

ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DELL'ESTRATTO DI *PUNICA GRANATUM* SULLA *SHELF-LIFE* DELLE FRAGOLE: ANALISI FITOCHIMICHE E POSSIBILI MECCANISMI DI AZIONE

D. RONGAI¹, S. NADIA², C. DI MARCO²

¹Centro di ricerca Difesa e Certificazione, via C.G Bertero, 22 - 00156 Roma, Italy

²Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, ulteriore sede di servizio attiva di Pescara (PE)

domenico.rongai@crea.gov.it

RIASSUNTO

In Italia le fragole sono tra le più importanti realtà frutticole e la muffa grigia (*Botrytis cinerea*) rappresenta la malattia più grave soprattutto durante la fase di postraccolta. Una strategia alternativa di contenimento potrebbe essere l'uso di composti bioattivi di origine vegetale con elevata attività antifungina. In questo lavoro sono stati eseguiti test in vitro e in vivo per valutare gli effetti dell'estratto di *Punica granatum* sulla muffa grigia della fragola. L'efficacia è stata valutata anche dalla spettroscopia Infrarossi di Fourier Transform Near Infrared che ha mostrato un'alta correlazione tra spettri e gravità della malattia. Inoltre, attraverso un approccio di chimica computazionale, è stato descritto un meccanismo molecolare di interazione tra la molecola bioattiva dell'estratto (punicalgina) e l'ergosterolo della membrana fungina.

Parole chiave: muffa grigia, punicalgina, malattie in postraccolta, ergosterolo, chimica computazionale

SUMMARY

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *PUNICA GRANATUM* EXTRACT ON THE SHELF LIFE OF STRAWBERRIES: PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION

In Italy strawberries are among the most important fruit crops and gray mold (*Botrytis cinerea*) represents the most serious disease, especially in post harvesting. An alternative containment strategy could be the use of bioactive plant compounds with high antifungal activity. In this work, in vitro and in vivo tests were performed to evaluate the effects of the *Punica granatum* extract on the strawberry gray mold. Effectiveness was also evaluated by the Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy which showed high correlation between spectra and severity of the disease. In addition, through a computational chemistry approach, a molecular mechanism of interaction between the bioactive extract molecule (punicalagin) and ergosterol of the fungal membrane is described.

Keywords: gray mold, punicalagin, postharvest diseases, ergosterol, computational chemistry

INTRODUZIONE

In Italia le fragole (*Fragaria x ananassa* Duch.) sono tra le più importanti realtà frutticole e la muffa grigia (*Botrytis cinerea*) rappresenta la malattia più grave soprattutto durante la fase di post raccolta. Per prolungare la shelf life delle fragole, si fa largo uso dei fungicidi di sintesi con trattamenti eseguiti durante la fase di fioritura in modo da ridurre le infezioni sui frutti, mentre la raccolta è eseguita la mattina presto utilizzando contenitori refrigerati.

Una strategia più *eco-friendly* è l'uso di microrganismi quali *Cryptococcus albidus* con trattamenti in pieno campo (Helbig, 2002), oppure con prodotti a base di glutatione, oligosaccaridi, laminarina e chitosano (Landi et al., 2014). Molti composti di origine vegetale

come allicina, glucosinoli, oli essenziali di origano e di timo sono stati riportati come efficaci contro la muffa grigia (Lopez-Reyes et al., 2010; Nabigol and Morshedi, 2011). Tuttavia, è stato dimostrato che il controllo dell'infezione da botrite è più efficace quando è effettuato in postraccolta (Romanazzi et al., 2013), pertanto molte strategie di difesa si basano sull'uso di agenti disinfettanti o trattamenti fisici mediante irradiazione UV-C o applicazioni ipobariche e iperbariche dell'ozono (Mlikota Gabler et al., 2010; Romanazzi et al., 2012).

Nel presente lavoro è stata saggiata in vitro e in vivo l'efficacia dell'estratto acquoso della buccia di melograno (*Punica granatum*) su *B. cinerea*. *P. granatum* è molto ricca di composti bioattivi (Rongai et al., 2015), e la sua attività antimicrobica è correlata al contenuto di fenoli e flavonoidi (Rongai et al., 2017). La presenza di punicalagina e acido ellagico (I principali componenti bioattivi) sono determinati attraverso un metodo analitico semplificato HPLC-MS-MS (Fischer et al., 2011). La punicalagina, identificata come componente principale dell'estratto, è stata studiata, con approcci di chimica computazionale, allo scopo di accertare le sue proprietà molecolari e confrontarle con quelle di amphotericina B.

