Università degli Studi "Mediterranea" di Reggio Calabria
Dipartimento di Agraria

Corso di Laurea Magistrale in
"Scienze e Tecnologie Agrarie"

SVILUPPO E VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI DI NANO-INSETTICIDI BOTANICI NEI CONFRONTI DI INSETTI TARGET E NON TARGET

Relatore: Prof. Orlando CAMPOLO

Tesi di Laurea di
Francesca Maria PLUTINO

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

Indice

RIASSUNTO 1
SUMMARY 3
1. INTRODUZIONE 4
2. APHIDIDAE 6
2.1 Morfologia 6
2.2 Polimorfismo e riproduzione 7
2.3 Cicli biologici 9
2.4 Danni 10
2.5 Controllo 11
2.5.1 Fattori biotici ed abiotici 11
2.5.2 Controllo chimico 12
3. *APHIS GOSSYPHII* 13
3.1 Morfologia 13
3.1.1 Forma giovanile 13
3.1.2 Forma adulta 14
3.2 Nemici naturali 15
4. OLI ESSENZIALI 16
4.1 Proprietà fisico-chimiche 16
4.2 Composizione chimica 16
4.3 Impiego 17
4.4 Olio essenziale di *Allium sativum* L. 18
5. NANOTECNOLOGIE 20
5.1 Nano-emulsioni a base di olio essenziale 20
6. OBIETTIVI DELLA SPERIMENTAZIONE 23
7. MATERIALI E METODI 24
7.1 Condizioni di allevamento 24
7.2 Caratterizzazione chimica dell'olio essenziale di aglio 24
7.3 Sintesi e caratterizzazione fisica della nanoemulsione 25
7.4. Tossicità nei confronti dell'insetto target *A. gossypii* 26
7.5 Tossicità nei confronti dell'insetto non target *Cryptolaemus montrouzieri* 27
7.6 Analisi statistica dei dati 28
8.RISULTATI E DISCUSSIONE 30
8.1 Composizione chimica dell'olio essenziale di aglio 30
8.2 Caratterizzazione fisica della nano-emulsione 31
8.3. Tossicità su organismi target 33

8.4. Tossicità su organismi non-target 35
9. CONCLUSIONI 37
BIBLIOGRAFIA 38
SITOGRAFIA IMMAGINI 41
RINGRAZIAMENTI 42

RIASSUNTO

Negli ultimi anni, la ricerca agronomica sta dedicando crescente attenzione allo studio di sostanze alternative, di origine naturale, come alternativa sostenibile ai pesticidi chimici di sintesi. Tra queste, gli oli essenziali (OE) rappresentano i candidati ideali in virtù della loro spiccata attività insetticida e biodegradabilità. Tuttavia, vi sono alcune limitazioni intrinseche, quali l'elevata volatilità e la scarsa solubilità in acqua, ne ostacolano l'impiego nei contesti operativi reali. Per superare tali criticità le nanotecnologie offrono uno strumento innovativo per sviluppare formulazioni stabili ad alta efficacia. In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo sviluppo e la caratterizzazione di una nano emulsione ad elevata concentrazione (15%) a base di olio essenziale di aglio (*Allium sativum* L.) per il controllo dell'afide *Aphis gossypii* Glover. Contestualmente, è stata valiutata la selettività del formulato nei confronti di un importante predatore non-target, il coleottero *Cryptolaemius montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae).

La prima fase della sperimentazione ha previsto la caratterizzazione chimica dell'OE di aglio mediante analisi GC-MS, che ha evidenziato un profilo nettamente dominato da composti organo solforati volatili. Successivamente, l'OE è stato nano-formulato tramite micro-fluidizzazione ad alta pressione (HPM) e caratterizzato fisicamente mediante diffusione dinamica della luce (DLS). I risultati hanno mostrato un'ottima stabilità cinetica nel tempo, con dimensioni delle goccioline mantenutesi costantemente al di sotto dei 200 nm ed una spiccata omogeneità dimensionale.

I test di tossicità residuale per immersione fogliare condotti sull'insetto target *A. gossypii* hanno evidenziato un'efficace azione contro l'insetto, dipendente sia dalla concentrazione sia dal tempo di esposizione. Di contro, le prove di contatto residuo eseguite sulle medesime concentrazioni letali nei confronti di *C. montrouzieri* hanno registrato la totale sopravvivenza degli individui, evidenziando l'assenza di tossicità acuta per l'entomofauna non-target.

I risultati hanno confermato l'elevata efficacia e la selettività della nano emulsione testata, candidandola come un promettente bioinsetticida

ecocompatibile idoneo all'integrazione nei programmi di difesa integrata (IPM).

SUMMARY

In recent years, agricultural research has increasingly focused on plant-derived substances as sustainable alternatives to synthetic chemical pesticides. Among these, essential oils (EOs) represent promising candidates owing to their insecticidal activity and biodegradability. However, intrinsic limitations such as high volatility and low water solubility hinder their practical application in real field conditions. To overcome these limitations, nanotechnology provides an innovative approach for developing stable and highly effective formulations. In this context, the main goal of this thesis was to develop and characterize a highly concentrated (15%) garlic (Allium sativum L.) EO nano emulsion for the control for the control of *Aphis gossypii* Glover. Simultaneously, the selectivity of the nanoformulation was assessed against a key non-target predator, the ladybird beetle *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant.

The initial stage involved the chemical characterization of the garlic EO via GC-MS analysis, which confirmed a volatile profile heavily dominated by organosulfur compound. Subsequently, the EO was nano-formulated using high-pressure microfluidization (HPM) and physically evaluated by dynamic light scattering (DLS). The results revealed remarkable physical stability over time, with average droplets sizes remaining consistently below 200 nm and displaying high dimensional homogeneity.

Residual toxicity bioassays conducted on the targert pests A.gossypii demonstrated significant concentration- and time- dependent aphicidal activity. Conversely, residual contact trials performed on the beneficial predator C. monotrouzieri at identical lethal concentrations resulted in complete survival, confirming the absence of acute toxicity toward non-target insects.

Overall, these findings underscore the high efficacy and selectivity of the garlic EO nano emulsions, supporting its potential as a promising eco-friendly biopesticide suitable for integration into integrated pest management (IPM) strategies.

1. INTRODUZIONE

La gestione fitosanitaria delle colture deve affrontare il problema del controllo di numerosi fitofagi di rilevanza agronomica, tra cui *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphidae), specie caratterizzata da una spiccata polifagia e notevole plasticità adattativa. Le infestazioni di questa specie possono determinare perdite produttive e compromettere la qualità delle produzioni agricole, rendendo necessario lo sviluppo di strategie di controllo efficaci e sostenibili.

I danni associati alle infestazioni si dividono in diretti e indiretti. I primi sono dovuti alla sottrazione di linfa durante l'attività trofica con conseguente deperimento ed indebolimento generale della pianta. I danni indiretti sono invece associati all'inoculazione di saliva fitotossica nei tessuti, alla capacità del fitofago di veicolare importanti agenti virali, quali il virus della tristezza degli agrumi (CTV) ed il virus del mosaico del cetriolo (CMV), nonché dalla produzione di abbondante melata; quest'ultima costituisce il substrato d'insediamento per funghi saprofiti (fumaggini) che causano un deprezzamento commerciale dei prodotti (., Ullah *et al*., 2019; Yokomi, 2019).

Storicamente, il controllo delle popolazioni di *A. gossypii* si è basato sull'impiego reiterato e massiccio di formulati fitosanitari di sintesi. Sebbene tali trattamenti abbiano garantito inizialmente un'elevata efficacia nel contenimento delle infestazioni, il loro continuo utilizzo ha causato problematiche ambientali, quali la contaminazione delle matrici suolo-acqua, rischi per la salute umana e tossicità nei confronti degli organismi non-target (Isman, 2017). Un'ulteriore criticità è rappresentata dalla selezione di popolazioni resistenti, conseguenza della pressione selettiva esercitata dall'uso reiterato degli insetticidi.

Alla luce delle criticità associate all'impiego degli insetticidi di sintesi, la ricerca agronomica ha rivolto un crescente interesse verso soluzioni a basso impatto ambientale, identificando negli oli essenziali (OE) un'alternativa promettente ai pesticidi di sintesi. Gli OE sono miscele complesse di

metaboliti secondari volatili, costituite prevalentemente da monoterpeni e sesquiterpeni, ai quali possono associarsi altri composti appartenenti a diverse classi chimiche. Numerosi studi hanno evidenziato attività insetticida, acaricida, e antibatterica (Giunti *et al.*, 2019; Campolo et al., 2020). Tuttavia, il loro impiego in condizioni di campo è ostacolato da diverse limitazioni di tipo chimico- fisico, come la marcata volatilità, la scarsa solubilità in acqua, la rapida degradazione ambientale ed il potenziale rischio di fitotossicità per le piante.

Per ovviare a tali criticità, l'approccio nanotecnologico costituisce uno strumento d'avanguardia in grado di proteggere i principi attivi naturali, preservandone la stabilità e potenziandone la biodisponibilità e l'efficacia biologica (Modafferi *et al.*, 2023). Le nano- emulsioni a base di OE si candidano pertanto come una tecnologia importante da integrare nelle moderne strategie di difesa sostenibile.

2. APHIDIDAE

Gli Aphididae sono una famiglia di insetti appartenenti all'ordine degli Emitteri. Sono generalmente di piccole dimensioni, caratterizzati da un tegumento relativamente poco sclerificato e da una notevole plasticità biologica ed ecologica che favorisce la colonizzazione di numerose specie vegetali e ne facilita l'adattamento ad una molteplicità di agroecosistemi.

