

Camera di Commercio Industria, Artigianato e Agricoltura di TORINO

Verbale di Deposito Domanda di Brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE

Numero domanda: **TO2013A001085**

CCIAA di deposito: **TORINO**

Data di deposito: **30/12/2013**

In data 30/12/2013 il richiedente ha presentato a me sottoscritto la seguente domanda di brevetto per Invenzione Industriale.

TORINO, 30/12/2013

L'Ufficiale Rogante

**Diritti di Segreteria
Bollo Virtuale**

**15,00 EURO
20,00 EURO**

RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto un prodotto fitosanitario, in particolare per la prevenzione e/o la cura da attacchi di agenti biologici a colture e altre specie vegetali, contenete un estratto di *Punica granatum*, e preferibilmente di epicarpo di *Punica granatum*. Il prodotto secondo l'invenzione trova particolarmente applicazione nella lotta all'azione di patogeni tellurici. La presente invenzione ha inoltre per oggetto un metodo per l'ottenimento di detto prodotto fitosanitario comprendente un processo estrattivo per ottenere detto estratto di *Punica granatum* che combina l'uso di uno o più solventi con un trattamento a ultrasuoni e che consente in tal modo di concentrare maggiormente le sostanze bioattive e di incrementare sensibilmente l'efficacia del suddetto prodotto fitosanitario.

"Prodotto fitosanitario e metodo per l'ottenimento di detto prodotto fitosanitario "

DESCRIZIONE

Settore tecnico dell'invenzione

5 La presente invenzione si riferisce ad un prodotto fitosanitario.

In particolare essa si riferisce ad un prodotto fitosanitario per la cura e/o la prevenzione di attacchi da parte di agenti biologici a colture e altre specie vegetali.

10 La presente invenzione si riferisce anche ad un metodo per l'ottenimento di detto prodotto fitosanitario.

Arte nota

La presente invenzione si inquadra nel settore concernente la lotta agli agenti biologici infettanti e si riferisce ad
15 un prodotto fitosanitario per la cura e/o la prevenzione di attacchi da parte di agenti biologici a colture e altre specie vegetali, in particolare per prevenire o eliminare malattie telluriche provocate da batteri e/o funghi.

Negli ultimi decenni, la difesa delle colture agrarie ha
20 richiesto un crescente uso di prodotti fitosanitari (o agrofarmaci) di sintesi, molto spesso con contenimento solo parziale dei fitopatogeni a causa dell'insorgenza di biotipi resistenti. Ciò ha comportato un incremento del numero dei trattamenti con conseguenze dannose per l'ambiente, i
25 consumatori e gli operatori del settore.

Tale consapevolezza ha provocato un maggiore interesse ad utilizzare prodotti fitosanitari meno tossici e più rispettosi per l'ambiente.

I sistemi di difesa da attacchi da parte di agenti biologici
30 per ridurre l'uso dei prodotti fitosanitari di sintesi sono essenzialmente quattro:

1) contenimento dei patogeni col minor numero di interventi possibile (cosiddetta "difesa guidata");

2) integrazione della lotta con prodotti di sintesi con

altri mezzi fisici ed agronomici (cosiddetta "difesa integrata");

3) sostituzione della lotta con prodotti di sintesi con agenti quali virus, batteri e funghi parassiti (cosiddetta
5 "difesa biologica"); e

4) sostituzione della lotta con prodotti di sintesi con prodotti di origine vegetale (cosiddetta "difesa con prodotti naturali").

Con particolare riferimento alla lotta contro i patogeni
10 tellurici, tecniche per disinfettare i terreni con prodotti di origine vegetali come sovescio e interrimento di ammendanti e residui vegetali a base di brassicacee sono da tempo usati contro detti patogeni.

Esempi di piante bioattive usate per il contenimento delle
15 malattie provocate da patogeni tellurici comprendono *Brassica carinata*, *Eruca sativa* e *Brassica verna* (in particolare per il contenimento di *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia minor*, due fitopatogeni della rizosfera); *Brassica juncea* (in particolare per contenere le infezione
20 del batterio del pomodoro *Ralstonia solanacearum*); *Sinapis alba*, *Raphanus sativus*, *Sorgum sudanese* e *Allium ampeloprasum* (per contenere le infezioni delle carote da *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia fragariae*).

Tuttavia, i risultati nel terreno del sovescio o
25 dell'interrimento di prodotti vegetali ricchi di sostanze bioattive derivanti dalle specie sopra descritte, sono stati spesso contraddittori e di limitata efficacia.

Secondo quanto rilevato dagli studi del Richiedente, il principale problema dell'interrimento di matrici vegetali in
30 generale ed in particolar modo di quelle derivanti dalle brassicacee sta nella rapida degradazione delle sostanze bioattive presenti in dette piante (isotiocianati).

Tali sostanze sono in grado di inibire i patogeni presenti nella rizosfera nel breve periodo, ma successivamente, una

volta degradati, la loro azione si esaurisce permettendo così ai patogeni sopravvissuti di moltiplicarsi rapidamente, anche grazie alla notevole sostanza organica immessa con la matrice vegetale (farina pellettizzata, parti di piante triturate, e così via.).

