

Viterbo, 01/02/2012

OGGETTO: Relazione Progetto BBB al Febbraio 2012

In riferimento all'oggetto della presente, si comunica che il programma tecnico-scientifico ad oggi sviluppato è in linea con quanto programmato.

UO1: Balestra G.M., DAFNE UnivTuscia (VT)

Sono proseguite differenti prove in pieno campo ed in ambiente protetto su sostanze di origine naturale (estratti vegetali, oli essenziali) al fine di valutare le proprietà antimicrobiche (battericida/batteriostatica) in differenti rapporti di concentrazione rispetto ai patogeni di natura batterica (*Pseudomonas syringae* pv. tomato e *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae) oggetto d'indagine e di saggiarne i diversi principi attivi.

- Prove su pomodoro

In seguito ai risultati ottenuti in serra sull'efficacia dei microincapsulati a base di polimetilmetacrilati nel controllo di *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) su piante di pomodoro sono state allestite le prove in pieno campo.

Le prove sono state condotte su piantine di pomodoro biologico, varietà Pullrex Bio, in parcelle sperimentali allestite presso l'Azienda Didattico-Sperimentale "Nello Lupori" dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.

Le parcelle erano costituite da 16 piante ciascuna e sono state sottoposte a differenti

E' stata ottenuta una sospensione batterica di *P. s.* pv. tomato, avente una concentrazione di 10^6 ufc/ml, distribuita sulle piante di pomodoro con un vaporizzatore manuale; mantenendo una distanza di circa 30 cm tra le foglie ed il vaporizzatore, la sospensione veniva distribuita fino ad ottenere una completa ed uniforme bagnatura delle pagine fogliari.

I trattamenti fogliari con i microincapsulati sono stati effettuati, in via preventiva, 24 ore prima dell'inoculazione con il patogeno impiegando una concentrazione di 10 g/l.

Dal primo giorno di inoculazione le piante sono state monitorate giornalmente per tutta la durata della prova al fine di verificare e seguire la comparsa e l'evoluzione dei sintomi (Incidenza e Gravità della malattia).

La gravità della malattia veniva calcolata dalla comparsa alla confluenza dei sintomi della picchiettatura batterica (8°-10° giorno). Dai risultati ottenuti è emerso che rispetto alle piante della tesi di controllo (non trattato), i formulati impiegati hanno ridotto la gravità della malattia.

- **Prove su actinidia**

Le prove venivano effettuate in ambiente controllato su piante in vaso di actinidia appartenenti alle cultivars Hayward e Soreli[®]; sulle piante oggetto di indagine sono stati effettuati, in via preventiva, i trattamenti fogliari con i microincapsulati; nelle 24 ore successive la sospensione batterica di *P. s. pv. actinidiae*, alla concentrazione di 10⁶ ufc/ml, è stata distribuita sulle piante di actinidia mediante un vaporizzatore manuale; mantenendo una distanza di circa 30 cm tra le foglie ed il vaporizzatore, la sospensione veniva distribuita fino ad ottenere una completa ed uniforme bagnatura delle pagine fogliari.

Nei giorni successivi ai trattamenti le foglie venivano monitorate giornalmente al fine di verificare e seguire la comparsa e l'evoluzione dei sintomi (Incidenza e Gravità della malattia).

La gravità della malattia è stata calcolata dalla comparsa dei primi sintomi della batteriosi (10°-12° giorno). I saggi sono stati numericamente ripetuti al fine di poter validare i risultati conseguiti dal punto di vista statistico.

Dai risultati ottenuti è emerso che rispetto alle piante della tesi di controllo (non trattato), i formulati impiegati hanno ridotto la gravità della malattia.

UO2: Tiezzi A., DIBAF UnivTuscia (VT)

Lo svolgimento di attività di ricerca necessita di una attenta conoscenza e valutazione e in tal senso abbiamo provveduto a prendere conoscenza di quanto svolto dagli altri ricercatori del settore. La ricerca bibliografica ha permesso di procedere alla effettuazione di saggi in laboratorio i quali sono risultati utili per la messa a punto delle condizioni di operatività dei mezzi di indagine utilizzati e utilizzabili nei nostri esperimenti.

