UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie

ELABORATO DI LAUREA

NANOPARTICELLE DI FOSFATO DI CALCIO PER UN'AGRICOLTURA SOSTENIBILE: POTENZIALITÀ E APPLICAZIONI

Tutor: Prof. Paolo Carletti
Dipartimento di Agronomia Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Laureando: Enrico Guglielmo Secco

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

ABSTRACT

L'inquinamento ambientale rappresenta un problema sempre più diffuso e coinvolge anche il settore agricolo, il quale dovrà garantire quantità adeguate di prodotti agricoli nonostante la crescita demografica prevista. Per soddisfare ciò, diventa necessario aumentare la produttività e quindi fare un uso intensivo di fertilizzanti chimici tradizionali. Tuttavia, questi ultimi sono caratterizzati da una bassa efficienza di assorbimento da parte delle piante dei loro nutrienti e questo causa una serie di effetti ambientali negativi. L'utilizzo delle nanotecnologie rappresenta una valida alternativa per migliorare l'efficienza e la sostenibilità in agricoltura, in particolare, i nanofertilizzanti a base di fosfato di calcio arricchiti con azoto stanno suscitando crescente interesse. Questa tesi analizza le caratteristiche, il funzionamento e i vantaggi di tali materiali, presentando due esempi applicativi nella coltivazione della vite: uno sul vitigno Tempranillo nella regione de La Rioja in Spagna, e l'altro sul Pinot Grigio a Conegliano, in Italia. I risultati mostrano benefici in termini di resa e sostenibilità. Infine, si propone l'impiego di questi fertilizzanti in sinergia con i vitigni PIWI, in un'ottica di agricoltura ancora più sostenibile.

INDICE

ABSTRACT 2

INDICE 3

1 INTRODUZIONE 4

2 NANOSISTEMI 6

2.1 Nanofertilizzanti 6

3 NANOFERTILIZZANTI 7

3.1 Vantaggi derivanti dall'uso dei nanofertilizzanti 7

3.2 Sintesi di nanoparticelle per nanofertilizzanti 8

3.3 Nanofertilizzanti a base di macronutrienti 9

3.4 Nanofertilizzanti a base di micronutrienti 9

4 NANOPARTICELLE DI FOSFATO DI CALCIO 10

4.1 CaP cristallini e amorfi 10

4.2 Sintesi CaP e tecniche di addizione per macronutrienti 11

4.3 Drogaggio con Urea o solo Nitrato 12

5 USO DI NPS DI FOSFATO DI CALCIO NELLA VITE 13

5.1 Test su tempranillo 13

5.2 Test su Pinot Gris 14

6 SVANTAGGI DELL'USO DI NP 16

7 CONCLUSIONI 17

BIBLIOGRAFIA 18

1 INTRODUZIONE

In un contesto globale in rapida evoluzione, la crescente pressione sulla produzione alimentare è una sfida centrale per il futuro. Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO), la popolazione mondiale raggiungerà i 10 miliardi entro il 2050 (Usman et al., 2020). Per far fronte a questa espansione demografica sarà necessario aumentare in modo significativo la produttività agricola.

Finora, le strategie adottate per incrementare le rese si sono basate principalmente sull'impiego intensivo di fertilizzanti chimici e pesticidi. Nel 2020 si è stimato un consumo globale di circa 187 milioni di tonnellate di fertilizzanti e 4 milioni di tonnellate di pesticidi, accompagnati da un uso di circa 2,7 trilioni di metri cubi di acqua (Usman et al., 2020). Tuttavia, l'utilizzo non controllato di questi input agricoli ha causato gravi forme di inquinamento ambientale, tra cui l'eutrofizzazione delle acque, la degradazione del suolo, l'inquinamento atmosferico dovuto all'emissione di gas serra, e la contaminazione delle falde acquifere a causa dell'elevata lisciviazione (Zulfiqar et al., 2019).

A questi problemi si aggiunge la scarsa efficienza d'assorbimento dei fertilizzanti da parte delle piante. Il parametro noto come NUE (Nutrienti Use Efficiency) misura la quantità di nutrienti effettivamente assimilati dalla pianta rispetto a quelli somministrati. Ad esempio, nei fertilizzanti azotati, il NUE è spesso inferiore al 50%, mentre per quelli a base di fosfato si attesta tra il 5% e il 30% (Carmona et al., 2022).

Alla luce di queste criticità, lo sviluppo di tecnologie innovative, in particolare nel campo delle nanotecnologie, rappresenta una valida alternativa per rendere l'agricoltura più efficiente e sostenibile.

Negli ultimi anni, diverse ricerche hanno evidenziato il potenziale delle nanotecnologie in ambito agricolo, soprattutto per migliorare l'efficienza degli input e offrire soluzioni sostenibili alle problematiche ambientali, contribuendo così ad aumentare la produttività e la sicurezza alimentare (Usman et al., 2020). Questi approcci si basano sull'utilizzo di molecole con dimensioni inferiori ai 100 nm, caratterizzate da un'elevata area superficiale e da tassi più alti di solubilità e reattività rispetto ai materiali convenzionali (Carmona et al., 2022).

I nanomateriali impiegati in agricoltura possono contenere macro- o micronutrienti e, grazie alla loro maggiore area superficiale, sono in grado di veicolare quantità più elevate di nutrienti. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che tali sistemi permettono un rilascio più lento e controllato dei

nutrienti nel suolo (Carmona et al., 2021). In particolare, i nanofertilizzanti, se applicati correttamente, consentono di nutrire le piante in modo graduale ed efficiente, riducendo le perdite per lisciviazione e limitando l'inquinamento atmosferico e l'accumulo nel suolo, contribuendo così a migliorare l'efficienza d'uso dei nutrienti (NUE) (Zulfiqar et al., 2019).

