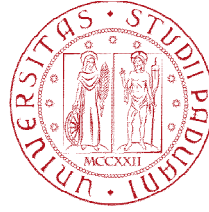


1222 • 2022  
**800**  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova  
Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

# **Nanofertilizzanti per un'agricoltura sostenibile**

Relatore:

Prof. Carmelo Maucieri

Correlatore:

Dott.ssa Vittoria Giannini

Laureando:  
Damiano Verona

ANNO ACCADEMICO 2022-2023



# Indice

<b>Riassunto .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Introduzione.....</b>	<b>7</b>
1.1 Nuove necessità e prospettive dell'agricoltura .....	7
1.2 Principali caratteristiche chimiche dei nanomateriali e metodi di produzione .....	9
<b>2.I fertilizzanti.....</b>	<b>13</b>
2.1 Storia dei fertilizzanti .....	13
2.2 Motivi del costante aumento dell'uso dei fertilizzanti.....	14
<b>3. Nanofertilizzanti .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Differenza tra i nanofertilizzanti di sintesi e i nanofertilizzanti biologici .....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Cenni sui metodi di produzione di nanofertilizzanti biologici.....	18
3.1.2 Potenzialità e criticità dei nanofertilizzanti biologici .....	19
<b>3.2 Modalità di azione dei nanofertilizzanti.....</b>	<b>20</b>
3.3 Nanoargille.....	23
3.3.1 Caratteristiche chimiche.....	24
3.3.2 Azione protettiva dei composti silicei .....	25
3.3.3. Ruolo di carrier dei composti silicei .....	28
3.3.4 Azione diretta sul terreno .....	29
3.4 Nanoparticelle di idrossiapatite .....	30
3.4.1. Caratteristiche chimiche.....	31
3.4.2 Idrossiapatite legata all' urea .....	32
3.4.3 Idrossiapatite legata al fosforo.....	33
3.5. Nanoparticelle polimeriche .....	35
3.6 Chitosano.....	35
3.6.1. Carrier per gli agenti fertilizzanti .....	37
3.6.2 Elicitore per indurre l'attivazione di sistemi di difesa .....	39
3.6.3Agente protettore da stress biotici e abiotici .....	40
3.7 Nanomateriali carboniosi.....	41
3.7.1Caratteristiche chimiche.....	43
3.7.2 Carbon nanotubes.....	44
3.7.3 Azione non legata ad elementi fertilizzanti.....	47
3.7.4 Criticità dei nanomateriali carboniosi .....	48
<b>4. Criticità legate all'utilizzo dei nanofertilizzanti.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Criticità per la pianta.....</b>	<b>51</b>
4.2 Criticità per il terreno .....	54
4.3 Criticità per l'uomo.....	55

<b>5. Assenza dei prodotti in commercio e prospettive future.....</b>	<b>58</b>
5.1 Cause dell'assenza dei prodotti in commercio.....	58
5.2 Mancanza di letteratura riguardante i nanomateriali.....	59
5.3 Mancanza di convenienza nella produzione da parte dell'industria.....	60
5.4 Mancanza di una legislazione adeguata .....	62
<b>6. Sperimentazione in viticoltura .....</b>	<b>65</b>
<b>7. Conclusioni.....</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>70</b>

## Riassunto

I nanofertilizzanti sono uno dei mezzi tecnici che esprimono le maggiori potenzialità per il futuro sviluppo di un'agricoltura sostenibile e di precisione. Il contesto attuale, caratterizzato dalla continua crescita della popolazione mondiale, rende necessario individuare delle soluzioni innovative che riescano a soddisfare le nuove esigenze alimentari. Al tempo stesso, però, è necessario che tali soluzioni siano caratterizzate da un basso, e se possibile nullo, impatto ambientale.

Uno dei principali elementi di criticità nell'ambito di questa ricerca è rappresentato dal fatto che i fertilizzanti che sono utilizzati al giorno d'oggi non sono adeguati a soddisfare le tali esigenze. Questi prodotti non hanno un'efficienza adeguata, in quanto è necessario andare ad utilizzarli in quantità elevate per poter avere una resa sufficiente dal punto di vista economico: tale inefficienza è data dal fatto che le sostanze utilizzate per la fertilizzazione non vengono interamente assorbite dalla pianta, andando in questo modo non a fornire sostentamento alla pianta stessa ma andando ad alimentare processi con elevato impatto ambientale (es. lisciviazione dei nitrati, eutrofizzazione dei corpi idrici, ecc).

Una delle soluzioni più promettenti per far fronte a tale problematica è rappresentata appunto dai nanofertilizzanti: tali prodotti esprimono delle caratteristiche chimiche e fisiche differenti dai fertilizzanti tradizionali in virtù della loro ridottissima dimensione. Per poter definire un prodotto come "nano" è necessario che esso sia dell'ordine di grandezza di  $10^{-9}$  m, secondo quelle che sono le norme attuali, e ciò fa sì che tali molecole vadano a legarsi in maniera differente alle colture, creando dei legami più stabili e allo stesso tempo più versatili. In questo modo l'agente fertilizzante riesce a legarsi alla pianta senza essere disperso, e allo stesso tempo il rilascio delle molecole avviene in maniera molto più graduale, consentendo alla pianta di modulare in maniera più equilibrata i propri metabolismi in modo tale da sfruttare appieno tutto il nutrimento a lei fornito. In questo modo l'operazione colturale andrebbe ad essere svolta con una maggior precisione, evitando inutili sprechi e favorendo allo stesso tempo una miglior crescita della coltura.

Gli studi su tale argomento si stanno concentrando principalmente sull'individuazione non di nuovi elementi chimici fertilizzanti, in quanto la maggior parte di essi sono già noti, ma sulla scoperta di nuovi prodotti chiamati carrier, ossia molecole che veicolano il nutriente alla pianta in maniera controllata ed evitandone la dispersione nell'ambiente. Sono in fase di studio formulati aventi sia origine organica, come ad esempio il chitosano, sia di origine inorganica, come alcune particolari argille o alcune strutture carboniose. Tutte queste devono però garantire il rispetto dei parametri di misura "nano": in particolare, la ricerca si sta sviluppando molto anche a riguardo di

quelli che sono i metodi di produzione di tali formulati, in quanto alcune tecniche finora proposte consentono sì di raggiungere le dimensioni adeguate, senza però che ci sia la capacità di esprimere le caratteristiche ricercate che differenziano i nanoprodotto dai fertilizzanti tradizionali.

Sono poi stati proposti dei metodi di produzione biologici, alternativi a quelli di sintesi: tutto ciò è ancora in fase di sviluppo, ma al momento attuale le proposte biologiche non sembrano garantire un'adeguata efficienza, soprattutto in relazione alla possibilità di produrre grandi quantitativi di fertilizzante.

Tali prodotti quindi rappresentano un'importante risorsa, ma è necessario andare a valutare anche quelle che sono le criticità che possono essere ad essi collegate. In particolare, tale ridotta dimensione fa sì che i nanofertilizzanti possano penetrare in maniera più profonda non solo nei tessuti vegetali, ma anche nei tessuti animali che ne entrano in contatto. Ciò può provocare l'insorgere di malattie gravi, ed è quindi necessario andare a svolgere un'adeguata azione di ricerca per poter individuare quelli che sono gli elementi che rappresentano un potenziale pericolo, in modo tale da neutralizzarli e consentire un uso sicuro degli stessi.

Da ciò emerge come la conoscenza disponibile attualmente in materia di nanofertilizzanti sia ancora molto ridotta. Ciò si riflette anche sulla legislazione che finora è andata a trattare tale argomento: le normative vigenti, ove presenti, sono allo stesso tempo vaghe a riguardo di alcuni ambiti mentre possono essere molto restrittive in altri. Questo ostacola lo sviluppo della ricerca, in particolare da parte delle grandi aziende produttrici, in quanto non vi è la garanzia dell'adeguatezza del prodotto a quelle che sono le norme. Per questo motivo al giorno d'oggi non è disponibile alcun nanofertilizzante in commercio, il che obbliga a continuare ad usare i fertilizzanti tradizionali in quantità sempre maggiori.

## **1. Introduzione**

Quello dei nanomateriali rappresenta uno dei settori che, al momento, mostra un maggior sviluppo e una maggior attenzione nell'ambito della ricerca. Non sono infatti dei materiali di interesse esclusivamente agronomico, ma rivestono un ruolo molto importante in altri settori, quali la medicina o l'ingegneria. Il primo a parlare di nanomateriali fu il fisico Richard Phillips Feynman nel 1959, il quale andò a sottolineare come tale vastissimo ambito della fisica fosse ancora inesplorato. Da allora l'interesse verso questa materia è aumentato enormemente, come conseguenza delle caratteristiche che esprimono tali materiali, che rendono il loro utilizzo molto efficiente in svariati campi di applicazione. Allo stesso tempo, però, la ricerca che ha come protagonista tali prodotti può essere considerata ancora in fase iniziale, in quanto ad oggi non si conoscono esattamente alcuni aspetti del loro funzionamento, ed allo stesso tempo si cerca di trovarne di nuovi che si adattino in maniera ancor migliore a quelle che sono le attuali necessità.

Come osservato da Marchiol (2012) lo sviluppo di nuove tecnologie, quali i nuovi microscopi, ha consentito di progredire enormemente nello studio di tali materiali. Difatti, queste nuove tecnologie ci consentono di andare ad analizzare in maniera più precisa quelle che sono le peculiari caratteristiche chimiche che sono espresse dalle nanostrutture, e che rappresentano la vera ricchezza di tali prodotti. Infatti, la differenza tra i nanomateriali ed i materiali equivalenti storicamente utilizzati nei vari ambiti (ad esempio, fertilizzanti tradizionali e nanofertilizzanti), non è data esclusivamente da quella che è la dimensione dei prodotti. Tale differenza macroscopica si accompagna ad una molto più profonda differenza dal punto di vista chimico: la ridottissima dimensione dei nuovi materiali fa sì che le molecole non vadano a godere delle stesse proprietà dei materiali classici, ma seguono principi e leggi fisiche differenti. Questo fa sì che le modalità di azione, e quindi conseguentemente anche le modalità di impiego, siano molto differenti tra loro. Gli studi effettuati finora hanno evidenziato come, nella grande maggioranza dei casi, tali proprietà rendano tali materiali più efficaci sotto moltissimi aspetti, e quindi il loro utilizzo risulta essere preferibile.

### **1.1 Nuove necessità e prospettive dell'agricoltura**

I nanomateriali in agricoltura avranno un ruolo sempre più rilevante nel prossimo futuro, a causa della maggior efficienza ed efficacia, paragonata ai prodotti tradizionali, e del ridotto impatto ambientale. Tali prodotti rappresentano uno degli elementi di maggior importanza nell'ottica della riduzione delle fonti di inquinamento generate dall'agricoltura e nell'ottica di una miglior e più efficiente produzione di prodotti agricoli. Questi elementi si inseriscono in un quadro di grande

rinnovamento dell'agricoltura, che è sempre più attenta all'utilizzo di prodotti dal basso impatto ambientale, dall'utilizzo di tecniche agronomiche volte alla riduzione dell'utilizzo di prodotti di sintesi e alla protezione delle colture. Tali cambiamenti spingono quindi verso un'agricoltura di precisione che acquisirà un ruolo sempre più importante in futuro. La necessità, infatti, non è più esclusivamente rappresentata dal raggiungimento di una produzione quantitativamente sufficiente, ma a ciò si accompagnano degli elementi di salvaguardia di quella che è la qualità del prodotto stesso e di protezione della pianta e dell'ambiente in cui la coltivazione va ad essere effettuata. Tali principi rappresentano un elemento di assoluta novità: è profondamente cambiata la visione dell'agricoltura e ciò spinge a rispondere a nuove esigenze che solo fino a pochi anni fa non erano contemplate. Questo rinnovamento non va a riguardare esclusivamente quelli che sono i prodotti e le tecniche utilizzate, ma va a porre sotto una nuova luce anche quella che è l'importanza della coltura scelta e degli strumenti a disposizione dell'agricoltore.

Ogni anno la ricerca di specie sempre più competitive, più resistenti alle malattie e agli stress ci propone delle nuove soluzioni, spesso derivanti da tecniche di evoluzione assistita. Tali novità però da sole non sono sufficienti. Dalle osservazioni svolte da Mittler e Blumwald (2010) si può facilmente capire il perché di questa insufficienza: innanzitutto, ad oggi non sono ancora stati effettuati sufficienti studi riguardanti l'utilizzo su larga scala di molte delle specie studiate; inoltre, molto spesso i geni responsabili dei miglioramenti su ogni specie sono stati individuati tramite dei processi di ricerca molto dispendiosi. Inoltre, come evidenziato da Raman (2015), i problemi legati al fenomeno di pleiotropismo sono ancora molto diffusi, e possono rappresentare, a causa delle attuali conoscenze, un limite molto importante. Tale ricerca è però uno dei capisaldi dell'agricoltura di precisione, in quanto ci consente di andare ad individuare, di volta in volta, le specie che meglio rispondono alle specifiche esigenze.

Le nuove attrezzature di cui dispone l'agricoltore invece vanno a fronteggiare delle differenti problematiche. Queste criticità sono legate al costo sempre più elevato dell'attrezzatura, che costringe ad effettuare investimenti di valore sempre più alto, in un contesto in cui, a causa dei cambiamenti climatici, non c'è più la stessa garanzia di guadagno, e sono legati ad una complessità di utilizzo maggiore. Da un lato tale complessità rappresenta un'opportunità di miglioramento, in quanto permette di effettuare lavorazioni sempre più precise ed efficaci. I maggiori stimoli per la ricerca e lo sviluppo di nuove attrezzature sono rappresentate dall'adozione di sistemi di acquisizione di immagini che consentano di effettuare delle operazioni quanto più precise possibili, in particolare per quanto riguarda fertilizzazioni e trattamenti con prodotti fitosanitari. Acquisendo tali immagini infatti è possibile andare a fornire alla pianta la quantità più adeguata possibile: ciò richiede però che vadano ad essere sviluppati dei sistemi informatici che siano in grado di elaborare



le informazioni che possono essere ricavate dalle foto per poi tramutarle in vere applicazioni. In questo modo inoltre è anche possibile operare delle scelte per la difesa e la tutela della pianta, ma in futuro sarà possibile selezionare i diversi raccolti sulla base di quelle che sono le caratteristiche mostrate, in modo tale da poter lavorare le singole partite nella maniera più efficiente. Ad oggi, le maggiori problematiche in questo verso sono rappresentate, come evidenziato da Mavriedou et al. (2015), dalla mancanza di software in grado di elaborare le informazioni raccolte, andando a distinguere i vari elementi che la pianta fornisce di volta in volta, quali ad esempio il colore della vegetazione, il numero di foglie, la lunghezza dei germogli.

## 1.2 Principali caratteristiche chimiche dei nanomateriali e metodi di produzione

Le caratteristiche che rendono i nanomateriali così interessanti e così importanti in uno spettro di ambiti molto ampio sono legate essenzialmente alla loro ridotta dimensione. Un nanomateriale è così considerato se la sua dimensione risulta essere al più pari a  $10^{-9}$ m, come determinato da Holdren (2011). Questa ridottissima dimensione fa sì che le proprietà chimiche e fisiche di cui gode il materiale siano profondamente differenti se paragonate ai materiali tradizionali. In particolare, caratteristiche come la conduttività elettrica, l'elettromagnetismo, la reattività chimica, i diversi effetti ottici e la forza dei legami che vanno a formare le singole molecole sono gli aspetti di maggior interesse in questo ambito.

I nanomateriali possono essere suddivisi in varie categorie in base a quello che è il numero di dimensioni che risultano essere inferiori a  $10^{-9}$ m (ogni corpo si sviluppa in 3 dimensioni, a differenza di un grafico o di un disegno che si sviluppano in 2 dimensioni). Sono quindi distinti in:

- *One dimensional nanoparticles*: nanomateriali di misura inferiore a 100nm solo nello sviluppo di un'unica dimensione. Generalmente sono nanomateriali utilizzati per creare dei sensori chimici e biologici, o per materiali utilizzati nelle celle solari.
- *Two dimensional nanoparticles*: nanomateriali aventi dimensione inferiore a 100nm in due dimensioni. Spesso fanno parte di questa categoria i nanotubi di fibre carboniche.
- *Three dimensional nanoparticles*: nanomateriali di dimensione inferiore a 100nm in tutte le dimensioni. Sono generalmente materiali di origine metallica, che generano prodotti quali *quantum dots*, sfere vuote, nanopolimeri, nanotubi di fibre di carbonio.

I due principali effetti che sono strettamente correlati alla dimensione del materiale e che rappresentano quello che è l'elemento di differenza rispetto ai materiali tradizionali sono:

- il differente rapporto tra la superficie espressa in funzione del volume;
- lo sviluppo di effetti quantici, ossia di comportamenti delle particelle non previsti dalle leggi della fisica classica ma previsti invece dalla fisica quantistica, che mostrano un

comportamento discontinuo legato alla costante competizione tra gli elettroni delocalizzati del guscio più esterno (Roduner, 2006).

Il rapporto tra superficie e volume può essere espresso da tale funzione:

$$F = (6n^2 - 12n + 8) / n^3$$

dove F è chiamata dispersione e rappresenta il numero di atomi presenti su una data superficie, ed n è il numero di atomi presenti nel sistema in esame. La superficie di una sfera varia in maniera quadratica in relazione a quello che è il suo raggio, mentre il suo volume varia in funzione del cubo dello stesso raggio. Il numero totale di atomi N varia in maniera lineare in base a quello che è il volume.

Siccome F è data dal rapporto tra l'area e il volume, e quindi varia in maniera inversa al raggio, si può approssimare  $n^3 = N^{1/3}$ , dove N è il numero totale di atomi contenuti nel sistema. Ipotizzando di analizzare ora un cubo avente un numero  $N=n^3$  di atomi e un numero di atomi sulla superficie pari a 6n, è quindi possibile esprimere la precedente relazione come:

$$F = (6/N^{1/3}) (1 - 2/N^{1/3} + 8/6N^{2/3})$$

che può essere approssimata a:

$$F = 6/N^{1/3}$$

Gli atomi sulla superficie hanno un numero minore di atomi nelle vicinanze, e questo determina un minor numero di coordinazione (con tale termine si va ad indicare il numero di atomi direttamente adiacenti a quello preso a riferimento). Il numero di coordinazione risulta variare in maniera lineare, così come la dispersione, e questo mostra come tali parametri siano adeguati per la valutazione di quelli che sono gli effetti legati alla superficie.

Gli effetti quantici legati alla ridotta dimensione delle particelle possono essere riferiti al numero di elettroni che sono presenti nel guscio più esterno di ogni singolo atomo. Questi elettroni vanno ad essere inseriti di volta in volta all'interno di uno stato elettronico differente, a seconda di quella che è la condizione dell'atomo. La cessione e l'acquisizione di tali elettroni è funzionale al raggiungimento di una condizione di maggiore stabilità energetica, che si esprime come raggiungimento di una maggior simmetria possibile nella struttura atomica. Con l'acquisizione o la cessione degli elettroni l'atomo va di volta in volta ad acquisire o cedere energia in quantità differenti. Questa variazione però non è lineare, ma è detta "quantizzata": ogni livello elettronico

richiede una quantità di energia differente, che varia sia in funzione della distanza dal nucleo che dal numero di particelle già presenti nel sistema. Questo fa sì che siano sufficienti anche piccole variazioni del sistema, provocate ad esempio da alterazioni della temperatura, per andare ad eccitare gli elettroni causando così una modifica di quelle che sono le condizioni di equilibrio. Questa nuova condizione, dal punto di vista tecnologico di nostro interesse, si manifesta come una diversa capacità di creare legami e quindi di andare ad interagire con la pianta o il terreno. Tali comportamenti della materia, sebbene siano ancora in fase di studio, sembrano essere molto promettenti per un ulteriore sviluppo dell'agricoltura di precisione.

La sintesi di questi materiali però richiede dei processi differenti rispetto a quelli convenzionali. I diversi metodi possono essere ricondotti a due sviluppi differenti, detti:

- *top to bottom approach*: i metodi che fanno riferimento allo sviluppo *top to bottom* sono generalmente basati su fenomeni fisici, quali fresature meccaniche, incisioni utilizzando opportune componenti chimiche, asportazioni di materiale tramite trattamenti termici quali evaporazione e condensazione, utilizzo di raggi laser per polverizzare i materiali. Tali metodi quindi si caratterizzano per andare a generare dei nanomateriali tramite delle lavorazioni che vanno a modificare quella che è la struttura dei materiali convenzionali per ridurli alla dimensione voluta in modo tale che esprimano le proprietà ricercate. Le maggiori criticità legate all'utilizzo di questi metodi sono rappresentate dal fatto che i nanomateriali che vanno ad essere generati possono presentare delle imperfezioni importanti sulla superficie, che è uno degli elementi caratterizzanti, come riportato da Kumar et al. (2014). Essendo però dei metodi fisici le problematiche legate all'impatto ambientale risultano essere molto più ridotte rispetto all'utilizzo di metodi di sintesi.
- *bottom to up approach*: i metodi che fanno riferimento a questa tipologia di produzione sono invece basati su fenomeni chimico-fisici che vanno a generare dei nuovi nanomateriali andando ad assemblare elementi adeguati, e non andando a disgregare prodotti già costituiti come nel caso precedente. Tra tali metodi troviamo: l'uso di micro-emulsioni chimiche, precipitazioni chimiche e precipitazioni dirette, la combustione con microonde. Il metodo però più utilizzato, come riportato da Hurst et al. (2006), è quello basato sull'utilizzo di riduzioni chimiche. Le criticità connesse a questi metodi sono rappresentate dall'utilizzo di reagenti chimici che possono essere pericolosi e tossici per gli organismi viventi (Sastry et al., 2003), in particolar modo per la produzione delle capsule che avvolgono le singole unità di nanomateriale.

### **1.3 Principali funzioni dei nanomateriali in agricoltura**

I nanomateriali in agricoltura trovano impiego in molti ambiti differenti. Gli utilizzi più importanti sono legati alla produzione di nanofertilizzanti e nanofitofarmaci, che sono le due categorie di prodotti convenzionali più utilizzati. A questo si aggiungono degli utilizzi per sviluppare sensori chimici e biologici, per implementare ancor di più le potenzialità dell'agricoltura di precisione. Infine, le ultime ricerche hanno evidenziato come alcuni nanomateriali abbiano le potenzialità per recuperare terreni inquinati o carichi di composti chimici non voluti, o addirittura per andare a purificare le falde, come dimostrato da Mollamohammada et al. (2021). Sono stati infatti creati dei particolari gel, costituiti da microalghe prodotte in laboratorio, che hanno la capacità di permeare nel terreno raggiungendo le riserve d'acqua sottostanti e di legarsi alle molecole inquinanti, chelando e purificando il sistema.

Questo ampio spettro di utilizzo evidenzia come le caratteristiche intrinseche dei singoli nanocomponenti possano essere estremamente differenti tra loro e come ciò faccia sì che possano andare a svilupparsi prodotti che assolvono a molti scopi differenti. I nanomateriali possono quindi essere utilizzati con l'intento di favorire lo sviluppo della pianta, monitorare quelle che sono le condizioni della pianta stessa (presenza di malattie, di condizioni di stress, presenza di patogeni, grado di sviluppo, ecc.) o recuperare dei terreni e degli ambienti utili all'agricoltura e da essa danneggiati.

## **2.1 fertilizzanti**

I fertilizzanti sono dei prodotti che hanno lo scopo di favorire un ottimale sviluppo della coltura. Gli elementi nutritivi di cui ha bisogno la pianta sono molteplici, ma possono essere suddivisi in due categorie: i macronutrienti e i micronutrienti. I primi sono quegli elementi di cui la pianta ha bisogno in quantità maggiori, e che risultano quindi essere limitanti in caso di assenza. I microelementi sono invece di più facile gestione, in quanto sono richiesti in quantità minori, ma non sono per questo non necessari.

