

PROGETTO ESECUTIVO PAN per l'Agricoltura Biologica e i Prodotti Biologici 2008/2009 Azione 2.2.: Progetto MIPAAF BBB

Unità Operativa 1: Balestra G.M., DAFNE UnivTuscia

Sono proseguite e sono tutt'ora in corso differenti prove in pieno campo mediante sostanze di origine naturale al fine di valutare le loro proprietà antimicrobiche (battericida/batteriostatica) rispetto ai patogeni di natura batterica (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), agenti di malattia come di gravi danni perdite supiante di pomodoro e di actinidia.

- Prove su Piante di Pomodoro

In seguito ai risultati ottenuti in serra ed in pieno campo durante il 2011 sull'efficacia dei microincapsulati a base di polimetilmetacrilati nel controllo di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) su piante di pomodoro, sono state allestite ulteriori prove in pieno campo nel 2012.

Le prove, considerata la stagionalità, sono all'inizio e pertanto al momento non si hanno dati disponibili. Per le stesse sono state costituite 16 parcelle ognuna a sua volta costituita da 16 piante e sono state sottoposte a differenti

E' stata programmato di contaminare artificialmente le piante di pomodoro mediante una sospensioni batterica di *P. s.* pv. *tomato* (Pst) 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 verranno 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 verranno monitorate giornalmente per tutta la durata della prova al fine di verificare e seguire la comparsa e l'evoluzione dei sintomi caratteristici causati da Pst.

- Prove su Piante di Actinidia

- Le prove sono tutt'ora in corso in pieno campo su impianti di *Actinidia deliciosa* cv. Hayward naturalmente affetti dall'agente del cancro batterico dell'actinidia, Psa. Sulle piante oggetto di indagine sono stati effettuati, in via preventiva, i trattamenti fogliari con i microincapsulati. Nei giorni successivi ai trattamenti le foglie venivano monitorate giornalmente al fine di verificare e

seguire la comparsa e l'evoluzione dei sintomi. Come rilievi si effettuano frequenti sopralluoghi e monitoraggi sullo stato fitosanitario delle piante limitatamente alle parcelle sperimentali.

- Rilievi specifici (rami, foglie, fiori, boccioli) per determinare:
 - L'incidenza della malattia secondo una scala preventivamente sviluppata che tiene conto del numero di spot fogliari (aree necrotiche contornate da alone clorotico) tipicamente causati da PSA;
 - la % di rami sani/esenti da sintomi da PSA; quest'analisi è stata volutamente concentrata sui rami di 2 anni di età (rami che daranno la produzione dell'anno), che solitamente vengono ad essere colonizzati da PSA e che quindi vanno incontro ad avvizzimenti con pesanti e negative ricadute economiche per le produzioni finali.

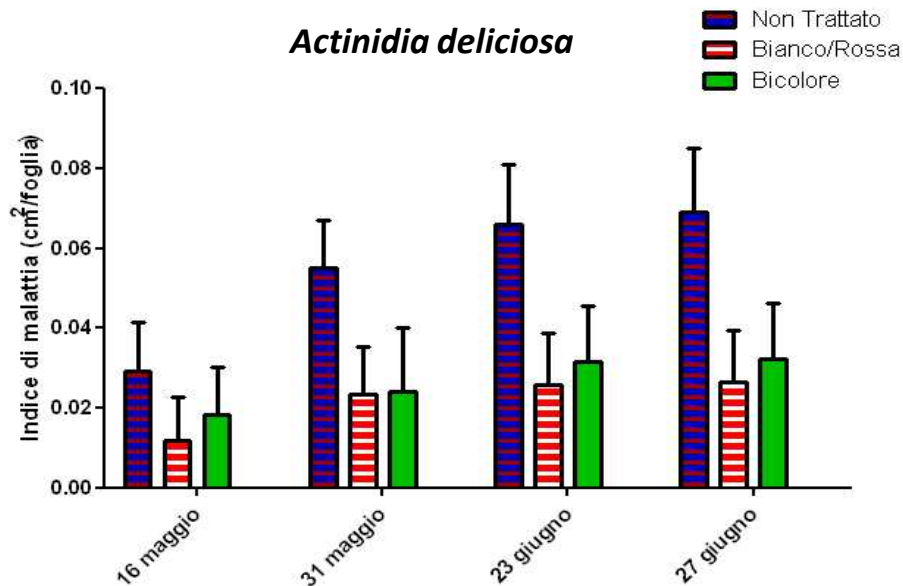
Come campionamenti per determinare l'incidenza della malattia si opera nel seguente modo:

- Scelta casuale di due tralci $\geq 2^\circ$ anno per pianta;
- Su ogni tralcio, $\geq 2^\circ$ anno, venivano selezionate 10 foglie;
- Venivano quindi create delle classi di malattia da assegnare a ciascuna foglia in base al numero di spot presenti;
- I classe: 0 spot, II classe: 1-50 spot, III classe: $n^\circ >$ di 50 spot, IV classe: spot confluiti, V classe: foglie completamente secche;
- Ad ogni classe di malattia veniva assegnato un valore: I=0, II=0,25, III=0,50, IV=0,75, V=1;
- Mediante la formula (n° . foglie appartenenti alla classe I x 0 + n° . foglie appartenenti alla classe II x 0,25 + n° . foglie appartenenti alla classe III x 0,50 + n° foglie appartenenti alla classe IV x 0,75 + n° . foglie appartenenti alla classe V x 1)/ n° . totale foglie si otteneva l'indice di malattia;

Per determinare la % di rami sani, si operava nel seguente modo:

- Venivano contati tutti i rami di ogni pianta e quanti di questi erano affetti da cancro batterico;
- Per differenza si è ottenuto il numero di rami sani;
- Mediante la formula $\text{rami sani}/n^\circ \cdot \text{totale di rami} \times 100$ si otteneva la % di rami sani per pianta.

Dai risultati ottenuti ad oggi, come emerso durante la stagione 2011, si conferma riportato nel grafico sottostante il dato che, rispetto alle piante della tesi di controllo (non trattato), i formulati sviluppati contenenti le sostanze naturali hanno ridotto la gravità della malattia rispetto alle tesi di controllo e evidenziano un contenimento della malattia simile o migliore rispetto alle tesi dove si impiega un formulato a base di rame.



- **Tesi Bicolore:** 3 trattamenti con idrossido di rame (19.9% pari a 266.4 g/l) (dose =100 ml/60l) in pre-fioritura (25/03/12, 15/04/12 e 05/05/12) + 2 (17/05/12 e 02/05/12)
- **Tesi Bianco/Rossa:** trattamenti con le sostanze naturali.

Unità Operativa 2 Tiezzi A., DIBAF, UnivTuscia

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

a) Effettuazione di estratti di foglie di *Mirtus communis*, *Phlomis thapsoides* e *Stachys betoniciflora*

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 agronomico. Il primo approccio è stato quello di utilizzare delle foglie fresche di *Mirtus communis* che sono state omogenate in etanolo e lasciate in estrazione al buio. La soluzione era poi centrifugata, il pellet scartato ed il sopranatante 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 (EtOH Extract 1). Successivamente si è proceduto all'utilizzo di foglie sia fresche (EtOH Extr 2) che essiccate (EtOH Extr 3) di mirto per l'effettuazione di estratti etanolici che sono stati portati a secco. Per fare questo le foglie sono state omogenate in etanolo e lasciate in estrazione al buio; gli estratti così ottenuti sono stati centrifugati e il sopranatante, una volta separato dal pellet, è stato portato a secco. L'estratto secco sia delle foglie fresche che delle foglie secche così ottenuto è stato solubilizzato in DMSO e ridiluito in acqua per permetterne la somministrazione ai batteri.

- b) Analoghe procedure sono state effettuate per le piante *Phlomis thapsoides* e *Stachys betoniciflora*, piante caratteristiche dell'Asia Centrale, effettuando estratti dalle foglie con solventi di natura chimica e polarità diversa quali cloroformio (CHCl_3 *Phlomis thapsoides* e CHCl_3 *Stachys betoniciflora*), metanolo (MetOH *Phlomis thapsoides* e MetOH *Stachys betoniciflora*) e acqua (Wat *Stachys betoniciflora* e Wat *Phlomis thapsoides*). Anche in questi casi gli estratti sono stati portati a secco e solubilizzati in DMSO e ridiluiti in acqua per l'estratto in cloroformio e risolubilizzati direttamente in acqua per gli estratti in metanolo e in acqua.