In questa tesi si è scelto di concentrarsi sull'impiego di nanoparticelle a base di fosfato di calcio come nanofertilizzanti, con un focus particolare sull'applicazione in agricoltura, e in specifico sulla coltivazione della vite. Negli ultimi anni, il fosfato di calcio ha suscitato un crescente interesse nella comunità scientifica. Esso può essere sintetizzato in laboratorio principalmente in due forme: idrossiapatite nanocristallina (nAp, formula ideale $Ca_5(PO_4)_3OH$) e fosfato di calcio amorfo (ACP, $Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$) (Carmona et al., 2022).

La possibilità di ottenere queste nanoparticelle tramite sintesi artificiale rappresenta un vantaggio rispetto ai fertilizzanti convenzionali a base di fosforo, la cui produzione dipende dall'estrazione di rocce fosfatiche, una risorsa non rinnovabile. Inoltre, il fosfato di calcio possiede un elevato contenuto intrinseco di macronutrienti, in quanto fornisce sia calcio (Ca) che fosforo (P).

Diversi studi hanno dimostrato la possibilità di arricchire queste nanoparticelle con urea o nitrato come fonte di azoto (N), ottenendo ottimi risultati in termini di efficienza nutrizionale. In particolare, è stato possibile ridurre significativamente le dosi di N applicato, grazie alla capacità di queste particelle di caricare sulla propria superficie elevate quantità di composti azotati (Pérez-Álvarez et al., 2021).

Oltre all'azoto, le nanoparticelle di fosfato di calcio possono essere dopate anche con altri elementi tramite sostituzioni cationiche (Ca, K, Mg, Zn, ecc.) o anioniche (come il carbonato). Un ulteriore vantaggio risiede nella loro solubilità pH-dipendente, che consente un rilascio controllato e graduale dei nutrienti, aumentando ulteriormente l'efficienza di assorbimento da parte delle piante (Ramírez-Rodríguez et al., 2020).

2 NANOSISTEMI

I nanosistemi si riferiscono a quei materiali che vengono ingegnerizzati su scala nanometrica con l'obiettivo di sfruttare le loro proprietà fisiche e chimiche. Nel settore agroalimentare li troviamo utilizzati in 3 principali categorie: nanofertilizzanti, nanopesticidi e nanosensori. La loro applicazione sta sempre di più crescendo, insieme allo sviluppo di nuovi metodi di sintesi e produzione di diversi nanomateriali.

2.1 Nanofertilizzanti

Questo tipo di nanosistemi è stato progettato in modo da contenere nutrienti, sia macro che microelementi. Le loro diverse proprietà sono dovute dal modo in cui vengono sintetizzati, ai materiali utilizzati e dal tipo di drogaggio effettuato. Le ultime ricerche sono concentrate soprattutto sulla scelta della particella e sulla modalità di addizione di quest'ultima.

2.2 Nanopesticidi

Anche l'impiego dei pesticidi comporta rilevanti criticità ambientali, considerando che solo lo 0,1% del principio attivo applicato riesce a colpire il bersaglio prescelto, mentre la restante parte si disperde nell'ambiente, contribuendo alla contaminazione del suolo, delle acque e favorendo l'insorgenza di resistenze in insetti, funghi ed erbe infestanti (Usman et al., 2020).

L'intervento con nanopesticidi, grazie alla lenta degradazione e al rilascio controllato, garantisce un'azione prolungata contro patogeni e parassiti, riducendo in maniera significativa le dosi necessarie e il numero di applicazioni. Tuttavia, persistono preoccupazioni legate alla salute umana, in quanto le dimensioni nanometriche di queste particelle ne facilitano l'assorbimento cutaneo e la penetrazione attraverso le membrane cellulari (Usman et al., 2020).

Alla luce di questi aspetti, si rende necessario condurre ulteriori studi per valutare con maggiore precisione la sicurezza e l'impatto a lungo termine delle nanotecnologie applicate alla protezione delle colture.

2.3 Nanosensori

I biosensori sono sistemi integrati costituiti da un recettore e un trasduttore, progettati per rilevare analiti specifici di interesse. In ambito agricolo, vengono principalmente utilizzati monitorare lo stato fisiologico delle piante e per individuare composti inquinanti nel suolo. Lo sviluppo di nanobiosensori ha ulteriormente migliorato queste applicazioni, grazie alla loro elevata sensibilità, che consente di rilevare tracce di contaminanti anche a concentrazioni molto basse. Questo permette di intervenire tempestivamente nella gestione delle colture, ottimizzando l'uso di acqua, fertilizzanti e

pesticidi, e prevenendo l'accumulo di sostanze nocive nel suolo e la loro potenziale migrazione nelle acque sotterranee (Usman et al., 2020).

3 NANOFERTILIZZANTI

3.1 Vantaggi derivanti dall'uso dei nanofertilizzanti

L'uso dei nanofertilizzanti comporta numerosi vantaggi. Le loro dimensioni ridotte e il grande rapporto superficie/volume consentono una maggiore reattività: infatti, avendo più superficie esposta, offrono più siti attivi per reazioni di vario tipo, comprese quelle con acqua e suolo. Questa elevata superficie permette anche una maggiore solubilità, e quindi una disponibilità più facile dei nutrienti per la pianta. Inoltre, il fatto che siano rivestiti da nanomateriali consente un rilascio lento e controllato, con un assorbimento graduale rispetto ai fertilizzanti classici. Risultano quindi più disponibili nel tempo e molto più longevi, fino a 40–50 giorni, rispetto ai 4–10 giorni dei fertilizzanti convenzionali.

Una superficie maggiore significa anche più spazio per addizionare nutrienti esogeni, selezionati in base alle esigenze della pianta, migliorando ulteriormente la velocità di crescita e la sostenibilità della coltivazione (Zulfiqar et al., 2019).

Oltre a questi vantaggi, sono emersi anche benefici generali per il suolo e l'ambiente, come il potenziamento di alcuni processi geochimici (per esempio il ciclo dell'azoto e in particolare la nitrificazione), un miglioramento dell'attività microbica e una maggiore induzione di microrganismi benefici (fig. 1) (Kalwani et al., 2022).

