

Sviluppo di nanovettori lipidici veicolanti timolo come alternativa biocompatibile ai fitofarmaci tradizionali

F.Menicucci¹, M.Michelozzi², A.Raio², M.Tredici³, M.Belli⁴, G.Cencetti², M.Carta², A.Papini⁴, I.Clemente¹, C.Gonnelli⁴, S.Ristori¹

¹Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze; ² Consiglio Nazionale delle Ricerche, Firenze; ³ Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università degli Studi di Firenze; ⁴Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze

Obiettivi

L'interesse di questo studio è sviluppare nanovettori lipidici di derivazione biologica caricati con timolo e valutarne l'effetto nei confronti del patogeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (abbr. Xcv), responsabile di una batteriosi che interessa la pianta di pomodoro¹. L'azione antibatterica e fungicida del timolo è comprovata da numerosi studi², tuttavia la natura volatile di questo composto ne pregiudica l'efficacia a lungo termine. Questo problema potrebbe essere aggirato caricando il monoterpene in nanoformulazioni biocompatibili, che ne aumentino la biodisponibilità consentendone un rilascio graduale nel tempo.

Metodi

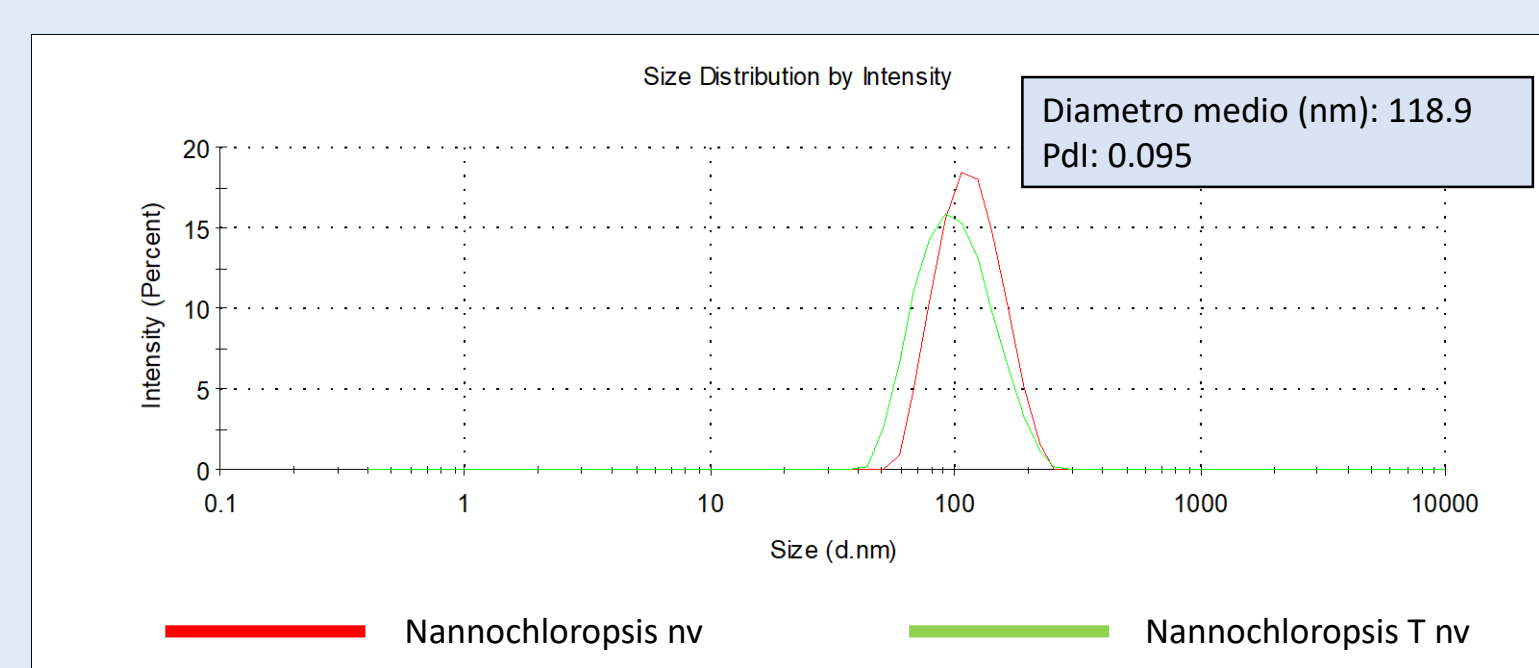
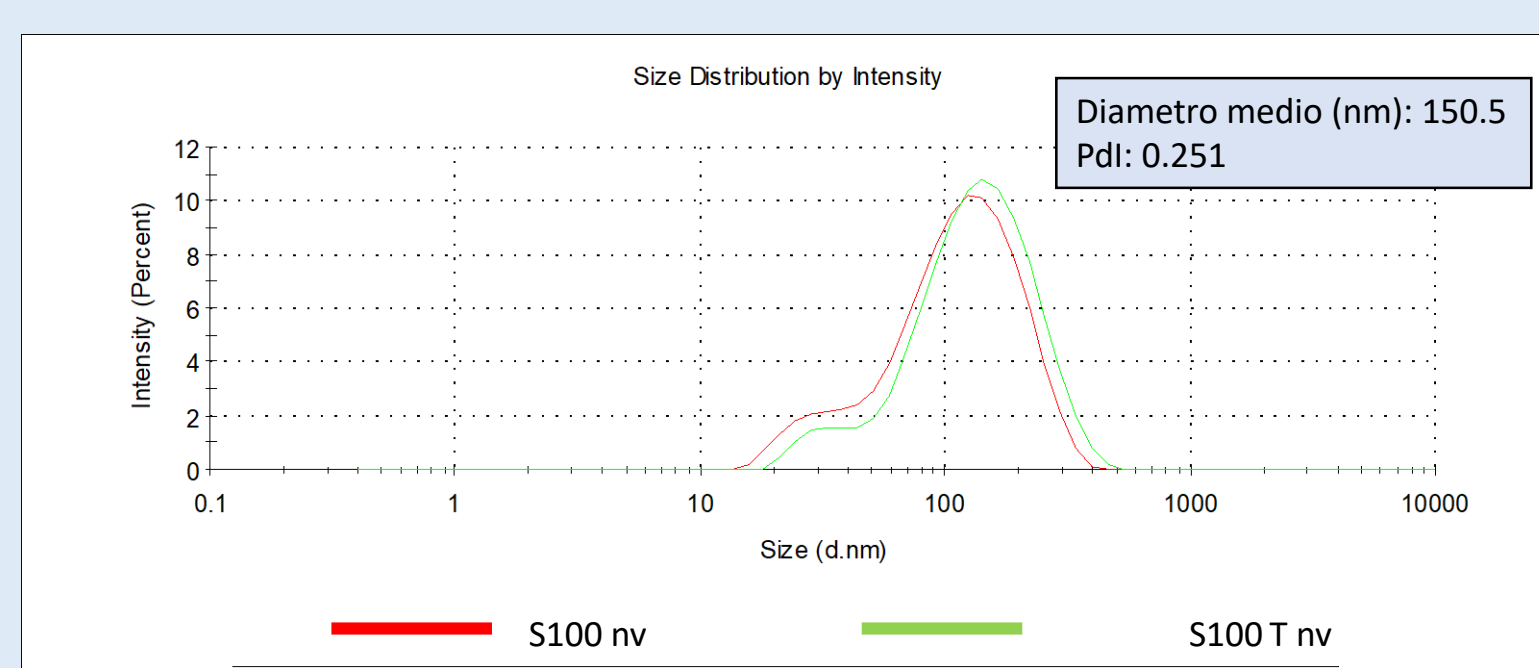
Sviluppo di nanovettori La frazione lipidica di *Nannochloropsis* sp., microalga marina il cui contenuto lipidico può raggiungere il 68% della biomassa totale³, è stata ottenuta utilizzando una miscela di estrazione cloroformio/metanolo (1/2 v/v), addizionata di lipide sintetico 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (10%) e di timolo (10⁻²M), essiccata e infine reidratata, ottenendo così i nanovettori. Infine, otto cicli di *freeze-thaw* seguiti da sonicazione hanno omogeneizzato e ridotto di dimensioni le nanoparticelle. Una formulazione lipidica caricata con timolo, interamente costituita da fosfatidilcolina (miscela lipidica standard), è stata prodotta in parallelo a quella derivante dalla microalga, seguendo lo stesso protocollo.