Scopo principale della presente invenzione è quello di superare gli inconvenienti della tecnica nota, fornendo un prodotto fitosanitario in grado di agire efficacemente e per un tempo prolungato per la prevenzione e/o la cura di attacchi alle colture e ad altre specie vegetali da parte di agenti biologici.

In particolare, scopo della presente invenzione è quello di fornire un prodotto fitosanitario in grado di prevenire e/o contenere efficacemente e per un tempo prolungato le malattie provocate dai patogeni della rizosfera, cioè della porzione di suolo che circonda le radici delle piante.

Scopo ulteriore della presente invenzione è quello di fornire un prodotto fitosanitario a impatto ambientale basso o nullo e innocuo per uomini ed animali domestici.

Questi ed altri scopi sono raggiunti dal prodotto fitosanitario come rivendicato nelle unite rivendicazioni.

Esposizione sintetica dell'invenzione

Nello stato dell'arte, l'utilizzo di estratti di *Punica granatum* (melograno) è noto con riferimento ai settori della cosmesi, degli integratori alimentari e della medicina. In tali settori l'attenzione è principalmente incentrata su estratti dal succo di *Punica granatum*.

Non sono note dello stato dell'arte applicazioni di estratti di *Punica granatum* al settore dei fitosanitari.

Ora, il Richiedente ha sorprendentemente constatato che estratti di *Punica granatum* si rivelano estremamente efficaci nella cura e nella prevenzione di attacchi da parte di agenti biologici a colture e altre specie vegetali.

In particolare, il Richiedente ha riscontrato che un

prodotto fitosanitario contenente un estratto di *Punica granatum* è efficace per inibire l'azione di numerosi patogeni tellurici, fra i quali ad esempio il *Fusarium oxysporum*, responsabile della fusariosi, una delle
5 principali malattie telluriche.

Vantaggiosamente, l'estratto della presente invenzione è un prodotto innocuo per uomini ed animali domestici, facilmente confezionabile e trasportabile ed a basso o nullo impatto ambientale.

10 In una forma preferita di realizzazione della presente invenzione, il prodotto fitosanitario secondo l'invenzione contiene un estratto di epicarpo (buccia) di *Punica granatum*.

In una forma particolarmente preferita di realizzazione
15 della presente invenzione, il prodotto fitosanitario secondo l'invenzione contiene un estratto di epicarpo di *Punica granatum* fino a 3 mm di spessore.

Infatti, ancora più sorprendentemente, il Richiedente ha trovato che estratti dell'epicarpo di *Punica granatum* si
20 rivelano particolarmente efficaci nella lotta ai patogeni tellurici.

Tale sorprendente efficacia è da imputarsi all'elevata concentrazione nell'epicarpo di *Punica granatum* di polifenoli come antocianidine, tannini, acido ellagico e,
25 soprattutto, punicalagina, che si è rivelata la molecola di gran lunga più interessante per la sua intensa attività citotossica.

In questa forma preferita di realizzazione dell'invenzione il contenuto medio di punicalagina è compreso tra 100 e 500
30 mg per grammo di buccia di *Punica granatum*.

Vantaggiosamente, in questa forma preferita di realizzazione la materia prima per il prodotto fitosanitario secondo l'invenzione - cioè le bucce di melograno - è ottenibile dagli scarti di lavorazione delle industrie produttrici di

succhi di frutta, il che rende i costi di produzione del prodotto secondo l'invenzione particolarmente ridotti.

Ulteriori studi del Richiedente hanno dimostrato che l'efficacia del suddetto estratto di *Punica granatum* o di epicarpo di *Punica granatum* è sensibilmente incrementata quando tale estratto è ottenuto mediante uno specifico processo di estrazione che combina l'uso di uno o più solventi e un trattamento a ultrasuoni e che consente in tal modo di concentrare maggiormente le sostanze bioattive.

Ulteriori studi del Richiedente hanno messo in evidenza l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* anche a protezione dei frutti durante la fase di conservazione attraverso trattamenti da eseguire subito dopo la raccolta.

Lista delle Figure

Figura 1 è un grafico che mostra l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* nella inibizione di *Fusarium oxysporum* in funzione della concentrazione di detto estratto.

Figura 2 è un grafico che mostra l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* nella inibizione di *Fusarium oxysporum* in funzione del solvente utilizzato per la sua estrazione.

Figura 3 è un grafico che mostra l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* nella inibizione di *Fusarium oxysporum* in funzione del processo utilizzato per la sua estrazione.

Figura 4 è un grafico che mette a confronto l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* e della farina di *Brassica carinata* nella inibizione di *Fusarium oxysporum*.

Figure 5 - 7 sono grafici che evidenziano l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* nella protezione della frutta da marciumi causati da *Botrytis cinerea* e *Monilinia laxa*.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione riguarda un prodotto fitosanitario contenente un estratto di *Punica granatum*.

In una forma particolarmente preferita dell'invenzione detto

prodotto fitosanitario contiene un estratto di epicarpo di *Punica granatum*.

La presente invenzione riguarda anche un metodo per l'ottenimento di detto prodotto fitosanitario che prevede un particolare processo di estrazione per l'ottenimento del suddetto estratto di *Punica granatum*.

Nel seguito vengono forniti, a titolo di esempio non limitativo, risultati di prove sperimentali ed esempi di applicazione dell'invenzione, al fine di evidenziarne l'efficacia nella lotta ad agenti biologici, ed in particolare a patogeni tellurici.

