



Summer day sugli oli essenziali

dalla difesa della pianta
alle applicazioni mediche



Co-organizzato da

Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Pre-Clinica e Clinica dei
Farmaci Istituto Superiore di Sanità
Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Farmacia dell'Università
Cattolica del Sacro Cuore - Roma

Con

Associazione Scientifica “Società Italiana per la Ricerca sugli Oli
Essenziali” (S.I.R.O.E.)

Aula Bovet, Istituto Superiore di Sanità

8 Settembre 2022



Nell'ultimo ventennio la Letteratura scientifica ha dato un sostanziale supporto a precedenti evidenze empiriche e scientifiche sulle potenzialità preventive e/o terapeutiche degli **oli essenziali** (OE), prodotti di origine naturale, evidenziando in modo rigorosamente scientifico nuove possibili fonti di molecole, non tossiche ed efficaci, potenzialmente utili per fronteggiare le continue emergenze infettive con associata farmaco-resistenza in campo umano e veterinario, nonché per trovare nuove possibili soluzioni ecosostenibili di conservazione degli alimenti per l'industria alimentare.

Questo evento è stato proposto per dare spazio e risalto alle recenti ricerche innovative sugli OE condotte da **giovani ricercatori**, con età inferiore ai 35 anni, appartenenti a diverse università italiane. In particolare, verranno presentati dati scientifici sulla produzione, sulla formulazione e sull'uso degli OE, insieme alle evidenze scientifiche relative agli effetti biologici (in particolare attività citotossica e antimicrobica) e agli ambiti di impiego degli OE in medicina umana e veterinaria, in campo alimentare e agronomico, con focalizzazione su efficacia e sicurezza di uso.

La presenza di giovani ricercatori con la presentazione delle loro recenti ricerche assieme alla presenza di Docenti e Ricercatori, esperti del settore, anch'essi affiliati a diverse università italiane e a importanti centri di ricerca quali l'Istituto Superiore di Sanità, oltre che membri dell'associazione scientifica SIROE, favorirà un ampliamento della comprensione di questi particolari estratti fitoterapici in un approccio terapeutico complementare o integrativo in diversi contesti correlati alla salute umana ed alla salvaguardia dell'ambiente.

Scopo e obiettivi

Gli obiettivi principali sono:

1. Divulgare le ricerche scientifiche sviluppate da giovani ricercatori;
2. Formare i discenti su tematiche correlate alla produzione, alla formulazione e all'uso degli oli essenziali
3. Creare momenti di scambio per la programmazione di nuove linee di ricerca;
4. Creare momenti di incontro tra giovani ricercatori e gli utilizzatori finali degli oli essenziali (medici, farmacisti, erboristi, ma anche aziende interessate alla ricerca scientifica sugli oli essenziali).

COMITATO SCIENTIFICO

Maria Grazia Bellardi, Professore. Dip. di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari. Università degli Studi di Bologna “*Alma Mater Studiorum*”, Bologna

Francesca Bugli, Ricercatore. Dip. di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie. Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Maura Di Vito, Ricercatore. Dip. di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie. Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Francesca Mondello, Presidente S.I.R.O.E. - Già ricercatore del Dip. Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma.

Maurizio Sanguinetti, Professore ordinario. Direttore del Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche. IRCCS Fondazione Policlinico Gemelli, Roma.

Annarita Stringaro, Ricercatore. Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Pre-Clinica e Clinica dei Farmaci. Istituto Superiore di Sanità, (ISS), Roma.

Andrea Urbani, Professore ordinario. Direttore del Dip. di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie. Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Responsabili Scientifici dell’evento

Prof. Maurizio Sanguinetti. Direttore del Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche. IRCCS Fondazione Policlinico Gemelli, Roma.

Dott.ssa Annarita Stringaro. Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Pre-Clinica e Clinica dei Farmaci. Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma.

Dott.ssa Francesca Mondello. Presidente S.I.R.O.E.- Già ricercatore del Dip. Malattie Infettive, ISS, Roma.

Segreteria Scientifica

Dott.ssa Maura Di Vito 3925476062 maura.divito@unicatt.it; segreteria@siroe.it
Dip. di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie. Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Dott.ssa Marisa Colone 06/49903610 marisa.colone@iss.it
Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Pre-Clinica e Clinica dei Farmaci. Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma.

Segreteria Organizzativa

Dott.ssa Maura Di Vito 3925476062 maura.divito@unicatt.it; segreteria@siroe.it
Dip. di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie. Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Dott.ssa Melinda Mariotti
Dott.ssa Giulia Lombardini
Dott. Roberto Rosato
Dott.ssa Silvia Rizzo

Dip. di Scienze Biotecnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie. Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Dott.ssa Marisa Colone 06/49903610 marisa.colone@iss.it
Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Pre-Clinica e Clinica dei Farmaci. Istituto Superiore di Sanità, ISS, Roma.

A seguire, la sintesi di alcune delle Presentazioni

- Melinda Mariotti.** Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. *Formulazione di smalto green e oli essenziali per la prevenzione e cura delle onicomicosi.* pg. 5
- Silvia Rizzo.** Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. *Preparazione e caratterizzazione di microparticelle di PLGA per il rilascio di cinnamaldeide isolata da Cinnamomum cassia nel trattamento di Candida spp.* pg. 7
- Eleonora Truzzi.** Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena. *Sviluppo di un metodo rapido per la classificazione e riconoscimento di specie e chemotipi di oli essenziali mediante spettroscopia infrarossa accoppiata a chemiometria.* pg. 8
- Enrico Rossi.** Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena. *Sviluppo di un metodo analitico HS-SPME-GC per l'identificazione di linalolo in tessuti animali.* pg. 9
- Chiara Genova.** Sapienza Università degli Studi di Roma. *Attività biocide degli oli essenziali ed applicazioni nell'ambito della conservazione dei beni culturali.* pg. 12
- Giulia Lombardini.** Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. *Oli essenziali per la prevenzione e il trattamento delle salmonellosi da allevamenti intensivi.* pg. 14
- Francesca Maggio.** Università degli Studi di Teramo. *Approccio innovativo per descrivere la risposta fisiologica di Listeria monocytogenes a concentrazioni subletali di olio essenziale di Origanum vulgare L.* pg. 15
- Marzia Beccaccioli.** Sapienza Università degli Studi di Roma. *Effetto di metaboliti naturali su crescita e sintesi di aflatossine in Aspergillus flavus.* pg. 17
- Alessandra Culmone.** Università degli Studi di Palermo. *Idrolato e olio essenziale di origano per la protezione della papaya (Carica papaya L.) in postraccolta e riduzione delle perdite alimentari.* pg. 19
- Lorenzo Benetti.** Università degli Studi di Ferrara. *Effetti dell'idrolato di Monarda didyma L. nella lotta al fitopatogeno Drosophila suzukii.* pg. 21
- Marwa Mounni.** Università Politecnica delle Marche, Ancona. *Oli essenziali per la protezione da patogeni trasmessi per seme.* pg. 23
- Michele Ricupero.** Università degli Studi di Catania. *Recenti sviluppi degli oli essenziali come strumento di difesa sostenibile in agricoltura.* pg. 25
- Gaetano Giuliano.** Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria. *Attività biologica di bio-insetticidi a base di oli essenziali di aglio, nei confronti di Tuta absoluta.* pg. 26
- Premiazione Giovani Ricercatori S.I.R.O.E. (Moderatori: Francesca Mondello, Annarita Stringaro, Hedayat Bouzari, Sebastiano Delfine)** pg. 29

**A cura di Maura Di Vito¹, Francesca Mondello²,
Annarita Stringaro³, Maria Grazia Bellardi⁴**

¹ Dipartimento di Scienze Biotechnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma;

² Presidente SIROE, già ricercatore presso Dip. di Malattie Infettive dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma;

³ Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci, ISS, Roma;

⁴ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Bologna

AREA MEDICINA UMANA

Smalto naturale “green” modificato con oli essenziali per il trattamento delle onicomicosi

M. Mariotti¹, C. Scafuro¹, S. Garzoli², R. Torelli³, A. Zhiri^{4,5}, M. Sanguinetti^{1,3}, F. Bugli^{1,3}, M. Di Vito¹

¹Dipartimento di Scienze Biotechnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

²Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma Sapienza, Roma, Italia

³Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia

⁴Pranarom International S.A. 7, Ghislenghien, Belgio

⁵Plant Biotechnology Research Unit, Belgium Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgio
e.mail: melinda.mariotti@unicatt.it

Le onicomicosi (OM) sono infezioni fungine che possono interessare la lamina, la matrice o il letto dell'unghia. Rappresentano circa il 50% dei disturbi ungueali dei paesi industrializzati (1) e si manifestano con decolorazione, ispessimento e onicolisi dell'unghia. In questo contesto gli oli essenziali (OE), composti aromatici naturali noti per la loro attività antimicrobica (2-4), stanno trovando il loro posto come nuove alternative per la prevenzione e il trattamento di tali infezioni. Lo scopo dello studio è stato di valutare l'efficacia antifungina di 7 OE e di un MIX commerciale nei confronti di 10 funghi dermatofiti responsabili di OM al fine di formulare uno smalto green naturale (GNNP) da utilizzare a scopo preventivo o curativo. Il profilo chimico dei composti naturali è stato valutato tramite gas cromatografia accoppiata allo spazio di testa (SPME/GC-MS). Sono stati eseguiti test di micro-brodo diluizione per valutare l'efficacia antifungina e un sondaggio di gradimento olfattivo per selezionare il composto migliore. La SPME/GC-MS è stata utilizzata anche per valutare il rilascio nel tempo dei composti attivi dei 2 GNNP modificati con l'aggiunta dell'OE più efficace o del MIX (GNNP-m-OE/MIX). L'azione preventiva e curativa dei due GNNP-m è stata valutata con esperimenti *ex vivo* su unghie sane o colonizzate con *Trichophyton mentagrophytes* testando concentrazioni scalari di OE o MIX comprese tra 4% v/v e 1% v/v. Dei 3 OE che hanno mostrato la più elevata attività antifungina (*Cymbopogon giganteus*, *C. citratus* e *C. martini*), il *C. citratus* (IC₉₀=0,5% v/v, CC₉₀=1% v/v) è stato preferito dal 46,67% dei partecipanti al sondaggio di gradimento e selezionato per formulare il GNNP-m-OE. Il picco massimo di rilascio dei componenti attivi delle due formulazioni GNNP-m è raggiunto al 3° giorno e si mantiene costante fino al 6° per GNNP-m-MIX. Al 4% i GNNP-m mostrano azione fungicida su tutti i ceppi, al 2% GNNP-m-OE su tutti tranne *Microsporum canis* ma non risulta attivo all'1%; al 2% e 1% GNNP-m-MIX risulta invece attivo solo su *Trichophyton rubrum* (Fig. 1). Nei confronti di *T. mentagrophytes*, i dati degli esperimenti *ex vivo* mostrano l'azione preventiva di entrambi i GNNP-m al 4%, mentre GNNP-m-OE presenta anche azione curativa. A concentrazioni diverse, i due GNNP-m inibiscono in parte o totalmente la crescita dei dermatofiti responsabili delle OM. In particolare, il GNNP-m-MIX presenta un'azione inibente e il rilascio dei suoi componenti è compatibile con un trattamento ogni 7 giorni, mentre il GNNP-m-OE mostra anche un'azione citocida sulle unghie colonizzate e può quindi agire come farmaco naturale, richiedendo però 2 applicazioni alla settimana. In conclusione, per il trattamento delle OM gli OE possono considerarsi una valida risorsa naturale ad azione antifungina per lo sviluppo di nuovi approcci preventivi e terapeutici.

Bibliografia

- (1) Leung A.K.C., Lam J.M., Leong K.F., Hon K.L., Barankin B., Leung A.A.M., Wong A.H.C. (2020) - Onychomycosis: an updated review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discovery*, 14(1): 32-45.
- (2) Napoli E., Di Vito M. (2021) - Toward a new future for essential oils. *Antibiotics*, 10(2): 207.
- (3) Di Vito M., Bellardi M.G., Sanguinetti M., Mondello F., Girolamo A., Barbanti L., Garzoli S., Sabatino M., Ragno R., Vitali A., Palucci I., Posteraro B., Gasbarrini A., Prati G.M., Aragona G., Mattarelli P., Bugli F. (2020) - Potent *in vitro* activity of *Citrus aurantium* essential oil and *Vitis vinifera* hydrolate against gut yeast isolates from irritable bowel syndrome patients – the right mix for potential therapeutic use. *Nutrients*, 12(5): 1329.
- (4) Di Vito M., Cacaci M., Barbanti L., Martini C., Sanguinetti M., Benvenuti S., Tosi G., Fiorentini L., Scozzoli M., Bugli F., Mattarelli P. (2020) - *Origanum vulgare* essential oil vs. a commercial mixture of essential oils: *in vitro* effectiveness on salmonella spp. from poultry and swine intensive livestock. *Antibiotics*, 9(11): 763.