2.1 Morfologia

Il corpo degli afidi ha una lunghezza solitamente compresa tra 0,5 e 7 mm, ed è suddiviso in capo, torace e addome. Il capo, ben distinto, porta lateralmente gli occhi composti e dorsalmente un paio di antenne, costituite da un numero variabile di antennomeri, di cui i primi due (scapo e pedicello) si presentano brevi e tozzi, mentre i successivi sono generalmente più allungati. A livello degli ultimi due antennomeri è sempre presente un sensillo placoideo primario, mentre nelle forme adulte alate compare un numero variabile di sensilli secondari lungo il terzo antennomero. L'apparato boccale è di tipo pungente- succhiante (rostro), con un segmento distale provvisto di microsensilli, con funzione meccanocettrice e tattile.

Il torace è costituito da tre segmenti, protorace, mesotorace e metatorace, la cui complessità anatomica differisce tra forme attere ed alate. In queste ultime, sono presenti due paia di ali membranose, con le ali anteriori generalmente più sviluppate rispetto a quelle posteriori. Il torace porta, inoltre, tre paia di zampe, generalmente sottili e allungate.

L'addome costituisce la porzione più sviluppata del corpo dell'insetto e presenta lateralmente le coppie di spiracoli respiratori. L'addome ospita anche le strutture morfologiche diagnostiche della famiglia: i sifoni (o cornicoli) e la codicola (Fig. 1).



Figura 1: Esemplari atteri di Aphididae su tessuto vegetale. Sono visibili alcuni caratteri morfologici tipici degli afidi, tra cui le antenne e i sifoni addominali.

I sifoni sono appendici tubolari collocate in posizione dorso- laterale deputate all'escrezione di goccioline cerose contenenti feromoni d'allarme e sostanze repellenti con funzione difensiva. La codicola rappresenta la modificazione del nono urotergite e si presenta come un prolungamento mediano, la cui conformazione (semilunare, triangolare o digitiforme) varia significativamente tra i diversi taxa, e svolge un ruolo nell'allontanamento delle goccioline di melata prodotte durante l'alimentazione. Alla base della codicola si trova l'apparato genitale.

2.2 Polimorfismo e riproduzione

Il polimorfismo rappresenta uno degli aspetti più caratteristici della biologia degli afidi e consente la presenza, all'interno della stessa specie, di forme morfologicamente e biologicamente differenti. Le diverse forme possono differire per caratteristiche quali la presenza delle ali, la capacità di dispersione, la modalità riproduttiva e la funzione svolta nell'ambito del ciclo biologico. Il ciclo di sviluppo alterna la riproduzione per partenogenesi, che assicura una rapidissima moltiplicazione clonale in assenza di individui

maschi, a quella sessuata ovipara In quest'ultima, dopo l'accoppiamento, le femmine depongono uova durevoli, generalmente destinate a superare le condizioni ambientali sfavorevoli.

L'articolazione delle differenti forme afidiche risponde a precise funzioni all'interno del ciclo vitale:

- La fondatrice è la femmina partenogenetica che deriva dalla schiusa dell'uovo durevole, generalmente a inizio primavera; è caratterizzata da un corpo tozzo, di dimensioni superiori rispetto alle generazioni successive; è attera e dà origine, per partenogenesi, alla colonia primaria.
- Le fondatrigenie costituiscono le generazioni partenogenetiche derivate dalla fondatrice. Possono essere attere o alate: le forme attere contribuiscono all'accrescimento demografico sulla pianta ospite mentre quelle alate (definite migranti nelle specie dioiche) promuovono la dispersione verso nuove piante ospiti.
- Le virginogenie (o esuli) comprendono le generazioni partenogenetiche, attere o alate, che si sviluppano sugli ospiti secondari. Tra di esse, le forme alate prodotte al termine della stagione favorevole prendono il nome di remigranti, poiché compiono il volo di ritorno verso l'ospite primario.
- Le sessupare sono femmine partenogenetiche specializzate nella produzione della generazione sessuata. A seconda della specie e del tipo di ciclo biologico, possono produrre maschi, femmine sessuate oppure entrambi.
- Le forme anfigoniche rappresentano l'unica generazione sessuata del ciclo, e comprendono i maschi e le femmine deputati all'accoppiamento e alla deposizione dell'uovo svernante. La femmina è attera ed è distinta dalle vergini partenogenetiche per la presenza di tipici pseudosensilli sulle tibie posteriori; il maschio può essere attero oppure alato, e si riconosce per la conformazione dell'apparato copulatore e per l'elevata densità di sensilli placoidei sulle antenne.

2.3 Cicli biologici

I cicli biologici degli afidi sono caratterizzati da una notevole complessità e possono differire in relazione alla modalità riproduttiva e al numero di specie vegetali utilizzate come ospiti. Il ciclo completo, definito olociclo, comprende numerose generazioni partenogenetiche vivipare durante la stagione favorevole e una generazione sessuata, generalmente prodotta in autunno. Dopo l'accoppiamento, le femmine ovipare depongono uova durevoli, che consentono il superamento delle condizioni ambientali sfavorevoli e dalle quali, nella primavera successiva, originano le fondatrici (Figura 2). Quando l'intero ciclo di sviluppo si svolge sulla stessa specie vegetale, il ciclo viene definito monoico; se invece richiede l'avvicendamento tra un ospite primario ed uno secondario si parla di olociclo dioico.

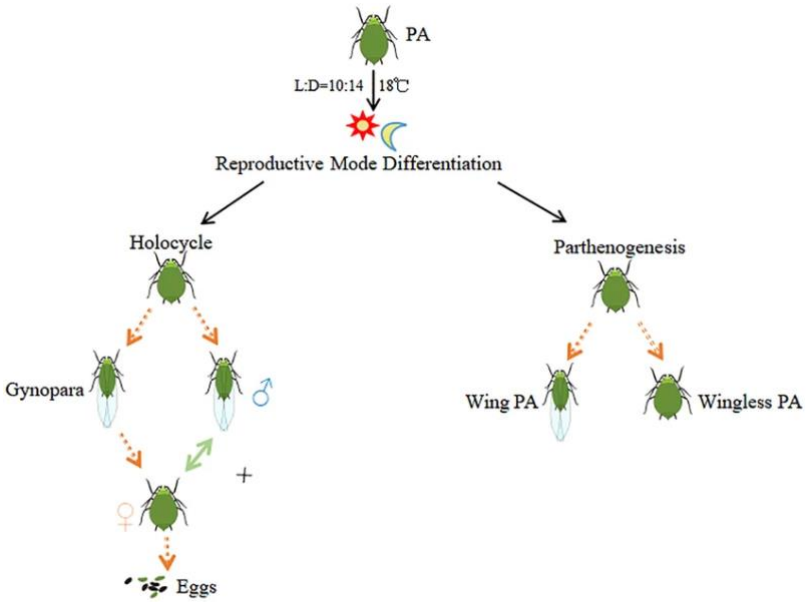


Figura 2: Differenziazione delle modalità riproduttive in Aphis gossypii in relazione al ciclo biologico. PA indica la forma partenogenetica; L:D indica il rapporto tra ore di luce (L) e di buio (D). Fonte: Liu et al. (2024)

In presenza di microclimi favorevoli e di disponibilità trofica ininterrotta e continua, la fase sessuata può essere assente. in questo caso si parla di analociclo, in cui la specie si moltiplica esclusivamente per via

partenogenetica. In specie dotate di elevata plasticità ecologica l'alternanza o la coesistenza tra dinamiche olocicliche e analocicliche è regolata dal fotoperiodo e dalla temperatura: l'accorciamento delle ore di luce ed il calo termico autunnale stimolano la differenziazione delle sessupare e dei maschi, mentre il mantenimento di condizioni termiche miti garantisce la riproduzione clonale delle virginogenie.

2.4 Danni

Le infestazioni afidiche si concentrano prevalentemente sugli organi aerei delle piante, in particolare sui germogli in accrescimento e sulle lamine fogliari. I danni arrecati si distinguono in due categorie:

-i danni diretti derivano dall'attività trofica dell'insetto. La continua sottrazione di linfa priva i tessuti vegetali dei nutrienti necessari, provocando un deperimento fisiologico generale, un arresto dello sviluppo e una diminuzione della produzione. Inoltre, la saliva iniettata durante la perforazione possiede sostanze con proprietà fitotossiche e altre molecole, tra cui enzimi ed effettori, che possono modificare le risposte fisiologiche e di difesa della pianta. In alcune specie di afidi, tali interazioni possono determinare specifiche alterazioni morfologiche dei tessuti vegetali, inclusa la formazione di strutture galligene.

-i danni indiretti possono risultare particolarmente rilevanti e sono associati principalmente alla produzione di melata (Figura 3) e alla trasmissione di fitovirus. La melata, una secrezione zuccherina derivante dall'alimentazione che imbratta foglie e frutti, può favorire l'insediamento di funghi saprofiti



Figura 3: Afide durante l'emissione di una goccia di melata

(fumaggini), che attraverso i miceli scuri riducono l'attività fotosintetica della pianta, oltre a deprezzare commercialmente il prodotto.

