



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA
(DAFNE)**

Via S. Camillo De Lellis snc - 01100 Viterbo
Tel. 0761 357554 - Fax 0761 357558
Email: s_dafne@unitus.it

Viterbo, 22 Giugno 2011

**All'Att.ne Egr Dr. F. RIVA
Ufficio Agricoltura Biologica MIPAAF
Via XX Settembre 20
00185 Roma**

**Oggetto: Progetti di Ricerca e supporto tecnico in Agricoltura Biologica "BIOFORMULATI
AD ATTIVITA' ANTIMICROBICA" "BBB: BIO BUG BANG" ID 12. 1a
Relazione.**

In riferimento all'oggetto della presente, si allega documentazione inerente le attività ad oggi sviluppate dalle Unità Operative (UU.OO 1-4) impegnate nel progetto.

Il Coordinatore Nazionale

Distinti saluti

Dr. Giorgio M. BALESTRA

Tel. 0761 357474, Fax 0761 357558, Cell. 333 4246404, Email 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**

Progetto di Ricerca

BIOFORMULATI AD ATTIVITA' ANTIMICROBICA

“BBB: BIO BUG BANG”

(Progetto PAN 2008-2009 2.2 - n° 12D/2010)

Oggetto: UO1, Relazione Tecnico-scientifica Ottobre 2010-Giugno 2011.

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

Nello specifico l'UO1, ha proseguito differenti prove di laboratorio su sostanze di origine naturale (estratti vegetali, oli essenziali) al fine di valutare le proprietà antimicrobiche (battericida/batteriostatica) in differenti rapporti di concentrazione rispetto ai patogeni di natura batterica (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) oggetto d'indagine e di saggiarne i diversi principi attivi. Durante il semestre in questione i saggi *in vitro* sono stati sviluppati applicando tecniche di laboratorio inerenti la batteriologia fitopatologia, in particolare la tecnica di diffusione tramite dischetti su substrati nutritivi agarizzati.

Dai risultati ad oggi conseguiti, si sta procedendo a concentrare l'attenzione su un numero più ristretto di sostanze di origine naturale inizialmente sottoposte a screening allo scopo di sviluppare con queste ultime ulteriori approfondimenti scientifici; in particolare, l'attenzione è stata rivolta nei confronti di alcuni oli essenziali (*Lavandula hybrida*, *Mentha piperita*) e di alcune sostanze di origine naturale (*Ficus carica*, *Punica granatum*).

Gli oli essenziali impiegati per la sperimentazione venivano utilizzati a varie concentrazioni, ottenute preparando un'emulsione in acqua distillata appena prima di procedere al dosaggio.

Gli estratti da sostanze naturali erano ottenuti da materiale vegetale fresco che veniva fatto essiccare in stufa alla temperatura di 50°C per alcuni

giorni; successivamente veniva finemente tritato utilizzando un comune “grinder” ad uso domestico e conservato al buio in un luogo fresco ed asciutto fino al momento dell'estrazione. Quest'ultima veniva effettuata preparando una soluzione alcolica con un rapporto foglie/etanolo pari a 1:1 (W:V).

Per il saggio della diffusione tramite dischetti venivano preparate delle sospensioni batteriche aventi una concentrazione di 10^6 ufc/ml; da ogni sospensione dei ceppi patogeni prescelti venivano prelevate aliquote di 100 μ l che erano distribuite uniformemente con una ansa di vetro sterile su piastre Petri contenenti NA. Al centro di ogni piastra veniva posizionato un dischetto sterile del diametro di 6 mm sul quale venivano disposti 15 μ l di ciascun estratto saggiato; le piastre inoculate sono state poste ad incubare in termostato a 25 ± 2 °C per 48-72 h. Eventuali aloni di inibizione formati venivano osservati e misurati con l'ausilio di uno stereoscopio e di una apposita scala graduata.

I saggi *in vitro*, effettuati in condizioni di sterilità, sono stati numericamente ripetuti al fine di poter validare i risultati conseguiti dal punto di vista statistico.

A questi primi risultati hanno fatto seguito ulteriori approfondimenti, sia in merito all'individuazione dei singoli componenti biochimici delle sostanze in esame sia per gli aspetti che riguardano il metodo di somministrazione in pieno campo.

Una prima prova preliminare in serra è stata effettuata per valutare l'efficacia dei microincapsulati a base di polimetilmetacrilati nel controllo di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst).

Sono state utilizzate piantine di pomodoro, cv. Pullrex Bio, di un mese di età; esse sono state poste in serra dove la temperatura veniva mantenuta a 25 ± 2 °C di giorno e 15 ± 2 °C di notte mentre l'umidità relativa è stata mantenuta tra il 70-80% per tutta la durata della prova.

I microincapsulati sono stati impiegati ad una concentrazione di 10 g/l mentre le sospensioni batteriche avevano una concentrazione di 10^5 ufc/ml; queste ultime venivano distribuite sulle piante di pomodoro con un vaporizzatore manuale fino ad ottenere una completa ed uniforme bagnatura delle pagine fogliari, mantenendo una distanza di circa 30 cm tra le foglie ed il vaporizzatore stesso. Nelle due ore precedenti e nelle due successive alla contaminazione,

l'umidità relativa è stata mantenuta circa al 90% per favorire l'apertura stomatica e quindi la penetrazione delle cellule batteriche all'interno degli organi vegetali.

I trattamenti fogliari con i microincapsulati sono stati effettuati, in via preventiva, 24 ore prima dell'inoculazione con il patogeno.

Dopo 1, 7 e 14 giorni dalla contaminazione artificiale, venivano effettuati i campionamenti delle foglie, le quali venivano raccolte a random e trasportate in laboratorio; qui erano sottoposte ad analisi allo scopo di stimare i valori della popolazione batterica di Pst presente sul filloplano delle piante in funzione dei differenti trattamenti effettuati.

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 (Fig. 1); 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%).