Parole chiave. *Cymbopogon citratus*, *Dermatofiti*, *Oli essenziali*, *Onicomicosi*, *Unghie*

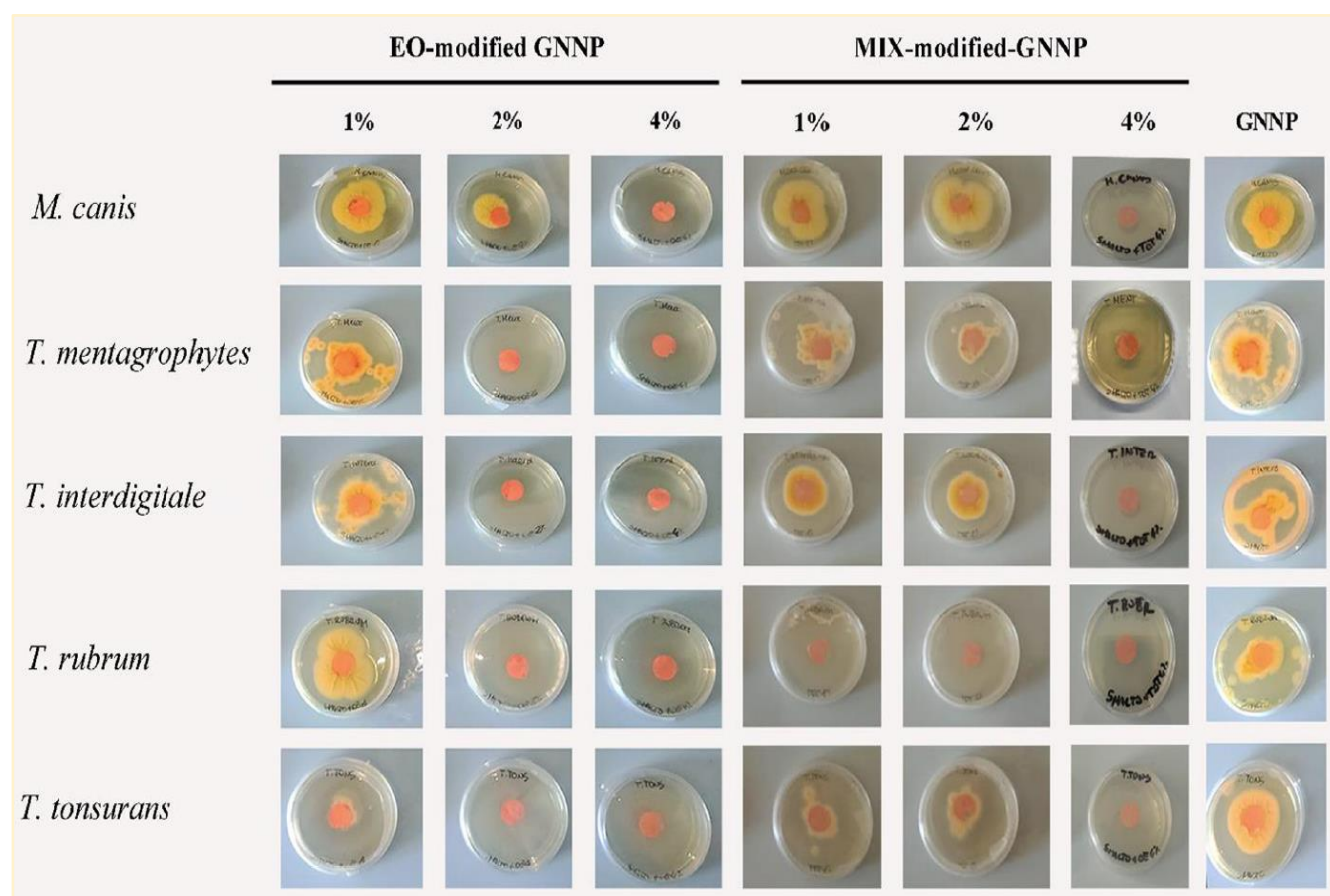


Figura 1. Valutazione dell'azione inibitoria dello smalto green naturale (GNNP) e delle due formulazioni modificate GNNP-m-OE e GNNP-m-MIX.

Sintesi e caratterizzazione di microparticelle di PLGA per il rilascio di cinnamalaldeide estratta da *Cinnamomum Cassia* nel trattamento di infezioni di *Candida albicans* e *Candida glabrata*

**S. Rizzo^{1,2}*, M. Di Vito^{1,2}, I. Favuzzi^{1,2}, E. Mazzinelli^{1,2}, R. Torelli^{1,2}, M. Cacaci^{1,2},
G. Nocca^{1,2}, F. Bugli^{1,2}**

¹*Dipartimento di Scienze Biotechnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie,
Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia*

²*Fondazione Policlinico Agostino Gemelli, Roma, Italia*

*e.mail: silvia.rizzo01@icatt.it

Introduzione. Negli ultimi anni, la diffusione di ceppi di *Candida* multiresistenti agli antimicotici tradizionali ha raggiunto proporzioni allarmanti, tanto che lo sviluppo di agenti antimicrobici innovativi, come sostanze di origine naturale, appare una necessità improrogabile (1). Tra i prodotti di origine naturale è stato riservato notevole interesse allo studio della cinnamalaldeide (CIN), uno dei principali componenti attivi dell'olio essenziale di cannella, la quale si trova naturalmente nella corteccia degli alberi del genere *Cinnamomum*, come *Cinnamomum zeylanicum* (o *Cinnamomum verum*), *Cinnamomum canfora* e *Cinnamomum cassia* (2). La CIN presenta attività antimicotiche dovute all'inibizione della biosintesi della parete, della funzione della membrana e delle attività enzimatiche specifiche nella cellula fungina (3). L'impiego di vettori, come microparticelle (MPs) polimeriche, per il rilascio di molecole con azione terapeutica, come la CIN, potrebbe rivelarsi la strategia più vantaggiosa al fine di modulare e/o migliorare l'azione di queste promettenti molecole, ridurre la tossicità sistemica ad esse associata ed aumentarne la selettività verso i bersagli di interesse (4). Il PLGA (acido polilattico- co-glicolico) rappresenta uno dei polimeri maggiormente utilizzati nella formulazione di vettori per il *drug delivery*, con spiccata biocompatibilità, biodegradabilità e bassa tossicità (5).

Materiali e metodi. Le MPs di PLGA cariche di CIN sono state sintetizzate mediante la tecnica dell'emulsione singola. La caratterizzazione morfologico-funzionale è stata valutata al microscopio elettronico a scansione (SEM); l'analisi del carico e del rilascio di CIN è stata effettuata in cromatografia ad alta prestazione (HPLC). La tossicità della CIN nella forma libera e veicolata è stata valutata *in vitro* su fibroblasti murini 3T3 mediante MTT test e *in vivo* su larve di lepidottero *Galleria mellonella*. L'attività antimicotica della CIN libera e veicolata è stata testata su ceppi isogenici di *C. albicans* e *C. glabrata* resistenti e sensibili, isolati da campioni clinici, valutando la minima concentrazione inibente la crescita fungina (MIC) e la minima concentrazione fungicida (MFC) mediante il saggio della micro-brodo diluizione.

Risultati e discussione. Utilizzando la tecnica dell'emulsione singola, l'efficienza di produzione di MPs cariche di CIN è pari al 70% (il 70% del PLGA usato nella preparazione determina la formazione di MPs). Dall'analisi al SEM emerge che le MPs si sono formate, presentano forma sferica, morfologia superficiale regolare e liscia e dimensioni eterogenee con diametro medio pari a 30 µm. L'efficienza di carico risulta pari al 13% (il 13% del peso della CIN usata nella fase di preparazione viene incapsulata). La CIN è altamente volatile e viene in parte persa nella fase di preparazione per evaporazione. La cinetica di rilascio di CIN è stata analizzata sia in etanolo che in terreno di coltura liquido per cellule fungine (RPMI), a temperatura ambiente, dopo 1h, 4h e 24h. Il rilascio in etanolo è pari a circa il 99% in 24h mentre in terreno acquoso risulta essere pari al 30%. Ciò dipende dalla solubilità della CIN nei solventi utilizzati, ottima in etanolo e scarsa in terreno acquoso. Inoltre, in terreno in presenza di *Candida* il rilascio è pari a circa il 90% in 24h, in quanto al graduale rilascio di CIN da parte delle MPs consegue la graduale captazione della molecola da parte del microrganismo

e, quindi, le MPs per ripristinare l'equilibrio in soluzione, continuano a rilasciare CIN. La CIN libera alle diverse concentrazioni testate (150, 300 e 600 µg/mL) induce mortalità nell'80% delle cellule in coltura (fibroblasti murini 3T3). La percentuale di mortalità indotta dalla CIN incapsulata in MPs di PLGA decresce del 20% rispetto a quella della forma libera. Le concentrazioni che *in vitro* presentano elevati livelli di tossicità, nel modello *in vivo* risultano essere non tossiche e ben tollerate. L'azione antimicotica della CIN veicolata, valutata su ceppi isogenici di *C. albicans* e *C. glabrata* resistenti e sensibili, viene conservata o leggermente potenziata rispetto alla forma libera.

Conclusioni. Le MPs cariche con CIN presentano caratteristiche chimico-fisiche e biologiche ottimali, assenza di tossicità e conservano o potenziano la loro attività antimicrobica rispetto alla CIN libera.

Bibliografia

- (1) Doyle A.A., Stephens, J.C. (2019) - A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405.
- (2) Thomas J., Duethi P. P. (2001) - Cinnamon. Chapter 11, pg 143-53 in Peter K.V. ed. *Handbook of Herbs and Spices*, 2001. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England and CRC Press LLC.
- (3) Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. (2007) - Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4863–4870.
- (4) Grottkau B.E., Cai X., Wang J., Yang X., Lin Y. (2013) - Polymeric nanoparticles for a drug delivery system. *Current drug metabolism*, 14(8), 840–846.
- (5) Lü J.M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P.H., Yao Q., Chen C. (2009) - Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. 9(4), 325–341.

Parole chiave. *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cinnamaldehyde*, *Drug delivery*, *Microparticelle polimeriche*, *PLGA*

AREA CHIMICA e AMBIENTE

Sviluppo di un metodo rapido per la classificazione e riconoscimento di specie e chemotipi di oli essenziali mediante spettroscopia infrarossa accoppiata a chemiometria

E. Truzzi¹, C. Durante², D. Bertelli¹, B. Catellani¹, S. Pellacani², S. Benvenuti¹

¹Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

²Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

e.mail: eleonora.truzzi@unimore.it

Introduzione. Gli oli essenziali (OE) sono miscele ad alto valore economico, comunemente utilizzate nelle industrie alimentare, farmaceutica, cosmetica e profumiera. OE estratti da piante aromatiche appartenenti allo stesso *genus*, e in certi casi alla stessa specie, possono avere una composizione chimica estremamente variabile. L'identificazione dell'origine botanica e la composizione di un OE sono fattori molto importanti in quanto determinano la sicurezza, l'efficacia e il valore economico. La conformità di un OE a specifici standard analitici è necessaria a livello industriale per assicurare la qualità di un prodotto finito in termini di riproducibilità dei contenuti e quindi stabilirne gli usi e

per salvaguardare la salute dei consumatori. Dal punto di vista economico, la chemotipizzazione di un OE è un aspetto fondamentale per i produttori al fine di valorizzare i propri prodotti. La metodica convenzionale per l'identificazione di un OE è la gas cromatografia, una tecnica costosa, lenta, e che richiede infrastrutture adeguate. Nel presente progetto, le potenzialità della spettroscopia infrarossa in riflettanza totale attenuata (*Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform InfraRed spectroscopy*, ATR-FTIR) accoppiata a metodi chemometrici sono state investigate come tecniche alternative per il controllo di routine di OE. L'ATR-FTIR è infatti una metodica veloce, economica, e facile da utilizzare. Inoltre, gli spettrometri ATR sono largamente diffusi a livello industriale.

