di sedimenti.

Valutazione olfattiva: un'estrazione a gradazione più alta ha favorito una maggior concentrazione di profumi.

Valutazione gustativa: un'estrazione a gradazione più bassa ha favorito una maggior concentrazione di sapori, lasciando poco profumo.

Tutti i campioni prodotti con i *T. praecox*, in quanto dolciastri, sono risultati i meno interessanti dal punto di visto gustativo; in un caso, il campione non è stato riconosciuto come liquore a base di timo ma è stato scambiato per un liquore a base di camomilla.

Il campione che ha riscontrato più gradimento ed è stato globalmente accettato come migliore del test è il liquore prodotto a partire dal *T. pulegioides* raccolto a Bionaz con un'estrazione a 55 gradi; al secondo posto si piazza il campione a base di *T. vulgaris* di Quart estratto a 55 gradi, seguito dal campione prodotto con il *T. pulegioides* di Bionaz estratto a 70 gradi.

In conclusione:

- la specie risultata più interessante è il *T. pulegioides*, che potrebbe diventare una valida alternativa al *T. vulgaris* nella produzione di liquori;
- non è stato possibile stabilire il metodo di estrazione migliore, in quanto entrambi possono essere usati per cercare un liquore ricco di profumi o di aromi;
- la ricetta utilizzata (38% vol., 15% zucchero, 3 g/l pianta secca) può essere migliorata e modificata, anche sul campione più apprezzato.

4. Comunicazione dei risultati del progetto

Alla fine del progetto è stato organizzato un evento rivolto alle aziende di coltivazione e di trasformazione, tenutosi il 25/10/2021 a Quart (AO). Sono stati presentati i risultati ottenuti nell'ambito del progetto, seguiti da una visita al campo sperimentale, una dimostrazione di estrazione di olio essenziale, una degustazione dei liquori prodotti e un pranzo a base di timo. "La Valle d'Aosta in TV" ha realizzato un video di sintesi disponibile su Youtube (<https://www.youtube.com/watch?v=iyyIRJ5fdMI>).

L'aiuola allestita presso il Centro visitatori "L'uomo e i coltivi" del Parco Nazionale Gran Paradiso (Valprato Soana, TO) è liberamente fruibile dai visitatori ed è accompagnata da un pannello divulgativo; il giorno 07/08/21 il DISAFA ha illustrato le attività e i risultati del progetto OpThymus ai visitatori, in sinergia con CAMP2IT, altro progetto che beneficia di un finanziamento della Fondazione CRT.

Il campo sperimentale di Quart (AO) allestito con le tre specie di timo valdostane è stato oggetto di un articolo su La Vallée Notizie, settimanale diffuso in Valle d'Aosta e pubblicato in data 13/06/2020, e di un post Facebook.

Infine, la valutazione delle proprietà fitochimiche delle due popolazioni di *T. vulgaris* è stata oggetto di un elaborato finale di Laurea in Scienze Naturali presso l'Università degli Studi di Torino dal titolo "Differenze nel contenuto di polifenoli e nell'attività antiossidante di due popolazioni valdostane di *Thymus vulgaris* L.". L'attività antibatterica degli oli di timo svolta all'interno del progetto OpThymus è invece oggetto di una tesi di laurea magistrale dal titolo "Attività inibente dell'olio essenziale di timo estratto da specie autoctone" presso il DISAFA - Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari.

5. Conclusioni

Il progetto OpThymus è stato avviato per valorizzare i timi autoctoni dell'arco alpino occidentale attraverso l'innovazione di prodotto e di processo nel settore delle piante officinali e per fornire informazioni tecniche alle aziende di trasformazione locali.

Considerata la facilità di coltivazione della pianta, le sue numerose proprietà e i molteplici utilizzi che ne derivano, il progetto ha approfondito diversi aspetti legati all'utilizzo e alla trasformazione dei timi spontanei: valore ornamentale, resa in olio essenziale, caratterizzazione ed efficacia antibatterica dell'olio, caratterizzazione e valutazione dell'attività antiossidante degli estratti vegetali, approfondimento delle potenzialità liquoristiche.

Tra le numerose specie del genere *Thymus* presenti lungo l'arco alpino occidentale, il progetto OpThymus ha studiato e confrontato le caratteristiche di 3 popolazioni valdostane di timo, provenienti da diverse località: il ***Thymus vulgaris***, il ***Thymus pulegioides*** e il ***Thymus praecox*** subsp. ***polytrichus***.

