

**TEST SU CIMICE DEL NOCCIOLO (*Gonocerus acuteangulatus* E *Palomena prasina*)
E CIMICE ASIATICA(*Halyomorpha halys*)
CON OLI ESSENZIALI DI ROSMARINO, SALVIA, TIMO E
PINO MUGO ED ESTRATTO IDROALCOLICO DI ASSENZIO
IN RIFERIMENTO AD ACETAMIPRID**

Alessandro Careglio¹



Fig. 1: applicazione di una goccia di olio essenziale sull'emitorace delle cimici

¹Dipartimento scienza e tecnologia del farmaco università degli studi Torino (studente e dott. in scienza erboristiche)

Corrispondenza: Alessandro Careglio Frazione Santa Maria 92/a La Morra 12064 (CN) Italia

alessandro.careglio@edu.unito.it

alessandrocareglio@gmail.com

Parole chiave: prodotti naturali, insetticida, gestione dei parassiti.

ABSTRACT

Le cimici (*Cimicidae* subsp.) portano a notevoli danni in agricoltura e sono un problema sanitario.

La cimice asiatica comparsa da pochi anni in occidente non risponde bene ai trattamenti con i comuni insetticidi e sono stati riammessi all'utilizzo molecole sospese per la loro tossicità.

In questo studio viene dimostra l'efficacia degli oli essenziali nel trattamento della cimice applicati direttamente sul metatorace degli insetti, con Acetamiprid come controllo positivo.

In agricoltura, non è possibile usare gli oli essenziali come tali, perché causerebbero danni alle colture e sarebbero pericolosi per chi li applica, nonostante vengano utilizzati per la preparazione di comuni alimenti, ed in ultimo per il costo. Si sono eseguiti test con alcuni veicoli a bassa tossicità per l'uomo con risultati non incoraggianti.

Si sono inoltre confrontati con strumenti computazionali (Flare Cresset) i composti contenuti negli oli essenziali e principi attivi di sintesi sull'acetilcolinesterasi umana e del moscerino.

INTRODUZIONE

La cimice verde (*Palomena prasina* Linnaeus, 1761) è un insetto eterottero della famiglia Pentatomidae. Specie comune e polifaga, attacca piante erbacee e arboree. È uno dei principali agenti dell'aborto traumatico in cui il guscio si forma normalmente ma il seme è atrofizzato e del cimiciato delle nocciole, tra le maggiori avversità del nocciolo

La cimice asiatica (*Halymorpha halys*) è un insetto originario dell'Asia orientale.

La cimice asiatica appartiene alla famiglia delle Pentatomidae, ed è nota anche come "brown marmorated sting bug".

Gli adulti sono marmorizzati con colore grigiastro- brunastro, hanno una lunghezza di 12-17 mm e presentano bande scure sul bordo esterno dell'addome

La cimice asiatica può causare gravi danni su diverse specie frutticole, su vite e verdura. Frutti puntati sviluppano la formazione di fossette o aree necrotiche sulla superficie esterna.

Punture precoci possono provocare cascole o malformazioni di frutti. Colpisce più di 300 specie di piante tra cui il nocciolo. I frutti morsi dalla cimice acquistano un sapore particolarmente sgradevole, tanto da renderlo inutilizzabile a fini alimentari.

Vengono inoltre eseguiti dei confronti computazionali dei composti contenuti negli oli essenziali, dei principi attivi dell'estratto di assenzio ed altre molecole inibitrici dell'acetilcolinesterasi usato comunemente come bersaglio per gli insetticidi

Si utilizza la piperina in associazione ad oli essenziali come inibitore dei P450 (principali enzimi che metabolizzano i gli insetticidi) ma i risultati non erano in linea con le aspettative, si è inoltre utilizzata urea che in genere facilita l'assorbimento dei principi attivi, favorendo l'attraversamento delle membrane ma con risultati non netti.

Gli oli essenziali esplicano la loro azione insetticida in toto, sebbene i singoli composti testati sull'acetilcolinesterasi diano una lieve inibizione (rif 2). Dai calcoli computazionali sotto elencati risulterebbe che più terpenoidi potrebbero occupare contemporaneamente la tasca di legame dando un'azione sinergica.

Sarebbe interessante testare in vitro sull'acetilcolinesterasi i singoli composti degli oli essenziali combinati a 2 oppure a 3 per valutare come avviene il sinergismo.