Materiali e metodi. OE appartenenti ai genus *Mentha*, *Cymbopogon*, e *Lavandula*, e alle specie *Salvia rosmarinus* e *Thymus vulgaris* sono stati analizzati mediante ATR-FTIR. I dataset formati dai punti spettrali (assorbanza per ogni numero d'onda nel range 4000-450 cm⁻¹) degli OE analizzati sono stati divisi in training e test sets e utilizzati per creare modelli di classificazione mediante la *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) per identificare le specie (dei genus *Mentha*, *Cymbopogon*, e *Lavandula*) e i chemotipi (di *S. rosmarinus* e *T. vulgaris*) degli OE.

La robustezza dei modelli e la veridicità dei risultati sono state dimostrate mediante test di permutazione e l'area sotto la curva (AUC) ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Risultati e Discussione. I modelli creati sono stati testati su campioni incogniti e hanno mostrato alte percentuali di sensibilità e specificità. Gli errori medi quadratici in cross-validazione e predizione non hanno superato lo 0.34, dimostrando la capacità dei modelli di riconoscere la specie o il chemotipo degli OE. Le peggiori performance predittive sono state ottenute per i modelli di classificazione delle specie *Cymbopogon winterianus* e *C. nardus*, e *Lavandula angustifolia* e *L. x intermedia*, a causa del loro legame genetico e la simile composizione degli OE.

Tutti i modelli hanno mostrato valori inferiori a 0.05 in seguito ai test di permutazione, dimostrando che i risultati di classificazione ottenuti sono veritieri e non dipendono dal dataset utilizzato. I valori di AUC erano prossimi a 1, suggerendo l'elevata robustezza dei modelli.

Conclusioni. L'approccio analitico sviluppato si è dimostrato essere una strategia promettente per le analisi di routine degli OE.

Parole chiave. *Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)*, *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)*, Oli essenziali, Chemometria

Sviluppo di un metodo analitico HS-SPME-GC per l'identificazione di linalolo in tessuti animali

E. Rossi¹, E. Truzzi¹, M. Scozzoli², S. Benvenuti¹

¹Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

²APA-CT, Forlì (FC), Italia

e.mail: enrico.rossi@unimore.it

Introduzione. Negli ultimi decenni, l'Unione Europea ha promosso numerosi interventi per la salvaguardia del benessere animale e sta limitando sempre di più l'uso del taglio della coda negli allevamenti intensivi di suini (1). Tuttavia, a causa della ristrettezza degli spazi, gli animali hanno un aumento dello stress e sono numerosi i casi di aggressione. Il taglio della coda è una pratica per diminuire il rischio di lesioni, con limitate fuoriuscite di sangue che possono indurre ulteriore stress per gli animali. La mancata applicazione di tale pratica aumenta drasticamente la probabilità di lesioni (2). Per questo motivo si stanno cercando valide alternative per diminuire lo stress dei suini. L'olio essenziale (OE) di *Lavandula angustifolia* Mill. Lamiaceae è stato dimostrato avere una buona attività

rilassante ed è applicato sugli animali in un allevamento intensivo (3). Il linalolo, molecola presente ad elevate concentrazioni nell'OE insieme al suo estere, è segnalato come allergene per l'uomo e non può essere presente negli alimenti (4).

L'obiettivo del nostro studio è stato quindi lo sviluppo di un metodo analitico efficace e sensibile per l'identificazione di linalolo nel lardo e nel muscolo di suini trattati con nebulizzazioni di OE di *L. angustifolia* Mill.

Materiali e metodi. Gli animali sono stati divisi in due gruppi trattati (T1 n=27; e T2=29) e un gruppo di controllo (n=18). L'OE di lavanda è stato nebulizzato una volta al giorno (T1) e due volte al giorno (T2). Al fine di estrarre il linalolo dalla matrice animale, è stato sviluppato un metodo HS-SPME. A tale scopo è stata selezionata la fibra DVB/CAR/PDMS. Usando i campioni di controllo di lardo e di muscolo è stata calcolata la minima concentrazione determinabile (LOD). Per le analisi sono stati pesati 1.5 g di campione e successivamente è stato aggiunto 1 mL di paraffina. Ogni campione è stato sottoposto ad agitazione magnetica per 5 min. e riscaldato in bagno ad ultrasuoni per 15 min. a 50 °C. Successivamente, è stata inserita attraverso un setto, la fibra SPME e portata a saturazione per 15 minuti. Finito il tempo di esposizione, è stata inserita nell'iniettore del gas cromatografo (GC) per i primi 5 minuti dell'analisi a 250 °C.

Risultati e Discussione. È stato calcolato il LOD del linalolo in campioni di lardo e muscolo corrispondente ad una concentrazione di 0.25 nL/g. La Fig.1 mostra un campione non trattato di lardo con 0.25 nL/g di standard di linalolo. Le Figure 2 e 3 riportano i cromatogrammi di campioni di lardo e muscolo relativi ad animali trattati con OE di *Lavandula*. I campioni trattati mostrano una concentrazione inferiore al LOD.

Conclusioni. Il metodo HS-SPME-GC risulta sensibile a minime concentrazioni di linalolo in tessuti animali. Nello studio su suini trattati con OE di *Lavandula angustifolia* non si sono rinvenute concentrazioni di linalolo superiori al LOD (0.25 nL/g) e quindi si può affermare che il trattamento non ha provocato fenomeni di accumulo nei tessuti.

Bibliografia

- (1) Nalon E., De Briyne N. (2019) - Efforts to Ban the routine tail docking of pigs and to give pigs enrichment materials via EU law: where do we stand a quarter of a century on? *Animals*, 9(4): 132-147.
- (2) De Briyne N., Berg C., Blaha T., Palzer A., Temple D. (2018) - Phasing out pig tail docking in the EU – present state, challenges and possibilities. *Porcine Health Management*, 4: 27-36.
- (3) Aponso M., Hearn M. T. W., Patti A. F., Bennet L. E. (2022) - Multiple Sclerosis and Related Disorders, *ACS Chemical Neuroscience*, 63: 103910. DOI: 10.1016/j.msard.2022.103910
- (4) Audrain H., Kenward C., Lovell C. R., Ormerod A. D., Sansom J., Chowdhury M. M. U., Cooper S. M., Johnston G. A., Wilkinson M., King C., Stone N., Horne H. L., Holden C. R., Wakelin S., Buckley D. A. (2014) - Allergy to oxidized limonene and linalool is frequent in the U.K. *British Journal of Dermatology (BJD)*, 171: 292-297. <https://doi.org/10.1111/bjd.1303>

Parole chiave. HS-SPME, Linalolo, Suini, Olio essenziale

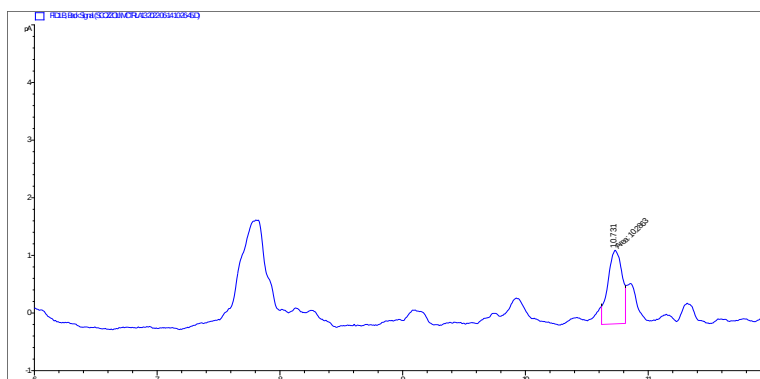


Figura 1. Linalolo 0.25 nL/g in controllo di lardo.

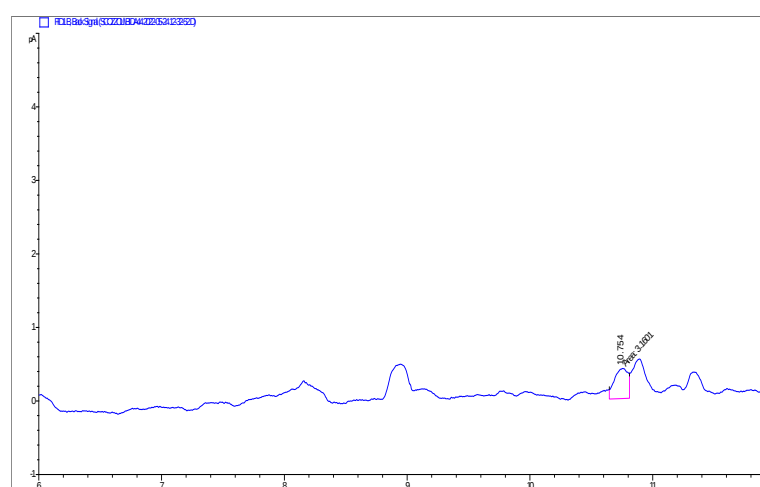


Figura 2. Lardo da animale trattato con OE.

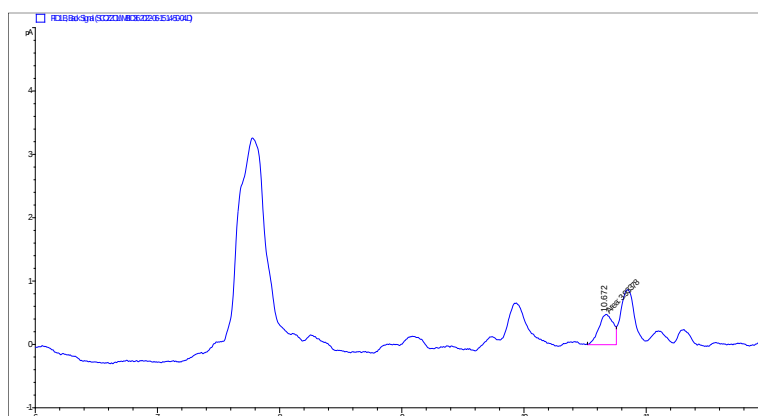


Figura 3. Muscolo da animale trattato con OE.

Attività biocide degli oli essenziali ed applicazioni nell'ambito della conservazione dei beni culturali

C. Genova¹, G. Favero²

¹Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: chiara.genova@uniroma1.it

Il biodeterioramento è uno dei fenomeni di degrado più ricorrenti nei beni culturali, ed include tutti quei cambiamenti chimici, fisici ed estetici provocati dalle attività vitali di microorganismi colonizzatori di superfici organiche (legno, carta, pergamena) ed inorganiche (materiali lapidei), che costituiscono l'opera d'arte. Per controllare la crescita di tali microorganismi, recentemente si stanno studiando delle alternative naturali ai classici biocidi, tra cui gli Oli Essenziali (OE). Sebbene le loro proprietà antibatteriche e antifungine siano note fin dall'antichità, ancora non è chiaro se esse siano attribuibili alla sinergia derivante dalla composizione chimica eterogenea dell'OE o alla predominanza di una/due componenti maggioritarie (CM) che ne stabiliscono il chemotipo. In questo studio, tre OE (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e *Calamintha nepeta*), e le loro CM (timolo, carvacrolo e R-(+)-pulegone), sono stati selezionati per essere applicati su biofilm eterogenei presenti su superfici lapidee in travertino (un muro esterno caratterizzato da evidente biocolonizzazione) e granito (campioni artificialmente biocolonizzati in laboratorio).

La sperimentazione ha previsto l'utilizzo di una matrice gel a base di PVA nella quale sono stati dispersi i composti chimicamente attivi, in modo da limitarne la volatilità e favorirne l'applicazione e la rimozione dai substrati lapidei.

I prodotti costituiti dalle sostanze chimicamente attive (i.e. OE e CM) e dalla matrice gel sono state applicate a pennello sulle superfici lapidee biocolonizzate. Una volta asciutta, la matrice gel è stata rimossa dalle superfici e ne è stata valutata l'azione pulente tramite misure colorimetriche, completamente non invasive e non distruttive. Le patine superficiali sono state efficacemente rimosse grazie all'applicazione dei sistemi a base di biocidi naturali combinati con PVA (Fig. 1). Questo è confermato dai risultati colorimetrici che, inoltre, hanno permesso di stabilire una persistenza nell'efficacia dei prodotti in quanto, le misure ripetute durante un monitoraggio a breve termine, hanno evidenziato un progressivo miglioramento del colore ed un avvicinamento al colore originario dei litotipi non colonizzati.