Per quanto riguarda la raccolta allo stato spontaneo, l'identificazione in natura del *T. vulgaris* è risultata semplice, mentre per i due timi del gruppo serpillino (*T. pulegioides* e *T. praecox*) è stato necessario avvalersi di botanici specialisti. Il materiale raccolto è stato destinato all'estrazione di olio essenziale, alla produzione di estratti vegetali e di liquori e, infine, alla propagazione in vivaio per il trapianto in campo.

Dal punto di vista **colturale**, il timo ha confermato la sua rusticità: già nella seconda stagione di coltivazione, l'accrescimento vegetativo delle piante, in particolare l'*habitus* tappezzante di quelle del gruppo serpillino, ha limitato la crescita delle malerbe e la frequenza degli interventi di estirpazione manuale; inoltre, il maggior sviluppo dell'apparato radicale, ha limitato gli interventi irrigui e, nei prossimi anni, il ricorso all'irrigazione potrebbe essere necessario solo in via straordinaria.

Il timo è risultato interessante anche dal punto di vista **ornamentale**: forma cespugli fitti e compatti, di colore verde nella maggior parte dell'anno, con numerosi fiori rosa o violetti; la forma dei cespugli, soprattutto quella prostrata dei timi serpillini, ha un effetto tappezzante e, tra le tre specie esaminate, la miglior copertura del suolo è data dal *T. praecox*.

La **resa in olio essenziale** ha mostrato delle differenze tra le tre specie di timo: il *T. vulgaris* è risultata la specie con la miglior resa, pari al 2,24%, segue il *T. pulegioides* con 1,34% e il *T. praecox* con 0,59%. Il *T. vulgaris* raccolto allo stato spontaneo ha quindi confermato la sua buona attitudine all'estrazione di olio essenziale e il *T. pulegioides* ha rivelato interessanti potenzialità.

La **composizione degli oli essenziali** è fortemente influenzata da fattori intrinseci quali specie, cultivar, clone ed ecotipo, e da fattori ecologici come origine geografica, condizioni climatiche, suolo, fattori biotici e tecnologici, tecniche di coltivazione, tipo di raccolta, condizioni di stoccaggio del materiale raccolto e tecniche di estrazione. Per queste ragioni le piante spontanee della stessa specie, ma provenienti da differenti contesti possono esprimere caratteristiche e composizioni chimiche differenti (Russo, 2013). Questo si è

evidenziato soprattutto per una delle due specie del gruppo *serpyllum* analizzate. Infatti solo due delle tre popolazioni di *Thymus pulegioides* raccolte sono a chemiotipo timolo, rispettivamente quella proveniente da Cogne e quella proveniente da La Thuile. Invece per quanto riguarda il timo raccolto a Bionaz siamo di fronte alla prima osservazione di una popolazione a chemiotipo alfa-terpinyl acetato in Italia. Tale composto è molto profumato con sentore di limone/bergamotto/lavanda e si trova come componente principale in diversi oli essenziali fra cui quello di pino e quello di cardamomo. Viene anche sintetizzato dall'industria per essere impiegato come aromatizzante negli oli essenziali artificiali o nei cibi quali, per esempio, i succhi di frutta. È stato dimostrato che l'estratto etanolic da semi di *Elettaria cardamomun*, che contiene il 46% circa di questo monoterpene naturale, risulta essere attivo nella malattia di Alzheimer, causata da un disordine neurodegenerativo irreversibile, perché in grado di legare molteplici *drug target* implicati in questo disturbo (Chowdhury, 2020). Questo composto si ritiene utile nella strategia terapeutica conosciuta come *multi-target drug ligand approach* per poter sviluppare una nuova terapia, sicura ed efficace per questa malattia, visto che è in grado di migliorarne i sintomi. Considerando che l'olio essenziale di *Thymus pulegioides* raccolto a Bionaz ne contiene altrettanto, sarà interessante approfondire le analisi nei prossimi anni.

In merito all'**attività antibatterica degli oli essenziali**, tutte le specie hanno mostrato efficacia nei confronti di tutti i ceppi testati e l'olio essenziale di *T. vulgaris* ha mostrato risultati sempre paragonabili a quelli dell'olio di timo commerciale. *Thymus praecox* ha mostrato la minore attività antibatterica, mentre *T. pulegioides* ha mostrato risultati intermedi. Gli oli essenziali dei timi spontanei, in particolare di *T. vulgaris*, possiedono quindi proprietà antibatteriche che possono essere efficacemente utilizzate nell'industria alimentare come ingrediente conservante, o come componente di packaging intelligenti, volti a migliorare la conservabilità dei prodotti.