Viene inoltre eseguito un docking dei composti dell'estratto di assenzio evidenziando l'efficacia secondo i punteggi come inibitori dell'acetilcolinesterasi umana in confronto ai farmaci registrati contro l'alzheimer, ed i risultati sembrerebbero incoraggianti.

MATERIALI E METODI

Vengono prodotti gli oli essenziali di Oli essenziali di rosmarino (*Salvia rosmarinus*), salvia (*Salvia officinalis*), timo, (*Thymus vulgaris*) pino mugho (*Pinus mugho*) e vengono applicati con una pipetta contagocce sull'

Assenzio (*Artemisia absintium*) estratto idroalcolico

2 litri acqua di rete, 1,5 litri alcool denaturato (marca CRAI acquistati al supermercato in Italia)

500 grammi di assenzio (*Artemisia absintium*) essiccato in pellet (coltivato nella mia azienda agricola) vengono miscelati, riscaldati all'ebollizione per 30 min. e filtrati

Ottenuti 1,4 litri estratto



Assenzio coltivato in consociazione con nebbiolo da barolo, azienda agricola Careglio, La Morra (CN) Italia

Oli essenziali di rosmarino (*Salvia rosmarinus*), salvia(*Salvia officinalis*), timo, (*Thymus vulgaris*) pino mugo (*Pinus mugo*)

Gli oli essenziali vengono preparati utilizzando parti aeree fresche delle rispettive specie (5 Kg), inserite in un distillatore da 35 litri (35L Moonshine ERBE OLIO ESSENZIALE KIT) acquistato da galaxyond (cina) e distillati in corrente di vapore.

Acetamiprid

Viene utilizzato un agrofarmaco contenente acetamiprid registrato in italia di nome EPIK, acquistato al consorzio agrario provinciale di Gallo D'alba (CN) Italia

Indicazioni in etichetta: 150 ml di prodotto in 100 litri acqua

= 1 ml in 0,666 litri di acqua di rete

Viene qui utilizzato 1 ml di prodotto in 500 ml acqua

Diluizioni pesticida ed estratto di assenzio

1/2 , 1/3, 1/5, 1/7 1/10, tal quale, acqua rete come controllo negativo

Quindi 7 gruppi X 2 (prodotti) = 14 gruppi di insetti

Modalità esecuzione test:

Gli insetti vengono prelevati dagli infissi in giornata, inseriti in capsula di Petri assieme ad una fetta di mela golden e in seguito trattati

39 capsule (di Petri) totali

1 cimice dei letti *Cimex lectularius*

7 cimici asiatiche *Halyomorpha halys*

31 cimici del nocciolo *Palomena prasina*

Vengono applicate tre gocce sul metatorace per ogni insetto (estratto assenzio e pesticida di sintesi) ed 1 goccia per gli oli essenziali

Tabella con indicazione del numero del gruppo, tipo di trattamento e diluizione

<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>
<u>A</u>	<u>E</u>	A	<u>E</u>	A	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>C</u>
<u>tal</u>	<u>tal</u>	1/	<u>1/</u>	1/	<u>1/</u>	<u>1/</u>	<u>1/</u>	<u>1/</u>	<u>1/</u>	<u>1</u>	<u>1/1</u>	<u>TIM</u>	
<u>qual</u>	<u>qual</u>	2	<u>2</u>	3	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>/</u>	<u>0</u>	<u>O</u>	
<u>e</u>	<u>e</u>									<u>1</u>			
										<u>0</u>			
<u>*</u>	<u>*</u>	<u>*</u>	<u>*</u>	<u>*</u>		<u>*</u>				<u>*</u>			
<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>		<u>-</u>				<u>-</u>			

*= CIMICE ASIATICA

Quindi quattordici gruppi con una cimice asiatica in sette

C= controllo= acqua di rete

A= assenzio, A1/2= estratto assenzio diluito 50%

A(1/3....1/10)

E= acetamiprid come sopra

ALLA CIMICE DEI LETTI VIENE USATO ASSENZIO ESTRATTO TAL QUALE
PER OGNI GRUPPO 3 ESEMPLARI

Risultati

Epik (pesticida):

Campione N° 12 in vita

Campione N° 10 morto 1 insetto su 3

Campione N° 6 morti 2 insetti su 3

Campione N° 2 e 4 tutti morti

Assenzio estratto alcolico:

campione 1, 3, 5, 7, 9, 11 tutti in vita

La cimice dei letti(1 esemplare) è morta

Campione 13 con **timo** estratto alcolico in vita

Oli essenziali

1 goccia sul metatorace

Campione num 15 rosmarino olio essenziale, 2.3 3 gocce 2.2 2 gocce
2.1 1 gtc

Campione num 16 salvia tutti 1 goccia

Campione num 17 timo 1 goccia

Campione num 18 pino mugo 1 goccia

Risultato test oli essenziali non diluiti

Le cimici trattate sono morte in modo quasi immediato con l'olio essenziale di rosmarino e salvia, 2 video caricati su YOUTUBE (visibile solamente a chi ha il link)

