

Abstract

This study investigates the phytochemical profile and biological potential of selected species of the genus *Origanum*, with a focus on *O. dictamnus*, *O. majorana*, *O. vulgare*, and *O. heracleoticum*. The work was structured into three main objectives. First, the volatile and non-volatile fractions of *O. dictamnus* were evaluated. The essential oil was characterised through GC–MS and evaluated for its inhibitory effects on key enzymes involved in neurodegenerative and metabolic disorders. Kinetic analyses were performed to clarify the mode of inhibition. *In silico* analysis by molecular docking supported the in vitro results, clarifying the interactions of the main constituents — particularly carvacrol and p-cymene — with the enzyme's active sites. For the non-volatile fraction, three extraction methods (maceration with 70% ethanol, maceration with 20% ethanol, and pressurized liquid extraction (PLE) with 20% ethanol) were compared in terms of extraction efficiency and biological activity (antioxidant and enzymatic assays). The extract obtained via PLE, which showed the best overall performance, was further analyzed by LC-HRESIMS/MS to characterize its metabolic profile. The second objective consisted of an interspecific comparison of essential oils from *O. majorana*, *O. vulgare*, and *O. heracleoticum*. Their chemical composition was determined through GC–MS, and their antioxidant properties and enzyme inhibitory activities were assessed on targets related to neurodegenerative and metabolic diseases. Enzyme kinetic studies were performed to investigate potential differences in their mechanisms of action. The third objective focused on an intraspecific comparison of *O. heracleoticum* collected from different Italian regions. Eight samples were analysed for the volatile fraction, allowing the identification of chemical variability through GC–MS and multivariate statistical analysis. Selected samples were tested for activities related to the central nervous system and metabolic disorders. For the non-volatile fraction, six samples were extracted using the optimized PLE method and evaluated for their chemical features and biological properties, particularly regarding enzymes involved in metabolic dysfunction. Overall, the findings demonstrate chemical diversity among *Origanum* species and highlight their potential as sources of natural inhibitors targeting enzymes implicated in neurodegenerative and metabolic disorders. The study supports the relevance of *Origanum* spp. as promising candidates for nutraceutical and phytotherapeutic applications.

Abstract

Questo studio analizza il profilo fitochimico e le bioattività di specie appartenenti al genere *Origanum*, con particolare attenzione a *O. dictamnus*, *O. majorana*, *O. vulgare* e *O. heracleoticum*. Il lavoro è stato strutturato in tre obiettivi principali. In primo luogo, sono state valutate le frazioni volatili e non volatili di *O. dictamnus*. L'olio essenziale è stato caratterizzato tramite GC-MS e successivamente è stato valutato il suo possibile effetto inibitorio su enzimi chiave coinvolti in disturbi neurodegenerativi e metabolici. Sono state eseguite analisi cinetiche per chiarire la modalità di inibizione. L'analisi *in silico* mediante docking molecolare ha supportato i risultati *in vitro*, chiarendo le interazioni dei principali costituenti, in particolare carvacrolo e *p*-cimene, con i siti attivi dell'enzima. Per la frazione non volatile, tre differenti metodi di estrazione (macerazione con etanolo al 70%, macerazione con etanolo al 20% ed estrazione con liquido pressurizzato (PLE) con etanolo al 20%) sono stati confrontati in termini di efficienza di estrazione e attività biologica (saggi antiossidanti ed enzimatici). L'estratto ottenuto tramite PLE, che ha mostrato le migliori prestazioni complessive, è stato analizzato mediante LC-HRESIMS/MS per caratterizzarne il profilo metabolico. Il secondo obiettivo consisteva in un confronto interspecifico di oli essenziali di *O. majorana*, *O. vulgare* e *O. heracleoticum*. La loro composizione chimica è stata determinata tramite GC-MS e le loro proprietà antiossidanti e attività inibitorie enzimatiche sono state valutate su target correlati a malattie neurodegenerative e metaboliche. Sono stati condotti studi di cinetica enzimatica per indagare potenziali differenze nei loro meccanismi d'azione. Il terzo obiettivo si è concentrato su un confronto intraspecifico di *O. heracleoticum* raccolto in diverse regioni italiane. È stata analizzata la frazione volatile di otto campioni, consentendo l'identificazione della composizione chimica tramite GC-MS e successivamente le differenze tra loro è stata analizzata mediante analisi statistica multivariata. I campioni sono stati selezionati per valutare attività correlate al sistema nervoso centrale e a disturbi metabolici. Per la frazione non volatile, sei campioni sono stati estratti utilizzando il metodo PLE ottimizzato e valutati per le loro caratteristiche chimiche e proprietà biologiche, in particolare per quanto riguarda gli enzimi coinvolti nelle disfunzioni metaboliche. Nel complesso, i risultati dimostrano la diversità chimica tra le specie di *Origanum* e ne evidenziano il potenziale come fonti di inibitori naturali nei confronti di enzimi implicati nei disturbi neurodegenerativi e metabolici. Lo studio supporta la rilevanza di *Origanum* spp. come promettenti candidati per applicazioni nutraceutiche e fitoterapiche.