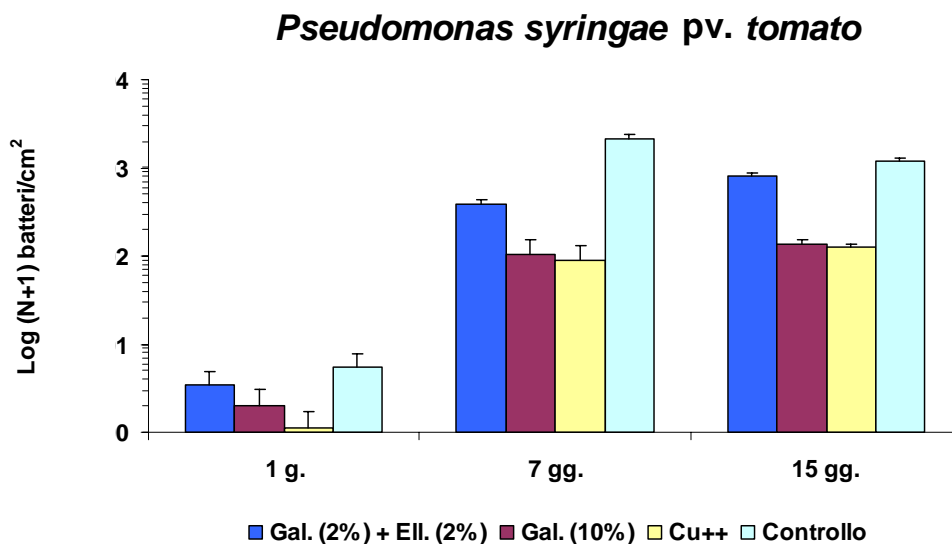


Fig. 1 - Dinamiche di popolazione di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* su foglie di pomodoro inoculate e sottoposte a trattamenti con i microincapsulati in esame.

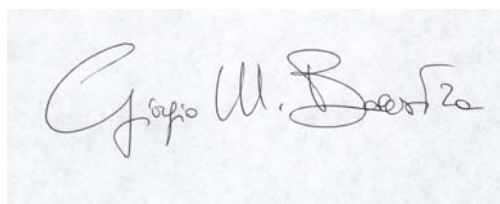
A questi primi risultati faranno seguito ulteriori approfondimenti; sono state allestite ulteriori prove volte a valutare l'efficacia dei microincapsulati a base di polimetilmetacrilati nel controllo di *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Pst) e *Pseudomonas syringae pv. actinidiae* (Psa). Nello specifico sono state allestite delle parcelle sperimentali in pieno campo per quanto riguarda il pomodoro, e delle prime prove su piantine di actinidia in serra.

Viterbo 26 Giugno 2011

Il Responsabile Scientifico dell'UO1

Dr. Giorgio Mariano BALESTRA

DAFNE (ex DIPROP) – UTUSCIA

A handwritten signature in black ink on a light blue background. The signature reads "Giorgio M. Balestra" in a cursive script.

Unità Operativa 2. Responsabile Prof. Antonio Tiezzi

In questo arco di tempo le attività di ricerca della Unità Operativa 2 sono state svolte in stretta connessione con l'Unità Operativa 1 ed orientate su due differenti tematiche:

- a) Determinazione quantitativa di acido gallico ed acido ellagico da buccia di melograno*
- b) Estratti di foglie di *Mirtus communis*: saggi in vitro di attività antibatterica*

Nel primo caso si è trattato di mettere a punto una procedura di determinazione quantitativa, aspetto di non facile realizzazione che soprattutto per l'acido ellagico ha richiesto molto tempo per la individuazione dei parametri analitici ed il reperimento delle colonnine cromatografiche necessarie; nel secondo caso saggi *in vitro* condotti con estratti di foglie di *Mirtus communis* hanno evidenziato attività antibatterica nei confronti di batteri PSA. Studi di natura chimica condotti per mezzo di procedure di cromatografia su strato sottile (TLC) e di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono in corso per la identificazione della molecola o del fitocomplesso responsabile dell'attività antibatterica.

a) Determinazione quantitativa di acido gallico ed acido ellagico da buccia di melograno

La determinazione della quantità di acido gallico ed ellagico è stata fatta utilizzando la cromatografia liquida ad alta pressione (HLPC) per mezzo dello strumento LC-10ATvp collegato al UV-VIS detector SPD-10Avp (Shimadzu Co, Kyoto, Japan).