<https://youtu.be/u3w5M-hhf1A>

https://youtu.be/i_TJmQlolk

Con l'olio essenziale di timo gli insetti sono morti in circa ½ ora

Con l'olio essenziale di pino mugo (test su 2 insetti) uno è morto quasi istantaneamente l'altro in qualche minuto

Diluizione olio essenziale rosmarino con tween (polisorbato) 20 (farmalabor)

Il polisorbato viene utilizzato per solubilizzare l'olio essenziale in acqua (acquistato in farmacia)

2 ml di olio essenziale di rosmarino vengono aggiunti a 1 ml di tween 20

Alla soluzione di olio essenziale + tween viene aggiunta acqua (purezza grado analitico Sigma Aldrich)

1 sola cimice per ogni diluizione

Dopo l'applicazione della goccia di soluzione si ha una reazione paragonabile alle convulsioni per i vertebrati, ed in seguito una lenta ripresa in 15-20 ore

Oli essenziale di salvia diluito con alcool

2 ml di olio essenziale vengono diluiti con 2 ml di alcool

1/2	alcool	1/5	1/7	1/10	1/15	1/20	1/30	1/40	1/70	1/100
M	V	V**	V**	V	V	V	V	V	M	V

1 sola cimice per ogni diluizione

Dopo l'applicazione della goccia di soluzione si ha una reazione paragonabile alle convulsioni per i vertebrati, ed in seguito una lenta ripresa in 15-20 ore e la morte dopo qualche giorno per gli insetti meno vitali (**)

CONCLUSIONI

Viene effettuato un test di trattamento della cimice verde e del nocciolo (*Palomena presina*, *Gonocerus acuteangulatus*) e cimice asiatica (*Halyomorpha halys*) con oli essenziali di rosmarino, salvia, timo, pino mugo, ed estratto idroalcolico di assenzio, usando come controllo positivo (Epik), insetticida di sintesi (acetamiprid principio attivo 50 g/L) e controllo negativo acqua.

Applicando una goccia di olio essenziale sul metatorace degli insetti ne ha causato la morte in alcuni casi in modo quasi istantaneo _

[video https://youtu.be/u3w5M-hhf1A](https://youtu.be/u3w5M-hhf1A)

[https://youtu.be/ i_TJmQlkk](https://youtu.be/i_TJmQlkk)

L'estratto alcolico di assenzio e risultato letale per la cimice da letto *Cimex lectularius* mentre per le altre specie di cimici ha causato in lieve intorpidimento per le concentrazioni più alte.

L'Insetticida di sintesi è risultato totalmente letale per la concentrazione indicata in etichetta e letale al 50% per la dose indicata in etichetta diluita ad 1/5

Diluendo gli oli essenziali con olio extra vergine di oliva si ha una notevole riduzione della tossicità ugualmente per acetone ed alcool etilico, per la diluizione al 50% si ha la morte quasi immediata, per le altre diluizioni ad una prima fase "convulsiva" si ha una lenta ripresa.

Gli oli essenziali qui testati risultano tutti efficaci e pur essendo naturali, ne ostacola l'utilizzo il costo, che nell'acquisto al dettaglio si aggira sull'euro al grammo e questo ne scoraggia l'utilizzo.

Se l'olio essenziale però, ad esempio per il trattamento della cimice del nocciolo viene prodotto in azienda si recuperano le acque aromatiche, cioè i residui acquosi dell'idrodistillazione che contengono l'1% di oli essenziali come base per i trattamenti forse si riesce ad ottenere un buon risultato senza residui con costi accettabili.