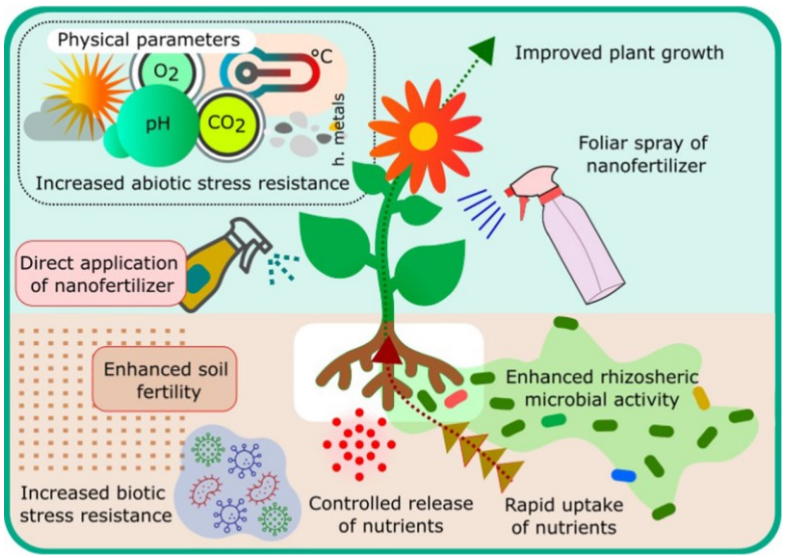


Fig. 1. Effetti positivi dell'uso dei nanofertilizzanti sulla pianta, sull'attività microbica e sul suolo (Kalwani et al., 2022).

Studi più specifici su determinate specie hanno evidenziato altri aspetti interessanti: ad esempio, l'uso di nanoparticelle di Fe_2O_3 ha ridotto le emissioni di CO_2 fino al 30%, grazie alla capacità di sequestrare carbonio organico e ridurre quindi la liberazione di sostanze climalteranti (Usman et al., 2020).

Un altro studio ha valutato l'efficacia di un nanofertilizzante a base di calcio (LITHOVIT®) in condizioni di stress salino, dimostrando che è risultato più efficace rispetto ad altri trattamenti, sia in termini di numero di frutti che di resa produttiva. Benefici sono stati osservati anche con l'applicazione di alte dosi di nanoparticelle di silice (SiO_2-NPs) su ciliegio canino (*Prunus mahaleb*) in condizioni di siccità.

Quindi stanno emergendo molti altri vantaggi anche per quanto riguarda le condizioni di stress delle piante (Zulfiqar et al., 2019).

3.2 Sintesi di nanoparticelle per nanofertilizzanti

La sintesi delle nanoparticelle per i nanofertilizzanti può avvenire secondo tre approcci principali: top-down (approccio fisico), bottom-up (approccio chimico) e biosintesi (approccio biologico) (Fig. 2).

L'approccio top-down consiste nella riduzione di materiali sfusi di dimensioni maggiori fino a raggiungere la scala nanometrica (inferiore a 100 nm), tramite una serie di processi meccanici di macinazione. Questo metodo consente una sintesi rapida delle nanoparticelle, ma presenta due principali limitazioni: la possibile contaminazione da impurità metalliche provenienti dagli strumenti di macinazione e il limitato controllo sulla dimensione finale delle particelle.

L'approccio bottom-up, al contrario, parte da unità più piccole come atomi o molecole, che vengono assemblate tramite reazioni chimiche per formare nanoparticelle. Essendo un metodo chimico, permette un migliore controllo sulle dimensioni e una minore probabilità di contaminazione rispetto al metodo fisico. Tuttavia, l'utilizzo di reagenti potenzialmente tossici rappresenta un importante svantaggio.

Infine, l'approccio biologico o di biosintesi utilizza materiali naturali come estratti vegetali, funghi o batteri. Questo metodo è considerato il più ecocompatibile, in quanto richiede condizioni di reazione più miti, ha bassa tossicità ed è spesso più economico. Tuttavia, la sintesi risulta generalmente più lenta e con rendimento inferiore rispetto agli altri approcci (Zulfiqar et al., 2019).

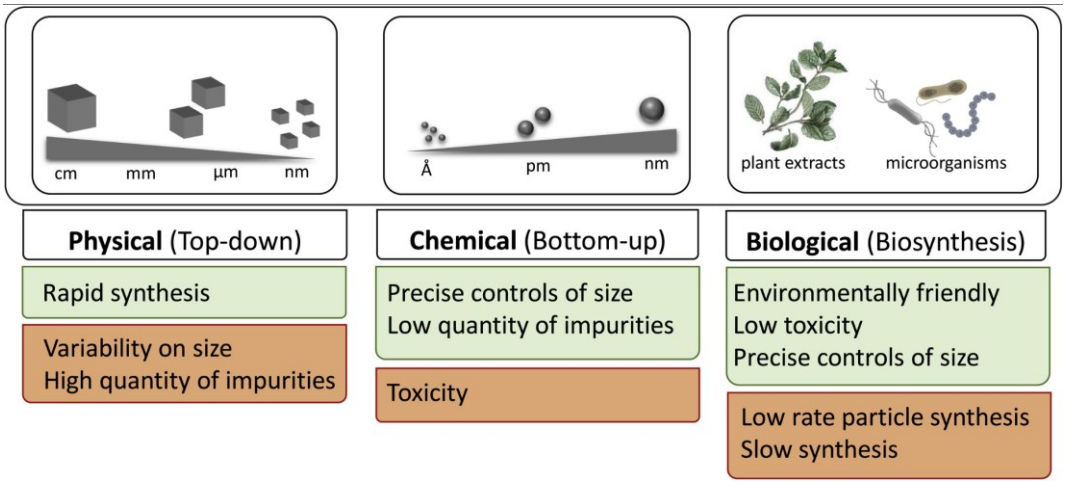


Fig. 2. Principali metodi di sintesi delle nanoparticelle per nanofertilizzanti con relativi vantaggi (verde) e svantaggi (marrone) (Zulfiqar et al., 2019).

