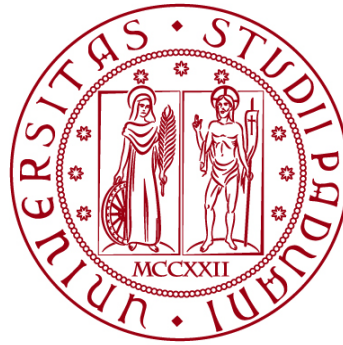


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**NANOSISTEMI PER IL MIGLIORAMENTO DELLA PRODUTTIVITÀ
AGRARIA**

Tutor: Prof. Paolo Carletti

Dipartimento di Agronomia Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Laureando: Riccardo Giora

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 3 |
| 1 INTRODUZIONE | 3 |
| 2 NANOPARTICELLE E NANOMATERIALI | 5 |
| 2.1 NP organiche | 6 |
| 2.2 NP inorganiche | 6 |
| 2.3 NP a base di carbonio | 7 |
| 3 SINTESI DI NANOPARTICELLE | 7 |
| 3.1 Approccio bottom up | 7 |
| 3.2 Approccio top-down | 7 |
| 4 IL CHITOSANO | 8 |
| 4.1 Struttura e sintesi | 8 |
| 4.2 Effetti e risposte delle piante | 9 |
| 5 NP DI CHITOSANO COME BIOSTIMOLANTE | 10 |
| 5.1 NP di rame-chitosano | 10 |
| 5.2 NP di chitosano funzionalizzate con acido salicilico | 12 |
| 6 NANOINCAPSULAMENTO CON CHITOSANO | 13 |
| 6.1 Nanoincapsulamento di metaboliti fenolici come inibitori di aflatossine | 13 |
| 7 RISCHI NELL'UTILIZZO DEI NANOSISTEMI | 16 |
| 8 CONCLUSIONI | 17 |
| Bibliografia | 18 |

ABSTRACT

In un mondo dove la disponibilità di risorse alimentari non è più sufficiente per soddisfare la crescente richiesta dovuta al costante aumento della popolazione globale, la ricerca si sta ora concentrando su nuove tecnologie per poter sfruttare al massimo le terre che già vengono coltivate; un esempio di questo progresso in ambito agrario sono i nanosistemi. Queste tecnologie permettono sia l'incapsulamento di fitormoni, fertilizzanti, erbicidi e pesticidi sia la somministrazione di molecole pure, organiche o inorganiche in forma nanometrica con lo scopo di portare il massimo beneficio alle piante permettendo loro la più alta resa in termini di quantità e le migliori caratteristiche qualitative e nutrizionali dei loro prodotti. Il chitosano, biopolimero naturale derivato dalla chitina, è stato largamente caratterizzato in quanto può essere utilizzato come biostimolante, in forma pura o associata ad esempio a rame o acido salicilico, e come nanoincapsulante. In quest'ultima forma permette di combinare le naturali caratteristiche biostimolanti con gli effetti indotti dal composto o molecola incapsulata; verrà presentato a titolo di esempio l'uso di composti fenolici come inibitori delle aflatossine.

1 INTRODUZIONE

In un mondo sempre più incline al cambiamento l'agricoltura è uno dei settori che più sta risentendo delle maggiori e nuove richieste del consumatore e della società; con il costante aumento della popolazione mondiale il settore agricolo sarà costretto a rispondere a una crescente domanda, verrà quindi richiesto di incrementare la produttività. Aumentare il rendimento delle coltivazioni, mentre si raggiungono i limiti del potenziale genetico delle colture principali e si riduce la superficie di terre coltivabili, richiede di ottenere di più utilizzando meno risorse. Questo è solitamente realizzato attraverso l'uso di fertilizzanti chimici e/o pesticidi, migliorando la resa e la resistenza a stress biotici e abiotici. Tuttavia, l'uso indiscriminato di agrofarmaci ha conseguenze a lungo termine sull'ambiente, motivo per cui alcuni sono stati addirittura vietati, rendendo l'agricoltura una delle principali fonti di inquinamento non puntuale [1].

I problemi derivanti dall'uso dei fertilizzanti, ad esempio, sono dovuti al loro limitato assorbimento da parte delle piante, si stima che il 40-70% di N e l'80-90% di P dei fertilizzanti comunemente usati vengono dispersi nell'ambiente o che essi siano chimicamente legati al suolo e sono quindi inutilizzati e non disponibili per le piante. Questo implica enormi costi di produzione viste le ingenti quantità necessarie e un grande costo anche a livello ambientale [2]. Anche i pesticidi, largamente utilizzati, costituiscono un problema in quanto solo una piccola parte reagisce con i parassiti, mentre la restante si disperde nell'ambiente. Inoltre questi

solitamente vengono diluiti con acqua e spruzzati, ciò espone il principio attivo alla degradazione da parte di fattori ambientali che possono ridurre significativamente le prestazioni [2].

Per affrontare queste sfide la ricerca si è concentrata sull'uso di biostimolanti, i quali in accordo con il regolamento europeo sono stati definiti come “un prodotto che stimola i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal contenuto nutritivo del prodotto stesso, con l'unico scopo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche della pianta o della rizosfera: efficienza nell'uso di nutrienti; tolleranza allo stress abiotico; tratti qualitativi; disponibilità di nutrienti confinati nel suolo o nella rizosfera” [1]. La loro forza risiede nell'elevata efficacia a fronte di una quantità molto piccola per il trattamento, ma il loro punto debole è il breve tempo d'azione e l'elevata degradabilità ambientale dovuta alla composizione.