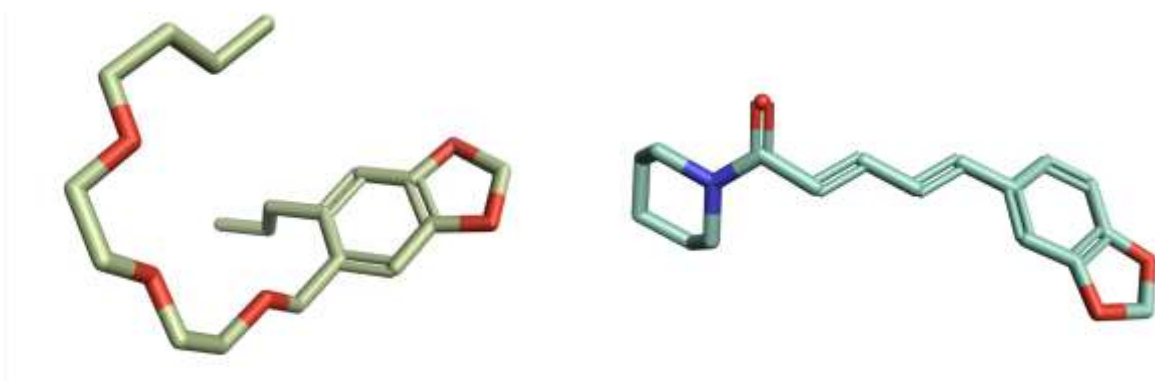
Un'incognita rimane l'aspetto organolettico, gli oli potrebbero alterare il sapore o il profumo degli alimenti

PIPERNA

In alcune formulazioni di insetticidi naturali viene aggiunto il piperonil butossido come coformulante, come inibitore dei citocromi responsabili del metabolismo degli insetticidi, aumentandone l'efficacia

L'idea di aggiungere piperina ad oli essenziali (la cui formula di struttura 2D è simile) per aumentarne l'efficacia, considerato il costo dell'olio essenziale.

La piperina (un solido giallo) si scioglie bene in alcool, mentre gli oli essenziali non formano soluzioni limpide in alcool.



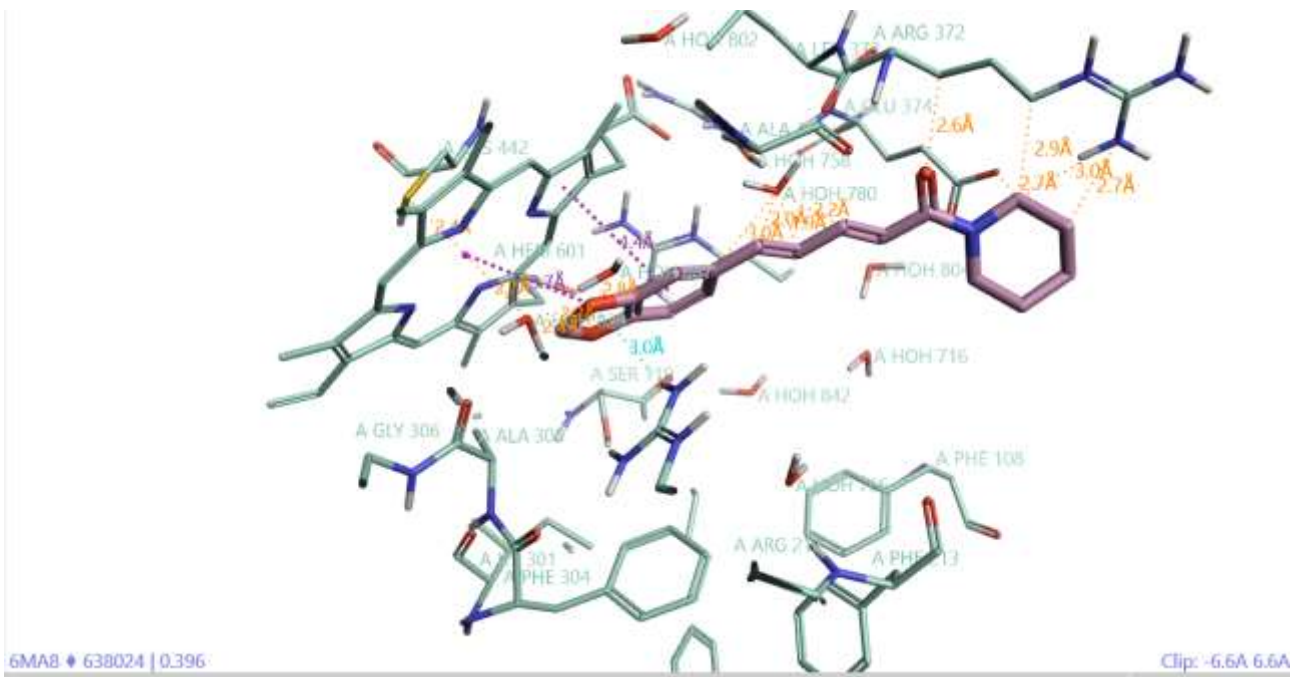
Piperonil butossido

Piperina

(atomi di carbonio verdi, rossi osigeno, blu azoto)