3.3 Nanofertilizzanti a base di macronutrienti

I nanofertilizzanti possono venire sintetizzati con nanomateriali combinati a macronutrienti per le piante; tra i principali troviamo azoto (N), fosforo (P), potassio (K), magnesio (Mg) e calcio (Ca). Negli ultimi anni diversi studi hanno riportato risultati positivi nell'utilizzo di questi prodotti.

Per esempio, uno studio condotto sulla soia (*Glycine max*) ha dimostrato che l'uso di NPs (nanoparticelle) di idrossiapatite ricca in fosforo e calcio ha portato a un aumento del tasso di crescita, della resa dei semi e della produzione di biomassa epigea e ipogea, rispettivamente del 33%, 20%, 18% e 41%.

Un altro esempio è quello sul fagiolo dell'occhio (*Vigna unguiculata*), dove è stata testata l'applicazione fogliare di Mg-NPs a 0,5 g L^{-1}: il trattamento ha aumentato del 7% il peso di 1000 semi (da 216 g a 232 g) e ha migliorato l'efficienza fotosintetica (Liu e Lan, 2015).

3.4 Nanofertilizzanti a base di micronutrienti

Oltre ai macronutrienti, i nanomateriali possono essere combinati anche con micronutrienti essenziali per le piante, come ferro (Fe), manganese (Mn), zinco (Zn), rame (Cu) e molibdeno (Mo). Questi elementi, pur richiesti in quantità minime, sono fondamentali per la crescita vegetale, come si può osservare dalla loro presenza, anche se limitata, nella composizione di diversi terreni agricoli. Essendo necessari in dosi molto basse, presentano un basso rischio ecotossicologico; tuttavia, la loro carenza è abbastanza comune, specialmente in suoli con elevata umidità o pH alcalino. Per questo motivo è importante riuscire a veicolarli in modo efficace all'interno della pianta.

In uno studio, l'applicazione di Mn-NPs a una concentrazione di 0,05 mg L^{-1} su fagiolo mungo (*Vigna radiata*) ha portato a un aumento del 52% nella lunghezza delle radici e del 38% nella lunghezza dei germogli. È stato inoltre osservato un incremento del 71% nel numero di radichette, mentre la biomassa fresca è aumentata del 38% e quella secca del 100%.

Anche l'utilizzo di ZnO-NPs alle dosi di 400 e 800 mg kg^{-1} su cetriolo (*Cucumis sativus*) ha dato risultati molto positivi: i contenuti di amido sono aumentati rispettivamente di 1,1 e 1,6 volte rispetto al controllo, così come la massa secca. Inoltre, nessun parametro di crescita è stato influenzato negativamente da questo trattamento (Liu and Lal, 2015).

4 NANOPARTICELLE DI FOSFATO DI CALCIO

Diversi studi stanno riportando gli ottimi risultati ottenuti con l'utilizzo delle nanoparticelle di fosfato di calcio (CaP) come nanofertilizzanti. Esistono diverse forme cristalline e amorfe di questi materiali, ognuna delle quali si distingue per grado di idratazione, livello di protonazione del fosfato, stabilità al pH, solubilità e rapporto Ca/P, che può variare da 0,5 fino a 2.

Tra queste, le due forme più impiegate in ambito agricolo sono l'idrossiapatite nanocristallina (nAp), attualmente la più utilizzata, e il fosfato di calcio amorfo (ACP), che negli ultimi anni ha suscitato crescente interesse per i suoi vantaggi funzionali in diverse applicazioni agronomiche. (Carmona et al., 2021)

4.1 CaP cristallini e amorfi

Entrambe le forme si possono trovare in sistemi biologici, soprattutto nello smalto dentale, ma per la produzione di nanofertilizzanti vengono sintetizzate in laboratorio. L'ACP è altamente disordinato e, in soluzione acquosa, tende a trasformarsi in altri fosfati di calcio, come l'apatite non stechiometrica. Per evitare questa reazione e perdere i vantaggi derivati dal CaP amorfo, si possono aggiungere ioni carbonato o citrato, oppure controllare il pH della soluzione preferendolo leggermente acido o neutro.

Queste 2 varianti presentano numerosi vantaggi: dal momento che sono presenti in sistemi biologici, non presentano problemi di ecotossicità; sono ricche di macronutrienti come fosforo e calcio; grazie alle dimensioni nanometriche, offrono un'elevata superficie disponibile per l'addizione di ulteriori nutrienti; infine, la loro solubilità è pH-dipendente e questo consente la regolazione del rilascio nel suolo.

È stata dimostrata l'efficacia della nAp in un esperimento fatto su girasole (*Helianthus annuus*), il quale è stato coltivato in un terreno carente di fosforo, confrontando nAp, un fertilizzante convenzionale (triple superphosphate, TSP)

e una roccia fosfatica ricca di apatite stechiometrica macroscopica. I risultati dello studio hanno dimostrato che l'applicazione di nAp ha aumentato di molto la concentrazione di fosforo nei tessuti e nei germogli e di conseguenza ha favorito una crescita più marcata nelle piante trattate con nanoidrossiapatite (Carmona et al., 2022).

Un'analisi più approfondita degli ACP ha riportato che, rispetto alla loro forma cristallina, essi possiedono una maggiore reattività superficiale e quindi una migliore capacità di assorbire i nutrienti addizionati. Inoltre, la loro solubilità rispetto alle controparti cristalline è superiore, in quanto essendo privo di struttura ordinata, i legami chimici sono meno stabili e più facilmente rompibili (Carmona et al., 2021).

Nel caso del grano duro (*Triticum durum*), l'impiego di ACP addizionato con azoto ha permesso di ottenere piante con caratteristiche simili (numero di germogli, peso della spiga e della pianta) rispetto a quelle trattate con il fertilizzante tradizionale ovvero il DAP (Diammonium Phosphate), ma con il vantaggio di aver utilizzato il 50% in meno di quest'ultimo. Inoltre, le proprietà qualitative legate alla produzione di farina, semola e derivati della pasta, come la percentuale di proteine presenti e la quantità di chicchi duri e vitrei, sono state considerate di elevata qualità (Carmona et al., 2022).