2.5 Controllo

2.5.1 Fattori biotici ed abiotici

Il contenimento naturale delle popolazioni afidiche è determinato dall'interazione tra fattori abiotici e biotici, la cui importanza relativa può variare in funzione della specie e delle condizioni ambientali. Tra i fattori abiotici, precipitazioni intense e forti venti possono determinare il distacco degli individui dalla pianta ospite, provocando un aumento della mortalità, soprattutto negli stadi giovanili. Anche le condizioni termiche influenzano significativamente la dinamica delle popolazioni: temperature inferiori ai limiti di tolleranza possono compromettere la sopravvivenza e lo sviluppo, mentre temperature eccessivamente elevate, soprattutto se associate a condizioni di stress idrico della pianta ospite, possono ridurre la sopravvivenza e la capacità riproduttiva degli afidi. L'entità di tali effetti dipende tuttavia dalla specie, dallo stadio di sviluppo e dalla durata e intensità dello stress ambientale.

I fattori biotici comprendono un articolato complesso di nemici naturali, costituito principalmente da predatori e parassitoidi. Tra i predatori più importanti rientrano numerose specie appartenenti ai coleotteri coccinellidi, ai neurotteri crisopidi, ed ai ditteri sirfidi. I parassitoidi sono rappresentati principalmente da imenotteri braconidi (sottofamiglia Aphidiinae) e afelindi, le cui femmine depongono l'uomo all'interno dell'afide e le larve si sviluppano a spese dell'ospite, che al termine del processo assume la caratteristica forma mummificata. Tuttavia, il controllo biologico naturale dipende dalla sincronizzazione tra la dinamica delle popolazioni degli afidi e quella dei loro antagonisti. In determinate condizioni, infatti, l'aumento delle popolazioni dei nemici naturali può risultare temporalmente successivo alla crescita della popolazione della preda, consentendo agli afidi di raggiungere livelli di abbondanza elevati prima che la pressione esercitata dagli antagonisti diventi significativa.

2.5.2 Controllo chimico

Il controllo chimico delle popolazioni afidiche si è storicamente basato sull'impiego di formulati contraddistinti prevalentemente da un meccanismo d'azione anticolinesterasico o neurotossico (Regnault-Roger, 1997). In relazione alle capacità di penetrazione, distribuzione e traslocazione all'interno dei tessuti vascolari della pianta ospite, le sostanze attive impiegate in ambito fitoiatrico vengono comunemente classificate in tre raggruppamenti:

- Aficidi ectofitici: agiscono prevalentemente per contatto diretto sulla superficie esterna della vegetazione trattata. Tali formulati risultano indicati per interventi precoci su infestazioni incipienti o localizzate, in quanto richiedono l'intercettazione diretta degli individui che compongono la colonia (come nel caso delle piretrine naturali e dei piretroidi di sintesi);
- Aficidi citotropici o translaminari: possiedono la capacità di attraversare la cuticola fogliare e diffondersi all'interno dei tessuti parenchimatici, raggiungendo gli afidi insediati sulla pagina inferiore della lamina fogliare o all'interno delle anfrattuosità dei tessuti (ad es. Pirimicarb);
- Aficidi sistemici radicali: sono formulati in granuli e somministrati al suolo per raggiungere gli insetti attraverso le radici. Questi prodotti, altamente tossici, sono raccomandati solo per piante ornamentali o colture non destinate al consumo immediato.

3. *APHIS GOSSYPHII*

Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae) è una specie polifaga a distribuzione cosmopolita, con un'ampia presenza anche nelle regioni dell'Italia meridionale. Può colonizzare numerose famiglie botaniche, tra le quali spiccano le Cucurbitacee, le Malvacee e le Rutacee. Le colonie si insediano prevalentemente sulla pagina inferiore della lamina fogliare e sui giovani germogli, sebbene su alcune specie vegetali come cotone e crisantemo possono interessare anche gli organi fiorali. I sintomi dell'infestazione variano in relazione alla pianta ospite e all'intensità dell'attacco e possono comprendere deformazioni e accartocciamenti fogliari, riduzione dell'accrescimento dei germogli e, in presenza di infestazioni elevate, un generale indebolimento della pianta che può portare al disseccamento.

Inoltre, *A. gossypii* agisce come vettore di virus, tra cui il virus del mosaico del cetriolo e del cocomero, il virus del giallume e del sedano e il virus Y della patata.

3.1 Morfologia

3.1.1 Forma giovanile

Le forme giovanili di *A. gossypii* attraversano quattro stadi ninfali, durante i quali si verificano progressive modificazioni delle dimensioni corporee e dello sviluppo delle appendici.

L'identificazione degli stadi può basarsi sulla combinazione di diversi caratteri morfologici, tra cui le dimensioni corporee, lo sviluppo delle antenne e dei sifoni e, nelle forme destinate a diventare alate, la comparsa e il progressivo sviluppo degli abbozzi alari. Le ninfe destinate a sviluppare le ali presentano infatti, già negli stadi intermedi, evidenze morfologiche a livello toracico che diventano progressivamente più marcate con l'avanzare dello sviluppo. La distinzione accurata dei diversi stadi ninfali richiede tuttavia l'osservazione combinata di più caratteri diagnostici, poiché le singole caratteristiche possono variare in relazione alla morfe, alle condizioni ambientali e allo stato fisiologico dell'individuo.

3.1.2 Forma adulta

Gli adulti di *A. gossypii* presentano un marcato polimorfismo morfologico, rappresentato principalmente dalle forme attere e alate delle femmine partenogenetiche vivipare. Le due morfe differiscono per la presenza delle ali, per le proporzioni corporee e per alcuni caratteri morfologici utilizzabili ai fini dell'identificazione.

L'adulta alata virginopara (Figura 4) misura circa 2 mm di lunghezza ed è caratterizzata da capo, torace, sifoni e codicola di colore nero. L'addome mostra una colorazione variabile dal verde scuro al verde-nerastro, fino a tonalità più bluastre. Spesso l'intero tegumento appare rivestito da una sottile secrezione cerosa che conferisce all'insetto un aspetto opaco. Le antenne coprono una lunghezza pari al 60-80% dell'intero corpo e recano, sul terzo antennomero, da 6 ad 8 sensilli placoidei secondari. Sul protorace e sui segmenti addominali compresi tra il primo ed il settimo sono presenti i caratteristici tubercoli marginali.



Figura 4: Femmina adulta alata virginopara di Aphis gossypii

La forma attera virginopara (Fig. 5) presenta una conformazione corporea ovoidale e compatta, con una colorazione variabile del tegumento che va dal verde chiaro al verde scuro/nerastro, con sifoni e codicola intensamente pigmentati ed antenne più brevi rispetto alla forma alata.



Figura 5: Femmina adulta attera virginopara di Aphis gossypii

3.2 Nemici naturali

In natura, il contenimento delle popolazioni di *A. gossypii* può essere favorito dall'azione combinata di diversi organismi antagonisti, riconducibili a due categorie: i parassitoidi, che utilizzano l'afide come ospite per il proprio sviluppo larvale, e i predatori, che se ne nutrono direttamente.

Tra i parassitoidi, il ruolo di maggior rilievo è svolto da Imenotteri endoparassitoidi appartenenti alla famigliadei Braconidae, tra cui spiccano le specie del genere *Aphidius* spp. e *Lysiphlebus* spp.

Il complesso dei predatori associati agli afidi è particolarmente eterogeneo e comprende specie dotate di una spiccata capacità di ricerca e consumo delle prede. Tra i Coleotteri, un ruolo importante è svolto da diverse specie della famiglia Coccinellidae, le quali possono esercitare una significativa pressione predatoria sia allo stato larvale sia allo stadio adulto; tra le specie maggiormente utili rientra *Coccinella septempunctata*, oltre a diverse specie appartenenti ai generi *Adalia* spp e *Scymnus* spp.

Un ulteriore gruppo di rilievo è rappresentato dai Crisopidi (Neuroptera: Chrysopidae) le cui larve sono predatrici e comprendono specie appartenenti soprattutto ai generi *Chrysopa* spp. e *Chrysoperla* spp. Infine, tra i Sirfidi (Diptera: Syrphidae), si segnala l'attività predatoria delle larve di *Syrphus ribesii* (L.) ed *Episyrphus balteatus* (De Geer).

4. OLI ESSENZIALI

Gli oli essenziali (OE) sono miscele complesse costituite da composti organici volatili, quali monoterpeni, sesquiterpeni, alcoli, aldeidi, fenoli e derivati metossilici, prodotti dal metabolismo secondario di numerose specie appartenenti a differenti famiglie botaniche. Nelle piante, tali sostanze svolgono funzioni difensive, proteggendo i tessuti da sollecitazioni ambientali abiotiche e dall'attacco di patogeni e fitofagi, oltre a fungere da attrattivi chimici per gli insetti impollinatori. La biosintesi avviene in strutture secretive specializzate, quali tricomi ghiandolari, cavità secretorie e cellule specializzate, presenti in differenti organi vegetali, tra cui foglie, fiori, frutti, cortecce e radici. Le caratteristiche compositive degli OE ne determinano le proprietà fisico-chimiche e biologiche e ne hanno favorito l'impiego in diversi settori, tra cui quello alimentare, farmaceutico, cosmetico e fitosanitario.

4.1 Proprietà fisico-chimiche

Le caratteristiche fisico-chimiche degli OE le differenze non nettamente dagli oli fissi di natura lipidica, per le seguenti caratteristiche:

- elevata volatilità: tendono ad evaporare rapidamente a temperatura ambiente a causa delle caratteristiche chimico-fisiche dei numerosi composti a basso peso molecolare che li costituiscono;
- lipofilia e idrofobia: risultano solubili nei principali solventi organici, come etanolo ed etere) ma insolubili nelle soluzioni acquose;
- densità ridotta: presentano una densità inferiore all'acqua, galleggiando sulla fase acquosa durante la separazione per distillazione;
- indice di rifrazione elevato;
- sensibilità alle condizioni ambientali: sono suscettibili alla degradazione indotta dall'esposizione alla luce, al calore e all’ossigeno atmosferico.