I macroelementi di cui la pianta necessita sono azoto (N), fosforo (P) e potassio (K). L'azoto è necessario per stimolare una maggior crescita della pianta, e quindi per generare una maggior resa della coltura. Il fosforo è principalmente utilizzato nei processi di fotosintesi, nella crescita dell'apparato radicale e nello sviluppo del seme. Il potassio invece è un importante elemento regolatore dei processi interni alla pianta (regola la respirazione, l'apertura degli stomi, lo scambio di sostanze tra le cellule, ecc.).

Tra i principali microelementi troviamo invece lo zinco (Zn), il rame (Cu) e il boro (B). Tali elementi hanno anch'essi principalmente un ruolo regolatore all'interno della pianta, ma solo negli ultimi anni hanno cominciato ad essere diffusi ed utilizzati in maniera maggiore.

### **2.1 Storia dei fertilizzanti**

Fin dall'antichità è sempre risultato evidente come fosse necessario andare a fornire alle colture i nutrienti di cui avevano bisogno. I prodotti che venivano utilizzati sono in parte utilizzati tutt'oggi, basti pensare all'utilizzo del letame. Tuttavia, nel corso dell'ultimo secolo si è attuata una vera e propria rivoluzione in tale ambito. L'avvento della chimica di sintesi ha riguardato molti ambiti, tra cui quello legato proprio alla produzione di fertilizzanti. In particolare, i primi prodotti ad essere commercializzati su larga scala furono quelli che miravano a fornire alla pianta sostanze nutritive a base di N, P, K. Questi tre elementi sono infatti quelli generalmente più richiesti per un ottimale sviluppo delle colture, e quindi quelli che risultano essere più importanti da integrare. È interessante notare come anche già nell'antichità fossero stati individuati come prodotti di maggiore importanza per la fertilizzazione quelli contenenti proprio N, P, K, senza però avere a disposizione le conoscenze e gli strumenti d'analisi che possediamo al giorno d'oggi. A seguito di un'iniziale produzione di fertilizzanti molto generici, maggiori conoscenze e lo sviluppo di una chimica di maggior precisione portarono alla creazione di fertilizzanti che miravano ad integrare anche altre sostanze, come ad esempio B e Zn, ma andando anche a creare dei prodotti aventi caratteristiche chimiche più specifiche per ogni singola coltura. Inoltre, lo sviluppo della tecnica portò alla produzione di fertilizzanti che contenessero più elementi differenti in un'unica soluzione

(contenenti allo stesso tempo, ad esempio, N, P e K): ogni elemento è presente in un dosaggio diverso, e l'utilizzo di questa tipologia di prodotti consente di andare a ridurre le tempistiche richieste per svolgere tale operazione colturale da parte dell'operatore. Sono stati poi introdotti dei fertilizzanti aventi diverse modalità di utilizzo a causa del diverso stato fisico in cui si trovano e della funzione che devono andare a svolgere: storicamente i fertilizzanti erano infatti prodotti allo stato solido, e raramente allo stato liquido, ma grazie alla continua ricerca si è arrivati all'utilizzo di fertilizzanti anche allo stato gassoso. Tale tecnologia rappresenta tuttavia una frazione molto limitata, a causa dell'elevata complessità dei macchinari richiesti per la loro applicazione, e quindi anche a causa di un costo maggiore.

Con lo sviluppo della chimica si è assistito ad un parallelo sviluppo anche della meccanica, legata alla creazione di nuovi strumenti per l'applicazione dei fertilizzanti alle colture. La ricerca in tale ambito è quindi indirizzata verso un'agricoltura di sempre maggior precisione, che mira a rendere più efficienti le lavorazioni e ridurre gli effetti negativi dei prodotti utilizzati, legati principalmente all'inquinamento ambientale e ad una scarsa efficienza degli stessi, che costringe ad utilizzare quantità superiori rispetto a quelle necessarie.

## **2.2 Motivi del costante aumento dell'uso dei fertilizzanti**

La ragione che ha portato all'introduzione della chimica di sintesi per la produzione di fertilizzanti è legata principalmente alla costante crescita della domanda di prodotti agricoli. Il continuo aumento della popolazione a livello mondiale ha costretto gli agricoltori ad operare una forte selezione di quelle che sono le colture con una maggior resa, per soddisfare la sempre maggior richiesta. Questo processo di selezione non è però risultato essere sufficiente. La domanda di prodotti agricoli non ha mai smesso di crescere, e questo ha costretto gli agricoltori ad introdurre l'utilizzo di nuove tecniche di lavorazione e di nuovi strumenti, come i fertilizzanti di sintesi. Tali prodotti consentono di aumentare quella che è la resa della coltura, sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo.

La richiesta sempre più pressante di maggiori quantitativi di prodotto può quindi essere soddisfatta in 3 modi: andando a selezionare cultivar sempre più produttive, andando a individuare nuove aree coltivabili, e aumentando l'utilizzo e l'efficienza dei fertilizzanti e delle tecniche di coltivazione.

È però sempre più difficile individuare nuove cultivar, anche utilizzando tecniche di evoluzione assistita, a causa dell'elevata complessità del genoma delle singole specie. L'individuazione di sequenze geniche adatte a quelle che sono le necessità di sviluppo tecnologico non è un processo semplice, in quanto anche una minima variazione inserita in un punto non adatto

del genoma può portare alla produzione di piante che non solo non hanno le caratteristiche ricercate, ma tali individui possono essere peggiori di quelli a disposizione inizialmente.

A ciò si aggiunge il fatto che i terreni disponibili per l'agricoltura risultano, in termini di superficie, stabili da molto tempo, ed è molto difficile andare a crearne di nuovi senza andare a danneggiare quelli che sono i delicati equilibri ambientali (es. deforestazione). La messa in coltura di nuovi territori risulta infatti spesso un'operazione molto impattante.

Questi due fattori spingono quindi verso un sempre più intenso ed efficiente utilizzo dei fertilizzanti, con le relative problematiche annesse.

### **2.3 Criticità dei fertilizzanti convenzionali e motivo dell'introduzione dei nanofertilizzanti**

I fertilizzanti convenzionali, e in particolare quelli di sintesi nati nel corso dell'ultimo secolo, continuano ad essere uno strumento indispensabile per quelle che sono le richieste alimentari odierne. Non sarebbe in alcun modo possibile produrre sostentamento per ogni singolo individuo se non si utilizzassero tali prodotti. Al tempo stesso però i fertilizzanti che vengono quotidianamente utilizzati sono inefficienti. Alcune stime calcolano una dispersione in misura pari al 40-70% per quanto concerne i fertilizzanti azotati, all'80-90% per quanto riguarda i fertilizzanti a base di P e pari al 50-90% per quelli a base di K (Ombodi e Saigusa, 2000). Questa elevata inefficienza è causa di importanti squilibri. Per quanto concerne l'inquinamento, l'utilizzo intensivo e non efficace di tali prodotti fa sì che la quota non utilizzata dalla pianta possa essere soggetta a diversi effetti che contribuiscono a danneggiare l'ambiente circostante. Il materiale che non contribuisce alla crescita della pianta può per esempio, nel caso dell'azoto, essere soggetto a lisciviazione, andando poi ad inquinare le falde acquifere; oppure, nel caso del fosforo, il nutriente in eccesso può essere immobilizzato, andando a non essere più fruibile dalla pianta anche se inserito nella stessa matrice, e andando allo stesso tempo a modificare il pH del terreno. In questo modo vanno ad essere alterate quelle che sono le condizioni ideali di sviluppo dei microrganismi presenti nel terreno, che svolgono un ruolo fondamentale in simbiosi con la pianta, andando quindi a limitarne lo sviluppo. Oppure tali condizioni possono favorire lo sviluppo di microrganismi che sono in competizione con le popolazioni microbiche utili o con la pianta stessa, causando altri danni.

In uno studio condotto su mais da Manikandane e Subramanian (2015) è stata calcolata quella che risulta essere la quantità di fertilizzante utilizzato, facendo riferimento ai tre principali elementi chimici utilizzati, ossia rispettivamente N, P, K, e risulta essere pari a 8,2:1:4,2. La quantità invece effettivamente richiesta è stata calcolata essere 4:2:1. Questi valori ci aiutano a comprendere quelli che siano i volumi che contribuiscono alla crescita della pianta, e quelli che

invece contribuiscono al deterioramento ambientale. Inoltre, il continuo utilizzo di quantità non adeguate di fertilizzanti fa sì che l'insufficienza che si manifesta vada ad essere corretta utilizzando sempre gli stessi prodotti. In questo modo il problema legato alla scarsità di nutrienti va ad essere risolto, ma va a creare uno squilibrio sempre più importante nel terreno, che di anno in anno andrà quindi ad essere sempre meno produttivo (El-Saadony et al.,2021).

A tutto ciò si aggiunge un danno anche per il produttore stesso, che è costretto ad utilizzare tali quantità per avere una resa economicamente adeguata, al netto però di una spesa squilibrata rispetto a quella che è l'azione effettivamente svolta dal prodotto. A ciò si deve aggiungere il costo delle operazioni colturali che vanno ad essere effettuate senza avere un vero ritorno economico.

Queste criticità hanno quindi generato un'attenzione sempre maggiore verso i nanomateriali, prodotti che grazie alle proprie caratteristiche chimiche risultano essere molto più efficaci e più adatti ad un'agricoltura sostenibile e di precisione.



### **3. Nanofertilizzanti**

I nanofertilizzanti sono tra le migliori risorse per lo sviluppo di un'agricoltura di maggior precisione e sostenibilità. Garantiscono infatti una maggiore qualità di lavoro e al tempo stesso un minor impatto sull'ambiente, riducendo gli effetti inquinanti. Come già evidenziato, i fertilizzanti attualmente in uso non risultano essere efficaci e sono causa di gravi dispersioni, che riducono quelli che sono gli effetti positivi sulla pianta e provocano al tempo stesso degli effetti negativi al terreno, alle falde acquifere, all'aria e in alcuni casi anche alle piante stesse. I nanofertilizzanti invece, a causa della loro ridotta dimensione, vanno a sfruttare delle proprietà differenti che li rendono più adatti alle varie colture.

#### **3.1 Differenza tra i nanofertilizzanti di sintesi e i nanofertilizzanti biologici**

Anche per quanto concerne i nanofertilizzanti è possibile individuare due diverse categorie di prodotti: i nanofertilizzanti di sintesi e quelli di origine biologica. Le differenze alla base di tale distinzione sono piuttosto sottili, e sono date sia dal diverso modo in cui le particelle di prodotto vanno ad interagire con la pianta sia dal modo in cui vanno ad essere creati i fertilizzanti. Nel caso dei prodotti di sintesi non sono presenti dei microrganismi che vanno ad interagire con la pianta o il suolo, ma sono contenuti esclusivamente elementi chimici, che di volta in volta ne influenzano lo sviluppo in maniera differente. I biofertilizzanti invece sono “formulati contenenti uno o più microrganismi benefici, che migliorano quella che è la condizione di nutrizione della pianta e aumentano la capacità della pianta stessa di reperire i nutrienti” secondo la definizione fornita da Pandey and Chandra (2016). Tale definizione è quella che probabilmente definisce meglio quello il ruolo del nano-biofertilizzante, andando allo stesso tempo a mettere in evidenza le principali differenze con i nanofertilizzanti di sintesi. Nel caso dei formulati biologici invece si deve andare a considerare un approccio differente alla coltura da parte dell'elemento attivo. L'azione non si limita a fornire alla pianta solo ciò di cui essa ha bisogno: si vogliono fornire degli agenti che vanno ad interagire in maniera sinergica con la rizosfera e con l'ambiente in cui si trovano.

Tali nanofertilizzanti biologici quindi possono essere considerati come degli inoculati microbici in cui tali agenti, che possono essere dormienti come attivi, vanno a contribuire al buon sviluppo della pianta. Sono comunque presenti dei tratti comuni tra i nanofertilizzanti di sintesi e quelli biologici, quali:

- la ridotta dimensione delle particelle e quindi le simili caratteristiche chimico – fisiche;
- entrambi sono una fonte di nutriente la cui produzione ha un ridotto impatto ambientale;
- hanno un'efficienza di fertilizzazione molto elevata;

- il rischio di inquinamento legato al loro utilizzo è molto ridotto se paragonato a quelli che sono i valori dei prodotti attualmente utilizzati.

Ad ogni modo, le differenze tra le due tipologie sono molto profonde, e nonostante l'obiettivo per cui sono creati e utilizzati sia lo stesso è necessario porre delle distinzioni.

### **3.1.1 Cenni sui metodi di produzione di nanofertilizzanti biologici**

I nanofertilizzanti biologici si distinguono da quelli di sintesi anche per i metodi di produzione, che risultano essere molto differenti. Per la produzione di questi ultimi, infatti, vanno ad essere utilizzati elementi che devono essere trattati chimicamente, mentre nel caso dei primi si utilizzano dei particolari microrganismi che andranno a generare quelli che saranno gli elementi effettivamente contenuti nelle applicazioni in campo. Questi microrganismi hanno diverse origini (funghi, lieviti, cellule batteriche, ecc.), e posti in un adeguato mezzo culturale sono indotti a sviluppare precisi composti (di interesse tecnologico) piuttosto che altri. È quindi necessario che i mezzi culturali siano noti e creati in maniera adeguata di volta in volta, per indurre il campione in esame a sviluppare esclusivamente i processi metabolici desiderati. I metaboliti di interesse sono molteplici, quali ad esempio enzimi, proteine, particolari tossine, nuove cellule vitali, ecc. . Tali prodotti devono poi essere separati dalle componenti iniziali, in modo tale da avere un prodotto quanto più puro possibile. Il risultato di queste operazioni deve poi essere adeguatamente lavorato in modo tale da renderlo fruibile, in particolare andando a utilizzarlo per la sintesi di quelle che saranno le nano particelle effettivamente adoperate sulle colture. Sono poi in fase di studio altri processi di sintesi di nanofertilizzanti biologici, in particolare tramite l'utilizzo di reazioni di riduzione a partire da piccole entità di base. Tali processi sono generalmente realizzati con coadiuvanti quali flavonoidi, fenoli, enzimi, proteine, sia in condizioni *in-vitro* che *in-vivo*, ma la ricerca in tale ambito è ancora agli inizi.

Infine, negli ultimi anni si sono sviluppati diversi studi che mirano ad estrarre nanomolecole utili in agricoltura (ma anche in altri settori tecnologici, quali il settore farmaceutico) da piante particolarmente ricche di tali composti. Oltre a ciò, si sta dando nuova importanza al recupero degli scarti di lavorazione di altre differenti colture, andando quindi a dare una nuova vita a prodotti che in precedenza erano appunto considerati scarti e che invece in questo modo possono essere sfruttati appieno in maniera innovativa.

Questi processi di biosintesi risultano essere relativamente semplici da sviluppare in vitro, ma il grosso limite è rappresentato dall'effettiva trasposizione di quanto dimostrato in laboratorio a livello industriale. Difatti, al giorno d'oggi non è ancora possibile andare a produrre nanofertilizzanti biologici a prezzi adeguati a quelle che sono le leggi di mercato, e questo

impedisce la commercializzazione del prodotto. Allo stesso tempo tali metodi risultano avere un minor impatto ambientale, come evidenziato da Patel e Krishnamurthy (2015), in quanto vanno ad essere utilizzati principalmente microrganismi e solo una piccola quota di prodotti di sintesi, costituita dai coadiuvanti di processo.

### ***3.1.2 Potenzialità e criticità dei nanofertilizzanti biologici***

I nanofertilizzanti biologici hanno delle modalità d'azione differenti rispetto a quelli di sintesi, in quanto la natura del prodotto è diversa: nei primi vanno ad essere utilizzati microrganismi o macromolecole organiche, che possono essere naturalmente presenti nella pianta o prodotte dalla pianta stessa, mentre in quelli di sintesi le molecole sono esclusivamente inorganiche.

Ad ogni modo, anche le componenti organiche necessitano di essere fornite alla pianta tramite precise molecole chiamate "carrier". I carrier svolgono sia una funzione di protezione dalla disgregazione e dalla denaturazione sia una funzione di trasporto della sostanza attiva alla coltura.

Tali molecole devono quindi avere le seguenti caratteristiche:

- devono riuscire a mantenere le sostanze in buone condizioni durante il trasporto alla pianta, in qualsiasi ambiente vadano a trovarsi;
- devono essere in grado di sopravvivere alle condizioni ambientali per un periodo sufficientemente lungo, generalmente individuato essere pari ad almeno 3 mesi;
- devono essere facilmente biodegradabili, non tossiche e non inquinanti;
- devono essere in grado di solubilizzarsi utilizzando l'acqua presente nel terreno in maniera graduale, per fornire alla pianta i nutrienti nell'arco di un periodo di tempo quanto più lungo possibile;
- devono essere semplici da conservare ed utilizzare;
- devono essere altamente specifici per le colture, in modo tale da non andare a fornire sostentamento ad altri microrganismi o colture non desiderate.

Tali caratteristiche non sono valide esclusivamente per i carrier di molecole biologiche, ma anche per i carrier di prodotti di sintesi. Ovviamente, le caratteristiche dovranno essere di volta in volta adattate a quelle che sono le diverse esigenze.

Tali carrier possono avere diverse origini, quali:

- materiali terrosi, quali argille;
- derivati dagli scarti delle piante;
- materiali inerti, di diversa natura polimerica;
- possono essere particelle di mezzi di coltura disidratati che vanno a contenere l'agente fertilizzante.

La ricerca relativa ai carrier è tuttavia ancora agli albori. Difatti, le necessità relative all'utilizzo di sostanze attive organiche sono molto differenti rispetto alle sostanze di sintesi che siamo abituati ad utilizzare e che sono state studiate in maniera più approfondita. Questo elemento rappresenta uno dei punti di maggior criticità nella produzione e nella commercializzazione di tali prodotti.

Quello che rappresenta il punto di maggior criticità è la diversa tensione superficiale che mostrano i prodotti biologici rispetto a quelli di sintesi. Come per tutti i nanomateriali infatti la superficie della particella risulta essere uno dei fattori limite nell'interazione tra il prodotto e l'ambiente, e andare ad alterare quelle che sono le proprietà che la caratterizzano può essere molto svantaggioso. I fertilizzanti di sintesi, infatti, hanno minori esigenze rispetto ai prodotti organici, e questo consente di andare a sviluppare dei materiali che mantengano le caratteristiche sopra descritte, ma che allo stesso tempo consentano di avere una maggior efficacia, che si esprime in un rilascio più graduale e regolato in relazione a quelle che sono le necessità della coltura. Al tempo stesso, tali minori esigenze consentono di sviluppare materiali che proteggano il fertilizzante in maniera migliore, andando quindi a limitare quella che è la quota dispersa a causa della denaturazione del prodotto.

Queste ultime osservazioni mostrano come i nanofertilizzanti biologici non siano ad oggi ancora in grado di competere a livello qualitativo con quelli di sintesi. Questa differenza può quindi essere un importante punto di sviluppo per nuove ricerche e per la produzione di fertilizzanti ancor più efficaci: in particolare, uno degli aspetti che ad oggi è ancora poco noto è l'effetto dei prodotti biologici nel terreno e la loro interazione con gli elementi già presenti e con i microrganismi che lavorano in sinergia con le colture (El-Ghamry, 2018).

### **3.2 Modalità di azione dei nanofertilizzanti**

I nanofertilizzanti di sintesi possono essere suddivisi in varie tipologie di prodotto. Tali distinzioni possono essere effettuate sulla base di elementi quali: caratteristiche chimiche espresse, modalità di azione, struttura, ecc...Tutti questi prodotti hanno però dei tratti comuni, quali una maggior efficienza nella distribuzione delle molecole con azione nutriente rispetto ai fertilizzanti tradizionali, e una minor dispersione degli elementi nutritivi.

I nanofertilizzanti generalmente sono pensati per andare ad interagire con la pianta, e solo di rado con il suolo. L'interazione con il suolo è ricercata quasi unicamente con quei prodotti che hanno la funzione: i)di recuperare e rendere disponibili per la coltura i nutrienti immobilizzati ma già presenti nel terreno; ii)di risanamento ambientale, quale ad esempio il recupero di falde

acquifere inquinate. In questi casi, infatti, l'interazione con la coltura generalmente non è necessaria, ma anzi può essere un ostacolo.

Per ovviare ai problemi legati alla scarsa efficienza (dovuta alla dispersione degli elementi nutrienti) e quindi anche all'inquinamento si sono sviluppati dei formulati che vanno ad essere applicati alla pianta tramite trattamenti fogliari. In tal modo il prodotto va ad essere veicolato direttamente al soggetto dell'operazione colturale, e allo stesso tempo ne si riduce il tempo di acquisizione. In questo modo infatti le molecole non devono essere ricercate dalle radici, ma sono immediatamente disponibili e più facilmente fruibili.

Dal punto di vista chimico invece, la più importante differenza tra i nanofertilizzanti e i fertilizzanti tradizionali è rappresentata dalla diversa tensione superficiale dei prodotti: come evidenziato da Brady e Weil (1999) i nanofertilizzanti hanno una tensione superficiale maggiore, che consente di sviluppare un rilascio più graduale e controllato dei nutrienti, andando ad aumentarne l'efficienza. Ciò è dovuto all'utilizzo di precisi rivestimenti, detti anche capsule, posti intorno all'elemento attivo che interagisce con la coltura. Tali capsule possono avere diverse origini: sono stati studiati in maniera molto approfondita sia materiali organici come il chitosano e l'albumina, sia alcuni materiali silicei, qual è la zeolite; sono però stati sperimentati anche dei polimeri di sintesi, creati appositamente per quelle che sono le esigenze del materiale in questione, come ad esempio l'acido polilattico, i policaprolattone, i polimeri poliacrilici, ecc... Ogni materiale presenta una diversa tensione superficiale, il che fa sì che ognuno di essi sviluppi una diversa relazione con la pianta e la sostanza attiva che deve essere veicolata. In questo modo è possibile avere di volta in volta una molteplicità di soluzioni che si prestano in maniera differente alle diverse esigenze.

Anche la dimensione finale delle particelle risulta essere di fondamentale importanza, sia per motivi di ingombro sterico sia per motivi legati alla capacità di formare diversi legami chimici. Infatti, le naturali aperture della pianta, quali ad esempio gli stomi o le varie aperture nella cuticola, hanno anch'essi una precisa dimensione, e ciò funge da primo elemento di "selezione" per quelle che sono le molecole che possono entrare nella cellula. Tale forma di selezione può essere definita di "setacciamento": le molecole di dimensione più piccola rispetto a tali aperture possono entrare senza bisogno di trasportatori appositi presenti sulla parete o sulla membrana cellulare, e questo rappresenta un vantaggio per la pianta, che non deve spendere energia per svolgere tale azione. Grazie alle ricerche di Eichert et al. (2018) condotte su campioni di *Vicia faba* è stato possibile osservare come molti nanocomponenti forniti in maniera controllata alla coltura fossero in grado di entrare all'interno delle cellule tramite semplice diffusione, e non andando ad attivare sistemi di trasporto richiedenti energia. Questo studio ha messo in luce un altro differente aspetto: gli stomi

sono in grado di svolgere un processo di selezione anche per le particelle che per dimensione potrebbero entrare per diffusione, senza che il loro movimento sia mediato da altre strutture. Ciò è stato notato in quanto non tutti gli stomi, a parità di condizioni, sono attraversati dalle molecole marcati. Non è ancora chiara quale sia la causa di questo differente comportamento, ma è stato ipotizzato che sia legata alla ricezione da parte della pianta di precisi segnali, probabilmente legati alla presenza di molecole idrofiliche, che vanno a regolarne il flusso attraverso lo stoma. Tale supposizione è stata proposta dopo aver effettuato delle prove andando ad umidificare le foglie campione: l'aumento di molecole d'acqua nella struttura della foglia ha portato ad avere un numero di stomi aperti maggiore dopo ogni trattamento, facendo quindi ipotizzare un legame con le molecole aventi caratteristiche idrofiliche. Oltre a questo aspetto, tale esperimento ha messo in evidenza come specie diverse abbiano stomi aventi diversi raggi, e quindi diverse aperture che vanno a limitare in maniera differente il passaggio delle particelle (come mostrato andando a paragonare campioni di *Vicia faba* e *Allium porrum*). Questo va ancora una volta a sottolineare come vi sia un elevatissimo livello di specificità, che necessita di essere adeguatamente analizzato di volta in volta.