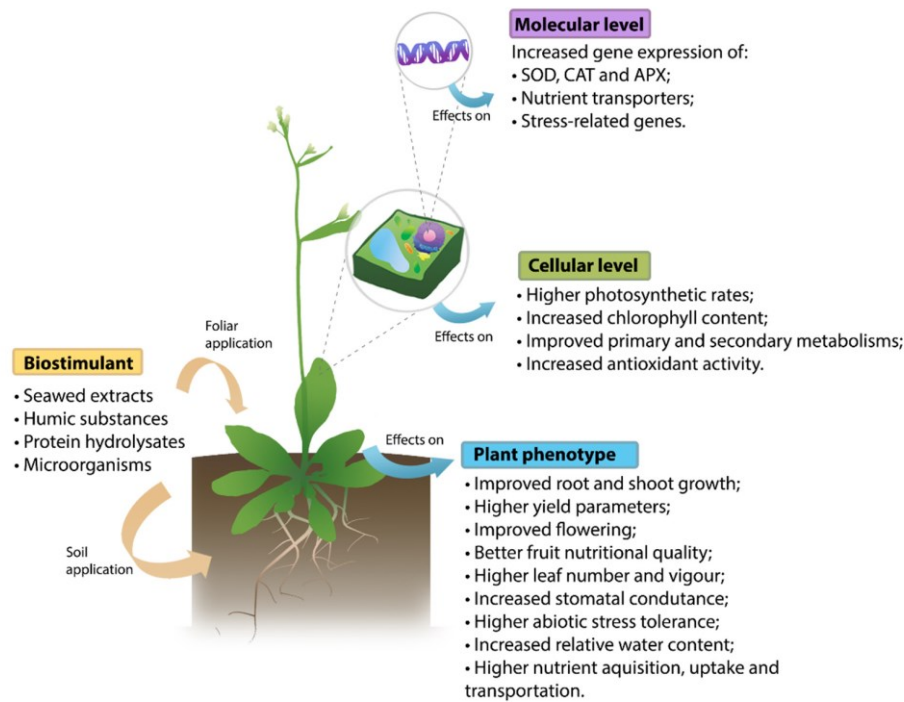


Fig. 1 Rappresentazione riassuntiva degli effetti biostimolanti sulle piante a livello molecolare e cellulare, e sul fenotipo delle piante [1]

In questo lavoro vista la vastità dell'argomento verrà approfondito lo studio del Chitosano, che insieme a alginato e acido umico o materiali organici come vermicompost, compost ed estratti di alghe marine fa parte di uno dei due gruppi in cui vengono suddivisi questi composti, cioè sostanze provenienti da piante e materiali animali, mentre l'altro gruppo è caratterizzato da microrganismi benefici, come funghi promotori della crescita delle piante (PGR), funghi endomicorrizici (AMF) e rizobatteri PGP (PGPR) [3].

I biostimolanti hanno costituito sicuramente un enorme passo avanti in ambito agricolo permettendo una virata verso un approccio più green e consapevole dei

meccanismi fisiologici e metabolici delle piante, stimolandone i naturali processi biologici senza l'eccessivo uso di sostanze chimiche. Per rendere ancora più vantaggioso l'uso di questi composti riducendo al minimo le limitazioni intrinseche che li caratterizzano la nuova frontiera è stata l'utilizzo dei nanosistemi accoppiati ai biostimolanti.

I nanosistemi sono composti da nanomateriali, i quali vengono definiti come oggetti con almeno una delle loro dimensioni (lunghezza, larghezza, profondità) su scala nanometrica, che nel campo delle nanoscienze è definita come 1–100 nm [3]; questi possono poi essere classificati in base alla nanoscala, morfologia, composizione chimica e caratteristiche superficiali [2]. In ambito agroalimentare questi materiali possono essere usati per la produzione di nanofertilizzanti, nanobiostimolanti, nanopesticidi, nanobiosensori e nanomateriali per la bonifica del suolo.

Il Chitosano è un polimero di particolare interesse in quanto oltre alle sue intrinseche proprietà di biostimolante che gli hanno permesso di essere sviluppato per la somministrazione come nanobiostimolante, può essere utilizzato anche per l'incapsulamento di sostanze come fertilizzanti, pesticidi ed erbicidi sempre in formulazione nanometrica.

2 NANOPARTICELLE E NANOMATERIALI

I nanomateriali sono oggetti con almeno una delle loro dimensioni (lunghezza, larghezza, profondità) su scala nanometrica (1–100 nm); da questa definizione derivano poi ulteriori classificazioni. Una prima classificazione divide questi materiali in base alla loro dimensionalità in quattro classi diverse:

- OD: nessuna delle loro dimensioni supera la nanoscala, (1-100 nm); esempi di questi sono nanosfere, nanoparticelle e punti quantici.
- 1D: una delle dimensioni non rispetta la nanoscala, come nanofili, nanotubi, nanobarre.
- 2D: possiedono due dimensioni fuori dalla nanoscala e includono strutture come fogli, film sottili e rivestimenti.
- 3D: tutte e tre le dimensioni superano i 100 nm; le strutture trovate in questa classificazione sono polveri sfuse, gruppi di nanotubi o multilivelli. [2]

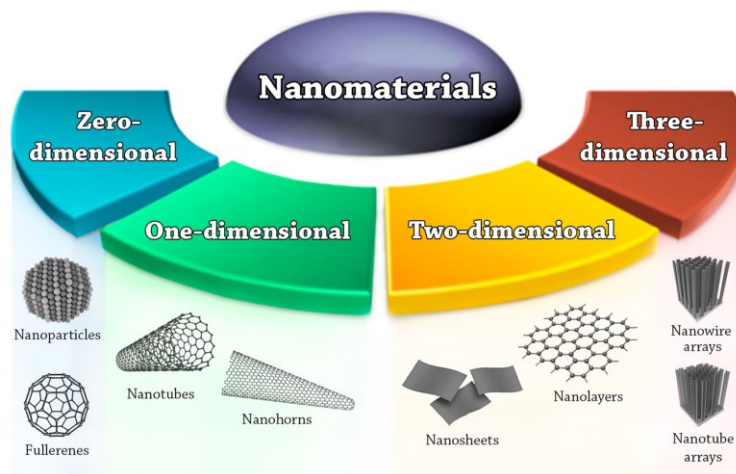


Fig. 2 Classificazione dei nanomateriali basata sulla dimensionalità

Una seconda classificazione si basa sulla composizione e le suddivide in tre categorie: organiche, inorganiche e a base di carbonio.

2.1 NP organiche

Di cui fanno parte ad esempio dendrimeri, liposomi, micelle, ferritina e chitosano, sono costituite da proteine, carboidrati, lipidi, polimeri e qualsiasi composto organico. Queste nanoparticelle sono biodegradabili sensibili a radiazioni termiche ed elettromagnetiche, non tossiche e molte come micelle e liposomi per la loro struttura intrinseca presentano un nucleo cavo [4].