4.2 Sintesi CaP e tecniche di addizione per macronutrienti

L'addizione di N sotto forma di urea o nitrato appare la scelta migliore per garantire una certa sostenibilità nel mondo della agricoltura. La sintesi di nanofertilizzanti a base di CaP prevede la miscelazione di 2 soluzioni. Per andare ad introdurre l'azoto si possono modificare 2 reagenti delle soluzioni ovvero scambiare il CaCl2 con il $Ca(NO_3)$ in una delle due soluzioni e aggiungere il KNO_3 nell'altra; inoltre, per aumentare definitivamente l'efficienza oltre agli ioni nitrato si può introdurre anche l'urea (Ramírez-Rodríguez et al., 2020). Di norma, la fase di drogaggio avviene successivamente alla precipitazione delle NPs ed è seguita da un lavaggio. Questa tecnica viene detta one-pot e permette una moderata veicolazione di N tramite urea, a causa di perdite dovute alla fase di lavaggio che, oltre ad eliminare i reagenti rimasti dalla reazione, si porta via anche l'azoto aggiunto in seguito, lasciando le NPs a una concentrazione di N del 2,8%. Carmona (et al., 2021) ha progettato un diverso sistema per veicolare i macronutrienti. A differenza del one-pot, con il nuovo metodo PSM l'arricchimento con i macronutrienti avviene a seguito del lavaggio e quindi non si rischia di eliminare i nutrienti di interesse (Fig.3). Questo esperimento ha riportato dati interessanti: infatti, l'addizione PSM ha consentito la sintesi di NPs con un contenuto di N del 6,4%, utilizzando la stessa quantità di nitrato e 60 volte in meno quella di urea rispetto alla veicolazione one-pot (Carmona et al., 2021).

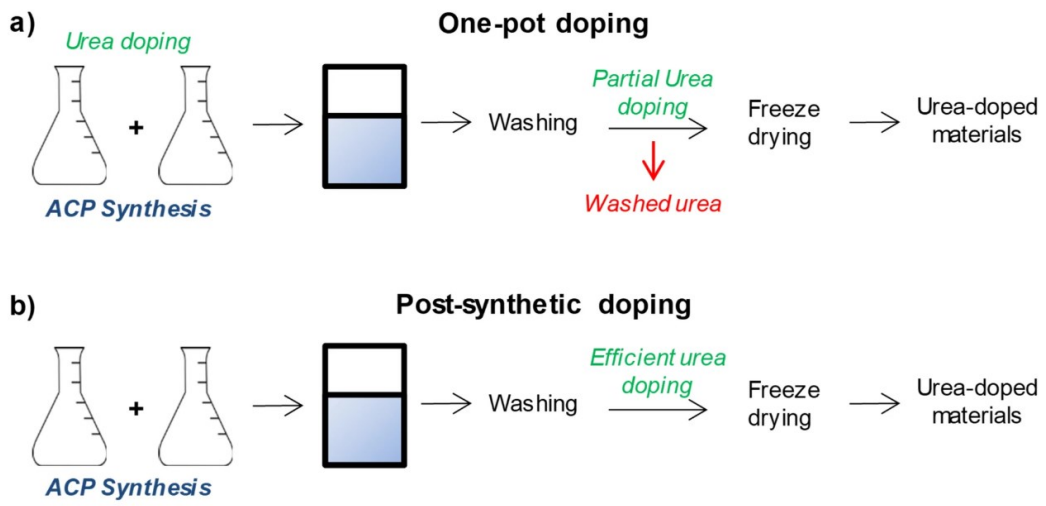


Fig. 3. L'immagine sintetizza le 2 tecniche principali per ottenere nanofertilizzanti con aggiunta di fonti di N. Si può notare che nel one-pot parte dell'urea addizionata viene persa in seguito al lavaggio.

Altri ottimi risultati sono stati ottenuti nella sintesi di questi nanofertilizzanti con reagenti TG (Technical Grade, quindi a basso costo e meno puri dei classici reagenti) e acqua di rubinetto. Questi nuovi prodotti detti TG-Nano-U-ACP, nonostante la bassa purezza, forniscono un'efficienza di drogaggio e di rilascio dei nutrienti uguali alle loro varianti comuni di nano-U-ACP (Carmona et al., 2021).

4.3 Drogaggio con Urea o solo Nitrato

Ulteriori differenze avvengono sulla scelta della fonte di azoto da addizionare: nitrato da solo o anche con l'urea. Sono state studiate entrambe le loro cinetiche di rilascio di elemento azotato, in particolare, per quella del nitrato si sono utilizzati saggi colorimetrici ed è emerso che la quantità massima di N contenuta nelle NPs, si verifica dopo 24 ore e da lì in poi avviene un rapido calo, cosa che accade nello stesso modo con l'urea. Questo si spiega perchè la maturazione dell'ACP in fase ordinata, che avviene con il passare del tempo, comporta una minore capacità di assorbimento dei nutrienti inseriti nelle NPs. Inoltre, si è confrontata la velocità di cessione dei macronutrienti in soluzione acquosa con e senza aggiunta di nitrato, ed è emerso che la cinetica di dissoluzione non varia: rimane del primo ordine. Un'altra importante comparazione di velocità di rilascio è stata effettuata confrontando l'emissione di urea da parte dei nanoU (nanofertilizzanti caricati di urea) con i fertilizzanti classici (Cry-U), e i risultati mostrano che nella prima ora, per i nanoU, la cinetica è di 10 volte minore rispetto a quella dei fertilizzanti tradizionali, mentre quella totale è ridotta di 5 volte: kCry-U = 1,99 h^{-1}, knano-U = 0,38 h^{-1} (Ramírez-Rodríguez et al., 2020).

Infine, si è notato che l'efficienza della veicolazione di nitrato o urea è differente: infatti, per il primo, nonostante i metodi PSM, rimane bassa al 3,42%, mentre per la seconda abbiamo già visto un'efficienza intorno al 6,4% (Carmona et al., 2021).

