



RT/2005/41/BIOTEC

**ESTRAZIONE DI SOSTANZE AD AZIONE ANTIFUNGINA
DA FOGLIE DI ARANCIO DOLCE (*CITRUS SINENSIS*
OSBECK), OLIVO (*OLEA EUROPAEA SATIVA L.*) ED
ALLORO (*LAURUS NOBILIS L.*) CON LA TECNICA
DELL'ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA**

M. ADAMI, A. DE SANTIS, D. FERRI, E. PICCINELLI

ENEA - Unità Tecnico Scientifica Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi

Centro Ricerche Casaccia, Roma

R. ALBERGO, U. DE CORATO, G. DI SANZO, G.P. LEONE, O. MACCIONI,

S. PALAZZO, M. TRUPO, G. ZINGARELLI

ENEA - Unità Tecnico Scientifica Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi

Centro Ricerche Trisaia, Matera

ESTRAZIONE DI SOSTANZE AD AZIONE ANTIFUNGINA DA FOGLIE DI ARANCIO DOLCE (*CITRUS SINENSIS* OSBECK), OLIVO (*OLEA EUROPAEA SATIVA* L.) ED ALLORO (*LAURUS NOBILIS* L.) CON LA TECNICA DELL'ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA

RIASSUNTO

Le piante superiori sintetizzano un gran numero di sostanze chimiche, definite “metaboliti secondari”, che possono avere proprietà biocida e che rivestono notevole interesse nel campo della difesa delle colture agrarie.

Tali sostanze naturali possono integrare l'uso di quei composti chimici di sintesi che, oggi estensivamente utilizzati, costituiscono un grosso problema per il loro negativo impatto sia sull'ambiente e sia sulla salute di consumatori ed agricoltori.

Alla luce di tali considerazioni, ed anche sull'onda della diffusione delle superfici investite a colture “biologiche” per le quali l'impiego di molecole di sintesi ad azione biocida è vietato o comunque limitato dalle normative vigenti, sta rivestendo un grande interesse la ricerca di nuove molecole di origine naturale ad efficace azione biocida.

Scopo del presente lavoro è stato quello di:

- selezionare fonti vegetali idonee dalle quali ottenere estratti contenenti sostanze naturali ad azione biocida, e più precisamente antifungina, da poter impiegare nella difesa delle colture agrarie;
- estrarre tali sostanze con un processo innovativo, mediante estrazione con anidride carbonica supercritica, che non utilizza solventi organici.

Dopo uno studio bibliografico sul profilo fitochimico di possibili fonti vegetali, sono state selezionate tre specie di piante coltivate negli areali mediterranei:

- Olivo (*Olea europaea sativa* L.);
- Arancio dolce (*Citrus sinensis* Osbeck);
- Alloro o Lauro (*Laurus nobilis* L.).

Le foglie di queste piante sono state essiccate e poi processate con CO₂ supercritica (CO₂-SC) al fine di estrarre composti con proprietà antimicrobiche.

Per effettuare le estrazioni sono stati utilizzati:

- un estrattore da laboratorio a fluidi supercritici (“Dionex 703-SFE”);
- un impianto pilota di estrazione con anidride carbonica supercritica (“Luwar”).

Sono state anche effettuate, per confronto, delle estrazioni dalle foglie delle stesse piante tramite distillazione in corrente di vapore con l'apparecchio di Clevenger.

Gli estratti sono stati sottoposti a saggi biologici per lo studio *in vitro* della loro azione antifungina su una collezione di isolati fungini fitopatogeni ottenuti da varie specie di piante agrarie naturalmente infette, e poi è stata confrontata l'efficacia antifungina degli estratti ottenuti con le diverse tecniche.

I risultati di questa ricerca hanno evidenziato l'esistenza di una maggiore efficacia antifungina degli estratti di *C. sinensis* e di *L. nobilis* ottenuti con CO₂ supercritica alle condizioni operative di 110 bar e 40°C e degli estratti di *O. europaea sativa* ottenuti con la stessa tecnica alle condizioni di 500 bar e 50°C. La concentrazione degli estratti in cui è stata rilevata la maggiore azione antifungina è risultata compresa fra 80 e 800 µg/ml.

Le prove sperimentali di estrazione con CO₂ supercritica con l'estrattore da laboratorio e con l'impianto pilota e le estrazioni con il Clevenger sono state svolte presso i laboratori del Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA, dall'Unità Tecnico Scientifica BIOTEC (Biotecnologie, Protezione della salute e degli ecosistemi) – Sezione BIOTEC-AGRO e Gruppo BIOTEC-SIS.

I saggi biologici sugli estratti sono stati svolti presso i laboratori del Centro Ricerche Trisaia dell'ENEA, dall'Unità Tecnico Scientifica BIOTEC (Biotecnologie, Protezione della salute e degli ecosistemi) – Sezione BIOTEC-AGRO.

Parole chiave: Estrazione con CO₂ supercritica; Estrazione con Clevenger; Estrazione da foglie di arancio, olivo e alloro; Funghi fitopatogeni; Attività antifungina.

Extraction of antifungal activity substances from leaves of orange tree, olive tree and laurel by means of supercritical carbon dioxide technique

SUMMARY

Superior plants synthesize a great number of chemical substances, defined “secondary metabolites”, which are able to own biocide action that have a great interest in the field of crops protection.

Such natural substances are complementary to those compounds produced by chemical synthesis that today are widely utilised and that are a great problem as their impact is negative either for environment or consumers and farmers health.

In consideration of the above mentioned issues and also taking into account the significant diffusion on a more and more increasing areas of “biological” cultures, where the use of synthesis molecules having a biocide action is forbidden or, anyway, limited by present rules, the research on new molecules of natural origin holding a valuable biocide action is gaining a great interest.

Purpose of this work is:

- to select suitable vegetable sources to obtain extracts of natural substances having a biocide action, specifically antifungal, in order to use them in crops protection;
- the extraction of these substances with an innovative process, supercritical CO₂, without the use of organic solvents.

After an deep bibliographical study on phytochemical profile of possible vegetable sources, three Mediterranean plants have been selected:

- Olive tree (*Olea europaea sativa* L.);
- Sweet orange tree (*Citrus sinensis* Osbeck);
- Laurel (*Laurus nobilis* L.).

Leaves have been dried and processed with supercritical CO₂ (CO₂-SC) in order to extracts compounds with antimicrobial properties.

For this purpose we utilise:

- A laboratory supercritical fluid extractor (“Dionex 703-SFE”);
- A supercritical CO₂ pilot plant (“Luwar”).

On the same leaves steam extractions with a Clevenger have been made in order to compare the antifungal action of the extracts.

Extracts undertook biological tests for the *in vitro* study of their antifungal activity on a collection of phytopathogen fungi isolated from various species of naturally infected plants of agrarian interest. The antifungine efficacy has been compared among the extracts obtained from the same leaves handled with different extraction techniques.

The outcomes of our research confirmed the existence of a more antifungine efficacy of the extracts coming from *C. sinensis* and *L. nobilis* achieved with supercritical CO₂ at operational conditions of 110 bar and 40°C, and also from extracts of *O. europea sativa* achieved with the same technique at 500 bar and 50°C.

The “range” of extracts concentration where a better antifungine activity has been detected is the one from 80 to 800 µg/ml.

Experimental tests of extraction with supercritical CO₂ both with laboratory extractor and pilot plant and, also, the extraction with Clevanger have been carried out at the laboratories of Casaccia Research Centre of ENEA by the U.T.S. BIOTEC (Biotechnologies, health and ecosystem protection) – BIOTEC-AGRO and BIOTEC-SIS groups.

Biological tests on extracts have been carried out at the laboratories of Trisaia Research Centre of ENEA by the U.T.S. BIOTEC (Biotechnologies, health and ecosystem protection) – BIOTEC-AGRO group.

Key words: Extraction with supercritical CO₂; Extraction with Clevenger; Extraction from leaves of orange, olive and laurel trees; Phytopathogen fungi; Antifungine activity.