Saggi di attività antibatterica

Questa attività è stata condotta in stretta collaborazione con l'Unità Operativa 1. Batteri del ceppo *Pseudomonas syringae actinidiae* 7285 sono stati messi in coltura in piastre di Petri contenenti apposito mezzo di coltura. L'attività antibatterica è stata saggiata per mezzo di test di diffusione (Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol), caricando piccoli volumi dell'estratto di foglie di mirto ottenuti sia utilizzando foglie fresche che foglie essiccate portati a secco e solubilizzati in DMSO su dischetti di cotone e rilevando l'eventuale presenza di zone di inibizione della crescita batterica in prossimità del dischetto. Questi saggi hanno permesso di evidenziare la presenza di molecole ad attività antibatterica nell'estratto di *Mirtus communis*. Da notare che 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.

Anche per gli estratti ottenuti da *Stachys betoniciflora* e da *Phlomis thapsoides* sono stati effettuati test di diffusione su *Pseudomonas syringae actinidiae* 7285 necessari per metterne in evidenza l'eventuale attività antibatterica; sono state osservate proprietà di inibizione della crescita batterica nel caso dell'estratto in cloroformio di *Phlomis thapsoides* e *Stachys betoniciflora* (CHCl_3 *Phlomis thapsoides* e CHCl_3 *Stachys betoniciflora*).

- c) Contemporaneamente sono stati effettuati anche controlli per valutare l'eventuale tossicità del DMSO, risultati negativi. Il DimetilSulfossido (DMSO) viene somministrato allo scopo di rendere solubili in acqua le molecole provenienti da estratti effettuati con solventi apolari.

Indagini chimiche per il frazionamento degli estratti

Allo scopo di procedere alla individuazione della molecola o 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 sembrano dare risultati 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.

Frazionamenti analoghi saranno effettuati a breve con gli estratti in cloroformio di *Phlomis thapsoides* e *Stachys betoniciflora*.

Unità Operativa 3 Cortesi R., DISFA, UnivFerrara

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. I bioformulati sono impiegati per veicolare due molecole proposte e selezionare dalle UO1 e UO2, quali acido ellagico (AE) e acido gallico (AG).

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 sono stati selezionate per questo progetto acido ellagico (fig. 1A) e acido gallico (fig. 1B).

L'AE è un composto polifenolico che si trova nelle piante sottoforma di tannino idrolizzabile

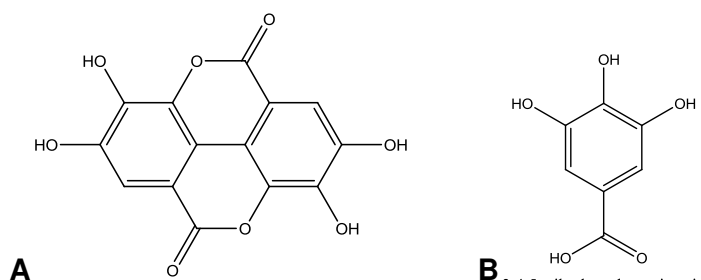


Figura 1: struttura chimica dell'acido ellagico (A) e dell'acido gallico (B)

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.

In Figura 2 è riportato il cromatogramma HPLC delle soluzioni standard dei due principi attivi analizzati.

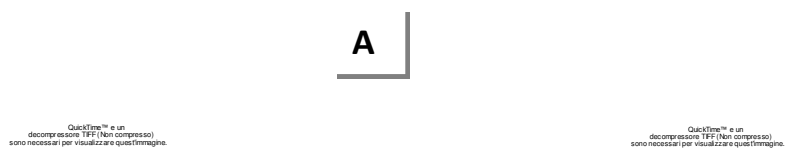


Figura 2: cromatogramma HPLC delle soluzioni standard di acido gallico (A) ed acido ellagico (B)

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

Per la produzione dei biofarmaci è stato proposto l'utilizzo dei seguenti polimeri (Figura 3):

- 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.