La ridotta dimensione delle particelle non è però un fattore limitante per la formazione di legami tra le molecole e la pianta. Infatti, alcune molecole che per ingombro sterico potrebbero entrare attraverso lo stoma senza bisogno di opportuni trasportatori sono invece costrette ad entrare nella cellula grazie alla mediazione di precise strutture di trasporto. Le ragioni alla base di questa necessità sono molteplici: il trasporto può dover essere effettuato contro gradiente, la molecola ha una polarità troppo netta, la carica superficiale può essere troppo alta, ecc... Le condizioni cambiano in funzione di quelli che sono gli equilibri dei sistemi interni alla pianta, che eseguono un'indiretta selezione sulle particelle in modo da regolarne il flusso. Alcuni sistemi di ingresso nella pianta diversi dalla diffusione sono quindi rappresentati dalle acquaporine, dai canali ionici, dai sistemi di trasporto ABC, e dall' endocitosi: tutti questi processi possono, di volta in volta, essere coinvolti nello sviluppo di diverse reazioni.

Queste reazioni si sviluppano sia a livello fogliare che radicale, con le opportune distinzioni. Dopo essere entrate, tali sostanze possono essere messe in circolo tramite il simplasto o l'apoplasto. Queste due vie di trasmissione delle sostanze non sono equivalenti, e questo elemento di diversità può essere molto utile per sviluppare fertilizzanti più precisi, che vadano ad essere trasportati in maniera più efficace. La presenza di queste due vie influenza l'azione del nanofertilizzante in funzione di quelle che sono le caratteristiche chimiche della sostanza attiva o della capsula che le avvolge. Sfruttando quelli che sono i sistemi di selezione dell'apoplasto o i trasportatori del

simplasto è infatti possibile andare a creare dei prodotti sempre più specifici che garantiscano una maggiore efficacia e una minore dispersione.

### **3.3 Nanoargille**

Le argille hanno un ruolo molto importante tra i nanomateriali, in ambito agricolo come in ambito medico, ingegneristico, o in altri differenti settori. Questo perché hanno una struttura silicea che si caratterizza per presentare diversi strati e piastrine di misura nanometrica, per una lunghezza complessiva comunque molto ridotta, dell'ordine di pochi micrometri. Tali materiali inoltre non sono tossici, sono economici e derivano da fonti naturali semplici da reperire.

In base alla loro natura possono essere suddivise in argille cationiche o anioniche. Questo fa sì che ne esistano diverse tipologie che si prestano in maniera efficace a trasportare prodotti aventi caratteristiche molto differenti. Questa vasta disponibilità di soluzioni è garantita anche da quelle che sono due fondamentali proprietà di tali molecole, ossia la capacità naturale di formare barriere che proteggono il prodotto, andando allo stesso tempo a formare con esso delle interazioni non elettrostatiche che ne regolano la distribuzione. Queste due naturali proprietà sono estremamente ricercate tra i nanomateriali: esse, infatti, vanno a mediare nella distribuzione dei nutrienti in base a quelle che sono le necessità della pianta, e non vanno a rilasciare il prodotto in maniera indiscriminata. Risultano particolarmente adatte ai fertilizzanti a base di N, il quale può essere lisciviato molto facilmente, con conseguenti inutili perdite. Allo stesso modo, l'elevata carica ionica di tali componenti fa sì che siano particolarmente adatti per trasportare molecole attive, che richiedono condizioni particolari per mantenere una stabilità che li protegga. È proprio questa marcata polivalenza fa sì che tali prodotti siano considerati tra i più promettenti per gli utilizzi in campo agricolo. Sono quindi noti per essere in grado di migliorare in maniera importante l'efficienza degli input che vanno ad essere forniti alla pianta senza bisogno di specifici stimoli, caratteristica unica tra tutti i nanomateriali conosciuti al giorno d'oggi.

Come sottolineato da Epstein (2009), la ricerca in ambito agricolo ha cominciato ad interessarsi al ruolo del silicio (Si), elemento di base della struttura delle argille, solo negli ultimi anni. In precedenza infatti era considerato di secondaria importanza: ciò era dovuto al fatto che in molti casi le colture riescono a svilupparsi anche in ambienti in cui le carenze di Si sono importanti. Dopo aver però analizzato le piante in laboratorio, in condizioni in cui il Si era fornito alla pianta in quantità adeguate a quella che era la richiesta, si è potuto notare come tale elemento possa cambiare radicalmente lo sviluppo delle stesse. Inoltre è stato possibile mettere in evidenza come, anche fornendo alle piante quantità di tale materiale estremamente elevate, non si sviluppassero condizioni

di stress dovute da una concentrazione troppo alta. Al giorno d'oggi è l'unico materiale noto per non indurre tali reazioni.

Al momento attuale è emersa solo una potenziale criticità nell'utilizzo di tali componenti, ed è legata ad un loro impatto nel lungo periodo. Osservazioni svolte da Benicio et al. (2016) hanno evidenziato come possa manifestarsi un aumento del pH del terreno, ma le ragioni di ciò non sono state chiarite e necessitano di ulteriori ricerche.

### ***3.3.1 Caratteristiche chimiche***

Le nanoargille sono dei materiali silicei che presentano un numero elevato di strati che si sviluppano in due dimensioni in scala nanometrica (aventi generalmente dimensione circa pari a 1 nm), mentre hanno una lunghezza generalmente pari a diversi nanometri. Questa loro particolare struttura, costituita appunto da un numero elevato di strati di minerale, fa sì che siano considerati tra i più importanti carrier per gli elementi fertilizzanti in quanto vanno a proteggere tali molecole dagli agenti degradanti (luce solare, calore, acqua, ecc.). Al tempo stesso però i silicati sono formati da diversi ioni che ne costituiscono la struttura di base: questo fa sì che ogni materiale abbia la sua peculiare carica, e ciò garantisce una grande polivalenza che facilita lo sviluppo di soluzioni differenti che si possano adattare ad elementi molto diversi tra loro. Questi materiali, in funzione della carica che esprimono, vanno a formare dei diversi tipi di legami, che possono essere di tipo covalente come ponti idrogeno, ma in alcuni casi si possono creare anche delle interazioni di tipo non elettrostatico.

In base a quella che è la natura dei minerali che costituiscono i nanomateriali è possibile andare a effettuare un'importante distinzione tra le nanoargille cationiche e quelle anioniche. Le nanoargille cationiche sono generalmente rappresentate dalla zeolite, la montmorillonite, la caolinite; quelle anioniche invece sono principalmente accostate a ioni di B, N, P.

Un'altra funzione che sembra poter essere espressa dalle nanoargille è legata al loro utilizzo nel terreno, e non sulla pianta: sembra infatti che abbiano la capacità di andare a mobilizzare e veicolare alcuni ioni già presenti nel suolo, facilitandone l'assorbimento e quindi favorendo allo stesso tempo un recupero dei terreni affetti da eutrofizzazione. L'ipotesi che tali nanomateriali siano in grado di svolgere anche questa funzione è stata proposta solo di recente, e non vi sono ancora sufficienti studi per poter effettuare delle ipotesi più precise a tal riguardo.

Ad ogni modo, la rilevanza del Si nei metabolismi delle colture è di primo piano, anche se non tutte hanno le stesse necessità. Questa importanza è stata messa in evidenza grazie all'individuazione di sequenze di geni che codificano per la trascrizione e traduzione di proteine che fungono da carrier specifici per le molecole di silicio (in particolare su riso; Yamaji, 2008) e per la



scoperta di un particolare gruppo di proteine che va a costituire dei canali estremamente selettivi nelle pareti cellulari. Tali canali fungono anche in questo caso da carrier per pochi precisi soluti, tra cui acqua e appunto molecole di silicio.

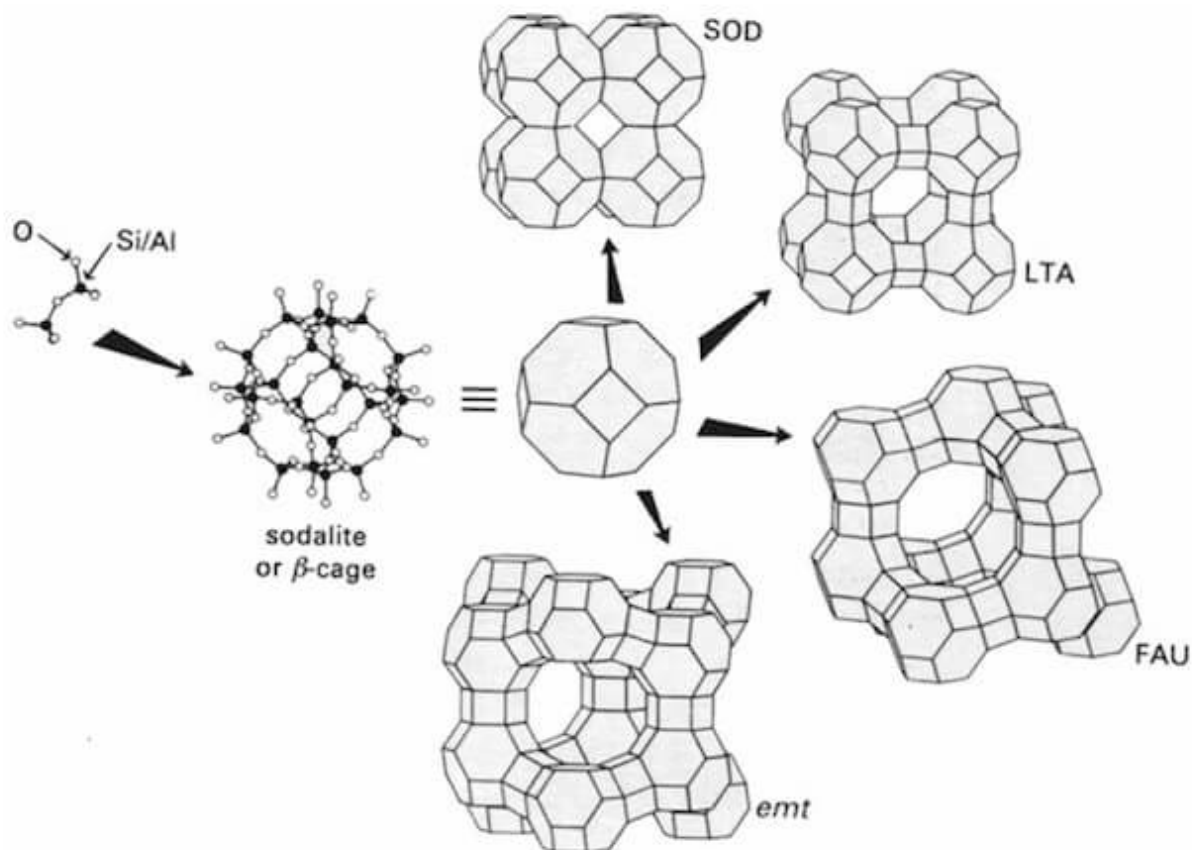


Figura 3.1 Struttura chimica della Zeolite, una delle principali nanoargille oggetto di ricerca.

### 3.3.2 Azione protettiva dei composti silicei

Come evidenziato da Fellet et al. (2021) i nanomateriali silicei sono noti soprattutto per la loro azione protettiva, sia contro gli stress biotici e abiotici sia contro alcune malattie ed alcuni patogeni. Il campo di ricerca relativo all'utilizzo delle nanoargille come fertilizzanti è ancora largamente inesplorato, ma comunque promettente. Il ruolo di tali materiali nella protezione della pianta dagli stress è però talmente importante che può portare non solo a far sì che la pianta non risenta delle condizioni avverse, ma in molti casi le colture trattate con tali prodotti riescono a raggiungere dei parametri sia qualitativi che quantitativi migliori rispetto a quelli raggiunti dalle piante non trattate. Questo fa sì che anche i nanomateriali utilizzati non direttamente con scopi fertilizzanti possano essere, in qualche modo, considerati come tali, proprio in virtù della loro elevata capacità di esprimere questa funzione secondaria.

Tali nanomolecole vanno ad esprimere la loro funzione di protezione principalmente agendo in due modi:

- tramite l'attivazione della trascrizione di geni che codificano per molecole di difesa;
- tramite la polimerizzazione delle molecole di acido silicico, che vanno a costituire molecole amorfe di silicio idrato che servono a rinforzare le pareti cellulari.

Le relazioni che intercorrono tra le colture e le molecole di Si sono però ancora da chiarire. Come detto, negli ultimi anni è stata notata la grande importanza di tale elemento, ma tali ricerche non hanno ancora definito quelli che sono i processi metabolici in cui è coinvolto. Tali processi vanno ad essere attivati sia per difendere la pianta da attacchi patogeni, sia per preservarne la salubrità quando vanno a manifestarsi condizioni di stress, ovviamente con le opportune distinzioni.

Quando la pianta è attaccata da un agente esterno va ad indurre la formazione di silicati amorfi in quanto tali molecole hanno la capacità di legarsi alle pareti cellulari andando a rinforzarne l'aspetto "meccanico", come riportato da Manivannan and Ahn (2017), andando quindi ad inibire la diffusione dell'ospite dannoso, impedendogli di spostarsi velocemente. Allo stesso tempo però le molecole di silicio possono anche fungere da elicitatori ed andare ad attivare una trascrizione più rapida dei geni codificanti per la produzione di molecole di difesa, andando a combattere non solo la diffusione della malattia, ma la malattia stessa. Da ciò si evince come generalmente un'azione non escluda l'altra, ma anzi come entrambe lavorino in accordo tra loro.

Quanto descritto finora riguardante la difesa dai patogeni non sembra però manifestarsi anche per il contrasto alle condizioni di stress. In questo caso, al netto di quelle che sono le attuali conoscenze, l'importanza dell'azione svolta dalle nanoparticelle amorfe risulta essere molto ridotta se paragonata invece al ruolo ricoperto nell'attivazione della trascrizione genica. Un'azione attiva operata dalle forme di silicato amorfo sembra infatti manifestarsi esclusivamente in casi di siccità. È stato infatti dimostrato come tali particelle siano in grado di andare a legarsi alle molecole di emicellulosa presenti nei tessuti vegetali, andando ad alterare quello che è l'equilibrio osmotico e favorendo di conseguenza una maggiore trattenuta d'acqua. In maniera simile, sembra possano andare ad accumularsi nella cuticola, a ridosso degli stomi, per andare a ridurre la loro conduttività e quindi la traspirazione.

Invece, come riportato da Bhardwaj e Kapoor (2021), in condizioni di stress idrico il ruolo del Si nella trascrizione genica è molto più complesso, è più vasto e va a toccare molti aspetti differenti:

- regola l'assorbimento dell'acqua a livello radicale;
- regola l'assorbimento di nutrienti che possono favorire la fuoriuscita dell'acqua disponibile a causa di variazioni della loro concentrazione;

- riduce la traspirazione;
- regola l'attività fotosintetica;
- favorisce la formazione di soluti compatibili;
- fa aumentare la produzione di enzimi con funzione antiossidante, contrastando la formazione di forme ROS.

Tutti questi fattori contribuiscono a migliorare quelle che sono le condizioni di omeostasi cellulare, garantendo alla coltura una maggiore quantità di acqua disponibile da utilizzare.

È importante però sottolineare come il ruolo del Si nella regolazione dei metabolismi idrici non si manifesti esclusivamente quando si presentano condizioni di stress: in un esperimento condotto da Ding et al. (2007) su piante di frumento coltivate in idroponica è stato notato come i silicati abbiano svolto un ruolo fondamentale nella regolazione dei consumi di acqua, andando a ridurre il consumo e allo stesso tempo aumentando la resa. Questo va a dimostrare come tale elemento possa essere utilizzato sia in condizioni di criticità come in condizioni di sviluppo ideali per la coltura.

Il Si è poi coinvolto nello sviluppo delle radici. Ha infatti un ruolo fondamentale nell'incentivare la formazione delle cellule secondarie e terziarie dell'endoderme: tali cellule sono direttamente coinvolte nello sviluppo di un apparato radicale più diffuso, che riesce ad espandersi in un'area maggiore e quindi in tal modo va ad aumentare la possibilità di trovare acqua per le necessità della pianta. Inoltre, nelle radici si possono spesso individuare concentrazioni elevate (rispetto al resto della pianta) di ossidi di silicio, che vanno facilmente a formare dei legami con le molecole d'acqua che vanno ad essere assorbite o che già si trovano in quei tessuti, andando a sottrarle al sistema che potrebbe andare a rilasciarle.

Le condizioni di stress riducono le capacità di crescita della pianta e le relative rese anche andando ad alterare l'equilibrio fotosintetico: essendo minore la disponibilità di acqua nelle colture, gli stomi tendono a chiudersi per ridurre la traspirazione, andando al tempo stesso a ridurre la quantità di CO<sub>2</sub> assorbita. Questo fa sì che il processo di fotosintesi vada a rallentare, e di conseguenza rallenta la crescita dell'intero organismo. Questa minor capacità di svolgere la fotosintesi è causata dalla formazione di un numero più elevato di forme ROS che vanno a danneggiare i tessuti e sottraggono elettroni alle reazioni di produzione energetica. Le molecole di Si svolgono un ruolo molto importante anche in queste situazioni, in quanto vanno a stimolare la sintesi di enzimi antiossidanti che vanno a detossificare le forme ROS, consentendo una ripresa dell'attività fotosintetica e al tempo stesso limitando i danni che tali molecole possono formare ad altri composti, quali lipidi e clorofilla.

Il Si, quindi, entra in molti percorsi metabolici differenti, sia tramite l'attivazione di precisi geni che codificano per la produzione di soluti con funzione difensiva, sia regolando i processi metabolici già in atto. Questa ampia gamma di funzioni non è stata tutt'ora completamente analizzata, né conosciamo esattamente quelli che sono i processi che regolano tutte queste funzioni.

### **3.3.3. Ruolo di carrier dei composti silicei**

Come è stato evidenziato in precedenza, il ruolo del Si in agricoltura è collegato principalmente ai suoi utilizzi nella difesa della pianta da condizioni di stress e dai patogeni, mentre un'approfondita analisi del ruolo svolto da tale materiale come elemento fertilizzante non è ancora presente in letteratura.

Le ricerche più approfondite svolte finora hanno però messo in evidenza una serie di fattori di notevole importanza. Innanzitutto, le migliori forme di silicati che si prestano per un utilizzo come fertilizzanti non sono le forme amorfe, ma le cosiddette *nanoparticelle mesoporose*: tali particelle si caratterizzano per avere uno scheletro di atomi di silicio molto stabile, ma al tempo stesso presentano un'importante porosità che facilita la formazione di legami di diverso tipo con molecole anche molto differenti tra loro. In questo modo inoltre tali formulati esprimono un rapporto tra la superficie ed il volume molto elevato, garantendo una maggior efficienza. Inoltre, tale porosità apporta anche un altro elemento vantaggioso: questa struttura infatti consente di andare a caricare le particelle sia sfruttando i legami dovuti alla natura elettrostatica delle particelle, sia sfruttando l'intrappolamento sterico che si manifesta quando un elemento va a depositarsi all'interno del poro senza più uscirne. Questo doppio metodo di azione consente quindi di caricare maggiormente la singola struttura silicea, facendo sì che ne sia necessaria una minor quantità per andare a svolgere una singola operazione colturale di fertilizzazione.

Un'altra caratteristica peculiare delle particelle di silicato è rappresentata dalla rugosità di tali strutture: questa rugosità garantisce una maggior capacità di adesione ai tessuti vegetali, ed è quindi di fondamentale importanza, soprattutto per le soluzioni in cui il fertilizzante è fornito tramite applicazione fogliare. Tali operazioni colturali, infatti, risentono in maniera molto importante dell'azione degli agenti atmosferici, che provocano facilmente l'allontanamento dei prodotti fertilizzanti dalla pianta. Se però la capacità adesiva aumenta, va ad aumentare anche la capacità del materiale di fornire alla pianta le molecole di fertilizzante in maniera più graduale, in un arco di tempo più lungo e in un modo più adatto a quelle che sono le necessità della coltura, resistendo agli agenti atmosferici. In questo modo inoltre diminuisce anche quella che è la quantità di prodotto che deve essere utilizzato ad ogni operazione colturale, in quanto le dispersioni diminuiscono anch'esse. Queste caratteristiche positive fin qui presentate però non hanno finora

trovato un'applicazione: gli studi svolti da Suriyaprabha et al. (2014) hanno evidenziato come i nanofertilizzanti silicei da loro utilizzati non fossero in grado di cedere alla pianta i nutrienti in maniera diretta, ma solo in maniera indiretta. Le particelle che costituivano tali prodotti andavano infatti a depositarsi in maniera separata, non rimanendo legati tra loro. Questo causava lo sviluppo di un processo di assorbimento non efficace da parte della pianta, e quindi un importante punto di criticità nello sviluppo di tali nanofertilizzanti.

Un altro studio condotto da Lima de Oliveira et al.(2019) ha invece evidenziato come l' utilizzo di fertilizzanti silicei in condizioni di squilibrio idrico possa causare l'aggravarsi di tali criticità, andando ad alterare la traspirazione e gli equilibri fotosintetici. Questi risultati sembrano essere in disaccordo con quanto descritto in precedenza, in quanto molti studi hanno mostrato come il Si sia un regolatore dell'apertura stomatica, non un agente che induce l'apertura o la chiusura degli stomi in maniera univoca. Questo elemento di contrasto non è stato ancora chiarito, e necessità di studi più approfonditi.

### ***3.3.4 Azione diretta sul terreno***

Fino a questo momento sono stati descritti gli utilizzi dei nanomateriali silicei quando applicati alle colture. È però importante sottolineare come si stiano sviluppando molti studi che vanno ad analizzare quella che è l'azione svolta da tali prodotti quando applicati al terreno. È infatti emerso come tali materiali siano particolarmente adatti a modificare quelle che sono le caratteristiche del suolo, quali la porosità, la densità delle particelle che lo compongono, la concentrazione di ioni presenti, la quantità d'acqua disponibile, ecc... Tutti questi fattori contribuiscono a determinare un diverso sviluppo della pianta, e l'utilizzo di prodotti adatti a migliorare queste caratteristiche può facilitarne la crescita ed aumentarne la resa.

Uno dei problemi principali è rappresentato dall' eccessiva salinità di alcuni suoli, troppo ricchi di ioni quali  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , ecc... Tali eccessi possono essere la causa del manifestarsi di condizioni di stress osmotico nelle colture, andando ad inibirne lo sviluppo. L' applicazione di precisi prodotti, come la zeolite, può portare ad una variazione della concentrazione di questi ioni: in particolare, questa soluzione non va a sfruttare la sua elevata capacità di scambio ionico per chelare gli ioni, ma per alterare gli equilibri elettrostatici delle particelle contenute nel terreno. Questi squilibri si manifestano inizialmente tramite il rilascio degli ioni che causano un eccesso di salinità, andando ad aumentarne ulteriormente la concentrazione. In questo modo vanno ad essere stimolati dei processi che portano ad un rilascio di molecole d' acqua, proprio per bilanciare questa condizione di squilibrio. La zeolite però è in grado di legarsi a queste molecole, grazie all' importante porosità che presenta: in questo modo funge da tramite tra gli ioni e l' acqua, facendo si

che queste molecole, che non sono più immobilizzate grazie alla formazione di questi legami, possano allontanarsi dalle radici, migliorando le condizioni dell' ambiente in cui si sviluppa la coltura.

La grande porosità che caratterizza le molecole di zeolite fa inoltre sì che tale materiale rappresenti una sorta di "riserva d'acqua" permanente. L'elevata carica superficiale che esprimono tali molecole, infatti, fa sì che difficilmente l'acqua possa essere rilasciata nel terreno, anche in condizioni di forte stress idrico. In questo modo la pianta si trova ad avere sempre un comodo accesso alle molecole d'acqua, in quanto è in grado di andare a legarsi alle molecole di zeolite con relativa facilità. Tale azione dei silicati può portare ad un aumento anche del 50% della disponibilità idrica nel terreno per le diverse colture, secondo quanto analizzato da Sangeetha e Baskar (2016) nei loro esperimenti.