Test in vitro L'inibizione della crescita di Xcv coltivato su terreno liquido NB (Nutrient Broth) e, conseguentemente, l'effetto tossico delle nanoformulazioni cariche di timolo su di esso, sono stati valutati misurando la crescita del batterio a 24, 48 e 72h dall'inizio dell'esperimento tramite letture di assorbanza a 530nm.

Risultati

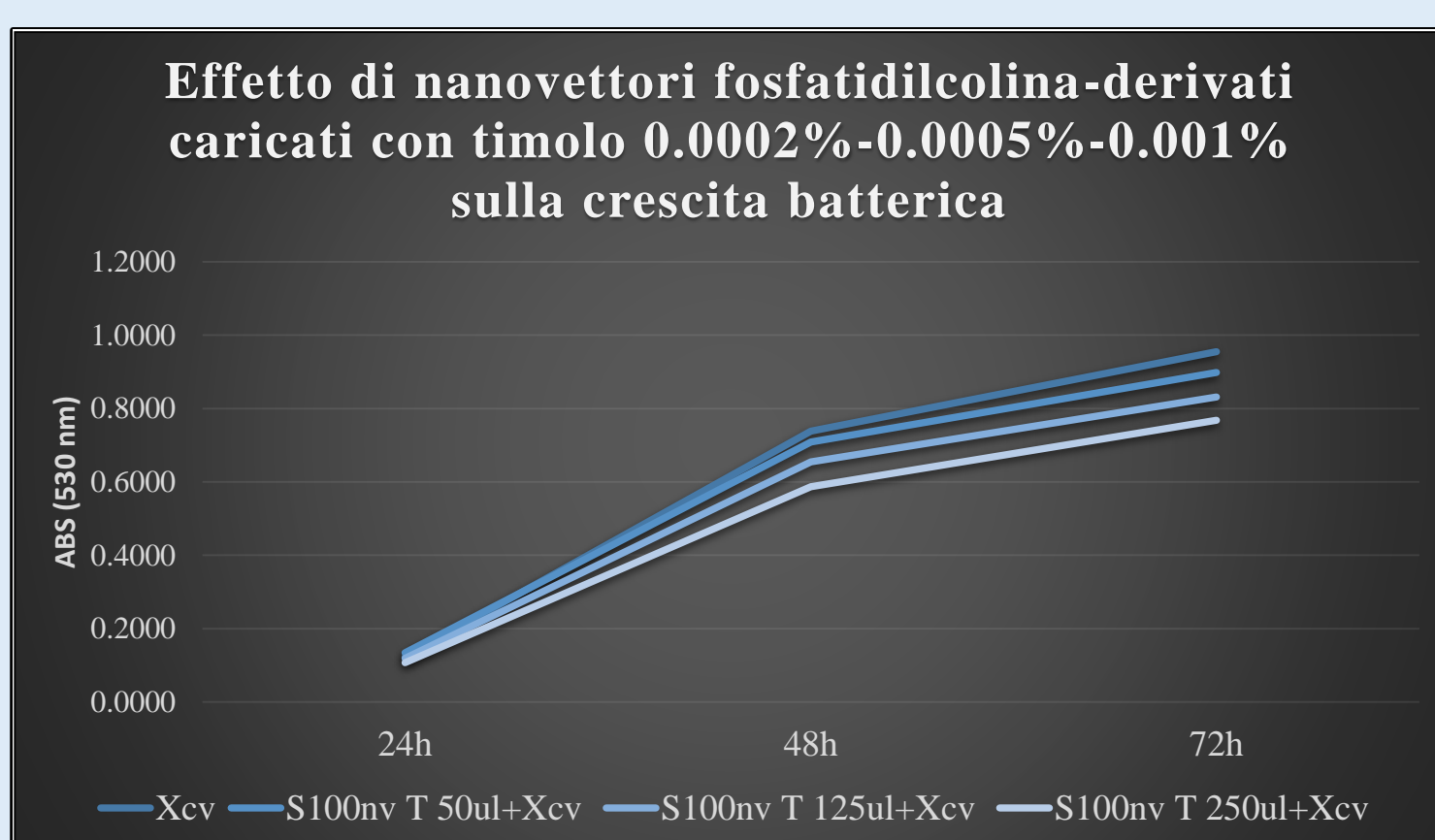
Analisi DLS Le due nanoformulazioni lipidiche ottenute sono state caratterizzate tramite *Dynamic Light Scattering*: il diametro medio delle particelle è inferiore a 200nm e l'aggiunta di timolo non ne altera le dimensioni. L'indice di polidispersione (PdI) è in entrambi i casi inferiore a 1,1 e rende conto della monodispersione che caratterizza le distribuzioni.

LEGENDA
S100 = nanovettori fosfatidilcolina-derivati
Nv = nanovettori
T = timolo
PdI = indice di polidispersione



Analisi GC-MS L'analisi gascromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) ha permesso di determinare il contenuto di timolo presente nei nanovettori; i risultati sono schematizzati nella tabella.

NANOVETTORI	CONTENUTO di TIMOLO (ug/ml)	EFFICIENZA DI CARICAMENTO (%)
Nannochloropsis-derivati	18.258	8.7
Fosfatidilcolina-derivati	217.482	100



Test in vitro Prove preliminari hanno messo in evidenza l'effetto tossico del timolo tal quale nei confronti di Xcv coltivato su terreno solido NAG (Nutrient Agar Glucose). Il test *in vitro* effettuato con nanovettori fosfatidilcolina-derivati carichi di timolo ha mostrato una diminuzione della crescita di Xcv all'aumentare della concentrazione di nanovettori nel terreno, sebbene questo decremento non sia statisticamente significativo.

Conclusioni

I risultati ottenuti dal test *in vitro* indicano che la presenza di nanovettori caricati con timolo ha un effetto inibente la crescita di Xcv, tuttavia non è stato riscontrato un abbattimento significativo di tale crescita alle concentrazioni testate. Pertanto lo sviluppo di nanoformulazioni a più alta concentrazione di timolo è attualmente in corso. Il passo successivo prevederà la somministrazione dei nanovettori su piante di pomodoro infettate da Xcv.

Bibliografia

- 1) Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J., & Stall, R. E. (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4(1), 81-88.
- 2) Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.
- 3) Bondioli, P., Della Bella, L., Rivolta, G., Zittelli, G. C., Bassi, N., Rodolfi, L., ... & Tredici, M. R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource technology*, 114, 567-572.