INDICE

1. INTRODUZIONE	PAG. 7
1.1 CENNI SULLA TECNOLOGIA DELL'ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA.....	8
1.2 CENNI SUI METODI TRADIZIONALI DI ESTRAZIONE DI SOSTANZE NATURALI DI ORIGINE VEGETALE.....	10
2. MATERIALI E METODI.....	11
2.1 MATRICI VEGETALI SCELTE E PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI.....	11
2.2 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA.....	12
2.2.1 ESTRATTORE DA BANCO CON CO ₂ -SC (MOD. DIONEX SFE-703).....	12
2.2.2 IMPIANTO PILOTA PER ESTRAZIONE CON CO ₂ -SC (MOD. LUWAR).....	13
2.2.3 APPARECCHIATURA PER LA DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE (MOD. CLEVINGER).....	14
2.3 CONDIZIONI OPERATIVE DELLE ESTRAZIONI CON CO ₂ -SC.....	15
2.3.1 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>OLEA EUROPAEA SATIVA</i> CON IL “DIONEX SFE-703”.....	15
2.3.2 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>CITRUS SINENSIS</i> CON IL “DIONEX SFE-703”.....	16
2.3.3 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>LAURUS NOBILIS</i> CON IL “DIONEX SFE-703”.....	16
2.3.4 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>OLEA EUROPAEA SATIVA</i> CON IL “LUWAR”.....	16
2.3.5 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>CITRUS SINENSIS</i> CON IL “LUWAR”.....	17
2.3.6 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>LAURUS NOBILIS</i> CON IL “LUWAR”.....	17
2.4 CONDIZIONI OPERATIVE DELLE ESTRAZIONI CON DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE	17
2.4.1 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>OLEA EUROPAEA SATIVA</i> CON IL “CLEVINGER”.....	17
2.4.2 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>CITRUS SINENSIS</i> CON IL “CLEVINGER”.....	18
2.4.3 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI <i>LAURUS NOBILIS</i> CON IL “CLEVINGER”.....	18
2.5 CONSERVAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DEGLI ESTRATTI.....	18
2.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI	19
2.6.1 TRATTAMENTO DEGLI ESTRATTI PER I SAGGI BIOLOGICI.....	19
2.6.2 PARAMETRI BIOLOGICI CONSIDERATI PER VALUTARE L'ATTIVITÀ ANTIFUNGINA	20
2.6.2.1 VALUTAZIONE DELLA GERMINABILITÀ DEI CONIDI IN PIASTRA.....	20
2.6.2.2 VALUTAZIONE DELL'ACCRESIMENTO RADIALE DEL MICELIO IN PIASTRA.....	21
2.6.2.3 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ DEL MICELIO IN PIASTRA.....	21
3. RISULTATI.....	22
3.1 EFFETTI DEL METANOLO-ACETONE SULLA VITALITÀ DEGLI ISOLATI FUNGINI.....	22
3.2 EFFETTI ANTIFUNGINI DEGLI ESTRATTI GREZZI DI ARANCIO DOLCE, OLIVO	

COLTIVATO ED ALLORO.....	22
3.2.1 EFFETTI ANTIFUNGINI INDOTTI DAGLI ESTRATTI DI ARANCIO DOLCE.....	22
3.2.2 EFFETTI ANTIFUNGINI INDOTTI DAGLI ESTRATTI DI ALLORO.....	24
3.2.3 EFFETTI ANTIFUNGINI INDOTTI DAGLI ESTRATTI DI OLIVO.....	24
4. DISCUSSIONE.....	24
4.1 CONFRONTO DELL'EFFICACIA ANTIFUNGINA DELLO STESSO MATERIALE VEGETALE IN FUNZIONE DELLE DIVERSE TECNOLOGIE ESTRATTIVE SPERIMENTATE	24
4.2 CONFRONTO DELL'EFFICACIA ANTIFUNGINA DEI DIVERSI MATERIALI VEGETALI SAGGIATI IN FUNZIONE DELLA STESSA TECNICA ESTRATTIVA SPERIMENTATA.....	25
5. CONCLUSIONI.....	26
6. BIBLIOGRAFIA.....	28

1. INTRODUZIONE

Le piante superiori, come è noto, sintetizzano in condizioni fisiologiche normali un gran numero di sostanze chimiche che non sempre hanno un ruolo ben riconosciuto nella fisiologia della pianta. Generalmente, tali sostanze rivestono importanza nella vita di relazione della pianta e sono utilizzate, ad esempio, nella difesa da predatori e parassiti, nella competizione con altre specie o per facilitare i processi riproduttivi. Queste molecole vengono generalmente definite, nel loro complesso, “metaboliti secondari” e, dal punto di vista della loro struttura chimica, vengono generalmente suddivise in tre grosse categorie: fenoli, alcaloidi e terpeni.

Molti metaboliti secondari rivestono notevole interesse in vari settori industriali come quello farmaceutico, cosmetico, alimentare, agrochimico. In questo ultimo settore destano molto interesse tutti quei composti che, per le loro proprietà biocide (antimicrobiche, insetticide e repellenti), potrebbero integrare l'azione degli agrofarmaci di sintesi, oggi estensivamente utilizzati, che rappresentano un grosso problema per il loro impatto negativo sia sull'ambiente che sulla salute del consumatore e degli operatori agricoli.

Le piante superiori hanno infatti imparato, nel corso della loro evoluzione, a sviluppare varie barriere di difesa chimica altamente raffinate rivolte contro l'attacco di fitofagi (insetti e acari) e microrganismi patogeni (funghi e batteri) e, tra i metaboliti secondari da esse prodotti, è possibile individuare, isolare e caratterizzare molte molecole biologicamente attive nella difesa contro di essi.

La ricerca di nuove molecole naturali di origine vegetale ad efficace azione antimicrobica, o più in generale ad effetto biocida, sta pertanto vivendo una nuova stagione di rilancio sull'onda della diffusione delle superfici agrarie investite a colture intensive da pieno campo e in ambienti protetti, per le quali l'impiego di alcune molecole di sintesi chimica è vietato (come, ad esempio, il bromuro di metile) o limitato dalle normative nazionali ed europee vigenti.

Gli estratti vegetali saggiati nel corso di questo lavoro sperimentale sono stati ottenuti con la tecnologia innovativa che utilizza come solvente CO₂ supercritica. Tale tecnologia, come è noto, può operare a più basse temperature rispetto all'idrodistillazione, evitando o limitando i processi di degradazione termica dei composti, ed inoltre non prevede l'utilizzo di solventi organici, considerati come rifiuti speciali dannosi all'uomo e all'ambiente.

Scopo di questa ricerca è stato quindi quello di rilevare e di quantificare, per il momento solo *in vitro*, l'attività antifungina di estratti fogliari grezzi di arancio dolce (*Citrus sinensis* Osbeck), olivo coltivato (*Olea europaea sativa* L.) ed alloro (*Laurus nobilis* L.) ottenuti con CO₂ supercritica su una collezione di funghi fitopatogeni di rilevante pericolosità per molte colture dell'Italia meridionale: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab., *Cladosporium fulvum* (Cke) Cif., *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh.

1.1 CENNI SULLA TECNOLOGIA DELL'ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA

Ogni sostanza pura assume uno stato di aggregazione specifico, cioè solido, liquido o gassoso, a seconda delle condizioni di temperatura e pressione in cui si trova. Il diagramma di stato di una sostanza (Figura 1) permette di conoscere lo stato fisico in cui si trova la sostanza stessa per ogni coppia di valori di pressione e temperatura. Sulla linea di equilibrio che parte dal punto triplo, ove coesistono le tre fasi, e arriva al punto critico, si ha una fase gassosa in equilibrio con una fase liquida, distinguibili tra loro anche per la differenza di densità. Man mano che si percorre la linea bifasica liquido-vapore e ci si avvicina al punto critico la differenza di densità tra le due fasi diminuisce notevolmente ed al punto critico le due fasi hanno la stessa densità e non sono più distinguibili tra loro. Per pressioni maggiori della pressione critica (P_c) e temperature maggiori della temperatura critica (T_c) si ha un unico fluido opaco, omogeneo e lattiginoso: il fluido supercritico.

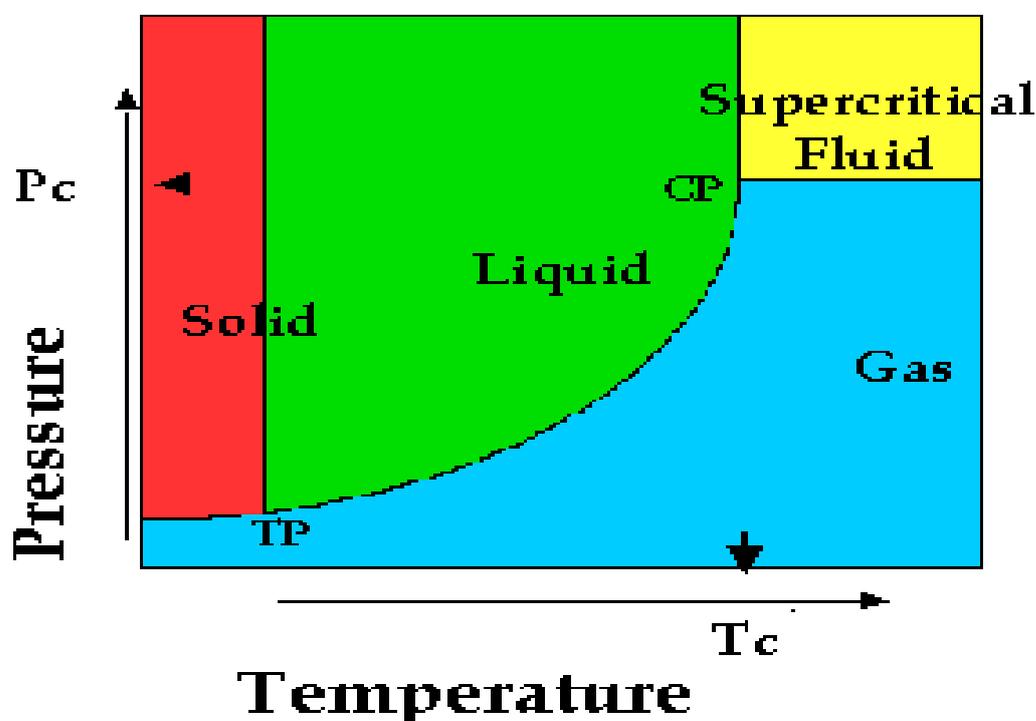


Figura 1

Si definisce, dunque, fluido supercritico, una sostanza o una miscela in condizioni di temperatura e di pressione superiori a quelle relative al suo punto critico. I valori di T_c e P_c sono specifici per ogni sostanza.