Inoltre, sono state avanzate alcune ipotesi che sostengono che l'elevata porosità delle molecole dei silicati possa andare ad alterare la porosità del terreno, almeno negli strati superficiali in cui va ad essere applicata. Tale ipotesi è stata avanzata in quanto la zeolite è in grado di formare dei canali all'interno delle proprie strutture, andando così ad esprimere un'elevata superficie, il che consente di poter formare dei legami con molte molecole differenti. Questa azione è stata poi collegata alla possibilità di andare a modificare, in maniera indiretta, anche quella che è la struttura del terreno, alterando la densità delle molecole contenute, la concentrazione di molecole d'acqua, ecc... Tali ipotesi però non sono ancora state dimostrate, e sono necessari maggiori studi a riguardo per conoscere in maniera più approfondita quella che è la reale natura dei legami che legano le particelle al terreno.

### ***3.4 Nanoparticelle di idrossiapatite***

Un'altra importante categoria di nanomateriali utilizzati come carrier è rappresentata dalle nanoparticelle di Calcio Fosfato (CaP), ed in particolare dall'idrossiapatite. Tali composti hanno un ruolo biologico estremamente importante: sono infatti i costituenti fondamentali dei tessuti ossei e dei tendini dei vertebrati, ma si trovano anche sotto forma di cristalli a seguito del deposito degli stessi nell'arco di migliaia di anni. Queste due diverse origini del materiale consentono quindi di sviluppare diversi metodi di sintesi: da un lato l'uso dei cristalli già depositati può favorire lo sviluppo di tecniche più economiche e semplici da attuare, dall'altro lato l'utilizzo delle carcasse degli animali ci consente di avere un minor impatto ambientale. Queste considerazioni preliminari mettono in evidenza come al giorno d'oggi vi sia una grande attenzione alla sostenibilità in tutti gli aspetti, che è di fondamentale importanza per lo sviluppo dell'agricoltura negli anni futuri.

Da esperimenti fattisi è poi dimostrato come tali prodotti siano degli ottimi trasportatori di elementi azotati, a causa della sua capacità di rilasciare le molecole in maniera controllata, ma anche di composti contenenti Ca e P, a causa dell'elevato rapporto tra superficie e volume che va ad essere espresso.

A ciò si aggiunge un effetto secondario di importanza notevole: il loro utilizzo sembra aumentare l'apporto di fosforo alle colture, in particolare garantendo un più lungo accesso alla molecola da parte della pianta, che mantiene aperti i canali di assorbimento per un maggior periodo di tempo. Questo effetto è stato collegato ad una più alta produzione di gibberelline e ad una maggiore resistenza agli stress legati all'eccesso di metalli nel terreno. A tale riguardo, Marchiol et al. (2019) hanno mostrato come questo processo possa favorire un miglior sviluppo dell'apparato radicale su pomodoro.

Oltre che a migliorare gli apporti nutritivi alla pianta, è stato notato come l'idrossiapatite possa essere un valido materiale per la difesa della coltura: sembra infatti che tali molecole abbiano la capacità di andare a legarsi a diversi nutrienti secondari che possono poi essere assorbiti con scopi di difesa. Giroto et al. (2017) hanno mostrato l'esistenza di tali processi, ma ad oggi la causa di tali reazioni non è ancora nota ed è in fase di studio.

### ***3.4.1. Caratteristiche chimiche***

L'idrossiapatite (HAP), che si esprime a livello chimico come  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_2)$ , è di gran lunga la forma di cristallo più utilizzata tra quelle appartenenti al gruppo delle nanoparticelle di CaP. Questo perché da un lato è la più diffusa e quindi la più facile da reperire, ma allo stesso tempo ha un'elevata capacità di formare legami con molecole ed elementi molto diversi tra loro. Tale prodotto può essere ottenuto sia tramite processi di sintesi che utilizzano i cristalli depositati nel corso dei secoli sia tramite processi biologici che invece utilizzano le carcasse degli animali. Le molecole di origine biologica sono generalmente più utilizzate in quanto hanno un contenuto di ioni più vario, e questo garantisce una maggiore polivalenza del prodotto e quindi una maggior capacità di adattamento alle diverse esigenze. Essendo un prodotto naturalmente presente in natura, non tossico e biocompatibile con le esigenze tecnologiche, risulta quindi essere un ottimo carrier per gli utilizzi agricoli, in particolare per i fertilizzanti.

L'HAP è un prodotto inorganico che ha da subito attratto l'interesse della comunità scientifica in quanto presenta un elevato rapporto tra superficie espressa e volume, e questo lo rende adatto al trasporto di molecole aventi un importante ingombro sterico, quali ioni di Ca e P.

Un'altra categoria di tale prodotto ha suscitato l'interesse dei ricercatori negli ultimi anni: si tratta delle forme amorfe di calcio fosfato. Lo studio di questa tipologia di nanomateriali è ancora agli albori, per cui non è facile definire quelli che sono i limiti entro cui variano le proprietà e le

caratteristiche del materiale stesso, ma i primi risultati sembrano essere molto positivi. Questo prodotto si caratterizza per avere una struttura che richiama quella dell'apatite, ma di dimensione più ridotta, con dei cristalli che risultano essere talmente piccoli che negli esperimenti svolti con i raggi X risultano essere amorfi. In un confronto con l'idrossiapatite, tali molecole risultano essere molto più reattive, molto più solubili e avere una capacità molto elevata di assorbimento sulla loro superficie, e questo li rende più adatti a legarsi a molti macronutrienti.

I primi studi effettuati hanno dimostrato come tale nanomateriale sia in grado di garantire un'elevata efficienza, andando a ridurre gli apporti degli elementi nutrienti, come l'N, senza provocare una parallela riduzione della resa. Inoltre, è emerso come i nanofertilizzanti che utilizzano tali materiali vengano assorbiti molto più velocemente tramite le radici (il tempo impiegato è circa 1 ora) rispetto agli stomi (il tempo richiesto è molto più alto, circa 2 giorni).

Tutti questi elementi, quindi, evidenziano come sia necessario svolgere degli studi più approfonditi per analizzare quelle che sono le diverse caratteristiche.

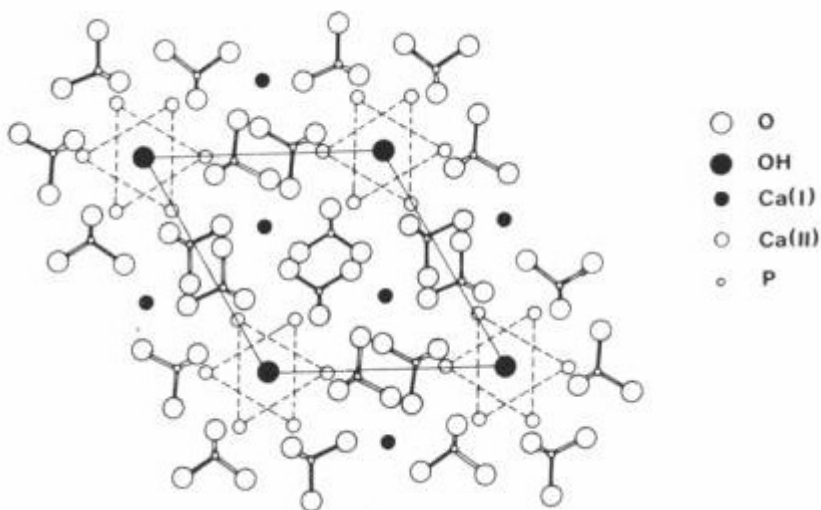


Figura 3.2 Struttura chimica dell'idrossiapatite.

### 3.4.2 Idrossiapatite legata all'urea

Inizialmente le molecole di CaP e i suoi cristalli furono studiate come potenziali carrier per gli elementi azotati, essendo N il nutriente più richiesto dalle colture. A seguito dello sviluppo di studi più approfonditi però è stato notato come tale prodotto sia particolarmente adatto a formare legami con molecole di diverso tipo, quali ioni di Ca e P. La ricerca si è quindi presto ampliata a molti utilizzi differenti, a dimostrazione della grande polivalenza di tale carrier.

I primi studi misero subito in evidenza come l'HAP si legasse molto facilmente all'urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), ossia la principale molecola fertilizzante che apporta nutrimento azotato. Kottegoda et al. (2011) dimostrarono come tale unione tra questi prodotti favorisse un maggiore sviluppo delle colture se paragonato ai fertilizzanti tradizionali. A seguito di tale dimostrazione andarono a



svilupparsi nuovi studi che riguardavano non solo l'efficacia di tale nanoprodotta, ma anche nuovi metodi di sintesi dello stesso.

Il motivo della maggiore efficienza delle particelle di urea legate all'HAP rispetto alla formulazione tradizionale è da ricercarsi nella diversa cinetica di degradazione del composto. La capsula che è stata creata infatti garantisce un'azione più graduale che meglio si presta alle necessità della pianta. La ragione di tale gradualità, come anche nel caso del chitosano precedentemente descritto, è da ricercarsi nella natura dei legami che si formano tra il nanomateriale e le molecole che effettivamente svolgono l'azione fertilizzante. Anche in questo caso, infatti, i legami sono estremamente stabili e quindi difficili da rompere, in particolare quelli che si formano tra il gruppo amminico dell'urea e il gruppo carbonilico dell'idrossiapatite. Anche in questo caso è quindi necessario andare a degradare la capsula per provocare la rottura dei legami ed il conseguente rilascio delle molecole. L'HAP ha una cinetica di degradazione, e quindi di rilascio, diversa dal chitosano, il che rappresenta un elemento di ricchezza: è infatti una nuova e differente soluzione che può adattarsi in maniera migliore a precise necessità a cui il chitosano può non rispondere. In ogni caso, tale cinetica è sicuramente migliore rispetto a quella dei fertilizzanti tradizionali.

Come dimostrato da Subbaiya et al. (2012) in alcuni esperimenti condotti su *Vigna radiata*, l'utilizzo di urea legata ad una capsula di HAP ha condotto ad un aumento della durata del periodo di rilascio. Ciò ha favorito la crescita delle piante campione non solo durante la fase di germinazione, ma anche durante la fase di sviluppo dei frutti. Altri studi condotti su riso (*Oryza sativa*) hanno invece dimostrato come tale formulazione provochi un importante aumento della resa, pari anche al 8,2% in più rispetto alle piante di controllo. In tale studio era stata fornita urea secondo le formulazioni tradizionali alle piante di controllo, mentre era stato utilizzato un nanofertilizzante a base di urea ed idrossiapatite per le piante che hanno espresso una maggior resa.

In generale, è stato osservato come l'urea tradizionale usata come fertilizzante abbia una elevatissima velocità di rilascio e di penetrazione (impiega circa 10 minuti per entrare nella pianta dopo che è stata effettuata l'operazione colturale), mentre la formulazione che presenta l'HAP ha una velocità molto inferiore. A parità di condizioni è infatti richiesta una settimana di tempo per raggiungere lo stesso livello di penetrazione nella pianta (Okey-Onyesolu et al., 2019).

### **3.4.3 Idrossiapatite legata al fosforo**

I fertilizzanti tradizionali a base di fosforo esprimono un livello di efficienza tra i più bassi: spesso, infatti, le colture soffrono di carenze di tale elemento, anche se il terreno risulta esserne molto ricco. Diversi studi hanno infatti dimostrato come il P possa essere facilmente chelato da ioni

di alluminio e di ferro o come possa andare ad immobilizzarsi in composti inorganici, diventando così non disponibile per la pianta. Queste evidenze pongono l'attenzione sul fatto che si debba andare a fornire alla pianta tale nutriente in delle soluzioni che difficilmente vanno ad essere chelate o che invece sono di immediato assorbimento, in modo tale da evitare che si sviluppino reazioni indesiderate che annullino la disponibilità delle molecole.

L'idrossiapatite si è rivelata essere una molecola che si adatta molto bene a formare dei legami con il P, a causa dell'elevato rapporto tra superficie esposta e volume. È stato dimostrato come la cinetica di rilascio delle particelle sia diversa dai fertilizzanti tradizionali, e come la velocità sia molto inferiore. Questo, come descritto in precedenza, garantisce un rilascio più controllato che meglio si adatta alle necessità della pianta e al tempo stesso sottrae le molecole attive alle reazioni che possono andare a modificarne la struttura e a renderle inutilizzabili.

Come dimostrato da Marchiol et al. (2019), il fosforo legato a molecole di HAP può favorire un maggior sviluppo della pianta andando ad aumentare la lunghezza e la superficie dell'apparato radicale, soprattutto in condizioni ambientali in cui la coltura può risentire di condizioni di stress e non svilupparsi in maniera adeguata. Dalle osservazioni svolte è stato notato come il P avesse un'elevata capacità di diffondere all'interno della pianta (sono stati misurati i livelli di P in diverse zone, e tutte mostrano una sostanziale omogeneità di concentrazione), e come invece non andasse ad accumularsi nell'apparato radicale, causando degli squilibri a livello osmotico e di pH. Questo ha dimostrato come il rivestimento di idrossiapatite abbia facilitato la conservazione del nutriente, facilitandone l'assorbimento tramite le radici, senza però inficiare la sua capacità di movimento all'interno dei tessuti. Tale effetto positivo è stato osservato in tutti i test effettuati, anche con formulazioni aventi concentrazioni di P e di HAP differenti. Questo sembra suggerire che il nanomateriale non vada ad influenzare quelle che sono le capacità di movimento dell'elemento fertilizzante, ma nello stesso esperimento sono stati effettuati dei test utilizzando la stessa tipologia di capsule legate a ioni di calcio (Ca) portando ad osservare come il calcio non andasse a diffondersi all'interno della pianta, ma andasse invece ad accumularsi nelle radici.

Dalle prime analisi è emersa l'ipotesi che tale problematica sia legata alla diversa via di diffusione di tali ioni all'interno dei tessuti: sembra infatti che vada ad essere utilizzato lo xilema, e questo inibisce la risalita verso zone apicali della pianta, causando quindi degli accumuli nella parte radicale. Non è però ancora stata dimostrata tale ipotesi, né al momento sono ancora state completamente chiarite le dinamiche di trasmissione degli elementi nutrienti dall'HAP alle colture, e questo non ci consente di fugare i dubbi su quella che sia la reale efficienza e l'effettivo comportamento di tale nanomateriale.

Ciò che però emerge chiaramente è la necessità di condurre nuovi e più approfonditi studi che vadano ad esplorare quello che è il potenziale del prodotto, in quanto, sulla base delle prime ricerche effettuate, sembra possa avere un grande potenziale.

### **3.5. Nanoparticelle polimeriche**

Le nanoparticelle polimeriche non esistono di per sé in natura, ma devono essere necessariamente prodotte in laboratorio per poter poi essere utilizzate. Questo fa sì che tali particelle godano di un'elevatissima specificità, in quanto vanno ad essere create appositamente per svolgere una precisa funzione, e non devono invece essere adattate a quelle che sono le esigenze del caso. Anch'esse devono comunque rispondere alle caratteristiche di biodegradabilità, non tossicità e biocompatibilità. Possono anch'esse avere diverse origini: alcune sono state create in vitro grazie a processi di sintesi basati sull'utilizzo di molecole inorganiche, mentre altre si basano su prodotti di origine organica, come ad esempio il chitosano. Tale molecola, infatti, è un ottimo carrier, anche per più elementi alla volta, come ad esempio NPK in un'unica soluzione, senza perdere di efficacia per nessuno di essi. È stato infatti visto che gli strati di chitosano utilizzati per incapsulare tali elementi presentano una forza di legame molto elevata, e difficilmente vanno ad essere rotti. Quando però la molecola entra in un sistema in cui è presente acqua tali molecole riescono un po' alla volta a penetrare tali strati, andando a modificare la pressione interna alla capsula finché non raggiunge una nuova condizione di equilibrio. Dal momento in cui tale equilibrio è raggiunto inizia la fuoriuscita delle molecole di nutriente, in maniera molto controllata a causa del particolare equilibrio raggiunto. Non sono ancora del tutto chiare le cause che consentono una regolazione così graduale, ma è stato notato come si manifesti per prodotti che presentano sia uno sia più nutrienti in una sola formulazione.

È poi importante sottolineare come esistano dei polimeri di dimensione non nanometrica che sono utilizzati nella produzione di fertilizzanti e nanofertilizzanti, con diversi ruoli (agenti che vanno a legare le molecole, formazione di tessuti protettivi, ecc.).

### **3.6 Chitosano**

Il chitosano è un polisaccaride lineare, formato da molecole di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, unite tra loro tramite legami di tipo  $\beta(1-4)$ . La sintesi di questo prodotto si sviluppa a partire da molecole di chitina, che devono essere deacetilate per consentire l'estrazione del prodotto (Calvo et al., 1997). La chitina è estremamente importante in natura: è infatti il secondo polimero sintetizzato naturalmente, dopo la cellulosa, ed è presente soprattutto nel carapace dei crostacei, ma anche in alcuni funghi e nelle pareti cellulari di alcune specie vegetali.

Inizialmente la produzione di chitosano era particolarmente complessa, in quanto presentava delle importanti criticità legate ad aspetti tossicologici e i primi formulati mostravano alcune difficoltà nel rilascio delle molecole contenute all'interno della capsula che si andava a costituire. Tale problema era legato alla presenza di non voluti legami covalenti difficili da rompere, la cui formazione era legata alla forte carica cationica espressa dalle molecole di chitosano. Risolti tali problemi sono emerse le proprietà positive che si voleva andare a sfruttare, come la non tossicità, la biocompatibilità, la elevata capacità adesiva, e la forte attitudine a formare dei gel in presenza di condizioni ambientali non estreme. In particolare, questa proprietà si è rivelata fondamentale nel facilitare la formazione dei legami tra la capsula e le molecole da veicolare: questo perché il raggiungimento di una condizione di stabilità del prodotto in condizioni ambientali standard ne facilita la conservazione e l'utilizzo.

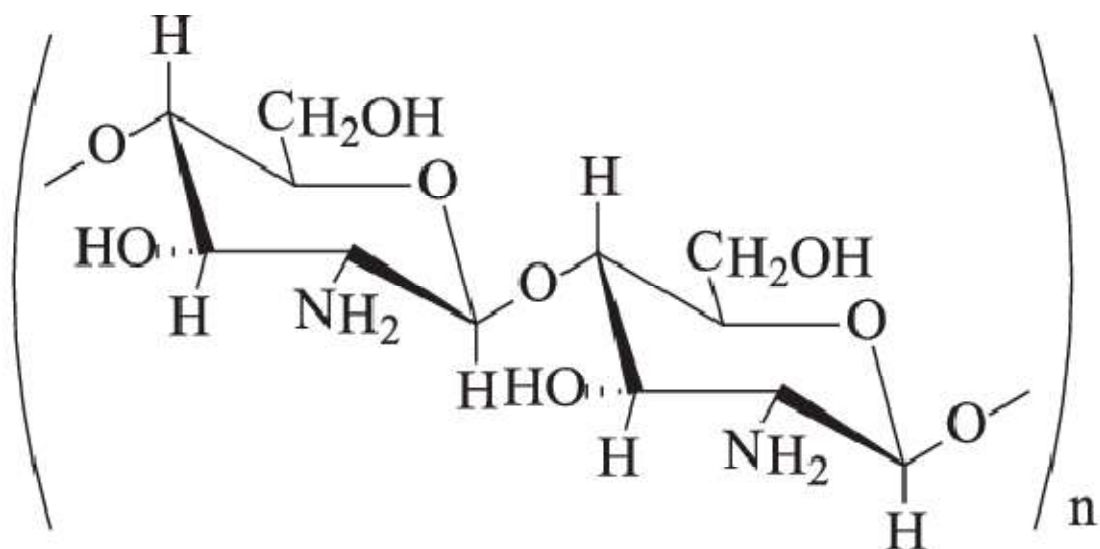


Figura 3.3 Struttura chimica di una molecola di Chitosano.

Gli utilizzi del chitosano sono molteplici: è un prodotto che ha visto una vasta diffusione, fra gli altri, in ambito medico, in quanto è in grado di regolare l'assorbimento del colesterolo, di contrastare la malattia di Crohn, e di alleviare le complicanze per la dialisi.

In agricoltura, invece, il chitosano rappresenta una delle molecole organiche più importanti in quanto è utilizzato in processi anche molto diversi tra loro. Le funzioni per cui è maggiormente noto il chitosano sono:

- azione fertilizzante: funge da carrier per il trasporto delle molecole con azione fertilizzante verso le colture;
- sviluppo di processi di maggior resistenza alle condizioni di stress, sia biotiche che abiotiche;

- funzione di elicitore per l'attivazione di sistemi di difesa.

Tali funzioni non sono indipendenti le une dalle altre. Nel momento in cui va ad essere utilizzato tale prodotto si manifestano tutte, anche se in modalità differenti le une dalle altre e con intensità differenti. Esistono poi varie formulazioni che sono state create per indurre maggiormente lo sviluppo di uno specifico processo, ma le singole azioni comunque non vanno ad escludersi a vicenda.

È poi importante sottolineare come il chitosano possa essere fornito alla pianta in due diverse modalità: può essere utilizzato come prodotto “tradizionale” durante la sua fase di crescita nel momento colturale più adatto, ma può anche essere inserito direttamente attorno al seme che andrà poi ad essere seminato. Questi approcci diversi vanno a determinare delle reazioni differenti della coltura, che non sono ugualmente efficaci: molto dipende da quelle che sono le condizioni della pianta stessa e le sue caratteristiche intrinseche.

### ***3.6.1. Carrier per gli agenti fertilizzanti***

L'utilizzo del chitosano come agente fertilizzante è quello più diffuso in agricoltura. Tale prodotto infatti presenta delle caratteristiche chimiche che sono particolarmente adatte alla costituzione di capsule che vanno a legarsi agli elementi nutritivi, in particolare la sua elevata carica superficiale. Al tempo stesso però tale carica elevata non va ad inficiare l'ingresso per diffusione delle particelle attraverso gli stomi delle piante. Come descritto in precedenza, alcuni nanomateriali, nonostante la loro ridottissima dimensione, non riescono ad entrare nelle cellule o nelle piante tramite diffusione a causa di polarità troppo nette o cariche superficiali troppo elevate. Non è questo il caso del chitosano, che sfruttando questa caratteristica si rivela essere un carrier eccellente.

L'elevata carica che va ad esprimere consente invece la formazione di legami difficili da rompere, che garantiscono un rilascio molto graduale dell'elemento attivo. È importante notare che l'entità della carica superficiale espressa varia in funzione di quello che è il grado di deacetilazione raggiunto durante il processo di estrazione del chitosano dalla chitina: maggiore è il grado di deacetilazione, maggiore risulterà essere la carica superficiale e quindi la possibilità di formare legami. Questa proprietà è stata sfruttata per andare a risolvere uno dei maggiori problemi legati ai micronutrienti che devono essere forniti alla pianta: difatti, la loro assenza ha un effetto limitante per la coltura, ma al tempo stesso risulta essere difficile andare a sopperire a tale carenza con i fertilizzanti tradizionali. Questo perché la quantità di prodotto richiesto è molto ridotta, ed è quindi facile andare a fornire quantità in eccesso che possono causare tossicità. Tale rischio è elevato con i prodotti tradizionali, ma più limitato con l'utilizzo di nanofertilizzanti, qual è il chitosano, che sono

in grado di andare a fornire una quantità specifica secondo quelle che sono le esigenze della pianta, senza generare inutili eccessi.

In un'ottica più generale, che comprende sia i micronutrienti che i macronutrienti, l'utilizzo di tale prodotto risulta avere dei risultati notevoli nello sviluppo delle colture: andando ad analizzare quelli che sono i principali parametri di riferimento (lunghezza delle radici, quantità di foglie presenti sulla pianta, estensione dell'apparato fogliare, peso secco alla raccolta, ecc.) si possono infatti notare dei valori migliori, in un confronto con i fertilizzanti tradizionali, in quasi tutti i casi presi ad esame. Questo miglioramento è collegato alla capacità del chitosano di rilasciare gli elementi fertilizzanti a cui è legato in maniera molto graduale, facendo sì che siano fornite alla pianta solo le quantità di cui essa ha bisogno e andando al tempo stesso a proteggere il prodotto non ancora distribuito. Tale gradualità è garantita dalla lenta disgregazione delle molecole di chitosano stesso, che provoca un altrettanto lenta rottura dei legami tra capsula ed elemento fertilizzante, che va ad essere liberato nell'ambiente (sulla superficie della foglia o nel terreno a seconda del tipo di operazione colturale svolta) per poi essere assorbito.