Confronto computazionale su citocromo P450 dell'inibitore PMF con piperina e piperonil butossido e canfora eseguito con Flare Cresset

Piperina in cyp3a4



File	Home	Ligand	Protein	QSAR	Activity Miner	Python	View	Help
Ligands								
Structure	Radial Plot	LF Rank Score	LF dG	LF VScore	LF LE			
		-4.879	-7.521	-1.995	-0.321			
	0.912	-4.26	-7.225	-8.295	-0.344			
	0.800	-3.136	-4.74	-5.006	-0.431			
	0.651	-1.888	-7.156	-7.32	-0.3			

Punteggi docking piperina in confronto a PMF (fluoruro di fenilmetilsulfonyl) inibitore p450 e canfora e piperonil butossido in PDB (Protein data bank) ID 6MA8

La piperina ha dei punteggi migliori dell'inibitore PMF e del piperonil butossido e la canfora presente negli oli essenziali ha un'attività inibitrice

Test su cimice con olio essenziale di rosmarino, piperina ed urea

P soluzione di piperina (0,18 g) in 3,5 ml di etanolo (98% Sigma aldrich grado analitico)

U soluzione urea grado tecnico con acqua di rete al 50%

R rosmarino olio essenziale ottenuto dalla distillazione in corrente di vapore di *Salvia rosmarinus* coltivato in azienda (azienda agr. Careglio)

A acqua di rete

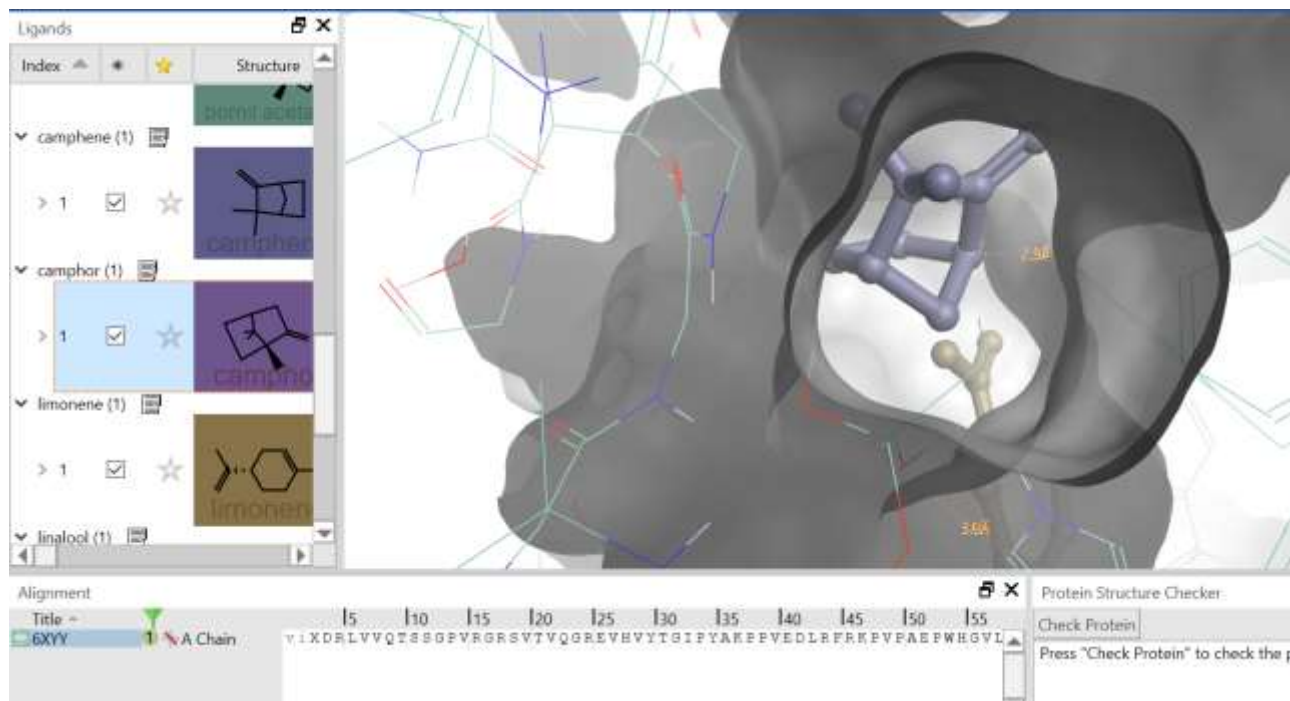
<u>P</u>	<u>R</u>	<u>U</u>	<u>R+P</u> 50%	<u>R+U</u> 50%	<u>R+P+U</u> 1/3,1/3,1/3	<u>R+P+A</u> 1/3,1/3,1/3	<u>R+P+U</u> 1/3,1/3,1/3 + 50% A
	#		#	##	##	##	

