



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGROALIMENTARI, AMBIENTALI
E ANIMALI

Corso di Laurea in Scienze Agrarie

Tesi di Laurea

Caratterizzazione e applicazioni di nanoparticelle di chitosano quali vettori di biomolecole

Relatore:
Prof. Braidot Enrico

Laureanda:
Albuta Anca

Correlatori:
Dott.ssa Petrusa Elisa
Dott.ssa Scarpin Dora

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO	IV
INTRODUZIONE	1
2 <i>Criticità sulla sostenibilità e soluzioni con tecniche agronomiche avanzate</i>	1
3 <i>Nanotecnologie nell' innovazione con i nanomateriali: possibili impieghi</i>	2
3.1 Vantaggi	3
3.2 Svantaggi	4
4 <i>Nanoparticelle</i>	6
4.1 Proprietà nanoparticelle	6
4.2 Applicazioni potenziali nel sistema pianta	7
4.3 Carriers per la difesa vegetale	12
5 <i>Chitosano</i>	13
5.1 Storia	14
5.2 Proprietà biologiche	15
5.3 Risposte fisiologiche al chitosano nelle piante	17
5.4 Applicazione su piante coltivate	17
6 <i>Nanoparticelle di chitosano</i>	19
6.1 Metodi di sintesi	19
6.2 Fattori che influenzano la sintesi di CHT- NPs	22
6.3 Tecniche di caratterizzazione	26
6.4 Impieghi agronomici	28
7 <i>RNA interference – cenni e applicazione</i>	29
SCOPO DEL LAVORO	32
MATERIALI E METODI	33
1 <i>Degradazione del chitosano</i>	34
2 <i>Filtrazione</i>	34
3 <i>Sintesi NPs</i>	34
4 <i>Purificazione delle NPs</i>	35
5 <i>Funzionalizzazione dsRNA</i>	35
6 <i>Determinazione di dimensione e carica</i>	36
7 <i>Elettroforesi</i>	37
8 <i>Impiego di un agente bagnante</i>	38
RISULTATI	39
DISCUSSIONE	45
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE FUTURE	47
9 <i>Importanza pratica</i>	47
10 <i>Importanza scientifica</i>	47
11 <i>Prospettive future</i>	48
BIBLIOGRAFIA	49

RIASSUNTO

Questo elaborato nasce con lo scopo di affrontare un argomento innovativo in grado di apportare nel mondo dell'agricoltura una modalità alternativa di gestione colturale sostenibile e di larga applicazione.

Si tratta dell'utilizzo di nanotecnologie per rendere più ecosostenibili alcune pratiche agronomiche, come la nutrizione e la protezione delle colture, attraverso l'impiego di biomateriali che incentivino l'economia circolare. In quest'ottica sono state scelte come oggetto di studio le nanoparticelle (NPs) di chitosano.

Questo polimero organico assume rilevanza per la produzione di NPs grazie alle sue numerose proprietà, tra cui la biocompatibilità, la reperibilità quale composto di scarto di prodotti ittici e fungini e la possibilità di essere riciclabile. Esso è in grado di stimolare risposte attive nelle piante in termini di crescita e difesa dai patogeni.

Il lavoro è stato svolto proprio nella prospettiva di sfruttare le peculiari potenzialità delle NPs di chitosano quali carrier di molecole biologicamente attive e verificare l'eventuale effetto sinergico tra il nanomateriale e la molecola trasportata.

L'obiettivo, in particolare, consisteva nella funzionalizzazione di NPs di chitosano con specifiche sequenze di dsRNA, con lo scopo di valutare la possibilità di applicazione futura in ambito fitopatologico attraverso lo sfruttamento del meccanismo di RNA-interference, funzionale a limitare le infezioni da patogeni.

Si riportano i risultati preliminari riguardanti lo sviluppo di un protocollo per la sintesi delle NPs di chitosano, la loro caratterizzazione e le prime informazioni riguardanti la loro interazione con sequenze di dsRNA.

Questo lavoro di tesi si propone, oltre a fornire delle potenziali applicazioni delle nanotecnologie ai fini agronomici, di rimarcare la necessità in questo periodo storico di sviluppare un pensiero critico e disposto a nuove prospettive volte alla soluzione delle problematiche che affliggono il presente e il futuro dell'intero pianeta.

PAROLE CHIAVE: nanotecnologie, pratiche agronomiche, chitosano, biostimolante, nanoparticelle, biomolecole, trattamenti sostenibili, RNA-interference

INTRODUZIONE

1 Criticità sulla sostenibilità e soluzioni con tecniche agronomiche avanzate

L'incremento demografico incide in maniera rilevante sulla gestione delle risorse e sulla continua introduzione in agricoltura di nuovi sistemi colturali per poter sopperire al suo sostentamento.