1. Efficacia dell'estratto di *Punica granatum* nell'inibizione di *Fusarium oxysporum*

Con riferimento alla Figura 1, è illustrata l'efficacia di un estratto di *Punica granatum* nell'inibire la crescita del fungo tellurico *Fusarium oxysporum*.

L'estratto di *Punica granatum* è stato messo su piastre Petri in un substrato PDA (Potato - Dextrose - Agar) a diverse concentrazioni: 0,5%, 1%, 1,5% e 2%.

Una ulteriore piastra Petri conteneva unicamente PDA, senza alcun estratto di *Punica granatum* (controllo).

Un tassello di 5mm di diametro di inoculo è stato preso da una colonia di *Fusarium oxysporum* in crescita attiva e posto al centro di ogni piastra. A partire dal terzo giorno è stata misurata la crescita radiale del fungo.

I risultati ottenuti mostrano che anche a basse concentrazioni (0,5%) la crescita radiale del fungo risultava significativamente ridotta.

Tali risultati hanno inoltre mostrato un chiaro "effetto dose" dell'estratto, in quanto l'effetto di inibizione della crescita radiale del fungo cresceva sensibilmente al crescere della concentrazione di estratto ed era massimo alla concentrazione del 2%.

2. Metodo per l'ottenimento dell'estratto di *Punica granatum*

Il metodo innovativo di ottenimento dell'estratto di *Punica granatum* è stato messo a punto a seguito di prove sperimentali che hanno riguardato:

- l'efficacia di diversi tipi di solvente testati;

- 5 - l'effetto degli ultrasuoni sulla concentrazione delle molecole bioattive nell'estratto suddetto.

Nella prima prova, si è andati ad analizzare se i solventi usati per l'estrazione potevano influire sull'efficacia dell'estratto stesso.

- 10 L'estratto di *Punica granatum* alla medesima concentrazione ma ottenuto utilizzando solventi diversi - metanolo, etanolo, acqua, miscela acqua / metanolo / etanolo, propanolo - è stato messo su piastre Petri in un substrato PDA (Potato - Dextrose - Agar).

- 15 Una ulteriore piastra Petri conteneva unicamente PDA, senza alcun estratto di *Punica granatum* (controllo).

Un tassello di 5mm di diametro di inoculo è stato preso da una colonia di

Fusarium oxysporum in crescita attiva e posto al centro di
20 ogni piastra. A partire dal terzo giorno è stata misurata la crescita radiale del fungo.

I risultati ottenuti sono illustrati in Figura 2. Tali risultati mostrano che gli estratti ottenuti utilizzando solventi diversi non mostrano differenze significative. Solo

- 25 il propanolo sembra essere leggermente meno efficace.

Nella seconda prova si è verificato l'effetto degli ultrasuoni sulle molecole bioattive, ed in particolare sulla concentrazione della punicalagina, ritenuta la molecola maggiormente responsabile della bioattività dell'estratto di

- 30 *Punica granatum*. Questa prova era basata sull'idea che un sonicatore fosse in grado di rompere le cellule del tessuto vegetale e far liberare i soluti nell'estratto.

Un estratto di *Punica granatum* trattato con un sonicatore e un estratto di pari caratteristiche non trattato con il

sonicatore sono stati sottoposti ad analisi cromatografica.

I risultati hanno mostrato che il rapporto tra l'area dei picchi della punicalagina nell'estratto trattato col sonicatore e quella nell'estratto non trattato col sonicatore è superiore a 2, il che fa presupporre che nell'estratto trattato con il sonicatore, la punicalagina sia presente in una concentrazione maggiore

Sulla base degli esiti delle prove summenzionate, nelle sue linee più generali il processo di estrazione di *Punica granatum* del metodo per l'ottenimento di un prodotto fitosanitario secondo l'invenzione comprende almeno le fasi di:

- miscelare *Punica granatum* con un solvente;
- eseguire un trattamento con ultrasuoni;
- eliminare i residui vegetali;
- eliminare il solvente.

L'estratto così ottenuto può essere congelato e poi liofilizzato per il successivo utilizzo.

In una forma preferita di realizzazione dell'invenzione, in cui si intende ottenere un estratto di epicarpo di *Punica granatum*, il processo prevede una fase preliminare in cui i frutti di *Punica granatum* sono sbucciati e l'epicarpo (buccia) è selezionata e triturrata in piccoli pezzi.

Detto processo può inoltre comprendere opzionalmente prima della congelamento:

- una fase di sterilizzazione;
- una fase di purificazione mediante estrazione in fase solida.

Una ulteriore prova su piastre Petri è stata effettuata per testare l'efficacia del processo di estrazione sopra descritto.