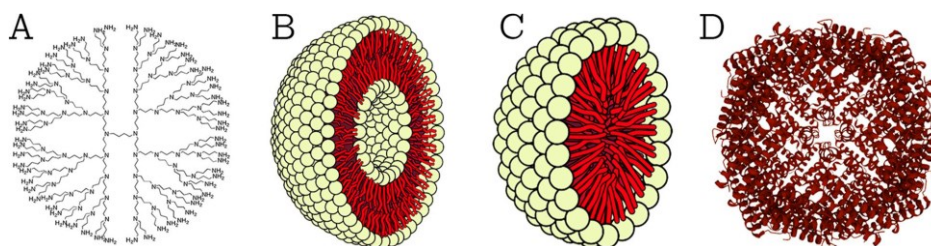


Fig. 3 Tipi di NPs organici. A dendrimeri; B liposomi; C micelle; e D ferritina

2.2 NP inorganiche

Questa classe comprende nanoparticelle che non sono costituite ne da carbonio ne da materiali organici e può suddividersi al suo interno ulteriormente in NP a base di metalli o a base di ossidi metallici. Possono anche presentare una struttura guscio – nucleo formati da diversi strati, questi come le particelle singole sono costituiti esclusivamente da precursori metallici e possono essere monometalliche, bimetalliche o polimetalliche [4]. Alcune di queste particelle possiedono uniche proprietà termiche, magnetiche e biologiche.

2.3 NP a base di carbonio

Queste particelle formate esclusivamente di carbonio sono conosciute anche come basate sul carbonio. I principali costituenti sono: fullereni, punti quantici di carbonio, nerofumo, nanotubi di carbonio (CNT). Tutte sono utilizzate in ampia gamma per le loro proprietà di affinità elettronica, conduttività elettrica, proprietà ottiche e di assorbimento[4].

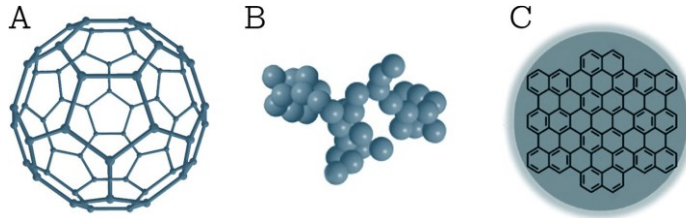


Fig. 4 Tipi diversi di carbon-based NPs. A C60 fullerene; B carbonio nero NPs; e C particelle quantiche di carbonio

3 SINTESI DI NANOPARTICELLE

3.1 Approccio bottom up

È il metodo più largamente utilizzato in quanto è in grado di produrre NM con distribuzioni, forme e dimensioni uniformi, controllando con precisione i processi che ne portano alla formazione; questi, come suggerisce il nome, si basano sulla partenza dai componenti più piccoli come molecole e atomi, che vanno ad aggregarsi ed assemblarsi utilizzando metodi chimici e biologici fino a formare particelle nanoscopiche [3]. I principali metodi utilizzati in questo approccio sono Sol-gel, spinning, chemical vapour deposition (CVD) e biosynthesis, senza tralasciare i vantaggi derivanti dall'autoassemblaggio dei lipidi o macromolecole anfifiliche guidato dall'influenza dell'ambiente chimico [2]. La deposizione da vapore chimico (CVD) ad esempio si basa sulla deposizione di un sottile strato di reattivi gassosi su un substrato, questo strato viene poi recuperato per essere utilizzato; il metodo porta alla creazione di nanoparticelle altamente uniformi, pure, dure e resistenti.

3.2 Approccio top-down

L'approccio si basa sulla creazione di nanoparticelle a partire da strutture di dimensioni più elevate, questo avviene grazie a processi come fotolitografia, litografia soft, acquaforte e macinazione a sfere, che rientrano nei metodi fisici. Questi approcci di produzione presentano difetti nella struttura superficiale del prodotto il che è limitante vista la stretta dipendenza delle proprietà fisiche da essa; per questo motivo vengono meno utilizzati dei precedenti. Tuttavia oltre ai metodi fisici esistono anche metodi biologici basati sulla sintesi di nanoparticelle tramite l'uso di microorganismi che sono in grado di estrarre NP di alto valore dalla fonte primaria, rappresentando una grande risorsa, vedi la produzione di silice cristallina dalla silice amorfa dalla lolla di riso [2].

4 IL CHITOSANO

4.1 Struttura e sintesi

Il chitosano è un biopolimero ottenuto da deacetilazione della chitina, polisaccaride derivante da parete cellulare di funghi, alghe, esoscheletro dei crostacei e cuticola degli insetti; quest'ultima fonte rispetto agli scarti dei molluschi marini utilizzati fino ad ora in ambito industriale, rappresenta la nuova frontiera, in quanto gli insetti possiedono la capacità di riprodursi tutto l'anno e in maniera molto rapida, rispetto invece a molti organismi marini, senza poi sottovalutare i problemi derivanti dalla dipendenza dall'industria ittica e l'allergenicità di questi scarti [5].

Il gruppo di sostanze biopolimeriche definite chitosano devono essere derivanti da chitina con un grado di depolimerizzazione non minore del 50 %, entrambi questi composti sono caratterizzati da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina legati da legami β -1,4-glicosidici. Il processo di estrazione della chitina si compone di tre fasi: deproteinizzazione con soluzione alcalina o enzimi, demineralizzazione con soluzione acida per sciogliere il carbonato di calcio e infine decolorazione con soluzione alcalina [6]. Per la produzione industriale viene utilizzata una soluzione di NaOH al 40% - 50% (p/v) dove viene immersa la chitina solida, questo processo porta alla rimozione dei gruppi acetili ($-\text{CH}_3\text{CO}$) dalla chitina e converte la N-acetil-D-glucosamina in β -1,4-D-glucosamina con la conseguente formazione di chitosano; il grado di deacetilazione finale dipende dalla temperatura, dalla durata della reazione e dalla concentrazione iniziale della soluzione [6], [7].

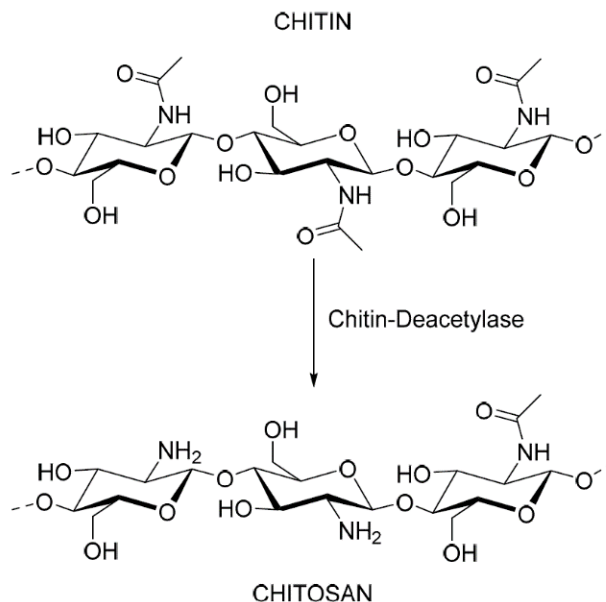


Fig. 5 Processo di sintesi del chitosano

Il termine chitosano descrive quindi non un unico composto bensì un gruppo di copolimeri, in quanto le varie preparazioni di CHT sono eterogenee rispetto a viscosità, grado di polimerizzazione, deacetilazione e massa molecolare.