L'attività di ricerca sin qui condotta si è così articolata:

a) Effettuazione di estratti di foglie di *Mirtus communis*

A seguito della ricerca bibliografica si è individuata la pianta di *Mirtus communis* (nome volgare mirto) come possibile sorgente di molecole ad azione antibatterica contro batteri patogeni per piante di interesse agrario. Foglie fresche di *Mirtus communis* sono state omogenate in etanolo e lasciate in estrazione al buio. La soluzione era centrifugata, il pellet scartato ed il soprannatante sottoposto a sostituzione di solvente per mezzo di evaporazione di alcool sotto flusso di azoto gassoso. Al termine del processo le molecole estratte dalle foglie di mirto si trovavano in soluzione acquosa e potevano così essere somministrate alle colture di batteri per saggiarne l'eventuale attività antibatterica.

b) Saggi di attività antibatterica

Questa attività è stata condotta in stretta collaborazione con l'UO1. Isolati batterici di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* venivano posti in coltura su specifici substrati agarizzati.

L'attività antibatterica è stata saggiata per mezzo di procedure di spot test, caricando piccoli volumi dell'estratto di foglie di mirto su dischetti di cotone e rilevando l'eventuale presenza zone di inibizione della crescita batterica in prossimità del dischetto.

Questi saggi hanno permesso di ipotizzare la presenza di molecole ad attività antibatterica nell'estratto di *Mirtus communis*. I saggi hanno anche permesso di evidenziare la presenza di attività antibatterica solo in determinati periodi dell'anno, così mostrando una correlazione tra attività antibatterica degli estratti e condizioni ambientali, parametri stagionali e ciclo biologico della pianta. Studi sono in corso per valutare la possibilità di operare con campioni di foglie essiccate prelevate dalla pianta durante il periodo in cui si manifesta l'attività antibatterica.

c) Indagini chimiche per il frazionamento degli estratti

Allo scopo di procedere alla individuazione della molecola/molecole responsabili dell'attività antibatterica sono in corso indagini di tipo chimico che permettano intanto l'individuazione di una frazione dell'estratto contenente la molecola/molecole responsabili dell'attività antibatterica. Indagini di tipo preliminare sono state condotte per mezzo di procedure di Cromatografia su Strato Sottile (TLC) e sono state saggiate come fasi mobili varie miscele di solventi. Alcune di queste miscele manifestano attività interessanti ed hanno permesso di suddividere l'estratto di *Mirtus communis* in alcune frazioni. Le frazioni ottenute saranno sottoposte a saggi per la valutazione di eventuale attività antibatterica.

UO3: Muganu M., DAFNE UnivTuscia (VT)

Rilievi condotti in serra

Actinidia

I rilievi, effettuati su giovani piante di actinidia, hanno avuto lo scopo di valutare gli eventuali effetti fitotossici delle sostanze di difesa impiegate e di monitorare i ritmi di crescita delle giovani piante. I rilievi sono iniziati il giorno precedente alla esecuzione dei trattamenti da parte della UO1 e sono stati conclusi circa sei settimane dopo. Come testimone sono state impiegate piantine trattate con prodotto rameico convenzionale. Sono state impiegate cultivar di *Actinidia chinensis* e di *Actinidia deliciosa*.

Lo schema sperimentale adottato è stato a blocchi randomizzati.

Sono stati effettuati rilievi su:

- **presenza di danni riferibili a fitotossicità dei principi attivi**
- **indici biometrici di crescita**

Sono stati rilevati per ciascuna tesi i seguenti parametri: altezza, peso fresco della parte aerea e delle radici, numero di nodi.

- **sostanza secca finale delle piante.**

E' stata determinata la sostanza secca della parte aerea delle giovani piante.

A) Rilievo della fitotossicità

Nessuna alterazione del tessuto fogliare riconducibile ad un effetto fitotossico del formulato in prova è stato rilevato sulle piante trattate.

B) Rilievi sulla crescita

Per tutti i parametri analizzati, i risultati ottenuti sono in fase di elaborazione.

Rilievi su colture in pieno campo

I rilievi sono stati effettuati sulle piante di pomodoro e su piante adulte di actinidia impiegate dall'UO1 ed hanno avuto lo scopo di valutare gli eventuali effetti fitotossici delle sostanze di difesa impiegate, di monitorare i ritmi di crescita delle piante e di valutare la qualità dei frutti ottenuti. In entrambe le specie i rilievi sono iniziati il giorno precedente alla esecuzione dei trattamenti da parte della UO1 e sono stati conclusi alla maturazione dei frutti. Come testimone sono state impiegate piante trattate con prodotto rameico convenzionale. Lo schema sperimentale adottato è stato a blocchi randomizzati.

A) Pomodoro

Sulle parcelle in prova sono stati effettuati rilievi su:

- **presenza di danni riferibili a fitotossicità dei principi attivi impiegati;**
- **determinazione dei principali parametri compositivi e qualitativi dei frutti.**

A) Rilievo della fitotossicità

Anche in questo caso con lo scopo di evidenziare effetti fitotossici riconducibili ai prodotti usati per la difesa sono stati eseguiti rilievi sull'apparato fogliare nei dieci giorni successivi alla applicazione del formulato. In nessuna delle parcelle in prova sono stati riscontrati sui tessuti delle piante sintomi riferibili a fitotossicità.

