

ESTRAZIONE, SAGGI *IN VITRO* E SAGGI *IN VIVO* DI SOSTANZE NATURALI A PARTIRE DA SPECIE DEL GENERE *SALVIA*

G. MINUTO¹, A. MINUTO¹, A.P. LANTERI², S. MASIA¹, C. BRUZZONE¹, A. BISIO²,
S. CAFAGGI², E. RUSSO², G. ROMUSSI²

¹ Centro Regionale di Sperimentazione e Assistenza Agricola
Regione Rollo, 98, 17031 Albenga (SV)

² Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche e Alimentari - Facoltà di Farmacia,
Università di Genova
cersaa.direzione@sv.camcom.it

RIASSUNTO

A partire dal 2003, nell'ambito di due progetti del Programma d'iniziativa comunitaria Interreg IIIA 2000-2006 ALCOTRA, sono stati ottenuti da *Salvia* oltre 20 estratti grezzi e sono state caratterizzate alcune sostanze pure. Si è potuta verificare la buona efficacia in particolare di una sostanza pura (di seguito indicata come S30A e S30A1 quando ottenuta da estrazione diretta) estratta dall'essudato delle parti aeree di *Salvia somalensis*, capace di inibire in modo significativo e per più settimane la crescita del micelio di *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. I successivi saggi *in vivo*, organizzati utilizzando il binomio ospite/parassita basilico/*Botrytis cinerea* e ciclamino/*B. cinerea*, hanno permesso di verificare anche in questo caso la buona efficacia di S30A1 nel bloccare l'insorgenza dei sintomi. L'efficacia di una prima formulazione sperimentale di S30A1 viene inoltre discussa.

Parole chiave: *Salvia*, estratti grezzi, funghi fitopatogeni

SUMMARY

EXTRACTION, *IN VITRO* AND *IN VIVO* ASSAYS OF NATURAL SUBSTANCES FROM *SALVIA* SPECIES

Since 2003, in the framework of EU projects Interreg IIIA 2000-2006 ALCOTRA, 20 crude extracts have been obtained and some pure substances have been identified from *Salvia* species. The pure substance S30A, purified from exudates of aerial parts of *Salvia somalensis*, effectively inhibited the mycelium growth of *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Later, with the same active ingredient obtained by direct extraction (S30A1), *in vivo* tests have been carried out on the host/disease complexes sweet basil/*Botrytis cinerea* and cyclamen/*B. cinerea* and the results confirmed previous achievements. Furthermore, the efficacy of a experimental formulation of S30A1 is reported.

Keywords: *Salvia* species, rude extracts, phytopathogenic fungi

INTRODUZIONE

Il genere *Salvia* L. (Lamiaceae) include oltre 900 specie diffuse in zone temperate e tropicali di tutto il mondo. Da questo genere sono stati isolati importanti composti quali flavonoidi, olii essenziali, diterpeni e triterpeni molti dei quali sono, ad esempio, caratterizzati da attività *antifeedant* su insetti (Simmonds, 2006), antibatterica (González *et al.*, 1989), anti-fungina (Grayer e Harborne, 1994), allucinogena e antiossidante. Questi composti meritano così ulteriori studi di approfondimento non solo per il loro interesse nella chimica dei composti organici naturali, ma anche perché molti di essi, essendo dotati di attività biologica, possono presentare possibili applicazioni come fitofarmaci. Se si considera, infatti, che i metaboliti secondari sono la risposta evolutiva della pianta al suo habitat si può ipotizzare l'estrazione e l'identificazione di tali sostanze o estratti grezzi per il loro utilizzo in agricoltura per sostituire

o integrare l'azione dei prodotti di sintesi. Negli ultimi anni, quindi, presso il Ce.R.S.A.A. si è provveduto ad allestire una collezione di diverse specie di salvia, molte delle quali presentano anche un notevole interesse dal punto di vista ornamentale. Presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche e Alimentari dell'Università di Genova si è messa a punto l'estrazione dell'essudato dalle parti aeree fresche della pianta. Da diversi di questi essudati totali, attraverso tecniche cromatografiche e di spettroscopia NMR (Nuclear Magnetic Resonance), si è potuta effettuare la separazione e l'identificazione di numerose sostanze, alcune delle quali non ancora descritte in letteratura. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare attraverso saggi *in vitro* e *in vivo* l'attività biologica nei confronti di funghi fitopatogeni di estratti grezzi e di sostanze pure ottenute da diverse specie del genere *Salvia*.