Per effettuare tale prova, detto processo di estrazione è stato realizzato utilizzando i seguenti parametri:

- il frutto di *Punica granatum* è stato sbucciato e

l'epicarpo è stato selezionato e triturato in piccoli pezzi;
- sono stati aggiunti alcol etilico nella proporzione di 0,5/1 e acqua nella proporzione di 5/1 dell'epicarpo di *Punica granatum*;

- 5 - solventi ed epicarpo sono stati mescolati per 24 ore con un agitatore a piastra riscaldata (temperatura di circa 30-40 °C);
- è stato eseguito un trattamento con ultrasuoni per 10 minuti a 60 ampere;
- 10 - il prodotto è stato nuovamente mescolato in agitatore per circa 2 ore;
- i residui vegetali sono stati eliminati con centrifugazione a 4000 - 5000 giri/min per 10 min;
- il solvente è stato eliminato con un evaporatore a
- 15 rotazione;
- l'estratto è stato poi sterilizzato con un filtro a 0,45 µm;
- l'estratto è stato purificato mediante estrazione in fase solida eluendo con acetonitrile;
- 20 - l'acetonitrile è stato eliminato con un evaporatore centrifugo;
- l'estratto ottenuto è stato congelato a -80 °C;
- il prodotto congelato è stato poi liofilizzato con un liofilizzatore.

- 25 I risultati ottenuti sulle piastre Petri e illustrati in Figura 3 mostrano che l'estratto di *Punica granatum* ottenuto con il processo di estrazione secondo l'invenzione è in grado di ridurre la crescita fungina dell'80%, molto superiore al 39% dell'effetto inibitorio ottenuto senza
- 30 utilizzare il suddetto processo estrattivo.

3. Efficacia dell'estratto di *Punica granatum* su semi di pomodoro

È stato valutato l'effetto fitotossico dell'estratto di *Punica granatum* su semi di pomodoro adagiati su carta bibula

in contenitori Petri.

La Tabella 1 mostra la variazione della lunghezza della radichetta neoformata in funzione della concentrazione di detto estratto dopo 8 giorni di osservazione.

- 5 La Tabella 2 mostra la percentuale di germinazione dei semi in funzione della concentrazione di detto estratto dopo 8 giorni di osservazione.

Tabella 1

Concentrazione dell'estratto di <i>Punica granatum</i>	Lunghezza della radichetta (mm)
0 (controllo)	6,41
0,25%	3,05
0,75%	1,51
1,5%	0,55
2,5%	0,24

10

Tabella2

Concentrazione dell'estratto di <i>Punica granatum</i>	Germinazione dei semi (%)
0 (controllo)	90
0,25%	100
0,75%	100
1,5%	75
2,5%	45

I dati ottenuti hanno evidenziato l' effetto fitotossico dell'estratto di *Punica granatum*.

- 15 I dati ottenuti hanno anche evidenziato che a basse dosi l'estratto di *Punica granatum* potrebbe avere un effetto stimolante sulla germinazione, che poi diventa reprimente a dosi più elevate.

4. Efficacia dell'estratto di *Punica granatum* sui batteri

- 20 *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Cmm) del

pomodoro, *Pseudomonas syringae* pv. *aclinidiae* (Psa)
dell'actinidia e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss)
dell'olivo.

Le prove sono state condotte in vitro su piastre Petri,
 5 utilizzando estratto di *Punica granatum* a concentrazioni di
 0,5% e 1%.

Una sospensione di batteri e acqua sterile (1 ml) è stata
 miscelata a 45 °C con 3 ml di LB (Luria Broth) e sovrapposta
 a LB medium. Dopo aver raffreddato le piastre sono stati
 10 praticati dei buchi (diametro 5 mm) i quali sono poi stati
 riempiti con estratto di *Punica granatum* e con acqua
 (controllo). Le piastre sono state poi incubate e dopo 24 h
 è stato misurato il diametro di inibizione.

Anche in questo caso i risultati hanno dimostrato che
 15 l'estratto di *Punica granatum* ha avuto una buona attività
 antibatterica. Ad esempio, in Cmm l'estratto di *Punica*
granatum ha fatto registrare una zona di inibizione che in
 alcuni casi ha superato i 40 mm.

5. Prova comparativa fra l'estratto di *Punica granatum* e la
 20 farina di *Brassica Carinata* nell'inibizione di *Fusarium*
oxysporum

La Figura 4 mostra un confronto fra l'efficacia
 dell'estratto di *Punica granatum* e quella della farina di
Brassica carinata (ricca di glucosinolati), attualmente
 25 usata per la "biofumigazioni" dei terreni: nei rilievi
 eseguiti al 3°, 6° e 9° giorno la crescita micellare in
 entrambi i casi è stata statisticamente più bassa di quella
 osservata nel controllo; al 3° e 6° giorno i valori di
 efficacia dei due agrofarmaci nei confronti di *Fusarium*
 30 *oxysporum* non erano statisticamente differenti; tuttavia al
 9° giorno la crescita micellare nel caso dell'estratto di
Punica granatum è stata di 19,83 mm, statisticamente più
 bassa di quella osservata nel caso di *Brassica carinata* (27
 mm) .

Questa prova comparativa dimostra la minore degradabilità dell'estratto di *Punica granatum* rispetto a *Brassica carinata*.

Una bassa degradabilità delle sostanze bioattive utilizzate è molto importante perché permette una maggiore persistenza nel terreno e una azione inibente nei confronti dei patogeni presenti nel suolo più prolungata nel tempo, proteggendo così la pianta da rapidi ripopolamenti dei patogeni tellurici.

Questo si spiega per il fatto che rispetto ad altre sostanze biologicamente attive, la punicalagina contenuta nell'estratto di *Punica granatum* ha un peso molecolare più elevato, quindi maggiore stabilità e più efficacia nel contenimento dei patogeni.