B) Sostanza secca finale dei frutti di pomodoro in pieno campo

Al momento della maturazione delle bacche, sono stati campionati 5 frutti per ciascuna delle 10 parcelle di ciascuna tesi e su questi è stata determinata la sostanza secca per mezzo di essiccazione in stufa a 90°C (fino a peso costante dei campioni). Successivamente è stata calcolata la percentuale di sostanza secca dei frutti di ogni parcella. La sostanza secca è risultata maggiore per le piante sottoposte a trattamenti con i bioformulati.

C) - Determinazione parametri compositivi e qualitativi dei frutti

Nei frutti giunti a maturazione commerciale sono stati determinati: grado rifrattometrico, pH, acidità titolabile, lucentezza, angolo di colore e croma. I risultati sono risultati equivalenti.

Dati qualitativi frutti pomodoro in pieno campo. I risultati sono risultati equivalenti.

Analisi al colorimetro dei frutti di pomodoro coltivati in pieno campo (U.O. 1). I risultati sono risultati equivalenti.

B) Actinidia

In pieno campo lo schema sperimentale a blocchi randomizzati ha previsto l'impiego di tre ripetizioni di tre piante per ciascuna tesi. Da ogni parcella, sono state campionate 26 foglie prelevate dai germogli ai nodi 8° e 9°, di queste è stata misurata la superficie della lamina.

Superficie fogliare media delle piante in pieno campo (cm²). I risultati sono risultati equivalenti.

UO4: Cortesi R., DISFA UnivFerrara (FE)

L'UO3 di Ferrara si è occupata dello sviluppo e messa a punto di alcuni sistemi di rilascio (bioformulati) a matrice organica in grado di contenere e quindi di rilasciare nel tempo le molecole attive nei confronti dei batteri fitopatogeni oggetto di studio. In particolare si cerca di progettare e produrre bioformulati microparticellari in grado di preservare le molecole attive dall'ambiente circostante e di realizzare rilasci protratti e controllati nel tempo.

Obiettivi del progetto sono:

- 1- Messa a punto del sistema analitico quali-quantitativo dei principi attivi utilizzati
- 2- Studio preformulativo per ottenere le condizioni standard di preparazione di bioformulati a base di polimetilmetacrilati o derivati della cellulosa
- 3- Produzione e caratterizzazione di bioformulati contenenti AE e/o AG
- 4- Valutazione della resa di incapsulazione dei principi attivi nelle microsfele prodotte
- 5- Determinazione *in vitro* della cinetica di rilascio delle molecole bioincapsulate
- 6- Eventuale studio preformulativo di sistemi nanoparticellari a matrice lipidica

Risultati

Messa a punto del sistema analitico quali-quantitativo dei principi attivi utilizzati

Come molecole attive nei confronti di batteri fitopatogeni oggetto di studio sono stati selezionati per questo progetto 2 acidi. Inizialmente è stata messa a punto la metodica analitica con cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) per la determinazione quantitativa del principio attivo.

Studio preformulativo per ottenere le condizioni standard di preparazione di bioformulati a base di polimetacrilati o derivati della cellulosa

Per la produzione dei bioformulati è stato proposto l'utilizzo dei seguenti polimeri:

- 1- un polimero sintetico biocompatibile quale l'Eudragit[®] RS100, poli(trimetilammonioetil metacrilato cloruro);
- 2- due derivati della cellulosa quali l'idrossipropilmetilcellulosa ftalato (HPMCP) e l'etilcellulosa.

Eudragit[®] RS100 è un polimero insolubile in acqua. Ha la capacità di formare in acqua un film rigonfiabile grazie alla presenza di esteri metacrilici e della percentuale di cloruro di trietilammonioetil metacrilato.

Idrossipropilmetilcellulosa ftalato (HPMCP) è un polimero semisintetico derivato dalla cellulosa è facilmente solubile in molti solventi organici ed in soluzioni acquose con pH inferiore a 5.0-5.5.

Etilcellulosa è un polimero derivato dalla cellulosa. È insolubile in acqua, ma solubile in solventi organici come eteri, alcoli, chetoni, esteri e idrocarburi.

I polimeri prescelti sono stati miscelati con alcuni tensioattivi e poi dissolti in miscele solventi. Valutate le solubilità relative del polimero e dei principi attivi, si è proceduto con uno studio preformulativo al fine di scegliere la formulazione più adatta all'incapsulazione di dei principi attivi e per valutare le condizioni strumentali più adatte. I dati ottenuti hanno permesso di selezionare le condizioni di preparazione standard per la preparazione di bioformulati a base di Eudragit.