In conclusione, i sistemi a base di PVA arricchiti con i biocidi naturali sono efficaci nella rimozione della patina biologica e nella prevenzione della ricrescita dei microorganismi. Inoltre, l'effetto ottenuto applicando le componenti maggioritarie è confrontabile e/o superiore rispetto a quello ottenuto utilizzando i soli oli essenziali (1-2). Questo apre dei nuovi scenari per lo sviluppo di sistemi biocidi composti dai soli principi attivi (eventualmente combinati) presenti negli oli, con il vantaggio di un controllo superiore sulle concentrazioni impiegate e sull'effetto nei confronti di microorganismi target. Attualmente sono in corso degli studi sul nano-incapsulamento dei principi attivi, da utilizzare come sistemi biocidi sia sui materiali lapidei ma anche su altri supporti, come il legno archeologico.

Bibliografia

- (1) Genova C., Fuentes E., Sanmartin P., Favero G., Prieto B. (2020) - Phytochemical Compounds as Cleaning Agents on Granite Colonized by Phototrophic Subaerial Biofilm. *Coatings*, 10: 295-307.
- (2) Genova C., Grottoli A., Zoppis E., Claudia C., Matricardi P., Favero G. (2020) - An integrated approach to the recovery of travertine biodegradation by combining phyto-cleaning with genomic characterization. *Microchem J.*, 156: 104918 - 14925.

Parole chiave. Biodeterioramento, Biocidi naturali, Materiali lapidei, Misure non invasive

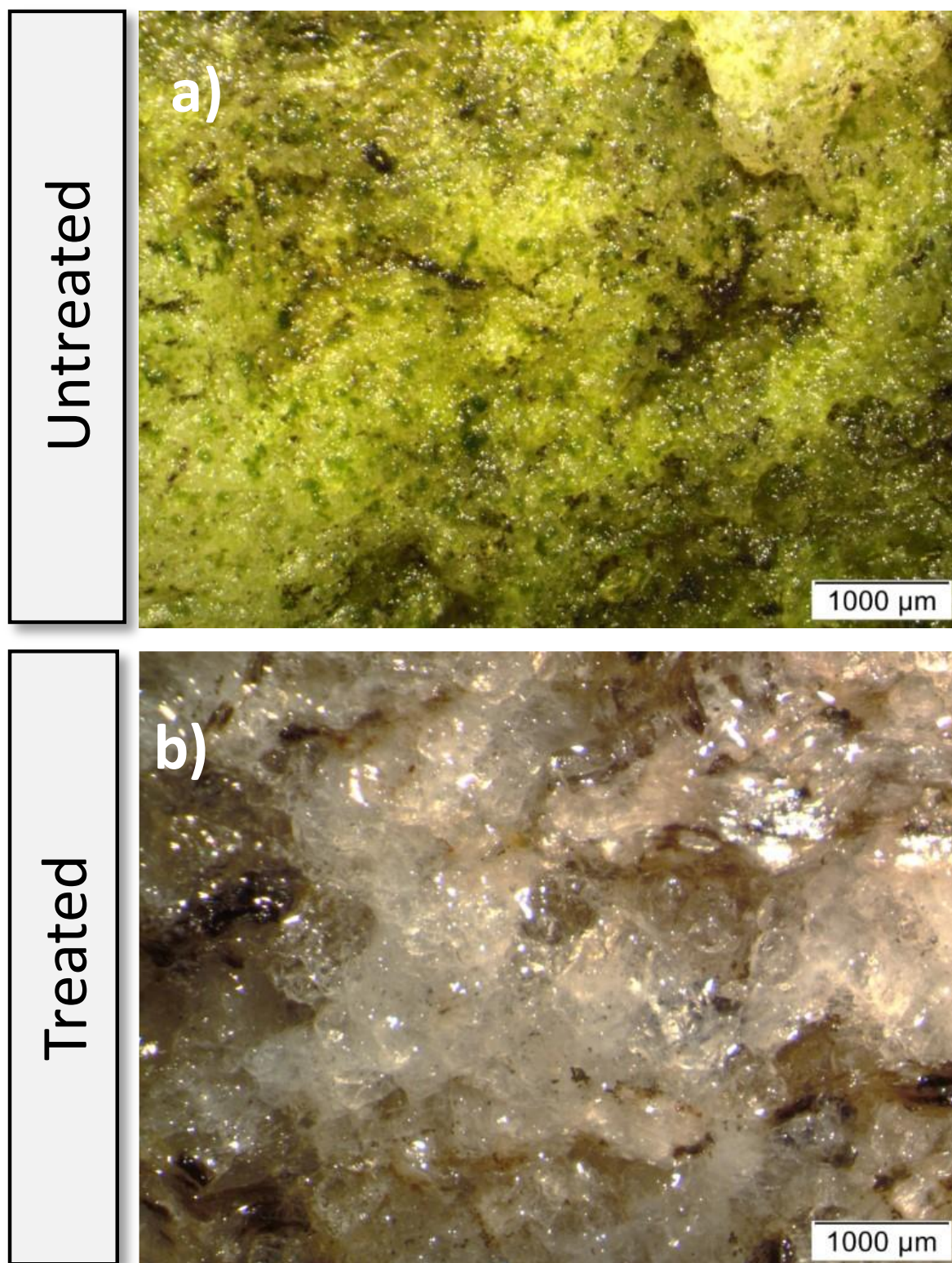


Figura 1. Osservazioni microscopiche in campioni di granito (ingrandimenti 1,25x) a) biocolonizzato, prima del trattamento (*untreated*); c) dopo il trattamento (*treated*) con sistema composto da matrice gel e olio essenziale di *Calamintha nepeta*.

AREA MEDICINA VETERINARIA e ALIMENTI

Potenziali applicazioni degli oli essenziali per la sanificazione dell'ambiente e il trattamento antimicrobico delle infezioni negli allevamenti di intensivi di bestiame

G. Lombardini¹, M. Mariotti¹, S. Rizzo¹, D. Scarafile², M. Modesto², E. Truzzi³, S. Benvenuti³, A. Elmi⁴, M. Bertocchi⁴, L. Fiorentini⁵, L. Gambi⁵, M. Scozzoli⁶, P. Mattarelli²

¹Dipartimento di Scienze Biotechnologiche di Base, Cliniche Intensivologiche e Perioperatorie, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italia

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Bologna, Italia

³Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

⁴Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Bologna, Italia

⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), Sede Territoriale di Forlì, Forlì, Italia

⁶Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali (SIROE), Roma, Italia
e.mail: giulia.lombardini@unicatt.it

Nel corso degli anni l'uso estensivo degli antibiotici ha contribuito alla contemporanea crisi di antibiotico resistenza. L'aumento delle infezioni del bestiame causate dai ceppi batterici di *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. ed *Escherichia coli* resistenti agli antimicrobici rappresentano una minaccia pubblica per la salute umana e animale. Un approccio innovativo per la riduzione dell'incidenza di queste zoonosi si potrebbe ottenere mediante l'uso degli oli essenziali (OE). In questo studio l'obiettivo è stato quello di identificare degli OE sicuri per l'uso ed efficaci sia nella terapia veterinaria complementare che nella sanificazione ambientale degli allevamenti intensivi. Nello studio, tre ceppi di *Salmonella Typhimurium*, tre di *Clostridium perfringens* e quattro di *Escherichia coli* isolati da allevamenti di pollame e suini sono stati utilizzati per valutare le proprietà antimicrobiche di nove OE (*Eucalyptus globus*, *Origanum vulgare*: OV), *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Melaleuca leucadendron*, *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* da foglie: CZ), *Lavandula* × *hybrida* e *Mentha piperita*) e del prodotto commerciale GR-OLI modificato (mGR-OLI) dalla stessa casa produttrice. I prodotti naturali utilizzati sono stati caratterizzati mediante gascromatografia, mentre la sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici è stata eseguita secondo linee guida individuandone le resistenze. L'efficacia antimicrobica degli OE è stata valutata sia mediante test di micro brodo-diluizione, eseguito secondo linee guida EUCAST, che con il test di micro-atmosfera in piastra, quest'ultimo per valutare l'efficacia delle componenti volatili dei composti naturali. Gli OE che sono risultati più efficaci sono stati CZ (Range MIC-CZ= 0,06%-0,31% v/v, Range MBC-CZ= 0,03%- >0,5% v/v) ed OV (Range MIC-OV= 0,06%-0,38% v/v, Range MBC-OV= 0,17%-1,17% v/v), mentre i valori ottenuti con mGR-OLI (Range MIC-mGR-OLI= 0,08%-0,38% v/v, Range MBC-mGR-OLI= 0,13-1,17%v/v) ne confermano l'efficacia *in vitro*. Analogamente anche il test di micro-atmosfera ha mostrato la maggiore efficacia di questi 3 composti naturali poiché le loro componenti volatili sono state in grado di inibire significativamente la crescita dei ceppi testati (Fig. 1). Di CZ e OV è stata successivamente valutata la tossicità sia *in vitro* sugli spermatozoi di suini che *in vivo* mediante larve di *Galleria mellonella*. La tossicità *in vitro* di OV è risultata leggermente inferiore a quella di CZ, mentre sulle larve di *Galleria mellonella* (Fig. 2) non si visualizzava alcuna tossicità di entrambi. In conclusione, lo studio conferma l'importanza dell'impiego dei prodotti naturali per la lotta all'antibiotico-resistenza presente negli allevamenti intensivi e consolida l'idea dell'utilizzo sicuro e dell'applicazione futura degli OE per ridurre e prevenire le infezioni del bestiame.

Parole chiave. *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Escherichia coli*, *Pollame*, *Suini*

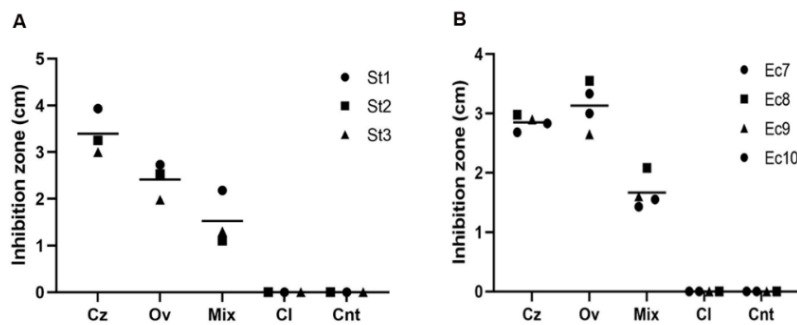


Figura 1. Esperimento con il metodo Micro-atmosfera: il grafico mostra i centimetri degli aloni di inibizione di crescita dei ceppi di *Salmonella*.

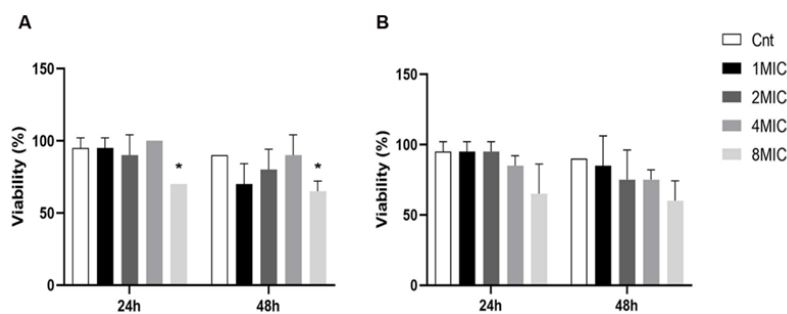


Figura 2. Tossicità di *Cinnamomum zeylanicum* (CZ) e *Origanum vulgare* (OV) EO in larve di *Galleria mellonella*: il grafico A mostra la tossicità di CZ; il grafico B mostra la tossicità di OV. * $p < 0.05$ il p value è stato calcolato relativamente al controllo.

Approccio innovativo per descrivere la risposta fisiologica di *Listeria monocytogenes* a concentrazioni subletali di olio essenziale di *Origanum vulgare* L.

F. Maggio¹, A. Serio², C. Rossi², C. Purgatorio², F. Buccioni², C. Chaves López², A. Paparella²

^{1,2} Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Teramo, Italia
e.mail: fmaggio@unite.it

La bioconservazione degli alimenti è una valida alternativa agli antimicrobici tradizionali. Il fiocomplesso degli oli essenziali (OE) esplica una forte attività antimicrobica, colpendo bersagli cellulari multipli e compromettendo la capacità del microrganismo di instaurare resistenze (1). Questo studio (2) si è avvalso della tecnologia del ‘microarray’ fenotipico (OmniLog®, Biolog, Hayward, CA, USA) per la determinazione della risposta fisiologica di *Listeria monocytogenes*

ATCC 7644 alla pre-esposizione a 30°C per 1 ora ad una concentrazione subletale (1,25 µL/mL) di *Origanum vulgare* L. OE (OEO).