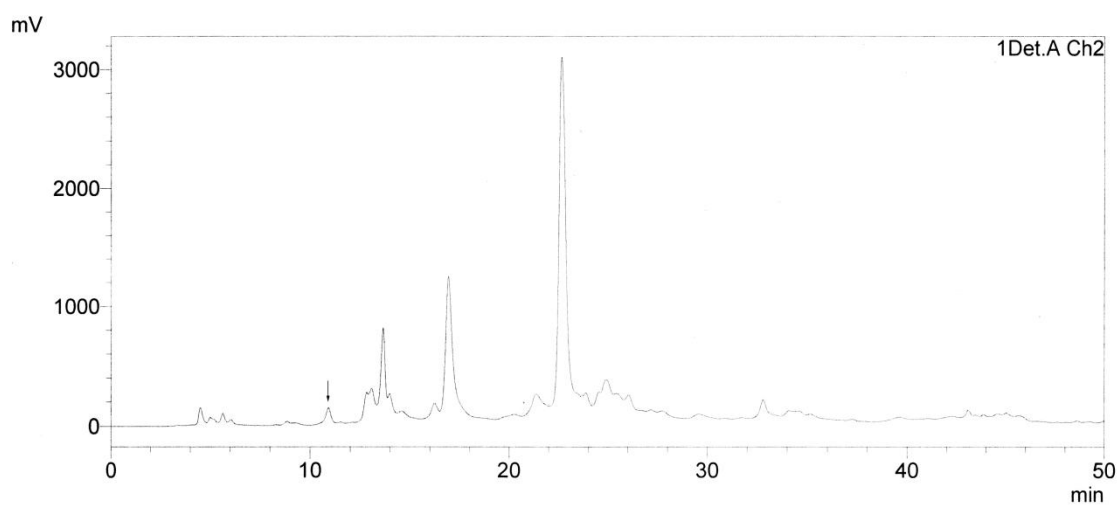
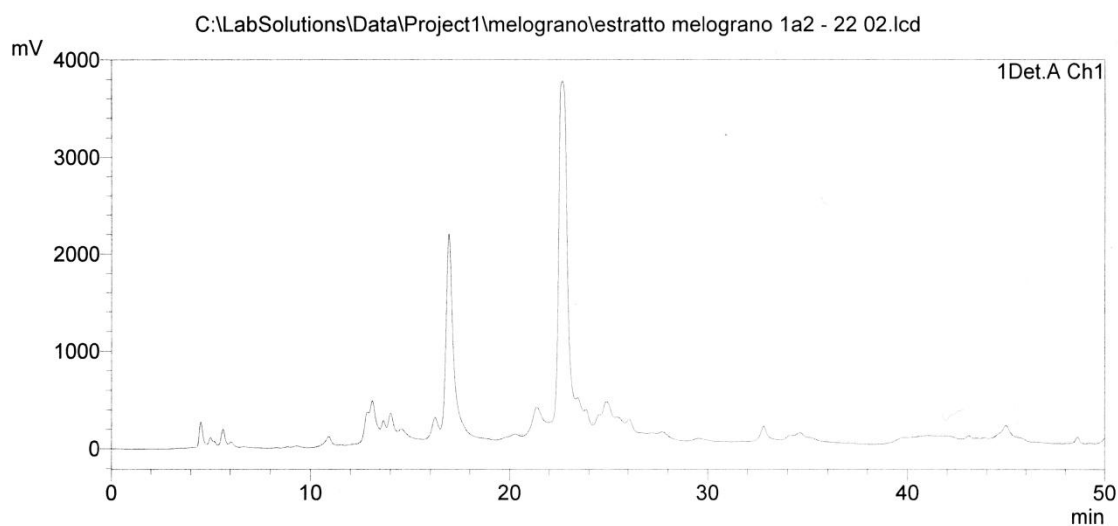
Il procedimento si basa sulla preparazione dell'estratto alcolico di buccia di melograno che comporta prima l'essiccazione e la completa disidratazione della buccia e quindi la successiva triturazione ed estrazione con alcool etilico per 24 ore.

Dopo centrifugazione il sopranatante ottenuto è stato filtrato e per la separazione molecolare dei vari costituenti sono state utilizzate due colonne: la colonna Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel GmbH & Co, KG) per la determinazione della quantità di acido gallico e la colonna Hypersil GOLD PFP (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) per la determinazione dell'acido ellagico. In entrambi i casi l'eluizione è stata fatta con la fase mobile costituita dal solvente A (2,5% di acido acetico in acqua) e dal solvente B (2,5% acido acetico in metanolo). L'eluizione è iniziata con il 100 % di A ed è rimasta isocratica fino a 5 minuti, poi aumentando progressivamente la concentrazione del solvente B si è arrivati fino ad una concentrazione pari al 100% di B in 50 minuti (Amakura et al., 2000; Gil et al., 2000; Mousavinejad et al., 2009). Dopo aver effettuate la curva di calibrazione per l'acido gallico (fig. 1) e per l'acido ellagico utilizzando i due standard relativi (Sigma) si è proceduto alla determinazione della quantità di queste due molecole all'interno dell'estratto, che sono risultate rispettivamente 0.012 mg/ml e 0.285 mg/ml.

Referenze

- Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y.. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A*, 896 (2000) 87–93
- Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Holcroft Deirdre M. and Kader A.A., Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4581-4589
- Mousavinejad G., Emam-Djomeh Z., Rezaei K., Hossein M., Khodaparast H., Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry* 115 (2009) 1274–1278.