Il fluido supercritico ha caratteristiche intermedie tra quelle di un gas e quelle di un liquido ed infatti, come un liquido, ha elevata densità e bassa comprimibilità, mentre la sua elevata diffusività e bassa viscosità sono quelle tipiche dei gas.

Per quanto riguarda la capacità solvente di un fluido supercritico, essa è paragonabile a quella

di un liquido di uguale polarità ma, a differenza dei liquidi, è in grado di penetrare come un gas all'interno della matrice solida.

Per quanto riguarda la selettività estrattiva del fluido supercritico, il frazionamento di liquidi e solidi può essere ottenuto se i costituenti la matrice da frazionare differiscono per volatilità (sono più solubili i composti con più alta tensione di vapore), massa (la pressione necessaria per l'estrazione aumenta con il peso molecolare dei composti) e polarità (ad esempio in un fluido supercritico apolare come la CO_2 è favorita la solubilizzazione di composti apolari). Quindi in base alle condizioni operative scelte per l'estrazione (pressione e temperatura), si può conferire una certa selettività all'estrazione stessa. La selettività può anche essere ottenuta nella successiva fase di separazione del soluto dal solvente. Disponendo infatti di due o più separatori in serie si possono impostare in essi condizioni di pressione e temperatura che favoriscano il frazionamento dell'estratto.

Quindi, l'estrazione con fluidi supercritici (Supercritical Fluid Extraction, SFE) costituisce una alternativa importante ai tradizionali processi di estrazione da matrice solida e liquida come la distillazione frazionata, la distillazione in corrente di vapore, l'estrazione con solventi organici.

Uno schema del processo di estrazione con fluidi supercritici è mostrato in Figura 2.

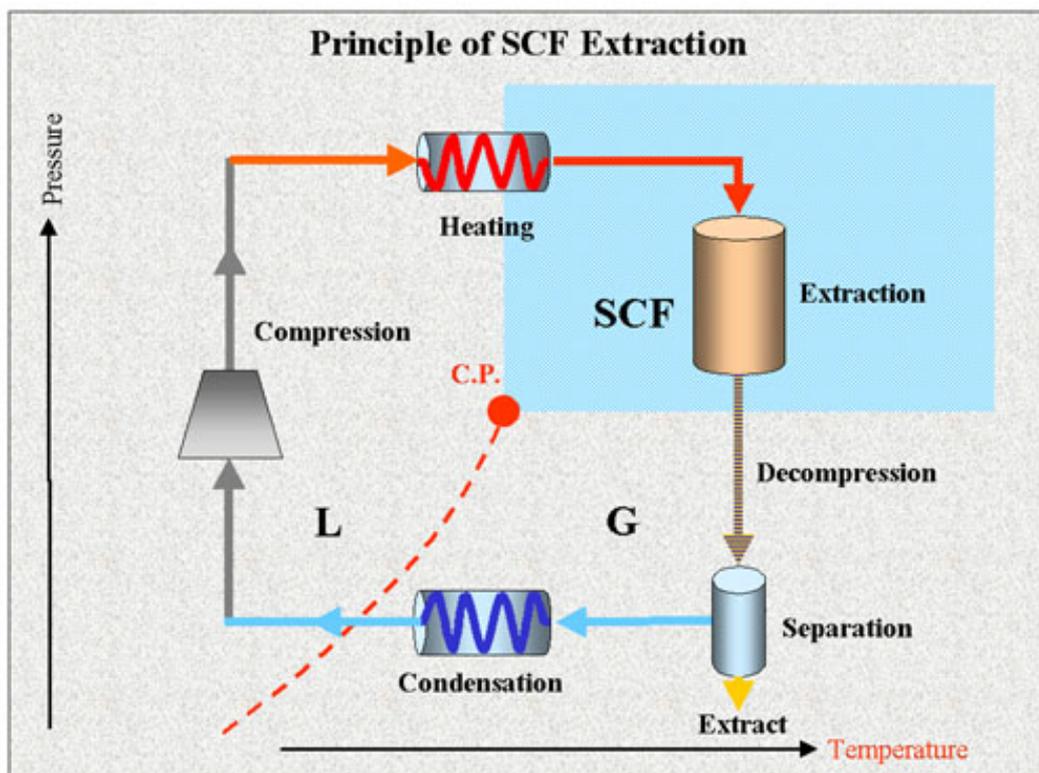


Figura 2

Il composto più comunemente impiegato nei processi di estrazione con fluidi supercritici è l'anidride carbonica (CO_2), che, oltre a presentare valori critici piuttosto bassi ($T_c = 31,08\text{ }^\circ\text{C}$ e P_c

= 73,8 bar) è: atossica, inerte chimicamente, non infiammabile, non esplosiva, poco costosa ed allo stato gassoso in condizioni naturali.

Questa ultima proprietà consente di avere estratti privi di solvente e quindi conferisce a tali processi un valore aggiunto rispetto alle estrazioni con solventi organici.

Data la sua apolarità, la CO₂ supercritica dissolve meglio i composti lipofili, che sono poco polari. Tuttavia, alcoli a basso peso molecolare, acqua o altri composti polari possono, in opportune concentrazioni, essere disciolti nella CO₂ supercritica per variare la polarità della miscela solvente complessiva e quindi favorire l'estrazione di composti polari. Tali additivi sono definiti "cosolventi".

1.2 CENNI SUI METODI TRADIZIONALI DI ESTRAZIONE DI SOSTANZE NATURALI DI ORIGINE VEGETALE

La maggior parte dei processi di estrazione da matrici vegetali sono generalmente preceduti da pretrattamenti del campione ed, in particolare, da un essiccamento in quanto gli stessi possono contenere allo stato fresco dal 60% al 90% di acqua che deve essere necessariamente eliminata prima di procedere con l'estrazione. Questa procedura deve essere eseguita in condizioni blande onde evitare modificazioni chimiche e/o inattivazioni biologiche dei composti da estrarre.

I tradizionali processi di estrazione dei composti organici vegetali consistono essenzialmente nella distillazione in corrente di vapore e nell'estrazione con solventi organici polari o apolari a seconda della natura chimica delle sostanze da estrarre.

L'estrazione con distillazione in corrente di vapore è adatta per la separazione dei composti immiscibili con l'acqua e si basa sul principio che, come un liquido puro bolle quando la sua tensione di vapore eguaglia la pressione totale, così, aggiungendo un secondo liquido (acqua) immiscibile con esso, l'ebollizione avviene quando la somma delle tensioni di vapore dei due componenti raggiunge la pressione totale. Quindi un liquido, se unito con un altro con esso immiscibile, bollerà ad una temperatura tanto più bassa, rispetto al valore normale, quanto più è alta la tensione di vapore del liquido aggiunto. In tal modo è possibile abbassare la temperatura di ebollizione di un composto di interesse, in modo da evitarne la degradazione termica. Al di sopra della caldaia dove avviene l'ebollizione, vi è un condensatore che condensa il vapore d'acqua e il vapore del liquido trascinato e ne permette la successiva separazione per decantazione. Gli estratti tramite distillazione in corrente di vapore sono indicati come "oli essenziali".

La distillazione in corrente di vapore è il processo più utilizzato per l'estrazione di oli essenziali che hanno temperature di ebollizione comprese tra 150 e 250 °C. Il materiale di partenza viene sottoposto a temperature intorno a 100°C. E' possibile condurre l'operazione anche sotto vuoto con il vantaggio di operare a temperature più basse. Questo processo può però produrre degradazioni termiche dei composti termolabili ed inoltre la presenza di acqua può produrre la parziale idrolisi di alcuni composti.

L'estrazione con solventi organici viene utilizzata per estrarre composti a più alto peso molecolare e per trattare prodotti termolabili. Viene realizzata in due stadi: prima viene eseguita l'estrazione vera e propria e poi si procede all'eliminazione del solvente. Gli estratti da materiali essiccati ottenuti con questo processo vengono definiti oleoresine; quelli ottenuti dai materiali freschi vengono definiti essenze o concrete.

Dalla concreta si ottengono le seguenti frazioni:

1. l'assoluto per trattamento della stessa con alcool etilico a -40°C . Con questo processo si ha la precipitazione di una parte delle cere cuticolari ottenendo un olio (l'assoluto) da sottoporre ad una distillazione sotto vuoto per allontanare il solvente;
2. l'olio volatile per distillazione in corrente di vapore che ha una composizione chimica simile a quella degli oli essenziali. Però, l'elevato numero di trattamenti cui viene sottoposto il materiale di partenza, determina un ulteriore impoverimento nei composti più volatili.