I dati ottenuti sono stati sottoposti a modellazione attraverso l'equazione di Baranyi e Roberts (3) per poter descrivere i parametri di crescita.

Un'importante estensione della fase di latenza con riduzione della crescita sono state osservate nelle cellule pre-esposte ad OEO in presenza di diverse fonti carboniose, in particolare del lattosio (28 ore di estensione) (Fig. 1).

Interessanti risultati sono stati osservati in presenza di pH acidi, dove a pH 5.0 è stata significativamente ($p^* < 0,05$) estesa la fase di latenza (fino a 22,90 ore) con una forte riduzione della μ_{max} (sistema informativo dei clienti) e l'impossibilità di modellare completamente i dati, suggerendo l'assenza di uno sviluppo cellulare (Tab. 1). Inoltre, la pre-esposizione all'OEO e la presenza dell'1% di NaCl hanno indotto un'estensione della fase di latenza maggiore rispetto al solo trattamento con 8% di NaCl (20,57 e 5,82 ore, rispettivamente) (Tab. 1).

L'OEO influenzerebbe le normali attività metaboliche di *L. monocytogenes*, la fase di latenza e impedirebbe il ripristino degli stress subletali subiti. Pertanto, gli OE permetterebbero la riduzione delle concentrazioni dei conservanti maggiormente impiegati nella formulazione degli alimenti (come NaCl e pH acidi), preservandone la *shelf-life*.

Bibliografia

(1) Degirmenci H., Erkurt H. (2020) - Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers. Journal of Infection and Public Health, 13: 58-67.

(2) Maggio F., Rossi C., Lòpez C., Valbonetti L., Desideri G., Paparella A., Serio A. (2021) - A single exposure to a sublethal concentration of *Origanum vulgare* essential oil initiates response against food stressors and restoration of antibiotic susceptibility in *Listeria monocytogenes*. Food Control, 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108562>

(3) Baranyi J., Roberts T.A. (1994) - A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 12: 277-294.

Parole chiave. Microarray fenotipici, *Origanum vulgare* L., Bioconservazione

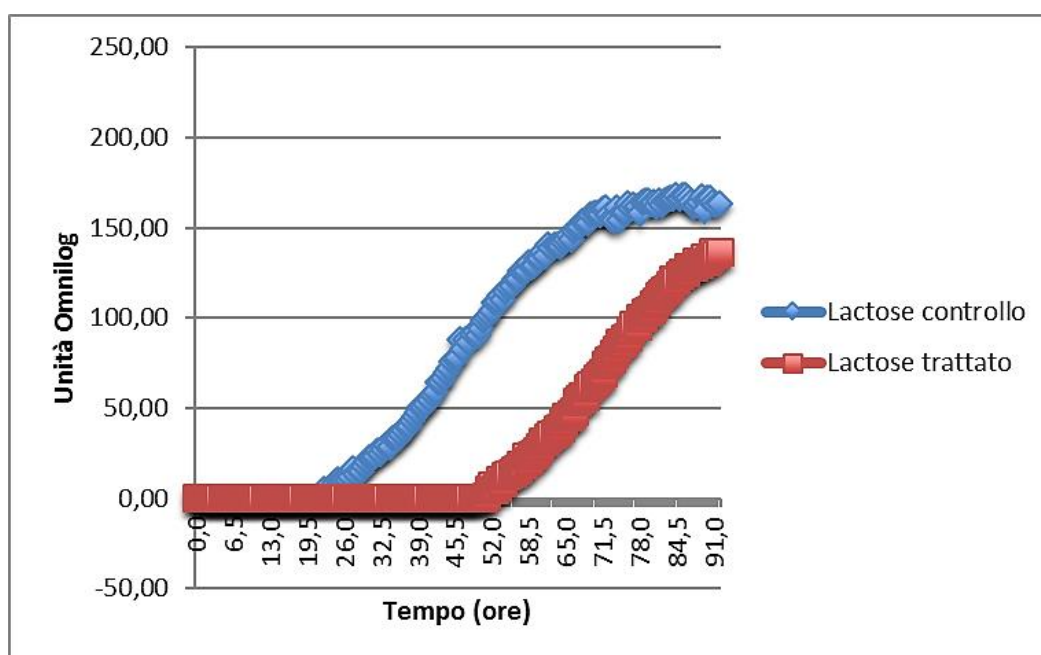


Figura 1. Dinamica di crescita di cellule di *L. monocytogenes* ATCC 7644 non trattate e pretrattate con 1,25 μ L/mL di olio essenziale di *Origanum vulgare* L. (OEO) in presenza di lattosio. I risultati sono espressi come Unità Omnilog/ore.

Substrato	Fase di latenza (ore)	μ_{max} (Unità Omnilog /ore)	Carica cellulare iniziale (Unità Omnilog)	Carica cellulare finale (Unità Omnilog)	R ²	Errore Standard	Modello
pH 6 controllo	4,29 $\pm$ 0,13	73,80 $\pm$ 5,96	5,45 $\pm$ 2,64	194,26 $\pm$ 1,64	0,99	5,47	Completo
pH 6 trattato	24,85 $\pm$ 0,11	76,55 $\pm$ 6,39	15,96 $\pm$ 1,13	191,33 $\pm$ 1,37	0,99	5,65	Completo
pH 5 controllo	11,44 $\pm$ 0,23	37,58 $\pm$ 3,77	3,73 $\pm$ 1,93	143,04 $\pm$ 1,33	0,99	6,46	Completo
pH 5 trattato	22,90 $\pm$ 3,31	-1,44 $\pm$ 0,44	42,77 $\pm$ 1,46	0	0,47	6,26	No asintoto
1% NaCl controllo	3,71 $\pm$ 0,20	50,71 $\pm$ 4,16	3,71 $\pm$ 3,47	183,07 $\pm$ 3,43	0,99	6,54	Completo
1% NaCl trattato	20,57 $\pm$ 0,16	68,88 $\pm$ 6,95	8,07 $\pm$ 1,61	190,81 $\pm$ 5,41	0,99	7,32	Completo
4% NaCl controllo	4,05 $\pm$ 0,27	30,65 $\pm$ 2,13	5,94 $\pm$ 3,28	170,68 $\pm$ 2,153	0,99	6,14	Completo
4% NaCl trattato	27,18 $\pm$ 0,13	46,08 $\pm$ 2,10	14,75 $\pm$ 0,85	172,11 $\pm$ 2,13	0,99	4,43	Completo
8% NaCl controllo	5,82 $\pm$ 0,48	1,61 $\pm$ 0,65	10,66 $\pm$ 2,79	159,80 $\pm$ 2,41	0,99	5,80	Completo
8% NaCl trattato	37,48 $\pm$ 0,33	10,23 $\pm$ 0,47	37,08 $\pm$ 0,90	49,37 $\pm$ 0,35	0,99	5,55	Completo

Tabella 1. Parametri di crescita ottenuti dal modello Baranyi e Roberts per cellule di *L. monocytogenes* ATCC 7644 non trattate e pre-trattate con 1,25 μ L/mL OEO, in presenza di diverse condizioni ambientali.

Effetto di metaboliti naturali su crescita e sintesi di aflatossine in *Aspergillus flavus*

M. Beccaccioli¹, V. Cecchetti¹, R.S. Fratini¹, R. Ragno², M. Reverberi¹

¹Dipartimento di Biologia Ambientale, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia

²Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, Roma, Italia
e.mail: marzia.beccaccioli@uniroma1.it

Piante e microrganismi possono essere fonti naturali di metaboliti bioattivi con effetti antiossidanti, antimicrobici o antinfiammatori (1, 2). L'utilizzo di molecole bioattive vegetali o microbiche nella gestione integrata delle malattie delle colture rappresenta una scelta innovativa e sostenibile per contrastare la contaminazione da micotossine prodotte da funghi fitopatogeni come l'*Aspergillus flavus* (3).

A tal scopo è stata sviluppata una metodologia rapida ed efficace, il *Multiwell Assay* (MA, Fig. 1), che consente di testare l'effetto dei metaboliti naturali sulla crescita di *A. flavus* e sulla produzione di aflatossine (AFLA). Nel MA si utilizzano piastre da 96 micro-pozzetti, questo sistema permette di monitorare simultaneamente l'effetto di numerosi metaboliti bioattivi a diverse concentrazioni su *A. flavus*. La crescita viene analizzata attraverso la lettura dell'assorbanza (da 1 a 3 giorni dopo l'inoculo); la produzione di AFLA viene determinata a 7 giorni dall'inoculo, attraverso un processo estrattivo seguito da un'analisi condotta attraverso la spettrometria di massa (HPLC-MS/MS).

I metaboliti naturali testati derivano da funghi e piante. I metaboliti fungini sono stati ottenuti dalla crescita *in vitro* di *Trametes versicolor* e *Pleurotus eryngii* (Basidiomycota).

I metaboliti bioattivi vegetali sono stati ottenuti da piante officinali tramite estrazione di oli essenziali da *Heracleum persicum*, *Crocus sativus*, *Peganum harmala*, *Trachyspermum ammi*, *Rosmarinus officinalis*, *Anethum graveolens*, *Berberis vulgaris* e *Berberis thunbergii*.

Il MA ha mostrato che le molecole bioattive utilizzate possono influenzare la crescita di *A. flavus* ed hanno un ruolo importante sulla produzione di AFLA. In particolare, i livelli di AFLA hanno mostrato una significativa diminuzione in presenza di composti bioattivi derivati da *T. versicolor* e *P. eryngii*. La produzione delle AFLA è stata completamente inibita anche in presenza degli oli essenziali di *H. persicum*, *P. harmala*, *T. ammi*.

Il MA è stato utilizzato anche per testare singole molecole bioattive, per i funghi è stato estratto e purificato il Trimesan, un esopolisaccaride prodotto da *T. versicolor*, mentre tra le piante è stato estratto e purificato l'antirinnoside, un glicoside iridoide, prodotto da *Linaria purpurea*.

Entrambe le molecole testate si sono mostrate efficaci nella riduzione della produzione delle AFLA. Numerose informazioni sui metaboliti bioattivi derivati da piante possono essere trovate consultando il database Py-EO (www.eo.3d-qsar.com), l'obiettivo del database è di raccogliere il più possibile dati sperimentali sui composti naturali, con un principale focus sugli oli essenziali.

Il nostro studio suggerisce che, l'idea di utilizzare metaboliti bioattivi derivanti da funghi e piante, sia un valido metodo per controllare la propagazione di *A. flavus* e la contaminazione di AFLA durante le infezioni che insorgono nelle colture agricole sia nella fase di pre che di post-raccolta (1,2,3).

Bibliografia

- (1) Loi M., Paciolla C., Logrieco A.F., Mulè G. (2020) - Plant bioactive compounds in pre-and postharvest management for aflatoxins reduction. *Frontiers in Microbiology*, 11: 243.
- (2) Gunatilaka A.L. (2006) - Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, 69(3): 509-526.
- (3) Klich M.A. (2007) - *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 8(6): 713-722.