Il settore primario resta tuttavia il pilastro del sistema in cui l'uomo vive e opera; allo stesso tempo esso gioca un ruolo cruciale nel raggiungimento dell'eco-compatibilità.

Negli ultimi anni, tuttavia, ha mostrato numerose criticità a causa delle emergenze ambientali e del deperimento delle risorse a disposizione.

L'agricoltura evolve di pari passo all'evoluzione tecnologica, ma è anche afflitta dalla presenza di numerosi stress biotici e abiotici che in gran parte sono causati da una gestione antropica poco previdente. I parassiti e gli agenti patogeni delle piante causano riduzioni significative della produzione agricola con perdite fino al 40% ogni anno (Elizabeth A. Worrall et al., 2018).

La gestione dei parassiti è tuttora demandata all'utilizzo di composti di sintesi quali insetticidi, fungicidi ed erbicidi. Questi rimedi in molti casi si dimostrano palliativi e spesso dannosi non solo per le popolazioni di organismi non bersaglio, ma anche per l'incremento delle curve di crescita dei parassiti a seguito della comparsa di fenomeni di resistenza ai fitofarmaci (Elizabeth A. Worrall et al., 2018).

La variazione dell'equilibrio naturale tra organismi positivi e antagonisti a causa di una produzione alimentare elevata danneggia non solo l'ambiente per gli sprechi e il rilascio di sostanze dannose, ma impatta anche sulla biodiversità globale, intesa a diversi livelli, da quella genetica all'interno delle popolazioni, a quella delle specie, fino alla diversità delle comunità e degli ecosistemi (Sala et al., 2000).

La biodiversità, dunque, mantiene un equilibrio a livello ambientale e contribuisce alla nostra economia tramite i servizi ecosistemici di cui è portatrice. Lo sfruttamento intensivo delle risorse e le produzioni eccessivamente monoculturali destabilizzano questo equilibrio e richiedono quantità superiori di fitofarmaci e prodotti dannosi per l'ambiente.

Si tende nell'ultimo periodo a diffondere una sensibilità maggiore rispetto a queste problematiche e si ha anche una motivazione crescente a sviluppare colture economicamente ed ecologicamente sostenibili e ad alta efficienza produttiva.

Dinanzi a questa dicotomia apparentemente inconciliabile tra la necessità di incrementare la produzione e di preservare le risorse naturali, si osserva l'avvento delle nanotecnologie come mezzo innovativo potenzialmente in grado di affrontare questa sfida.

Questo nuovo ambito di ricerca ha già raggiunto livelli avanzati in medicina e farmacologia, ma ha suscitato meno interesse per le applicazioni agricole. L'utilizzo in agricoltura è attualmente in fase di studio per la somministrazione di ormoni vegetali, la germinazione dei semi, la gestione dell'acqua, il trasferimento di geni bersaglio, i nano-sensori e il rilascio controllato di prodotti chimici in agricoltura, in particolare micronutrienti (Elizabeth A. Worrall et al., 2018).

Il paradigma delle nanotecnologie potrebbe favorire con successo la crescita delle piante supportandone un equilibrato sviluppo fisiologico, con lo sguardo rivolto alla produzione, ma senza stravolgere i delicati equilibri naturali degli ecosistemi. I problemi principali quali spreco, inquinamento ambientale e produzione sono avviati ad una potenziale soluzione grazie anche all'introduzione di queste tecnologie in agricoltura, nell'ottica di una forte spinta innovativa.

2 Nanotecnologie nell'innovazione con i nanomateriali: possibili impieghi

Le nanotecnologie si sono sviluppate in modo particolare negli ultimi anni e fanno riferimento all'ingegneria e progettazione di sistemi funzionali su scala atomica e molecolare (Elizabeth A. Worrall et al., 2018). La progettazione di materiali di dimensioni ridotte garantisce un facile impiego e trasportabilità, inoltre permette una buona conservazione e un impatto limitato in termini di volatilizzazione, tossicità e inquinamento ambientale (Elizabeth A. Worrall et al., 2018).

I prodotti di questa nuova sfera di studio sono materiali dalle dimensioni da micrometriche a nanometriche.

L'agricoltura, per consentire il sostentamento di una popolazione mondiale in continuo aumento richiede tuttavia un'attenzione sempre maggiore allo scopo di ridurre le perdite produttive, l'uso eccessivo di pesticidi nonché la degradazione e impermeabilizzazione del suolo.

L'impiego in agricoltura di nanomateriali si prospetta allettante per diversi motivi, tra cui: la possibilità di migliorare l'assunzione di macro- e micronutrienti; il miglioramento dell'efficienza dei trattamenti fitosanitari tramite la riduzione della quantità di principio attivo utilizzato e la sua protezione da agenti alteranti; la veicolazione di agenti bioattivi alternativi ai fitofarmaci; lo sfruttamento dei nuovi metodi molecolari per la difesa dalle malattie (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

2.1 Vantaggi

I potenziali vantaggi delle nanotecnologie sono ascrivibili ad un aumento della produttività agricola con un basso impatto economico ed energetico. I prodotti di tale nuova industria sono nanoparticelle utilizzate come nanofertilizzanti, nanopesticidi, nanoerbicidi e sistemi di somministrazione intelligenti. Possono, inoltre, essere utilizzati come strumenti per il miglioramento genetico delle piante e ingegneria genetica (Mishra et al., 2017).