I solventi organici apolari hanno generalmente una bassa selettività di estrazione e consentono l'estrazione di tutti i composti non polari dalla matrice di partenza ad eccezione dei polimeri a più alto peso molecolare.

2. MATERIALI E METODI

2.1 MATRICI VEGETALI SCELTE E PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Lo studio dell'attività antifungina di sostanze naturali di origine vegetale verso microrganismi fitopatogeni rappresenta, attualmente, una delle linee più attuali e promettenti della ricerca fitoiatrica ecocompatibile in quanto sono ormai numerose le evidenze sperimentali che documentano dell'effetto antifungino di sostanze estratte da piante verso funghi e batteri fitopatogeni.

Di seguito sono elencati solo alcuni esempi di sostanze naturali vegetali che la letteratura riporta come dotate di attività antimicrobiche verso diversi agenti fitopatogeni, sia di natura fungina che batterica (Saks e Barkai-Golan, 1995; Dixit *et al.*, 1995; Cammareri *et al.*, 2002; Curir *et al.*, 2002; Shahi *et al.*, 2003; Daferera *et al.*, 2003; Zambonelli *et al.*, 2003; Pirajno *et al.*, 2004):

- gli oli essenziali estratti da *Erigeron canadensis*, *Myrtus communis*, *Cymbopogon flexuosus* e da altre piante officinali (origano, timo, dittamo, maggiorana, lavanda, rosmarino, alloro, menta piperita e ruta);
- il gel contenuto nelle cellule parenchimatiche delle foglie di *Aloe barbadensis*;
- le saponine presenti negli estratti fogliari di piante della famiglia delle *Asteraceae*;
- i flavonoli glucosidi e le cumarine estratte da svariate piante ornamentali;
- gli estratti idroalcolici ottenuti da spicchi di aglio;
- gli estratti di *Moringa oleifera*;
- miscele composte da estratti di chiodi di garofano, olio di neem, pepe, olio di senape ed olio di cannella.

In seguito ad una indagine esplorativa condotta dall'ENEA avente lo scopo di individuare possibili fonti vegetali idonee per l'estrazione di principi bioattivi in possesso di una efficace azione antifungina, sono state scelte piante di arancio dolce (*C. sinensis*), olivo coltivato (*O. europaea sativa*) ed alloro (*L. nobilis*).

Sono infatti numerose le evidenze sperimentali che dimostrano la presenza nei tessuti verdi, ed in particolare nelle foglie, di piante del genere *Citrus*, *Olea* e *Laurus* di diverse categorie di sostanze organiche (fenoli, terpeni e glucosidi) in possesso di attività antimicrobiche (Zaat *et al.*, 1987; Laks e Pruner, 1989; Le Tutour e Guedon, 1992; Tassou e Nychas, 1994; Kivçak e Mert, 2002; Fiorini *et al.*, 1998; Pirajno *et al.*, 2004).

Gli elementi sopra esposti hanno quindi indotto gli autori del presente lavoro ad effettuare ricerche sui possibili effetti antifungini *in vitro* di estratti fogliari grezzi di *C. sinensis*, *O. europaea sativa* e *L. nobilis* verso la crescita del micelio e la germinabilità dei conidi di alcuni funghi fitopatogeni di rilevante interesse agrario per molte colture mediterranee.

Le foglie di arancio dolce, olivo coltivato ed alloro sono state, pertanto, essiccate al buio a temperatura ambiente ed al riparo dall'umidità per circa 20 giorni. Sono state poi finemente sminuzzate con un macinino da laboratorio a lame rotanti (2 cicli della durata di 5 sec ciascuno) e setacciate, selezionando, per questa sperimentazione, l'intervallo dimensionale compreso tra 1 e 6 mm. L'essiccazione a temperatura ambiente è stata preferita a quella in stufa perchè riduce sia la perdita delle sostanze volatili e sia la degradazione di composti termolabili. Durante l'essiccamento è stato controllato giornalmente il peso fino a costanza, rilevando così una perdita di umidità del

campione pari a circa il 70% del peso fresco iniziale.

2.2 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

Gli estratti grezzi utilizzati nel corso di queste prove sono stati ottenuti da foglie di arancio dolce, olivo coltivato ed alloro utilizzando le seguenti apparecchiature di estrazione:

1. un estrattore con CO₂-SC da laboratorio: Modello “DIONEX SFE – 703” con cella di estrazione da 32 ml;
2. un impianto di estrazione con CO₂-SC scala pilota: Modello “LUWAR” con cestello di estrazione da 800 ml;
3. un'apparecchiatura per l'estrazione in corrente di vapore: Modello “CLEVENGER”.

2.2.1 ESTRATTORE DA BANCO CON CO₂-SC (MOD. “DIONEX SFE – 703”)

L'estrattore “Dionex SFE-703”, mostrato in Figura 3, è uno strumento di estrazione a fluidi supercritici automatizzato da banco, con 8 celle di estrazione in parallelo, dotato di forno riscaldante fino a 150°C e di un sistema di pompaggio in grado di comprimere la CO₂ fino a 650 bar.



Figura 3

Tale apparecchio è dotato di due tipi di celle di estrazione di diverso volume: 8 ml e 32 ml.

2.2.2 IMPIANTO PILOTA PER ESTRAZIONE CON CO₂-SC (MOD. “LUWAR”)

L’impianto-pilota “LUWAR” permette di raggiungere la pressione di 500 bar e la temperatura di 80°C ed è composto da una sezione per il trattamento di matrici solide e da una sezione appositamente progettata per la tintura di filati con CO₂ supercritica. L’impianto è dotato di tre separatori in serie e di un modulo per l’utilizzo del cosolvente.

L’impianto “LUWAR” è mostrato in Figura 4, mentre il cestello dell’estrattore del volume di 800 ml è riportato in Figura 5.



Figura 4



Figura 5

2.2.3 APPARECCHIATURA PER LA DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE (MOD. “CLEVINGER”)

La distillazione in corrente di vapore è stata effettuata tramite l'apparecchiatura di Clevenger (Clevenger, 1928) mostrata in Figura 6.

Questa consiste in un pallone della capacità di 2 litri, inserito in un mantello riscaldante, in cui viene introdotta la matrice da trattare ed una certa quantità di acqua distillata. Il pallone è collegato, mediante un raccordo, ad un refrigerante raffreddato ad acqua dove avviene la condensazione dei vapori. L'acqua contenuta nel pallone e riscaldata dal mantello riscaldante evapora ed attraversa la matrice provoca l'evaporazione degli oli essenziali in essa presenti.

I vapori che si generano condensano e, sfruttando la loro immiscibilità e la diversa densità, consentono il recupero degli oli essenziali.



Figura 6

2.3 CONDIZIONI OPERATIVE DELLE ESTRAZIONI CON CO₂ SUPERCRITICA

Le estrazioni con l'estrattore "Dionex SFE – 703" sono state effettuate alle condizioni operative di 110 bar e 40°C.

Le estrazioni con l'impianto "Luwar" sono invece state condotte a condizioni operative più drastiche di pressione e temperatura: 500 bar e 50°C.

Per ogni pianta sono stati quindi ottenuti due estratti con CO₂ supercritica diversi tra loro per composizione in relazione alle diverse condizioni di pressione e temperatura di estrazione adottate.

L'estratto ottenuto a 110 bar e 40 °C si presume costituito da oli essenziali e da cere cuticolari (concreta) mentre l'estratto ottenuto a 500 bar e 50°C si presume costituito, oltre che da oli essenziali e cere cuticolari, anche dagli altri composti che vengono solubilizzati a tali condizioni di estrazione.

2.3.1 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *OLEA EUROPAEA SATIVA* CON IL “DIONEX SFE – 703”

Con il “Dionex SFE – 703” sono state effettuate estrazioni consecutive dalle foglie di *Olea europaea sativa* alle condizioni di 40°C e 110 bar. E’ stata utilizzata la cella di estrazione da 32 ml e la durata di ciascuna estrazione è stata di 140 min. Per ottenere la quantità di estratto necessaria per la successiva fase di biosaggio delle proprietà antimicrobiche degli estratti, sono state eseguite, a parità di condizioni operative, un totale di 23 estrazioni ricaricando sempre la cella di estrazione con nuove foglie di *Olea europea sativa*. Gli estratti ottenuti dalle varie estrazioni effettuate sono stati infine cumulati.

In totale sono state sottoposte ad estrazione 246,06 g di foglie essiccate e sminuzzate ottenendo in totale 0,350 g di estratto con un flusso medio di 200 ml/min di CO₂ gassosa.

La sigla identificativa del campione estratto da noi usata è stata: **Olea 1**.

2.3.2 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *CITRUS SINENSIS* CON IL “DIONEX SFE – 703”

Anche dalle foglie di *Citrus sinensis* sono state effettuate estrazioni consecutive alle condizioni di 40°C e 110 bar utilizzando la cella di estrazione da 32 ml. La durata di ciascuna estrazione è stata di 140 min. Per ottenere la quantità di estratto necessaria per l’esecuzione dei biosaggi, sono state eseguite, a parità di condizioni operative, un totale di 15 estrazioni ricaricando sempre la cella di estrazione con nuove foglie di *Citrus sinensis*. Gli estratti delle varie estrazioni effettuate sono stati poi cumulati.

