

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

**Relazione Finale**

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

Sono state effettuate 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.

Per le prove 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 micro incapsulati, venivano 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.

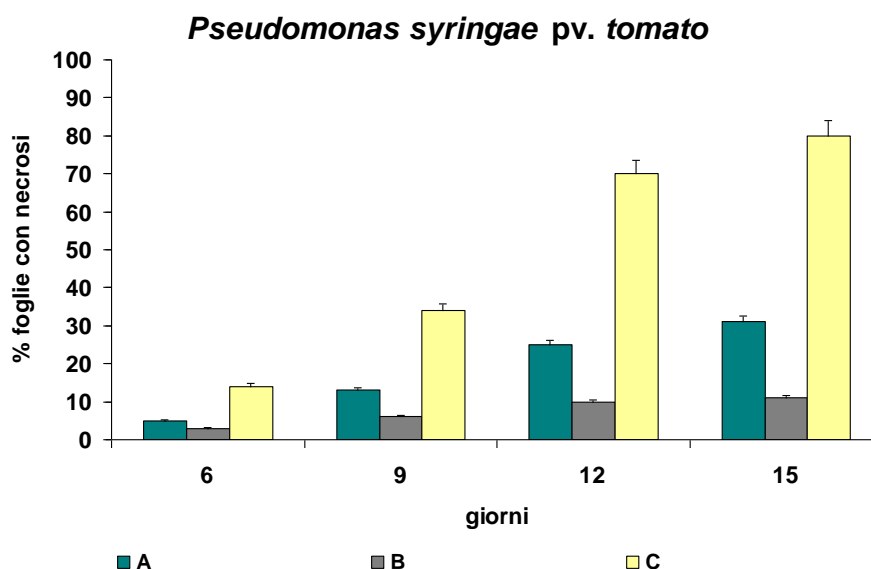
Dal primo giorno di inoculazione le piante sono state monitorate giornalmente per tutta la durata della prova al fine di verificare e seguire la comparsa e l'evoluzione dei sintomi (Incidenza e Gravità della malattia).

GRAVITA' DELLA PATOLOGIA		
Trattamenti	n° necrosi/cm <sup>2</sup> foglia	Rid.% g.p.
Tesi A	0,056	54,09
Tesi B	0,011	89,71
Tesi C	0,122	-

Gravità della patologia all'8° giorno dal trattamento effettuato.

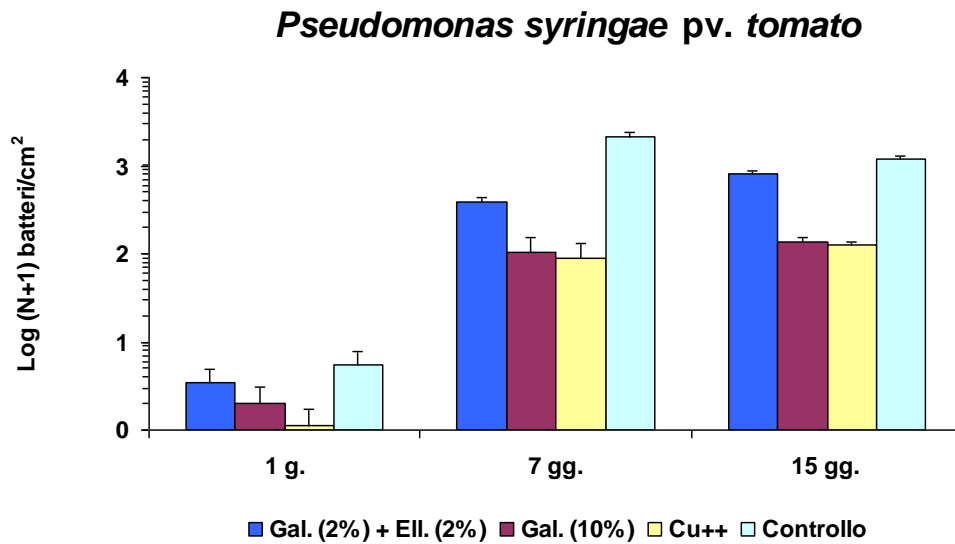
**Legenda:** Rid.% g.p.: Riduzione percentuale della gravità della patologia rispetto al controllo non trattato (Tesi C). **A:** microincapsulato contenente acido gallico ed acido ellagico entrambi al 2%; **B:** ossicloruro di rame; **C:** non trattato.

La gravità della malattia è stata 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 con valori prossimi di riduzione della malattia simili a quanto ottenuto con un prodotto rameico commerciale.