Gli **estratti acquosi** di *T. vulgaris* presentano un contenuto di polifenoli totali maggiore rispetto a *T. praecox* e *T. pulegioides*, mentre questi ultimi hanno mostrato maggiore attività antiossidante (metodo DPPH e ABTS) rispetto al primo. Per tutti i parametri, si è evidenziata variabilità anche tra popolazioni appartenenti alla stessa specie, sottolineando l'influenza dell'ambiente sulla specie, che potrebbe essere ulteriormente approfondita valutando il profilo fitochimico in studi futuri.

Relativamente alla trasformazione del prodotto si è evidenziato come la **tecnologia di essiccazione** a bassa temperatura permetta di ottenere un prodotto dalle caratteristiche qualitative statisticamente simili a quello ottenuto mediante essiccazione tradizionale, in termini di composti bioattivi e attività antiossidante. Al contempo, è possibile ottenere il prodotto in un arco di tempo molto breve (24 ore) ed è possibile estrarre maggiori quantitativi di acqua dal materiale vegetale, che prende il nome di acqua costituzionale. Questo materiale di scarto dell'essiccazione a freddo ha comunque mostrato, con concentrazioni minori rispetto agli estratti vegetali, una valenza come fonte di polifenoli. Inoltre, seppur con un'ampia variabilità, le acque costituzionali ottenute dai timi del gruppo serpillo hanno presentato un'attività antiossidante che, se valutata con il metodo DPPH, è comparabile con gli estratti vegetali.

Il **confronto tra estrazione ad ultrasuoni e decotti** ha rivelato caratteristiche qualitative migliori per il decotto, che può essere quindi considerato un valido metodo di preparazione per tisane a base di timo, conferendo alti quantitativi di polifenoli e attività antiossidante.

La degustazione dei **liquori** a base di timo ha fatto emergere che la specie utilizzata conferisce un aroma differente al prodotto: i liquori a base di *T. vulgaris* mantengono la nota più amara e si avvicinano di più ai liquori di timo in commercio, quelli a base di *T. praecox* risultano troppo dolci, mentre i liquori a base di *T. pulegioides* mantengono una leggera nota dolce ma allo stesso tempo piacevole e risultano più ricchi in profumi e aromi. Anche i due metodi di estrazione hanno dato risultati differenti: un'estrazione a 70 gradi risulta più aggressiva nei confronti della pianta, causando un maggiore sedimento nel liquido, mentre un'estrazione a gradazione più bassa (55 gradi) ha favorito una maggior concentrazione di profumi e sapori; la scelta del metodo di estrazione, quindi, deve essere fatta in funzione della tipologia di liquore desiderata. Globalmente, il *T. pulegioides* raccolto a Bionaz è risultata la popolazione più interessante dal punto di vista liquoristico.

Le diverse attività svolte nell'ambito del progetto OpThymus hanno evidenziato alcune delle potenzialità dei timi spontanei delle Alpi occidentali e le possibili ricadute per gli attori della filiera, in particolare nell'utilizzo del *Thymus pulegioides*, specie meno conosciuta e poco utilizzata.

Inoltre, la coltivazione delle 3 specie di timo autoctono provenienti da diverse località, permetterà di ripetere le analisi svolte nell'ambito del progetto, osservare le caratteristiche delle diverse accessioni, a parità di condizioni ambientali e colturali, e confrontarle con quelle del materiale raccolto allo stato spontaneo.

L'obiettivo finale sarà fornire indicazioni tecniche alle aziende locali interessate ad avviare una coltivazione o trasformazione di varietà locali, valorizzando il patrimonio genetico valdostano e salvaguardando la biodiversità del territorio regionale.

6. Bibliografia

Bartolucci F., 2018. *Thymus L.* In: Pignatti S., Guarino R., La Rosa M. (Eds) Flora d'Italia. Ed. 2, Vol. 3. Edagricole di New Business Media, Bologna, pp. 278-290.

Bartolucci F., 2019. *Chiavi analitiche, Thymus L. e Thymbra L.* In: Pignatti S., Guarino R., La Rosa M. (Eds) Flora d'Italia. Ed. 2, Vol. 4. Edagricole di New Business Media, Bologna, pp. 740-741.