È poi stata messa in evidenza una relazione molto particolare tra il chitosano e l'N, il macronutriente più importante in termini di quantità assorbita dalle colture. È stato scoperto che tale nanomateriale è attivamente coinvolto sia nei processi di regolazione dell'assorbimento dell'N sia nella regolazione dei metabolismi che sono direttamente legati ad esso. Non va quindi esclusivamente a regolarne il rilascio, agendo "esternamente" alla coltura, ma opera in simbiosi con la pianta per effettuare una regolazione quanto più precisa possibile. Questo porta di conseguenza ad un miglioramento sia nei parametri qualitativi che quantitativi, tramite un'interazione molto profonda e specifica con il nanomateriale, che può essere modulata e adattata di volta in volta alle diverse esigenze.

Le proprietà finora descritte si manifestano sia nel caso in cui il chitosano sia fornito tramite fertilizzazione in fase di crescita della pianta, sia nel caso in cui i semi utilizzati per la semina vadano ad essere trattati prima dell'insacchettamento.

Esistono però degli elementi di specificità legati all'utilizzo del chitosano come capsula per il seme. Innanzitutto, la degradazione delle molecole stesse è differente e posta ancor più in relazione con quelle che sono le necessità del seme, in quanto esse sono contenute in un ambiente con caratteristiche particolari. Dai primi studi emerge una cinetica di degradazione molto precisa, che segue di pari passo quelle che sono le varie fasi di germinazione. Tali fasi inoltre risultano essere molto più vigorose e meno soggette a rallentamenti o a blocchi rispetto ai campioni trattati con fertilizzanti tradizionali (che apportano la stessa quantità di elemento nutriente a parità di dosi) e rispetto ad equivalenti trattamenti fogliari in cui era utilizzato chitosano, come mostrato da Cho et

al. (2008). Questo miglioramento non è l'unico che può essere osservato sulla pianta: si può infatti notare come vi sia una maggior lunghezza e attività delle radici, una maggiore attività di alcuni enzimi, e un maggior contenuto in clorofilla che facilita lo sviluppo della pianta. La maggior crescita, come dimostrato da Mona (2015), si manifesta attraverso una maggior attività di divisione cellulare, stimolata da una maggior presenza di giberelline.

L'utilizzo del chitosano però non è limitato al miglioramento dei valori germinativi e di resa, ma è legato anche al miglioramento di quelli che sono i metaboliti secondari che spesso hanno un peso fondamentale nella valutazione dei parametri qualitativi.

### ***3.6.2 Elicitore per indurre l'attivazione di sistemi di difesa***

E' stato inoltre evidenziato un ruolo importante del chitosano nell'attivazione dei sistemi di difesa. Tale azione si manifesta anche quando non è in atto un attacco da parte di agenti patogeni, e questo quindi suggerisce come tale azione non sia influenzata dalle caratteristiche degli agenti patogeni stessi ma sia invece da ricercarsi tra le diverse relazioni che legano la pianta e il chitosano.

Le ipotesi più accreditate per la spiegazione di tale fenomeno portano a considerare il chitosano come un elicitore per le colture. Un elicitore è una molecola segnale che induce l'attivazione di un preciso processo o sistema nella pianta, in risposta ad uno stimolo. Tale stimolo è quindi rappresentato proprio da tali molecole. Secondo quanto riportato da Day et al. (2001), i geni predisposti all'attivazione dei sistemi di difesa delle piante riconoscono le molecole di chitina contenute nel chitosano, considerandole però come "tracce" di patogeni. Infatti, molti di essi contengono delle molecole di chitina nella propria struttura, e vanno a liberarle nel momento in cui attaccano la pianta. Questa ipotesi sembra dimostrare quanto evidenziato inizialmente, ossia come le difese della pianta vadano ad aumentare nonostante non vi siano attacchi in corso, ma è necessario andare a svolgere altri studi per confermare la validità di tale teoria.

Altri studi infatti hanno mostrato come il chitosano non solo abbia la capacità di attivare i meccanismi di difesa, ma possa agire esso stesso come "elemento difensivo" di per sé. Come osservato da Rabea et al. (2005) tale prodotto sembra essere in grado di uccidere le larve dei parassiti che erano state inoculate nel sistema preso in esame, agendo direttamente su di esse e non stimolando la coltura. Questo, quindi, sembra ipotizzare che esista una relazione non solo con la pianta, ma anche con gli organismi patogeni, e quindi l'ipotesi prima proposta andrebbe a perdere di significato.

L'azione difensiva del chitosano si manifesta in diversi modi:

- tramite la produzione di forme tossiche dell'ossigeno (ROS): tali molecole vanno a degradare le cellule patogene inducendo la cessione di elettroni da parte della parete

cellulare, che non va più a trovarsi in condizioni di equilibrio e ciò limita lo sviluppo della malattia;

- inducendo la sintesi di enzimi che favoriscono la lignificazione per andare a occludere i vasi all'interno dei quali si diffonde il patogeno;
- andando a modificare le condizioni di pH della zona in cui si trova l'organismo dannoso: in questo modo vanno ad essere alterate le condizioni dell'ambiente in cui si trovano le cellule patogene, che possono non riuscire ad adattarsi a tali nuove condizioni e quindi vanno ad essere danneggiate a loro volta. Tale azione si svolge andando a depolarizzare la membrana, andando a modificare l'equilibrio di scambio ionico tra le cellule, acidificando il citoplasma, ecc.; può manifestarsi tramite la sintesi e l'attivazione di enzimi con funzione difensiva, come glucanasi, chitinasi e fitoalessine.

Il chitosano quindi è un prodotto molto versatile, che può fornire una vasta gamma di soluzioni e quindi può rappresentare una risorsa anche per sviluppare delle tecniche di difesa sostenibili, non tossiche, estremamente specifiche e al tempo stesso molto efficienti.

La trattazione del chitosano come agente di difesa richiede un approfondimento specifico, ma non è argomento di questa tesi. Le informazioni fornite in questo capitolo hanno lo scopo di dare una descrizione quanto più completa possibile di quelli che sono gli effetti “secondari” dell'utilizzo di tale prodotto, in quanto non è possibile in alcun modo andare a separare le diverse azioni: le operazioni colturali possono essere svolte per effettuare una fertilizzazione, ma le caratteristiche intrinseche della molecola possono indurre lo sviluppo di processi non volutamente ricercati, di secondaria importanza rispetto all'azione principale, che però contribuiscono allo sviluppo della pianta.

### ***3.6.3 Agente protettore da stress biotici e abiotici***

Il chitosano ha inoltre un'importante funzione nella protezione della coltura dagli stress, sia biotici che abiotici. Tale comportamento del chitosano è detto di “bio-fortificazione”: il prodotto, infatti, non va a proteggere la pianta andando a impedire che si manifestino le condizioni di stress, ma va a indurre l'attivazione di processi biotici che hanno lo scopo di far sì che possa adattarsi nella maniera migliore alle condizioni avverse che si presentano. Tali processi si sviluppano in quanto il chitosano si comporta anche in questo caso come una sorta di elicitore, ossia di molecola attivatrice per i metabolismi della coltura.

Una delle condizioni di stress più critiche per le colture è dovuta alla carenza di acqua; il chitosano si è rivelato essere un ottimo prodotto anche per contrastare questa problematica, in quanto è in grado di regolare l'apertura e la chiusura degli stomi in modo tale da regolare il



processo di evaporazione e quindi anche la quantità d'acqua che va ad essere traspirata dalla pianta. Esperimenti condotti da Bittelli ed al. (2000) hanno dimostrato come l'applicazione di chitosano in forma di fertilizzante fogliare possa ridurre la quantità d'acqua ceduta all'ambiente tramite traspirazione per una quota pari al 26 – 43%, senza andare a ridurre le rese. Questi valori suggeriscono quindi un nuovo ruolo per il chitosano, ossia quello di agente antitraspirante da utilizzare nei momenti più caldi della stagione. L'alterazione del naturale processo di traspirazione effettuata dal chitosano è messa in atto grazie alla regolazione della trascrizione di precisi geni che codificano per la produzione di acido jasmonico. Tale acido ha delle caratteristiche che lo rendono molto simile all'acido abscissico (ABA), che è il principale regolatore dell'apertura e della chiusura degli stomi. In particolare, maggiori quantità di ABA inducono la chiusura di un maggior numero di stomi, e viceversa. L'acido jasmonico quindi va ad aggiungersi a quello naturalmente presente nella pianta, andando in questo modo a modificare quella che è la normale regolazione.

Un altro dei più importanti effetti che inducono l'apertura o la chiusura degli stomi è l'esposizione alla luce del sole, che induce la trascrizione degli stessi geni d'interesse del chitosano, generando una sorta di competizione. È stato dimostrato che però il chitosano non risente dell'azione della luce del sole, ma anzi l'azione di tale prodotto è risultata essere “dominante” su di essa. In condizioni di laboratorio, le piante trattate con il chitosano hanno tutte mostrato una tendenza a ridurre l'apertura degli stomi, anche andando ad aumentare l'esposizione alla luce. La chiusura del singolo stoma non era sempre la stessa, ma la superficie chiusa totale risultava essere maggiore rispetto alle piante di controllo. Questo fa sì che il chitosano possa essere considerato un ottimo prodotto per la protezione delle colture dallo stress idrico.

La condizione di stress idrico non è però l'unica che va ad essere contrastata dal chitosano. Recenti studi infatti hanno ipotizzato un suo ruolo anche nella riduzione dei danni alle colture causati da un'eccessiva salinità tramite la sintesi di prolina, di enzimi quali le catalasi e le perossidasi, e tramite la riduzione della produzione di malondialdeide.

Tutte queste proprietà ci mostrano quindi come il chitosano sia un elemento estremamente polivalente, che si presta in maniera ottimale a molte colture e per molti scopi.

### **3.7 Nanomateriali carboniosi**

I nanomateriali carboniosi sono dei prodotti il cui spettro di azione è molto vasto: sono infatti utilizzati in ambito medico, in ambito ingegneristico, in ambito informatico, ed ovviamente in ambito agricolo. Questa categoria di prodotti comprende molti diversi formulati, che differiscono gli uni dagli altri a causa delle specificità chimiche e fisiche. Queste differenze sono però una fonte

di ricchezza, in quanto possono portare allo sviluppo di molte soluzioni, con una maggiore capacità di adattamento alle diverse condizioni, garantendo una grande polivalenza.

In un primo momento i progetti sia di ricerca sia di produzione di tali nanomateriali hanno dovuto affrontare delle importanti criticità, in quanto i materiali a cui era stata associata la sperimentazione (Titanio e Zinco) si sono poi rivelati non essere adeguati. Grazie poi alle ricerche di Wang et al. (2019) è stato invece mostrato come tali materiali offrano grandi opportunità nell'ambito dei fertilizzanti. Tali ricerche, infatti, hanno portato allo sviluppo di sistemi di produzione non tossici, economici ed efficaci per la creazione di molecole a base di N legate ad una matrice carboniosa.

Il principale utilizzo dei nanomateriali carboniosi è legato alla produzione di nanofertilizzanti e nanofitofarmaci, ma si stanno sviluppando molte ricerche volte ad individuare delle nuove potenziali applicazioni. Tra queste, quelle che sembrano avere un maggior potenziale sono rappresentate dall'utilizzo di tali nanoprodotto nelle applicazioni al terreno, in modo tale da modificarne le caratteristiche per favorire un miglior assorbimento dei nutrienti da parte della pianta, o per andare a recuperare terreni inquinati. Un altro differente ambito di studio riguarda l'utilizzo dei nanoprodotto carboniosi come *coating* dei semi per favorire la germinazione delle colture. Tutte queste ricerche sono però ancora in una fase sperimentale, e necessitano di maggiori studi.

I fertilizzanti prodotti finora sono risultati essere particolarmente efficienti nel favorire lo sviluppo dell'apparato radicale delle colture, e nel favorire un aumento del rapporto tra il peso secco e il peso fresco. Tale miglioramento si va a manifestare in quanto tali nanomateriali esprimono una capacità di rilascio dei diversi nutrienti estremamente precisa, che va perfettamente a seguire quelle che sono le necessità della pianta. È stato poi osservato come tali nanomateriali riescano a penetrare attraverso l'apparato radicale andando a diffondersi sia tramite il simplasto che l'apoplasto, andando a raggiungere punti molto distanti tra loro all'interno della pianta e facendo sì che la loro azione si diffonda in maniera estremamente omogenea.

Questi materiali si sono poi rivelati essere delle soluzioni inaspettate per la difesa della pianta da alcune malattie. Infatti, è stato notato come esse siano in grado di penetrare le pareti cellulari, raggiungendo il nucleo e andando a separare i due filamenti di DNA presenti: a seguito di ciò risulta essere più semplice per la pianta stessa andare a trascrivere le sequenze codificanti la tionina, una molecola in grado di alleviare quelli che sono gli effetti di alcune malattie sulla pianta.

### 3.7.1 Caratteristiche chimiche

I nanoprodotti carboniosi sono molteplici, ed ognuno ha delle caratteristiche differenti. Quelli più noti e generalmente più utilizzati sono il grafene, il fullerene e i nanotubi carboniosi (*carbon nanotubes*). Ad ogni modo però è importante sottolineare come tutti i composti che appartengono a questa categoria abbiano delle caratteristiche chimiche molto diverse rispetto agli altri nanofertilizzanti finora trattati, a causa delle particolari caratteristiche del carbonio (C), elemento chiave di queste strutture. In particolare, la capacità del C di formare degli orbitali ibridizzati che esprimono un maggiore equilibrio rappresenta uno degli elementi chiave nella costituzione delle diverse strutture.

Il grafene è un prodotto bi – dimensionale, con una configurazione a foglio. Ogni singolo atomo di C va a creare dei legami di tipo  $\sigma$  con altri 3 atomi di C, formando delle strutture esagonali che ricordano i favi di un alveare. Il grafene può anche essere utilizzato per la creazione di punti quantici, tramite la lavorazione di un foglio singolo con dei metodi top – down, che portano alla formazione di piccole porzioni di nanomateriale i cui atomi si caratterizzano per avere una configurazione  $sp^2$ .

Il fullerene è un prodotto la cui struttura non è più bi – dimensionale, ma in questo caso assume una conformazione sferica. Ogni singolo atomo di C ha un'ibridazione  $sp^2$ , e i legami che si creano portano alla produzione di strutture esagonali e pentagonali legate tra loro. Questa è la più piccola struttura nota tra i nanomateriali, avente una marcata allotropia e un diametro esterno mediamente di 0.71 nm. Queste caratteristiche rendono tale prodotto estremamente stabile, sia dal punto di vista chimico che fisico: è infatti necessario raggiungere temperature elevatissime, fino anche a 1000°C, per andare a modificarne la struttura.

I nanotubi carboniosi sono probabilmente i prodotti di maggiore interesse. Ciò è dovuto al fatto che le caratteristiche positive che caratterizzano qualsiasi nanomateriale carbonioso vanno ad essere espresse in maniera più accentuata, facendo sì che si prestino ad una vasta gamma di utilizzi e al tempo stesso abbiano una efficienza generalmente più alta rispetto agli altri nanomateriali. Anche in questo caso, gli atomi di carbonio sono ibridati  $sp^2$  e sono legati tra loro in modo tale da formare una struttura tubolare. Possono essere prodotti sia utilizzando dei metodi bottom – up che dei metodi top - down, e possono suddividersi in due categorie: i nanoprodotti costituiti da un singolo cilindro (SWCNT), e i nanoprodotti costituiti da più cilindri concentrici (MWCNT).

I metodi di produzione possono quindi essere molto differenti tra loro, anche se quelli più diffusi si basano sull'ablazione tramite laser o sul deposito di vapori chimici. Quest'ultimo metodo è quello generalmente più utilizzato, in quanto è quello più semplice da controllare e allo stesso tempo più modulabile. Ciò consente la creazione di prodotti dalle caratteristiche estremamente precise, che meglio si adattano a quelle che sono le diverse esigenze di volta in volta.

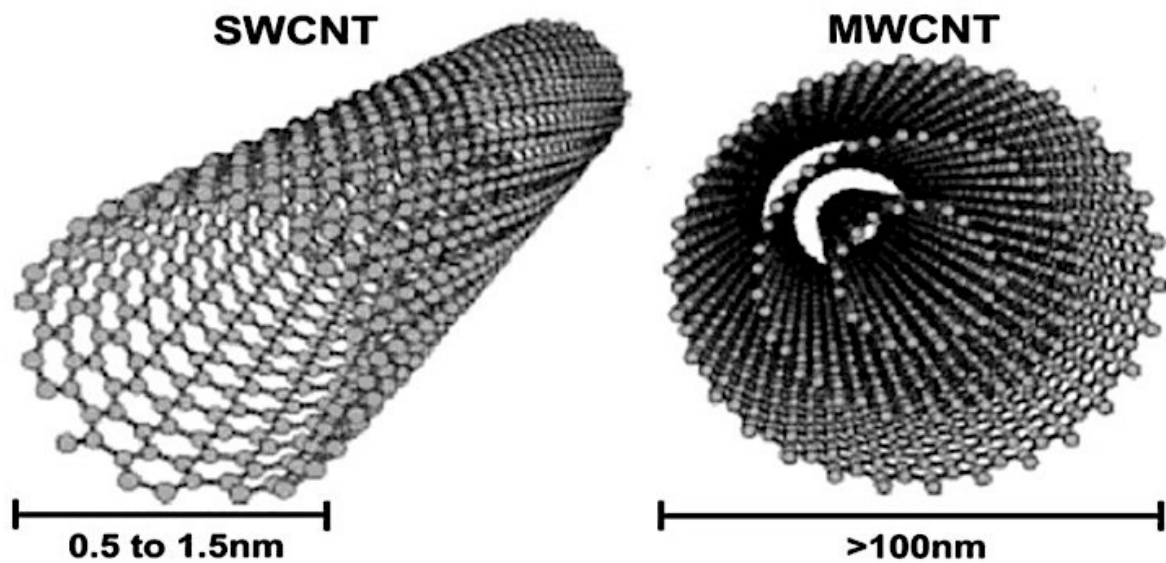


Figura 3.4 Struttura chimica rispettivamente dei SWCNT (a sinistra) e dei MWCNT (a destra).

### 3.7.2 Carbon nanotubes

I nanotubi di carbonio (CNT) hanno una dimensione molto ridotta, con un diametro di pochi nanometri e una lunghezza di qualche micron. Possono essere distinti, come detto in precedenza, tra i *single wall nanotubes* (SWCNT) e i *multi wall nanotubes* (MWCNT):

I nanomateriali carboniosi possono essere suddivisi in due categorie in base alla loro struttura:

- i *single-walled carbon nanotubes*: tali nanomateriali si caratterizzano per essere costituiti da un unico strato di grafene che avvolge il nutriente, avente un diametro compreso tra 0.5 nm e 2 nm.
- i *multi-walled carbon nanotubes*: tali prodotti invece sono costituiti da più strati di grafene che formano la struttura, andando a creare una particella che presenta un diametro esterno che varia tra 2 nm e 100nm, mentre il diametro interno risulta essere molto più ridotto, pari a 1-3 nm. Tale categoria di prodotti sembra possa andare ad agire andando a modificare l'attrazione tra le cariche superficiali delle particelle, andando di conseguenza a determinare proprietà differenti che alterano quelli che sono i rapporti tra i nutrienti, la coltura e il terreno. Tali legami però non sono ancora stati chiariti e necessitano di ulteriori ricerche.

I CNT possono trovarsi in 3 diverse conformazioni: chirale, a zigzag (solo i SWCNT), a poltrona.

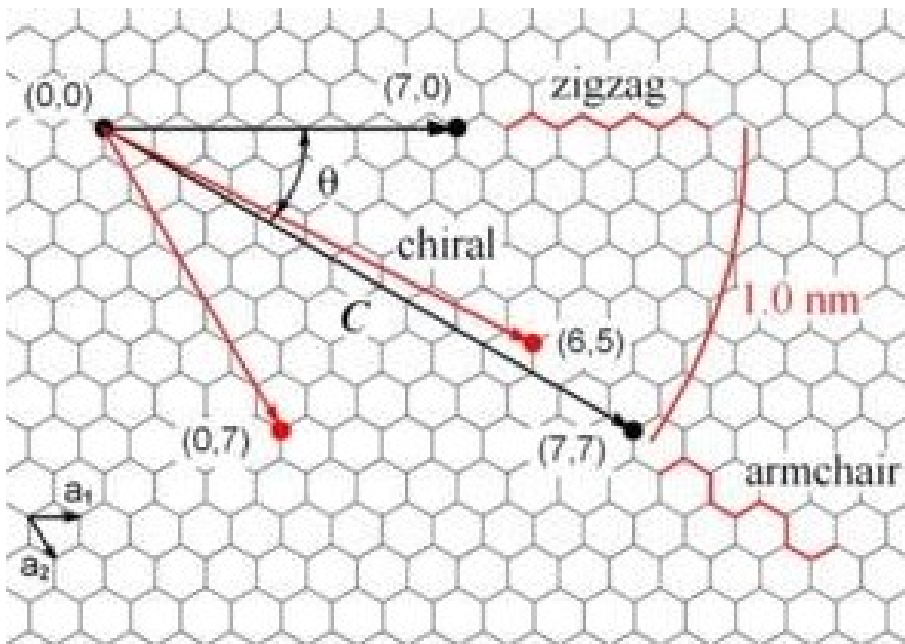


Figura 3.5 sviluppo dei legami nelle diverse conformazioni dei CNT

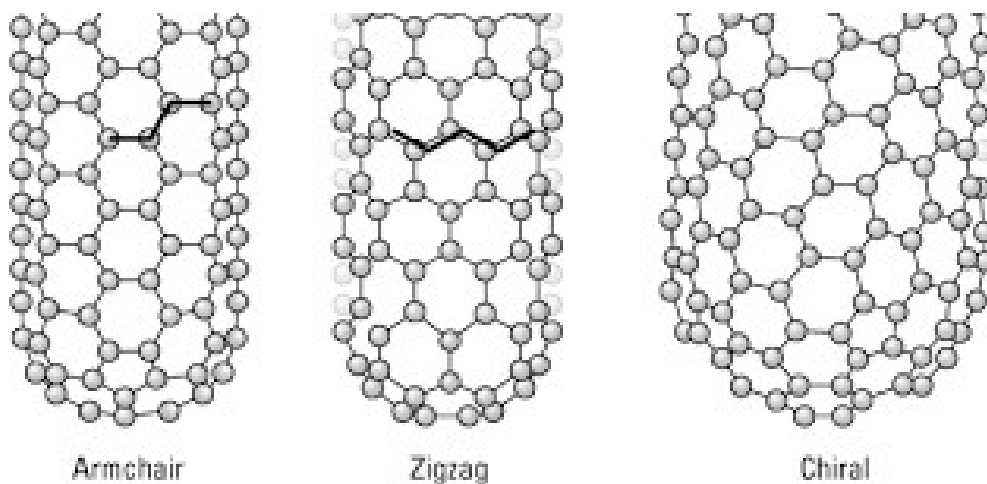


Figura 3.6 diverse conformazioni dei CNT.

Come detto, i CNT hanno una vasta gamma di impieghi, anche all' interno dell'ambito agricolo. Come nanofertilizzanti, i principali impieghi evidenziati dagli studi fin qui condotti sono:

- miglioramento della fase germinativa dei semi;
- aumento della lunghezza delle radici e dei germogli;
- capacità di alleviare le condizioni di stress idrico;
- miglioramento del contenuto biochimico della pianta;
- aumento e regolazione dell'attività enzimatica;
- aumento della concentrazione delle sostanze di difesa a seguito dell'attivazione di appositi geni;

- soppressione degli enzimi ossidativi;
- miglioramento del livello fotosintetico;
- attivazione e regolazione di altri processi metabolici.