In totale sono stati sottoposti ad estrazione 189,66 g di foglie essiccate ottenendo 0,624 g di estratto con un flusso medio di 250 ml/min di CO₂ gassosa.

La sigla identificativa del campione estratto da noi adoperata è stata: **Citrus 1**.

2.3.3 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *LAURUS NOBILIS* CON IL “DIONEX SFE – 703”

Anche per le foglie di *Laurus nobilis* sono state effettuate estrazioni consecutive alle condizioni di 40°C e 110 bar utilizzando la cella di estrazione da 32 ml. La durata di ciascuna prova è stata anche in questo caso di 140 min. Per ottenere la quantità di estratto sufficiente per l’esecuzione dei biosaggi, sono state eseguite, a parità di condizioni operative, un totale di 9 estrazioni ricaricando sempre la cella di estrazione con nuove foglie di *Laurus nobilis*. Gli estratti ottenuti dalle varie estrazioni effettuate sono stati cumulati.

In totale sono stati sottoposti ad estrazione 76,95 g di foglie essiccate ottenendo 0,650 g di estratto adoperando un flusso medio di 200 ml/min di CO₂ gassosa.

La sigla identificativa del campione estratto è stata: **Laurus 1**.

2.3.4 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *OLEA EUROPAEA SATIVA* CON IL “LUWAR”

Il primo separatore dell’impianto “Luwar” è stato by-passato, mentre l’estratto contenente i principi bioattivi è stato raccolto sul fondo del secondo e terzo separatore.

L’ estrazione dalle foglie di *Olea europea sativa* con l’impianto-pilota “Luwar” è stata effettuata alle seguenti condizioni operative:

- Temperatura di estrazione: 50°C;
- Pressione di estrazione: 500 bar;
- Primo separatore: by-passato;
- Secondo e terzo separatore: P = 55 bar e T = 28°C;

- Portata media di CO₂: 28 kg/h;
- Tempo di estrazione: 65 minuti.

Sono stati sottoposti ad estrazione 165 g di foglie essiccate, recuperando nei separatori 21,52 g di estratto.

La sigla identificativa del campione estratto da noi usata è stata: **Oe 1**.

2.3.5 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *CITRUS SINENSIS* CON IL “LUWAR”

Sono state effettuate quattro estrazioni consecutive dalle foglie di *Citrus sinensis* al fine di recuperare una quantità di estratto sufficiente da sottoporre ai saggi biologici.

Il primo separatore dell'impianto Luwar è stato by-passato, mentre l'estratto contenente i principi bioattivi è stato raccolto sul fondo del secondo e terzo separatore.

Le estrazioni sono state condotte alle seguenti condizioni operative:

- Temperatura di estrazione: 50°C;
- Pressione di estrazione: 500 bar;
- Primo separatore: by-passato;
- Secondo e Terzo separatore: P = 50 bar e T = 28°C;
- Portata media di CO₂: 25 kg/h.
- Tempo di estrazione: 45 minuti.

In totale sono stati sottoposti ad estrazione 773 g di foglie essiccate recuperando nei separatori 50,54 g di estratto.

Tutto l'estratto recuperato nelle quattro estrazioni è stato riunito ed indicato con la sigla identificativa **Cs 1**.

2.3.6 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *LAURUS NOBILIS* CON IL “LUWAR”

L'estrazione dalle foglie di *Laurus nobilis* con l'impianto “Luwar” è stata effettuata alle seguenti condizioni:

- Temperatura di estrazione: 50°C;
- Pressione di estrazione: 500 bar;
- Primo separatore: by-passato;
- Secondo e Terzo separatore: P = 55 bar e T = 28°C;
- Portata media di CO₂: 18 kg/h;
- Tempo di estrazione: 75 minuti.

Sono stati sottoposti ad estrazione 198 g di foglie recuperando nei separatori 1,45 g di estratto.

La sigla identificativa del campione estratto è stata: **Ln 1**.

2.4 CONDIZIONI OPERATIVE DELLE ESTRAZIONI CON DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE

Foglie essiccate e macinate di arancio dolce, olivo coltivato ed alloro sono state sottoposte a distillazione in corrente di vapore con l'apparecchio di Clevenger per l'estrazione di oli essenziali, allo scopo di confrontare l'efficacia antimicrobica degli oli raccolti con questa tecnica tradizionale di estrazione con quella degli estratti ottenuti utilizzando la tecnologia innovativa della CO₂ supercritica.

2.4.1 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *OLEA EUROPAEA SATIVA* CON IL “CLEVENGER”

Per le foglie di olivo sono state condotte due estrazioni consecutive.

La prima estrazione è stata eseguita introducendo nel pallone (da 2 litri) 100 g di foglie ed 1 l di acqua distillata. La prova ha avuto una durata di quattro ore dalla bollitura e non è stato ottenuto alcun estratto, ma solo acqua di condensazione.

E' stata eseguita successivamente una seconda estrazione, caricando nel pallone una maggiore quantità di foglie (150 g) ed aggiungendovi 1,5 l di acqua distillata, in modo tale da mantenere inalterato il rapporto solido-liquido. Anche in questo caso, dopo quattro ore dalla bollitura, non è stato ottenuto alcun estratto.

Dalle foglie di olivo non si sono quindi recuperati oli essenziali, almeno alle nostre condizioni sperimentali, probabilmente perché questi sono presenti in quantità troppo esigua nella matrice trattata.

2.4.2 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *CITRUS SINENSIS* CON IL “CLEVENGER”

Per le foglie di arancio dolce sono state eseguite 5 distillazioni consecutive in corrente di vapore, caricando nel pallone (da 2 litri), per ogni estrazione, 100 g di foglie essiccate e sminuzzate ed aggiungendovi 1 litro di acqua distillata ad ogni estrazione. La durata di ciascuna distillazione è stata di 4 ore dalla bollitura dell'acqua ed alla fine è stato spillato tutto l'estratto all'interno di una “vial”. Il peso totale dell'estratto ottenuto dalle 5 estrazioni è risultato pari a 0,636 g. L'estratto è stato da noi indicato con la sigla identificativa: **OAD**.

2.4.3 ESTRAZIONE DALLE FOGLIE DI *LAURUS NOBILIS* CON IL “CLEVENGER”

Per le foglie di alloro sono state condotte 3 distillazioni consecutive in corrente di vapore, caricando nel pallone (da 2 litri), per ogni estrazione, 100 g di foglie essiccate e sminuzzate ed aggiungendovi 1 litro di acqua distillata ad ogni estrazione. La durata di ciascuna distillazione è stata di 4 ore dalla bollitura dell'acqua ed alla fine è stato spillato tutto l'estratto all'interno di una “vial”. Il peso totale dell'estratto è risultato pari a 5,65 g che è stato da noi indicato con la sigla identificativa: **OAL**.

2.5 CONSERVAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DEGLI ESTRATTI

Tutti gli estratti vegetali ottenuti utilizzando sia la CO₂ supercritica e sia la distillazione in corrente di vapore sono stati raccolti separatamente in beute “Erlenmeyer” da 100 ml e in “vials”, conservati al buio alla temperatura di – 30°C, accuratamente sigillati con pellicola “Parafilm” e ben protetti dalla luce con carta stagnola in attesa di essere usati per i saggi biologici.

Nella Tabella 1 sono riassunte le sigle di identificazione, la tecnica estrattiva usata, la presunta natura e la quantità di estratto totale ottenuta da foglie di arancio dolce, olivo coltivato ed alloro saggiati nel corso di queste prove.

TECNICA ESTRATTIVA E TIPOLOGIA DEL PRODOTTO OTTENUTO	ARANCIO DOLCE	OLIVO COLTIVATO	ALLORO
<p>SFE a 110 bar e 40°C in estrattore “Dionex”</p> <p>Oli essenziali con cere cuticolari (<i>concreta</i>)</p>	<p>Sigla identificativa campione: Citrus 1</p> <p>Quantità totale ottenuta: 0,624 g</p>	<p>Sigla identificativa campione: Olea 1</p> <p>Quantità totale ottenuta: 0,350 g</p>	<p>Sigla identificativa campione: Laurus 1</p> <p>Quantità totale ottenuta: 0,650 g</p>
<p>SFE a 500 bar e 50°C in estrattore “Luwar”</p> <p>Estratti grezzi con cere cuticolari</p>	<p>Sigla identificativa campione: Cs 1</p> <p>Quantità totale ottenuta: 50,54 g</p>	<p>Sigla identificativa campione: Oe 1</p> <p>Quantità totale ottenuta: 21,52 g</p>	<p>Sigla identificativa campione: Ln 1</p> <p>Quantità totale ottenuta: 1,45 g</p>
<p>In corrente di vapore con il “Clevenger”</p> <p>Oli essenziali senza cere cuticolari</p>	<p>Sigla identificativa campione: OAD</p> <p>Quantità totale ottenuta: 0,636 g</p>	<p>Non è stato ottenuto nessun estratto</p>	<p>Sigla identificativa campione: OAL</p> <p>Quantità totale ottenuta: 5,65 g</p>

Tabella 1

2.6 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIFUNGINA DEGLI ESTRATTI

2.6.1 TRATTAMENTO DEGLI ESTRATTI PER I SAGGI BIOLOGICI

Gli estratti grezzi e gli oli essenziali di *O. europea sativa*, *C. sinensis* e *L. nobilis* indicati nella Tabella 1 sono stati prima disciolti in un volume noto di una miscela di metanolo-acetone (1:1 v/v) direttamente nelle beute e nelle "vials" che li contenevano, e poi agitati energicamente fino ad ottenere emulsioni omogenee che sono state filtrate su carta tipo "Wathman".