6. Prova in vivo in serra su vasetti contenenti terreno precedentemente infettato con *Fusarium oxysporum*.

Nella prova in vivo è stata utilizzata una dose di estratto di *Punica granatum* pari a 0,5% somministrata con trattamenti ogni 7 giorni.

I risultati di questa prova in vivo sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3

Tesi	Dose	Altezza pianta (cm)	Lunghezza radice (cm)	Peso fresco pianta (g)
Piante non inoculate non trattate	==	22,0a	17,25a	3,9a
Piante inoculate non trattate	==	7,7b	5,0b	0,8b
Piante inoculate trattate	0,5%	17,0a	16,0a	3,2a

Tali risultati evidenziano come nelle piantine non inoculate con *Fusarium oxysporum* si sono registrati valori statisticamente simili a quelli delle piantine inoculate con *Fusarium oxysporum* e trattate con l'estratto di *Punica*

granatum.

Al contrario, i valori relativi alle piantine inoculate con *Fusarium oxysporum* e non trattate con l'estratto di *Punica granatum* i valori sono statisticamente diversi, e in misura
5 sensibile.

7. Efficacia dell'estratto di *Punica granatum* nella protezione della frutta da marciumi causati da *Botrytis cinerea* e *Monilinia laxa*.

È stata valutata l'efficacia dell'utilizzo dell'estratto di
10 *Punica granatum* su frutta dopo la raccolta per proteggere la frutta stessa dai marciumi causati da *Botrytis cinerea* e *Monilinia laxa*.

In un primo test sono state prese 90 bacche di uva, suddivise in tre repliche da 30. Una prima replica è stata
15 trattata con l'estratto secondo l'invenzione, pungendo le bacche con un ago nella parte mediana e immettendo su ogni puntura 10 µl di estratto secondo l'invenzione (10% di concentrazione); dopo 1 ora sulla stessa puntura sono stati messi 10 µl di sospensione conidica (106 conidi/ml).

20 La Figura 5 mostra che l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* (espressa utilizzando l'indice di McKinney), il quale estratto ha completamente inibito lo sviluppo dei marciumi sulle bacche di uva.

In Figura 5 è anche riportato per confronto l'indice di
25 McKinney di una replica di controllo in cui l'estratto di *Punica granatum* è stato sostituito con acqua sterile.

In un secondo test sono state prese 90 fragole, suddivise in tre repliche da 30. Una prima replica è stata trattata con l'estratto secondo l'invenzione, immergendo per 2 min le
30 fragole in una soluzione contenente il 10% di estratto di *Punica granatum*. Dopo il trattamento le fragole sono state poste in frigo per 5 giorni ad una temperatura di 4°C e successivamente a 24°C dove è stata valutata la gravità e l'incidenza dei marciumi.

La Figura 6 mostra (anche in questo caso utilizzando l'indice di Mc Kinney) che l'estratto di *Punica granatum* ha completamente inibito lo sviluppo dei marciumi nelle fragole.

5 In Figura 6 è anche riportato per confronto l'indice di McKinney di una replica di controllo in cui l'estratto di *Punica granatum* è stato sostituito con acqua sterile.

In un terzo test sono state prese 90 ciliegie, suddivise in tre repliche da 30. Una prima replica è stata trattata con
10 l'estratto secondo l'invenzione, immergendo per 2 min le ciliegie in una soluzione contenente il 10% di estratto di *Punica granatum*. Dopo il trattamento le ciliegie sono state poste in frigo per 5 giorni ad una temperatura di 4°C e successivamente a 24°C dove è stata valutata la gravità e
15 l'incidenza dei marciumi.

La Figura 7 mostra (sempre utilizzando l'indice di Mc Kinney) che l'estratto di *Punica granatum* ha completamente inibito lo sviluppo dei marciumi nelle ciliegie.

In Figura 7 è anche riportato per confronto l'indice di
20 McKinney di una replica di controllo in cui l'estratto di *Punica granatum* è stato sostituito con acqua sterile. 8.

Applicabilità industriale

Il prodotto fitosanitario oggetto della presente invenzione si inserisce nel settore degli agrofarmaci naturali.

25 Nel caso di utilizzo del solo epicarpo di *Punica granatum* i costi di produzione possono essere particolarmente contenuti poiché le bucce di melograno potrebbero essere ottenute dagli scarti di lavorazione delle industrie che producono succhi di frutta.

30 Il prodotto fitosanitario secondo l'invenzione può essere costituito unicamente da estratto di *Punica granatum* (o di epicarpo di *Punica granatum*), oppure contenere anche altri componenti adiuvanti.

Esso può essere realizzato in capsule rivestite da una

pellicola idrosolubile. Vantaggiosamente è possibile ipotizzare pellicole idrosolubili con spessori differenziati, in modo che il rilascio delle sostanze bioattive sia graduale.

5 In alternativa, il prodotto secondo l'invenzione può essere sciolto in acqua prima dell'uso e poi versato nel terreno. Esso può essere somministrato prima della semina o dopo la messa in atto della coltura, distribuendo il prodotto attorno alle piante.

10 Il prodotto fitosanitario secondo l'invenzione può anche essere utilizzato efficacemente sulla frutta dopo la raccolta per prevenire l'insorgenza di marciumi.