Produzione e caratterizzazione di bioformulati

Le diverse condizioni di solubilità degli acidi rispetto a quella del polimero, ci ha indirizzato verso la produzione di microparticelle contenenti entrambi i principi attivi al 2% p/p in presenza del cosolvente NMP. Per i bioformulati a base di derivati della cellulosa, è stato incluso l'acido da solo alla concentrazione del 10% p/p rispetto la quantità totale polimero utilizzato.

Valutazione della resa di incapsulazione dei principi attivi nelle microsfere prodotte

La resa di incapsulazione è stata valutata estraendo gli acidi utilizzando una miscela etanolo: acqua 95:5 (v/v), o metanolo. La quantità di acido veicolato nelle microparticelle è stata determinata mediante cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) delle miscele estratte, utilizzando una colonna C18 a fase inversa. I risultati ottenuti indicano che nei bioformulati a base di Eudragit la percentuale di incapsulazione è del $78,5\% \pm 4,49$, e del $88,5\% \pm 3,21$.

Determinazione della cinetica di rilascio degli acidi dai bioformulati

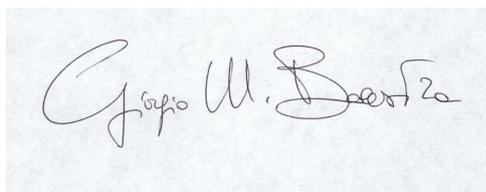
Nel presente studio si è scelta la tecnica della dialisi all'equilibrio. Per quanto riguarda i bioformulati a base di Eudragit® RS100/Span 20 (95:5, v/v), il rilascio varia dall'1 al 30% nelle 24 ore. Per quanto riguarda la cinetica di rilascio degli acidi dai bioformulati a base dei derivati della cellulosa (HPMC ed etilcellulosa), la percentuale rilasciata dopo 24 ore è stata del $98,0\% \pm 2,13$ per la soluzione, del $4,04\% \pm 1,12$ per il bioformulato a base di HPMC e del $88,48\% \pm 0,43$ per il bioformulato a base di etilcellulosa. Per quanto concerne i bioformulati a base di derivati della cellulosa, è stato incluso da solo l'acido alla concentrazione del 10% p/p rispetto la quantità totale di polimero utilizzato. La resa di incapsulazione è stata valutata estraendo acido. Per le microparticelle a base di HPMCP la percentuale di incapsulato diminuisce con l'aumentare della quantità di polimero presente. Come formulazione standard a base di HPMC è stata selezionata la HPMC 5%. Per le microparticelle a base di Etilcellulosa la percentuale di principio attivo incapsulato risulta comparabile a quella ottenuta utilizzando HPMC al 7.5 % o al 15%.

Dai risultati ottenuti con la tecnica di dialisi all'equilibrio il rilascio di acido dalla soluzione acquosa è molto più veloce rispetto a quello ottenuto dalle microparticelle a base di polimetacrilato. Questo a dimostrare che le microparticelle di Eudragit® RS100 hanno un rilascio più costante e protratto nel tempo. Si evidenzia inoltre che la presenza del co-solvente NMP nella preparazione riduce ulteriormente la percentuale di rilascio (dal 21.8% al 14.7%).

Dall'analisi dei risultati ad oggi conseguiti è quindi possibile trarre le seguenti conclusioni. Gli studi riguardanti la capacità delle microparticelle di rilasciare i principi attivi incapsulati condotti attraverso delle dialisi all'equilibrio hanno dimostrato che la percentuale di rilascio di acido dopo 24 ore per i bioformulati a base di Eudragit[®] RS100 al 2% in AG è 21.8% in tampone fosfato; per i bioformulati a base di Eudragit[®] RS100 al 2% + NMP è 14.7% in tampone fosfato; per i bioformulati a base di HPMCP è 10.24% in tampone fosfato, 4.04% in acqua e nelle soluzioni acide è 25.86% per i bioformulati a base di etilcellulosa è 6.68% in tampone fosfato, 88.48% in acqua e nelle soluzioni acide è 10.4%.

Il Coordinatore del Progetto MIPAAF, BBB

G.M. BALESTRA

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink. The signature is written in a cursive style and appears to read 'G. Balestra'.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE) Via S. Camillo De Lellis snc - 01100 Viterbo Tel. 0761 357474 - Fax 0761 357558 – Cell. 333 4246404 – Email: balestra@unitus.it