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-NIR) è considerata un potente metodo non distruttivo per il controllo qualitativo di molti prodotti alimentari (Bendini et al. 2007). Utilizzando uno spettrometro (Erkin Elmer), sono stati presi, in riflettanza, i valori degli spettri su fragole sane ed infette.

Per concludere, con questa ricerca è stata valutata la potenzialità dell'estratto acquoso di melograno allo scopo di preservare la qualità ed estendere la shelf-life delle fragole.

MATERIALI E METODI

Fragole, melograni e funghi usati

Le fragole sono state prese in un market di prodotti biologici. Per le prove sono state selezionate fragole della stessa misura, senza difetti visibili e con lo stesso grado di maturazione. I melograni (cv Dente di cavallo) provenienti dai giardini botanici del CREA-DC di Roma, sono stati trattati secondo il metodo descritto da Rongai et al., (2017). La buccia di melograno è stata tagliata a pezzi, inserita in beuta col solvente (acqua) e poi messa in un sonicatore per 15 minuti. La miscela è stata fatta prima agitare a 40°C per 24h, poi centrifugata a 7.000 rpm per 10 minuti, infine il supernatante è stato filtrato (0,45 µm). Il prodotto ottenuto, l'estratto acquoso della buccia di melograno (AEBM), è stato congelato a -80°C e liofilizzato. Il fungo *B. cinerea* (ceppo numero 1623 del CRA-DC Roma) è stato mantenuto su potato dextrose agar (PDA, OXOID CM 0139) e conservato a 4°C. Al bisogno l'isolato è stato fatto crescere per 8 giorni su PDA in incubatore a 25±2°C.

Esperimento *in vitro*

L'efficacia di EABM è stata valutata su piastre Petri da 90 mm contenenti 20 mL di PDA con aggiunti 15, 30 e 60 mg /mL (w/v) di polvere, corrispondenti rispettivamente a 0,75; 1,5 e 3%. PDA con acqua sterile è stato usato come controllo. Al centro di ogni piastra è stato posto un tassello di 5 mm di diametro preso da una piastra colonizzata da *B. cinerea*, poi tutte le piastre sono state incubate a 25±2°C. A partire dal terzo giorno e fino al sesto, è stata misurata la crescita miceliare. La percentuale di inibizione di ogni piastra con estratto è stata calcolata con la formula: % inibizione = 100 × (il diametro della colonia nella piastra del controllo – il diametro della colonia nella piastra con l'estratto) / il diametro della colonia nella piastra del controllo. Per ogni tesi sono state eseguite quattro repliche e il test ripetuto due volte.

Esperimento *in vivo*

Le fragole sono state immerse per 30 s in 2 L di soluzione con diverse concentrazioni di estratto, mentre quelle del controllo sono state immerse in acqua deionizzata. Dopo i trattamenti i frutti sono stati fatti asciugare per circa 1 ora e poi messi su carta assorbente dentro scatole di plastica. Successivamente sono stati conservati per 2 giorni a 0 ± 1 °C, 95-98% RH e per altri 3 gg a 20 ± 1 °C, 95-98% RH (in modo da simulare lo shelf life).

Ogni tesi era costituita da 72 frutti (18 frutti x 4 repliche) e comprendeva a) controllo non trattato; b) frutti trattati con EABM alla concentrazione dello 0,75%; c) frutti trattati con EABM alla concentrazione del 1,5%; d) frutti trattati con EABM alla concentrazione del 3%.

Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-NIR)

Gli spettri del vicino infrarosso (Near -Infrared) in trasformata di Fourier sono stati acquisiti in riflettanza diffusa sulla superficie esterna delle fragole utilizzando un spettrometro FT-NIR (Erkin Elmer). Sono state eseguite sessantaquattro scansioni per spettro di riflettanza in circa 30.1 s, intervallo $10.000-4.000$ cm^{-1} , risoluzione di spettro 16 cm. Il modello chemometrico è stato costruito con il software PCR/PLS interfacciato con lo spettrometro Erkin Elmer utilizzando il tipo di validazione “full cross”. Attraverso una regressione multipla lineare di componenti principali (PCR) della matrice composta dagli spettri (variabili indipendenti) rispetto al valore numerico rappresentato dalla gravità della malattia (variabile dipendente), è stato costruito un modello chemiometrico NIR per la predizione della gravità della malattia su fragole infettate da *Botrytis cinerea*.