La modalità con cui tali funzioni vanno ad essere espresse non è però comune ad ogni prodotto. Infatti, le peculiarità chimiche di ogni formulato, quali ad esempio il rapporto tra superficie e volume della particella, la diversa carica superficiale, i diversi ioni che possono legarsi, la conformazione della struttura, ecc... vanno ad influenzare quella che è la capacità e il modo in cui si svolge l'azione. Questo fa sì che vi sia una grande diversità di prodotti, e che ognuno di essi sia maggiormente adatto a svolgere una funzione piuttosto che un'altra.

Una caratteristica che accomuna i nanofertilizzanti carboniosi agli altri nanofertilizzanti finora trattati è la capacità di tali prodotti di rilasciare in maniera molto graduale gli elementi a cui vanno a legarsi, facendo sì che la pianta possa acquisirli in quantità adeguate, senza generare sprechi. Tale modalità d'azione è legata sia alla capacità di formare legami estremamente stabili, impedendo alle sostanze attive di disperdersi, ma è anche da attribuire a dei fattori che riguardano le caratteristiche intrinseche della struttura. Infatti, i CNT hanno una struttura molto stabile che si distingue per essere porosa e presentare delle cavità che assumono dei valori molto importanti in volume. Questo fa sì che vada ad aumentare ancora di più il rapporto tra la superficie esposta ed il volume, facilitando la formazione di ulteriori legami. A ciò si aggiunge un ulteriore elemento, legato a quella che è la conformazione che i prodotti vanno ad assumere. Le tre configurazioni prima descritte hanno la capacità di esprimere ognuna delle differenti proprietà: ciò accentua ancor di più la polivalenza evidenziata in precedenza e rende tali prodotti ancor più importanti nello sviluppo di una nuova agricoltura, più sostenibile ed efficiente.

I nanoprodotti carboniosi sono stati studiati come fertilizzanti solo in relazione ai tre principali macronutrienti di cui le colture hanno bisogno (ossia NPK), ma la letteratura in materia è ancora estremamente limitata. Ad ogni modo, i risultati di questi studi sembrano essere molto promettenti.

Uno degli impieghi per il quale i CNT risultano essere particolarmente adatti è il trasporto di acqua, o più in generale la difesa dalle condizioni di stress. La particolare natura porosa e le diverse conformazioni che possono essere assunte si prestano infatti a facilitare il trasporto e la movimentazione dell'acqua dal terreno alla pianta, o tra gli stessi tessuti della pianta. La struttura cilindrica delle unità che compongono questi materiali infatti può essere considerata come una sorta di "canale" attraverso cui scorrono le molecole di acqua, in maniera estremamente controllata e sicura allo stesso tempo. La capacità dei nanomateriali di penetrare la parete cellulare garantisce poi

che le particelle non vadano ad essere disperse ma vadano ad essere destinate ai tessuti che poi andranno ad utilizzarle.

### ***3.7.3 Azione non legata ad elementi fertilizzanti***

In un primo momento i nanomateriali carboniosi erano stati studiati senza che fossero legati ad alcun tipo di elemento nutritivo. Infatti, tali prodotti hanno dimostrato di poter svolgere un'azione positiva nel favorire lo sviluppo della pianta anche in maniera indipendente dalla presenza di ioni o di altri elementi. Questa caratteristica unica di tale categoria di nanomateriali si esprime in diversi modi: proteggendo la pianta dagli stress idrici, attivando la trascrizione di precisi geni che ne facilitano o ne aumentano la crescita, denaturando degli enzimi che possono danneggiare le cellule, ecc... Queste azioni sono molto simili a quelle descritte in precedenza in relazione ai nanotubi di carbonio, in quanto anch'essi hanno una struttura carboniosa di base, ma ogni tipologia di prodotto ha delle diverse peculiarità che le contraddistinguono.

I principali effetti positivi si vanno a manifestare principalmente sulla crescita della pianta, sulla germinazione del seme e sulla capacità di assorbimento dell'acqua.

Per quanto riguarda la crescita delle colture, sembra che i nanomateriali carboniosi siano in grado di penetrare i tessuti molto facilmente, entrando nelle cellule e andando ad influenzare diversi processi che regolano gli equilibri della cellula stessa. Sono infatti in grado di inserirsi nella doppia elica di DNA, andando a guidare o a bloccare la trascrizione di precisi geni (favorendo ad esempio la sintesi di gibberelline e impedendo la sintesi di enzimi ossidativi). Allo stesso tempo però sono anche in grado di andare a legarsi ai lipidi di membrana, modificandone la struttura e andando ad alterare la permeabilità, facilitando o inibendo l'ingresso di altri composti che possono essere utili o dannosi. Oppure, grazie alla loro elevata carica superficiale, possono fungere da carrier per diverse molecole: possono trasportare delle molecole già presenti nel terreno che grazie alla presenza di questi nanoprodotto trovano un modo per entrare all'interno della pianta, oppure possono andare a veicolare delle sostanze già presenti all'interno dei tessuti ma che necessitano di un preciso trasportatore per poter essere veicolate.

La grande efficienza di tali nanomateriali è da ricercarsi anche nella grande facilità di movimento all'interno della pianta. È stato notato infatti come questa categoria di prodotti vada a muoversi sfruttando sia la via floematica sia la via xilematica, come anche attraverso il simplasto e l'apoplasto. Non tutti i formulati sono però in grado di spostarsi tramite tutte queste vie: ognuno, infatti, ha delle differenti caratteristiche chimico – fisiche che fanno sì che vada di volta in volta ad essere preferita una via piuttosto che un'altra. Tutto ciò ha delle ripercussioni importanti sulla modalità di applicazione e sul tipo di funzione che deve essere svolta. Ad esempio, questa diversità

fa sì che alcuni prodotti siano più efficaci se forniti alla pianta tramite applicazioni fogliari, mentre altri si rivelano più efficaci se forniti alle radici.

Alcune ricerche hanno poi messo in evidenza come i nanomateriali carboniosi vadano a penetrare all'interno della pianta in molti modi differenti: possono entrare andando a creare dei canali nella parete cellulare, andando a scinderla, andando a legarsi a dei particolari tessuti che fungono da "ancora" per facilitarne l'ingresso, oppure possono anche andare a sviluppare dei fenomeni di endocitosi. L'endocitosi è però un fenomeno piuttosto raro: è stato infatti ipotizzato che questa tipologia di trasporto, essendo molto dispendiosa, vada ad essere utilizzata esclusivamente per quelle sostanze che sono estremamente importanti per la pianta e allo stesso tempo difficili da reperire. Non è chiaro però se il nanomateriale carbonioso utilizzato in questo modo funga da carrier per alcune sostanze, che legandosi ad esso possono essere veicolate all'interno della cellula, o se invece funga da elicitore, andando ad innescare il fenomeno dell'endocitosi e agendo quindi senza legarsi a tali molecole, o se invece sia esso stesso l'oggetto di questa modalità di trasporto.

Questa categoria di prodotti è però l'unica che è stata associata a questa modalità di trasporto estremamente specifica. Ciò rappresenta un elemento di unicità che può essere oggetto di nuovi studi volti all'individuazione di nuovi trasportatori di elementi molto specifici e la cui azione deve essere estremamente mirata.

#### ***3.7.4 Criticità dei nanomateriali carboniosi***

L'azione dei nanoprodotti carboniosi è però strettamente legata alla concentrazione con cui essi stessi vanno ad essere utilizzati. Come evidenziato da Vithanage et al. (2017) nella loro review, molti studi condotti su diverse colture hanno dimostrato che anche variando in maniera estremamente ridotta la concentrazione si possono ottenere delle reazioni profondamente differenti. Molti studi hanno infatti dimostrato come le piante trattate con concentrazioni limitate di prodotto abbiano subito un miglioramento di quelli che sono i parametri d'analisi, mentre all'aumentare della concentrazione tali parametri siano andati progressivamente peggiorando.

Un altro elemento di interesse è rappresentato dal fatto che la reazione delle piante all'utilizzo di tali prodotti è molto varia. Alcune piante, infatti, si sono rivelate essere estremamente sensibili, andando ad esprimere subito delle variazioni nei parametri di interesse presi a riferimento: talune hanno reagito in maniera positiva, migliorando il proprio sviluppo, altre invece hanno subito un rallentamento della crescita o sono state danneggiate da tali applicazioni. Altre specie invece si sono rivelate essere poco sensibili all'utilizzo di tali formulati, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata.



I motivi alla base di queste notevoli differenze non sono ancora noti. Una delle ipotesi più accreditate al momento collega tali comportamenti alla presenza o meno di alcuni geni codificanti per il trasporto o l'assimilazione di tali prodotti. Infatti, la mancanza di specifici geni che codificano per il trasporto delle molecole di nanoprodotto può essere la causa di una più o meno marcata sensibilità: nel caso siano presenti, le molecole di nanofertilizzante possono essere assimilate e quindi la pianta può risentire dell'azione di tali prodotti, in maniera benefica o meno. Viceversa, nel caso in cui il prodotto non riesca ad entrare nella pianta, questa non subirà alterazioni nel suo sviluppo. Inoltre, il numero di geni coinvolti in tale processo può essere un altro elemento molto importante nella regolazione: la capacità, infatti, di produrre più trasportatori per tali nanoprodotto può determinare una diversa capacità di assorbimento, e quindi una diversa reazione della coltura.

È stato però notato come tali prodotti, aventi precise formulazioni, siano in grado di entrare all'interno della pianta senza alcun trasportatore. Questo implica che vi sia la capacità, da parte di taluni nanomateriali, di agire indipendentemente dalla presenza di geni che ne regolino l'ingresso. Questo fenomeno fa quindi supporre che non esistano solo dei geni responsabili per l'assorbimento dei nanoprodotto, ma che ne esistano alcuni che invece sono responsabili per il loro trasporto all'interno della pianta, di modo tale da non generare tossicità. Delle ricerche hanno mostrato come certi formulati siano in grado di penetrare i tessuti radicali delle colture, ma non siano poi in grado di diffondersi all'interno della pianta, andando quindi ad accumularsi in tali zone ed andando a danneggiare lo sviluppo della pianta stessa, che non risulta essere più in grado di andare ad assorbire i nutrienti e le sostanze di cui ha bisogno in quanto le proprie vie di assorbimento sono ostruite dalla presenza di tali molecole.

Un'altra ipotesi che è stata formulata per spiegare tali diversi comportamenti fa invece riferimento a quelle che sono le caratteristiche intrinseche del nanomateriale, non legandole alle peculiarità della pianta. Queste caratteristiche possono essere collegate a quelle che sono le proprietà della superficie (carica superficiale, ioni ad essa legati, presenza di gruppi funzionali, ecc...): ciò garantisce una diversa capacità di formare dei legami, il che influenza l'assorbimento della molecola stessa, come evidenziato da Villagarcia et al. (2012). In maniera simile è stato poi ipotizzato che il tipo di terreno o di sistema in cui le particelle di nanoprodotto vanno ad inserirsi possa influire sulle capacità di diffusione e di assorbimento della molecola: i nanotubi carboniosi, ad esempio, si diffondono meglio e sono di conseguenza più disponibili per le colture in un sistema in cui la loro concentrazione non è elevata, piuttosto che in un agglomerato molto ricco.

I nanomateriali carboniosi sono però legati anche ad altri fenomeni di tossicità che si manifestano nella pianta. È stato notato come in alcuni casi tali materiali fungano da carrier non solo per i nutrienti o le sostanze di cui la pianta ha bisogno, ma anche per molecole tossiche che

hanno un'elevatissima affinità con il nanoprodotta, provocandone un accumulo e riducendo l'attività della pianta stessa. In altri casi, la formazione di canali di ingresso nella cellula tramite la scissione della parete può essere seguita da una mancata rimarginazione della stessa, con conseguente morte cellulare. L'uso di questi prodotti può poi portare ad un irrigidimento della parete, con una conseguente diminuzione degli scambi e quindi un rallentamento dei metabolismi, il che inibisce lo sviluppo della pianta stessa. In altri studi è stato poi notato un aumento della concentrazione di forme tossiche dell'ossigeno dopo l'applicazione di tali materiali: ciò è stato collegato ad una possibile azione di inibizione della sintesi degli enzimi antiossidanti, ma tale relazione non è ancora stata dimostrata. È stato invece dimostrato come tali prodotti possano portare alla sintesi di tali enzimi, e tale ipotesi sembra essere in contrasto con tutto ciò.

Questo vasto spettro di azioni evidenzia come tale argomento non sia ancora molto noto, e di come richieda invece un approfondimento dati gli importanti pregi evidenziati.

## 4. Criticità legate all'utilizzo dei nanofertilizzanti

I nanofertilizzanti sono, come descritto finora, uno strumento con delle potenzialità enormi ma non ancora esplorate. Queste potenzialità si accompagnano anche ad alcuni aspetti di criticità, che sono emerse al pari dei benefici. Questi elementi negativi possono avere come soggetti:

- le piante interessate dall'operazione colturale;
- il terreno dove vanno ad essere applicati i nanoprodotti, e con esso tutti i microrganismi presenti che possono essere in simbiosi con la pianta;
- l'uomo e gli animali.

Al giorno d'oggi la ricerca si è concentrata principalmente nell'individuare quelli che sono i benefici dei nanofertilizzanti, mentre la letteratura che analizza gli aspetti negativi è ancora limitata. Ciò che però è stato chiaramente compreso è come sia necessario approcciare tale materia in maniera differente rispetto ai materiali convenzionali. Anch'essi possono infatti essere causa di tossicità per le stesse categorie di soggetti sopra elencate, ma le loro modalità d'azione e le loro caratteristiche chimiche sono talmente differenti da rendere impossibile accettare paragoni. È quindi indispensabile sviluppare una nuova metodologia ed individuare delle caratteristiche implicite dei nanomateriali che possano essere assunte come riferimento per determinare i diversi livelli di tossicità indipendentemente dall'ambiente e dalla coltura a cui vanno ad essere applicati.

Questo cambiamento nell'approccio alla materia non riguarderà esclusivamente l'ambiente accademico. Le problematiche che sono oggetto di analisi porteranno allo sviluppo di nuove tecnologie per l'applicazione di tali materiali, come evidenziato da Meng et al. (2009). Ciò può tradursi nella creazione di nuovi strumenti e macchinari che consentano di lavorare in sicurezza, come anche nella creazione di nuove tecniche agronomiche che si accompagnano all'utilizzo di tali formulati e che possono coadiuvarne l'azione. Gli elementi di criticità e i benefici possono quindi essere ugualmente importanti, in quanto possono stimolare la ricerca con la creazione di nuovi strumenti e metodi meno impattanti a livello ambientale.

### 4.1 Criticità per la pianta

I nanofertilizzanti rappresentano quindi una grandissima opportunità per sviluppare una nuova forma di agricoltura, più efficiente e sostenibile. Al tempo stesso però sono emerse delle importanti problematiche legate a possibili fenomeni di tossicità per le colture, il che porterebbe automaticamente a vanificare gli sforzi fatti per creare tali prodotti.

Le condizioni di stress possono manifestarsi sotto forma di fenomeni di fitotossicità e genotossicità. La fitotossicità si manifesta quando un determinato fattore va ad alterare gli equilibri interni alla pianta, determinandone uno sviluppo stentato o provocandone, in casi più gravi, la morte. La genotossicità invece è un fenomeno che si manifesta quando la regolazione genica va ad essere alterata, danneggiando la coltura. È stato dimostrato come molti nanofertilizzanti possano andare a generare tali squilibri, anche se spesso le cause di ciò non sono ancora state individuate.

Tali fenomeni di tossicità sono molteplici e si manifestano in modalità differenti tra loro, in maniera peculiare per ogni singola specie. Sono influenzati da una moltitudine di fattori, tra cui i più importanti sono:

- il dosaggio somministrato;
- la dimensione della particella;
- la tipologia di nanomateriale e di coltura;
- la tipologia di terreno.

L'utilizzo di dosaggi inadeguati è uno dei principali fattori che generano tossicità non solo in relazione ai nanofertilizzanti, ma in relazione ad ogni aspetto biochimico naturale. La scarsità di un particolare nutriente, o la presenza in quantità eccessive dello stesso vanno ad alterare gli equilibri della pianta, e ciò si manifesta anche con l'utilizzo di tali nanoformulati, come evidenziato da Raskar and Laware (2014). È quindi necessario individuare i limiti accettabili da ogni singola coltura, in modo tale da garantire un adeguato bilanciamento dei suoi metabolismi. Questo fattore di tossicità è quello che al momento risulta avere una letteratura più approfondita, in quanto è uno degli elementi più facili da valutare, ma non è ancora sviluppato in maniera sufficiente. In particolare, una delle principali lacune è rappresentata dal fatto che le sperimentazioni fin qui effettuate si basano su esperimenti in vitro, o in alcuni casi più rari su terreni artificiali. Queste sperimentazioni sono utili per avere un'indicazione generica su quello che è il comportamento della pianta, ma non sono adeguati per individuare i reali dosaggi che causano tossicità: tali valutazioni devono essere necessariamente sviluppate dopo una sperimentazione in campo, dove sono presenti i microrganismi che agiscono coadiuvando la pianta andando ad modificare l'azione del nanofertilizzante stesso.

La dimensione delle particelle è un altro fattore di tossicità. Innanzitutto, ogni singola coltura ha una diversa capacità di assorbimento delle sostanze, legata anche alla diversa dimensione delle stesse, e questo determina a priori lo sviluppo di comportamenti differenti. È stato però evidenziato come fornendo a piante della stessa specie uno stesso nanofertilizzante in due formulati aventi dimensioni differenti gli sviluppi della coltura possano essere opposti (stando che le particelle vengano effettivamente assorbite). Una prima ipotesi per spiegare tale fenomeno è stata individuata nella diversa capacità delle molecole di legarsi ai tessuti o alle altre strutture della cellula. I siti di legame hanno infatti ognuno la propria peculiarità, facendo sì che vada ad essere operata una diversa selezione su base sterica delle molecole, inducendo una diversa risposta. È stato però anche ipotizzato che tali molecole possano andare ad ostruire le vie attraverso le quali sono regolati gli scambi della pianta, impedendo alla cellula di mantenere attivi i propri metabolismi e

quindi danneggiandola. Queste ipotesi però non sono ancora state dimostrate, in quanto ogni singola specie ha limiti sterici differenti e ciò rende estremamente difficile effettuare delle valutazioni.

Un altro elemento che può causare tossicità è legato alla non compatibilità tra la pianta e il nanofertilizzante. In alcuni casi, infatti, la pianta può non possedere i geni che codificano per l'assorbimento o il trasporto del prodotto, il che può portare all'ostruzione delle vie linfatiche o ad un accumulo di molecole che altera l'equilibrio osmotico. Non abbiamo però al momento attuale dei riferimenti che indichino quali sono gli elementi che causano tossicità in ogni singola specie, il che costringe i ricercatori ad operare delle valutazioni di caso in caso, con un conseguente maggior consumo di tempo e risorse.

La tipologia di terreno è infine un altro elemento che può influire su tale tipologia di processi nocivi per la pianta. I fertilizzanti infatti vanno necessariamente a modificare la propria struttura in relazione a quelle che sono le caratteristiche del terreno (pH, presenza di ioni, presenza di acqua, ecc.) il che fa sì che il formulato non esprima con assoluta corrispondenza le caratteristiche studiate durante la sperimentazione. Le molecole di prodotto possono essere soggette a disgregazione o possono invece andare a formare degli agglomerati di dimensioni maggiori, come possono cedere gli ioni o andare ad immobilizzarsi nel terreno come un fertilizzante tradizionale. Questi differenti fenomeni fanno sì che la pianta possa avere a disposizione un prodotto che non è adatto alle proprie caratteristiche, il che ne determina uno sviluppo non voluto.

I fenomeni di tossicità si manifestano a livello chimico in modalità molto differenti tra loro, a seconda del tipo di interazione tra il nanofertilizzante e la pianta. Per quanto riguarda le problematiche legate alla fitotossicità, le reazioni che sono state osservate sono molteplici e in molti casi non sono ancora state chiarite. Questa varietà di processi è al momento un grave problema, in quanto molti studi hanno evidenziato come ogni pianta risponda in un preciso modo allo stesso prodotto, ma in alcuni casi le reazioni si sono rivelate essere molto differenti le une dalle altre. Un esempio di ciò può essere individuato nello studio svolto da Mazumdar e Ahmed (2011) riguardo a dei nanofertilizzanti il cui formulato conteneva molecole di argento. In tale studio è stato evidenziato come tali nanofertilizzanti possano andare a legarsi alla parete dei vacuoli, danneggiandola e creando squilibri interni alla pianta. Altri studi che invece hanno analizzato il ruolo dell'argento nei nanofertilizzanti non hanno evidenziato criticità di questo tipo, il che sottolinea come vi sia una elevata specificità di azione difficile da individuare.

Anche per quanto riguarda la genotossicità sono state individuate diverse reazioni, ma una in particolare accomuna quasi tutte le specie prese ad esame in molti studi differenti. Tale fenomeno si manifesta tramite la formazione di forme ROS (reactive oxygen species) o tramite una non adeguata sintesi di enzimi ossidativi. Le forme ROS sono considerate essere delle molecole di difesa prodotte

dalla pianta, sia contro condizioni di stress sia, in alcuni casi, contro particolari agenti patogeni. L'accumulo di tali molecole, indotto da un'eccessiva trascrizione degli appositi geni causata dai nanofertilizzanti, fa sì che la pianta percepisca una condizione di pericolo o di squilibrio. Tale condizione non è però reale, in quanto è causata in maniera "artificiale" dall'azione dei nanoprodotto, ma induce l'attivazione di processi in risposta a tali pericoli. In questo modo vanno ad essere alterati gli equilibri, con un conseguente inutile consumo di energie e blocco dello sviluppo. Un'altra tipologia di processo chimico legata alla genotossicità è rappresentata da un errato sviluppo delle fasi di duplicazione del materiale genetico al momento della riproduzione cellulare. È stato infatti dimostrato tramite degli studi condotti da Taranath et al. (2015) come le molecole di ossido di zinco (ZnO-NPs) possano interferire durante tutte le fasi di riproduzione cellulare, creando anomalie negative a livello genico. È quindi necessario sviluppare dei prodotti che non vadano ad interagire con la trascrizione del DNA, in modo tale da garantire uno sviluppo quanto più regolare possibile.

Si può quindi sostenere che, sulla base di quelle che sono le ricerche fin qui svolte, che i nanofertilizzanti non siano di per sé dannosi per la pianta. Sono stati evidenziati alcuni casi di specifica tossicità, ma sono circoscritti ad esempi molto limitati. Ciò che manca al momento attuale e che può essere causa di tossicità in fase di sperimentazione è la letteratura e la conoscenza di quelli che sono i limiti di applicazione che possono causare tali fenomeni.

#### **4.2 Criticità per il terreno**

Come evidenziato in precedenza, l'utilizzo dei nanofertilizzanti può essere dannoso non solo per le colture, ma anche per il terreno dove esse crescono. Difatti, le interazioni che possono svilupparsi tra tali particelle e il terreno sono differenti, e non tutte positive. Sono stati studiati e sono in via di creazione dei nanofertilizzanti che hanno lo scopo di migliorare le caratteristiche di alcuni terreni, andando ad agire per liberare dei nutrienti in essi presenti ma immobilizzati, favorendo lo sviluppo di condizioni di simbiosi tra la pianta e i microrganismi, aumentando la fauna microbica, ecc... Allo stesso tempo però ci sono dei fattori che possono modificare la struttura del formulato, facendo sì che esso non possa andare ad esprimere la funzione per cui è stato creato. I principali fattori che possono danneggiare tali molecole sono:

- la salinità dei terreni;
- il pH;
- gli sbalzi termici;
- l'esposizione alla luce solare;
- la conduttività elettrica dei terreni.

I nanofertilizzanti possono risentire di tutto ciò, andando ad immobilizzarsi anch'essi come fanno certi fertilizzanti tradizionali, o andando invece ad assumere nuove conformazioni che invece sono ancor più dannose, sia per la coltura che per la fauna.