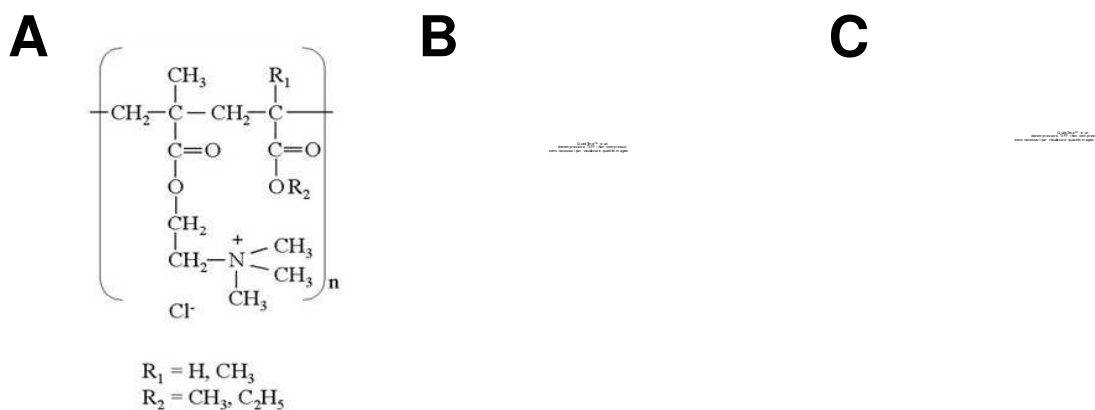


Figura 3: struttura chimica dei polimeri utilizzati.

A: Eudragit[®] RS; B: Idrossipropilmetilcellulosafalato; C: 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.

Con l'obiettivo di selezionare il miglior solvente per la dissoluzione del polimero e per migliorare la bagnabilità dei bioformulati da produrre, i polimeri prescelti sono stati miscelati con alcuni tensioattivi e poi dissolti in miscele solventi. La miscela Eudragit® RS100/Tween 80 risulta essere più solubile nella soluzione metanolo:acqua 95:5 v/v, a differenza della miscela miscela Eudragit® RS100/Span 20 che è invece più solubile nella soluzione etanolo:acqua 95:5 v/v. Inoltre le miscele di HPMCP/Span 20, HPMCP/Tween 21, Etilcellulosa-Span 20 in Etanolo: Acetone 1:1 v/v e Etanolo:Cloroformio 1:1 v/v risultano essere le migliori. Successivamente le miscele sono state essiccate tramite utilizzando la tecnica di spray-drying che permette di ottenere microparticelle o microcapsule per semplice contatto di un liquido di alimentazione contenente il polimero e il principio attivo da inglobare (soluzione, sospensione, emulsione) con una corrente d'aria calda che provoca l'evaporazione istantanea del solvente e del polimero.

Dopo aver stabilito quale fosse la miscela solvente migliore per la produzione di bioformulati microparticellari, si è proceduto verificando se gli stessi solventi potessero essere ottimali per la solubilizzazione dei due principi attivi. Per solubilità dell'AE sono stati utilizzati diversi solventi o miscele di solventi. I risultati ottenuti sullo studio della solubilità dell'AE indicano che il miglior solvente per l'AE è N-metil-2-pirrolidone (NMP).

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 AG ed AE e per valutare le condizioni strumentali più adatte. In particolare sono stati variati alcuni parametri quali aspirazione, flusso, pompa di alimentazione, rapporto polimero/tensioattivo e concentrazione del polimero stesso. I dati ottenuti ci hanno permesso di selezionare le condizioni di preparazione standard per la preparazione di bioformulati a base di Eudragit.

Produzione e caratterizzazione di bioformulati contenenti AE e/o AG

Le diverse condizioni di solubilità di AG e AE 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. I bioformulati così prodotti presentano un recupero percentuale soddisfacente ($23,47\% \pm 5,28$) ed un diametro medio di $6,83 \mu\text{m} \pm 2,54$. L'analisi morfologica al microscopio elettronico SEM mostra che le particelle appaiono abbastanza scorrevoli, sferiche e di superficie liscia e priva di pori.

Per quanto concerne i bioformulati a base di derivati della cellulosa, è stato incluso l'AG da solo alla concentrazione del 10% p/p rispetto la quantità totale polimero utilizzato.

La percentuale di recupero delle microsfele a base di HPMCP cala all'aumentare della quantità di polimero presente nel liquido di alimentazione; una delle spiegazioni potrebbe essere dovuta all'aumento della densità della soluzione all'aumentare della quantità di polimero presente.

Inoltre si evidenzia che il recupero di microparticelle a base di etilcellulosa risulta essere inferiore rispetto a quello a base di HPMCP a parità di concentrazione polimerica.

Valutazione della resa di incapsulazione dei principi attivi nelle microsfele prodotte

La resa di incapsulazione è stata valutata estraendo AG e acido AE. Per quando riguarda l'estrazione dell'AG, si è utilizzata una miscela etanolo: acqua 95:5 (v/v), mentre per l'AE è stato utilizzato metanolo.