Fig. 1

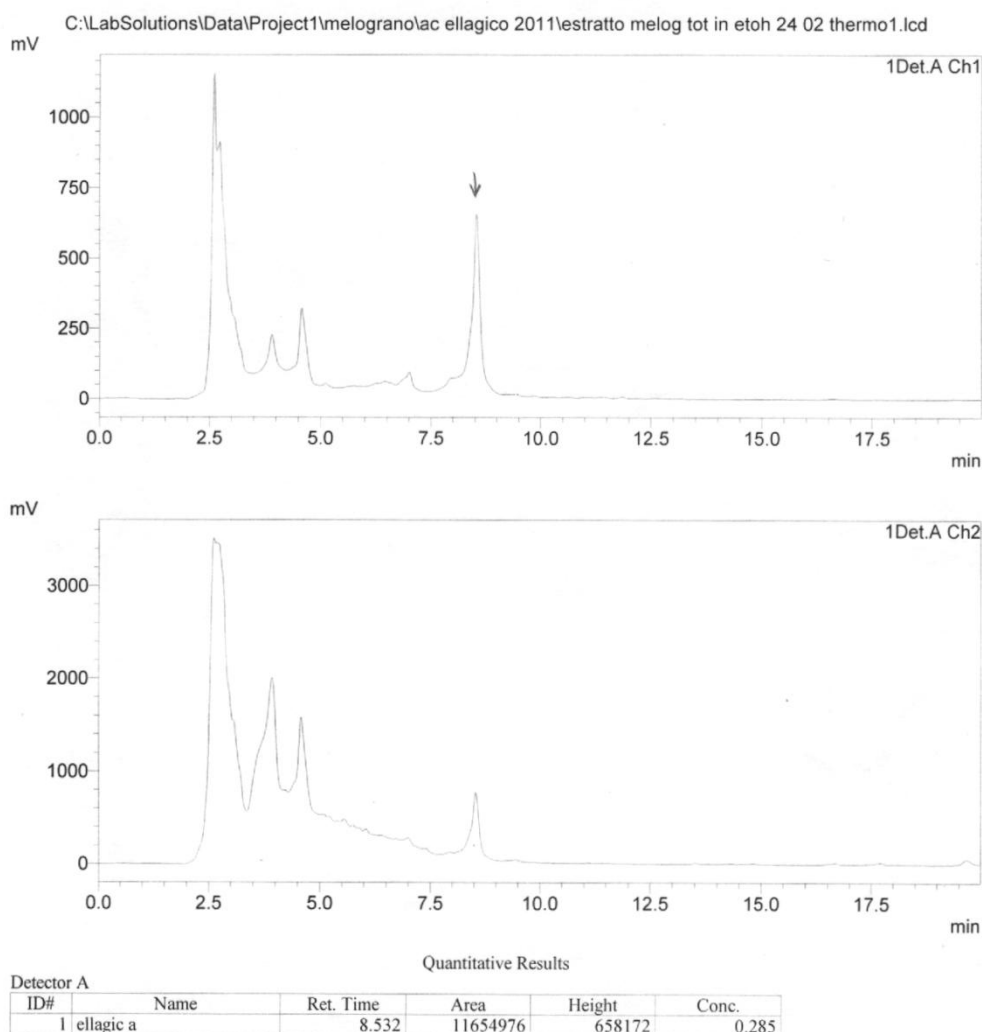


Quantitative Results

Detector A

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.
1	RT10.596	10.904	3336974	114660	0.006

Fig. 2



b) Estratti di foglie di *Mirtus communis*: saggi in vitro di attività antibatterica

Esperimenti sono stati condotti più volte sia nel periodo invernale che in primavera ed abbiamo appurato che solo nel periodo che prende inizio dalla tarda primavera è stato possibile riscontrare l'attività biologica oggetto del nostro studio.

Foglie di *Mirtus communis* raccolte presso strutture dell'Università della Tuscia di Viterbo sono state accuratamente lavate con acqua distillata, asciugate e pesate. Le foglie sono state poi sottoposte a processo di estrazione per 60 min. al buio a temperatura ambiente utilizzando come solvente alcool etilico. Dopo centrifugazione il soprannatante era sottoposto ad evaporazione dell'alcool per mezzo di flusso di azoto ed il residuo secco ripreso con acqua bidistillata. La soluzione era poi sterilizzata per mezzo di appositi filtri sterilizzatori e aliquote di differente volume di questa soluzione erano impiegate su filtri di cotone per l'effettuazione di spot test su piastre di agar sulle quali era stato previamente piastrato PSA. I risultati degli esperimenti sono riportati nell'allegata figura 1.

**PROGETTO ESECUTIVO PAN per l'Agricoltura Biologica e i Prodotti
Biologici 2008/2009 – Azione 2.2.
Unità operativa 03 - Università di Ferrara**

Bioformulati ad attività antimicrobica – BBB (Bio Bug Bang)

mese 06

Durante i primi 6 mesi 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 di alcuni batteri fitopatogeni attivi nei confronti di pomodoro e actinidia.

L'obiettivo è quello di progettare e produrre bioformulati microparticellari biocompatibili e/o biodegradabili in grado di preservare le molecole attive dall'ambiente circostante e di realizzare rilasci protratti e controllati nel tempo. I bioformulati potranno essere prodotti includendo una o più combinazioni/dosaggi delle molecole rivelatesi attive nell'inibire lo sviluppo dei batteri fitopatogeni oggetto di studio. In particolare tali sistemi sono impiegati per veicolare due molecole selezionate dalle UO1 e UO2, quali acido ellagico e acido gallico. I bioformulati che avranno dimostrato le migliori *performances* saranno selezionati per le prove della FASE 2.

Obiettivi del progetto sono:

- 1- Messa a punto del sistema analitico quali-quantitativo dei principi attivi utilizzati
- 2- Studio preformulativo per ottenere le condizioni standard di preparazione di bioformulati a base di polimetilmetacrilati o derivati della cellulosa
- 3- Produzione e caratterizzazione di bioformulati contenenti acido ellagico e/o acido gallico
- 4- Valutazione della resa di incapsulazione dei principi attivi nelle microsfeere prodotte
- 5- Determinazione *in vitro* della cinetica di rilascio delle molecole bioincapsulate

Risultati

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

Come molecole attive nei confronti di batteri fitopatogeni sono state selezionate per questo progetto acido ellagico e acido gallico.

L'acido ellagico (fig. 1A) è un composto polifenolico che si trova nelle piante sotto forma di tannino idrolizzabile (2,3,7,8-tetraidrossicromeno[5,4,3-*cde*]chromene-5,10-dione). È una molecola termodinamicamente stabile costituita da una porzione idrofobica rappresentata dai quattro cicli condensati tra loro e una porzione idrofila costituita da quattro gruppi fenolici e due gruppi lattonici.

L'acido gallico o acido 3,4,5-tri-idrossibenzoico (fig. 1B) è una sostanza naturale presente allo stato libero in alcune piante (melograno, tè, ecc.), ma può essere combinata sotto forma di glucoside o di tannino quale capostipite dei gallotannini (tannini idrolizzabili).

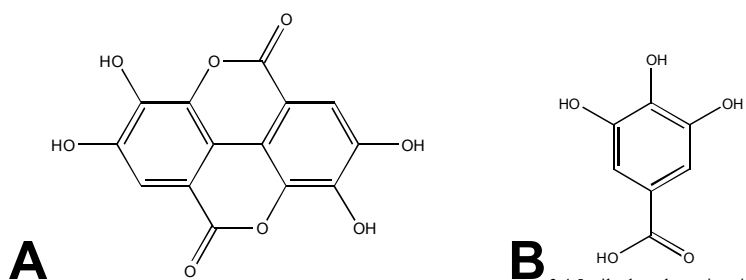


Figura 1: struttura chimica dell'acido ellagico (A) e dell'acido gallico (B)

Inizialmente è stata messa a punto la metodica analitica con cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) per la determinazione quantitativa del principio attivo.

L'apparato HPLC (Agilent mod. 1200) è costituito da un gradientatore interfacciato con una pompa a doppio pistone reciprocante (Jasco), un rilevatore con lampada UV a lunghezza d'onda variabile (Jasco) ed una valvola di campionamento Rheodyne mod. 7125 fornito di loop da 50µl.