5 USO DI NPs DI FOSFATO DI CALCIO NELLA VITE

5.1 Test su tempranillo

Il test è stato condotto in campo nel 2017 da Pérez-Álvarez et al. (2021), su un vigneto commerciale di Tempranillo (*Vitis vinifera*) innestato su portainnesto 110-Richter, situato nella valle di Najerilla, nella regione vitivinicola della Rioja. Sono stati utilizzati, mediante applicazione fogliare, tre differenti fertilizzanti a base di urea, dal momento che questa procedura migliora la concentrazione di YAN (azoto assimilabile dai lieviti) e di amminoacidi benefici nell'uva.

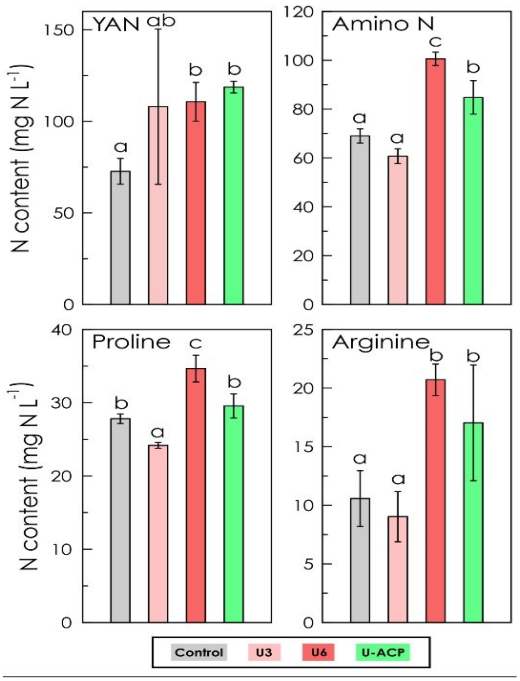
Due di questi fertilizzanti sono composti dal composto azotato commerciale a diverse concentrazioni: la minore, di 3 kg N ha^{-1} $anno^{-1}$, e l'altra, di 6 kg N ha^{-1} $anno^{-1}$, denominate rispettivamente U3 e U6.

Il terzo prodotto era un nano U-ACP con una dose di 0,4 kg N ha^{-1} $anno^{-1}$, sintetizzato con un metodo green utilizzando 500 ml di H_2O, addizionata con 0,2 mol L^{-1} di $Ca(NO_3)_2$, 0,2 mol L^{-1} di Na_3Cit e 40 g di urea, poi mescolata con un'altra soluzione di volume identico contenente 0,12 mol L^{-1} di K_2HPO_4 e 0,1 mol L^{-1} di Na_2CO_3. Il composto ottenuto è stato lavato, centrifugato e infine liofilizzato. Sono stati effettuati controlli di qualità sulla composizione chimica del nanofertilizzante tramite spettrometria di emissione ottica con plasma accoppiato induttivamente (ICP-OES), con esiti positivi: la quantità di N misurata era di 20 g di urea per kg.

Infine, è stato impiegato anche un controllo con una soluzione acquosa di Tween© 80 (Sigma-Aldrich), un agente umettante.

Una volta che le uve hanno raggiunto la maturità tecnologica ottimale, sono state raccolte, diraspate e pigiate per produrre il mosto. Sono state prelevate aliquote di quest'ultimo e conservate a -20 °C fino al momento delle analisi. Tra i parametri valutati sono state determinate la concentrazione di amminoacidi e di YAN (Yeast Assimilable Nitrogen), fondamentali per la qualità del vino. Le misurazioni sono state effettuate tramite HPLC in fase inversa con rivelatori FLD e DAD. I risultati sono stati promettenti: le quantità di YAN erano superiori nei trattamenti con U6 e nano U-ACP, mentre per la concentrazione di amminoacidi la massima è stata riscontrata in U6, con una buona quantità anche nel nano U-ACP, nonostante quest'ultimo contenesse una quantità di N 7,5 volte inferiore a U3 (fig. 4).

Fig.4. Le diverse concentrazione di YAN , amminoacidi totali e i 2 principali per la qualità dell'acino d'uva, ottenute con le 4 applicazioni.



La presenza di determinati amminoacidi nelle piante trattate con nanofertilizzanti (fig. 4; Tabella 1) è sempre maggiore rispetto a quelle trattate con una dose 7,5 volte superiore di urea, e molto simile a quelle con una fonte azotata 15 volte più concentrata (Pérez-Álvarez et al 2021).

	Control	U3	U6	U-ACP
Aspartic acid	0.90 ± 0.08 a	0.93 ± 0.02 a	1.06 ± 0.05 a	1.33 ± 0.04 b
Asparagine	0.07 ± 0.01 a	0.03 ± 0.00 a	0.18 ± 0.02 b	0.17 ± 0.03 b
Serine	1.80 ± 0.04 a	1.68 ± 0.00 a	2.58 ± 0.09 c	2.27 ± 0.07 b
Glutamine	10.72 ± 0.48 a	9.24 ± 0.26 a	16.90 ± 0.48 c	13.96 ± 0.94 b
Histidine	1.10 ± 0.11 ab	0.82 ± 0.02 a	2.05 ± 0.11 c	1.32 ± 0.20 b
Glycine	0.11 ± 0.01 ab	0.07 ± 0.00 a	0.20 ± 0.02 c	0.13 ± 0.02 b
Citrulline	0.65 ± 0.05 a	0.63 ± 0.00 a	1.09 ± 0.05 b	0.66 ± 0.03 a
Alanine	2.56 ± 0.06 a	2.43 ± 0.04 a	3.76 ± 0.03 b	3.40 ± 0.21 b
GABA	5.83 ± 0.25 a	5.15 ± 0.11 a	8.23 ± 0.69 b	5.83 ± 0.31 a
Lysine	0.93 ± 0.06 b	0.70 ± 0.02 a	1.11 ± 0.07 c	0.90 ± 0.01 b

Tab 1. Concentrazioni di vari amminoacidi con i 4 trattamenti.