4.2 Composizione chimica

La composizione chimica degli OE varia in relazione alla specie botanica, al microclima ed alle tecniche estrattive. La frazione volatile è costituita prevalentemente da terpeni e loro derivati ossigenati, ai quali possono aggiungersi fenilpropanoidi e altri composti aromatici.

I terpeni, derivati dall'unione di unità isopreniche a 5 atomi di carbonio, costituiscono la frazione quantitativamente maggioritaria e si suddividono in monoterpeni, sesquiterpeni e diterpeni. Tra i monoterpeni più comuni figurano il limonene, il pinene ed il mircene,

Mentre tra i composti aromatici ossigenati rientrano alcoli, aldeidi, chetoni, fenoli ed esteri.

Le attività biologiche degli OE non sono generalmente attribuibili a un singolo costituente, ma risultano dalla composizione complessiva del fitocomplesso e dalle possibili interazioni tra i suoi componenti. La composizione qualitativa e quantitativa può inoltre variare sensibilmente tra popolazioni della stessa specie, dando origine a differenti chemotipi. Fattori genetici, condizioni ambientali, stadio fenologico, organo vegetale utilizzato e modalità di estrazione contribuiscono quindi a determinare le caratteristiche finali dell'olio essenziale.

4.3 Impiego

Gli oli essenziali (OE) trovano applicazione in diversi settori produttivi, tra cui quelli alimentare, farmaceutico e cosmetico, nei quali sono impiegati come aromi, fragranze, conservanti naturali e agenti antimicrobici. Negli ultimi decenni, il crescente interesse verso le sostanze di origine vegetale ha favorito lo studio degli OE anche nell'ambito della protezione delle colture, sia per il controllo dei microrganismi fitopatogeni sia per la gestione di insetti e acari dannosi (Murugan *et al.*, 2015).

In ambito entomologico, gli OE possono esercitare attività insetticida, acaricida e repellente, oltre a svolgere un'azione deterrente nei confronti dell'alimentazione e dell'ovideposizione. Possono inoltre interferire con lo sviluppo, la riproduzione e il comportamento degli insetti. Per tali ragioni, sono considerati potenziali principi attivi per la produzione di biopesticidi da impiegare nei programmi di difesa integrata e biologica. Sebbene il numero di formulati commerciali sia ancora limitato, alcune sperimentazioni hanno dimostrato che, in determinate condizioni, i prodotti a base di OE possono raggiungere livelli di efficacia paragonabili a quelli di altri insetticidi biologici o convenzionali (Isman *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2018).

L’attività biologica degli OE è generalmente riconducibile all’azione complessiva del fitocomplesso. I composti maggioritari possono contribuire in modo rilevante all’effetto insetticida, ma anche i costituenti presenti in quantità inferiori possono influenzarne l’efficacia mediante interazioni additive, sinergiche o antagoniste. Di conseguenza, la concentrazione dei soli componenti principali non consente sempre di prevedere la bioattività dell’intera miscela (Buriani *et al.*, 2020).

Numerosi OE e i loro costituenti hanno mostrato attività insetticida nei confronti di diverse specie di insetti fitofagi. Tale attività è spesso associata alla presenza di monoterpeni e composti fenolici, che possono agire per contatto o inalazione e interferire con il sistema nervoso degli insetti. A titolo di esempio, nanoemulsioni a base di OE di Carlina acaulis hanno mostrato attività tossica nei confronti delle larve di Lobesia botrana (Benelli *et al.*, 2020).

L’impiego degli OE in condizioni di campo può essere favorito dallo sviluppo di formulazioni tecnologicamente avanzate, finalizzate a migliorarne la stabilità e la biodisponibilità. Tra queste, le nanoemulsioni e i sistemi a rilascio controllato possono contribuire a mitigare alcuni problemi applicativi legati all’elevata volatilità, alla scarsa idrosolubilità e alla ridotta persistenza sulle superfici vegetali, facilitando la distribuzione e il mantenimento dei componenti bioattivi (Blázquez, 2014; Pandey et al., 2017; Chaudhari et al., 2021).

4.4 Olio essenziale di *Allium sativum* L.

L’aglio (*Allium sativum* L.) è una pianta erbacea geofita appartenente alla famiglia delle Amaryllidaceae. L'olio essenziale può essere ottenuto mediante distillazione in corrente di vapore del materiale vegetale, generalmente costituito dai bulbi precedentemente sottoposti a schiacciamento. L’estratto si presenta allo stato liquido con una colorazione che oscilla tra il giallo paglierino e il giallo tenue, ed è contraddistinto da un odore penetrante, intenso, persistente e caratteristico. Sebbene la resa estrattiva si attesti generalmente su livelli ridotti, quantificabili intorno allo 0,1%-0,2% sul totale

della matrice vegetale di partenza, l'estratto finale è ricchissimo di composti organo-solforati quali il solfuro di diallile, il disolfuro di diallile, il trisolfuro di diallile, il tetrosolfuro di diallile, il trisolfuro di allile metile, il disolfuro di allile metile, il tetrasolfuro di allile metile e il trisolfuro di dimetile. Questi composti sono i principali responsabili delle proprietà antimicrobiche, antiossidanti ed insetticide ascrivibili all'olio essenziale (Hu *et al.*, 2021).

5. NANOTECNOLOGIE

Negli ultimi anni, le nanotecnologie si sono affermate come un settore di ricerca altamente innovativo, offrendo soluzioni d'avanguardia in ambiti strategici quali la medicina, l'elettronica e l'agricoltura di precisione. In ambito fitosanitario, l'approccio nanotecnologico risponde alla crescente esigenza di sviluppare formulati più sostenibili ed efficienti, attraverso una migliore veicolazione e biodisponibilità delle sostanze attive, riducendo al contempo gli apporti chimici nell'ambiente.

L'applicazione dei nano-carriers ai prodotti di origine botanica consente di superare alcuni dei limiti intrinseci degli oli essenziali, preservando i principi attivi volatili dai processi di degradazione foto-ossidativa e migliorandone la stabilità chimico-fisica e la biodisponibilità nei confronti degli organismi target (Modafferi *et al.*, 2023; Campolo, 2022).

5.1 Nano-emulsioni a base di olio essenziale

Tra le differenti tipologie di formulazioni nanostrutturate sviluppate per il settore fitosanitario, lenanoemulsioni rappresentano uno dei sistemi più versatili, efficienti ed economicamente vantaggiosi. Sotto il profilo chimico-fisico, una nano-emulsione è un sistema disperso etero-fasico, generalmente traslucido o opalescente, costituito da due fasi liquide immiscibili, comunemente una fase oleosa lipofila e una fase acquosa polare, nel quale la fase dispersa è presente sotto forma di goccioline di dimensioni nanometriche, con un diametro medio compreso generalmente tra 20 e 200 nm. In base alla natura della fase continua e di quella dispersa, questi sistemi possono essere classificati principalmente in emulsioni olio-in-acqua (O/W), particolarmente idonee alla veicolazione di oli essenziali lipofili in miscele acquose oppure emulsioni acqua-in olio (W/O).

A differenza delle microemulsioni, che sono sistemi termodinamicamente stabili, le nanoemulsioni sono sistemi termodinamicamente instabili ma caratterizzati da un'elevata stabilità cinetica. Ciò significa che, pur tendendo teoricamente alla separazione delle fasi nel lungo periodo, le ridotte

dimensioni delle goccioline e l'azione stabilizzante dei tensioattivi consentono di limitare i principali fenomeni di destabilizzazione fisica quali sedimentazione, flocculazione e coalescenza. Per aumentare la stabilità del sistema risulta pertanto fondamentale l'impiego di tensioattivi, quali polisorbati o derivati del sorbitano, in grado di ridurre la tensione interfacciale tra la fase acquosa e quella oleosa.

Tuttavia, la concentrazione degli emulsionanti deve essere accuratamente ottimizzata, poiché concentrazioni elevate di tensioattivi possono contribuire alla comparsa di effetti fitotossici sui tessuti vegetali trattati.

L'impiego delle nanoemulsioni consente di potenziare l'efficacia biologica degli oli essenziali in ambito agronomico. In particolare, per il controllo dei fitofagi succhiatori, nanoemulsioni contenenti olio essenziale di arancio dolce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) hanno evidenziato un'elevata attività aficida contro *A. gosssypii,* sia condizioni di laboratorio sia nei saggi di campo, migliorando la bagnabilità della lamina fogliare e la penetrazione del principio attivo (Laudani *et al.*, 2022). Analogamente, nanoformulazioni a base di oli essenziali sono state valutate nei confronti di importanti fitofagi delle colture in pieno campo ed in serra, quali *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Totricidae) (Campolo *et al.*, 2017; Benelli *et al.*, 2020). Parallelamente, formulati nanostruttutati a base di oli essenziali di *Eucalyptus* spp. o di agrumi hanno evidenziato attività insetticida nei confronti di insetti infestanti delle derrate alimentari come *Sitophilus oryzae* L. e *Tribolium castaneum* (Herbst) (Giunti *et al.*, 2019; Adak *et al.*, 2020).

Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla possibilità di formulare nanoemulsioni ad alta concentrazione di principio attivo (fino al 15% di OE), aumentando la persistenza d'azione sulle superfici vegetali e riducendo il volume complessivo di miscela necessario per il trattamento delle superfici coltivate (Giunti *et al.*, 2019). Nonostante tali vantaggi, l'affermazione commerciale delle nanoemulsioni a base di oli essenziali deve tutt'ora affrontare diverse criticità, tra cui la variabilità nella composizione chimica degli oli essenziali ottenuti da matrici naturali, i complessi iter autorizzativi

previsti per i prodotti fitosanitari, anche nell'ambito del Regolamento (CE) n. 1107/2009, e la necessità di condurre rigorose valutazioni tossicologiche ed ecotossicologiche con particolare attenzione alla selettività nei confronti dell'entomofauna utile e, più in generale, agli effetti sugli organismi non target.

6. OBIETTIVI DELLA SPERIMENTAZIONE

L'obiettivo primario del presente lavoro di tesi è stato lo sviluppo, la caratterizzazione fisico-chimica e la validazione biologica di una nanoemulsione a base di olio essenziale di aglio (*Allium sativum* L.) ad elevata concentrazione (15%), finalizzata al controllo dell'afide del cotone e del melone *A. gossypii*. Contestualmente, la ricerca si è proposta di valutare la tossicità del formulato nei confronti di un insetto non target, *Cryptolaemus montrouzieri*, utilizzato come standard di riferimento per i test eco-tossicologici.

A tal fine, l'attività sperimentale si è articolata nelle seguenti fasi operative:

1. Caratterizzazione chimica dell'olio essenziale di aglio: identificazione dei principali costituenti organosolforati volatili e determinazione della loro abbondanza relativa mediante analisi gas-cromatografica accoppiata alla spettrofotometria di massa (GC-MS).
2. Preparazione e caratterizzazione fisico-chimica della nanoemulsione: preparazione della nanoemulsione al 15% mediante microfluidizzazione ad alta pressione (HPM) e successiva determinazione del diametro delle goccioline, dell'indice di polidispersione (PDI) e della stabilità fisica a 24 ore, 1 settimana ed 1 mese dalla preparazione, mediante analisi di diffusione dinamica della luce (DLS).
3. Valutazione della tossicità nei confronti dell'insetto target: determinazione dell'efficacia insetticida della nanoemulsione mediante saggi di tossicità residuale per immersione fogliare su individui adulti di *A. gossypii*, con successiva stima delle concentrazioni letali (LC_{30}, LC_{50} e LC_{90}) mediante analisi Probit, sulla base della mortalità rilevata a 72 ore dall'esposizione.
4. Valutazione della tossicità nei confronti dell'insetto non target: determinazione della tossicità della nanoemulsione mediante contatto residuo su individui adulti di *A. mellifera*, utilizzando le concentrazioni letali (LC_{30}, LC_{50} e LC_{90}) calcolate per gli afidi.

7. MATERIALI E METODI

7.1 Condizioni di allevamento

Gli esemplari di *A. gossypii* utilizzati nelle prove di tossicità provenivano da una colonia allevata per diverse generazioni presso il Laboratorio di Entomologia Generale e Applicata del Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria. La colonia originaria era stata costituita a partire da individui raccolti su materiale vegetale infestato, prelevato in un agrumeto biologico della cultivar Tarocco situato in Calabria.

Gli afidi sono stati allevati su piantine di zucca della varietà Butternut, mantenute all'interno di gabbie BugDorm® delle dimensioni di 45 × 45 × 45 cm. Le gabbie sono state collocate in celle climatizzate, nelle quali sono state mantenute le seguenti condizioni ambientali: temperatura di 26 ± 2 °C, umidità relativa del 65 ± 5% e fotoperiodo di 16:8 h luce:buio (L: B).

Gli esemplari di *C. montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) impiegati nelle prove sono stati gentilmente forniti dalla Biofabbrica Insetti Utili (B.I.U.) (Ramacca, Italia) dell'Ente di Sviluppo Agricolo (ESA) della Regione Siciliana.

7.2 Caratterizzazione chimica dell'olio essenziale di aglio

L'olio essenziale (OE) di aglio, acquistato presso Esperis S.p.A. (Italia), è stato sottoposto a caratterizzazione chimica mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) (Fig. 9). Prima dell'analisi, l'OE è stato diluito in esano nel rapporto 1:10 (v/v).

L'analisi GC-MS è stata effettuata impiegando un gascromatografo Thermo Fisher TRACE 1300, dotato di colonna capillare MEGA-5 (30 m x 0,25 mm; spessore del rivestimento = 0,25 μm; colonna di guardia= 10 m), accoppiato a uno spettrometro di massa Thermo Fisher ISQ LT (corrente di emissione: 10 microampere; count threshold: 1 count; offset del moltiplicatore: 0 volt; tempo di scansione: 1,00 secondi; tempo di ionizzazione in prescan: 100 microsecondi; range di massa della scansione: 30-300 m/z; modalità di ionizzazione: EI= Electron Impact). Sono state utilizzate le seguenti

condizioni analitiche: temperatura dell'iniettore e della linea di trasferimento rispettivamente a 250 e 240°C; temperatura del forno programmata da 60 a 240°C a 3°C min^{-1}; gas carrier, elio a 1mL min^{-1}; iniezione, 0,2 μL; split ratio, 1:30.

L'identificazione dei composti rilevati nel cromatogramma è stata effettuata mediante il confronto dei tempi di ritenzione (TR) e degli indici di ritenzione lineare (IRL) con quelli di composti puri di riferimento. Gli spettri di massa ottenuti sono stati inoltre confrontati, sulla base dei relativi valori di match e reverse match (R-match), con quelli presenti nelle biblioteche commerciali NIST 05, Wiley FFNSC e ADAMS. Il processo di identificazione è stato ulteriormente supportato dal confronto con una biblioteca personale, costruita utilizzando gli spettri di sostanze pure, di componenti noti di oli essenziali e dati disponibili in letteratura (Masada, 1976; Davies, 1990; Jennings, 2012; Gruver *et al.*, 2017). Gli IRL sono stati calcolati applicando l'equazione proposta da Van den Dool e Kratz (1963). A tale scopo, i tempi di ritenzione dei composti presenti nell'OE sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi di una miscela standard di n-alcani, con numero di atomi di carbonio compreso tra 7 e 30 (C7-C30 Saturated Alkanes Standard Mixture, Supelco®, Bellefonte, PA, USA). La miscela standard è stata analizzata mediante GC-MS nelle medesime condizioni operative adottate per l'analisi dell'OE.

7.3 Sintesi e caratterizzazione fisica della nanoemulsione

La nanoemulsione a base di olio essenziale (OE) di aglio è stata preparata mediante microfluidizzazione ad alta pressione (*high-pressure microfluidization*, HPM), seguendo il protocollo descritto da Modafferi et al. (2024c).

Inizialmente, l'OE è stato miscelato con Tween® 80 [poliossietilene (20) sorbitano monooleato; Sigma-Aldrich, Monaco, Germania] in rapporto 3:1 (p/p). La miscela è stata sottoposta ad agitazione a 6.000 rpm per 5 min, fino al conseguimento di una completa omogeneizzazione. Successivamente, è stata aggiunta gradualmente acqua bidistillata, a una velocità di 1 mL min^{-1},

mantenendo un rapporto finale di 4:1 (p/p) tra la fase acquosa e la miscela costituita da OE e Tween® 80.

La formulazione così ottenuta, costituita dal 15% di OE, dal 5% di Tween® 80 e dall'80% di acqua bidistillata (p/p), è stata sottoposta ad agitazione a 7.000 rpm per 5 min, allo scopo di ottenere un'emulsione grezza omogenea. Quest'ultima è stata successivamente sottoposta a cinque cicli di microfluidizzazione alla pressione di 30.000 psi, mediante un LM20 Microfluidizer™ Processor (Microfluidics, USA). Durante il processo, la camera di interazione è stata mantenuta in un bagno di acqua e ghiaccio, al fine di contenere l'incremento della temperatura e limitare la possibile degradazione dei composti volatili presenti nell'OE.

Al termine del processo, la nanoemulsione è stata trasferita in contenitori di alluminio e conservata a 4 °C fino al momento dell'impiego.

La nanoemulsione è stata caratterizzata mediante diffusione dinamica della luce (*Dynamic Light Scattering*, DLS), utilizzando uno Zetasizer Nano (Malvern®). Le analisi sono state condotte per determinare i seguenti parametri:

- diametro medio delle goccioline, espresso in nm;
- indice di polidispersione (*polydispersity index*, PDI), utilizzato come indicatore dell'omogeneità della distribuzione dimensionale delle goccioline;
- carica superficiale delle goccioline;
- stabilità fisica della formulazione nel tempo, valutata dopo 1 giorno, 1 settimana e 1 mese dalla preparazione.

Prima delle analisi, la nanoemulsione è stata diluita con acqua bidistillata in rapporto 1:200 (v/v), al fine di ottenere condizioni idonee alla misurazione. Per ciascuna determinazione sono state utilizzate aliquote di 1 mL per l'analisi delle dimensioni delle goccioline e del PDI e aliquote di 0,75 mL per la determinazione della carica superficiale.

7.4. Tossicità nei confronti dell'insetto target *A. gossypii*

L'attività insetticida della nanoemulsione a base di olio essenziale (OE) di aglio è stata valutata nei confronti di individui adulti di *A. gossypii* mediante

un saggio di tossicità per esposizione residuale, condotto con il metodo dell'immersione fogliare (*leaf-dip bioassay*).