Analisi HPLC--MS-MS-ES(-) e chimica computazionale

L'estratto acquoso della buccia di melograno (EABM) è stato analizzato con HPLC--MS-MS-ES(-) secondo il metodo descritto da Rongai et al., (2017).

Simulazioni di dinamica molecolare della p-alagina e AmB e successiva analisi dei campi di interazione molecolare sono state effettuate con il programma “gromacs” mediante uno schema di lavoro descritto in lavori precedenti (Storchi et al., 2015; Marrone et al., 2016). Brevemente, dopo avere simulato la struttura in soluzione acquosa di p-alagin e AmB per un tempo sufficiente (500 ns), le relative traiettorie sono state clusterizzate identificando le strutture più rappresentative. Quest'ultime sono state poi soggette all'analisi dei campi molecolari che consentono di delimitare zone di interazione nello spazio che circonda la molecola di interesse. Quest'analisi è stata condotta impiegando software inhouse sviluppato in Python.

Tutte le rappresentazioni grafiche delle strutture e dei campi molecolari sono state effettuate con le interfacce grafiche VMD (Humphrey et al., 1996) o Maestro (versione 9.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2013).

Analisi statistica

E' stata eseguita l'analisi della varianza Anova e i valori medi sono stati confrontati con Fisher's protected LSD test a $p \leq 0,05$. SigmaPlot versione SPW10 e Sigma Stat versione 3.5 sono state usate per la creazione dei grafici.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Esperimenti *in vitro* ed *in vivo*

In vitro, l'attività antifungina di EABM testato a tre differenti concentrazioni, ha mostrato che aumentando la concentrazione, la crescita miceliare diminuiva (tabella 1). Al 3° giorno dall'inoculo e alla concentrazione dello 0,75% essa è stata di 32,7 mm, valore

significativamente più basso di 53,7 mm raggiunto nella piastra del controllo. Al 6° giorno le piastre del testimone non trattato sono state interamente invasa dal fungo mentre in quelle con il 3% di EABM la crescita è stata significativamente più bassa (31 mm). Non ci sono state differenze significative nella crescita miceliare al quinto giorno tra le concentrazioni di 1,5% e 3%. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che alle concentrazioni più elevate l'estratto non si dissolve completamente nel PDA, probabilmente perché l'acidità è troppo elevata.

In vivo, EABM ha ridotto la gravità della malattia e l'incidenza di muffa grigia sulle fragole, anche alla dose più bassa (0,75%) (figura 1). Aumentando la concentrazione dell'estratto, sia la gravità della malattia (DS) sia l'incidenza della malattia (DI) sono diminuite: le fragole trattate con lo 0,75% di EABM la DS e la DI sono stati di 29,33 e 66,6% rispettivamente, valori statisticamente inferiori rispetto a 74,66 e 93,33% ottenuti nel testimone non trattato. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata tra le concentrazioni 0,75 e 1,5%, mentre a 3% l'estratto è apparso più efficace con valori di DS e DI rispettivamente del 19,3 e 40% (figura 2).

Tabella 1 – Crescita miceliare di *B. cinerea* a tre differenti dosi dell'estratto acquoso della buccia di melograno (EABM). I valori nella stessa colonna seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti (LSD test, $p < 0,05$).

Tesi	Crescita miceliare di <i>cinerea</i>			
	3°giorno <i>mm</i>	4°giorno <i>Mm</i>	5°giorno <i>mm</i>	6°giorno <i>mm</i>
Testimone	53,7 ±0,33a	60,2 ±0,09a	69,0 ±0,33a	89,5 ±0,10a
EABM (0,75%)	32,7 ±0,27b	34,0 ±0,18b	37,5 ±0,33b	41,7 ±0,23b
EABM (1,50%)	26,0 ±0,29c	28,3 ±0,08c	29,5 ±0,12c	35,7 ±0,17c
EABM (3%)	18,0 ±0,14d	21,0 ±0,08d	28,8 ±0,17c	31,0 ±0,11d
	F=128,74 $p < 0,001$	F=833,34 $p < 0,001$	F=216,18 $p < 0,001$	F=1078,83 $p < 0,001$

Figura 1. Effetto di EABM alle concentrazioni dello 0,75%, 1,5 e 3% su frutti di fragole infette da *B. cinerea* 7 giorni dopo i trattamenti.