Oltre al basso costo di produzione derivante dagli scarti di invertebrati o dall'uso di insetti, il chitosano ha assunto un'importante rilevanza grazie alle sue proprietà chimico – fisiche che includono: idrofilia, biocompatibilità, biodegradabilità, non tossicità, elevata capacità di assorbimento, alta affinità per i metalli.

4.2 Effetti e risposte delle piante

Il chitosano è capace di indurre numerose e differenti risposte nelle piante sulle quali viene utilizzato, la sua efficacia o addirittura il suo effetto finale dipendono: dalla struttura e dalla concentrazione stessa del polimero, dal suo peso molecolare, dalla specie vegetale e dallo stadio di sviluppo della pianta. I suoi effetti comprendono il miglioramento delle risposte di difesa della pianta da stress biotici e abiotici, attività fungicida, antipatogenica ed antivirale ad ampio spettro, regolazione positiva dei processi metabolici e aumento della produttività; alcune di queste caratteristiche ne permettono anche l'uso per la conservazione dei prodotti nelle fasi successive al raccolto. [7]

L'applicazione del chitosano per contrastare gli effetti negativi dello stress nelle piante consiste nella sua attività antiossidante dovuta alla neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) come radicali anionici superossido, radicali idrossilici liberi e perossido di idrogeno H_2O_2 . Recenti studi hanno però indicato che il chitosano può anche indurre la sintesi del perossido di idrogeno stesso nelle cellule delle piante con funzione di molecola segnale nelle reazioni di difesa allo stress portando all'induzione di enzimi deputati all'azione antiossidante. Questi enzimi sono la catalasi (CAT), la perossidasi (POX) e la superossido dismutasi (SOD). L'attività antiossidante del chitosano viene utilizzata per migliorare la stabilità durante lo stoccaggio delle materie prime [6].

Il meccanismo tramite il quale il chitosano svolge la sua attività antifungina, antimicrobica e anche antivirale non è ancora stato compreso a pieno anche se sono state documentate queste proprietà in vari studi come, nel caso di funghi, il blocco della germinazione e crescita di *Alternaria kikuchiana* e *Physalospora pirricola* nel frutto della pera, o la soppressione della malattia della muffa grigia causata dal fungo *Botrytis cinerea* che causa marciume nei grappoli di Sauvignon blanc e Chardonnay. Per quanto riguarda l'attività antimicrobica risulta che, probabilmente a causa della diversa composizione della parete cellulare, i batteri gram positivi, rispetto a quelli gram negativi sono maggiormente suscettibili a questo composto. [7].

Nel caso dell'azione biostimolante, i maggiori risultati si sono ottenuti nell'ambito delle colture da frutto e piante orticole, come miglioramento della crescita vegetativa, della resa e anche una miglior composizione chimica in piante di caffè e fragola o origano greco; ma anche esperimenti in campo su larga scala in grano,

che grazie a concimazione dei semi e irrorazione fogliare ha portato al miglioramento delle componenti di resa come chicchi per spiga e numero di spighe [7]. Anche in questo caso i processi coinvolti in queste azioni non sono del tutto chiari, si pensa che possano essere correlati ad un effetto stimolante sull'assorbimento di minerali essenziali, acqua e all'impatto sulla pressione osmotica delle cellule [6].

Viste le sue caratteristiche come biostimolante, il passo successivo ne è stato l'uso in formulazione nanometrica per lo sviluppo di nanosistemi. Questi possiedono caratteristiche aggiuntive rispetto alle molecole di dimensioni standard, che ne consentono una migliore efficacia, come una più elevata assorbibilità da parte del sistema vegetale, un'ampia area superficiale che ne consente la modifica e una minor degradabilità se associata per esempio a componenti metalliche come il rame [3]. Oltre al suo uso come nanobiostimolante il chitosano, come anche altri nanocomposti, possiede la possibilità di essere utilizzato come vettore per il nanoincapsulamento di sostanze come fertilizzanti, pesticidi, erbicidi, fitormoni. Il nanoincapsulamento permette ai composti contenuti di entrare all'interno della pianta aiutato dalla facilità di ingresso del biostimolante stesso, ne consente il lento rilascio dall'incapsulante rendendo possibile una azione prolungata e infine di essere meno sensibili alla degradazione. La funzione di nanobiostimolante e di nanoincapsulamento del chitosano verrà approfondito nei paragrafi seguenti [2].

5 NP DI CHITOSANO COME BIOSTIMOLANTE

5.1 NP di rame-chitosano

Un esempio di come le nanoparticelle di chitosano possano essere associate ad altre molecole o metalli è trattato nel lavoro di *Muthukrishnan Sathiyabama e Appu Manikandan*, dove viene descritta l'azione delle nanoparticelle di rame-chitosano nell'aumento della crescita e resistenza al *blast disease* nelle piante di miglio [8].

Il miglio è un cereale molto importante nelle zone del mondo dove le condizioni climatiche sono particolarmente avverse, perché le sue innate caratteristiche gli permettono di crescere dove gli altri cereali non sarebbero in grado; la malattia definita "*blast disease*" che colpisce questa specie è quindi estremamente dannosa per le popolazioni che traggono sostentamento da questo prodotto. Questa malattia causata da *Pyricularia grisea* porta ad una perdita media di rendimento del 28% fino ad arrivare all'80-90% nelle aree endemiche, colpisce le piante in tutte le fasi dello sviluppo, causando lesioni ed essiccazione prematura delle foglie giovani e portando a esplosioni su collo e dita.

Le nanoparticelle di rame-chitosano sono state sintetizzate tramite un approccio one step ed utilizzate in una concentrazione dello 0,1% (p/v) determinata come ottimale in studi precedenti. CuChNps sono state utilizzate in due differenti approcci, uno di tipo spray fogliare e uno caratterizzato da rivestimento del seme. Nell'esperimento

erano quindi presenti 3 diversi slot di piante: quelle con semi non trattati alle quali venivano fornite le nanoparticelle solamente tramite spray fogliare, quelle derivanti da semi trattati con nanoparticelle e successivamente sottoposte anche a spray e infine un gruppo di controllo sul quale veniva nebulizzata solamente acqua.