Circa 600 mg di ciascun campione di estratto solubilizzato in metanolo-acetone sono stati diluiti in 11 ml di metanolo-acetone (1:1 v/v) con lo scopo di preparare diluizioni decimali contenenti circa 50 – 5 – 0,5 mg di estratto per ml di soluzione.

2.6.2 PARAMETRI BIOLOGICI CONSIDERATI PER VALUTARE L'ATTIVITÀ ANTIFUNGINA

Una collezione di isolati fungini fitopatogeni proveniente dalla micoteca del Centro Ricerche Trisaia dell'ENEA (*A. alternata*, *A. rabiei*, *C. fulvum*, *F. culmorum*, *F. solani* e *S. oleagina*) è stata utilizzata per saggiare l'attività antifungina dei campioni di estratto indicati nella Tabella 1. E' stato eseguito, pertanto, sia in laboratorio che in camera di crescita illuminata e termostata, un saggio biologico specifico per funghi a micelio, così come descritto da Thompson (1989) e Shahi *et al.* (2003).

L'attività antifungina è stata valutata per tutti gli isolati in piastre Petri ventilate da 50 mm di diametro contenenti ciascuna 10 ml di substrato nutritivo di arricchimento agarizzato a base di Patata-Destrosio-Agar (PDA) portato a pH $5,6 \pm 0,2$ con acido lattico. Gli estratti grezzi e gli oli essenziali sono stati incorporati in questo terreno di coltura in quantità decimalmente decrescente, aggiungendo 10 ml di ciascuna diluizione di estratto precedentemente preparata a 600 ml di PDA equilibrato a 40 – 45°C. In questo modo sono state preparate tre serie di piastre di PDA da utilizzare per i saggi biologici contenenti, rispettivamente, 800 – 80 – 8 µg di estratto per ml di terreno nutritivo.

L'attività fungina che è stata presa in considerazione ha riguardato la valutazione dei seguenti parametri biologici:

1. la germinabilità dei conidi in piastra;
2. l'accrescimento radiale del micelio in piastra;
3. la vitalità del micelio in piastra.

L'eventuale azione tossica della miscela metanolo-acetone sugli isolati fungini è stata saggiata in piastre di PDA a cui sono stati aggiunti 10 ml di questa miscela a 600 ml di substrato nutritivo (testimone A), mentre l'attività biologica degli stessi isolati in assenza sia di estratti che di metanolo-acetone è stata valutata in piastre contenenti solo PDA (testimone B).

2.6.2.1 VALUTAZIONE DELLA GERMINABILITÀ DEI CONIDI IN PIASTRA

Conidi di *A. alternata*, *A. rabiei*, *C. fulvum*, *F. culmorum*, *F. solani* e *S. oleagina* sono stati prelevati sterilmente da colonie di 7-15 giorni cresciute su PDA a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sotto lampade NUV (Philips TLD 36W/08) con un ciclo di 12 ore luce/buio, e poi sospesi in acqua distillata sterile fino ad ottenere sospensioni conidiche aventi una densità media di $10^3 - 10^4$ conidi/ml.

Allo scopo di ottenere colonie monoconidiche nelle piastre da biosaggio da poter contare, aliquote di 100 – 200 µl di ciascuna sospensione conidica sono state seminate per spatolamento sulla superficie del PDA contenente gli estratti. La stessa quantità di sospensione conidica è stata distribuita anche su piastre di PDA addizionato con metanolo-acetone (testimone A) e su piastre contenenti solo PDA (testimone B). Per ogni prova sono state seminate 5 piastre che poi sono state mantenute in termostato a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ al buio per 5 giorni.

Il numero delle colonie cresciute è stato determinato con un contacolonie digitale e la percentuale media di germinazione dei conidi (**GC**) è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{GC (\%)} = C_E \times 100 / C_{\text{PDA}}$$

ove:

C_E = numero di colonie monoconidiche cresciute su PDA + estratti (tesi);

C_{PDA} = numero di colonie monoconidiche cresciute su PDA (testimone B).

E' stata anche valutata la “minima concentrazione bioattiva” di estratto in corrispondenza della quale la percentuale di germinazione dei conidi risultava pari a 0%.

2.6.2.2 VALUTAZIONE DELL'ACCRESIMENTO RADIALE DEL MICELIO IN PIASTRA

Colonie di *A. alternata*, *A. rabiei*, *C. fulvum*, *F. culmorum*, *F. solani* e *S. oleagina* sono state fatte crescere per 7-15 giorni al buio su PDA a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Dischi di micelio di 5 mm di diametro prelevati sterilmente dal margine delle colonie stesse sono stati depositi al centro delle piastre di PDA da biosaggio contenenti gli estratti. Tasselli di agar infungato delle stesse dimensioni sono stati depositi anche su PDA addizionato con metanolo-acetone (testimone A) e su piastre con solo PDA (testimone B). Per ogni prova sono state preparate 5 piastre che poi sono state mantenute a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ al buio per 5 giorni per gli isolati fungini a rapido accrescimento del micelio (*A. alternata*, *F. culmorum* e *F. solani*) e per 10 giorni per gli isolati a lento accrescimento (*A. rabiei*, *C. fulvum* e *S. oleagina*).

Il diametro medio delle colonie è stato misurato ortogonalmente e la percentuale di inibizione di crescita radiale del micelio (**ICM**) è stata determinata col metodo di Shahi *et al.* (2003):

$$\text{ICM (\%)} = (D_{\text{PDA}} - D_E) \times 100 / D_{\text{PDA}}$$

ove:

D_E = diametro medio (in cm) delle colonie cresciute su PDA + estratti (tesi);

D_{PDA} = diametro medio (in cm) delle colonie cresciute su solo PDA (testimone B).

E' stata anche valutata la “minima concentrazione bioattiva” di estratto in corrispondenza del quale la percentuale di inibizione della crescita miceliare risultava pari a 100%.

2.6.2.3 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ DEL MICELIO IN PIASTRA

Nei casi in cui la crescita del micelio risultava completamente inibita (ICM = 100%) dalla presenza della “minima concentrazione bioattiva” di estratto nel terreno nutritivo, l’attività antifungina dell’estratto è stata distinta, secondo il metodo di Garber e Houston (1959) e poi modificato da Thompson (1989), in:

1. attività fungistatica (inibizione temporanea della crescita del micelio);
2. attività fungicida (inibizione permanente della crescita del micelio).

Tale distinzione è stata valutata trasferendo nuovamente tasselli di agar infungato su altre piastre contenenti solo PDA che sono state mantenute al buio in termostato a 23 ± 2 °C per 5 giorni.

Le osservazioni sull’eventuale crescita del micelio sono state osservate in modo qualitativo al 5° giorno dal trasferimento. La presenza di crescita indicava solo un’azione fungistatica (s) dell’estratto, mentre l’assenza ne rivelava un’azione fungicida (c) dello stesso.

3. RISULTATI

I risultati delle prove di saggio biologico condotte in piastra sui sei isolati fungini fitopatogeni presi in considerazione nel corso di queste prove sono riportati nella Tabella 2 e nella Tabella 3.

3.1 EFFETTI DEL METANOLO-ACETONE SULLA VITALITA' DEGLI ISOLATI FUNGINI

L'attività biologica di tutti gli isolati fungini osservata sulle piastre di PDA a cui era stata aggiunta solo la miscela di metanolo-acetone (testimone A) non è risultata diversa da quella riscontrata sulle piastre contenenti solo PDA (testimone B).

Per quanto riguarda la germinazione dei conidi si sono infatti ottenuti in tutti i casi percentuali di germinazione pari al 100%. Per quel che concerne l'inibizione della crescita radiale del micelio di tutti gli isolati fungini si sono rilevate percentuali di inibizione pari allo 0%.

3.2 EFFETTI ANTIFUNGINI DEGLI ESTRATTI GREZZI DI ARANCIO DOLCE, OLIVO COLTIVATO ED ALLORO

I risultati riportati nella Tabella 2 e nella Tabella 3 dimostrano chiaramente l'esistenza di effetti antifungini degli estratti grezzi di arancio dolce, olivo coltivato ed alloro su tutti gli isolati fungini fitopatogeni saggiati nel corso di queste prove.

3.2.1 EFFETTI ANTIFUNGINI INDOTTI DAGLI ESTRATTI DI ARANCIO DOLCE

Dai biosaggi eseguiti sui campioni di estratto di arancio dolce si può rilevare quanto segue.