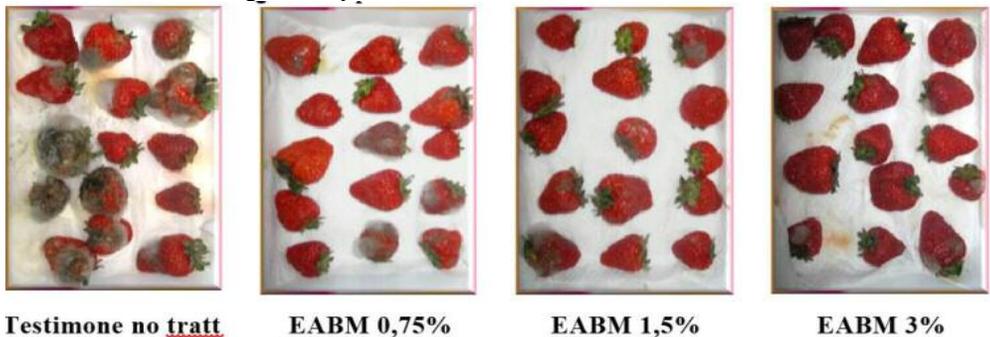
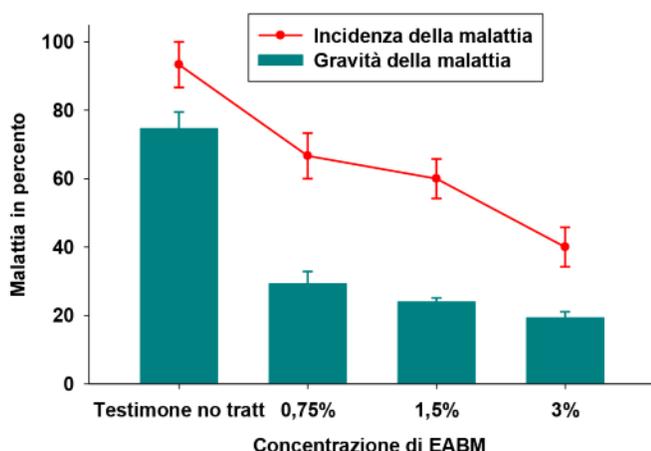


Figura 2. Percentuale dell'incidenza e gravità della malattia su frutti di fragola infette da *B. cinerea* e trattate con l'estratto acquoso delle bucce di melograno (EABM) a tre diverse concentrazioni (0,75, 1,5 e 3%).



Analisi HPLC--MS-MS-ES(-)su EABM e chimica computazionale

Le analisi chimiche hanno confermato l'identificazione delle punicalagine e dell'acido ellagico nell'estratto EABM.

Sulla base del presupposto che punicalagina e AmB possono formare analogamente pori trans-membrana responsabili della loro attività antifungina, le proprietà di interazione molecolare di entrambe le molecole sono state anche studiate e confrontate attraverso approcci computazionali.

La similarità molecolare tra AmB e p-alagina è stata indagata mediante uno schema computazionale riportato in precedenza sulla base della combinazione di simulazione della dinamica molecolare (MD) e dell'analisi del campo di interazione molecolare (MIF) (Storchi et al., 2015; Marrone et al., 2016). La simulazione di dinamica molecolare ha permesso di caratterizzare le conformazioni più rappresentative di AmB e p-alagina per ottenere un'immagine multiconformazionale (dinamica) delle strutture molecolari. Il calcolo del MIF ha consentito di caratterizzare lo spazio che circonda ogni molecola con punti di elevata interazione, in modo che le strutture di AmB e p-alagina possano essere confrontate in termini di somiglianza di interazione. La mappatura dei campi dei donatori e accettori dei legami a idrogeno attorno a AmB e alla punicalagina è stata ottenuta mediante l'uso di sonde O e N1 e ha portato ai disegni tridimensionali riportati in (figura3).