Le spore di *P. grisea* sono state utilizzate in 2 modi differenti: per saggi in vitro sono state preparate due sospensioni, di cui una è stata inoculata con CuChNps mentre l'altra fungeva da controllo, per saggi in vivo invece le spore sono state inoculate direttamente sulle foglie di piante di 30 giorni sia trattate (fogliare, seme + fogliare) sia non trattate. Queste piante sono state monitorate per i successivi 50 giorni e l'incidenza della malattia è stata determinata sulla base di un punteggio assegnato in relazione alla dimensione delle aree fogliari interessate da imbrunimento.

I risultati ottenuti da questo studio evidenziano sia gli effetti biostimolanti delle particelle rame-chitosano, sia quelli collegati all'attività antifungina e stimolatoria della risposta immunitaria.

Gli effetti fenotipici apprezzati nelle piante trattate rispetto al controllo sono stati numerosi. Si è osservato un aumento del numero di foglie rispetto al controllo del 22% con l'irrorazione fogliare e del 33% con irrorazione fogliare + trattamento semi. Valori significativamente più alti di lunghezza delle foglie e altezza dei germogli sono stati registrati nelle piante trattate con CuChNp rispetto al controllo; l'aumento di lunghezza delle foglie è stato circa del 85% nell'irrorazione fogliare e del 100% nel trattamento sia di semi che di foglie, mentre l'aumento dell'altezza dei germogli è stato rispettivamente del 36% e del 46%. Per quanto riguarda il peso fresco e secco, entrambi presentano un aumento, anche se molto più evidente nel peso secco. È stato misurato un incremento del 14% con irrorazione fogliare e del 82% con irrorazione fogliare + trattamento semi nel caso del peso fresco, il peso secco presenta invece incrementi rispettivamente del 152% e del 297%.

Oltre a questi parametri hanno subito un incremento anche il numero di dita per pianta con conseguente aumento della resa di granella per pianta, e il contenuto di clorofilla, indicatore utilizzato in questi studi in quanto considerato un indice della quantità totale di complessi fotosintetici.

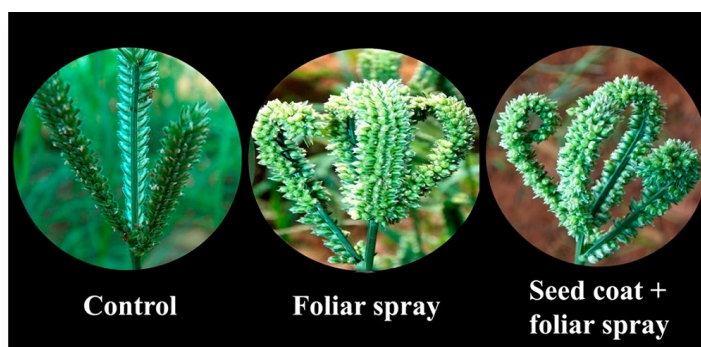


Fig. 6 Infiorescenza di miglio (al settantesimo giorno) che mostra l'aumento in granella

In relazione all'attività antifungina invece, in vitro è stata dimostrata un'inibizione, con valori fino all'80% della germinazione delle spore di *P. grisea* nel mezzo inoculato con CuChNp rispetto a quella di piastre di controllo. In vivo invece il controllo si è comportato come ci si aspettava, con progressione delle lesioni fogliari dopo i 15 giorni e completa esplosione dopo 50 giorni; per quanto riguarda le piante trattate la prima comparsa di sintomi è stata ritardata di 10 giorni in quelle trattate con solo applicazione fogliare e di 15 giorni in quelle con applicazione combinata e non si è avuta un'esplosione completa nella totalità delle piante ma solo nell'25-28%. Questi risultati sono stati associati all'induzione dell'attività degli enzimi difensivi, compresi quelli antiossidanti. Questi sono: perossidasi, polifenolo ossidasi e β -1,3-glucanasi, che sono aumentati da 1 a 8 volte, sempre però con maggiore caratterizzazione nelle piante con trattamento combinato. Nelle piante trattate inoltre è stata notata, tramite utilizzo di SDS-PAGE la presenza di nuovi polipeptidi e isoforme di questi enzimi [8].

5.2 NP di chitosano funzionalizzate con acido salicilico

Le nanoparticelle di chitosano funzionalizzate con acido salicilico (NP SA-CS) sono state utilizzate in uno studio condotto su mais, per valutarne l'attività biostimolante e di potenziamento dell'immunità verso funghi e parassiti, in particolare, rivolta verso la malattia di marciume del mais (PSFR; post-flowering stalk rot) causata da *F. verticillioides*, malattia particolarmente difficile da trattare in quanto si sviluppa appunto dopo la fioritura della pianta dove la maggior parte degli approcci non sono efficaci. L'acido salicilico (SA) è un acido organico contenente il gruppo carbossilico e ossidrilico fenolico, si trova libero in natura principalmente in numerosi fiori ed è fondamentale per la trasduzione del segnale. L'integrazione con il chitosano deriva dalla necessità di avere un rilascio più lento di questa molecola, in quanto la somministrazione alla pianta in concentrazioni elevate ne determina un'azione tossica; inoltre rispetto alle nanoparticelle Cu-Ch avranno una maggiore capacità di potenziare l'effetto di stimolante dell'immunità grazie alle intrinseche proprietà del SA.

La caratterizzazione in vitro ha valutato l'attività antifungina diretta nei confronti di *F. verticillioides* e l'effetto sulla crescita delle piantine. Nel primo caso la proliferazione micellare è diminuita del 62.2% fino al 100% e la germinazione delle spore dal 48.3 al 60.5%, grazie alla somministrazione di NP a concentrazioni del 0.08 e 0.16%. Nella seconda analisi erano presenti 4 pool differenti di semi: Trattati con NP SA-CH, non trattati (controllo con acqua), trattati solo con CH o solo con SA e coltivati per 10 giorni in piastre Petri; tutti i semi del primo pool hanno registrato un aumento delle caratteristiche come: percentuale di germinazione, peso fresco, indice di vigore (SVI), lunghezza della radice e del germoglio.

Per quanto riguarda gli esperimenti in vaso sono state misurati aumenti nell'attività antiossidante nelle piante trattate con NP attraverso somministrazione fogliare

rispetto al controllo e a quelle trattate solamente con SA o CH. La superossido dismutasi (SOD) ha registrato un'attività aumentata di 2,0 e 3,2 volte, la perossidasi (POD) di 7,7 e 5,2 volte mentre enzimi come CAT, PAL e PPO hanno mostrato anche essi un aumento seppur più modesto. Il contenuto di H₂O₂ ha registrato anche esso un aumento, e come visto in precedenza questa molecola svolge un ruolo fondamentale nell'induzione di questi enzimi agendo come molecola segnale.