MATERIALI E METODI

Materiale vegetale

Le specie di salvia utilizzate per ottenere gli estratti grezzi e le sostanze pure esaminate in questo lavoro sono state: *Salvia somalensis*, *Salvia cacaliaefolia*, *Salvia fallax*, *Salvia confertiflora*, *Salvia buehneri*, *Salvia wagneriana* e *Salvia chamaedrioides*. Coltivazione e raccolta sono state effettuate presso il Ce.R.S.A.A.. Gli estratti grezzi sono stati ottenuti utilizzando le parti aeree fresche della pianta. L'estrazione di tutti gli essudati è stata effettuata immergendo il materiale vegetale in CH₂Cl₂ per 20 secondi. Il ridotto tempo di contatto fra la pianta e il solvente ha permesso di evitare l'eventuale rottura delle cellule vegetali e, quindi, il passaggio in soluzione di sostanze non utili ai fini della nostra indagine. Dopo filtrazione il solvente di estrazione è stato rimosso a pressione ridotta. Per l'ottenimento di sostanze pure, dopo decerazione con esano, l'essudato è stato cromatografato in colonne Sephadex LH-20 (Pharmacia) usando CHCl₃/MeOH (7:3) come eluente. Le frazioni di interesse sono state quindi sottoposte a ulteriori separazioni su Silica gel 230-400 mesh (Merck). Per la cromatografia su strato sottile le frazioni caricate su lastre di gel di silice F254 su alluminio sono state eluite in CHCl₃/MeOH (12:0,5), le macchie sono state evidenziate spruzzando acido solforico al 50% e successivo riscaldamento a circa 100 °C per 1 minuto. I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Tottoli della ditta Büchi. ¹³C- e ¹H-NMR sono stati eseguiti con uno spettrometro Bruker DRX 600 usando TMS come standard interno. Gli spettri IR sono stati ottenuti con uno spettrofotometro Perkin Elmer 1310. I dosaggi quantitativi delle sostanze purificate sono stati eseguiti attraverso HPLC fase inversa su apparecchiatura Waters (Waters Corporation, Milford, USA), con pompa W600, iniettore Rheodyne Delta 600 e detector ad indice di rifrazione Waters 2414.

Saggi *in vitro*

I saggi *in vitro* sono stati eseguiti preparando un terreno di coltura con Potato Dextrose Agar (Merck) 39 g per litro di acqua autoclavato 15 minuti a 121 °C e successivamente avvelenato con essudati e sostanze pure previamente solubilizzati in metanolo (1% v/v). I substrati ottenuti sono stati quindi addizionati con streptomina (5 mg/L) e posti a solidificare in piastre Petri da 90 mm di diametro. Isolati patogeni di *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, conservati su substrato agarizzato presso il Ce.R.S.A.A., sono stati utilizzati per l'allestimento dei saggi di efficacia. Tasselli di micelio (≤2 x 2 mm) sono stati disposti in condizioni di sterilità al centro delle succitate capsule Petri, le quali sono state quindi poste in termostato al buio a 25 °C. Nei giorni successivi all'inoculazione è stato misurato il raggio di accrescimento del micelio fungino, ed è stata quindi determinata la percentuale di inibizione esercitata dalle sostanze in esame rispetto al testimone non avvelenato. Ogni prova ha previsto la valutazione dei raggi di

accrescimento anche su terreno avvelenato con metanolo 1% v/v e non avvelenato. Ogni singola sostanza e concentrazione è stata replicata tre volte.