**Fig. 1** – Incidenza della patologia su foglie di pomodoro cv. Pullrex Bio contaminate con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Pst 14 (concentrazione iniziale  $1 \times 10^6$  ufc/ml) e sottoposte ai trattamenti ( $p \leq 0,05$ ). **A:** microincapsulato contenente acido gallico ed acido ellagico entrambi al 2%; **B:** ossicloruro di rame; **C:** non trattato.

Dai risultati ottenuti è emerso che rispetto alle piante della tesi di controllo (non trattato), i formulati impiegati hanno ridotto la popolazione epifitica di *Pst* nei giorni successivi alla contaminazione batterica; in particolare è da rilevare come la tesi trattata con il microincapsulato contenente acido gallico al 10% sia risultata efficace quasi quanto il composto rameico impiegato (ossicloruro di rame al 27%).



Dinamiche di popolazione di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* su foglie di pomodoro sottoposte a trattamenti con i microincapsulati in esame.

- **Prove su Piante di Actinidia**

- Le prove sono corso state effettuate in pieno campo su impianti di *Actinidia deliciosa* cv. Hayward e Soreli 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.

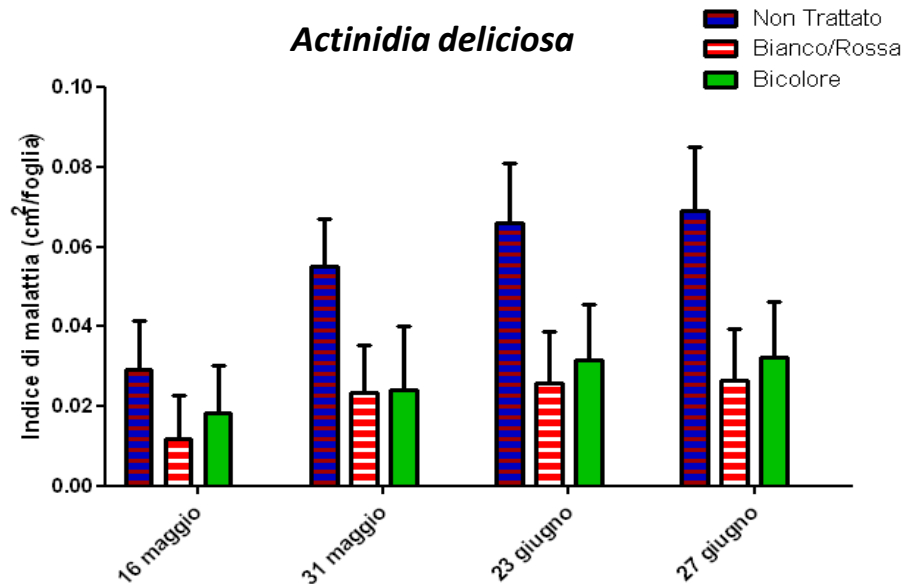
Come campionamenti per determinare l'incidenza della malattia si opera nel seguente modo:

- 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  $(n^\circ \text{ foglie appartenenti alla classe I} \times 0 + n^\circ \text{ foglie appartenenti alla classe II} \times 0,25 + n^\circ \text{ foglie appartenenti alla classe III} \times 0,50 + n^\circ \text{ foglie appartenenti alla classe IV} \times 0,75 + n^\circ \text{ foglie appartenenti alla classe V} \times 1) / n^\circ \text{ totale foglie}$  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  $\text{rami sani} / n^\circ \text{ totale di rami} \times 100$  si otteneva la % di rami sani per pianta.

Dai risultati ottenuti, come emerso durante la stagione 2011, si conferma 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.