morte dell'insetto in 1 h

morte dell'insetto entro 2

Docking dei composti dell'olio essenziale di salvia all'interno della tasca di legame dell'acetilcolinesterasi

Si nota dalla rappresentazione che più di un composto (anche 3) possono occupare la tasca contemporaneamente potendo dare un'azione sinergica sul recettore.



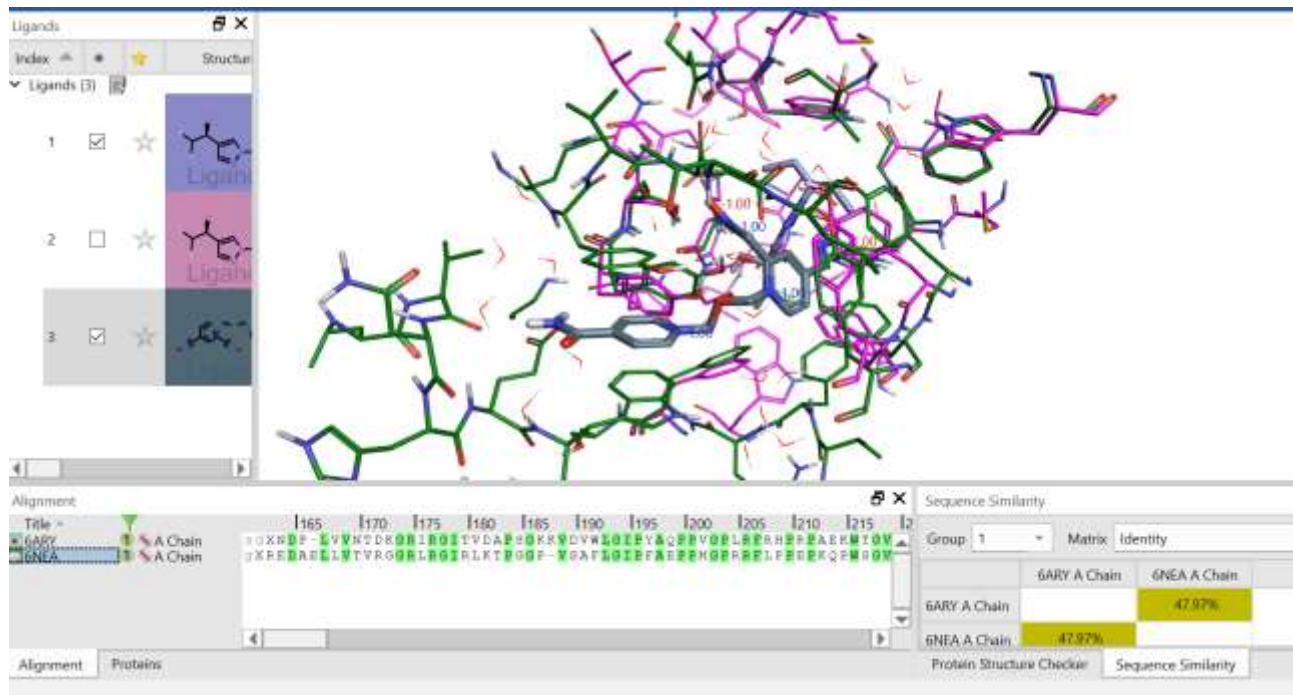
Nella figura camfene e limonene all'interno della tasca dell'acetilcolinesterasi (PDB 6XYY)

L'attività insetticida dell'olio essenziale è principalmente dovuta ai principali costituenti terpenoidi inibitori dell'acetilcolinesterasi, esiste un importante effetto sinergico tra i costituenti secondo Perry et al, (rif 2) poiché nessun singolo costituente è particolarmente potente da giustificare l'azione inibitrice degli oli essenziali (rif 2).