In particolare, uno degli aspetti che sembra essere più esposto ai rischi della degradazione di tali nanoformulati è l'attività enzimatica dei microrganismi, come evidenziato da Gupta e Prakash (2020). Tale attività risulta essere di fondamentale importanza per le colture: difatti, tale fauna va a fornire dei nutrienti in maniera più veloce e più specifica per quelle che sono le necessità delle piante, ed andare a danneggiare questo canale privilegiato di sostentamento sarebbe estremamente dannoso dal punto di vista agronomico.

Un altro fattore molto importante da considerare è il tempo di esposizione dei nanofertilizzanti ai fattori che possono danneggiarli: infatti, tali formulati non sono destinati ad essere degradati in un breve arco temporale, ma hanno lo scopo di garantire alla pianta una disponibilità di nutrienti più duratura e modulata. Questo fa sì che il rischio di degradazione e di denaturazione aumenti, a causa della maggior esposizione degli stessi. La valutazione di questi effetti non è stata ancora effettuata, in quanto mancano adeguate ricerche che vadano ad analizzare il comportamento di tali fertilizzanti nel terreno, come sottolineato da Ben-Moshe et al. (2013).

Infine, l'utilizzo di tali nanoprodotti può influenzare in maniera importante le relazioni che ci sono tra i diversi microrganismi presenti nel terreno, andando a danneggiare le colture in maniera indiretta: può infatti manifestarsi una diminuzione della biodiversità, lo sviluppo di una specie può essere ostacolato favorendo la crescita di un'altra e provocando lo sviluppo di squilibri, ecc... Questi aspetti spesso non sono di primario interesse nella creazione dei nanofertilizzanti, ma risultano essere molto importanti nell'arco di un lungo periodo di tempo, in quanto possono provocare delle alterazioni dell'ambiente che sono difficilmente correggibili, come evidenziato da Morales-Diaz et al. (2017).

È quindi fondamentale sviluppare un approccio che non si limiti solo ad analizzare la diretta relazione che si sviluppa tra il nanoprodotta e la coltura, ma anche con gli altri agenti che sono coinvolti nel suo sviluppo.

#### **4.3 Criticità per l'uomo**

Per quanto concerne le criticità legate al rapporto tra i nanofertilizzanti e la salute umana i quesiti sono ancora molti. Tali dubbi sono alimentati dalle profonde lacune che sono presenti ad oggi in materia, e che molti studi stanno cercando di dissipare. Le più importanti informazioni in nostro possesso riguardanti il rapporto con le particelle di dimensione "nano" possono essere dedotte da altri ambiti (quale ad esempio il campo medico), che spesso fungono da ottimo elemento

di paragone nello sviluppo di adeguati progetti di ricerca. L'utilizzo di nanomateriali è infatti molto più diffuso nella produzione di prodotti cosmetici e nella sperimentazione medica rispetto alla sperimentazione di interesse agronomico: tali informazioni sono quindi utilissime nel capire quale possa essere l'impatto di nanoparticelle aventi tali caratteristiche, utilizzate però in modo differente, come nel caso dei nanofertilizzanti.

Innanzitutto, è importante evidenziare come sia possibile entrare in contatto con i nanofertilizzanti in molti modi. Alcune modalità sono già note e possono essere ricondotte ai fenomeni di ingestione, inalazione e contatto che si possono manifestare anche con altri prodotti, come ad esempio i fitofarmaci attualmente in uso. Oppure, è possibile assumere delle particelle di nanofertilizzanti mangiando dei cibi che in precedenza sono stati trattati, come invece non accade utilizzando i fertilizzanti convenzionali. Tale fenomeno di ingestione non riguarda esclusivamente gli esseri umani, ma anche gli altri animali. È stato infatti dimostrato, grazie ad alcuni studi condotti da Fouqueray et al. (2013), come sia possibile per tali nanoparticelle essere trasmesse da alcune alghe opportunamente trattate al plankton che si nutre di esse. Tale plankton è stato poi utilizzato come nutrimento per alcuni pesci, senza però che tali molecole penetrassero i loro tessuti. In una ricerca condotta da Zhu et al. (2010) è stato invece dimostrato come fosse possibile il passaggio di nanoparticelle di Titanio da organismi di plankton (opportunamente trattati) ad individui di *Danio rerio*: tali evidenze sono in netta contrapposizione con quanto evidenziato da Fouqueray, il che va a sottolineare come sia necessario andare ad approfondire questo argomento.

Come riportato da Bimovà et al. (2020) ogni nanomateriale, e di conseguenza ogni tipologia di nanofertilizzante, esprime una diversa tossicità in funzione di diversi fattori, sia intrinseci che estrinseci alla molecola stessa. I fattori estrinseci sono principalmente legati alle condizioni dell'ambiente in cui la particella va a trovarsi, che possono causare una degradazione od una alterazione della struttura, con una conseguente differente espressione delle caratteristiche "nano". I fattori intrinseci sono invece legati sia ad elementi chimici sia fisici (dimensione della particella, forma, struttura, presenza di ioni di tipo diverso, ecc.). Come evidenziato da Name An (2019), dall'analisi di alcune nanoparticelle contenenti argento è infatti emerso come la tossicità delle stesse sia legata in primo luogo alla loro dimensione, e secondariamente alla loro forma. Ciò però è dimostrato esclusivamente per il caso in esame. Al momento attuale, infatti, non disponiamo di sufficiente letteratura per poter stabilire se tale forma di tossicità si possa manifestare secondo le stesse modalità anche in un'altra situazione, in quanto non conosciamo i principi che regolano questa tipologia di processi.

La questione più importante però è legata alla necessità di individuare i limiti dei dosaggi per l'utilizzo dei nanomateriali. Sono infatti stati dimostrati sia gli effetti positivi che quelli negativi



dei nanofertilizzanti, ed è stato dimostrato come sia possibile per l'uomo entrarne in contatto. Ciò che è ora necessario è sviluppare degli studi che individuino quelli che sono i processi che possono causare tossicità ed individuare quelle che sono le concentrazioni necessarie per innescare tali processi. È infatti indispensabile individuare un punto di equilibrio che garantisca la salute umana ed ambientale, ma che consenta al tempo stesso di utilizzare tali prodotti, in quanto essi rappresentano una delle tecnologie di maggior prospettiva nell'ottica di una miglior salvaguardia dell'ambiente stesso.

Sono stati condotti diversi studi per individuare quelli che sono i fenomeni di tossicità che si manifestano negli animali. Come per gli organismi vegetali, si possono individuare esempi di genotossicità, di fitotossicità e di citotossicità, che spesso sono legati alla produzione di forme ROS. Come per le piante, tali molecole possono andare ad interagire con il DNA e la sua trascrizione, causando la morte delle cellule per apoptosi o per necrosi a causa dell'incapacità di produrre le proteine necessarie (Li et al., 2012). Quest'azione si manifesta a causa della formazione di radicali idrossilici che vanno a legarsi alla doppia elica di DNA, ossidando precisi gruppi funzionali ad essa legati ed alterandone in questo modo la struttura. Un'altra caratteristica che rappresenta un elemento di potenziale tossicità è l'elevata capacità di formare dei legami da parte dei nanofertilizzanti, in funzione del loro rapporto tra superficie e volume. Questo può far sì che tali molecole si vadano ad inserire nella parete cellulare, alterandone la permeabilità o impedendo lo sviluppo di flussi di materia adeguati, e di conseguenza alterando gli equilibri interni alla cellula stessa. Un esempio di tale azione può essere individuato nell'azione del grafene: come riportato da Bimovà et al. (2020), tali molecole hanno un'elevatissima capacità di legarsi ai lipidi di membrana, causando citotossicità. Tali processi possono portare all'insorgere di diverse patologie, quali bronchite, cancro, morbo di Parkinson, morbo di Crohn, artrite reumatoide, malattie del cuore, ecc. , come evidenziato da Thomas et al. (2012). È quindi importante cercare di prevenire quanto più possibile il contatto con le nanoparticelle fin qui descritte.

Sulla base di quanto evidenziato finora è quindi possibile affermare che i nanofertilizzanti rappresentano, al momento attuale, una fonte di potenziale tossicità molto importante. È quindi necessario andare a svolgere delle opportune ricerche per approfondire tali aspetti, cercando di individuare dei valori che consentano di utilizzare in maniera sicura tali prodotti.

## **5. Assenza dei prodotti in commercio e prospettive future**

Quanto descritto finora evidenzia come i nanofertilizzanti siano dei prodotti che hanno enormi potenzialità in ambito agricolo, in quanto sono in grado di aumentare le rese sia a livello qualitativo che a livello quantitativo. La conoscenza di tali prodotti è però ancora limitata, e la ricerca si trova ancora in fase embrionale, per questo molti punti non sono ancora noti o non sono stati ancora analizzati, il che ne limita in maniera importante la diffusione. Al giorno d'oggi, infatti, sono stati brevettate diverse centinaia di nanofertilizzanti, ma i prodotti effettivamente immessi in commercio sono solo poche unità, e spesso in quantitativi esigui. Non è quindi attualmente possibile andare a sviluppare una nuova forma di agricoltura che vada a sostituire i prodotti tradizionali, in quanto nel mercato vi è una totale assenza di nanofertilizzanti adatti a sostituirli, come evidenziato da Pandey et al. (2021). Infatti, la maggior parte di questi prodotti sono stati messi in commercio dalle aziende con scopo di ricerca, sia per andare ad analizzare la reale efficienza del prodotto stesso sia per andare a verificare quelle che sono le esigenze e le criticità dei sistemi di produzione, per essere poi pronti ad una distribuzione su larga scala. Ad oggi non si può quindi sostenere che vi sia una reale disponibilità di nanofertilizzanti con finalità produttive.

### ***5.1 Cause dell'assenza dei prodotti in commercio***

Come detto, a livello globale sono state registrate diverse centinaia di prodotti differenti, ma pochissimi sono effettivamente disponibili in commercio. Tale quota è talmente esigua che non può essere nemmeno presa in considerazione per sviluppare delle ricerche o dei confronti tra i vari prodotti, in quanto il campione è troppo piccolo per essere rappresentativo. La ragione di questa totale assenza di nanofertilizzanti atti agli utilizzi produttivi è da ricondurre a molteplici cause, tra cui le principali sono:

- una sostanziale insufficiente sperimentazione che non consente di sviluppare dei prodotti sicuri e sostenibili a livello ambientale;
- la mancata convenienza nella commercializzazione da parte delle aziende produttrici;
- una sostanziale carenza in materia legislativa nella maggior parte dei Paesi che permetta alle case produttrici di avere delle indicazioni su quelli che sono i limiti e le caratteristiche a cui devono rispondere i prodotti, di modo tale da poter poi avviare la produzione e la distribuzione.

Negli ultimi anni il progresso della ricerca ha evidenziato come tali prodotti siano destinati ad avere un ruolo sempre più importante in futuro, ma al momento questa evidenza non è stata seguita da effettivi cambiamenti nel mercato, in quanto le criticità sopra citate risultano essere tutt'ora troppo importanti e non superate.

## ***5.2 Mancanza di letteratura riguardante i nanomateriali***

Molte review prodotte negli ultimi anni hanno come obiettivo quello di mettere ordine nella letteratura che tratta i nanomateriali, tra cui anche quelli di interesse agricolo, come i nanofertilizzanti e i nanofitofarmaci. Tale necessità è emersa in quanto tale argomento sta assumendo un'importanza sempre maggiore, ma non sono ancora state individuate dei principi o degli elementi di distinzione che permettano di distinguere tra le varie tipologie di prodotti. Non sono quindi disponibili delle distinzioni né all'interno della stessa categoria (ad esempio, tra i diversi nanofertilizzanti), né sulla base di quelli che sono gli elementi chimici che li compongono. Questo fa sì che sia estremamente difficile avere accesso alle poche informazioni disponibili, ostacolando lo sviluppo della ricerca.

Come evidenziato dal rapporto della FAO e della World Health Organization (WHO) (2013), la letteratura che riguarda i nanofertilizzanti utilizzati in ambito agricolo è estremamente ridotta. I risultati degli esperimenti finora svolti hanno sì mostrato delle grandi potenzialità, ma allo stesso tempo sono emerse delle criticità legate a possibili tossicità verso le stesse colture, l'ambiente ed il terreno in cui vanno ad essere utilizzate, l'uomo e gli animali. Sono in via di sviluppo delle ricerche che hanno l'obiettivo di chiarire i motivi di tali criticità ma, come evidenziato da tali organizzazioni, non è possibile andare ad immettere in commercio dei prodotti di cui non si conoscono ancora tutte le caratteristiche.

Nello stesso documento è stato poi individuato un ulteriore punto di discussione, per il quale la letteratura è quasi totalmente assente: tale problematica messa in evidenza è legata alla possibilità che tracce dei prodotti utilizzati per la crescita delle colture possano poi essere individuati nel cibo che va ad essere consumato, con i relativi rischi per la salute del consumatore. Ad oggi solo poche decine di studi hanno trattato l'argomento (Froggett, 2011), il che è assolutamente insufficiente per garantire la sicurezza dei consumatori. Più in generale, anche la ricerca svolta per analizzare la possibile tossicità per gli animali e l'uomo è molto limitata, ma essendo i nanomateriali utilizzati non solo in ambito agricolo, ma anche in altri settori (medicina, cosmetica, ecc.) questo aspetto è stato maggiormente approfondito, seppur in maniera attualmente non sufficiente. Gli argomenti che sono stati analizzati in tali studi però non sono di interesse agronomico, quindi i paragoni che possono essere svolti devono essere di volta in volta posti in relazione a quelle che sono le necessità e le caratteristiche agronomiche. Questo da un lato favorisce lo sviluppo della ricerca, in quanto si hanno a disposizione più dati, ma essi allo stesso tempo possono risultare ambigui o possono trarre in errore, proprio a causa della non esatta corrispondenza con la materia di interesse.

Un altro aspetto di criticità evidenziato dal rapporto di FAO e WHO è legato al fatto che le ricerche fin qui condotte si sono limitate, nella maggior parte dei casi, ad analizzare le possibili tossicità legate agli elementi chimici utilizzati, non alla natura di nanomateriale del formulato.

Come detto nei capitoli precedenti le peculiarità e le potenzialità dei nanomateriali sono legate alla loro ridotta dimensione, che determina delle caratteristiche chimiche e fisiche molto diverse dai prodotti convenzionali, e solo in maniera minore alla tipologia di elemento che ad esse va a legarsi.

I tre principali aspetti da approfondire sono rappresentati da:

- diverse modalità di assorbimento da parte dei tessuti e modalità con cui i nanoprodotti vanno ad entrare nella pianta;
- la ridotta dimensione delle particelle fa sì che vi sia un'elevata superficie di contatto, il che amplifica in maniera importante sia la potenzialità del prodotto che il rischio che vi sia tossicità a quantità molto più ridotte;
- la variazione della dimensione dei materiali ha effetto non solo in relazione al materiale stesso, ma anche in funzione di quelle che sono le caratteristiche del terreno e delle eventuali impurità presenti che ne alterano la funzione.

Ad oggi non esistono molte ricerche che trattino tali argomenti. Ciò rappresenta un'importante lacuna da colmare, in quanto una tale tipologia di materiali non è mai stata analizzata in precedenza, e non disponiamo quindi di alcuna conoscenza che possa fungere da riferimento per effettuare le dovute valutazioni.

Un altro aspetto che necessita di essere approfondito è invece legato all'efficienza ed al comportamento dei nanoprodotti “*in vivo*” e non “*in vitro*”. La maggior parte degli studi finora condotti infatti si sono concentrati sull'analisi di tali materiali esclusivamente in laboratorio, senza poi verificare se i risultati ottenuti avessero un'adeguata corrispondenza in campo. I pochi studi che hanno effettuato tali confronti hanno ottenuto risultati molto differenti: alcuni hanno mostrato dei parametri simili, in altri casi invece ciò che è stato ottenuto non rifletteva ciò che i ricercatori avevano ipotizzato (Horie e Fujita, 2011). Ciò sottolinea come sia necessario approfondire tale aspetto, andando a rimuovere gli ostacoli che impediscono di svolgere un'adeguata sperimentazione “*in vivo*”.

Le lacune messe in evidenza fanno sì che al momento attuale vi sia una totale assenza di elementi di riferimento, il che obbliga gli enti di controllo, i ricercatori e le industrie stesse ad effettuare delle valutazioni caso per caso. Ciò è causa di ulteriori difficoltà sia nella sperimentazione sia nell'applicazione dei prodotti in esame, ostacolandone la diffusione.

### **5.3 Mancanza di convenienza nella produzione da parte dell'industria**

Come evidenziato in precedenza, i nanoprodotti che sono stati registrati sono diverse centinaia, ma solo pochi sono quelli effettivamente prodotti, e per di più in quantità estremamente esigue, da pochi grammi a pochi chilogrammi. I motivi di ciò sono molteplici. In primis va

sottolineato l'aspetto economico: al momento attuale nessuna azienda ha convenienza nel produrre tali nanomateriali, in quanto i margini di guadagno sono inesistenti o altamente soggetti a fattori di rischio. Al giorno d'oggi, infatti, vi sono grandi incertezze lungo tutta la filiera, a partire dalla produzione fino alla commercializzazione.

I metodi di produzione attuale possono essere ricondotti a due principali categorie, ossia i metodi di sintesi e quelli biologici. I metodi biologici, come riportato da Dimkpa e Bindraban (2018), garantiscono un minor impatto ambientale, ma al tempo stesso hanno dei tempi di produzione più lunghi e richiedono una maggiore attività di ricerca. Questo perché è necessario individuare i microrganismi e le piante che possono essere adatte alla produzione dei metaboliti di interesse, ma poi è necessario anche andare a creare dei mezzi di coltura adeguati per indurre la sintesi. Tutto ciò richiede studi molto approfonditi che possono però portare a processi di sintesi non vantaggiosi economicamente. Inoltre, tali metodi di produzione sono anche maggiormente soggetti ad un preciso fattore di rischio: è infatti possibile che il prodotto finale non risponda alle caratteristiche dei materiali "nano" (che sono attualmente ancora da definire con precisione), il che ostacola ancor di più lo sviluppo di attività di ricerca in questa direzione da parte delle aziende produttrici. Ciò è dovuto al fatto che non vi è la possibilità di controllare in maniera diretta la sintesi del nanomateriale di interesse, come invece accade per i materiali convenzionali, ma è possibile solo "guidarne" la produzione sulla base di quelle che sono le conoscenze in possesso. I metodi di sintesi, d'altro canto, non garantiscono lo stesso ridotto impatto ambientale, ma garantiscono invece una più semplice produzione, con dei tempi più ridotti e in quantità maggiori rispetto ai prodotti biologici, in quanto è necessaria una minor sperimentazione, che però al giorno d'oggi non è stata ancora sviluppata. Un altro elemento di criticità è rappresentato dal fatto che i metodi di produzione sin qui sviluppati spesso richiedono una quantità di energia molto elevata per essere attuati, il che va ad incidere ancora di più sull'impronta ambientale che possono avere tali formulati, e al tempo stesso riduce quelli che sono i margini di guadagno per l'azienda.

Un altro fattore che limita l'interesse delle case produttrici verso i nanomateriali è rappresentato dalla possibile tossicità. Nessuna azienda ha interesse nel creare un prodotto che possa poi rivelarsi dannoso, e che quindi possa condurre a contenziosi legali. Al momento attuale però, come sottolineato in precedenza, non vi è una letteratura sufficiente per eliminare tali criticità in modo tale da rassicurare le aziende sulla convenienza nella produzione. Tale mancanza costringe le aziende ad effettuare delle analisi specifiche, spesso anche molto diverse tra loro, per ogni diverso tipo di prodotto, in quanto non vi sono dei principi di riferimento che possono essere assunti come modello. Inoltre, mancano delle indicazioni legislative adeguate che stabiliscano quali siano i metodi che garantiscono la sicurezza del prodotto, i dosaggi adeguati e i corretti metodi di utilizzo.

Nonostante le aziende siano costrette ad effettuare questi approfonditi controlli per ogni singolo prodotto, le prime opinioni espresse dai consumatori finali nei confronti dei nanofertilizzanti non sono positive. Ciò è dovuto anche ad un approccio adottato dalle aziende che non coinvolge il produttore agricolo: questo conduce spesso alla diffusione delle informazioni in maniera equivoca, attribuendo un'importanza non adeguata ai pregi e ai difetti di tali prodotti. Questo fa sì che il consumatore finale sovrastimi i rischi preferendo, sulla base delle proprie conoscenze, l'utilizzo dei prodotti convenzionali di cui è più edotto.

Infine, un altro campo in cui manca letteratura è rappresentato dal rapporto tra costi e benefici della produzione per le aziende. Al giorno d'oggi, infatti, mancano degli studi di carattere economico riguardanti i diversi metodi di produzione fin qui sviluppati: non è quindi possibile definire in maniera chiara il costo di produzione di tali formulati, né è possibile effettuare dei paragoni tra essi e i prodotti tradizionali. Ciò rende difficile valutare l'effettiva convenienza data dall'utilizzo di tali prodotti. Attualmente, le prime ricerche disponibili mostrano una maggiore efficienza dei nuovi formulati, ma non effettuano alcuna valutazione di tipo economico che possa interessare sia il produttore del nanofertilizzante sia l'agricoltore che andrà ad utilizzarlo. Uno dei pochi studi condotti finora in questo ambito ha però mostrato come i nanofertilizzanti garantiscano un maggiore profitto all'agricoltore non tanto in termini di maggior resa del raccolto, ma in termini di differenza tra i guadagni e i costi sostenuti (Adhikari et al., 2014). Inoltre, i residui di questi formulati che rimangono in campo garantiscono una miglior base per lo sviluppo delle colture nell'annata successiva al loro utilizzo, il che fa sì che aumentino ulteriormente i benefici per l'utilizzatore finale. Questo aspetto però non è stato oggetto di analisi nello studio citato, e quindi non vi sono dei dati che possano valutare quello che è il guadagno complessivo legato all'utilizzo dei nanofertilizzanti.

Le aziende hanno quindi bisogno che vadano a svilupparsi degli studi sia di carattere economico sia di carattere agronomico, che vadano a fugare i dubbi relativi all'efficienza e alla tossicità di tali prodotti, individuando allo stesso tempo i migliori metodi di produzione.

#### ***5.4 Mancanza di una legislazione adeguata***

I nanomateriali sono una materia nuova sia per quanto concerne gli aspetti agronomici, chimici e fisici, ma anche quelli legislativi. Le caratteristiche talmente innovative di questi prodotti rendono necessario adottare dei riferimenti ed introdurre delle norme che siano in grado di codificarli ed inserirli in un quadro che consenta di individuarli in maniera univoca. Gli elementi di novità espressi dai nanofertilizzanti, infatti, richiedono una nuova letteratura, che sia in grado di definirli in maniera chiara e precisa. Tale letteratura è necessaria per tutelare sia il produttore, sia

l'utilizzatore, sia il consumatore. Infatti, definendo quelli che sono i limiti che individuano i nanofertilizzanti e le loro rispettive categorie si vanno ad introdurre degli elementi di riferimento indispensabili per le aziende, dei meccanismi e delle norme che tutelano l'ambientale e l'operatore, garantendo al tempo stesso la salute del consumatore.

Tuttavia, l'attuale carenza di letteratura in materia di nanomateriali rende difficile andare a proporre delle distinzioni, sia in ambito accademico sia in ambito legislativo. Ciò è dovuto al fatto che non vi sono sufficienti conoscenze per determinare in maniera univocamente accettata quelle che sono le caratteristiche a cui devono sottostare i prodotti per poter essere considerati nanomateriali, e di conseguenza per poter essere considerati nanofertilizzanti, nanofitofarmaci, ecc.