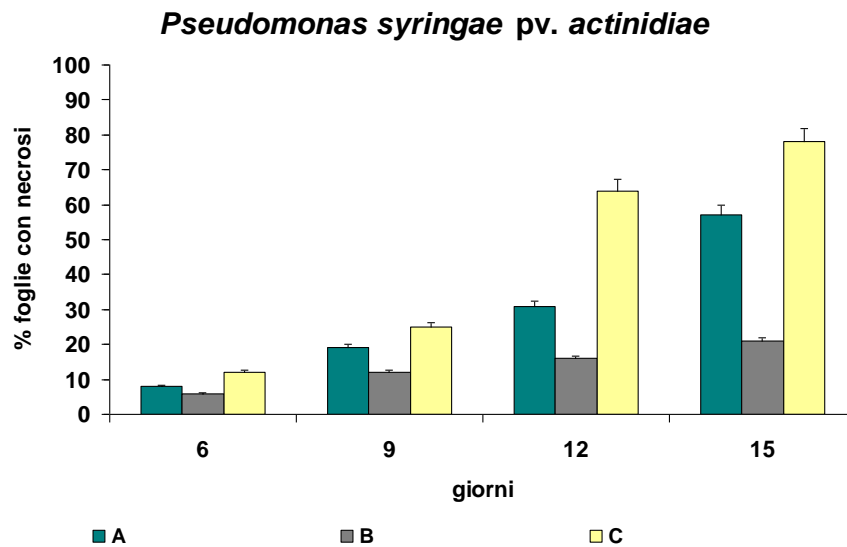
Nei giorni successivi ai trattamenti le piante venivano monitorate giornalmente anche al fine di verificare e seguire la comparsa e l'evoluzione dei sintomi (Incidenza e Gravità della malattia).

Gravità della patologia al 10° giorno dal trattamento effettuato.

GRAVITA' DELLA PATOLOGIA					
cv. Hayward			cv. Soreli <sup>®</sup>		
Trattamenti	n° necrosi/cm <sup>2</sup> foglia	Rid.% g.p.	Trattamenti	n° necrosi/cm <sup>2</sup> foglia	Rid.% g.p.
Tesi A	0,054	32,50	Tesi A	0,048	51,51
Tesi B	0,032	60,00	Tesi B	0,019	80,80

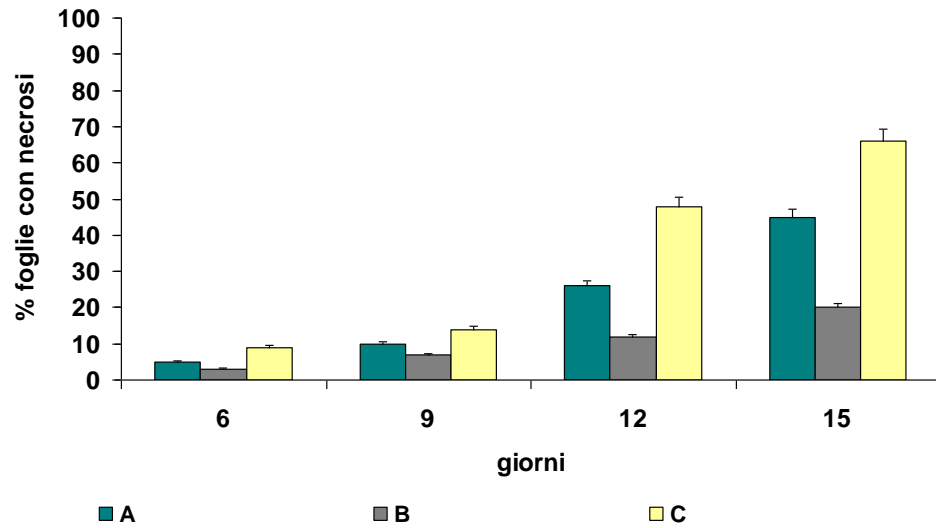
**Legenda:** Rid.% g.p.: Riduzione percentuale della gravità della patologia rispetto al controllo non trattato (Tesi C). **A:** microincapsulato contenente acido gallico ed acido ellagico entrambi al 2%; **B:** ossicloruro di rame; **C:** non trattato.

La gravità della malattia è stata calcolata dalla comparsa dei primi sintomi della batteriosi (10°-12° giorno).



**Fig. 2** – Incidenza della patologia su foglie di actinidia cv. Hayward e sottoposte ai trattamenti ( $p \leq 0,05$ ). **A:** microincapsulato contenente acido gallico ed acido ellagico entrambi al 2%; **B:** ossicloruro di rame; **C:** non trattato.

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*



**Fig. 3** – Incidenza della patologia su foglie di actinidia cv. Soreli<sup>®</sup> e sottoposte ai trattamenti ( $p \leq 0,05$ ). **A:** microincapsulato contenente acido gallico ed acido ellagico entrambi al 2%; **B:** ossicloruro di rame; **C:** non trattato.

L'attività di ricerca 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 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 (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 soprannatante, 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 ( $\text{CHCl}_3$  *Phlomis thapsoides* e  $\text{CHCl}_3$  *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* ( $\text{CHCl}_3$  *Phlomis thapsoides* e  $\text{CHCl}_3$  *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 state condotte indagini di tipo chimico e per mezzo di procedure di Cromatografia su Strato Sottile (TLC) saggiate come fasi mobili in varie miscele di solventi per l'individuazione di una frazione dell'estratto contenente la molecola/molecole con attività antibatterica. Alcune di queste evidenziano 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.