È evidente da quanto sopra descritto che l'invenzione raggiunge gli scopi sopra prefissati, in quanto fornisce un
15 prodotto fitosanitario che presenta una maggior efficacia, una minore degradabilità ed una maggiore persistenza nel terreno rispetto ad agrofarmaci di origine naturale di tipo noto.

È inoltre evidente che quanto sopra è stato descritto a
20 titolo esemplificativo e non limitativo e che numerose modifiche e varianti che rientrano nell'ambito della presente invenzione come definito dalle unite rivendicazioni sono alla portata del tecnico del settore.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per l'ottenimento di un prodotto fitosanitario, comprendente un processo di estrazione per ottenere un estratto di *Punica granatum*, **caratterizzato dal fatto che**

5 detto processo di estrazione comprende almeno le fasi di:

- predisporre *Punica granatum*;
- miscelare detto *Punica granatum* con uno o più solventi;
- incrementare la concentrazione di punicalagina sottoponendo la miscela così ottenuta a un trattamento a
- 10 ultrasuoni;
- rimuovere i residui vegetali;
- rimuovere il solvente.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto processo di estrazione prevede inoltre, prima della fase di

15 miscelazione con detto solvente, le fasi di:

- sbucciare *Punica granatum*;
- selezionare l'epicarpo di *Punica granatum*;
- tritare detto epicarpo di *Punica granatum* in piccoli pezzi.

20 3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detto processo di estrazione prevede inoltre una fase finale di congelamento e successiva liofilizzazione.

4. Metodo secondo una qualsiasi rivendicazione da 1 a 3, in cui detto processo di estrazione comprende inoltre,

25 successivamente alla fase di rimozione di detto solvente, una fase di sterilizzazione.

5. Metodo secondo una qualsiasi rivendicazione da 1 a 4, in cui detto processo di estrazione comprende inoltre, successivamente alla fase di rimozione di detto solvente,

30 una fase di purificazione mediante estrazione in fase solida.

6. Prodotto fitosanitario ottenuto mediante il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5.

7. Uso di un prodotto fitosanitario secondo una qualsiasi

P4156IT00

delle rivendicazioni da 1 a 5 per la cura e/o la prevenzione da attacchi a colture o altre specie vegetali da parte di agenti biologici, in particolare da parte di patogeni tellurici.