A tale scopo, da foglie di zucca della stessa varietà impiegata per l'allevamento della colonia, sono stati ricavati dischi fogliari del diametro di 3,8 cm. Ciascun disco è stato immerso per 10 s in una delle cinque diluizioni della nanoemulsione, corrispondenti a concentrazioni finali di OE pari a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5% (p/p). Le concentrazioni sono state ottenute mediante diluizione della formulazione originaria con acqua.

Dopo il trattamento, i dischi fogliari sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente e successivamente collocati, singolarmente, all'interno di contenitori di plastica provvisti di tappo forato. In ciascun contenitore, il disco è stato disposto su uno strato di agar al 2%, utilizzato allo scopo di preservarne la turgidità e limitarne il disseccamento.

Su ciascun disco fogliare sono stati trasferiti dieci individui adulti di *A. gossypii*, utilizzando un pennello a setole morbide. I contenitori sono stati quindi mantenuti in cella climatica nelle medesime condizioni ambientali adottate per l'allevamento della colonia.

Per ciascuna concentrazione sono state predisposte sei repliche, ciascuna costituita da un contenitore contenente un disco fogliare e 10 afidi, per un totale di 60 individui per trattamento. Parallelamente, è stato allestito un controllo negativo, nel quale i dischi fogliari sono stati immersi esclusivamente in acqua.

La mortalità è stata registrata a 24, 48 e 72 h dal trattamento mediante osservazione allo stereomicroscopio. Gli individui sono stati considerati morti quando, in seguito a una lieve stimolazione con un pennello a setole morbide, non mostravano alcun movimento coordinato.

7.5 Tossicità nei confronti dell'insetto non target *Cryptolaemus montrouzieri*

La tossicità per contatto residuo della nanoemulsione a base di olio essenziale (OE) di aglio nei confronti di *C. montrouzieri* è stata valutata seguendo lo stesso protocollo usato per *A. gossypii*.

Per la preparazione dei trattamenti sono state utilizzate le concentrazioni letali dell'OE stimate a 72 h per *A. gossypii*, corrispondenti a CL_{30}, CL_{50} e CL_{90}, rispettivamente pari allo 0,90, all'1,63 e al 2,67%.

Per ciascuna concentrazione e per il controllo sono state predisposte 10 repliche, ciascuna costituita da un contenitore con 10 individui. Le unità sperimentali sono state mantenute in cella climatica a una temperatura di 25 ± 1 °C, con umidità relativa del 65 ± 5% e fotoperiodo di 16:8 h luce: buio (L: B).

La mortalità è stata valutata a 24 h dall'inizio dell'esposizione. Gli individui che non mostravano alcun movimento in seguito a una lieve stimolazione sono stati considerati morti.

7.6 Analisi statistica dei dati

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software IBM® SPSS® Statistics, versione 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Prima di procedere con le analisi parametriche, la normalità della distribuzione dei residui e l'omogeneità delle varianze sono state verificate, rispettivamente, mediante il test di Shapiro-Wilk e il test di Levene. Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0,05$.

Le variazioni nel tempo delle caratteristiche fisiche della nanoemulsione sono state valutate mediante analisi della varianza a una via (ANOVA), considerando il tempo di conservazione come fattore. Il diametro medio delle goccioline e l'indice di polidispersione (PDI) sono stati analizzati separatamente come variabili dipendenti. In presenza di differenze significative, le medie sono state confrontate mediante il test HSD di Tukey, adottando un livello di significatività pari a $p < 0,05$.

I dati di mortalità ottenuti nelle prove di tossicità condotte su *A. gossypii* sono stati corretti rispetto alla mortalità osservata nel controllo mediante la formula di Abbott (1925). Le percentuali di mortalità corretta registrate a 72 h dall'esposizione sono state sottoposte ad analisi della varianza a una via, considerando la concentrazione dell'olio essenziale come fattore. In presenza

di differenze significative, le medie sono state separate mediante il test HSD di Tukey ($p < 0,05$).

La relazione concentrazione-risposta è stata analizzata mediante regressione Probit, utilizzando i dati di mortalità registrati a 72 h dall'esposizione alla nanoemulsione. Tale analisi ha consentito di stimare le concentrazioni letali mediane ed estreme, indicate come CL_{30}, CL_{50} e CL_{90}, unitamente ai rispettivi limiti fiduciali al 95%.

8.RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 Composizione chimica dell'olio essenziale di aglio

L'analisi GC-MS dell'olio essenziale (OE) di aglio ha evidenziato la presenza di 42 componenti. Di questi, 23 sono stati identificati e rappresentavano complessivamente il 97,36% dell'area cromatografica totale (Tabella 1).

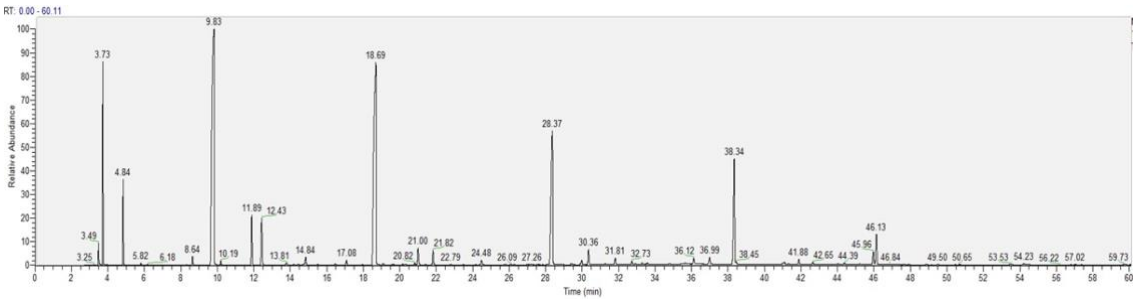
Il profilo chimico dell'OE era caratterizzato dalla predominanza di composti organosolforati. I costituenti principali erano il diallil disolfuro (32,30%), il diallil trisolfuro (26,80%) e il diallil tetrasolfuro (13,51%). A questi seguivano l'8-metil-4,5,6,9-tetratia-1,11-dodecadiene (7,44%) e il diallil solfuro (6,19%). Nel complesso, i cinque composti maggiormente rappresentati costituivano l'86,24% dell'area cromatografica totale, evidenziando un profilo chimico dominato dai derivati solforati dell'allile.

Composti	**IRL**[1]	**IRL**[2]	**RT**[3]	**Area (%)**
Allyl isopropyl sulfide	826	826	3,25	*[4]
1,2-Dithiolane	841	842	3,49	0,57
Diallyl sulfide	856	850	3,73	6,19
Allyl propyl sulfide	871	875	3,95	0,01
Methyl isopropyl disulphide	895	899	4,33	*[4]
Allyl methyl disulfide	917	919	4,84	2,50
Dimethyl trisulfide	970	970	6,18	0,01
1,3-Dithiane	1021	1027	7,67	*[4]
Allyl propyl disulfide	1049	1048	8,64	0,32
Diallyl disulphide	1084	1082	9,83	32,3
2-Propenyl propyl disulfide	1094	1097	10,19	0,15
Allyl methyl trisulfide	1138	1135	11,89	2,32
4-Methyl-1,2,3-trithiolane	1151	1150	12,43	2,51
3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-4-ene	1186	1180	13,81	0,10

2-Vinyl-4H-1,3-dithiine	1211	1215	14,84	0,47
Dimethyl tetrasulphide	1215	1215	14,99	*[4]
Allyl isopropil trisulfide	1264	1266	17,08	0,26
Diallyl trisulfide	1303	1300	18,69	26,8
Allyl propyl trisulfide	1312	1307	19,09	0,06
5-Methyl-1,2,3,4-tetrathiane	1358	1359	21	101
Diallyl tetrasulphide	1540	1540	28,37	13,51
6-Methyl-4,5,8-trithia-1,10-undecadiene	1591	1591	30,36	0,83
8-Methyl-4,5,6,9-tetrathia-1,11-dodecadiene	1812	1815	38,34	7,44
Composti solforati	**97,36%**			
Totale identificati	**97,36%**			

[1]Indice di ritenzione lineare calcolato;
[2]Indice di ritenzione lineare da bibliografia;
[3]Tempo di ritenzione; [4]<0.01%.

Tabella 1: Composizione chimica dell'olio essenziale (Allium sativum L.)



8.2 Caratterizzazione fisica della nano-emulsione

La nano-emulsione a base di OE di aglio ha mantenuto dimensioni medie delle goccioline inferiori a 200 nm a tutti i tempi di osservazione (Fig. 6). Tuttavia, nel corso del periodo di osservazione è stato rilevato un progressivo incremento della dimensione media delle goccioline, che è passata da 85,93 ± 0,3 nm a 24 h dalla preparazione a 129,7 ± 0,2 nm dopo una settimana e a 177 ± 0,79 nm dopo un mese. I valori dell'indice di polidispersione (PDI) sono rimasti inferiori a 0,25 durante l'intero periodo di osservazione (Fig. 7), con valori medi pari a 0,155 ± 0,00 a 24 h, 0,227 ± 0,00 dopo una settimana e 0,222 ± 0,00 dopo un mese.