### 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 selezionate dalle UO1 e UO2, quali acido ellagico (AE) e acido gallico (AG).

Obiettivi del progetto sono stati:

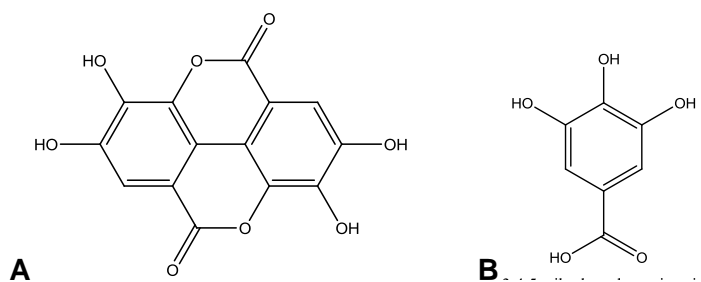
- 1- Messa a punto del sistema analitico quali-quantitativo dei principi attivi utilizzati
- 2- Studio preformulativo per ottenere le condizioni standard di preparazione di bioformulati a base di polimetilmetacrilati o derivati della cellulosa
- 3- Produzione e caratterizzazione di bioformulati contenenti 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).

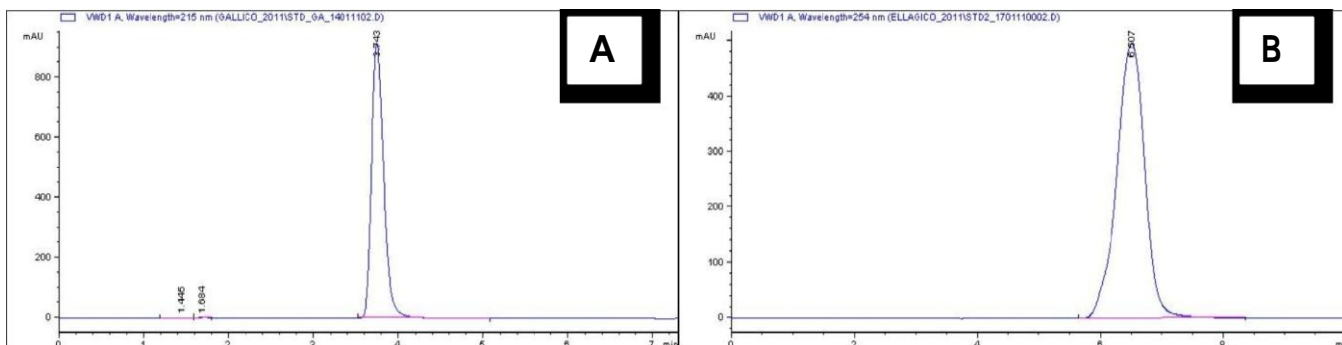
L'AE è un composto polifenolico che si trova nelle piante sottoforma di tannino idrolizzabile



**Figura:** 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.

Nella seguente figurasono riportati cromatogrammi HPLC delle soluzioni standard dei due principi attivi analizzati.