5

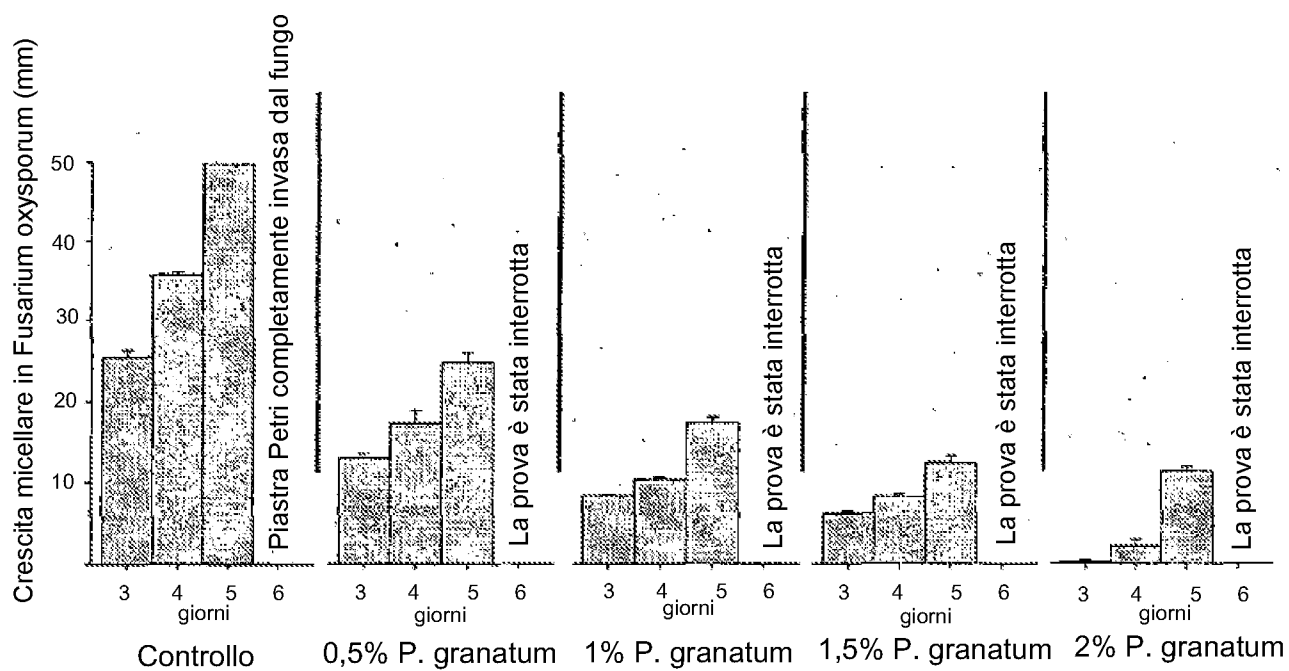


FIG. 1

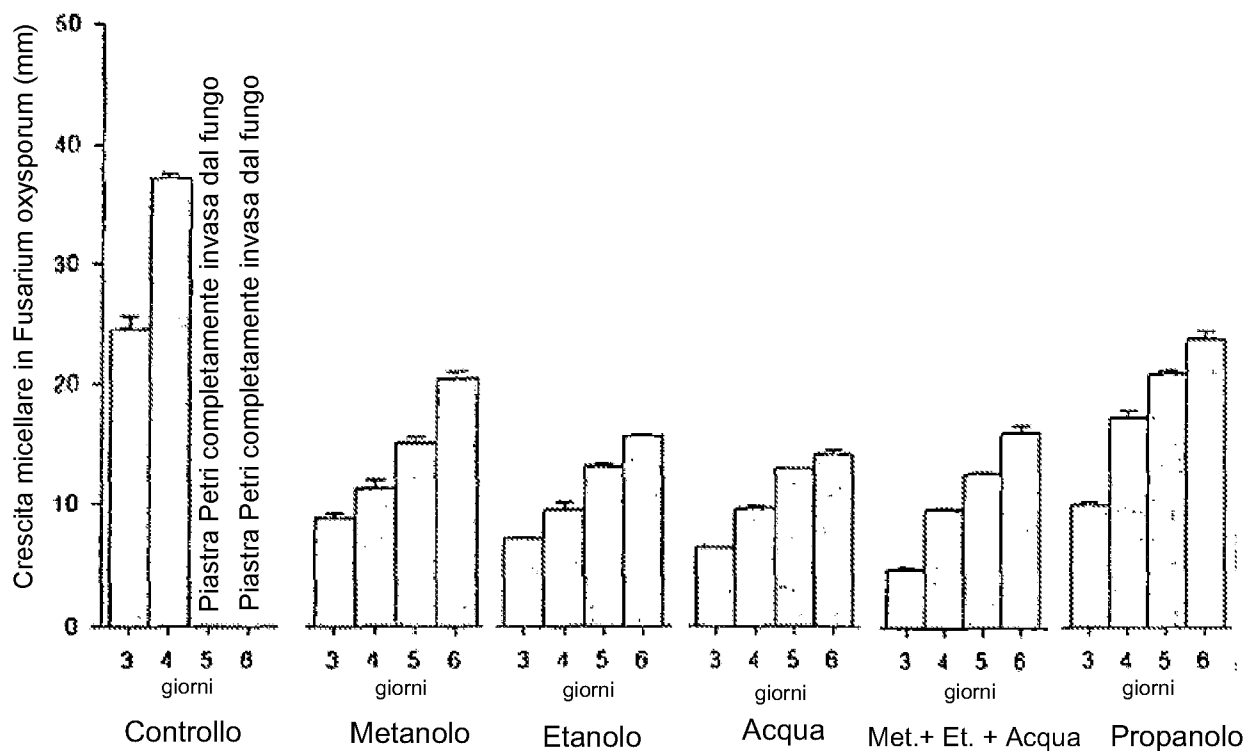


FIG. 2

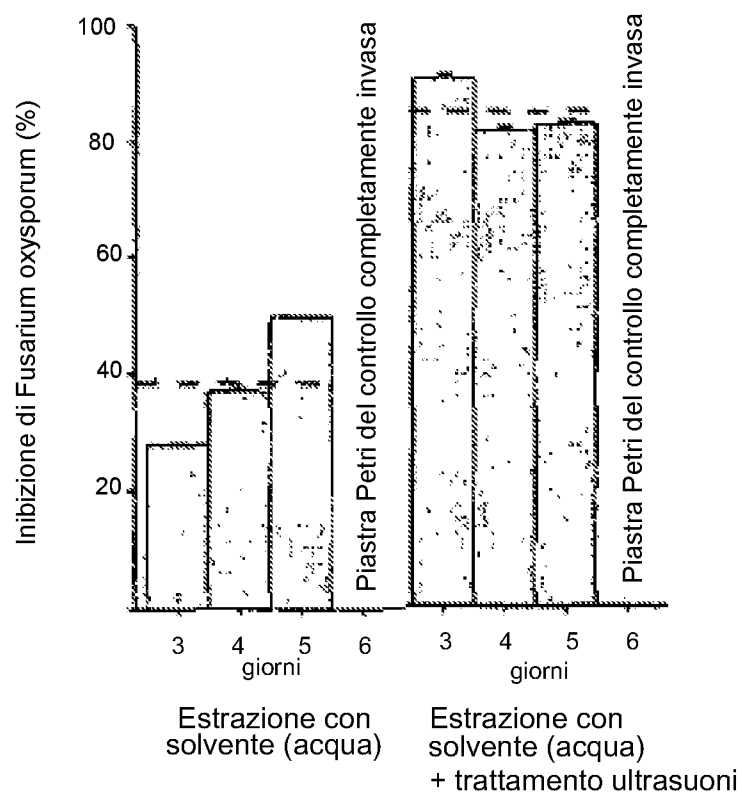


FIG. 3

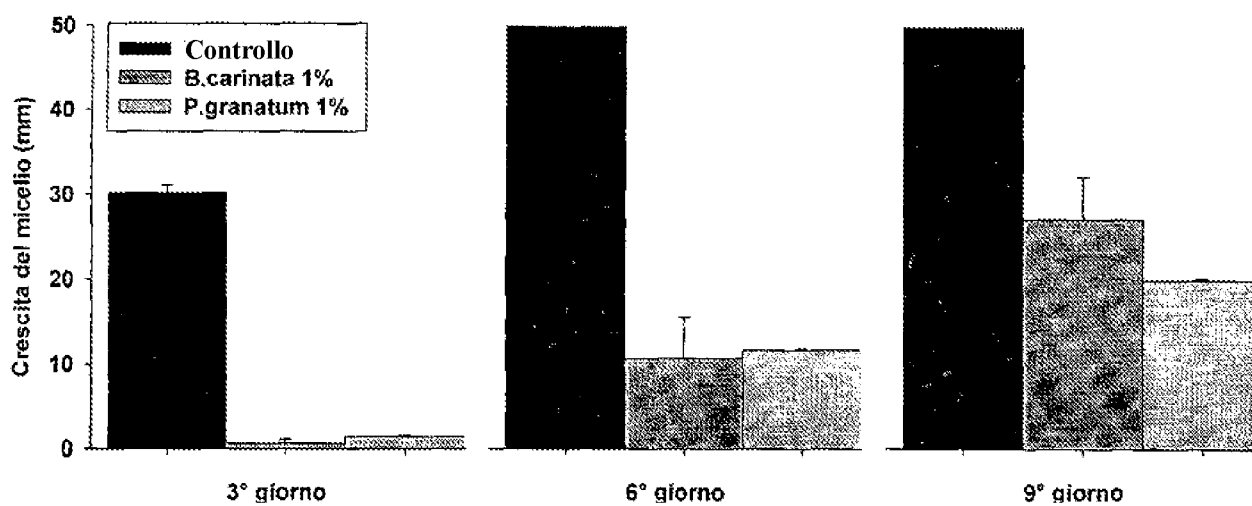