E' stata utilizzata una colonna a fase inversa Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm) impaccata con particelle di 5 µm.

Per ogni analisi si sono iniettati 20 µl di soluzione standard prelevati utilizzando una microsiringa di precisione da 50µl (Hamilton, USA). Il software impiegato dal computer per l'elaborazione dei dati è fornito da Agilent technologies® (Chem station versione B 0201).

Acido gallico. Per la determinazione quali-quantitativa di acido gallico l'analisi HPLC è stata condotta utilizzando una fase mobile costituita da una miscela di acqua (85% v/v) e metanolo (15% v/v) addizionata di acido fosforico (0,1% v/v), un flusso 1 ml/min una lunghezza d'onda 210 nm. In queste condizioni il tempo di ritenzione dell'acido gallico è di 3,7 min.

Soluzione standard: soluzione acquosa di acido gallico (0,05 mg/ml).

Acido ellagico. Per la determinazione quali-quantitativa di acido ellagico l'analisi HPLC è stata condotta utilizzando una fase mobile costituita da una miscela di acqua (45% v/v) e metanolo (55 % v/v) addizionata di acido fosforico (0,1 % v/v), un flusso di 0.6 ml/min e una lunghezza d'onda di 254 nm. In queste condizioni il tempo di ritenzione dell'acido gallico è di 6,5 min.

Lo standard è stato ottenuto dissolvendo 4,5 mg di acido ellagico in 0,2 ml di NMP e 0.8 ml di metanolo diluendolo in metanolo alla concentrazione finale di 0,045 mg/ml.

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

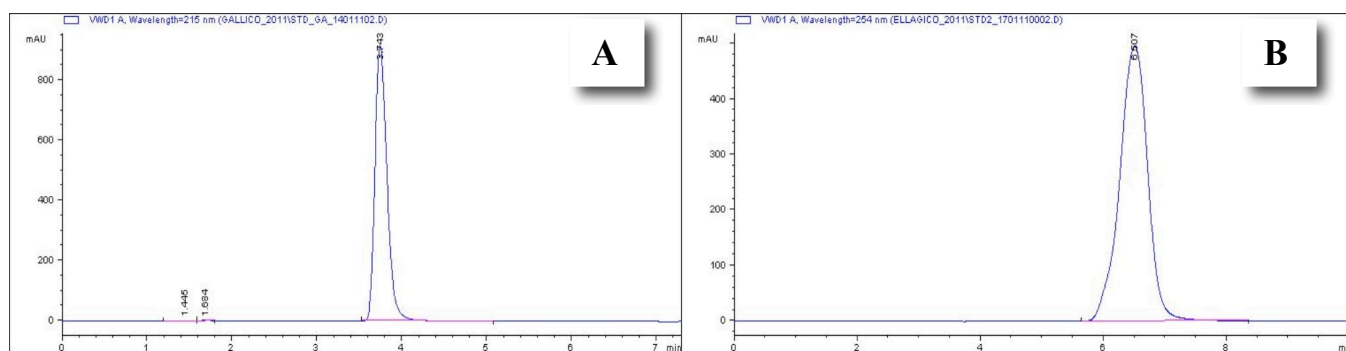


Figura 2: cromatogramma HPLC delle soluzioni standard di acido gallico (A) ed acido ellagico (B) ottenuti nelle condizioni sopra riportate

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

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

1- un polimero sintetico biocompatibile quale l'Eudragit® RS100, poli(trimetilammonioetil metacrilato cloruro).

2- due derivati della cellulosa quali l'idrossipropilmetilcellulosa ftalato (HPMCP) e l'etilcellulosa.

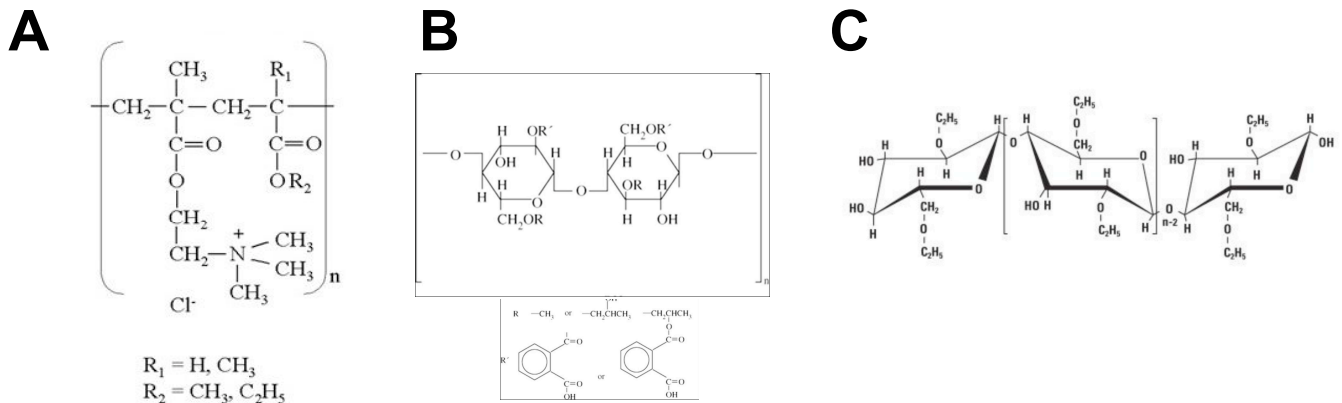


Figura 3: struttura chimica dei polimeri utilizzati.

A: Eudragit® RS. B: Idrossipropilmetilcellulosaftalato. C: Etilcellulosa

Eudragit® RS100, nome IUPAC poli(etilacrilato, metil metacrilato, trimetilammonioetil metacrilato cloruro), è un polimero biocompatibile di esteri acrilici e metacrilici con una percentuale di gruppi ammonici quaternari. Il suo peso molecolare si aggira attorno ai 150000 g/mol. Si tratta di una sostanza solida con un caratteristico odore di ammina.

L'Eudragit RS 100 è insolubile in acqua e in idrossido di sodio, mentre è solubile in solventi organici quali metanolo, etanolo, acetone e cloruro di metilene.