Bischof-Deichnik C., Holtuijzen J., & Stahl-Biskup E., 2000. Multivariate statistical analysis of the essential oil composition of *Thymus praecox* Opiz ssp. *polytrichus* (Kern. ex Borb.) Ronn. collected in the Tyrolean Alps. *Flavour and fragrance journal*, 15 (1), 1-6.

Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Kameli A., Saidi F., Kebir H.T., 2014. *Lemon grass (Cymbopogon citratus) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs.* *Libyan Journal of Medicine*, 9(1).

Chowdhury S., & Kumar S., 2020. Alpha-terpinyl acetate: A natural monoterpenoid from *Elettaria cardamomum* as multi-target directed ligand in Alzheimer's disease. *Journal of Functional Foods*, 68, 103892.

Demasi S., Caser M., Donno D., Ravetto Enri S., Lonati M., Scariot V., 2021. *Exploring wild edible flowers as a source of bioactive compounds: new perspectives in horticulture.* *Folia Horticulturae*, 33, 1–22.

De Martino L., Bruno M., Formisano C., De Feo V., Napolitano F., Rosselli S., Senatore F., 2009. *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of Thymus growing wild in southern Italy.* *Molecules*, 14(11), 4614-4624.

Ložien K., Vaičiūnienė J., Venskutonis P. R., 2003. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(3), 249-259.

Mancini E., Senatore F., Del Mont, D., De Martino L., Grulova D., Scognamiglio M., et al, De Feo V., 2015. *Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five Thymus vulgaris L. essential oils.* *Molecules*, 20(7), 12016-12028.

Miladi H., Slama R. B., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar, E., 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris L.* and *Rosmarinus officinalis L.*: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6), 1-11.

Mockute D., Bernotiene G., 2001. *The α -terpenyl acetate chemotype of essential oil of Thymus pulegioides L.* *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(1), 69-76.

Ozcan M., Chalchat J. C., 2004. *Aroma profile of Thymus vulgaris L. growing wild in Turkey.* *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30(3-4), 68-73.

Pavela R., Bartolucci F., Desneux N., Lavoit A. V., Canale, A., Maggi, F., Benelli G., 2019. *Chemical profiles and insecticidal efficacy of the essential oils from four Thymus taxa growing in central-southern Italy.* *Industrial Crops and Products*, 138, 111460.

- Piccaglia R., Marotti M., 1991. *Composition of the essential oil of an Italian Thymus vulgaris L. ecotype*. Flavour and Fragrance Journal, 6(3), 241-244.
- Pignatti S., 1979. *I piani di vegetazione in Italia*. Giornale botanico italiano, 113 (5-6): 411-428.
- Rey C., 1990. *Thymus vulgaris L. du val d'Aoste (Italie): un écotipe intéressant pour les zones marginales*. Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic. 22 (5), 313-324.
- Russo M., Suraci F., Postorino S., Serra D., Roccotelli A., Agosteo G. E., 2013. *Essential oil chemical composition and antifungal effects on Sclerotium cepivorum of Thymus capitatus wild populations from Calabria, southern Italy*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23(2), 239-248.
- Sárosi S., Bernáth J., Bertoli A., Pistelli L., Benvenuti S., 2011. *Essential oil polymorphism of Thymus pulegioides collected in Monti Pisani, Italy*. In 1th International Symposium on Medicinal, Aromatic and Nutraceutical Plants from Mountainous Areas (MAP-Mountain 2011) 955 (pp. 59-64).
- Senatore F., 1996. *Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (Thymus pulegioides L.) growing wild in Campania (Southern Italy)*. Journal of agricultural and food chemistry, 44(5), 1327-1332.
- Thedy L., Perruquet D., Sado A., Valentini S. Bassignana M., Barmaz A., 2015. *Caratterizzazione di olio essenziale di Thymus vulgaris L. da diverse accessioni provenienti da colonie spontanee in Valle D'Aosta*. III Congresso Nazionale della Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali. Roma, 6-8 novembre.
- Valentini G., Hruska K., Bellomaria B., 1987. *Ricerche sull'olio essenziale di alcune specie del genere Thymus nell'Italia Centrale*. Informatore botanico Italiano, 19(3), 270-279.
- Vidic D., Čavar S., Šolić M. E., Maksimović M., 2010. *Volatile constituents of two rare subspecies of Thymus praecox*. Natural product communications, 5(7), 1934578X1000500730.