Secondo l'opinione accademica più diffusa, la definizione di nanomateriale deve consentire di ricavare in maniera chiara due precise indicazioni: la dimensione del prodotto e le caratteristiche chimiche che esso va ad esprimere. L'Unione Europea ha adottato la seguente definizione: *con "nanomateriale" s'intende un materiale naturale, derivato o fabbricato, costituito da particelle solide isolate o come particelle costituenti identificabili in aggregati o agglomerati, e in cui il 50 % o più delle particelle nella distribuzione dimensionale numerica soddisfi almeno una delle seguenti condizioni:*

*(a) una o più dimensioni esterne della particella si collocano nell'intervallo da 1 a 100 nm;*

*(b) la particella ha una forma allungata – bastoncino, fibra o tubo – e le sue due dimensioni esterne sono inferiori a 1 nm, mentre l'altra dimensione è superiore a 100 nm;*

*(c) la particella è piastriforme – e una delle dimensioni esterne è inferiore a 1 nm mentre le altre dimensioni sono superiori a 100 nm.*

*Nel determinare la distribuzione dimensionale numerica delle particelle, non è necessario prendere in considerazione quelle con almeno due dimensioni ortogonali esterne superiori a 100 μm.*

Tale definizione è stata a lungo oggetto di discussione, in quanto pone dei limiti che non sono universalmente accettati in ambito accademico in relazione alla dimensione presa in riferimento, e al tempo stesso non va a definire le caratteristiche chimiche che devono essere espresse. Ciò fa sì che i limiti nell'individuazione e nella produzione di un nanomateriale siano vaghi: questo da un lato favorisce la sperimentazione, soprattutto da parte delle aziende private, così da trarne un maggiore slancio, mentre dall'altro lato ciò fa sì che possano essere considerati nanomateriali anche dei prodotti convenzionali opportunamente lavorati per raggiungere le dimensioni indicate, senza che però essi siano frutto di sperimentazione e senza che vadano ad esprimere nuove proprietà. Infatti, come evidenziato da Kah et al. (2018), i formulati che sono stati proposti nel corso degli ultimi anni non sono altro che il frutto di una sostanziale riduzione della dimensione dei prodotti già noti in precedenza, il che non favorisce lo sviluppo della ricerca e

rischia di trasmettere dei messaggi sbagliati al consumatore, creando incomprensioni difficili da risolvere che possono minare la credibilità dei reali nanomateriali.



## 6. Sperimentazione in viticoltura

I nanomateriali rappresentano uno strumento estremamente importante in ogni aspetto dell'agricoltura, tra cui il settore vitivinicolo. I progetti di ricerca che si sono sviluppati in questo ambito però sono in numero estremamente ridotto se paragonato agli altri settori agronomici, a causa principalmente della minor diffusione di tale coltivazione e dell'uso di lavorazioni differenti, peculiari per tale produzione, che richiedono dei precisi processi di sviluppo, come evidenziato da Garde-Cedran et al. (2021). Il settore viticolo è però uno tra i più esigenti, sia per quanto riguarda la fertilizzazione sia per quanto riguarda l'utilizzo di prodotti di sintesi con funzioni di difesa contro agenti patogeni. Questo fa sì che vi siano ampi margini di miglioramento, che però ad oggi rimangono inesplorati.

In particolare, per quanto concerne l'utilizzo di nanofertilizzanti, la letteratura disponibile è estremamente limitata. Solo negli ultimi anni si sono sviluppati dei progetti che hanno analizzato tale argomento, soprattutto in relazione all'uso di nanoprodotti atti ad ottimizzare l'uso di fertilizzanti azotati. Queste ricerche però si sono sviluppate in maniera preminente per garantire alla pianta una miglior crescita andando al tempo stesso a ridurre l'utilizzo di sostanze di sintesi, e garantendo quindi un minor impatto ambientale, ma non hanno approfondito quello che è l'effetto dell'utilizzo di tali prodotti sui parametri qualitativi dell'uva. Ad oggi infatti questi studi hanno dimostrato come l'utilizzo dei nanofertilizzanti sia più efficiente rispetto all'uso dei fertilizzanti tradizionali, mettendo in evidenza come le rese siano aumentate utilizzando una minor quantità di prodotto, però si hanno poche informazioni su come sia influenzata la formazione degli aromi, su quella che sia la concentrazione di sostanze proteiche, ecc. Le informazioni in nostro possesso si concentrano maggiormente sulle caratteristiche botaniche della pianta, non su quelle di carattere tecnologico utili per la lavorazione del frutto.

Ad ogni modo, l'utilizzo di tali nanoprodotti sembra avere un impatto positivo anche sui parametri di interesse nella produzione di vino, come dimostrato da Perez-Alvarez et al. (2020). Nel loro esperimento, condotto per individuare in che modo la vite si sviluppasse a seconda dell'utilizzo di diversi nanofertilizzanti azotati paragonati ad un fertilizzante tradizionale, è stato evidenziato come il livello di N prontamente assimilabile fosse superiore nelle piante trattate con i prodotti più innovativi, anche a dosaggi molto inferiori. Nonostante questo, però, la concentrazione di N è comunque risultata essere al di sotto della dose minima per garantire lo sviluppo di una fermentazione stabile, il che obbliga a svolgere delle aggiunte in cantina.

Un altro punto di grande interesse è quello rappresentato dall'analisi delle componenti aromatiche, o dei metaboliti che sono direttamente coinvolti nella formazione degli aromi. In uno studio condotto da Gaiotti et al. (2021) su piante di Pinot grigio coltivate in vaso in condizioni semi-

controllate è stato notato come l'utilizzo di nanofertilizzanti azotati anche in questo caso migliorasse i valori di assimilazione, ma al tempo stesso non generasse alcun miglioramento in altri parametri presi a riferimento (concentrazione zuccherina, acidità titolabile, presenza di composti volatili) fondamentali invece nella costituzione del profilo aromatico del vino. È però importante sottolineare come le operazioni colturali di fertilizzazione siano state svolte in un momento antecedente alla formazione della maggior parte degli aromi e dei precursori aromatici di interesse. Ciò può spiegare perché non vi siano state variazioni riguardanti il profilo aromatico, anche se sono indispensabili ulteriori ricerche per verificare se il periodo in cui vanno ad essere svolte tali operazioni colturali possa avere un impatto sulla creazione di tali metaboliti.

Emerge chiaramente quindi come sia necessario andare a sviluppare degli ulteriori progetti di ricerca che vadano ad analizzare sia gli aspetti relativi alle rese, che gli aspetti relativi ai parametri di interesse tecnologico, sia gli aspetti relativi ai diversi metodi di utilizzo.

## 7. Conclusioni

In questa trattazione sono stati evidenziati i più importanti punti di forza dei nanofertilizzanti e sono state esposte le principali criticità che devono essere affrontate per consentire un adeguato uso diffuso di tali prodotti.

È quindi importante sottolineare nuovamente come questi prodotti innovativi siano uno dei capisaldi da cui non potrà prescindere l'agricoltura dei prossimi decenni. Il continuo aumento della popolazione non può essere sostenuto utilizzando i fertilizzanti disponibili al momento, in quanto essi non sono sufficientemente efficienti. Con l'avvento dell'agricoltura di precisione è necessario andare ad introdurre delle nuove tecniche colturali, che prevedano l'utilizzo di nuovi prodotti, quali appunto i nanofertilizzanti.

A fronte di tale evidenza non disponiamo però di una conoscenza sufficiente, che va a toccare molti aspetti differenti:

- non sono note nella loro totalità le caratteristiche chimiche dei nuovi prodotti;
- non sono totalmente note le relazioni che si possono instaurare tra le molecole di prodotto e la coltura per cui vanno ad essere utilizzate;
- non sono note le relazioni che possono formarsi tra il prodotto e l'ambiente in cui vanno ad essere utilizzate, sia con la flora che con la fauna presenti;
- non sono note le reazioni avverse che possono svilupparsi negli organismi che agiscono in simbiosi con la pianta;
- non sono attualmente noti quelli che sono gli effetti negativi che possono interessare l'uomo;
- non sono noti gli adeguati dosaggi per l'utilizzo;
- non sono noti i limiti entro cui un prodotto può essere utilizzato.

Queste importanti lacune vanno ad evidenziare in maniera importante quanto sia necessario andare ad investire su progetti di ricerca, non solo in laboratorio ma soprattutto in campo. Difatti, la maggioranza degli studi attualmente disponibili non ha affrontato alcun tipo di sperimentazione in campo, ma solo *in vitro*, sia a causa di questioni economiche che di interesse da parte delle aziende produttrici e degli enti di ricerca verso questa tematica.

Un altro ambito di ricerca che potrà attrarre ulteriori investimenti e che ampliarà lo spettro degli studi futuri è la necessità di individuare nuovi materiali che si adattino alla formulazione di nuovi nanofertilizzanti. Alcuni materiali (argille, chitosano, materiali polimerici e carboniosi) sono già conosciuti, a causa di utilizzi similari in altri ambiti (quali ad esempio l'informatica o l'ingegneria) ma non sono stati introdotti appositamente per utilizzi di carattere agronomico. Riuscire ad individuare dei materiali che fungano da carrier o che costituiscano il guscio della

molecola e che siano studiati appositamente per quelle che sono le necessità di uso agricolo può rappresentare un vantaggio molto importante, a causa di una maggiore specificità che garantisce una maggiore efficienza ed un parallelo maggior guadagno.

Tali potenzialità però, al momento, restano tali. Non sono infatti disponibili dei nanofertilizzanti in grado di sostenere il fabbisogno agricolo mondiale, e questo costringe i coltivatori a continuare ad utilizzare prodotti tradizionali, con i relativi problemi annessi. Ciò è dovuto sia a causa della mancanza di conoscenza riguardante quelli che sono i metodi di produzione dei prodotti stessi, sia a causa del fatto che tali nanofertilizzanti non riescono, al momento attuale, a garantire una stabilità e una certezza di efficienza pari a quella offerta dai prodotti tradizionali. Uno dei maggiori problemi è legato alla differente tensione superficiale che esprimono i diversi prodotti: è difficile, infatti, creare dei prodotti con una tensione adatta a garantire un lento rilascio, necessario per avere una maggior efficienza, e questo limita lo sviluppo dei prodotti stessi. Inoltre, la ricerca in tale ambito si è finora limitata quasi esclusivamente alla produzione di nanofertilizzanti a base di N, P, K, mentre molti altri elementi non sono stati ancora oggetto di analisi, nonostante possano essere di rilevante importanza per talune colture. Un altro aspetto che non è stato ancora esaminato adeguatamente è quello legato alla creazione di nanofertilizzanti volti non ad aumentare le rese delle colture, ma volte a migliorarne la qualità. Tale aspetto sembra essere di secondaria importanza, a fronte dell'obiettivo primario rappresentato dal raggiungimento di una maggior produzione necessaria per far fronte al problema del costante aumento della popolazione globale.

Un altro aspetto che richiederà un'analisi più approfondita in futuro è rappresentato dall'individuazione di quelli che sono i materiali che possono fungere da carrier per le sostanze attive e dall'individuazione della loro effettiva disponibilità, oltre che del loro impatto ambientale. È fondamentale andare a trovare dei materiali che non vadano ad impattare sull'ambiente più di quelli che sono attualmente utilizzati, ed è quindi importante effettuare tutte le necessarie ricerche. Questi studi non devono però essere volti solo ad individuare l'impronta ambientale di tali prodotti, ma devono anche andare ad analizzare quello che è il rapporto tra la pianta e il materiale stesso, per evidenziare possibili effetti positivi o negativi per la coltura. Tali formulati hanno infatti la capacità di sviluppare diverse tipologie di legami indipendentemente da quella che è la sostanza che trasportano (e che svolge effettivamente un'azione fertilizzante). Tali legami rendono ancora più complesso l'ambiente in cui tali prodotti vanno ad essere inseriti, creando delle condizioni impreviste e potenzialmente dannose, per la coltura o per l'ambiente.

Infine, due aspetti che sono strettamente legati fra loro e che hanno una rilevanza estremamente importante sono rappresentati dalla mancanza di prodotti in commercio e dall'immagine che ha l'opinione pubblica a riguardo dei nanofertilizzanti, a causa dei loro possibili

impatti negativi sulla salute umana e sull'ambiente. Ad oggi, uno dei principali motivi per cui non ci sono prodotti disponibili in commercio è rappresentato proprio dal fatto che le grandi aziende produttrici non vogliono rischiare di introdurre sul mercato dei nanofertilizzanti per i quali siano poi costrette ad affrontare cause legali o contestazioni pubbliche. A ciò si aggiunge il fatto che la ricerca che si è sviluppata finora non ha ancora fornito risposte sufficienti per fugare i dubbi riguardanti tali potenziali criticità, il che avvalorava le teorie di coloro i quali non sono favorevoli all'introduzione della tecnologia "nano" in agricoltura. Un altro ulteriore ostacolo che deve essere affrontato dalle aziende produttrici è rappresentato dalla legislazione vigente in materia, che non è chiara e non consente alle aziende di condurre delle sperimentazioni che abbiano poi la garanzia di raggiungere dei risultati accettabili in termini di legge. Ciò rallenta ulteriormente il processo di sviluppo, ma si può sostenere che la tecnologia "nano", essendo comunque di recente introduzione, non sia stata ancora sufficientemente esplorata per poter introdurre dei limiti o per fornire delle indicazioni accettabili al legislatore.

Tutte le criticità hanno quindi un punto in comune: la assoluta necessità di implementare la ricerca. Questo ambito, essendo stato finora esplorato in maniera molto marginale, offre delle opportunità incredibili che possono essere colte, ed al tempo stesso rappresentano una delle migliori soluzioni a quelli che sono i problemi ambientali che stiamo affrontando in questi anni. È quindi importante individuare quelle che sono le caratteristiche di base che legano tutti i nanomateriali, in modo tale da creare una base scientifica e giuridica che metta nelle migliori condizioni di sviluppo sia gli enti di ricerca che le aziende interessate alla produzione dei nanofertilizzanti, consentendone una semplice distribuzione che deve però salvaguardare i principi di rispetto ambientale e della salute umana. Tale processo deve essere avviato al più presto, in quanto è di primario interesse pubblico e perché lo sviluppo di queste tecnologie non può essere fermato, essendo esse stesse la miglior opportunità disponibile per fornire sostentamento a tutta la popolazione mondiale senza allo stesso tempo esercitare un effetto negativo sul terreno.

## Bibliografia

- Adhikari, T., Kundu, S., Meena, V., & Rao, A. S. (2014). Utilization of nano rock phosphate by maize (*Zea mays* L.) crop in a vertisol of Central India. *Journal of Agricultural Science and Technology. A*, 4(5A).
- Bhardwaj, S., & Kapoor, D. (2021). Fascinating regulatory mechanism of silicon for alleviating drought stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 1044-1053.
- Bimová, P., Barbieriková, Z., Grenčíková, A., Šípoš, R., Škulcová, A. B., Krivjanská, A., & Mackuľak, T. (2021). Environmental risk of nanomaterials and nanoparticles and EPR technique as an effective tool to study them—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(18), 22203-22220.
- Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S., & Nichols, E. J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 107(3), 167-175.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of applied polymer science*, 63(1), 125-132.
- Cho, M. H., No, H. K., & Prinyawiwatkul, W. (2008). Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. *Journal of food science*, 73(1), S70-S77.
- de Oliveira, R. L. L., de Mello Prado, R., Felisberto, G., & Cruz, F. J. R. (2019). Different sources of silicon by foliar spraying on the growth and gas exchange in sorghum. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(4), 948-953.
- Dimkpa, C. O., & Bindraban, P. S. (2017). Nanofertilizers: new products for the industry?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(26), 6462-6473.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., & Goldbach, H. E. (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia plantarum*, 134(1), 151-160.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., & Goldbach, H. E. (2008). Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia plantarum*, 134(1), 151-160.
- El-Ghamry, A., Mosa, A. A., Alshaal, T., & El-Ramady, H. (2018). Nanofertilizers vs. biofertilizers: new insights. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 2(2018), 51-72.
- El-Saadony, M. T., Almoshadak, A. S., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Saad, A. M., El-Tahan, A. M., ... & Helmy, A. M. (2021). Vital roles of sustainable nano-fertilizers in improving plant quality and quantity-an updated review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7349-7359.

Epstein, E. (2009). Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of applied Biology*, 155(2), 155-160.

Fellet, G., Pilotto, L., Marchiol, L., & Braidot, E. (2021). Tools for nano-enabled agriculture: fertilizers based on calcium phosphate, silicon, and chitosan nanostructures. *Agronomy*, 11(6), 1239.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (2013), State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment and risk management of nanotechnologies in the food and agriculture sectors. Technical report. ISBN: 9789241564649

Fouqueray, M., Noury, P., Dherret, L., Chaurand, P., Abbaci, K., Labille, J., ... & Garric, J. (2013). Exposure of juvenile *Danio rerio* to aged TiO<sub>2</sub> nanomaterial from sunscreen. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 3340-3350.

Froggett, S. (2011). Review of release from solids embedded or coated with nanomaterials.

Garde-Cerdán, T., Souza-da Costa, B., Rubio-Bretón, P., & Pérez-Álvarez, E. P. (2021). Nanotechnology: recent advances in viticulture and enology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(15), 6156-6166.

Hasaneen, M. N. A., Abdel-Aziz, H. M. M., & Omer, A. M. (2017). Characterization of carbon nanotubes loaded with nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers. *Am J Nano Res Appl*, 5(2), 12-18.

Holdren, J. P. (2011). The national nanotechnology initiative strategic plan report at subcommittee on nanoscale science, engineering and technology of committee on technology. National Science Technology Council (NSTC), Arlington.

Horie, M., & Fujita, K. (2011). Toxicity of metal oxides nanoparticles. In *Advances in molecular toxicology* (Vol. 5, pp. 145-178). Elsevier;

Hurst, S. J., Lytton-Jean, A. K., & Mirkin, C. A. (2006). Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical chemistry*, 78(24), 8313-8318.

Jia, Z. (2007). *Effects of silicon on plant growth, photosynthetic parameters and soluble sugar content in leaves of wheat under drought stress. Plant Nutrition and Fertilizing Science.*

Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature nanotechnology*, 13(8), 677-684.

Kottegoda, N., Munaweera, I., Madusanka, N., & Karunaratne, V. (2011). A green slow-release fertilizer composition based on urea-modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. *Current science*, 73-78.

- Kumar, D. A., Palanichamy, V., &Roopan, S. M. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 127, 168-171.
- Li, Y., Liu, Y., Fu, Y., Wei, T., Le Guyader, L., Gao, G., ... & Chen, C. (2012). The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. *Biomaterials*, 33(2), 402-411.
- Manikandan, A., & Subramanian, K.S. (2016). Evaluation of Zeolite Based Nitrogen Nanofertilizers on Maize Growth, Yield and Quality on Inceptisols and Alfisols. *International Journal of Plant and Soil Science*, 9, 1-9.
- Manivannan, A., &Ahn, Y. K. (2017). Silicon regulates potential genes involved in major physiological processes in plants to combat stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1346.
- Marchiol, L. (2012). Synthesis of metal nanoparticles in living plants. *Italian Journal of Agronomy*, 7(3), e37-e37.
- Marchiol, L., Filippi, A., Adamiano, A., Degli Esposti, L., Iafisco, M., Mattiello, A., ... &Braidot, E. (2019). Influence of hydroxyapatite nanoparticles on germination and plant metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary evidence. *Agronomy*, 9(4), 161.
- Mavridou, E., Vrochidou, E., Papakostas, G. A., Pachidis, T., &Kaburlasos, V. G. (2019). Machine vision systems in precision agriculture for crop farming. *Journal of Imaging*, 5(12), 89.
- Mazumdar, H., & Ahmed, G. U. (2011). Phytotoxicity effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. *Int J ChemTech Res*, 3(3), 1494-1500.
- Meng, H., Xia, T., George, S., & Nel, A. E. (2009). A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS nano*, 3(7), 1620-1627.
- Mollamohammada, S., Aly Hassan, A., Dahab, M., & Kumar, S. (2021). A hybrid biological-adsorption approach for the treatment of contaminated groundwater using immobilized nanoclay-algae mixtures. *Water*, 13(5), 633.
- Mondal, M. M., Malek, M. A., Puteh, A. B., Ismail, M. R., Ashrafuzzaman, M., &Naher, L. (2012). Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), 918-921.
- Nam, S. H., & An, Y. J. (2019). Size-and shape-dependent toxicity of silver nanomaterials in green alga *Chlorococcum infusum*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 168, 388-393.
- Okey-Onyesolu, C. F., Hassanisaadi, M., Bilal, M., Barani, M., Rahdar, A., Iqbal, J., &Kyzas, G. Z. (2021). Nanomaterials as nanofertilizers and nanopesticides: An overview. *ChemistrySelect*, 6(33), 8645-8663.



- Ombódi, A., & Saigusa, M. (2000). Broadcast application versus band application of polyolefin-coated fertilizer on green peppers grown on andisol. *Journal of plant nutrition*, 23(10), 1485-1493.
- Pandey, S., Giri, V. P., Tripathi, A., Bajpai, R., Sharma, D., Bahadur, L., & Mishra, A. (2021). Interaction, fate and risks associated with nanomaterials as fertilizers and pesticides. In *Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture* (pp. 229-248). Woodhead Publishing.
- Pandey, V., & Chandra, K. (2016). Agriculturally important microorganisms as biofertilizers: Commercialization and regulatory requirements in Asia. In *Agriculturally important microorganisms* (pp. 133-145). Springer, Singapore.
- Patel, H., & Krishnamurthy R. (2015) Antimicrobial efficiency of biologically synthesized nanoparticles using root extract of *Plumbago zeylanica* as bio-fertilizer application. *International Journal of Bioassays*, 4.11, 4473-4475.
- Pérez-Álvarez, E. P., Ramírez-Rodríguez, G. B., Carmona, F. J., Martínez-Vidaurre, J. M., Masciocchi, N., Guagliardi, A., ... & Delgado-López, J. M. (2021). Towards a more sustainable viticulture: foliar application of N-doped calcium phosphate nanoparticles on Tempranillo grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(4), 1307-1313.
- Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM crops & food*, 8(4), 195-208.
- Raskar, S. V., & Laware, S. L. (2014). Effect of zinc oxide nanoparticles on cytology and seed germination in onion. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 467-473.
- Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, 35(7), 583-592.
- Sangeetha, C., & Baskar, P. (2016). Zeolite and its potential uses in agriculture: A critical review. *Agricultural Reviews*, 37(2).
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I., & Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current science*, 162-170.
- Subbaiya, R., Priyanka, M., & Selvam, M. M. (2012). Formulation of green nano-fertilizer to enhance the plant growth through slow and sustained release of nitrogen. *Journal of Pharmacy Research*, 5(11), 5178-5183.
- Suriyaprabha, R., Karunakaran, G., Yuvakkumar, R., Rajendran, V., & Kannan, N. (2014). Foliar application of silica nanoparticles on the phytochemical responses of maize (*Zea mays* L.) and its toxicological behavior. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 44(8), 1128-1131.

- Taranath, T. C., Patil, B. N., Santosh, T. U., & Sharath, B. S. (2015). Cytotoxicity of zinc nanoparticles fabricated by *Justicia adhatoda* L. on root tips of *Allium cepa* L.—a model approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8611-8617.
- Thomas, S. P., Al-Mutairi, E. M., & De, S. K. (2013). Impact of nanomaterials on health and environment. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 38(3), 457-477.
- Villagarcia, H., Dervishi, E., de Silva, K., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2012). Surface chemistry of carbon nanotubes impacts the growth and expression of water channel protein in tomato plants. *Small*, 8(15), 2328-2334.
- Vithanage, M., Seneviratne, M., Ahmad, M., Sarkar, B., & Ok, Y. S. (2017). Contrasting effects of engineered carbon nanotubes on plants: a review. *Environmental geochemistry and health*, 39(6), 1421-1439.
- Yamaji, N.; Mitatni, N.; Ma, J.F.A (2008), Transporter regulating silicon distribution in rice shoots;
- Zhu, X., Chang, Y., & Chen, Y. (2010). Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78(3), 209-215.
- Gupta C., Prakash, D., 2020. Effect of nano-fertilizers on soil microflora. *Ann. Plant Sci.* 14.
- Ben-Moshe, T., Frenk, S., Dror, I., Minz, D., & Berkowitz, B. (2013). Effects of metal oxide nanoparticles on soil properties. *Chemosphere*, 90(2), 640-646.
- Morales-Díaz, A. B., Ortega-Ortíz, H., Juárez-Maldonado, A., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., & Benavides-Mendoza, A. (2017). Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(1), 013001.