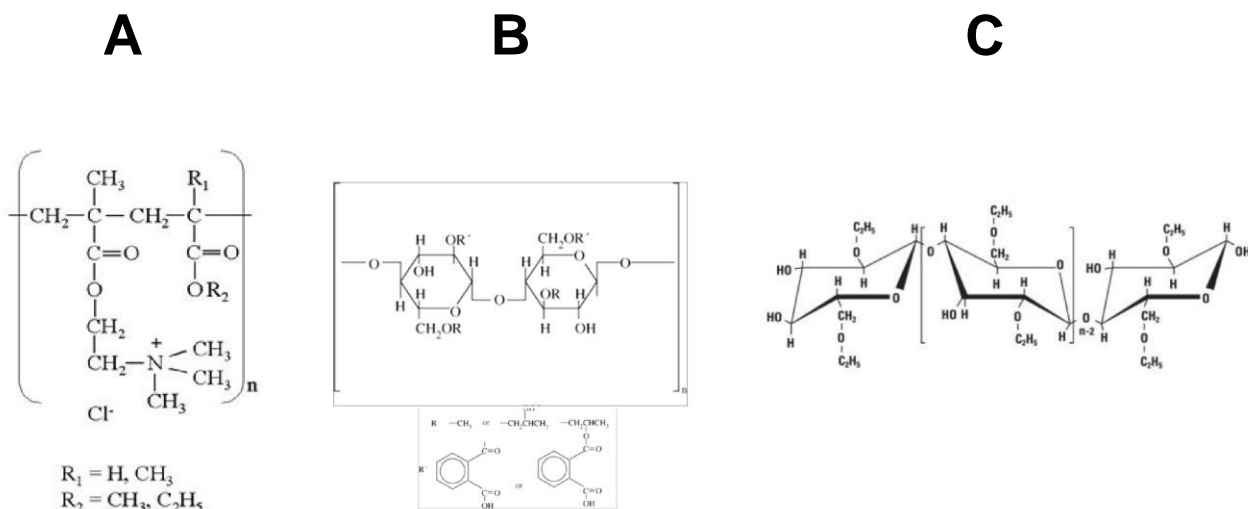


**Figura 2:** cromatogramma HPLC delle soluzioni standard di acido gallico (A) ed acido ellagico (B) ottenuti nelle condizioni sopra riportate

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

Per la produzione dei biofarmulati 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.



**Figura:** struttura chimica dei polimeri utilizzati.

A: Eudragit® RS; B: Idrossipropilmetilcellulosaftalato; 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 *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 quanto 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 UnivTuscia

### **Rilievi condotti sulle colture in pieno campo**

I rilievi sono stati effettuati su piante di pomodoro (cv Pullrex Bio e S. Marzano) e su piante adulte di actinidia (cv Soreli e Hayward), 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 UU.OO.1 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.

### **Pomodoro**

Le sostanze sono state testate su due diverse cv. Sulle parcelle in prova, tre ripetizioni per ogni sostanza utilizzata, 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*

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 delle bacche di pomodoro in pieno campo e delle parti vegetative alla fine del periodo di crescita dei frutti*

Terminata la fase di crescita dei frutti delle piante (alcune settimane prima della maturazione commerciale), sono stati raccolti tutti i frutti di una pianta campionata al centro della parcella (tre piante per ogni sostanza testata) e su questi sono stati determinati: il peso fresco totale medio delle bacche prodotte per pianta, la sostanza secca totale media 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 media per tesi. Anche per le parti verdi stesse piante sono stati determinati i parametri: peso fresco totale medio per pianta, sostanza secca totale media per pianta, sostanza secca percentuale media per tesi.

*Tab 1 - Sostanza fresca e secca media dei frutti e delle parti verdi delle piante di pomodoro e percentuale di sostanza secca per frutti e parti verdi delle piante della cv Pullrex Bio sottoposte a trattamenti di difesa con le sostanze testate*

Trattam.	Bacche			Fusto e foglie		
	PNU (g)	PNS (g)	%SS/PNU	PNU (g)	PNS (g)	%SS/PNU
<b>Controllo</b>	2695,37+227,63	118,63+9,1	4,31+0,09	548+43,21	74,9+8,12	14,92+2,38
<b>Cu</b>	1626,37+822,6	70,57+41,98	4,07+0,56	498,3+64,13	87,87+21,57	19,77+2,65
<b>Sost.Nat.</b>	2678,9+503,21	113,76+25,92	4,16+0,4	442,4+182,12	82,97+3,76	23,84+8,73
<b>AmyloX</b>	2878,07+550,83	128,19+23,13	4,38+0,38	630,4+224,01	95,35+1,2	18,81+8,37

Tab 2 - Sostanza fresca e secca media dei frutti e delle parti verdi delle piante di pomodoro e percentuale di sostanza secca per frutti e parti verdi delle piante della cv S. Marzano sottoposte a trattamenti di difesa con le sostanze testate

Trattam.	Bacche			Fusto e foglie		
	PNU (g)	PNS (g)	%SS/PNU	PNU (g)	PNS (g)	%SS/PNU
<b>Controllo</b>	1104,87+489,47	57,66+22,77	5,12+0,21	336+111,62	61,83+31,67	21,4+4,66
<b>Cu</b>	916,67+700,03	47,45+28,63	5,35+0,77	379,5+197,78	60,03+13,66	20,44+6,58
<b>Sost.Nat.</b>	1341,03+360,23	67,85+20,18	4,92+0,6	396,87+147,81	73,7+26,5	21,4+0,88
<b>AmyloX</b>	993,33+535,73	53,89+25,07	5,4+0,42	299,1+142,79	58,4+17,7	27,55+11,46

C) – Determinazione dei parametri compositivi e qualitativi dei frutti

Nei frutti giunti a maturazione commerciale sono stati determinati: grado rifrattometrico, pH, acidità titolabile, percentuale di acido citrico, sostanza secca (mediante essiccazione dei campioni in stufa a 90°C fino a peso costante).