Parole chiave. *Aspergillus flavus*, Aflatossine, Multiwell Assay, Molecole bioattive

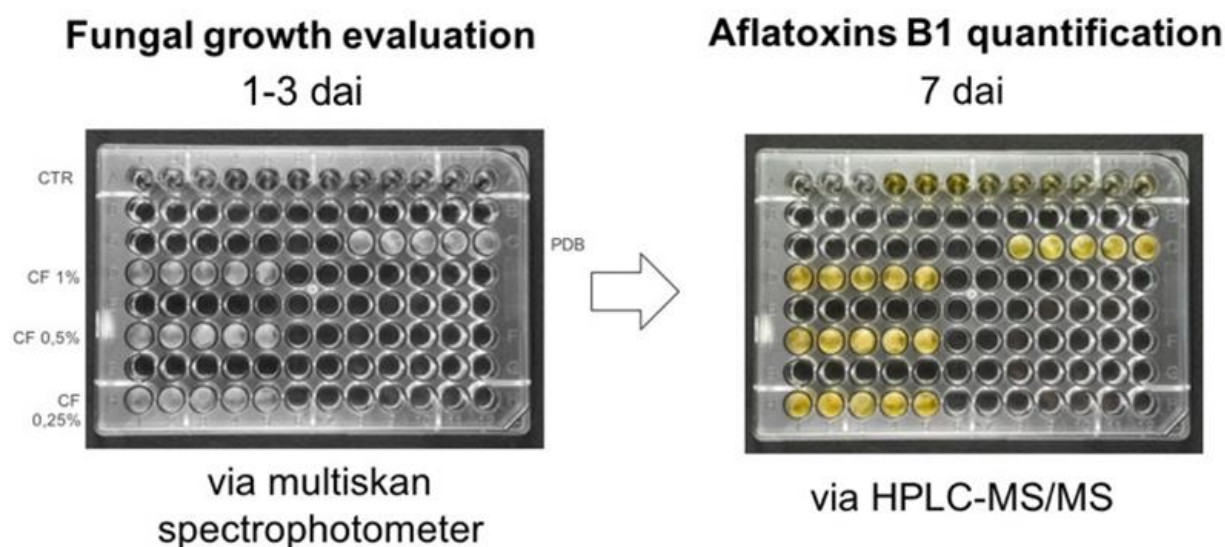


Figura 1. Multiwell Assay (MA). La metodologia MA permette di monitorare la crescita (attraverso la lettura dell'assorbanza) e la produzione di aflatossine (attraverso un'analisi in spettrometria di massa) di *Aspergillus flavus* in presenza di composti naturali a diverse concentrazioni [es. CF (cultural filtrate) a diverse concentrazioni 1, 0,5 e 0,25%]. (dai = days after inoculation)

AREA DIFESA AGRONOMICA

Idrolato e olio essenziale di origano per la protezione della papaya (*Carica papaya* L.) in postraccolta e riduzione delle perdite alimentari

A. Culmone

*Università degli Studi di Palermo, Dipartimento di Scienze Agrarie,
Alimentari e Forestali, Palermo, Italia
e.mail: alessandra.culmone@unipa.it*

È ormai risaputo che la perdita alimentare nel settore del post-raccolta, causata sia dall'assenza di tecnologie avanzate, sia dalla quiescente presenza di agenti patogeni fungini, possa colpire Paesi interi. Inoltre, sta risultando sempre più impellente l'esigenza di prendere decisioni più sostenibili e più consapevoli nei confronti di un Pianeta sempre più minacciato dall'uso indiscriminato di prodotti fitosanitari di sintesi chimica, responsabili non solo di inquinamento (dell'aria, delle acque e del suolo), ma in grado di indurre fenomeni di farmaco-resistenza da parte di agenti patogeni infettivi. Lo scopo di questo lavoro si è dunque incentrato sull'utilizzo di idrolato (ID) ed olio essenziale (OE) di *Origanum vulgare* L. subsp. *viridulum* coltivato in Sicilia per la difesa da infezioni ad eziologia fungina di frutti frigo-conservati di papaya (*Carica papaya* L.). Si è quindi voluto valorizzare un frutto tropicale attualmente prodotto in Sicilia, tamponando le ingenti perdite economiche causate dai numerosi agenti patogeni in grado di attaccare in maniera subdola gli impianti. In campo, infatti, non si notano sintomi specifici sui frutti, ma questi si manifestano nei giorni o nei mesi a seguire negli ambienti di conservazione (Fig.1).

Sono stati utilizzati frutti di papaya della varietà Solo (*Maturity Stage* MS3 = stadio di maturazione commerciale) e sottoposti ad una copertura omogenea di *edible coating* a base di ID ed un biofilm di *Aloe arborescens* Mill. (1), la cui attività antimicrobica è stata sinergizzata con l'aggiunta di OE di origano. Sono stati usati Gel di *A. arborescens* al 40% e OE di *O. vulgare* all'1,5%. Inoltre, per incrementare la protezione del frutto e la sua *shelf-life*, sono stati applicati 2 metodi differenti per la formazione dell'*edible coating*: *spraying* (vaporizzazione) e *brushing* (spennellatura). La sperimentazione è stata portata avanti per 25 giorni ($T 5\pm 1^{\circ}\text{C}$), in ambiente frigo conservato eseguendo rilievi giornalieri per verificare l'insorgenza di eventuali infezioni ad eziologia fungina. Alla fine del periodo di osservazione, sono state eseguite analisi distruttive. Infine, è stata condotta un'analisi sensoriale per valutare eventuali alterazioni della composizione organolettica delle papaye. Dalla sperimentazione eseguita, è emerso che i frutti trattati con *A. arborescens* con l'aggiunta dell'OE di *O. vulgare* (timolo 39,11%), sono risultati più contaminati dei frutti controllo. Ciò fa supporre che il film a base di *A. arborescens* possa essersi comportato come substrato di crescita per agenti fungini esterni. Il trattamento a base di ID (timolo 87,6%) invece, ha presentato un indice di deterioramento statisticamente significativo rispetto ai frutti controllo o trattati con *A. arborescens*, in quanto le lesioni ed i segni formati sull'epicarpo sono rimasti dall'inizio della contaminazione sino al termine della prova stessa, ben circoscritti. Inoltre, questo trattamento ha risposto positivamente ad entrambi i metodi *spraying* e *brushing*. Da questi risultati, seppure preliminari, si evince come si sia verificato un rallentamento della maturazione dei frutti di entrambi i trattamenti ed inoltre emerge in modo evidente come l>ID di origano potrebbe essere considerato un'alternativa promettente all'utilizzo di fungicidi di sintesi, per migliorare la sicurezza dei frutti di papaya estendendone la *shelf-life* in post-raccolta, evitando fenomeni di fitotossicità (2).

Bibliografia

(1) Farina V. *et al.* (2020) - Postharvest application of Aloe Vera gel-based edible coating to improve the quality and storage stability of fresh-cut Papaya. *Journal of Food Quality*, e8303140.

<https://doi.org/10.1155/2020/8303140>

(2) Poore J., Nemecek, T. (2018) - Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. Science, 360: 987.

Parole chiave. *Frutta tropicale, Sicilia, Carica papaya, Origanum vulgare, Idrolato, Olio essenziale, Post-raccolta*



Figura 1. Malattie fungine su frutti di papaya in postraccolta. (A) Sintomi da *Mucor* sp.; (B) Depressione dell'epicarpo con sviluppo di *Fusarium oxysporum*; (C) *Colletotrichum gloeosporioides*; (D) Micelio sull'epicarpo attribuito alla specie *Rhizopus stolonifer*; (E) Lesioni da *Alternaria alternata* (F) *Penicillium digitatum*; (G) Lesioni circolari da *Aspergillus* sp.

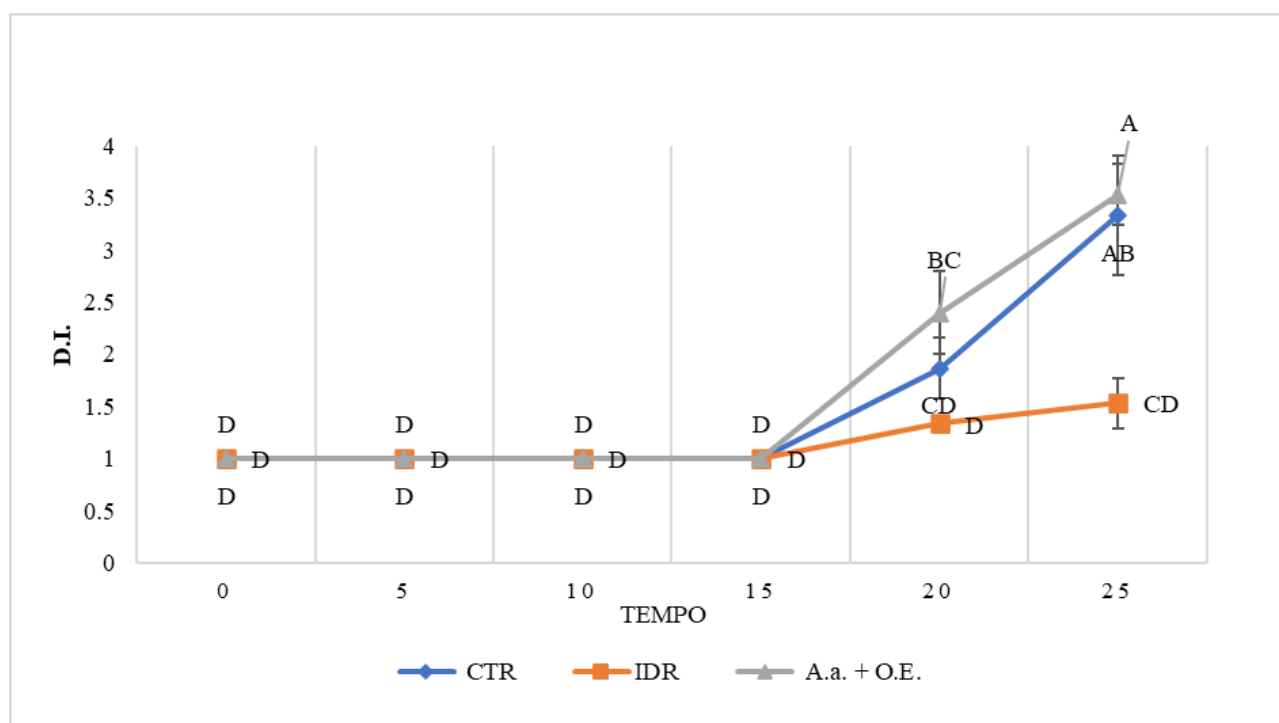


Figura 2. Indice di deterioramento (ID) calcolato nei frutti di *Carica papaya* L. nei due trattamenti idrolato di origano e *A. arborescens* Mill. coniugato all'olio essenziale di origano, rispettivamente (IDR e A.a. + OE) e nei frutti controllo (CTR). Le barre verticali rappresentano l'errore standard della media. Per ogni rilevamento, medie accompagnate dalla stessa lettera sono tra loro statisticamente non diverse per $p \leq 0.05$ (test di Tukey).

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno partecipato a questo lavoro di ricerca, primo fra tutti il Team con cui collaboro, del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali dell'Università di Palermo, in particolare il Professore Vittorio Farina, la Professoressa Alessandra Carrubba ed il Professore Livio Torta. Ringrazio allo stesso modo la Professoressa Maria Grazia Bellardi dell'Università di Bologna, il Professore Gianfranco Romanazzi dell'Università Politecnica delle Marche e i Dottori Marco Michelozzi e Gabriele Concetti del CNR di Sesto Fiorentino, per la loro disponibilità nelle analisi della caratterizzazione chimica dell'olio essenziale e il suo corrispettivo idrolato di Origano. Infine, ringrazio l'imprenditore Gandolfo Filippone per averci fornito gentilmente il materiale vegetale necessario per la sperimentazione.

Effetti dell'idrolato *Monarda didyma* L. nella lotta al fitopatogeno *Drosophila suzukii*

L. Benetti¹, L. Finetti², M. G. Bellardi³, M. L. Dindo³, G. Bernacchia¹

¹Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia

²Dipartimento di Biologia, Università di Toronto Mississauga, Mississauga, Canada

³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari, Università di Bologna, Bologna, Italia
e.mail: bntlnz@unife.it

Drosophila suzukii (Matsumura) è un insetto fitopatogeno originario dell'Asia che si è diffuso rapidamente anche in Europa (1) creando notevoli perdite economiche colpendo colture di piccoli frutti (come uva, more, ciliegie) maturi o prossimi alla maturazione. Gli attuali approcci di difesa non sono sufficienti o facilmente applicabili, per cui è necessario studiarne di nuovi. Una possibile soluzione viene offerta dalla componente terpenica degli estratti vegetali, in particolare quelli ottenuti da piante della famiglia delle Lamiaceae hanno mostrato un promettente effetto tossico (2).