Saggi *in vivo*

I saggi *in vivo* sono stati organizzati utilizzando i binomi ospite parassita basilico/*B. cinerea* e ciclamino/*B. cinerea*. È stata valutata l'efficacia di diverse concentrazioni della sola sostanza pura S30A1 a confronto con quella di 4 diversi fungicidi commerciali e del metanolo (1% v/v) utilizzato come solvente. Per il basilico si sono utilizzate sezioni di fusto di circa 2 cm con uniche lesioni presenti alle due estremità, mentre per il ciclamino sono stati utilizzati petali distaccati. In entrambi i casi, il materiale vegetale è stato conservato su carta bibula idratata con acqua distillata sterile in capsule Petri (diametro 15 cm). I trattamenti sono stati effettuati utilizzando sospensioni acquose di S30A1 precedentemente solubilizzata in metanolo (1% v/v), addizionate di bagnante (Tween 20). Le concentrazioni di applicazione saggiate sono state 5, 25, 50, 75 e 100 g/hl e solo per il ciclamino anche le concentrazioni di 0,5 e 1 g/hl. I fungicidi di sintesi utilizzati per il confronto sono stati Bavistin FL (BASF) (carbendazim 41,7%; 50 g p.a./hl), Rovral FL (BASF) (iprodione 25%; 67,5 g p.a./hl), Scala (BASF) (pyrimethanil 37,4%; 60 g/hl), Switch (Syngenta) (ciprodinil 37,5% e fludioxonil 25%; 37,5 + 25 g p.a./hl), tutti sotto forma di sospensione acquosa. Nella fase successiva le capsule sono state inoculate con una sospensione conidica di *B. cinerea* propagata a partire da isolati ottenuti da basilico distribuita ad una concentrazione finale non inferiore a 10^4 UFC/ml. Le diverse sospensioni acquose di trattamento e di inoculo sono state distribuite simulando una irrorazione fogliare con volume di applicazione pari a 1000 L/ha. In ogni prova sono state previste tre tesi di confronto: 1) trattata con metanolo 1% v/v; 2) inoculata e non trattata e 3) non inoculata e non trattata. Su basilico è stata valutata la % di lesioni infette mentre per il ciclamino si è valutato il numero e il diametro dei punti di infezione sul lembo del petalo fiorale. Per ogni singola sostanza e concentrazione sono state effettuate osservazioni su 4 capsule, considerate 4 replicazioni. L'analisi statistica dei dati ha previsto l'analisi della varianza e l'applicazione del test statistico di Tukey e Duncan ($P=0,05$).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Saggi *in vitro*

È stata saggiata *in vitro* la capacità di 8 essudati totali e 4 sostanze pure di inibire la crescita del micelio di diversi funghi fitopatogeni, in tre differenti prove. L'essudato di *S. somalensis* (S30) ha dimostrato nella prova 1 buona attività verso tutti i funghi fitopatogeni saggiati con particolare riferimento a *C. acutatum* e *F. oxysporum* (tabella 1). Nella prova 2, è stata saggiata una sostanza derivata da questo estratto grezzo sia come composto puro sia come composto con grado di purezza inferiore, poiché ottenuto per estrazione diretta dall'essudato. In tale prova, la sostanza pura S30A ha confermato di essere la più efficace verso i funghi saggiati dimostrando in particolare un'inibizione maggiore, nelle prime due settimane, della crescita del micelio di *C. acutatum*, *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*. In quest'ultimo caso essa ha dimostrato un'attività significativamente superiore rispetto a S30A1 ottenuta per estrazione diretta (tabella 2). Si è ritenuto quindi opportuno confrontare l'attività di S30A a due diverse concentrazioni e, nel frattempo, provare l'efficacia di altri due essudati a diverse concentrazioni. L'essudato di *S. confertiflora* ha dimostrato una buona attività nell'inibire la crescita del micelio di *C. acutatum* presentando anche un tendenziale effetto dose-risposta. S30A ha confermato di essere la sostanza più attiva verso tutti i funghi ed in particolare verso *C. acutatum*, *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*, ma non sono state riscontrate significative differenze di effetto tra le due concentrazioni (tabella 3).

Tabella 1. Effetto di essudati totali (S3, S4, S10, S17 e S30) e sostanze pure (S33A e S3B) sulla crescita micelica di funghi fitopatogeni dopo 14 giorni, espresso come percentuale di inibizione rispetto al testimone non trattato (Ce.R.S.A.A., 2006)

Tesi	ppm	Pianta di derivazione	<i>C. acutatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>
S3	1000	<i>S. cacaliaefolia</i>	41,1 cd [^]	28,9 c	11,1 a	0,0 a
S4	1000	<i>S. buchanani</i>	41,1 cd	27,8 c	0,0 a	0,0 a
S10	1000	<i>S. wagneriana</i>	44,4 d	13,3 b	15,6 ab	0,0 a
S17	1000	<i>S. chamaedryoides</i>	33,3 cd	0,0 a	-*	10,0 b
S30	1000	<i>S. somalensis</i>	67,8 e	70,0 e	36,7 b	53,3 c
S33A	1000	<i>S. jamensis</i>	0,0 a	0,0 bc	0,0 a	0,0 a
S3B	1000	<i>S. cacaliaefolia</i>	45,6 d	23,3 bc	12,2 ab	0,0 a
Metanolo	1% v/v		22,2 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Testimone			0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