I nostri calcoli hanno indicato che p-alagina e AmB sono entrambi amfifilici e presentano una simile disposizione spaziale dei campi molecolari N1 e DRY. Il campo polare N1 è esteso longitudinalmente e quasi parallelo alla regione idrofobica ed è presumibilmente responsabile di simili proprietà di aggregazione. Analogamente agli aggregati AmB riportati da Baginski et al., (2002), le unità p-alagina possono formare strutture a pori in cui la parete interna è formata dall'unità glucosidica e la parete esterna formata dalle parti idrofobiche compresa l'unità ellagica. La struttura di un aggregato putativo formato da otto unità di p-alagina è stata assemblata anche utilizzando strumenti di grafica molecolare (figura 4).

Figura 3. I campi di interazione molecolare calcolati utilizzando sonde N1 (blu), O (giallo) e DRY (rosso) sulla struttura più rappresentativa di AmB (A) e p-alagina (B). I MIF sono riportati come superfici iso (mesh) --- iso valore di -3, -3 e -0,3 per il campo N1, O e DRY, rispettivamente. Sono inoltre riportati i disegni 2D di AmB e p-alagina che mostrano le regioni con carattere idrofilo o idrofobico

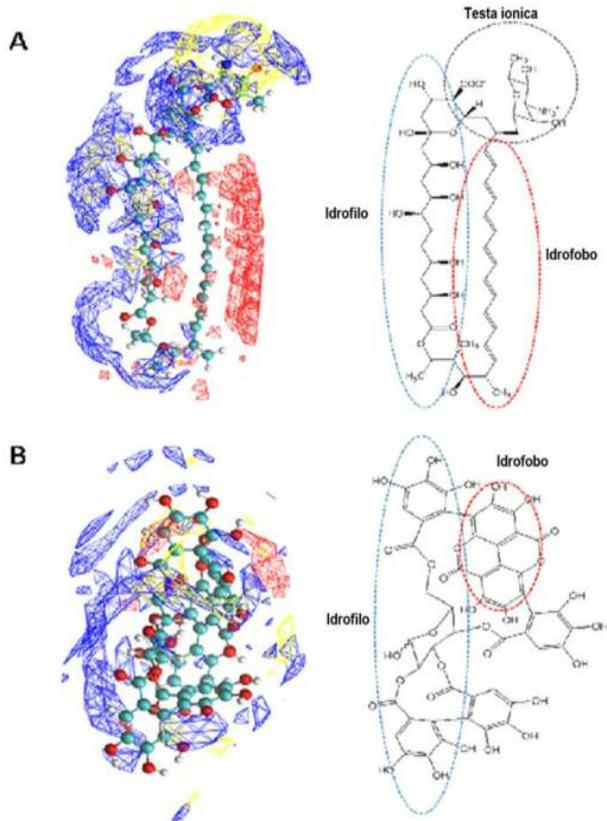
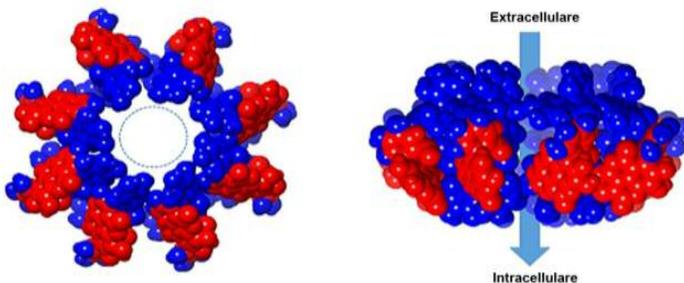


Figura 4. Vista superiore (sinistra) e laterale (destra) di un possibile aggregato extra-membrana formato da otto unità di p-alagina.



Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-NIR)

La spettroscopia FT-NIR eseguita sulla superficie delle fragole mostra una elevata correlazione tra gli spettri e la gravità della malattia utilizzata come proprietà analitica. Infatti, i dati NIR mostrano delle significative differenze tra gli spettri del campione non trattato e dei campioni trattati. L'efficacia di EABM è stata confermata dal modello chemiometrico predittivo costruito utilizzando i dati della severità della malattia e gli spettri NIR. L'analisi dei componenti principali (validazione full cross) ha mostrato una percentuale di varianza (R^2) = 98,8% ed un F value= 99,5. L'errore standard in fase di predizione (SEP) e di stima (SEE) erano rispettivamente 5,685 e 3,048.