In questo studio sono stati valutati gli effetti dell'idrolato della pianta aromatica *Monarda didyma*, prodotto secondario ottenuto nell'estrazione dell'olio essenziale, sul fitopatogeno *D. suzukii*. L'idrolato di *M. didyma* è stato ottenuto tramite idro-distillazione da foglie e steli e, tramite gascromatografia, è risultato essere composto in larga parte da carvacrolo (59.20%) e timolo (38.50%). Il prodotto non ha mostrato nessun effetto tossico fumigante contro *D. suzukii* adulte mantenute su una dieta artificiale mentre è risultato possedere un effetto tossico per contatto (Torre di Potter), con una LC₅₀ a 48h pari a 5.03 µL mL⁻¹. Test di sopravvivenza su *D. suzukii* adulte hanno inoltre evidenziato un effetto tossico nel lungo periodo accompagnato da un incremento nell'espressione di geni detossificanti, valutato attraverso qPCR. L'idrolato ha inoltre dimostrato un effetto negativo sia sul consumo di cibo (aggiungendo 100 e 1000 µL mL⁻¹ di idrolato di *M. didyma* nella dieta *D. suzukii*), sia sulla deposizione di uova da parte delle femmine.

In Letteratura è documentata la suscettibilità di *D. suzukii* verso composti volatili come carvacrolo e timolo (2) largamente presenti negli oli estratti dalle parti aeree delle piante della famiglia delle Lamiaceae. La caratterizzazione dell'idrolato, tramite gascromatografia, mostra una composizione molto simile all'olio essenziale, anche se in concentrazioni molto più basse. Questo spiega gli effetti tossici contro *D. suzukii* osservati solo tramite applicazione topica dell'idrolato con una LC₅₀ piuttosto bassa. D'altro lato il prodotto mostra una tossicità che persiste significativamente nell'arco di due settimane accompagnata anche da alterazioni nel consumo di cibo e nella deposizione di uova, indicando un effetto di deterrenza e repellenza. Dal punto di vista genico abbiamo osservato un aumentato livello di espressione di geni appartenenti alla famiglia delle GST e P450, implicati nei sistemi di detossificazione verso xenobiotici o pesticidi di sintesi. Questo studio ha evidenziato come l'idrolato di *M. didyma* abbia effetti negativi sul fitofago *D. suzukii*, suggerendo un possibile impiego nella difesa delle colture, anche in associazione ad altri sistemi di controllo.

Bibliografia

- (1) Cini A., Ioriatti C., Anfora G. (2012) - A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. Bull. Insectol. 65: 149-160. doi.org/10.1007/s10340-016-0746-7
- (2) Park C.G., Jang M., Yoon K.A., Kim J. (2016) - Insecticidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of Lamiaceae plant essential oils and their major components against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). Ind. Crops Prod. 89: 507-513 doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.008

Parole chiave. Idrolato, Oli essenziali, Monoterpeni, *Monarda didyma*; *Drosophila suzukii*, Biopesticida

Oli essenziali per la protezione delle piante ortive da patogeni trasmessi per seme

Essential oils for protection of vegetable crops by seedborne pathogens

M. Moumni¹, M.B. Allagui², K. Mezrioui¹, H. Ben Amara²
and G. Romanazzi¹

¹Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Marche Polytechnic University,
Ancona, Italy

²Laboratory of Plant Protection, National Institute for Agronomic Research of Tunisia, University
of Carthage, Tunis, Tunisia
e-mail: m.moumni@staff.univpm.it

Seed can be contaminated or infected with various types of disease, such as fungi, bacteria, viruses, and nematodes. This association between seeds and pathogens is an important means for the pathogens to spread on a large scale and a way to guarantee their survival in nature. Seedborne pathogens can limit the production of many crops and can result in severe economic losses to growers. Sowing healthy seeds is essential to improve crop yields and increase food production (1). Seed treatments with antimicrobials represent a crucial and important step for reduction of seed infections (2). The growing demand for healthy, and higher quality agricultural products has led producers to look for innovative control methods compatible with sustainable agriculture (3). For these reasons, research trend moves toward investigation of alternative products that are less toxic and environmentally friendly. Natural organic compound, such as essential oils, are among the alternatives that are being developed and tested to control many seedborne pathogens. Essential oils contain a wide range of volatile molecules, including mostly secondary metabolites, which possess several biological activities compounds—antibacterial, fungicidal, and nematicidal. The antifungal activity of seven essential (two *Origanum majorana*, *Lavandula dentata*, *Lavandula hybrida*, *Melaleuca alternifolia*, *Laurus nobilis*, and *Cymbopogon citratus*) have been studied by tests performed *in vitro* and *in vivo* conditions. Both assays showed that the essential oils are effective to reduce multiple pathogens on squash seeds (Fig. 1 and Tab. 1). The *C. citratus* essential oil increased seedling emergence and reduced the incidence of *Stagonosporopsis cucurbitacearum* in plantlets, and thus define their potential use for seed decontamination in integrated pest management and organic agriculture. The success of the application of such nonchemical alternatives requires an integrated approach that involves the combination of multiple control strategies according to the localization of the pathogen on the seeds. These methods of alternative strategies now need to be further developed as relevant pest management tools for sustainable agricultural production.

Bibliography

- (1) Ayesha M.S., Suryanarayanan T.S., Nataraja K.N., Prasad S.R., Shaanker R.U. (2021) - Seed treatment with systemic fungicides: time for review. *Frontiers in Plant Science*, 12: 654512.
- (2) Orzali L., Valente M.T., Scala V., Loreti S., Pucci N. (2020) - Antibacterial activity of essential oils and *Trametes versicolor* extract against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* for seed treatment and development of a rapid *in vivo* assay. *Antibiotics*, 9: 628.
- (3) Romanazzi G., Orçonneau Y., Moumni M., Davillerd Y., Marchand P. A. (2022) - Basic substances, a sustainable tool to complement and eventually replace synthetic pesticides in the management of pre and postharvest diseases: reviewed instructions for users. *Molecules*, 27: 3484.

Keywords. Essential oils, Seedborne pathogens, *Stagonosporopsis Cucurbitacearum*, Sustainable agricultural

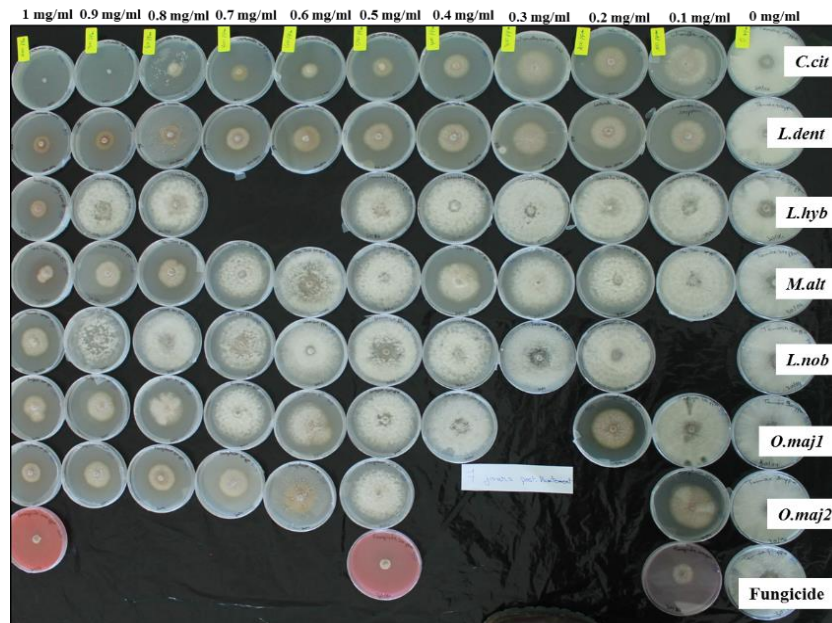


Figure 1. Representative experiment showing inhibition of *Stagonosporopsis cucurbitacearum* mycelial growth by the seven essential oils: C.cit, *Cymbopogon citratus*; L.dent, *Lavandula dentata*; L.hyb, *Lavandula hybrida*; M.alt, *Melaleuca alternifolia*; L.nob, *Laurus nobilis*; O.maj1/2, *Origanum majorana* 1/2, at increasing concentrations (right to left; as indicated) from 0 mg/mL (control) to 1 mg /mL, and by the fungicide combination of 25 g/L difenoconazole plus 25 g/L fludioxonil (positive control) at 0.1, 0.5 and 1 mg/mL, after 7 days of incubation at $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Treatment/ essential oil	Germination (%)	Radicle length (cm)	Incidence of seed infection (%)	
			<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Control ^a	85±1.4 ^a	20.9±0.7 ^b	16.1±2.3 ^a	9.3±1.8 ^a
<i>C. citratus</i>	86±1.9 ^a	21.0±0.9 ^b	4.5±0.9 ^b	1.1±0.5 ^c
<i>L. dentata</i>	86±1.7 ^a	15.0±0.7 ^c	5.2±1.2 ^b	1.0±0.4 ^c
<i>L. hybrida</i>	85±2.2 ^a	16.0±0.6 ^c	4.3±0.9 ^b	2.3±0.8 ^c
<i>M. alternifolia</i>	85±2.4 ^a	13.7±0.7 ^c	3.9±1.2 ^{bc}	1.7±0.6 ^c
<i>L. nobilis</i>	86 ±1.9 ^a	15.5±0.6 ^c	5.3±1.1 ^b	1.0±0.4 ^c
<i>O. majorana</i>	87±1.5 ^a	20.5±0.9 ^b	5.0±1.3 ^b	2.7±0.7 ^c
<i>O. majorana</i>	85±1.4 ^a	15.1±0.7 ^c	2.5±0.7 ^{bc}	1.2±0.5 ^c
Fungicide ^b	75±2.2 ^b	26.0±1.1 ^a	0.2±0.2 ^c	0.0±0.0 ^c
Significance (p)	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a seeds immersed in 0.1% Tween 20

^b25 g/L difenoconazole + 25 g/L fludioxonil

Data are means ±SE (n = 20; 10 seeds/treatment). Means with different letters are significantly different between treatments (down columns) ($p \leq 0.05$; Fisher's LSD)

Table 1. Effects of the seven essential oils at 0.5 mg/mL and the fungicides on seed germination, radicle length, and incidence of seed infections by the individual fungi.

Recenti sviluppi degli oli essenziali come strumento di difesa sostenibile in agricoltura

M. Ricupero^{1*}, A. Biondi¹, G. Siscaro¹, O. Campolo², V. Palmeri², L. Zappalà¹

¹Università degli Studi di Catania, Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, Catania, Italia

²Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, Dipartimento di Agraria, Reggio Calabria, Italia

*e.mail: michele.ricupero@unict.it

Si stima che la popolazione mondiale sia pari a 7,7 milioni di persone e una crescente domanda di cibo rappresenta la principale sfida dell'agricoltura dei prossimi anni. D'altra parte, la produzione agricola è minacciata dalla costante insorgenza di parassiti a causa dell'elevata richiesta energetica per incrementare la produzione, degli intensi flussi commerciali che facilitano l'ingresso di specie aliene invasive e, non in ultimo, del riscaldamento globale che ne amplifica la diffusione (1).

Gli insetti sono fra i più temuti parassiti delle piante e vengono comunemente controllati con insetticidi di origine sintetica. Tuttavia, l'impiego eccessivo di queste sostanze causa molteplici effetti secondari come l'incremento dei costi di produzione, la degradazione ambientale e i rischi alla salute dell'uomo (2,3). Di conseguenza, negli ultimi anni l'opinione pubblica e le legislazioni nei Paesi Sviluppati di tutto il globo promuovono e richiedono metodi di controllo sempre più sostenibili (4). Recenti progressi scientifici hanno permesso di isolare sostanze di origine naturale ritenute più sicure per l'uomo e l'ambiente le quali rappresentano una valida alternativa agli insetticidi di sintesi. Fra gli estratti vegetali, gli Oli Essenziali (OE) rappresentano uno strumento molto promettente per il controllo degli insetti dannosi alle piante poiché evidenze scientifiche dimostrano ampiamente la loro efficacia (5). Inoltre, gli OE in molti casi possono essere facilmente ottenuti da colture specializzate o dall'industria alimentare come scarto da riutilizzare. Tuttavia, gli OE come estratti grezzi possono determinare tossicità variabile, degradarsi in tempi diversi e persino danneggiare le piante trattate (6). Ciononostante, questi inconvenienti possono essere mitigati attraverso lo sviluppo e l'applicazione di nuove formulazioni. Infatti, l'inclusione degli OE in nano-particelle può limitare significativamente i fenomeni di degradazione, migliorare la stabilità chimica e ridurre la dose di applicazione (7).