Ha la capacità di formare in acqua un film rigonfiabile grazie alla presenza di esteri metacrilici e della percentuale di cloruro di trietilammonioetil metacrilato.

Il gruppo ammonio quaternario determina il rigonfiamento del film e aumenta la solubilità del polimero in acqua; poiché la percentuale di questo gruppo all'interno dell'Eudragit RS è molto bassa, ne consegue che si ha un minimo rigonfiamento e i film del polimero risultano poco permeabili alle sostanze attive, garantendo rivestimenti continui con spessore adeguato di film polimerico tali da permettere il rilascio controllato di farmaci.

Idrossipropilmetilcellulosa ftalato (HPMCP) è un polimero semisintetico derivato dalla cellulosa ed in particolare è un estere ftalico della idrossipropilmetil cellulosa. Si presenta come una polvere bianca grossolana e inodore.

HPMCP è facilmente solubile in molti solventi organici ed in soluzioni acquose con pH inferiore a 5.0-5.5 ed è ampiamente utilizzato nell'industria farmaceutica per il rivestimento enterico.

Etilcellulosa è un polimero derivato dalla cellulosa, il principale polisaccaride e costituente del legno e di tutte le strutture vegetali. Il prodotto commerciale è ottenuto dal legno e poi etilato per via chimica. Si presenta come una polvere bianca, granuli inodore, ha una buona stabilità nei confronti della luce, calore, ossigeno ed umidità. È insolubile in acqua, ma solubile in solventi organici come eteri, alcoli, chetoni, esteri e idrocarburi.

I polimeri prescelti sono stati miscelati con alcuni tensioattivi e poi dissolti in miscele solventi con l'obiettivo di selezionare il miglior solvente per la dissoluzione del polimero e per migliorare la bagnabilità dei bioformulati da produrre.

Nel caso del derivato polimetacrilico, sono stati presi in considerazione due tensioattivi non ionici, quali Tween 80 (poliossietilen sorbitan monooleato, HLB 15) e Span 20 (sorbitan monolaurato, HLB 8,6).

Mentre per i derivati della cellulosa si sono considerati i seguenti tensioattivi non ionici: Tween 80 (poliossietilen sorbitan monooleato, HLB 15), Tween 21 (HLB 13,85), Span 20 (sorbitan monolaurato, HLB 8,6) e Span 80 (HLB 4,3).

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1.

TABELLA 1

POLIMERO	TENSIOATTIVO	MISCELA SOLVENTI	SOLUBILITÀ
Eudragit® RS100	Tween 80	Etanolo:acqua 95:5 v/v	+/-
Eudragit® RS100	Tween 80	Metanolo:acqua 95:5 v/v	+
Eudragit® RS100	Span 20	Etanolo:acqua 95:5 v/v	+
Eudragit® RS100	Span 20	Metanolo:acqua 95:5 v/v	+/-
HPMCP	Tween 80	Etanolo:Acetone 1:1v/v	+/-
HPMCP	Tween 21	Etanolo:Acetone 1:1v/v	+
HPMCP	Span 20	Etanolo:Acetone 1:1v/v	++
HPMCP	Span 80	Etanolo:Acetone 1:1v/v	+/-
Etccl	Span 20	Etanolo:Acetone 1:1v/v	+
Etccl	/	Etanolo	-
Etccl	Span 20	Etanolo	-
Etccl	Span 20	Etanolo:Cloroformio 3:1v/v	-
Etccl	Span 20	Etanolo:Cloroformio 2:1v/v	+/-
Etccl	Span 20	Etanolo:Cloroformio 1:1v/v	++

Per la solubilità : + solubile fino a 40 mg/ml; - insolubile; +/- soluzione torbida

La miscela Eudragit® RS100/Tween 80 risulta essere più solubile nella soluzione metanolo:acqua 95:5 v/v, a differenza della miscela miscela Eudragit® RS100/Span 20 che è invece più solubile nella soluzione etanolo:acqua 95:5 v/v.

Inoltre le miscele di HPMCP/Span 20, HPMCP/Tween 21, Etilcellulosa-Span 20 in Etanolo: Acetone 1:1 v/v e Etanolo:Cloroformio 1:1 v/v risultano essere le migliori.

Successivamente le miscele sono state essiccate 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.

In particolare il liquido di alimentazione viene atomizzato in goccioline finissime con un'elevata superficie specifica, l'aria calda fornisce alle goccioline calore latente di vaporizzazione con un conseguente rapido essiccamento che a sua volta provoca un rapido raffreddamento dell'aria essiccante.

Questo processo determina un essiccamento dello strato superficiale che impedisce al solido di surriscaldarsi, dimostrandosi adatto alla microincapsulazione di prodotti termolabili.

Il processo dello spray-dryer può essere suddiviso in quattro fasi:

1. atomizzazione del materiale di alimentazione tramite ugello nebulizzatore;
2. contatto delle goccioline con una corrente d'aria a temperatura controllata;
3. evaporazione del solvente dalle goccioline;
4. separazione e raccolta del solido ottenuto.

La rappresentazione schematica di uno spray-dryer è riportata in Figura 4.

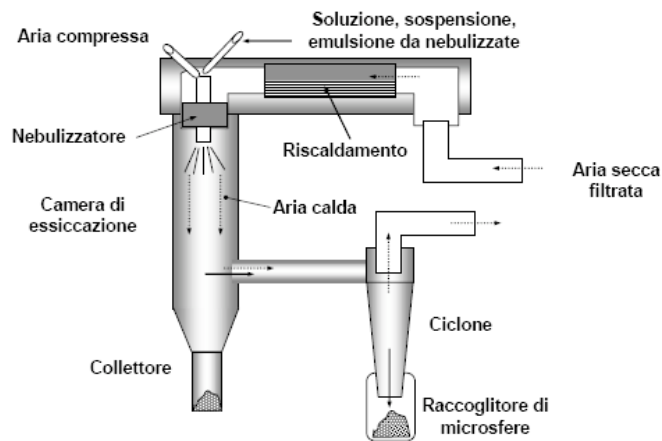


Figura 4: schema dei principali componenti dello spray-dryer

I principali componenti sono quindi: Nebulizzatore, Riscaldatore aria, Camera di essiccamento, Ciclone. L'utilizzo di questa tecnica presenta alcuni vantaggi, tra cui (a) rapida evaporazione del solvente che consente alle goccioline prodotte di mantenere la temperatura a valori inferiori della temperatura dell'aria essiccante e (b) possibilità di lavorare in condizioni asettiche.