7. Allegato 1. Comunicazione di accettazione dell'erogazione



INSTITUT AGRICOLE REGIONAL

Rég. La Rochère 1/A
11100 Aosta Italia
CF & PI 00415990076

tel. 0165 215 811 fax 0165 215 800
e-mail: iar@iaraosta.it
internet: www.iaraosta.it

Aosta, 23 gennaio 2019

c.a. Signor Giovanni Quaglia
Presidente Fondazione Cassa di Risparmio di Torino
Via XX Settembre, 31 - 10121 Torino

Prot. n. 13/AMM/2019

Oggetto: Accettazione dell'erogazione, RF=2018.2054

Facendo seguito alla Vs. comunicazione dell'erogazione a sostegno del progetto "OpThymus - Piante officinali e territorio: attività innovative per sviluppare e valorizzare la filiera dei timi spontanei delle Alpi occidentali" del 6 dicembre 2018, protocollo 2018.AI1516.U1796, Vi ringraziamo per l'accoglimento della nostra proposta progettuale.

L'assegnazione di un contributo di € 25.000, a fronte del contributo richiesto di € 56.648, ci pone nell'obbligo di operare una rimodulazione economica del progetto, che comporterà anche la riduzione del numero di accessioni di timo che verranno prese in considerazione, pur mantenendo invariati gli obiettivi del progetto, la sua articolazione temporale e le attività in programma.

Inizialmente prevedevamo di identificare, prelevare, propagare, coltivare e analizzare popolazioni valdostane di sei specie di timo: *Thymus vulgaris* L., *Thymus oenipontanus*, *Thymus praecox*, *Thymus pulegioides* (subsp. *pulegioides* e subsp. *pannonicus*) e *Thymus vallicola*. La rimodulazione ci induce a concentrarci sulle tre specie più rilevanti per l'areale regionale:

- *Thymus vulgaris* (subsp. *vulgaris*);
- *Thymus praecox* (subsp. *polytrichus*);
- *Thymus pulegioides* (subsp. *pulegioides*).

Questo permetterà di ridurre i costi di personale e quelli legati alle analisi da effettuare presso l'IAR e presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA) dell'Università degli Studi di Torino. Nella riformulazione del quadro economico, l'IAR, inoltre, si assumerà il costo dei materiali per la coltivazione e la raccolta. È stato eliminato, infine, il contributo previsto all'opificio liquoristico.

Il costo totale originariamente previsto era di € 77.948, con un contributo richiesto alla Vs. Fondazione di € 56.648, (pari al 72,9%) e un autofinanziamento da parte dell'IAR di € 21.098 (pari al 27,1%).

Dopo la rimodulazione il costo totale è ora di € 38.160, dei quali il contributo della Fondazione, pari a € 25.000, copre il 65,5% e l'autofinanziamento dell'IAR, di € 13.160, copre il 34,5%.

Presentiamo qui di seguito il confronto tra il quadro economico originario (Tab. 1) e quello rivisto (Tab. 2) e alleghiamo alla presente anche la relazione descrittiva del progetto nella sua ultima versione.

Distinti saluti,

Dott.ssa Francesca Madormo
(Referente del progetto)

Tabella 1. Quadro economico originario.

Categoria					Importo (€)	Importo (%)
Costi per ristrutturazione di immobili e/o opere di manutenzione straordinaria					0	0,0%
Costo di acquisto di beni strumentali e attrezzature					6.500,00	8,3%
Costo di personale e collaborazioni					42.900,00	55,0%
Costi di comunicazione					0	0,0%
Altro					28.548,00	36,6%
Totale					77.948,00	100,0%
Cat.	Voce	Costo unitario	Un. di misura	Quantità	Totale attività (€)	Copertura
2	Materiale di consumo per coltivazione e raccolta	800,00	forfait	1	800,00	Fondazione CRT
2	Distillatore Clevenger	1800,00	forfait	1	1.800,00	Fondazione CRT
2	Vetreteria per stoccaggio	1000,00	forfait	1	1.000,00	Fondazione CRT
2	Materiale per analisi chimica	2900,00	forfait	1	2.900,00	Fondazione CRT
3	Primo ricercatore A	180,00	€/giorno	75	13.500,00	IAR
3	Primo ricercatore B	160,00	€/giorno	35	5.600,00	IAR
3	Referente contabile	220,00	€/giorno	10	2.200,00	IAR
3	Incaricato di ricerca	200,00	€/giorno	100	20.000,00	Fondazione CRT
3	Vivaio per moltiplicazione	800,00	forfait	1	800,00	Fondazione CRT
3	Opificio liquoristico	800,00	forfait	1	800,00	Fondazione CRT
5	Collaborazione con DISAFA – Università di Torino (Partner percettore)	28.548	forfait	1	28.548,00	Fondazione CRT
Totale					77.948,00	
Legenda Cat.						
1: Costi per ristrutturazione di immobili						
2: Costo di acquisto di beni strumentali e attrezzature						
3: Costo di personale e collaborazioni						
4: Costi di comunicazione						
5: Altro						

Tabella 2. Quadro economico rivisto.