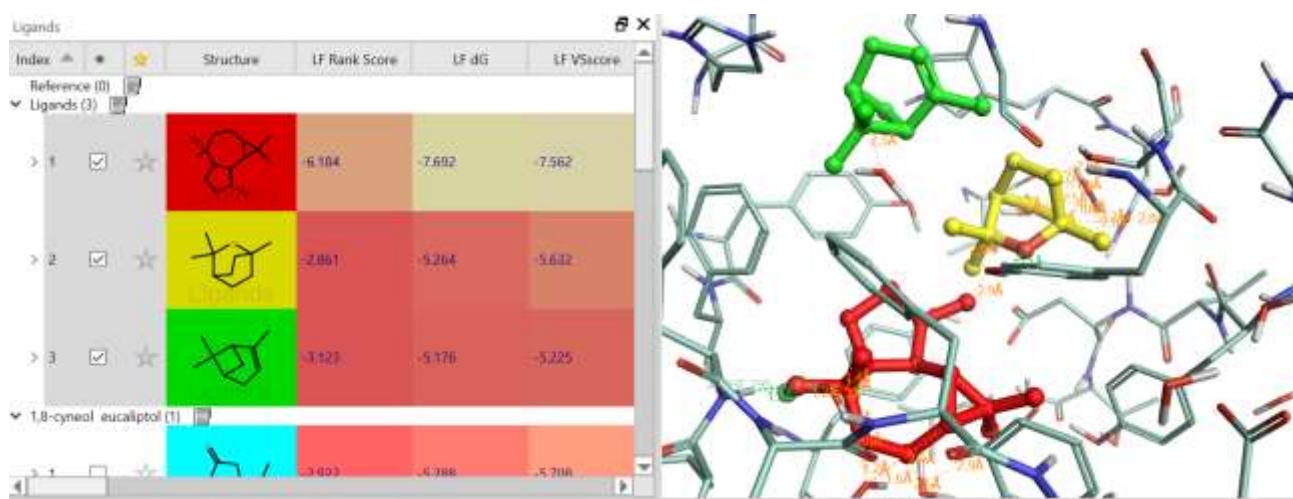
I terpenoidi degli oli essenziali essendo molecole con un basso peso molecolare, possono legarsi contemporaneamente nella tasca di legame

Sarebbe interessante testare in vitro sull'acetilcolinesterasi i singoli composti combinati a 2 oppure a 3 per valutare come avviene il sinergismo.

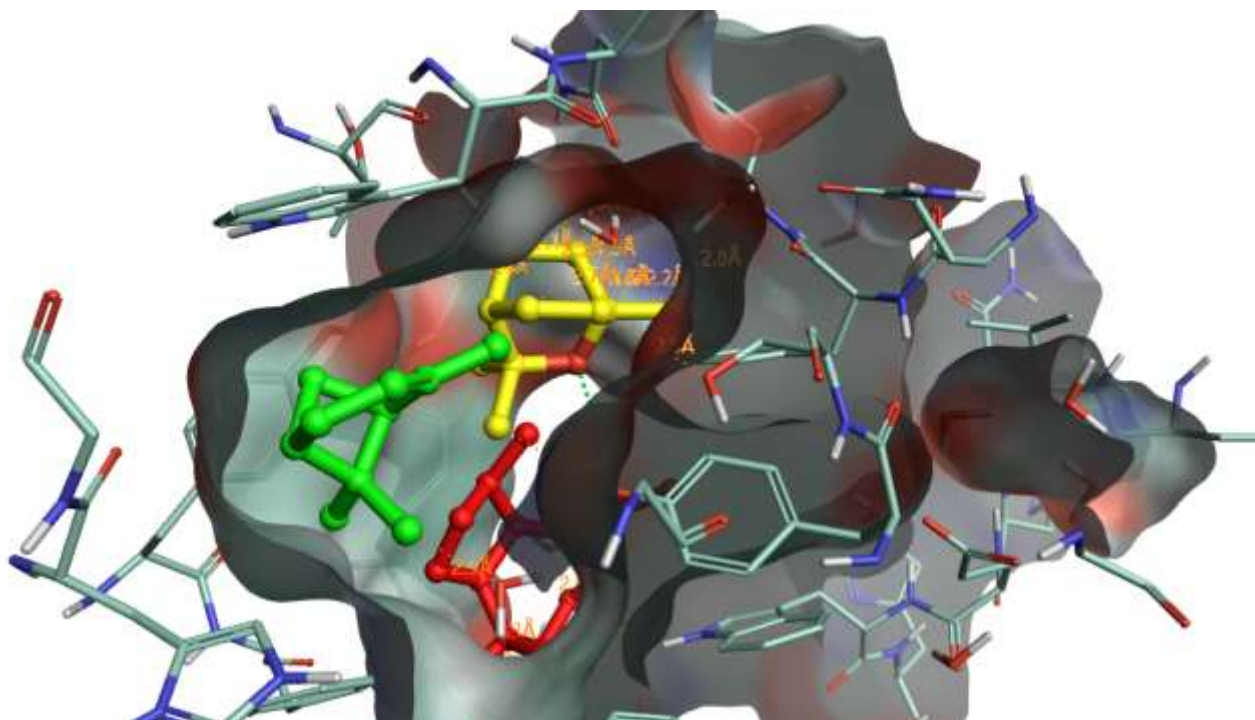
Confronto computazionale tra la tasca di legame dell'acetilcolinesterasi umana e del moscerino della frutta