5.2 Test su Pinot Gris

A distanza di poco tempo dal precedente studio sulla vite, ne è stato eseguito un altro nella stagione nelle annate 2019 e 2020 presso il Centro di Ricerca per la Viticoltura e l'Enologia (CREA-VE), a Conegliano, in Veneto. L'esperimento è

stato condotto su piante di Pinot Gris (*Vitis vinifera*) innestate su portainnesto Kober 5BB, coltivate in condizioni di temperatura e luce naturali.

Sono stati adottati quattro diversi trattamenti nutritivi: N1, consistente nell'uso di un concime commerciale con una dose di 45 kg N ha^{-1} $anno^{-1}$, valutata come la minima indispensabile per ottenere la resa massima consentita per il Pinot Grigio in Veneto e buoni livelli di qualità; N2, un nano U-ACP in soluzione acquosa, utilizzato in fertirrigazione per una quantità totale di 36 kg N ha^{-1} $anno^{-1}$ (riducendo così del 20% la quantità di azoto); N3, anch'esso un nanofertilizzante addizionato con urea in soluzione, con una concentrazione di azoto di 36 kg ha^{-1} $anno^{-1}$, impiegato con applicazione fogliare supportata da un trattamento con fertilizzazione granulare; C, il controllo, dove non è stato somministrato alcun fertilizzante.

Gli U-ACP sono stati sintetizzati mescolando due soluzioni dello stesso volume (V = 75 ml): una composta da nitrato di calcio [$Ca(NO_3)_2$] (0,4 M) e citrato di sodio [$Na_3C_6H_5O_7$] (0,4 M), e l'altra contenente idrogenofosfato di potassio [K_2HPO_4] (0,24 M), carbonato di sodio [Na_2CO_3] (0,2 M) e nitrato di potassio [KNO_3] (0,4 M). In seguito, la miscela è stata centrifugata, è stata aggiunta l'urea in quantità di 1 g in 6 ml e infine il tutto è stato liofilizzato. Con la diffrazione a raggi X (XRD) è stata confermata la purezza della preparazione e la sua natura amorfa, mentre la presenza di ioni nitrato e urea è stata valutata mediante spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), con un risultato di 6,43% di azoto sul peso totale del composto.

Si è osservato che, dopo i quattro trattamenti, la quantità di azoto nelle foglie, stimato attraverso il contenuto di clorofilla (SPAD), risultava comparabile per tutti e tre i fertilizzanti, mentre era più basso nel controllo. Infatti, le viti trattate con il composto azotato presentavano un valore di SPAD compreso tra 28 e 33, senza grandi differenze tra i tre trattamenti. Il contenuto di N fogliare è un parametro molto utile perché permette di monitorare lo stato nutrizionale della vite, di valutare quanto facilmente viene assorbito il composto e, inoltre, è fondamentale per le valutazioni enologiche su resa e qualità di uva e mosto.

Per quanto riguarda i dati sul frutto e sul mosto, le osservazioni sono state elaborate dopo la raccolta delle uve, una volta raggiunta la maturità tecnologica; queste sono state poi utilizzate per la produzione del mosto. La resa e le sue componenti, quali il numero di grappoli, il peso dei grappoli e degli acini, sono risultate inferiori nel controllo C e simili tra N1, N2 e N3. La TSS (Total Soluble Solids, ovvero il contenuto zuccherino totale del mosto d'uva) è risultata maggiore nel controllo, mentre i livelli negli altri tre trattamenti erano comunque nel range di qualità per il Pinot Grigio in Veneto (Tab 2). La YAN è risultata superiore nei due trattamenti con U-ACP, soprattutto in N2 (Gaiotti et al., 2021).

	2019				2020				Average 2019–2020			
PARAMETER	C	N1	N2	N3	C	N1	N2	N3	C	N1	N2	N3
Yield (kg/vine)	2,0 b	2,6 a	2,3 ab	2,5 a	1,5 b	2,4 a	2,1 a	1,7 ab	1,8 b	2,5 a	2,2 a	2,1 a
Berry weight (g)	1,3	1,2	1,3	1,3	1,2	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
Number of bunches	27	28	27	32	21	23	20	19	24	26	24	26
Bunch weight (g)	75 b	96 a	83 a	79 ab	73 b	102 a	107 a	97 a	74 b	99 a	95 a	88 ab
TSS (Brix)	21,9	21	21,7	21,6	20,1 a	18,7 b	19,2 ab	20,0 a	21,0	19,8	20,5	20,8
Titratable acidity (g L^{-1})	8,3	7,8	8,3	7,7	5,7	6,3	6,5	5,7	7,0	7,1	7,4	6,7
YAN (mg L^{-1})	43,2	51,4	67,3	60,2	73,6 b	78,5 ab	112,6 a	85,9 ab	58,4	65,0	90,0	73,1

Tab 2. Resa e qualità di uva e mosto con i 4 diversi trattamenti. Da notare che l'annata 2020 a causa di temperature leggermente inferiori è risultata meno produttiva e qualitativa.

6 SVANTAGGI DELL'USO DI NP

Al momento non sono emersi veri e propri svantaggi legati all'utilizzo di NPs a base di calcio fosfato, sia per l'efficacia di essi, sia per il numero ancora limitato di studi. Nonostante ciò, è importante considerare che l'applicazione di nanomateriali nel mondo agricolo può sollevare alcune problematiche, anche se relative soprattutto a casi specifici.

Tra gli aspetti più critici troviamo gli effetti che questi nanofertilizzanti possono provocare sulle comunità batteriche del suolo. È stato visto che le nanoparticelle inorganiche, come i metalli e i loro ossidi, sono più tossiche rispetto a quelle organiche; inoltre, colpiscono batteri diversi: per esempio, quelle in argento sono più nocive ai batteri Gram -, altre contenenti sostanze inorganiche possono agire da agenti antimicrobici e inibire la crescita dei rizobatteri. I nanomateriali a base di carbonio hanno impatto sulle funzioni di alcuni batteri coinvolti nei cicli dell'azoto e del carbonio (Usman et al., 2020).