L'essiccamento con spray-dryer delle miscele a base di Eudragit e dei derivati della cellulosa è stato effettuato utilizzando i seguenti parametri strumentali: $T^{\circ} = 120^{\circ}\text{C}$, Pump=20, Flow= 0,6 l/h Aspiration= 80%.

Le particelle ottenute sono state poi osservate al microscopio ottico (Figura 5 e Figura 6).

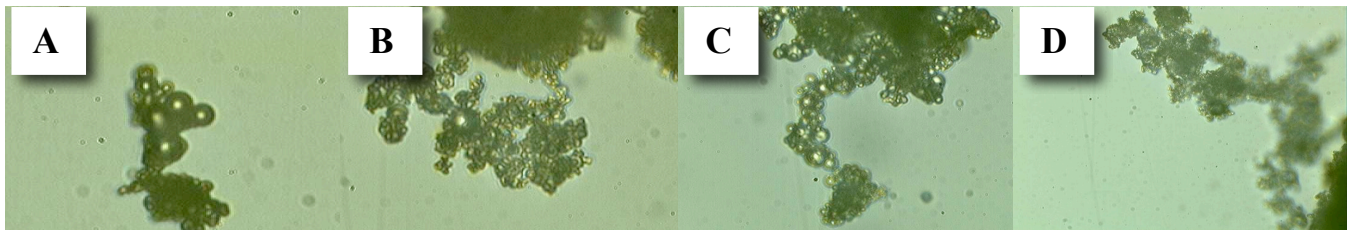


Figura 5: immagini delle microparticelle ottenute dalla miscela Eudragit[®] RS100/Span 20 in etanolo: acqua 95:5 v/v (A), Eudragit[®] RS100/Tween 80 in etanolo: acqua 95:5 v/v (B), Eudragit[®] RS100/Span 20 in metanolo:acqua 95:5 v/v (C) e Eudragit[®] RS100/Tween 80 in metanolo:acqua 95:5 v/v (D).

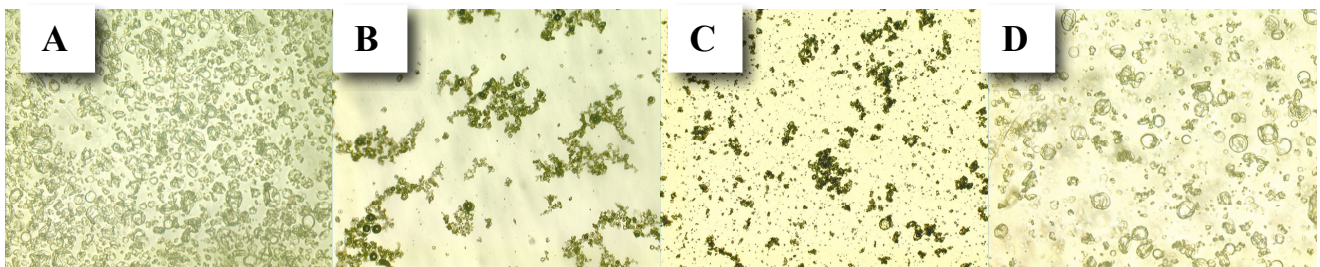


Figura 6: immagini delle microparticelle ottenute dalla miscela HPMCP/Span 20 (A), HPMCP/Tween 21 (B), Etilcellulosa/Span 20 in Etanolo:acetone 1:1 v/v (C), Etilcellulosa/Span 20 in Etanolo:Cloroformio 1:1 v/v (D).

Le microparticelle Eudragit[®] RS100/Span 20 ottenute dall'evaporazione della miscela etanolo: acqua 95:5 (v/v) risultano abbastanza sferiche, aggregate tra loro, ma definite, mentre le microparticelle

Eudragit[®] RS100/Tween 80 ottenute dall'evaporazione della miscela etanolo: acqua 95:5 (v/v) sono molto più aggregate tra loro e di struttura non ben definita.

Le microparticelle Eudragit[®] RS100/Span 20 in metanolo:acqua 95:5 v/v risultano più aggregate delle stesse in etanolo: acqua 95:5 v/v, ma molto più definite e sferiche delle microparticelle Eudragit[®] RS100/Tween 80 in metanolo:acqua 95:5 v/v.

Dall'analisi morfologica data dal microscopio ottico delle microparticelle prodotte con la tecnica dello spray-dryer e dai dati ottenuti di solubilità, la miglior miscela risulta essere Eudragit[®] RS100/Span 20 in etanolo: acqua 95:5 v/v. Questo risultato di omogenea solubilità e di miglior aspetto morfologico delle microparticelle è dato dalla capacità dello Span 20, avendo un HLB più basso rispetto al Tween 80, di stabilizzare meglio il polimero acrilico Eudragit[®] RS100.

Per quanto concerne i derivati della cellulosa, dall'analisi delle varie preparazioni risulta che le microparticelle di HPMCP/Span20 (fig. 5A) risultano più sferiche, meno aggregate e meno polidisperse rispetto alle microparticelle HPMCP/Tween 21 (fig. 5B).

L'omogeneità e il miglior aspetto morfologico delle microparticelle sono da attribuire alla capacità dello Span 20, rispetto al Tween 21; infatti lo Span 20 avendo un valore di HLB inferiore riesce meglio a stabilizzare il polimero.