FIG. 4

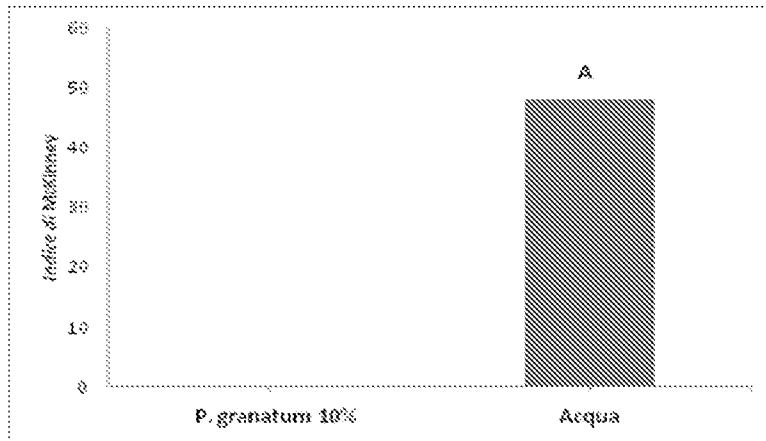


FIG. 5

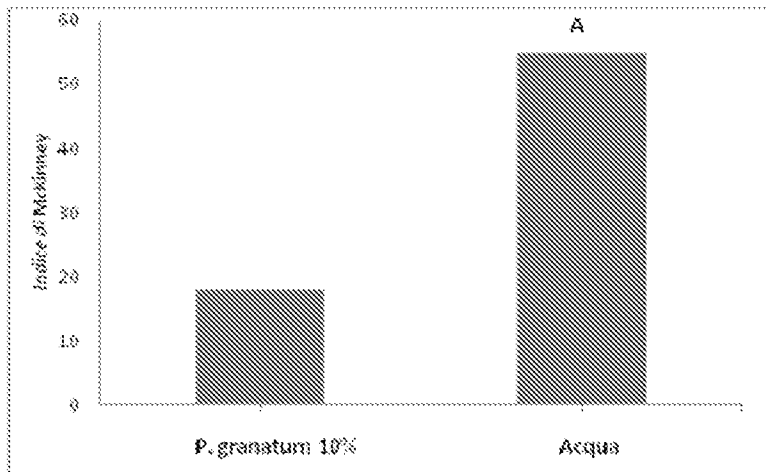


FIG. 6

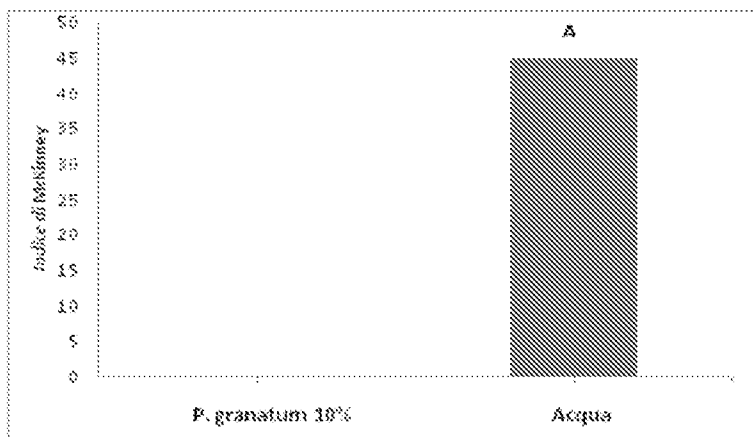


FIG. 7