*non saggiato

[^]i valori della medesima colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono tra loro con una probabilità di errore del 5%, secondo il test di Tukey

Tabella 2. Effetto dell'essudato totale S33 e di sostanze pure S33A, S3B, S30A e S30A1 (ottenuta da estrazione diretta) sulla crescita micelica di funghi fitopatogeni dopo 14 giorni, espresso come percentuale di inibizione rispetto al testimone non trattato (Ce.R.S.A.A., 2006)

Tesi	ppm	Pianta di derivazione	<i>C. acutatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
S33	100	<i>S. jamensis</i>	67,9 c [^]	52,2 e	16,7 b	0,0 a	0,0 a
S33A	100	<i>S. jamensis</i>	23,4 b	13,3 c	0,0 a	0,0 a	0,0 a
S3B	100	<i>S. cacaliaefolia</i>	65,4 c	42,2 d	6,7 ab	0,0 a	68,9 b
S30A	100	<i>S. somalensis</i>	87,7 d	78,9 f	31,1 c	56,7 b	83,3 c
S30A1	100	<i>S. somalensis</i>	86,4 d	81,1 f	36,7 c	26,7 a	66,7 b
Metanolo	1% v/v		30,8 b	6,7 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Testimone			0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

[^] vedi tabella 1

Tabella 3. Effetto di diverse concentrazioni degli essudati totali E3 e E4 e della sostanza pura S30A sulla crescita micelica di funghi fitopatogeni dopo 14 giorni, espresso come percentuale di inibizione rispetto al testimone non trattato (Ce.R.S.A.A., 2007)

Tesi	Dose g/hl	Pianta di derivazione	<i>C. acutatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
S30A	50	<i>S. somalensis</i>	82,9 e [^]	78,8 e	55,8 b	58,3 b	82,5 b
S30A	100	<i>S. somalensis</i>	84,3 e	81,5 e	68,3 b	62,5 b	82,5 b
E3	50	<i>S. fallax</i>	41,4 bc	36,3 c	0,0 a	0,0 a	0,0 a
E3	100	<i>S. fallax</i>	30,0 bc	36,2 c	0,0 a	0,0 a	0,0 a
E3	150	<i>S. fallax</i>	37,2 bc	43,0 c	0,0 a	0,0 a	0,0 a
E4	50	<i>S. confertiflora</i>	54,4 cd	24,9 bc	0,0 a	0,0 a	0,0 a
E4	100	<i>S. confertiflora</i>	71,4 de	29,3 c	0,0 a	0,0 a	0,0 a
E4	150	<i>S. confertiflora</i>	75,7 de	34,8 c	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Metanolo	1% v/v		27,2 b	5,4 ab	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Testimone			0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a

[^] vedi tabella 1

Saggi *in vivo*

Le prove *in vivo* sono state effettuate confrontando l'azione di S30A1 (estrazione diretta) a varie concentrazioni con quattro diversi fungicidi di sintesi. Nella prova basilico/*B. cinerea* S30A1 è risultato molto efficace impedendo l'insorgere della malattia senza dimostrare effetto dose-risposta nell'intervallo di concentrazione saggiato (tabella 4). Nel caso dei petali di ciclamino la concentrazione più bassa di S30A1 (5 g/hl) ha dimostrato in tutte e tre le prove un'efficacia maggiore rispetto alle concentrazioni più alte (tabella 5).

Tabella 4. Prova basilico/*B. cinerea*: efficacia della sostanza pura S30A1 e di 4 fungicidi di sintesi espressa come percentuale di lesioni infette dopo 5 giorni dal trattamento e dall'inoculazione (Ce.R.S.A.A., 2009)