Le microparticelle di Etilcellulosa/Span 20 in Etanolo:Acetone 1:1v/v (fig. 2C) risultano più aggregate, rispetto alle microparticelle di Etilcellulosa/Span20 in Etanolo:Cloroformio 1:1 v/v (fig. 2D). Il miglior aspetto di queste microparticelle è da attribuire al fatto che l'etilcellulosa va meglio in soluzione nella miscela Etanolo:Cloroformio 1:1v/v rispetto alla miscela Etanolo:Acetone 1:1v/v.

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.

In particolare l'acido gallico nella miscela etanolo: acqua 95:5 v/v non presenta problemi di solubilità. Per solubilizzare l'acido ellagico sono stati utilizzati diversi solventi o miscele di solventi. I risultati ottenuti sullo studio della solubilità dell'acido ellagico, riportati in Tabella 2, indicano che il miglior solvente per l'acido ellagico è N-metil-2-pirrolidone (NMP).

TABELLA 2

SOLVENTE o MISCELE DI SOLVENTI	CONCENTRAZIONE (mg/ml)	SOLUBILITA'
EtOH/ H ₂ O	0,2	±
MeOH	0,33	-
MeOH	0,11	±
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1:1	1	±
CH ₃ CN/CH ₂ Cl ₂ 70:30	1	±
PEG 400	5	-
TEA	0,971	++
N-metil-2-pirrolidone (NMP)	25	++

++ molto solubile; + solubile; ± poco solubile; - non solubile

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 acido gallico ed acido ellagico 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.

Le microsfele sono state poi sottoposte ad analisi morfologica avvalendosi della microscopia ottica ed elettronica.

TABELLA 3

Sample	% polimero	rapporto Eudragit/span	T°	PUMP	ASPIRATION	AGITAZIONE	RECUPERO ponderale %*
1	3,8	95:5	130	20	90	no	29,07
2	2,3	95:5	130	20	90	no	9,25
3	5,7	95:5	130	20	90	no	16,5
4	5,7	95:5	110	80	sì	27,88	
5	7,6	95:5	105	20	80	sì	35,12
6	15	95:5	105	20	80	sì	54,15

*Il recupero % delle microsfele è espresso come percentuale del peso di microsfele recuperate rispetto al peso del polimero e tensioattivo utilizzato.

Per quanto riguarda le microparticelle a base di Eudragit in Tabella 3 sono riportate le condizioni sperimentali usate e il recupero ponderale delle particelle prodotte.

Mentre in Figura 7 vengono riportate a titolo esemplificativo le fotografie ottenute al microscopio elettronico a scansione delle preparazioni 2,4,6 descritte in Tabella 3.

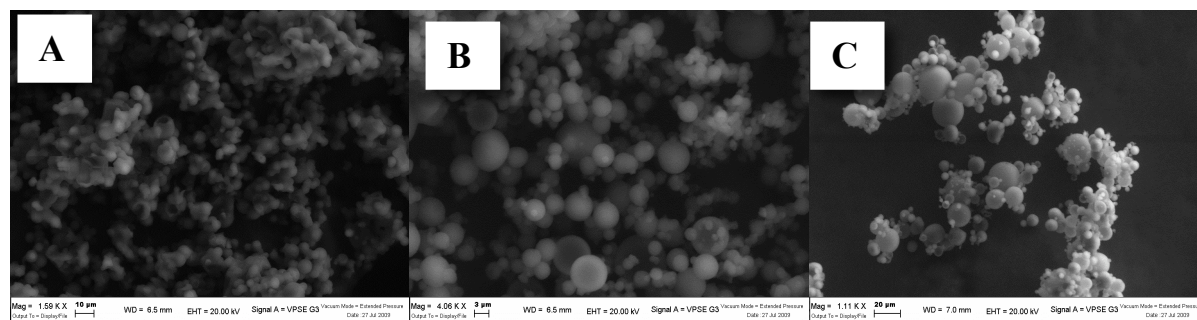


Figura 7: fotografie di microscopia elettronica SEM del campione 2 (A), del campione 4 (B), del campione 6 (C)

Dai dati ponderali e morfologici si possono trarre le seguenti conclusioni circa il recupero delle microparticelle: una diminuzione della temperatura migliora nettamente il recupero ponderale; la presenza dell'agitazione migliora l'uniformità della miscela e il recupero; aumentando la concentrazione del polimero si ha un miglioramento della resa.

I dati ottenuti ci hanno permesso di selezionare le condizioni standard per la preparazione di bioformulati a base di Eudragit per un primo test su piante di pomodoro e di actinidia.

Gli obiettivi 3, 4 e 5 della UO3 relativi al presente progetto sono in fase di studio e realizzazione.

PROGETTO DI RICERCA

BIOFORMULATI AD ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

UO 4: DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

Le attività finora svolte hanno riguardato:

- a) l'allestimento degli schemi sperimentali su pomodoro ed actinidia in serra ed in pieno campo;
- b) l'avvio dei rilievi previsti sulle singole tesi sperimentali su giovani piante di actinidia in serra ed in pieno campo;

1) Allestimento delle parcelle sperimentali

Per le diverse tesi a confronto si è collaborato con l'U.O. 1 nell'allestimento delle parcelle sperimentali secondo quanto previsto dal piano operativo.

Per quanto riguarda le giovani piante in vivaio è stato predisposto il monitoraggio dei fattori ambientali in serra (T°C ed umidità) e l'allestimento dell'ambiente di coltivazione (irrigazione, concimazione). Le piantine sono coltivate in substrato a base di torba commerciale di cui sono noti i principali parametri chimici.

Relativamente alle piante di actinidia in pieno campo sono state anche in questo caso predisposte le parcelle seguendo lo schema sperimentale utilizzato dalla U.O. 1.

2) Rilievi in corso

a) Sulle giovani piante sono stati avviati i seguenti rilievi

Rilievi sul piantine di actinidia in vivaio
Diametro basale fusto
Incremento in altezza piante
Numero nodi formati
Biomassa radicale
Anomalie negli organi delle piante (deformazioni della lamina, colorosi, necrosi).

b) Sulle piante in campo sono in corso i seguenti rilievi

- determinazione dell'area media della pagina fogliare;
- prelievo di tessuto fogliare per la determinazione del contenuto di clorofilla.