Tab. 3 - Dati qualitativi frutti pomodoro della cv Pullrex Bio in pieno camp. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Trattam.	°Brix	pH	Ac.titolabile (ml NaOH 0.1N)	Ac.citrico (%)	Sostanza secca
<b>Controllo</b>	3,83 $\pm$ 0,06	4,29+0,07	4,27+0,46	0,3+0,03	4,14+0,19
<b>Rame</b>	3,85+0,09	4,32+0,02	4+0,46	0,28+0,03	4,17+0,2
<b>Sostanze Naturali</b>	3,78+0,4	4,31+0,03	4,26+0,25	0,3+0,02	3,93+0,15
<b>AmyloX</b>	3,97+0,14	4,34+0,03	3,9+0,17	0,27+0,01	4,12+0,26

Tab. 4 - Dati qualitativi frutti pomodoro della cv S. Marzano in pieno campo Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Trattam.	°Brix	pH	Ac.titolabile (ml NaOH 0.1N)	Ac.citrico (%)	Sostanza secca
<b>Controllo</b>	3,85	4,26	4	0,28	4,32
<b>Rame</b>	3,92+0,15	4,24+0,13	5,03+1,16	0,35+0,08	4,58+0,18
<b>Sostanze Naturali</b>	3,77+0,24	4,28+0,1	4,33+0,55	0,3+0,04	4,3+0,27
<b>AmyloX</b>	4,22+0,32	4,2+0,09	5,13+0,81	0,36+0,06	4,63+0,29

## 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 almeno 100 frutti per pianta al momento della raccolta. I frutti sono stati divisi in classi di peso secondo le prassi commerciali e sono state calcolate le percentuali di frutti di ciascuna classe, sono stati altresì separati i ventagli. Per ciascuna classe, poi, sono stati determinati i seguenti parametri qualitativi: altezza, larghezza maggiore e minore del frutto, altezza e larghezza della columella, resistenza al penetrometro, grado rifrattometrico (misurato in gradi Brix°), sostanza secca percentuale (previo essiccamento in stufa a 90°C fino a peso costante) e dati colorimetrici, lucentezza, tinta e croma, per mezzo di colorimetro digitale. I dati sono presentati come media dei frutti di ciascuna classe di pezzatura sul totale dei frutti campionati dalle tre parcelle trattate con il rame o con le sostanze naturali  $\pm$  la deviazione standard. Sono presentati separati i dati ottenuti dai rilievi sulla cv Soreli e sulla cv Hayward.

### **Parametri qualitativi della cv Soreli a polpa gialla.**

*Tab. 5 - Dimensioni medie dei frutti della cv Soreli nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard*

Dimensioni		Pezzatura				
		<80	80-90	90-100	100-110	>110
H	Cu	57+2,1	61,6+1,8	63,5+1,9	63,9+1,9	64,8+1,6
	Sostanze naturali	56,1+5,3	62,6+2,4	63,8+3,6	66+2	64,2+2
L1	Cu	43,5+1,6	45,6+0,8	46,7+0,7	47,8+0,9	49+0,9
	Sostanze naturali	43+2,6	45,7+1,2	47,2+1	48,7+1,2	49,5+1
L2	Cu	46,3+2	49,9+2,9	50,9+1,7	53+2,2	55,5+2,5
	Sostanze naturali	45,7+3,2	48,7+1,4	51,1+1,8	54,2+3,1	55,9+1,8

*Tab.6 - Dimensioni medie della columella dei frutti della cv Soreli nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard*

Columella		Pezzatura				
		<80	80-90	90-100	100-110	>110
H	Cu	11+2,5	13,2+2,1	14+2,8	15,8+3,7	16,7+4,5
	Sostanze naturali	9,9+2,5	11+2	13,7+3,1	14,9+3,4	18+2,7
L	Cu	4,2+0,8	4,2+0,4	4,1+0,7	4,2+1,1	3,7+0,8
	Sostanze naturali	5+0,9	4,4+1	4,6+0,8	4,2+0,8	3,7+0,4

*Tab. 7 - Valori medi della durezza dei frutti della cv Soreli nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard*

Penetrometro	Pezzatura				
	<80	80-90	90-100	100-110	>110
<i>tesi</i>					
Cu	1,6+0,3	1,8+0,6	1,8+0,3	2+0,6	1,9+0,5
Sostanze naturali	1,6+0,4	1,5+0,5	1,6+0,4	1,5+0,3	1,7+0,4