Tesi	Dose g/hl	1 ^a prova	2 ^a prova	3 ^a prova
S30A1	5	9,4 a [^]	9,1 ab	0 a
S30A1	25	12,3 a	27,8 bc	3,0 a
S30A1	50	12,3 a	0 a	9,1 ab
S30A1	75	6,3 a	0 a	3,0 a
S30A1	100	15,6 a	0 a	3,0 a
Carbendazim	50	34,4 b	50,0 e	25,0 bcd
Iprodione	67,5	50,0 b	43,8 de	12,5 abc
Pyrimethanil	60	40,6 b	18,8 bc	6,3 ab
Ciprodinil+fludioxonil	37,5 + 25	43,8 b	31,3 cde	9,4 abc
Metanolo	1% v/v	40,6 b	43,8 de	37,5 d
Testimone inoculato non trattato		62,5 b	50,0 e	31,3 cd
Testimone non inoculato non trattato		0 a	0 a	0 a

[^] i valori della medesima colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono tra loro con una probabilità di errore del 5%, secondo il test di Duncan

Tabella 5. Prova ciclamino/*B. cinerea*: efficacia della sostanza pura S30A1 e di 4 fungicidi di sintesi espressa come percentuale di superficie di petalo infetta dopo 5 giorni dal trattamento e dall'inoculazione (Ce.R.S.A.A., 2009)

Tesi	Dose g/hl	1 ^a prova	2 ^a prova	3 ^a prova
S30A1	5	6,5 b [^]	3,1 ab	0,7 a
S30A1	25	24,2 e	12,8 cde	0,2 a
S30A1	50	18,0 cde	22,4 de	7,9 ab
S30A1	75	9,6 bcd	38,4 f	10,0 ab
S30A1	100	11,3 bcde	26,4 ef	8,8 ab
Carbendazim	50	18,5 bcde	23,7 ef	0,4 a
Iprodione	67,5	20,0 de	9,1 bc	0,2 a
Pyrimethanil	60	14,7 bcde	6,0 bc	0,4 a
Ciprodinil+fludioxonil	37,5 + 25	8,2 bc	3,0 abc	0,3a
Metanolo	1% v/v	18,8 cde	20,2 de	6,3 ab
Testimone inoculato non trattato		22,3 de	19,8 a	13,1 b
Testimone non inoculato non trattato		0 a	0 a	0 a

[^]vedi tabella 4

Le concentrazioni più elevate (da 50 g/hl a 100 g/hl) hanno indotto una forte fitotossicità manifestatasi con il danneggiamento immediato del delicato tessuto vegetale dei petali; ciò ha ragionevolmente favorito l'insorgenza della malattia nelle zone lesionate con una conseguente riduzione dell'efficacia osservata a tali concentrazioni. In seguito a queste osservazioni è stata condotta una quarta prova per verificare l'azione di due dosaggi inferiori (0,5 g/hl e 1 g/hl). Entrambi i dosaggi hanno dato buoni risultati, associati inoltre all'assenza di fitotossicità (dati non riportati).

CONCLUSIONI

Successivamente agli incoraggianti risultati ottenuti dalle valutazioni effettuate *in vitro*, i risultati ottenuti dagli esperimenti *in vivo* confermano l'interessante l'efficacia di S30A e S30A1 nei confronti di *B. cinerea*. Dai risultati dei saggi effettuati *in vivo* sui petali di ciclamino, inoltre, è stato possibile dedurre come l'aumento della concentrazione di S30A1 induca, almeno sui tessuti fiorali, un forte effetto fitotossico che addirittura promuove le infezioni di muffa grigia. D'altra parte nel caso delle sezioni di fusto di basilico, questo effetto non è così chiaro probabilmente per la maggior resistenza dei tessuti vegetali. Al momento sono in corso ulteriori valutazioni finalizzate alla messa a punto di una formulazione in grado di minimizzare gli effetti fitotossici aumentando l'efficacia della sostanza attiva, riducendone anche i dosaggi di impiego. Altre valutazioni *in vivo* su altri binomi ospite parassita sono attualmente in corso unitamente anche ad un primo approfondimento relativo al meccanismo d'azione che potrebbe essere proposto per spiegare l'efficacia biologica della sostanza attiva.

LAVORI CITATI

- González A.G., Abad T., Jiménez I.A., Ravelo A.G., Aguiar J.G.L.Z., San Andrés L., Plasencia M., Herrera J.R., Moujir L., 1989. A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (*Lamiaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 17 (4), 293-296.
- Grayer R.J., Harborne J.B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 37 (1), 19-42.
- Simmonds M.S.J., 2006. The search for plant-derived compounds with antifeedant activity, *In: Advances in Phytomedicine*. vol. 3, cap 13, Elsevier, Oxford UK, 514 pp.