Sempre in vaso si sono condotti anche gli esperimenti relativi alla PSFR, dopo una settimana di inoculazione fungina sono stati analizzati i sintomi della malattia come essiccazione e ingiallimento delle foglie e dello stelo, questi si presentavano in maniera estesa nel controllo e nel trattamento con SA mentre in quelle trattate con NP risultavano sani. Anche i dati relativi all'efficacia percentuale del controllo della malattia (PEDC) e alla gravità della malattia (DS) erano significativamente migliori nei trattamenti con NP rispetto agli altri. Essendo lo scopo dell'esperimento valutare se questi sistemi hanno efficacia in ambito agronomico su larga scala per poter essere utilizzati in futuro, è stata svolta anche una sessione di prove su campo, sempre con trattamenti di NP (0,01-0,16%) è stato registrato un valore di PDEC più elevato (dal 40,5 al 59,4%) e un valore di DS ridotto (dal 5,2 al 33,0%), dopo 95 giorni dalla semina; anche le caratteristiche morfologiche sono migliorate: altezza della pianta, lunghezza della pannocchia, peso di prova e resa in granella sono aumentati rispettivamente del 39,5; 44,5; 53,2 e 57,8% rispetto al trattamento con SA.

Per spiegare l'attività antifungina delle NP SA-CH bisogna fare presente che, quando una pianta viene attaccata da un fungo i suoi processi metabolici rallentano a causa dell'elevata presenza di ROS, con conseguente diminuzione della crescita, l'induzione degli enzimi antiossidanti tramite il trattamento fa quindi sì che questa condizione venga tamponata. Inoltre, è stato compreso che l'induzione degli enzimi POD, PAL e PPO sono coinvolti nella deposizione della lignina, che impedisce nei tessuti staminali l'accesso e la crescita di *F. verticillioides* [9].

6 NANOINCAPSULAMENTO CON CHITOSANO

6.1 Nanoincapsulamento di metaboliti fenolici come inibitori di aflatossine

Per ottenere un aumento della produttività agraria in senso stretto si può parlare di incremento della resa delle singole piante in termini di quantità del raccolto, ma in senso lato questo risultato comprende anche il mantenimento di ciò che è stato prodotto, nel caso in cui nel raccolto sia presente aflatossina, questa fa sì che esso non sia utilizzabile in nessun ambito, né animale né umano; è quindi importante trovare strategie volte a preservare ciò che è stato prodotto per contribuire all'aumento della produttività agraria. Di questo si sono occupati i ricercatori *Amal Al Mekawey* e *Mohammad M. El-Metwally* in uno studio volto a caratterizzare gli effetti di due composti fenolici 1-(2-etil,6-epil) fenolo (EHP) estratto da *Cuminum*

cuminum e 5-etil-2-(metossimetile) fenolo (EMMP) estratto dal pepe nero, incapsulati in NP di chitosano per la difesa contro le aflatossine [10].

Le aflatossine vengono prodotte soprattutto da *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* e si dividono in B1, B2, G1 e G2, tutte presentano effetti mutagenici, genotossici e cancerogeni sull'uomo e animali. Queste tossine sono particolarmente resistenti e la loro eliminazione deve essere quindi effettuata con trattamenti molto invasivi di tipo fisico e chimici che spesso comportano un'alterazione delle proprietà di questi alimenti e mangimi. È necessario quindi trovare nuovi metodi per controllare questo problema, il chitosano, come abbiamo già visto, presenta delle ottime capacità antifungine e di stimolazione dell'immunità della pianta e può essere utilizzato come nanoincapsulante. In questo caso i composti bioattivi come i metaboliti fenolici possono essere incorporati all'interno di NPCH, il che ne permette l'assorbimento o la dispersione sotto forma di nanometriche vescicole, migliorandone così la stabilità fisica, impedendone l'interazione con gli ingredienti alimentari e aumentandone la bioattività.

Prima di andare a testare i composti fenolici incapsulati sono state svolte: un'indagine preliminare sulla produzione di aflatossine dalle diverse specie di funghi, l'estrazione delle sostanze dai semi e i saggi antifungini per l'individuazione dei composti più attivi. Dopo aver definito questi parametri sono state sintetizzate le nanoparticelle di chitosano con i composti fenolici, per prima cosa tramite gelificazione ionica sono state create le NPCS: il chitosano (1,25 g) è stato sciolto in 500 ml di acido acetico all'1% (v/v) e 1,25 ml di Tween 80 per dare una concentrazione di 2,5 mg/ml di soluzione CS, la miscela è lasciata in agitazione. Per ottenere l'incapsulamento di EMMP e EHP, questi sono stati aggiunti in etanolo anidro (3mg/ml) alla soluzione di CS preparata, ponendo la soluzione in agitazione, quindi aggiungendo goccia a goccia 0,25 mg/ml di tripolifosfato di sodio sciolto in 25 ml di acqua distillata. La miscela è stata lasciata in agitazione per un ora a temperatura ambiente per formare EMMP-CSNP e EHP-CSNP.

Successivamente si è passati alla caratterizzazione tramite saggi antifungini della crescita di *A. flavus* e *A. parasiticus* e alla determinazione della concentrazione delle aflatossine B1, B2, G1 e G2 in campioni con diversi trattamenti.

Per i saggi antifungini è stata utilizzata la tecnica di diffusione su piastra, una sonda di sughero precedentemente inoculata con i funghi testati è stata posta in un terreno agar malto-destrosio e sui fori praticati in essa sono stati inoculati 100 microlitri di: estratti vegetali (bolliti e non bolliti), CSNP, CSNP rivestiti con EHP ed EMMP, i fori di controllo sono stati invece riempiti con gli stessi solventi utilizzati per l'estrazione. Le rilevazioni sono state effettuate dopo 48 ore di incubazione a 28 gradi. I risultati hanno mostrato come le nanoparticelle di chitosano incapsulate con i metaboliti fenolici estratti possiedono la maggiore attività antifungina, seguite dagli estratti di cumino e pepe nero non bolliti e successivamente dalle NPCS che mostrano un'attività più elevata del CS. L'EHP riduce il peso secco di *A. flavus* e *A. parasiticus* rispettivamente del 86,56% e del 85,61%, mentre l'effetto di EMMP è più marcato, con riduzione rispettivamente del 93,21% e del 96,98%. I CSNP

hanno registrato una riduzione del 78,73% e del 78,83% del peso secco rispetto al controllo, e questo effetto è stato potenziato nel caso dell'incapsulamento dei

composti fenolici: per CSNP-EMMP la riduzione di *A. parasiticus* è stata del 95.5% e del 96.5% per *A. flavus* trattato con CSNP-EHP

Per quanto riguarda invece la produzione di aflatossine, sono state inoculate 1 ml di spore (10^4 spore ml⁻¹) di ciascuna delle due specie di *Aspergillus* in 100ml di terreno da estratto di lievito, e successivamente mixati con 1ml di ciascun composto fenolico. I mix creati in tre repliche per ogni organismo sono stati incubati per 21 giorni a 25 gradi. Per quantificare le aflatossine l'estratto del campione è stato filtrato, diluito e applicato in una colonna di immunoaffinità contenente anticorpi specifici per le aflatossine B1, B2, G1 e G2.