Tab. 8 - Valori medi dei solidi solubili misurati come gradi Brix° dei frutti della cv Soreli nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Brix	Pezzatura				
	<80	80-90	90-100	100-110	>110
Cu	17,8+1,8	17,6+2,3	18,2+1,1	17,2+3,1	18,2+1,4
Sostanze naturali	17,9+0,6	17,80,6	18,1+1	18,6+0,5	18,8+0,4

Tab. 9 - Valori medi della sostanza secca dei frutti della cv Soreli nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Sostanza secca (%)	Pezzatura				
	<80	80-90	90-100	100-110	110-120
Cu	19,1+1	19,4+1,3	19,1+0,9	19,6+1	19,7+1,8
Sostanze naturali	18,5+1,5	18,8+0,7	18,6+0,8	18,5+0,7	19+0,1

Tab. 10 - Valori medi dei parametri colorimetrici della cv Soreli nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Dati colorimetrici		Pezzatura				
		<80	80-90	90-100	100-110	>110
Lucentezza	Cu	68,66+3,02	71,93+2,12	71,16+2,32	70,36+2,61	71,51+2,23
	Sostanze naturali	68,33+3,35	69,27+2,45	68,58+4,07	71,12+3,11	70,17+3,69
Tinta	Cu	-88,5+0,72	-88,39+0,71	-88,84+0,81	-89,07+0,74	-88,48+0,71
	Sostanze naturali	-88,36+1,34	-88,54+0,66	-88,68+0,61	-88,92+0,44	-89,11+0,52
Croma	Cu	37,51+4,78	37,49+4,6	35,64+2,31	37,89+3,26	37,41+3,26
	Sostanze naturali	37,58+4,88	35,08+2,79	37,13+3,36	37,38+4,1	35,38+4,37

### Parametri qualitativi della cv Hayward a polpa verde

Tab. 11 - Dimensioni medie dei frutti della cv Hayward nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Dimensioni		Pezzatura					
		<80	80-90	90-100	100-110	110-120	>120
H	Cu	55,4+3,2	57,8+1,8	60,9+2,2	63,4+1,5	65,2+1,8	66+2,1
	Sostanze naturali	51+5,5	56,5+3,1	59,9+1,7	61,2+1,5	62,7+2,8	66,3+3
L1	Cu	44,2+1,8	45,9+2,1	47,4+1,9	48,7+1,9	48,7+1,8	50,4+2,5
	Sostanze naturali	43,8+2,6	46+1,1	47,2+1,1	48,2+3,1	50+1,9	51,5+2,4
L2	Cu	47,1+2,8	50,7+2,8	52,4+2	53,1+2,4	55,1+1,7	57,4+2,5
	Sostanze naturali	48,5+3,9	51,3+3,7	53+1,9	54,9+3,6	56+3,4	56,9+2,5

Tab. 12 - Dimensioni medie della columella dei frutti della cv Hayward nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con Rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Columella		<80	80-90	90-100	100-110	110-120	>120
H	Cu	14,1+3,2	17,3+2,5	16,3+2,1	16,4+1,6	18,5+3,1	20+3,5
	Sostanze naturali	15,7+3,3	16,7+3,4	17,4+4	19,5+6,6	18,3+4,5	17,3+3,2
L	Cu	9,1+1	9+1	10+1,5	10,7+1,4	9,2+0,9	9,9+2,2
	Sostanze naturali	9,2+1,5	10+1,4	9,6+1,3	9,2+2,3	10,4+1,4	11,1+1,6

Tab. 13 - Valori medi della durezza dei frutti della cv Hayward nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con Rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Penetrometro	Pezzatura					
	<80	80-90	90-100	100-110	110-120	>120
Cu	2,1+0,4	2,3+0,4	2,6+0,3	2,7+0,6	2,8+0,3	2,8+0,3
Sostanze naturali	2,2+0,7	2,5+0,9	2,9+0,9	2,6+0,6	2,6+0,5	2,7+0,6

Tab. 14 - Valori medi dei soludi solubili misurati come gradi Brix<sup>o</sup> dei frutti della cv Hayward nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con Rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Brix	Pezzatura					
	<80	80-90	90-100	100-110	110-120	>120
Cu	9,8+1	9,7+0,9	10,3+0,8	10,5+0,4	10,6+0,5	10,3+0,3
Sostanze naturali	11,5+1,4	11,3+1,1	10,9+0,8	11,1+0,6	11,2+0,5	11,3+0,5