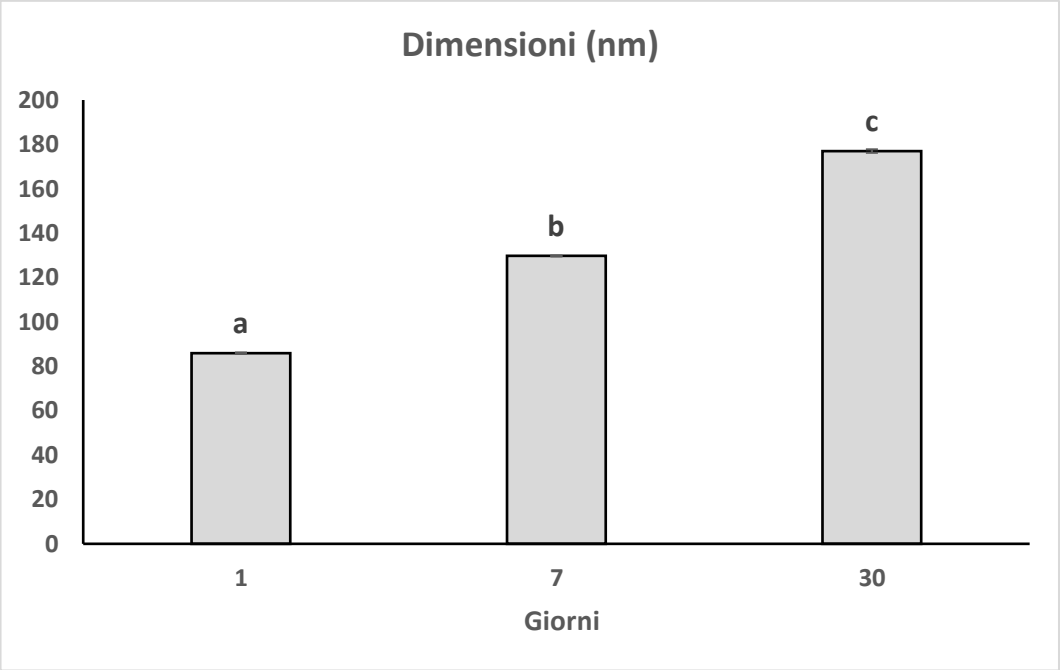


Figura 6: Variazione del diametro medio delle goccioline nei tempi di osservazione

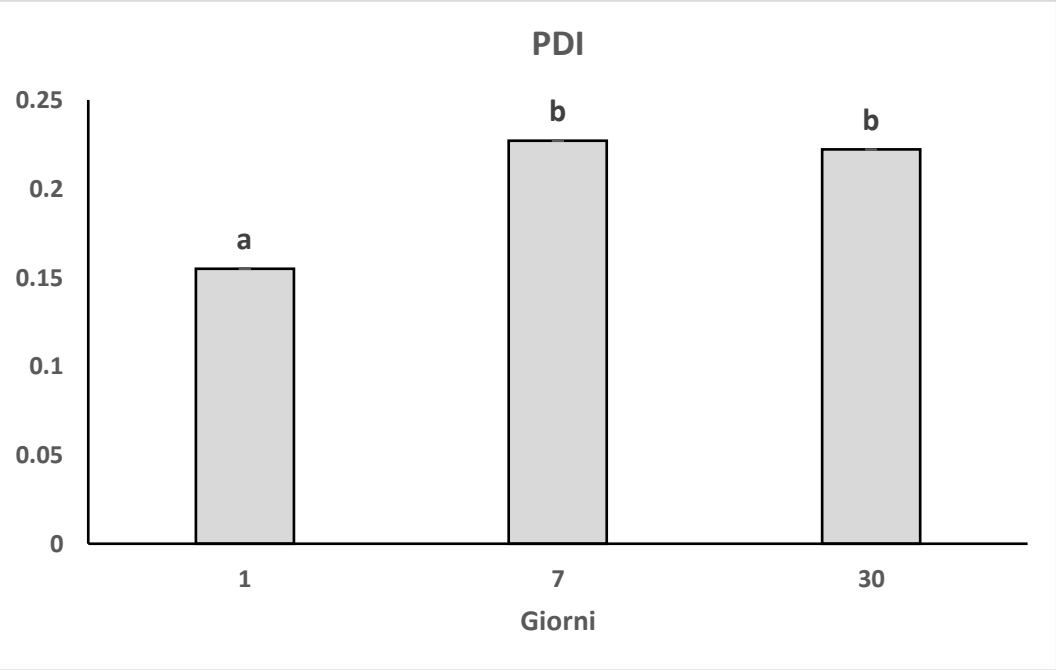


Figura 7:Indice di polidispersione (PDI)

8.3. Tossicità su organismi target

La nanoemulsione a base di olio essenziale di aglio ha determinato una mortalità di *A. gossypii* dipendente sia dalla concentrazione sia dal tempo di esposizione (Fig. 8, Tab. 3). In generale, la mortalità è aumentata progressivamente all'aumentare della concentrazione della formulazione e, per ciascuna concentrazione saggiata, con il prolungarsi dell'esposizione da 24 a 72 h.

Alla concentrazione più bassa, pari allo 0,5%, la mortalità si è mantenuta contenuta, con valori pari al 2% dopo 24 h, al 3,5% dopo 48 h e al 6% dopo 72 h. Alla concentrazione dell'1%, la mortalità è aumentata dal 18%, rilevato dopo 24 h, al 28% dopo 48 h, raggiungendo il 36% dopo 72 h. Un ulteriore incremento è stato osservato alla concentrazione dell'1,5%, alla quale la mortalità è risultata pari al 31, al 38 e al 43% rispettivamente dopo 24, 48 e 72 h.

Alle concentrazioni più elevate l'effetto insetticida della nanoemulsione è risultato maggiormente pronunciato. In particolare, alla concentrazione del 2%, la mortalità è aumentata dal 39% dopo 24 h al 62% dopo 48 h, raggiungendo il 70% dopo 72 h. Il valore più elevato è stato registrato alla concentrazione del 2,5%, che ha determinato una mortalità pari al 45% dopo 24 h, al 69% dopo 48 h e all'85% dopo 72 h.

Nel complesso, i risultati mostrano che l'efficacia della nanoemulsione è stata più evidente dopo 48 e 72 h di esposizione, soprattutto alle concentrazioni del 2 e del 2,5%.

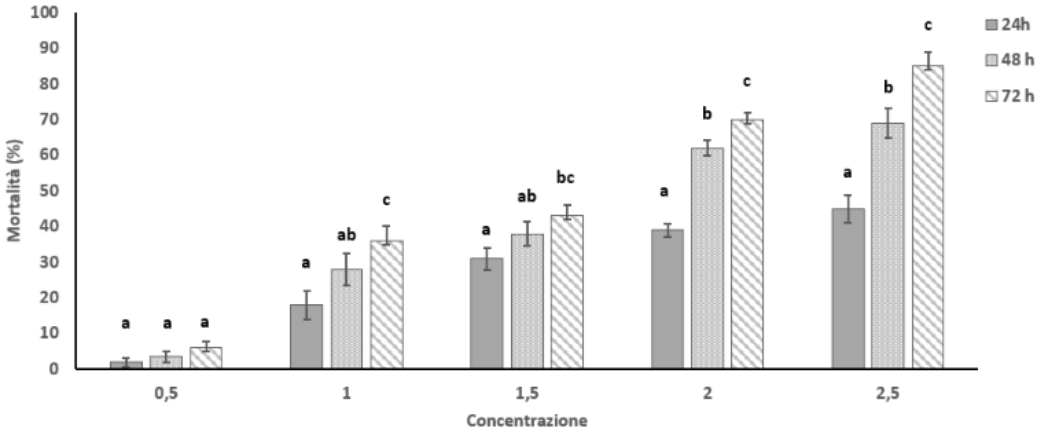


Figura 8: Percentuale di mortalità di A. gossypii registrata a 24, 48 e 72 ore dall'esposizione alle diverse concentrazioni di nanoemulsione

Concentrazione	24h	48h	72h
0,5	2 ± 1,2	3,5 ± 1,5	6 ± 1,8
1	18 ± 4,12	28 ± 4,35	36 ± 4,08
1,5	31 ± 3,15	38 ± 3,32	43 ± 3,08
2	39 ± 1,85	62 ± 2,10	70 ± 1,95
2,5	45 ± 3,85	69 ± 4,12	85 ± 3,96

Tabella 2: Mortalità di A. gossypii registrata a 24, 48 e 72 ore dall'esposizione della nanoemulsione

La mortalità massima, pari all'85%, è stata osservata dopo 72 h alla concentrazione più elevata saggiata. L'analisi dei dati a 72 h ha evidenziato un andamento crescente della mortalità in funzione della concentrazione (Fig. 9). L'incremento è risultato più graduale alle concentrazioni inferiori e più marcato a partire dal 2%, indicando una maggiore efficacia insetticida della nanoemulsione alle concentrazioni più elevate.

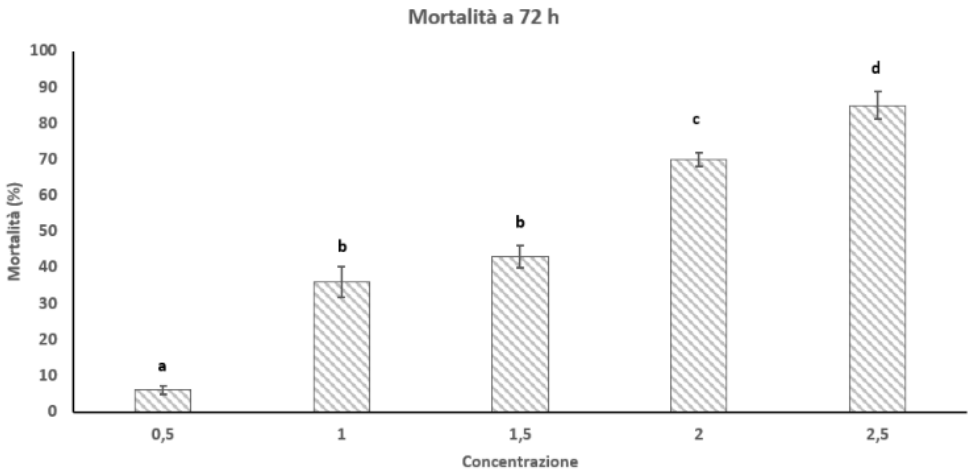


Figura 9: Andamento crescente della mortalità a 72h

I dati di mortalità registrati dopo 72 h di esposizione sono risultati adeguatamente descritti dal modello Probit, consentendo di stimare le concentrazioni letali e i relativi limiti fiduciali al 95% (Tab. 4).