L'effetto dei CSNP liberi e incapsulati nella produzione di aflatossine presenta una distribuzione uguale a quella che caratterizza l'inibizione fungina, come riportato nella tabella seguente:

| Treatment | Mycelial dry weight (mg) | | <i>A. flavus</i> | | <i>A. parasiticus</i> M3 | | | |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|--------|-------|--------|
| | <i>A. flavus</i> A2 | <i>A. parasiticus</i> M3 | AFB1 | AFB2 | AFB1 | AFB2 | AFG1 | AFG2 |
| Control | 15.03 | 21.54 | 22.9 | 19.5 | 18.2 | 31.5 | 14.5 | 19.3 |
| Cooled cumin seeds | 6.71 | 10.99 | 13.9 | 11.8 | 9.8 | 15.2 | 7.2 | 8.7 |
| | 55.36% ^{nl} | 48.98% | 39.3% | 39.5% | 46.2% | 51.8% | 50.3% | 55.0% |
| Boiled cumin seeds | 16.65 | 19.64 | 35.6 | 24.8 | 20.6 | 45.2 | 33.4 | 44.8 |
| EHP | 2.02 | 3.10 | 7.2 | 5.9 | 4.7 | 11.4 | 3.5 | 6.7 |
| | 86.56% | 85.61% | 68.6% | 69.7% | 74.2% | 63.8% | 75.9% | 65.3% |
| Cooled black pepper seeds | 6.95 | 7.25 | 12.3 | 21.3 | 14.0 | 16.0 | 14.0 | 11.2 |
| | 53.76% | 66.34% | 46.3% | | 23.1% | 49.2% | 3.45% | 42.0% |
| Boiled black pepper seeds | 13.45 | 17.69 | 37.9 | 59.5 | 48.2 | 51.5 | 64.5 | 49.3 |
| | 10.51% | 17.87% | 65.5% | | | | | |
| EMMP | 1.02 | 0.65 | 2.9 | 3.4 | 2.0 | 1.2 | 5.2 | 3.6 |
| | 93.21% | 96.98% | 87.3% | 82.6% | 89.0% | 96.2% | 64.1% | 81.4% |
| Chitosan | 10.23 | 9.87 | 16.4 | 13.8 | 12.6 | 15.1 | 14.0 | 10.8 |
| | 31.94% | 54.18% | 28.4% | 29.2% | 30.8% | 52.1% | 3.5% | 44.0% |
| CSNPs | 3.25 | 4.56 | 4.4 | 3.8 | 2.6 | 2.1 | 4.0 | 2.8 |
| | 78.38% | 78.83 | 80.8% | 80.51% | 85.7% | 93.3% | 72.4% | 85.5% |
| CSNPs + EHP | 0.52 | 2.15 | 00 | 0.57 | 00 | 1.1 | 0.89 | 1.2 |
| | 96.54% | 90.02% | 100% | 97.1% | 100% | 96.5% | 93.9% | 93.8% |
| CSNPs + EMMP | 1.21 | 0.95 | 1.25 | 00 | 00 | >0.65 | 00 | >0.78 |
| | 91.95% | 95.59% | 94.5% | 100% | 100% | >98.0% | 100% | >96.0% |

Fig. 7 Attività antifungina di estratti acquosi raffreddati e bolliti di cumino e pepe nero, EHP, EMMP, chitosano, CSNP liberi e incapsulati (5 mg/ml) nella crescita e nella produzione di aflatossine di *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Questo studio conferma ancora una volta la maggiore efficacia del chitosano in formulazione nanometrica rispetto alla sua forma microscopica il che, come già presentato, può essere dovuto ad un'area superficiale più ampia e di conseguenza da un numero maggiore di atomi superficiali, che influenza le proprietà fisico-chimiche, catalitiche e reattive inoltre i CSNP interrompono l'integrità della membrana cellulare e diffondono più facilmente nella cellula fungina riuscendo a

interrompere la sintesi di DNA e RNA. Ma la cosa ancora più sorprendente che questo studio porta alla luce è la possibilità di creare sistemi di nanoincapsulamento che rendono ancora più efficaci composti utilizzabili in ambito agroalimentare; questi sistemi sono in grado di proteggere le molecole incapsulate dall'ossidazione, conferirle maggiore stabilità, protezione da agenti volatili, pH e degradazione enzimatica [10].

7 RISCHI NELL'UTILIZZO DEI NANOSISTEMI

Queste nuove tecnologie possono presentare anche degli aspetti negativi che devono essere meglio caratterizzati. Quando i nanosistemi vengono utilizzati sulle piante, bisogna tenere presente che queste sono integrate in un quadro più complesso che comprende le altre colture e piante, gli animali, il suolo e in fine anche l'uomo. Purtroppo, ad ora, gli studi sugli effetti nocivi che questi trattamenti possono avere sulla pianta stessa e sull'ecosistema sono esigui oppure sono stati ottenuti attraverso studi in serra o esperimenti di laboratorio, quindi in un ambiente controllato dove le risposte rispetto ai trattamenti in campo possono differire di molto; questo fa sì che gli studi condotti in queste condizioni non possano essere estesi a questo tipo di colture [3]. Partendo dall'analisi degli effetti nocivi delle NP sulle piante stesse è stato rilevato come esse abbiano effetti soppressivi o stimolanti interagendo a livello subcellulare e cellulare, in rapporto alle loro caratteristiche chimiche, fisiche e morfologiche e dalle quantità presenti nella pianta.