Tab. 15 - Valori medi della sostanza secca dei frutti della cv Hayward nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

Sostanza secca (%)	Pezzatura					
	<80	80-90	90-100	100-110	110-120	>120
Verde						
Cu	14,3+2	13,9+2,6	15,1+0,8	15,6+0,5	15,9+0,4	15,8+0,1
Sostanze naturali	15,6+1,5	15,4+0,7	16,6+1,7	15,5+0,3	15,2+0,4	16+1

Tab. 16 - Valori medi dei parametri colorimetrici della cv Hayward nella tesi trattata con Sostanze Naturali e nella tesi controllo trattata con rame. Valori medi  $\pm$  deviazione standard

		Pezzatura					>120
		<80	80-90	90-100	100-110	110-120	
Lucentezza	Cu	61,75+2,57	61,34+3,5	62,13+3,63	63,23+2,8	62,46+2,56	63,4+3,24
	Sostanze naturali	61,1+3,27	63,27+2,74	62,55+2,93	63,11+2,71	62,54+3,05	62,89+1,62
Tinta	Cu	-75,96+0,49	-75,85+0,91	-76,39+0,73	-76,87+0,79	-76,83+1,36	-76,58+1,07
	Sostanze naturali	-77,15+1,6	-77+0,57	-76,71+0,71	-76,66+0,49	-76,88+0,62	-76,89+0,59
Croma	Cu	39,23+1,21	38,57+3,59	37,77+2,55	38,72+2,59	39,37+1,85	39,07+1,86
	Sostanze naturali	36,2+2,52	38,11+1,81	37,76+2,04	37,03+1,47	37,3+2,48	38,49+1,18

## Considerazioni conclusive

Il progetto **BBB** si è dedicato all'individuazione di sostanze naturali/principi attivi e alla loro caratterizzazione per lo sviluppo di agrofarmaci in grado di contenere batteri fitopatogeni altamente dannosi su importanti coltivazioni ortofrutticole d'interesse nazionale (picchiettatura batterica del pomodoro e cancro batterico dell'actinidia).

Nell'ambito delle attività è emerso che:

Differenti sostanze naturali (estratti vegetali) mostrano una spiccata attività (battericida e batteriostatica) nei confronti dei batteri fitopatogeni oggetto di studio;

E' possibile sviluppare dei micro incapsulati mediante l'applicazione di nanotecnologie ed arrivare allo sviluppo di formulazioni completamente organiche;

Le formulazioni sviluppate non hanno mostrato alcun effetto negativo sullo sviluppo delle differenti specie vegetali considerate (Pomodoro e Actinidia) come sui loro differenti organi vegetativi (foglie, rami, fiori, boccioli) sui quali sono state impiegate, ne hanno determinato alcun effetto fitotossico sulle stesse.

Le formulazioni sviluppate non hanno altresì mostrato alcun effetto negativo sulle produzioni finali.

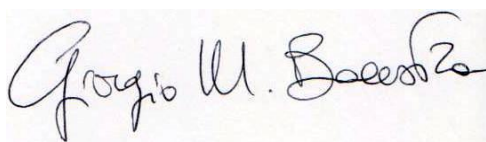
Le stesse formulazioni hanno invece evidenziato di poter efficacemente contenere/controllare, agendo preventivamente e come agrofarmaci biologici, proteggendo le piante di pomodoro dall'agente causale della picchiettatura batterica (*P. s. pv. tomato*) e le piante di actinidia dall'agente causale del cancro batterico (*P. s. pv. actinidiae*). In particolare la loro efficacia in termini di riduzione della gravità e dell'incidenza delle due patologie è molto prossima ai risultati conseguibili mediante l'impiego di formulazioni a base di Sali di rame.

In virtù dei risultati conseguiti, come del ridotto periodo di studio e sperimentazione concesso, è auspicabile un proseguimento delle stesse attività al fine di definire in tutti i dettagli, specifiche formulazioni agrofarmaceutiche biologiche in grado di ridurre concretamente l'impiego dei Sali di rame come di impiegare valide alternative agli stessi per il contenimento delle patologie di natura batterica considerate.

Distinti saluti

Viterbo 31/11/2012

Il Coordinatore Nazionale



**Dr. Giorgio M. BALESTRA**

Tel. 0761 357474, Fax 0761 357558, Email [balestra@unitus.it](mailto:balestra@unitus.it)

(DAFNE) Dipartimento di Scienze e tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia

Via S. Camillo De Lellis snc - 01100 Viterbo