Categoria					Importo (€)	Importo (%)
Costi per ristrutturazione di immobili e/o opere di manutenzione straordinaria					0	0,0%
Costo di acquisto di beni strumentali e attrezzature					6.500,00	17,0%
Costo di personale e collaborazioni					20.160,00	52,8%
Costi di comunicazione					0	0,0%
Altro					11.500,00	30,1%
Totale					38.160,00	100,0%
Cat.	Voce	Costo unitario	Un. di misura	Quantità	Totale attività (€)	Copertura
2	Materiale di consumo per coltivazione e raccolta	800,00	forfait	1	800,00	IAR
2	Distillatore Clevenger	1800,00	forfait	1	1.800,00	Fondazione CRT
2	Vetreteria per stoccaggio	1000,00	forfait	1	1.000,00	Fondazione CRT
2	Materiale per analisi chimica	2900,00	forfait	1	2.900,00	Fondazione CRT
3	Primo ricercatore A	180,00	€/giorno	37	6.660,00	IAR
3	Primo ricercatore B	160,00	€/giorno	26	4.160,00	IAR
3	Referente contabile	220,00	€/giorno	7	1.540,00	IAR
3	Incaricato di ricerca	200,00	€/giorno	35	7.000,00	Fondazione CRT
3	Vivaio per moltiplicazione	800,00	forfait	1	800,00	Fondazione CRT
3	Opificio liquoristico	0,00	forfait	1	-	
5	Collaborazione con DISAFA – Università di Torino (Partner percettore)	11.500	forfait	1	11.500,00	Fondazione CRT
Totale					38.160,00	
Legenda Cat.						
1: Costi per ristrutturazione di immobili						
2: Costo di acquisto di beni strumentali e attrezzature						
3: Costo di personale e collaborazioni						
4: Costi di comunicazione						
5: Altro						

8. Allegato 2. Risultati delle analisi sensoriali sui liquori a base di timo

N.	Specie	Località di raccolta	Grado estrazione	V. visiva	V. olfattiva			V. gustativa		V. retrogustativa		Valutazione globale
				Limpidezza	Intensità	Ricchezza	Persistenza	Intensità	Equilibrio	Persistenza	Amaro	
1	<i>T. vulgaris</i>	Saint-Denis	55%	5	7	4	3	8	4	5	4	5
2	<i>T. vulgaris</i>	Saint-Denis	70%	4	6	4	3	7	7	8	6	6
3	<i>T. vulgaris</i>	Quart	55%	4	5	2	2	9	4	9	2	7
4	<i>T. vulgaris</i>	Quart	70%	4	7	5	4	7	7	7	6	7
5	<i>T. praecox</i>	Cogne	55%	7	3	2	2	2	2	3	1	2
6	<i>T. praecox</i>	Cogne	70%	5	5	6	4	2	1	8	1	3
7	<i>T. praecox</i>	Bionaz	55%	6	4	7	4	7	4	7	2	5
8	<i>T. praecox</i>	Bionaz	70%	5	4	8	4	7	4	7	2	5
9	<i>T. praecox</i>	La Thuile	55%	8	7	6	4	5	3	4	1	3
10	<i>T. praecox</i>	La Thuile	70%	3	4	5	2	2	1	8	1	2
11	<i>T. pulegioides</i>	Cogne	55%	5	8	8	4	4	3	3	2	4
12	<i>T. pulegioides</i>	Cogne	70%	3	5	2	3	6	4	3	1	3
13	<i>T. pulegioides</i>	Bionaz	55%	10	4	6	3	8	8	8	3	8
14	<i>T. pulegioides</i>	Bionaz	70%	9	5	5		9	7	5	2	7
15	<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	55%	5	7	9	5	7	4	6	2	7
16	<i>T. pulegioides</i>	La Thuile	70%	1	5	6	6	6	4	8	7	2