La quantità di AG ed AE 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 dell'AG è del $78,5\% \pm 4,49$, mentre quella dell'AE è del $88,5\% \pm 3,21$

Per quanto riguarda i bioformulati a base dei derivati della cellulosa la percentuale di incapsulazione di AG diminuisce con l'aumentare della quantità di polimero HPMCP nella composizione e che nel bioformulato a base di Etilcellulosa la percentuale di AG incapsulato è poco più della metà rispetto alla formulazione HPMCP 5%. Questo ultimo dato potrebbe essere probabilmente dovuto al fatto che l'AG va meglio in soluzione con i solventi utilizzati per disciogliere HPMCP.

Determinazione della cinetica di rilascio di AE e AG 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 di AE raggiunge nelle 24 ore circa l'1%, mentre l'AG nelle 24 ore arriva intorno al 30%.

Per quanto riguarda la cinetica di rilascio dell'AG dai bioformulati a base dei derivati della cellulosa (HPMC ed etilcellulosa), la percentuale di AG rilasciato 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 l'AG da solo alla concentrazione del 10% p/p rispetto la quantità totale di polimero utilizzato.

La resa di incapsulazione è stata valutata estraendo AG. Per le microparticelle a base di HPMCP la percentuale di AG 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 AG 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 cosolvente NMP nella preparazione riduce ulteriormente la percentuale di rilascio (dal 21.8% al 14.7%).

Dall'analisi dei risultati riportati 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 AG 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% in AG + 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%.

Unità Operativa 4 Muganu M., DAFNE, Università della Tuscia

Le attività svolte dalla U.O. 4 sono state basate sulla necessità di valutare l'efficacia di nuovi formulati per la difesa delle colture anche in funzione dell'effetto che il formulato stesso può avere sulla pianta, considerando la sensibilità varietale, la fase fenologica in cui si effettua l'intervento sanitario e le tecniche di coltivazione impiegate.

Su questa base l'obiettivo generale della U.O.4 è stato quello di migliorare le tecniche di gestione in biologico delle due colture scelte (actinidia e pomodoro), mentre gli obiettivi specifici sono stati:

- 1) Definizione delle migliori condizioni di utilizzo dei principi attivi impiegati in specie da frutto e da orto;
- 2) Miglioramento della qualità igienico sanitaria dei frutti.

Le attività finora svolte dalla U.O. 4 nell'ambito del progetto sono state:

a) Controllo dei principali parametri di crescita di giovani piante coltivate in ambiente protetto.

Per ognuna delle specie di actinidia impiegate e per ciascuna delle cultivar utilizzata (sono state impiegate due cultivar di Actinidia chinensis e due di Actinidia deliciosa) sono stati determinati i principali indici biometrici di crescita (altezza, peso fresco della parte aerea e delle radici, diametro basale fusto numero di nodi, sostanza secca finale delle piante) ed eventuali anomalie negli organi aerei (deformazioni della lamina, colorosi, necrosi). Come tesi controllo sono state utilizzate piante trattate convenzionalmente con principi attivi rameici.

b) Condizione di crescita in pieno campo

In questo caso le attività sono state condotte su due specie: actinidia e pomodoro. Le condizioni ambientali di sperimentazione sono quelle in cui il coltivatore-produttore ordinario si trova ad operare. Il disegno sperimentale adottato è stato a blocchi randomizzati con tre repliche.

Sono stati determinati in pianta:

- area media della pagina fogliare;
- contenuto di clorofilla;
- rapporto peso fresco/ peso secco nei differenti organi;
- determinazione della quantità totale di prodotto giunto a maturazione.

Sono stati determinati sui frutti a campione:

- peso;
- pezzatura;
- colorazione;
- consistenza;
- grado rifrattometrico;
- acidità titolabile;
- indice di maturità e valutazione del valore commerciale.

Le tabelle seguenti descrivono alcuni parametri produttivi a confronto non riportati nelle precedenti relazioni.

Percentuali classi di peso

Classi peso (g)	Hayward		Zespri gold	
	rame	sostanze naturali	rame	sostanze naturali
<80	26,11	19,29	57,57	63,94
80-90	22,68	20,71	15,60	14,55
90-100	18,33	18,08	14,55	13,04
100-110	16,82	22,53	7,68	5,82
110-120	9,23	10,09	4,20	1,21
>120	7,24	14,32	0,41	1,44

	Hayward		Zespri gold	
	rame	sostanze naturali	rame	sostanze naturali
Peso medio frutto (g)	91,72	96,56	76,19	75,12
Frutti deformi (%)	0,93	0,37	0,91	0,00

Ad oggi sono in corso le determinazioni relative al secondo anno di prove in pomodoro ed il completamento delle analisi statistiche relative alle prove su actinidia.