Oltre ai batteri, anche i funghi ectomicorrizici possono risentire dell'utilizzo di questi prodotti: per esempio, l'Ag comporta una diminuzione della colonizzazione e crescita dei funghi sulla pianta di mais (*Zea mays*), stesso effetto che si verifica nelle piante di trifoglio se viene applicato ossido di ferro.

Infine, gli effetti negativi possono verificarsi anche negli artropodi del suolo, che contribuiscono a mantenere il suolo fertile partecipando al ciclo del carbonio e degradando la materia organica. Le NPs di Ag sono risultate deleterie per *Caenorhabditis elegans*, in quanto contribuiscono alla formazione di ROS (Kalwani et al., 2022).

È doveroso aggiungere che molti di questi svantaggi sono specifici di determinati nanomateriali su determinati organismi e non generalizzabili; inoltre, negli studi condotti per valutare la tossicità dei composti, sono state usate dosi di nanoparticelle maggiori rispetto a quelle applicate normalmente in campo, condizione che potrebbe aver influenzato questi effetti ottenuti.

7 CONCLUSIONI

Gli studi presi in considerazione evidenziano le grandi potenzialità dei nanofertilizzanti nel settore agricolo: questi composti grazie alle loro dimensioni ridotte, permettono un maggiore assorbimento da parte delle piante, contribuendo a ridurre l'impatto ambientale. Questo approccio è in linea con i programmi e le strategie internazionali che mirano a questi obiettivi, come One Welfare, Farm to Fork e l'Agenda 2030. In particolare, in questo lavoro è stato evidenziato l'ottimo potenziale dei nanofertilizzanti a base di fosfato di calcio arricchiti con azoto e le loro applicazioni nella viticoltura.

Partendo da questi dati, penso possa essere interessante ipotizzare una possibile sinergia tra nanofertilizzanti e la coltivazione di vitigni PIWI. Queste piante sono state ottenute grazie a degli incroci genetici tra *vitis vinifera* e altri tipi di *vitis* americane e asiatiche. Sono state poi selezionate per contenere nel loro genoma geni di resistenza a vari funghi che normalmente attaccano la vite come *Uncinula necator* che causa l'oidio, *Plasmopara viticola* che è responsabile della peronospora o *Botrytis cinerea* che provoca la muffa grigia del grappolo (Casanova-Gascón et al., 2019)

L'integrazione di nanofertilizzanti su vitigni PIWI potrebbe portare ad un impatto ambientale ridotto; infatti, questi vitigni necessitano di pochissime applicazioni di pesticidi e utilizzando i nanofertilizzanti avremmo anche il massimo dell'efficienza nutritiva con dosi minime.

Certamente sarà necessario eseguire ulteriori studi sia per quanto riguarda l'uso dei nanofertilizzanti, sia per quanto riguarda i vitigni PIWI, per poter attuare in modo concreto questa nuova direzione.

Bibliografia

Carmona F. J., Dal Sasso G., Ramírez-Rodríguez G. B., et al., (2021) «Urea-functionalized amorphous calcium phosphate nanofertilizers: optimizing the synthetic strategy towards environmental sustainability and manufacturing costs», Scientific Reports, 11, 3419.
DOI 10.1038/s41598-021-83048-9.

Carmona F. J., Guagliardi A., Masciocchi N., (2022) «Nanosized Calcium Phosphates as Novel Macronutrient Nano-Fertilizers», Nanomaterials, 12, 2709.
DOI 10.3390/nano12152709.

Casanova-Gascón J., Ferrer-Martín C., Bernad-Eustaquio A., Elbaile-Mur A., Ayuso-Rodríguez J. M., Torres-Sánchez S., Jarne-Casasús A., Martín-Ramos P., (2019) «Behavior of Vine Varieties Resistant to Fungal Diseases in the Somontano Region», Agronomy, 9, 738.
DOI 10.3390/agronomy9110738.

Gaiotti F., Lucchetta M., Rodegher G., Lorenzoni D., Longo E., Boselli E., Cesco S., Belfiore N., Lovat L., Delgado-López J. M., et al., (2021) «Urea-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles as Sustainable Nitrogen Nanofertilizers for Viticulture: Implications on Yield and Quality of Pinot Gris Grapevines», Agronomy, 11, 1026.
DOI 10.3390/agronomy11061026.

Kalwani M., Chakdar H., Srivastava A., Pabbi S., Shukla P., (2022) «Effects of nanofertilizers on soil and plant-associated microbial communities: Emerging trends and perspectives», Chemosphere, Volume 287, Part 2.
DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.132107.

Liu R., Lal R., (2015) «Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions», Science of The Total Environment, Volume 514, Pages 131–139.
DOI 10.1016/j.scitotenv.2015.01.104.

Pérez-Álvarez E. P., Ramírez-Rodríguez G. B., Carmona F. J., Martínez-Vidaurre J. M., Masciocchi N., Guagliardi A., Garde-Cerdán T., 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, Pages 1307–1313.
DOI 10.1002/jsfa.10738.

Ramírez-Rodríguez G. B., Dal Sasso G., Carmona F. J., Miguel-Rojas C., Pérez-de-Luque A., Masciocchi N., Guagliardi A., Delgado-López J. M., (2020) «Engineering Biomimetic Calcium Phosphate Nanoparticles: A Green Synthesis of Slow-Release Multinutrient (NPK) Nanofertilizers», ACS Applied

Bio Materials, Volume 3, Number 3, Pages 1344–1353.
DOI 10.1021/acsabm.9b00937.

Usman M., Farooq M., Wakeel A., Nawaz A., Cheema S. A., Rehman H., Ashraf I., Sanaullah M., (2020) «Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities», Science of The Total Environment, Volume 721.
DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.137778.

Zulfiqar F., Navarro M., Ashraf M., Akram N. A., Munné-Bosch S., (2019) «Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations», Plant Science, Volume 289.
DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110270.