Allineamento e sovrapposizione della catena A dell'acetilcolinesterasi umana (PDB ID 6NEA in verde) e del moscerino della frutta (PDB ID 6ARY in fucsia) simili al 47,9% del sito di legame.



Composti dell'olio essenziale di salvia contemporaneamente all'interno della tasca di legame dell'acetilcolinesterase in rosso viridiflor, in giallo eucaliptolo ed in verde alfa pinene



Come la figura precedente con evidenziata la superficie della tasca di legame.

Docking acetilcolinesterasi umana composti assenzio estratto usando come confronto i principali farmaci usati nell'alzheimer



(rif 3) La conoscenza di questi due parametri ha permesso di valutare l'energia libera del legame del detergente alla glicoproteina P nella membrana lipidica, ΔG_{tl}^0 , che riflette l'affinità diretta detergente-trasportatore. È aumentato all'aumentare del numero di gruppi etossilici, suggerendo che questi gruppi accettori di legami idrogeno sono gli elementi chiave per l'interazione detergente-trasportatore nella membrana lipidica. L'energia libera di legame alla P-glicoproteina per gruppo etossilico (EO) è stata determinata come circa $\Delta G_{EO}^0 = -1,6$ kJ/mol. I presenti risultati documentano inoltre che, a seconda della concentrazione applicata, i detergenti sono substrati intrinseci o inibitori della P-glicoproteina.

Questo spiega perché il piperonil butossido sia efficace come coformulante negli insetticidi, perché blocca l'efflusso cellulare degli insetticidi inibendo la glicoproteina p ma anche la piperina vedi rif 4.

CONCLUSIONI

Si è testata l'azione insetticida di oli essenziali di rosmarino, salvia, timo, pino mugo, ed estratto idroalcolico di assenzio su cimici ed i risultati sono sorprendenti per gli oli come si vede nei video, applicati come tali,

<https://youtu.be/u3w5M-hhf1A>

https://youtu.be/i_TJmQlkk

se però vengono diluiti l'efficacia crolla. Gli oli essenziali hanno una tossicità notevolmente inferiore rispetto ai composti di sintesi, ma ne ostacola l'utilizzo in agricoltura il costo.

Viene testata anche la piperina come sinergizzante con lievi risultati.

Alcuni composti dell'estratto di assenzio (quercetina, rutina, anabsintina) potrebbero essere utilizzati contro l'alzheimer come inibitori dell'acetilcolinesterasi secondo i punteggi del docking eseguito sull'acetilcolinesterase umana (PDB 6NEA).

Il progetto di studio è autofinanziato

I calcoli computazionali e le rappresentazioni di proteine e molecole sono eseguite con Flare Cresset (licenza accademica)

Contatti:

alessandrocareglio@gmail.com

BIBLIOGRAFIA

1 https://it.wikipedia.org/wiki/Palomena_prasina

2 <https://www.provincia.bz.it/agricoltura-foreste/agricoltura/frutti-viticultura/la-cimice-asiatica-halyomorpha-halys.asp>

1 **Attività insetticida di unolio essenziale di *Tagetes patula* L.(Asteraceae) su *Cimexlectularius* L. e docking molecolare dei principali composti al sito catalitico di C/AChE1**

Flavio Augusto Sanches Politi ,

Juliana Dameli Nascimento

2 In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes

N S Perry

3 Detergents as intrinsic P-glycoprotein substrates and inhibitors

XiaochunLi-BlatterPierluigiNerviAnnaSeelig

4 La piperina, uno dei principali costituenti del pepe nero, inibisce la glicoproteina P umana e il CYP3A4

Rajinder K. Bhardwaj , Hartmut Glaese