Citrus 1: L'attività antifungina massima (percentuale di germinazione dei conidi pari allo 0% ed un'attività fungicida) si rileva per tutti gli isolati con l'aggiunta al terreno di coltura di 80 µg/ml di estratto.

OAD: L'attività antifungina massima (percentuale di germinazione dei conidi pari allo 0% ed un'attività fungicida) si rileva per tutti gli isolati con l'aggiunta al terreno di coltura di 800 µg/ml di estratto. Invece, con l'aggiunta al terreno di coltura di 80 µg/ml di estratto si ha una germinazione dei conidi variabile dall'8% al 17% a seconda degli isolati, con eccezione di *S. oleagina* in cui il 30% dei conidi sono germinati. Inoltre, è stata rilevata solo un'attività fungistatica per tutti gli isolati.

Cs1: Con una aggiunta al terreno di coltura di 800 µg/ml di estratto, si osserva una percentuale di germinazione dei conidi pari allo 0% ed una attività fungistatica per tutti gli isolati.

Matrice vegetale trattata Identificazione del campione saggiato	Foglie di Arancio dolce									Foglie di Olivo coltivato									Foglie di Alloro								
	Citrus 1			Cs1			OAD			Olea 1			Oe 1			Laurus 1			Ln 1			OAL					
	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8
<i>Alternaria alternata</i>	0	0	13	0	12	43	0	8	32	100	100	100	0	0	52	0	0	48	0	58	100	0	11	31			
<i>Ascochyta rabiei</i>	0	0	21	0	39	65	0	10	34	100	100	100	0	0	49	0	0	43	0	43	100	0	14	63			
<i>Cladosporium fulvum</i>	0	0	11	0	18	63	0	10	42	100	100	100	0	0	41	0	0	35	0	56	100	0	8	27			
<i>Fusarium culmorum</i>	0	0	26	0	32	55	0	13	43	100	100	100	0	0	46	0	0	45	0	67	100	0	12	54			
<i>Fusarium solani</i>	0	0	28	0	8	62	0	17	46	100	100	100	0	0	47	0	0	36	0	71	100	0	13	52			
<i>Spilocaea oleagina</i>	0	0	53	0	80	100	0	30	88	100	100	100	0	0	67	0	0	41	0	77	100	0	25	43			

Tabella 2

Matrice vegetale trattata Identificazione del campione saggiato	Foglie di Arancio dolce									Foglie di Olivo coltivato									Foglie di Alloro								
	Citrus 1			Cs1			OAD			Olea 1			Oe 1			Laurus 1			Ln 1			OAL					
	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8	800	80	8
<i>Alternaria alternata</i>	100c	100c	76	100s	66,5	30	100c	100s	55	0	0	0	100s	100s	54	100c	100c	65	100s	52	12	100s	69	25			
<i>Ascochyta rabiei</i>	100c	100c	81	100s	100s	57	100c	100s	68	0	0	0	100s	100s	47	100c	100c	63	100s	44	8	100c	68	37			
<i>Cladosporium fulvum</i>	100c	100c	66	100s	100s	48	100c	100s	52	0	0	0	100s	100s	52	100c	100c	75	100s	58	22	100s	77	36			
<i>Fusarium culmorum</i>	100c	100c	73	100s	48,4	15	100c	100s	45	0	0	0	100s	100s	45	100c	100c	60	100s	48	7	100c	70	28			
<i>Fusarium solani</i>	100c	100c	83	100s	100s	27	100c	100s	49	0	0	0	100s	100s	61	100c	100c	76	100s	32	2	100c	60	18			
<i>Spilocaea oleagina</i>	100c	100c	54	100s	60,6	31	100c	100s	42	0	0	0	100c	100c	61	100c	100c	71	100s	55	9	100s	74	25			

Tabella 3

Legenda:
s = Effetto fungistatico
c = Effetto fungicida

3.2.2 EFFETTI ANTIFUNGINI INDOTTI DAGLI ESTRATTI DI ALLORO

Dai biosaggi eseguiti sui campioni di estratto di alloro si può rilevare quanto segue.

Laurus 1: L'attività antifungina massima (percentuale di germinazione dei conidi pari allo 0% ed una attività fungicida) si rileva per tutti gli isolati con l'aggiunta al terreno di coltura di 80 µg/ml di estratto.

OAL: L'attività antifungina massima (percentuale di germinazione dei conidi pari allo 0% ed una attività fungicida) si rileva solo per alcuni isolati con l'aggiunta al terreno di coltura di 800 µg/ml di estratto su *A. rabiei*, *F. culmorum* e *F. solani*. Viceversa, a questa stessa concentrazione di estratto nel terreno di coltura, per i funghi *A. alternata*, *C. fulvum* e *S. oleagina* si osserva solo un'azione fungistatica.

Ln1: Con una aggiunta al terreno di coltura di 800 µg/ml di estratto si osserva, per tutti i funghi considerati, una percentuale pari allo 0% di germinazione dei conidi e un'attività fungistatica ma non fungicida.

3.2.3 EFFETTI ANTIFUNGINI INDOTTI DAGLI ESTRATTI DI OLIVO

Situazione molto diversa dalle due precedenti è risultata dai saggi biologici condotti con i campioni di estratto di olivo ottenuti con CO₂ supercritica.

Nessuna attività antifungina è stata osservata con l'aggiunta al terreno di coltura di estratto **Olea 1** alle concentrazioni sperimentate.

Un'attività antifungina è stata invece osservata con l'aggiunta al substrato di coltura di estratto **Oe1**. L'attività antifungina maggiore si osserva con l'aggiunta di 80 µg/ml di estratto **Oe1**. A tale concentrazione si osserva, infatti, una percentuale pari allo 0% di germinazione dei conidi ed una attività fungistatica per quasi tutti gli isolati, ad eccezione per *S. oleagina*, in cui l'azione dell'estratto **Oe1** è risultata fungicida.

4. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti si prestano ad essere interpretati sotto almeno due aspetti:

1. Confronto dell'efficacia antifungina dello stesso materiale vegetale in funzione delle diverse tecnologie estrattive sperimentate.
2. Confronto dell'efficacia antifungina dei diversi materiali vegetali saggiati in funzione della stessa tecnica estrattiva sperimentata.

4.1 CONFRONTO DELL'EFFICACIA ANTIFUNGINA DELLO STESSO MATERIALE VEGETALE IN FUNZIONE DELLE DIVERSE TECNOLOGIE ESTRATTIVE SPERIMENTATE

Questo aspetto risulta essere molto importante in quanto ci fornisce utili indicazioni sull'individuazione della migliore tecnica estrattiva da utilizzare in funzione dello specifico profilo fitochimico della matrice vegetale presa in considerazione.

Per le foglie di arancio dolce appare evidente che, a parità di minima concentrazione bioattiva sperimentata (80 µg/ml) di estratto aggiunto al terreno di coltura, il campione identificato con la sigla **Citrus 1** risulta essere più efficace di quello identificato con la sigla **OAD** e che questo, a sua volta, esercita un'azione antifungina migliore rispetto a quello identificato con la sigla **Cs 1**.

Possiamo quindi stabilire una scala empirica di "efficacia antifungina" così rappresentabile:

$$\boxed{\text{Citrus 1} > \text{OAD} > \text{Cs 1}}$$

Per le foglie di alloro si riscontra un'analogo andamento in cui, a parità di minima concentrazione bioattiva sperimentata (80 µg/ml) di estratto aggiunto al terreno di coltura, il campione identificato con la sigla **Laurus 1** risulta essere più efficace di quello identificato con la sigla **OAL** e che questo, a sua volta, esercita un'azione antifungina migliore rispetto a quello identificato con la sigla **Ln 1**.

Possiamo quindi stabilire, anche in questo caso, una empirica scala di "efficacia antifungina" di questo tipo:

$$\boxed{\text{Laurus 1} > \text{OAL} > \text{Ln 1}}$$

Per le foglie di olivo, a parità di concentrazione di estratto aggiunto al terreno di coltura (80 µg/ml), il campione identificato con la sigla **Oe 1** ha mostrato una maggiore efficacia antifungina rispetto al campione **Olea 1** che, al contrario, si è dimostrato del tutto inefficace.

Pertanto, possiamo in questo caso dire che:

$$\boxed{\text{Olea 1} < \text{Oe 1}}$$

Riassumendo, si può dedurre che per quanto riguarda le foglie di arancio dolce e di alloro, la tecnica estrattiva che ha fornito i migliori risultati in termini di efficacia antifungina è stata quella che utilizza CO₂ supercritica alle condizioni operative di 110 bar e 40°C.

Per quanto riguarda, invece, le foglie di olivo, l'effetto antifungino si osserva solo con i campioni estratti con CO₂ supercritica alle condizioni operative di 500 bar e 50°C.

4.2 CONFRONTO DELL'EFFICACIA ANTIFUNGINA DEI DIVERSI MATERIALI VEGETALI SAGGIATI IN FUNZIONE DELLA STESSA TECNICA ESTRATTIVA SPERIMENTATA

Questo altro aspetto, anch'esso molto importante, ci fornisce invece utili indicazioni sull'individuazione della migliore matrice vegetale da cui ottenere un estratto con proprietà antifungine, in funzione del suo specifico profilo fitochimico, a parità di tecnica estrattiva sperimentata.