In questo contesto, è stata valutata in laboratorio attraverso differenti modalità di applicazione l'efficacia di nanoformulazioni di OE di essenze mediterranee appartenenti a diverse famiglie botaniche (Apiaceae, Asteraceae, Liliaceae e Lamiaceae) nei confronti dei principali insetti dannosi alle Solanaceae in ambiente protetto. Fra gli insetti dannosi, sono state saggiate specie aventi differenti strategie di alimentazione come la Tignola del pomodoro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), e l'afide del cotone, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). Gli effetti non-target dei nano-formulati a base di OE sono stati poi studiati sia sulle piante che sui principali nemici naturali dei fitofagi saggiati in precedenza. In particolare, sono stati valutati la fitotossicità e gli effetti letali e subletali sugli antagonisti naturali associati come *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) e *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae). In aggiunta, considerato che l'impatto degli OE sui sistemi di difesa delle piante e sulle reti trofiche ad esse associate è ancora poco noto, è stato anche valutato in laboratorio l'effetto di alcuni OE sulle difese delle piante e il loro impatto sulle principali reti trofiche dei sistemi colturali considerati. Esperimenti basati sulla risposta olfattiva del parassitoide *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) hanno permesso di selezionare gli OE di aglio (*Allium sativum*) e menta (*Mentha piperita*) fra i diversi saggiati. Successivamente, le risposte comportamentali ai volatili emessi dalle piante precedentemente esposte agli OE prescelti sono state studiate per alcuni fitofagi e i rispettivi nemici naturali. Contestualmente, è stato misurato il livello di espressione dei principali geni coinvolti nella difesa delle piante trattate.

Tutti gli OE testati hanno causato una mortalità significativa dei fitofagi saggiati rispetto al controllo, e le concentrazioni letali stimate variavano significativamente. La variabilità ottenuta può essere

dovuta sia alla diversa composizione delle sostanze attive testate sia alla specie saggiata. Le formulazioni hanno mostrato una tossicità diversa nei confronti dei nemici naturali rispetto alle specie bersaglio, probabilmente a causa della diversa via di esposizione o alla distinta sensibilità della specie. Gli OE di finocchio (*Foeniculum vulgare*) e anice (*Pimpinella anisum*) hanno causato una mortalità significativa su *T. absoluta*. L'aglio è risultato il più efficace degli OE nel contenimento di *A. gossypii* ma il meno selettivo verso gli antagonisti naturali. Gli OE di aglio e menta, testati a differenti concentrazioni, hanno causato molteplici risposte comportamentali nei fitofagi e nei nemici naturali saggiati. L'analisi dell'espressione genica ha evidenziato l'attivazione delle vie metaboliche coinvolte nella difesa nelle piante trattate con gli OE. Seppur trascurabile, è stato registrato un effetto fitotossico di entità variabile nel tempo fra i vari OE saggiati.

I risultati ottenuti confermano l'efficacia degli OE su insetti fitofagi di interesse agrario e dimostrano che gli OE possono stimolare l'induzione delle difese delle piante mediando molteplici effetti sulle reti trofiche associate. Tali risultati potrebbero quindi servire come base per lo sviluppo futuro di strategie fitosanitarie nel quadro della gestione integrata dei parassiti delle piante. Pertanto, risulta cruciale continuare ad investigare sull'efficacia e sulla selettività di nanoformulazioni di OE estratti da altre specie vegetali ed i possibili effetti che ne potrebbero conseguire sull'induzione di difesa delle piante e l'intero sistema trofico in condizioni di campo. Nel complesso, appare evidente come gli OE si prestino alla promozione di una produzione alimentare sostenibile sia per il basso impatto che hanno sull'uomo e sull'ambiente, nonché per la progressiva riduzione dell'uso dei pesticidi sintetici che ne potrà conseguire a seguito del potenziale incremento del loro impiego.

Bibliografia

- (1) Hulme P.E., Bacher S., Kenis M., Klotz S., Kühn I., Minchin D., *et al.* (2008) - Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *Journal of Applied Ecology*, 45(2): 403-414.
- (2) Desneux N., Decourty, A., Delpuech J.M. (2007) - The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52: 81-106.
- (3) Kim K.H., Kabir E., Jahan S.A. (2017) - Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the total environment*, 575: 525-535.
- (4) Wesseler J. (2019) - Perspective: Regulation of pest and disease control strategies and why (many) economists are concerned. *Pest Management Science*, 75(3): 578-582.
- (5) Regnault-Roger C., Vincent C., Arnason J.T. (2012) - Essential oils in insect control: low-risk products in a high- stakes world. *Annual review of entomology*, 57: 405-424.
- (6) Isman M.B. (2017) - Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. *Industrial Crops and Products*, 110: 10-14.
- (7) Campolo O., Cherif A., Ricupero M., Siscaro G., Grissa- Lebdi, K. Russo, A., *et al.* (2017) - Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. *Scientific Reports*, 7(1): 130-36.

Parole chiave. Controllo biologico, Effetti secondari, Nanoemulsione, IPM, Sostenibilità

Attività biologica di bio-insetticidi a base di olio essenziale di aglio, nei confronti di *Tuta absoluta* Meyrick

G. Giuliano*, I. Latella, A. Modafferi

Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, Dipartimento di Agraria, Reggio Calabria, Italia

*e.mail: gaetano.giuliano@unirc.it

Introduzione. Le conseguenze eco-tossicologiche, ambientali e sociali dell'uso diffuso e spesso indiscriminato degli insetticidi di sintesi in agricoltura, hanno indotto i ricercatori a trovare alternative più sostenibili rispetto ai pesticidi convenzionali. Tra le soluzioni alternative, gli estratti botanici, ed in particolare gli oli essenziali (OE), stanno ricevendo una significativa attenzione da parte dei ricercatori e dei consumatori. Gli OE, grazie alla loro ampia diffusione in tutto il globo, la relativa economicità, la rapida degradazione e la provata attività biocida, sembrano i candidati perfetti per lo sviluppo di formulazioni insetticide innovative ed ecosostenibili (1).

L'obiettivo della sperimentazione era quello di sviluppare e testare una formulazione insetticida a base di OE di aglio (*Allium sativum* L.), nei confronti del lepidottero minatore *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), il quale, pur essendo una specie oligofaga, che attacca principalmente il pomodoro, è considerata, in virtù dell'importanza economica del suo ospite, una specie di primaria importanza.

Materiali e metodi. Le attività sperimentali hanno previsto: i) lo sviluppo di una nano-formulazione a base di OE di aglio; ii) la valutazione dell'attività ovicida e iii) l'attività biologica nei confronti delle larve del gelechide. Lo sviluppo della nano-formulazione insetticida è stato effettuato utilizzando la metodologia sviluppata da Campolo *et al.*, (2). La procedura prevedeva la miscelazione di 15g di OE di aglio con 5g di Tween 80® per 30 minuti impiegando un agitatore magnetico (7.000 RPM). Successivamente, alla miscela ottenuta, veniva aggiunta lentamente (1mL x min⁻¹) acqua distillata (80g). Dopo un'agitazione di tre ore (7.000 RPM), l'emulsione ottenuta veniva sottoposta a tre cicli di sonicazione (100 W per 90 s). La dimensione delle particelle (nm) e la loro carica superficiale (potenziale Zeta) sono state misurate impiegando lo strumento Zetasizer Nano (Malvern®).

La valutazione dell'attività ovicida ha previsto la valutazione dell'efficacia di 5 concentrazioni (3-0,18%) di OE e un trattamento di controllo (solo acqua). Ogni trattamento è stato replicato 5 volte impiegando, per ogni replica, 10 uova deposte da meno di 48h. Gli adulti del lepidottero venivano liberati all'interno di una gabbia di allevamento, in poliestere (Bugdorm®), contenente piante di pomodoro e lasciati ovideporre per due giorni. Le piante contenenti le uova, spruzzate fino al punto di gocciolamento, sono state fatte asciugare all'aria. Le uova necessarie per le sperimentazioni sono state trasferite su foglioline di pomodoro non trattate alloggiare in piastre Petri contenenti agar. Quotidianamente veniva annotato il numero di uova schiuse e le mine prodotte dalle larve neonate.

L'attività larvicida della formulazione sviluppata è stata verificata testando, invece, 8 concentrazioni (1,25-0,15%) di OE e un trattamento di controllo (solo acqua), impiegando, per ognuna delle 5 repliche, 3 larve di seconda età. Per ogni concentrazione testata, le foglie di pomodoro venivano trattate per immersione e dopo asciugatura all'aria, il picciolo delle stesse veniva inserito in una piastra Petri contenente agar. Successivamente le larve venivano trasferite sulle foglie e la mortalità, nonché la presenza di mine fogliari, venivano registrate dopo 24 e 48 ore dal trattamento.

Risultati. La nano emulsione sviluppata presentava una dimensione media delle particelle di 141,0 ± 1,375 nm, valori di PdI di 0,146 ± 0,009 e una carica superficiale di -27,4 ± 1,91 mV; durante le sperimentazioni nessuna separazione delle fasi è stata evidenziata.

L'attività ovicida della formulazione sviluppata evidenziava come lo stadio di uovo era meno suscettibile rispetto alle larve. Infatti, solo a partire dalla dose dello 0,75% di OE contenuto nella formulazione, veniva registrata una mortalità delle uova superiore al 50%. L'effetto della formulazione sulla capacità delle larve neonate di scavare le mine all'interno del mesofillo si manifestava a partire dalla dose di OE dell'1,5%.

L'azione biocida della formulazione sviluppata nei confronti delle larve evidenziava un andamento della mortalità dose-dipendente che si adattava al modello Probit (3). La dose di OE necessaria per uccidere il 50% della popolazione trattata (LC₅₀) era dello 0,47% (intervallo di confidenza 0.39-0.53) mentre, la LC₉₀ raggiungeva la dose dello 0,84% (intervallo di confidenza 0.70-1.10).

Discussione e conclusioni. I dati ottenuti dalla sperimentazione evidenziano le potenzialità dell'uso dell'OE di aglio nella formulazione di insetticidi di origine botanica. Le uova del gelechide sono risultate meno suscettibili all'azione della formulazione rispetto alle larve. La minore suscettibilità di

questo stadio è imputabile, probabilmente, all'azione protettiva del corion che protegge l'embrione dall'azione insetticida degli OE (4). La capacità dei trattamenti effettuati di esplicare un'azione residuale nei confronti delle larve nate dalle uova trattate, lascia aperte nuove prospettive di indagini in merito all'impiego della formulazione sviluppata.

L'attività larvicida, invece, suggerisce una elevata potenzialità dell'impiego di questo OE, opportunamente formulato, in programmi di controllo biologico e/o integrato tenendo in considerazione, però, anche gli effetti nei confronti degli organismi non target (5).

Bibliografia

- (1) Shivkumara K.T., *et al.* (2019) - Botanical insecticides; prospects and way forward in India: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(3): 206-211.
- (2) Campolo O., Cherif A., Ricupero M., Siscaro G., Grissa-Lebdi K., Russo A., *et al.* (2017) - Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. *Scientific reports*, 7(1): 13036.
- (3) Finney D.J. (1947) - Probit analysis; a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge: Cambridge University Press, (University of Oxford, Oxford, England).
- (4) Passos L.C., Ricupero M., Gugliuzzo A., Soares M.A., Desneux N., Campolo O., *et al.* (2022) - Sublethal effects of plant essential oils toward the zoophytophagous mirid *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Pest Science*, 95: 1609-1629.
- (5) Shivkumara, K. T. (2019) - Botanical insecticides; prospects and way forward in India: A review. *Journal of Entomology and Zoology studies*, 7(3), 206-211.

Parole chiave. Oli essenziali, *Tuta absoluta*, Pomodoro, Bio-insetticidi

Premiazione S.I.R.O.E. di due Giovani Ricercatori



La Giuria scientifica composta dalla Dott.ssa Francesca Mondello, dal Dott. Hedayat Bouzari, dal Prof. Sebastiano Delfine e dalla Dott.ssa Annarita Stringaro ha conferito il Primo Premio del valore di 600 Euro (messi a disposizione dalla Prof.ssa Maria Grazia Bellardi, Università di Bologna), alla

*Dott.ssa **Melinda Mariotti** (Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma) che ha presentato la relazione:*

‘Formulazione di smalto “green” e oli essenziali per la prevenzione e cura delle onicomicosi’



Nelle foto: la Dott.ssa Francesca Mondello, Presidente SIROE, premia la vincitrice Dott.ssa Melinda Mariotti.

*Il secondo premio del valore di 400 Euro è stato conferito alla Dott.ssa **Damiana Scuteri** (Università della Calabria, Cosenza) che ha presentato la relazione:*

‘Basi razionali per la traslazione clinica dell’olio essenziale di bergamotto’