L'attività antimicotica di EABM è confermata anche dall'osservazione diretta dei frutti omogeneizzati (figura 5). I campioni trattati con la dose più alta erano apparentemente senza funghi se confrontati con i corrispondenti controlli non trattati. Infatti, i campioni omogeneizzati non trattati sono stati completamente invasi da muffa grigia, mentre quelli trattati con EABM apparivano più chiari e sani.

Figura 5. Frutti di fragola omogeneizzati appartenenti alla tesi trattata (3%) e alla tesi del controllo non trattato dopo essere stati conservati per una settimana a 4 ± 1 ° C e 50-60% di umidità relativa



CONCLUSIONI

I risultati ottenuti con i test *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato la capacità dell'estratto di melograno di contenere lo sviluppo della *B. cinerea* su fragola e aumentarne quindi la shelf-life. È stato dimostrato anche un'elevata correlazione tra gli spettri FT-NIR e la gravità della malattia dei frutti, fornendo un modello NIR chemometrico in grado di prevedere la gravità della malattia. Inoltre, attraverso approcci di chimica computazionale, si è mostrato che la punicalagina e l'AmB sono caratterizzate da simili proprietà di interazione molecolare, probabilmente connesse alla loro capacità di formare aggregati poriformi.

Per concludere, la presente ricerca promuove l'uso dell'estratto acquoso della buccia di melograno (EABM) come fungicida per controllare il decadimento delle fragole in post raccolta. La sostituzione di agrofarmaci sintetici con molecole vegetali riduce la quantità di sostanze chimiche nell'ambiente e gli effetti indesiderati come la contaminazione della catena alimentare. Il nostro lavoro suggerisce che EABM, potrebbe essere un'alternativa ai prodotti sintetici per controllare i deterioramenti in post raccolta e migliorare la qualità dei frutti evitando l'impatto delle sostanze chimiche sulla salute umana. Questo è anche un importante obiettivo delle politiche agricole della Comunità europea.

LAVORI CITATI

- Bendini A., Cerretani L., Di Virgilio F., Belloni P., Bonoli-Carbognin M., Lercker G., (2007) Preliminary evaluation of the application of the FT-IR Spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality* 30,424–437
- Fischer U.A., Carle R., Kammerer DR., (2011) Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. *Food Chemistry* 127, 807–821
- Helbig J., (2002) Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *Biocontrol* 47, 85-99
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K., (1996) VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 14, 33-38
- Landi L., Feliziani E., Romanazzi G., (2014) Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3047-3056
- Lopez-Reyes JG., Spadaro D., Gullinoa M.L., Garibaldi A., (2010) Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. *Flavour Fragr J* 25:171-177
- Mlikota Gablera F., Smilanickb J.L., Mansourb M.F., Karaca H., (2010) Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 55(2):85–90
- Marrone A., Re N., Storchi L., (2016) The Effects of Ca²⁺ Concentration and E200K Mutation on the Aggregation Propensity of PrPC: A Computational Study. *PLoS ONE* 11(12): e0168039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168039>.
- Nabigol A and Morshedi H., (2011) Evaluation of the antifungal activity of the Irania n thyme essential oils on the postharvest pathogens of Strawberry fruits. *African Journal of Biotechnology* 10(48):9864-9869
- Romanazzi G., Lichter A., Mlikota Gabler F., Smilanick JL., (2012) Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 63,141-147
- Romanazzi G., Feliziani E., Santini M., Landi L., (2013) Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* 75, 24-27
- Rongai D., Pulcini P., Pesce B., Milano F., (2015) Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Sciences (previously Central European Journal of Biology)* 10, 409-416
- Rongai D., Pulcini P., Pesce B., Milano F., (2017) Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato. *European Journal of Plant Pathology* 147, 229-238
- Storchi L., Paciotti R., Re N., Marrone A., (2015) Investigation of the molecular similarity in closely related protein systems: The PrP case study. Structure, Function, and Bioinformatics *Proteins* 83, 1751-1765