Per le foglie processate con la tecnica estrattiva SFE a 110 bar e 40°C si osserva che, a parità di minima concentrazione bioattiva sperimentata (80 µg/ml) di estratto aggiunto al terreno di coltura, l'effetto antifungino dei campioni siglati come **Citrus 1** e **Laurus 1** è molto simile, mentre **Olea 1** non produce alcun effetto antifungino.

Alle condizioni estrattive di 500 bar e 50°C, l'effetto antifungino degli estratti **Cs1** ed **Ln1** risulta essere meno efficace degli estratti di arancio ed alloro ottenuti a 110 bar e 40 °C anche se l'effetto dell'estratto **Cs 1** è risultato superiore rispetto a quello dell'estratto **Ln 1** limitatamente agli isolati fungini *A. rabiei*, *C. fulvum* e *F. solani*. Al contrario, alle condizioni estrattive di 500 bar e 50°C, l'estratto **Oe 1** ha svolto una marcata azione antifungina su tutti gli isolati fungini, e soprattutto sull'isolato di *S. oleagina* su cui ha esercitato un'azione fungicida.

Con la tecnica estrattiva in corrente di vapore, l'effetto antifungino risulta invece essere un pò più marcato per il campione **OAD** rispetto a **OAL**. Come già riferito in precedenza, per le foglie di olivo non possiamo effettuare alcun confronto in quanto in corrente di vapore non si è raccolto alcun estratto ma solo acqua di condensazione.

Riassumendo, possiamo quindi affermare che, a parità di tecnica estrattiva adoperata, le foglie di arancio risultano essere più idonee di quelle di alloro per l'estrazione di sostanze ad azione antifungina e che la tecnica estrattiva più adeguata all'estrazione di principi bioattivi ad attività antifungina è quella che utilizza CO₂ supercritica alle condizioni operative di 110 bar e 40°C.

Per quanto riguarda le foglie di olivo, queste risultano essere un buon materiale vegetale da cui ottenere principi bioattivi ad azione antifungina, ma solo se vengono processate con CO₂ supercritica alle condizioni operative di 500 bar e 50°C.

5. CONCLUSIONI

Possiamo quindi concludere affermando che le prove da noi effettuate hanno chiaramente dimostrato l'esistenza di una efficace attività antimicrobica *in vitro* degli estratti di *C. sinensis* e di *L. nobilis* a concentrazioni relativamente basse (comprese fra 80 e 800 µg/ml) su tutti gli isolati fungini fitopatogeni presi in considerazione.

Possiamo anche ritenere che per l'arancio dolce e l'alloro la tecnica estrattiva che ha fornito i migliori risultati è stata quella che ha impiegato CO₂ supercritica alle condizioni operative di 110 bar e 40°C (**Citrus 1** e **Laurus 1**) poiché ha probabilmente consentito, rispetto alle altre utilizzate, di estrarre una più ampia gamma di composti negli oli essenziali (sostanze fenoliche per l'arancio dolce e sostanze terpeniche per l'alloro) che, come già detto, sono dotati di attività antifungine.

E' necessario tener presente, inoltre, che negli estratti **Citrus 1** e **Laurus 1** sono presenti le cere cuticolari che, per loro natura, non sono dotate di un'azione antifungina basata su meccanismi di tipo biochimico. Tale presenza rende di fatto questi estratti meno concentrati in fenoli e in terpeni biologicamente attivi nell'antibiosi, per cui la stessa azione biocida potrebbe essere prodotta sugli stessi funghi a concentrazioni inferiori di estratto una volta che sono state eliminate le cere. Infatti, i campioni **OAD** e **OAL**, seppur privi di cere cuticolari, sono risultati tuttavia meno efficaci di **Citrus 1** e **Laurus 1** nell'antibiosi in quanto sono, probabilmente, meno concentrati in fenoli e in terpeni biologicamente attivi.

Sarà opportuno, pertanto, non considerando per il momento l'aspetto economico del processo, sperimentare in futuro estrazioni con CO₂ supercritica a 110 bar e 40 °C con una separazione delle cere cuticolari. Tale processo consente di ottenere un estratto costituito da due frazioni, una molto più concentrata in principi bioattivi ad azione antifungina (fenoli e terpeni) ed un'altra costituita dalle cere cuticolari utilizzabili, ad esempio, nel campo cosmetico.

Anche gli estratti di *O. europaea sativa* hanno mostrato un'attività antifungina in concentrazioni comprese fra 80 e 800 µg/ml su tutti gli isolati fungini fitopatogeni presi in considerazione, ed in particolare su *S. oleagina*, solo se però ottenuti con CO₂ supercritica alle condizioni operative di 500 bar e 50°C. Questa tecnica ha, probabilmente, consentito l'estrazione di diversi glucosidi biologicamente attivi come, ad esempio, l'oleuropeina, una sostanza dal sapore amaro di cui è nota da molto tempo l'attività soppressiva *in vivo* nei confronti di *S. oleagina* (Graniti e De Leo, 1966).

In conclusione, i risultati di queste prove, sebbene condotte solo *in vitro*, su una limitata collezione di isolati fungini fitopatogeni e per di più non supportate da adeguate e raffinate caratterizzazioni analitiche (HPLC, GC-MS) degli estratti ottenuti, forniscono comunque utili indicazioni preliminari sul possibile impiego degli oli essenziali di alloro e di arancio e degli estratti grezzi fogliari di olivo ottenuti con CO₂ supercritica nella difesa contro alcuni patogeni fungini di rilevante pericolosità negli areali mediterranei.

6. BIBLIOGRAFIA

- M. Cammareri, M. Zaccardelli, A. Errico, C. Conicella (2002) – Effetto di estratti grezzi di diverse specie di *Aster* sulla crescita, *in vitro*, di funghi fitopatogeni. *Atti IX Convegno Nazionale SIPaV “Innovazioni in Patologia Vegetale”*, 1-2 Ottobre, Roma.
- J. F. Clevenger (1928) – Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of American Pharmacological Association* 17: 346.
- P. Curir, C. Pasini, M. Sacco, F. D’Aquila (2002) – Risultati sperimentali di composti antifungini estratti da piante ornamentali. *Atti IX Convegno Nazionale SIPaV “Innovazioni in Patologia Vegetale”*, 1-2 Ottobre, Roma.
- D. J. Daferera, B. N. Ziogas, M. G. Polissiou (2003) – The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection* 22: 39-44.
- S. N. Dixit, H. Chandra, R. Tiwari, V. Dixit (1995) – Development of a botanical fungicide against blue mold of mandarins. *Journal of stored products research* 31 (2): 165-172.
- C. Fiorini, B. David, I. Fourasté, J. Vercauteren (1998) – Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves. *Phytochemistry* 47: 821-824.
- R. H. Garber and B. R. Houston (1959) – An inhibitor of *Verticillium albo-atrum* in cotton seed. *Phytopathology* 49: 449-450.
- A. Graniti e P. De Leo (1966) – Osservazioni su *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes II. Resistenza alla macerazione enzimatica come reazione di difesa delle foglie di olivo al parassita. *Phytopathologia mediterranea* 5: 65-79.
- B. Kivçak; T. Mert (2002) – Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia* 73: 242-243.
- P.E. Laks e M.S. Pruner (1989) – Flavonoid biocides: structure/activity relations of flavonoid phytoalexin analogues. *Phytochemistry* 28: 87-91.
- B. Le Tutour e D. Guedon (1992) – Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 4: 1173-1178.
- G. Pirajno, G. Scarito e A. Salamone (2004) – Attività inibente degli oli essenziali di *Laurus nobilis* L., *Menta x piperita* L. e *Ruta graveolens* L. su *Rhizoctonia solani* Kunn e *Sclerotinia sclerotiorum* (L.) De Bary. *Atti XI Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale (SIPaV), Milano 29 settembre – 1 ottobre*.
- Y. Saks and R. Barkai-Golan (1995) – *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. Postharvest. *Biology and Technology* 6: 159-165.
- S. K. Shahi, M. Patra, A. C. Shukla, A. Dikshit (2003) – Use of essential oil as botanical-pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruits. *BioControl* 48: 223-232.

- C.C. Tassou, G.J.E. Nychas (1995) – Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system *Letters in Applied Microbiology* 20: 120-124.

- D.P. Thompson (1989) – Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*, 81 (1) 151-153.

-S.A.J. Zaat, A.A.N. van Brussel, T. Tak, et al. (1987) – Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nodDABC gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *Journal of Bacteriology* 169: 3388-3391.

- A. Zambonelli, A. Bianchi, M. Curini, F. Epifano, R. Bruni, M. Iotti (2003) – Effetto degli oli essenziali di *Erigeron canadensis* e *Myrtus communis* sullo sviluppo di funghi fitopatogeni *in vitro*. Convegno AIPP “*Problemi fitopatologici emergenti e implicazioni per la difesa delle colture*”. Sanremo (IM), 27-28 novembre.