Il test di bontà di adattamento non è risultato significativo ($\chi^2 = 2,14$; gdl = 3; $p = 0,544$), indicando l'assenza di differenze statisticamente significative tra le mortalità osservate e quelle attese sulla base del modello. Il modello Probit ha pertanto mostrato un adattamento adeguato ai dati sperimentali.

DL[1]	**Limiti fiduciali (95%) per % di OE**			**χ^2 (gl[2])**	**Sign.**
	Stimata	**Limite inferiore**	**Limite superiore**		
DL_{30}	0,90	0,78	1,03	2,14 (3)	*0,544*
DL_{50}	1,63	1,47	1,8		
DL_{90}	2,67	2,39	3,12		
[1]dose letale; [2] gradi di libertà					

Tabella 3: Stima delle dosi letali DL30, DL50, e DL90, % di OE. I valori sono considerati statisticamente differenti se i loro limiti fiduciali (95%) non si sovrappongono

8.4. Tossicità su organismi non-target

I risultati delle prove condotte su *C. montrouzieri* non hanno evidenziato effetti letali nelle 24 h successive all'esposizione alla nanoemulsione a base

di olio essenziale di aglio. In particolare, la sopravvivenza è risultata pari al 100% in corrispondenza di tutte le concentrazioni esaminate, equivalenti alla CL_{30}, alla CL_{50} e alla CL_{90} stimate per l'insetto bersaglio. Una sopravvivenza del 100% è stata rilevata anche nel gruppo di controllo.

9. CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo lo sviluppo e la caratterizzazione di una nanoemulsione a base di olio essenziale di aglio, nonché la valutazione della sua attività insetticida nei confronti di *A. gossypii* e dei suoi possibili effetti sul predatore *C. montrouzieri*.

I saggi condotti su *A. gossypii* hanno evidenziato un'attività insetticida dipendente sia dalla concentrazione della nanoemulsione sia dal tempo di esposizione. L'effetto è risultato più marcato alle concentrazioni più elevate e dopo 72 h, quando è stata registrata la mortalità massima. La relazione concentrazione-risposta ha inoltre consentito di stimare le concentrazioni letali della formulazione nei confronti dell'insetto bersaglio.

Nelle condizioni sperimentali adottate, l'esposizione dell'organismo non bersaglio alle concentrazioni saggiate non ha determinato mortalità nelle prime 24 h. Tale risultato fornisce una prima indicazione sulla compatibilità della formulazione con l'organismo esaminato, limitatamente alla modalità di esposizione, alle concentrazioni e al periodo di osservazione considerati.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che le nanoemulsioni a base di olio essenziale di aglio potrebbero rappresentare un potenziale strumento per il controllo di *A. gossypii* nell'ambito di strategie di difesa integrata.

Prima di ipotizzarne un impiego operativo, sarà tuttavia necessario approfondire l'efficacia e la selettività della formulazione attraverso prove condotte in condizioni di semicampo e di campo. Ulteriori studi dovranno inoltre valutarne la persistenza, la stabilità durante la conservazione, gli eventuali effetti subletali e a lungo termine sugli organismi non bersaglio, nonché la possibile fitotossicità sulle colture trattate. Sarà infine opportuno verificare la riproducibilità del processo produttivo, l'efficacia su differenti popolazioni di *A. gossypii* e la sostenibilità economica della formulazione.

BIBLIOGRAFIA

Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, *18*(2), 265-267.

Adak T, Barik N, Patil NB, et al (2020) Nanoemulsion of eucalyptus oil: an alternative to synthetic pesticides against two major storage insects (*Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) of rice. Ind Crops Prod 143:. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111849

Benelli G, Pavoni L, Zeni V, et al (2020) Developing a highly stable *Carlina acaulis* essential oil nanoemulsion for managing *Lobesia botrana*. Nanomaterials 10:. https://doi.org/10.3390/nano10091867

Blázquez M (2014) Role of natural essential oils in sustainable agriculture and food preservation. J Sci Res Rep 3:. https://doi.org/10.9734/jsrr/2014/11376

Buriani, A., Fortinguerra, S., Sorrenti, V., Caudullo, G., Carrara, M., 2020. Essential oil phytocomplex activity, a review with a focus on multivariate analysis for a network pharmacology-informed phytogenomic approach, 2020 Molecules 25, 1833. Page 1833 25.

Campolo O (2022) Essential oil-based green nano-insecticides: formulation, biological activity and application in ecofriendly pest control strategies. In: Acta Horticulturae

Campolo O, Cherif A, Ricupero M, et al (2017) Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: Chemical properties and biological activity. Sci Rep 7:. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13413-0

Campolo O, Puglisi I, Barbagallo RN, et al (2020) Side effects of two citrus essential oil formulations on a generalist insect predator, plant and soil enzymatic activities. Chemosphere 257:. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127252

Chaudhari AK, Singh VK, Kedia A, et al (2021) Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. Environmental Science and Pollution Research 28

Curtis, Hannah & Noll, Ulrike & Störmann, Judith & Slusarenko, Alan. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (Allium sativum L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant Pathology. 65. 79-89. 10.1016/j.pmpp.2004.11.006.

Davies NW (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. J Chromatogr A 503:1–24. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81487-4

Hazem S. Elshafie, Emilia Mancini, Ippolito Camele, Laura De Martino, Vincenzo De Feo, In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit,Industrial Crops and Products, Volume 66, 2015, ISSN 09266690,https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.031.

Giunti G, Palermo D, Laudani F, et al (2019) Repellence and acute toxicity of a nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major stored grain insect pests. Ind Crops Prod 142:. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111869

Gruver RA-, Publishing TUT, 2017 undefined (2017) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. juniperus.org

Hosseini, S., Amini, J., Saba, M. K., Karimi, K., & Pertot, I. (2020). Preharvest and Postharvest Application of Garlic and Rosemary Essential Oils for Controlling Anthracnose and Quality Assessment of Strawberry Fruit During Cold Storage. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1855. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01855

Isman MB (2017) Bridging the gap: Moving botanical insecticides from the laboratory to the farm. Ind Crops Prod 110:. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.012

Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19, 603e608.

Jennings W (2012) Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography

Laudani F, Campolo O, Caridi R, et al (2022) Aphicidal activity and phytotoxicity of *Citrus sinensis* essential-oil-based nano-insecticide. Insects 13:. https://doi.org/10.3390/insects13121150

Lawrence R, Lawrence K (2011) Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown in north Indian plains. Asian Pac J Trop Biomed 1:. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60122-6

Masada Y (1976) Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry

Modafferi A., Latella I., Campolo O., Palmeri V. (2023) Nanotecnologie per lo sviluppo di insetticidi a base di oli essenziali, Società Entomologica Italiana, Entomata, n°20, 29 aprile.

Murugan, K., Raman, C., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Subramanium, J., Dinesh, D., & Devanesan, S. (2016). Nano-insecticides for the control of human and crop pests. Short Views on Insect Genomics and Proteomics: Insect Proteomics, Vol. 2, 229-251.

Mukhlid H, Cantrell CL, Zheljazkov VD (2024) Do essential oils suppress potato sprout growth? Ind Crops Prod 219:119081. https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2024.119081

Muturi EJ, Ramirez JL, Zilkowski B, et al (2018) Ovicidal and larvicidal effects of garlic and asafoetida essential oils against West Nile virus vectors. Journal of Insect Science 18:. https://doi.org/10.1093/jisesa/iey036

Pandey AK, Kumar P, Singh P, et al (2017) Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. Front Microbiol 7

Plata-Rueda A, Martínez LC, Santos MH Dos, et al (2017) Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). Sci Rep 7:. https://doi.org/10.1038/srep46406

Regnault-Roger C (1997) The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integrated Pest Management Reviews 2:. https://doi.org/10.1023/A:1018472227889

Smith, G.H., Roberts, J.M., Pope, T.W., 2018. Terpene based biopesticides as potential alternatives to synthetic insecticides for control of aphid pests on protected ornamentals. Crop Protection 110, 125e130.

Ullah F, Gul H, Desneux N, et al (2019) Imidacloprid-induced hormesis effects on demographic traits of the melon aphid, *Aphis gossypii*. Entomologia Generalis 39:. https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0892

van Den Dool H, Dec. Kratz P (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J Chromatogr A 11:. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x

Yokomi R (2019) CTV Vectors and Interactions with the Virus and Host Plants. In: Methods in Molecular Biology

SITOGRAFIA IMMAGINI

- https://apisumm.ch/it/notizia/cos-e-la-melata

- https://www.agraria.org/entomologia-agraria/afide-delle-cucurbitacee.htm

-https://terraevita.edagricole.it/agrofarmaci-difesa/melone-aphis-gossypii-va-individuato-tempestivamente/

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Biofabbrica Insetti Utili (B.I.U.) dell'Ente di Sviluppo Agricolo della Regione Siciliana per la fornitura degli esemplari di *C. montrouzieri* utilizzati nella presente tesi.