Disturbi del ciclo cellulare, danno ai nucleotidi, inibizione della crescita e attivazione della via di segnalazione indotta dallo stress sono alcuni degli effetti negativi di NP e NM; genotossicità, citotossicità e cambiamenti nella morfologia dei tessuti ad esempio sono dovuti allo stress ossidativo indotto dalla generazione di ROS, che come l'inibizione della germinazione e cambiamenti nella crescita della biomassa di radici e germogli sono alcuni degli effetti fitotossici associati alle NP metalliche e le NP dei nanotubi di carbonio [2]. Il movimento delle nanoparticelle attraverso le diverse porzioni di piante indica il loro probabile trasferimento a vari livelli trofici ecologici, influenzando così il microbiota del suolo, gli animali e gli esseri umani. Di conseguenza, l'assorbimento e l'accumulo di nanoparticelle da parte delle piante commestibili riflette gravi preoccupazioni sulla sicurezza alimentare e sulla salute pubblica. L'esposizione prolungata degli habitat di acqua dolce alle nanoparticelle può comportare un aumento del pH e della concentrazione di sale, influenzando così gli organismi acquatici che lo abitano [3]. Per capire la complessità delle interazioni presenti nell'ecosistema che possono essere influenzate dai nanosistemi prendiamo un esempio tratto dal lavoro di *Martin Šebesta, Luba Ďurišová et al.* dove è stato notato che le NP presenti nel polline delle piante possono essere dannose per gli insetti impollinatori. Queste NP presenti sul polline vengono raccolte insieme ad esso dagli insetti che le trasportano sui loro corpi e nel tratto digestivo, ciò può portare poi alla contaminazione dei prodotti delle api, il che comporta il rischio di trasmissione alla catena alimentare, e quindi anche all'uomo [3].

8 CONCLUSIONI

Gli esempi analizzati, pur comprendendo una piccolissima parte dei lavori di ricerca svolti in questo ambito espongono in modo chiaro come l'utilizzo di queste tecnologie, possa portare dei notevoli miglioramenti nelle colture. Questo comporterebbe, nel caso di utilizzo su larga scala, una notevole diminuzione nell'uso dei comuni pesticidi, erbicidi e fertilizzanti, ormai obsoleti nelle classiche formulazioni e spesso dannosi per l'ambiente. L'aumento dei pesi freschi e secchi delle piante, l'incremento della lunghezza delle foglie, del numero di dita e di granola nel miglio, la migliore resistenza alle malattie causate da vari funghi sono solo alcuni degli effetti apprezzati durante questi studi, il problema però sta nel fatto che in molti casi questi ed altri comportamenti sono determinati da cause sconosciute. Per portare un quadro il più completo e chiaro possibile sono stati trattati in questo lavoro casi tali per cui alcuni effetti misurati sono stati ricondotti alle specifiche cause, come nel caso della malattia del marciume del mais dove l'effetto protettivo riscontrato dopo applicazione di NP di chitosano funzionalizzate con acido salicilico è stato associato all'induzione degli enzimi antiossidanti endogeni delle piante che contrastano lo stress ossidativo derivato dalle ROS. Nella maggior parte dei casi però i meccanismi che si attivano o che vengono influenzati dai nanosistemi non sono ancora stati compresi, in quanto i pathway metabolici delle piante sono estremamente complessi, e anche una piccola modifica in uno di essi può comportare grandi effetti a livello del fenotipo. In questi termini la ricerca deve sicuramente puntare a una più completa comprensione di questi meccanismi per implementare tecnologie sempre più mirate permettendo il massimo risultato impiegando quantità minime di risorse. Ulteriore attenzione e sforzi devono essere impiegati per condurre studi che prendano in considerazione gli effetti negativi che questi trattamenti possono avere nei confronti delle piante stesse, delle altre colture e di tutto l'ecosistema, per poter dichiarare queste tecnologie sicure così da permetterne l'utilizzo su larga scala e non solo in ambienti controllati. Queste tecnologie come anche le piante geneticamente modificate si pongono sicuramente come avanguardie per un futuro più green e con maggiori disponibilità alimentari, ma per far sì che questo accada bisogna permettere all'opinione pubblica di fidarsi, portando a sostegno prove scientifiche derivate da studi approfonditi e completi volti a spaccettarne ogni singolo aspetto, così da renderne l'utilizzo pratica comune a livello globale.

Bibliografia

- [1] M. Baltazar, S. Correia, K. J. Guinan, N. Sujeeth, R. Bragança, e B. Gonçalves, «Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview», *Biomolecules*, vol. 11, fasc. 8, p. 1096, lug. 2021, doi: 10.3390/biom11081096.
- [2] P. Magnabosco, A. Masi, R. Shukla, V. Bansal, e P. Carletti, «Advancing the impact of plant biostimulants to sustainable agriculture through nanotechnologies», *Chem. Biol. Technol. Agric.*, vol. 10, fasc. 1, p. 117, ott. 2023, doi: 10.1186/s40538-023-00491-8.
- [3] J.-T. Chen, A. c. di, *Plant and Nanoparticles*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. doi: 10.1007/978-981-19-2503-0.
- [4] N. Joudeh e D. Linke, «Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists», *J Nanobiotechnol*, vol. 20, fasc. 1, p. 262, giu. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01477-8.
- [5] D. Jiménez-Arias *et al.*, «Encapsulation with Natural Polymers to Improve the Properties of Biostimulants in Agriculture», *Plants*, vol. 12, fasc. 1, p. 55, dic. 2022, doi: 10.3390/plants12010055.
- [6] M. Stasińska-Jakubas e B. Hawrylak-Nowak, «Protective, Biostimulating, and Eliciting Effects of Chitosan and Its Derivatives on Crop Plants», *Molecules*, vol. 27, fasc. 9, p. 2801, apr. 2022, doi: 10.3390/molecules27092801.
- [7] M. Malerba e R. Cerana, «Chitosan Effects on Plant Systems», *IJMS*, vol. 17, fasc. 7, p. 996, giu. 2016, doi: 10.3390/ijms17070996.
- [8] M. Sathiyabama e A. Manikandan, «Application of Copper-Chitosan Nanoparticles Stimulate Growth and Induce Resistance in Finger Millet (*Eleusine coracana* Gaertn.) Plants against Blast Disease», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, fasc. 8, pp. 1784–1790, feb. 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.7b05921.
- [9] R. V. Kumaraswamy *et al.*, «Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant», *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 123, pp. 59–69, feb. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.202.
- [10] A. A. I. Mekawey e M. M. El-Metwally, «Impact of nanoencapsulated natural bioactive phenolic metabolites on chitosan nanoparticles as aflatoxins inhibitor», *J Basic Microbiol*, vol. 59, fasc. 6, pp. 599–608, giu. 2019, doi: 10.1002/jobm.201800481.