Infine, soprattutto in campo biomedico, i biomateriali sono materiali funzionali naturali o sintetici utilizzati per interagire con i sistemi viventi per diagnosticare, riparare, sostituire o indurre la rigenerazione di cellule, tessuti e organi.

I nanomateriali in ambito agricolo sono utilizzati per produrre fitofarmaci per la gestione integrata, utilizzando nanoparticelle bio-coniugate tramite incapsulamento, per il rilascio lento di nutrienti, di molecole bioattive o di materiale genetico ai fini del controllo patologico. Ad un controllo più accurato degli stress biotici ed abiotici consegue un miglioramento in termini di deriva delle sostanze nocive, di fertilità del terreno e di un'espressione fisiologica ottimale nelle piante (Worrall et al., 2018).

Si prevede che il mercato mondiale dei bio-pesticidi, derivati cioè da materiali naturali come piante e animali (bioinsetticidi, bio-erbicidi, protettivi incorporati nelle piante) dovrebbe crescere nei prossimi anni. Le caratteristiche chiave dei programmi attuali di "Agricoltura verde" e "gestione integrata dei parassiti" prescrivono la necessità di un uso controllato con approcci rispettosi dell'ambiente per la riduzione della quantità di principi attivi attraverso la somministrazione mirata a siti specifici, riducendo al minimo l'impatto ambientale negativo e prevenendo la contaminazione con residui tossici della catena agroalimentare (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

I nanomateriali includono polimeri naturali a base di lipidi, substrati inorganici mesoporosi come il silicio, nanomateriali a base di argilla, idrossidi stratificati, nanostrutture complesse di carbonio come i fullereni, nanoparticelle di carbonio, nanomicelle, liposomi e nanomateriali basati su molte altre sostanze.

2.2 Svantaggi

L'importanza delle applicazioni nanotecnologiche ha rilevanza in tutti i settori della sicurezza alimentare, attraverso il miglioramento degli imballaggi, delle proprietà nutraceutiche degli alimenti e dei materiali a contatto con gli alimenti di qualità superiore.

L'impiego dei nanomateriali nel sistema agro-alimentare solleva interrogativi pertinenti sul loro potenziale impatto su salute, sicurezza e ambiente. Questo argomento è di fondamentale rilievo per tutta l'organizzazione scientifica ed è chiaramente un punto sensibile per la produzione industriale su larga scala (VandeVoort & Arai, 2012).

Sono stati condotti degli studi anche sulla potenziale tossicità e modifica a livello tissutale, in accordo con il principio di precauzione, in quanto anche queste tecnologie innovative necessitano di un approfondito studio sui loro effetti collaterali, perché potrebbero presentare delle criticità per la salute ambientale e specificatamente dei viventi. Le crescenti preoccupazioni in termini di destino, trasporto, tossicità delle nanoparticelle limitano la completa autorizzazione all'uso e riducono la propensione ad adottare le nanotecnologie nel settore agricolo (VandeVoort & Arai, 2012).

La prospettiva è cercare di mitigare i fattori di rischio e ottimizzare sia la produzione sia la distribuzione delle nanoparticelle. Lo scenario attuale evidenzia da un lato un interesse sempre crescente per questo ambito di indubbe potenzialità, mentre dall'altro si osserva la difficoltà ad una piena liberalizzazione nel mercato. L'attenzione si sta focalizzando su vari studi per comprendere l'interazione delle nanoparticelle con l'agro-ecosistema. La produzione agricola pone il fulcro sul binomio pianta-suolo ed è influenzata da qualsiasi variazione delle proprietà chimico-fisiche. I parametri del sistema suolo come pH, contenuto di materia organica e capacità di scambio cationico incidono sulla biodisponibilità delle nanoparticelle e sulla loro tossicità (Throbäck et al., 2007).

Questi prodotti tecnologici una volta introdotti nel sistema suolo si accumulano e dipendono dalle caratteristiche del terreno in termini sia di impatto con la materia inorganica sia con la comunità biotica. Le modifiche apportate ad un sistema naturale, seppure di natura biologica, preoccupano ed influenzano la percezione da parte dell'opinione pubblica e rallentano la diffusione generalizzata di queste nuove tecniche (Throbäck et al., 2007).

A questo proposito, in studi sull'interazione con la comunità microbica, soprattutto con i *taxa* batterici di *Rhizobiales*, *Bradyrhizobiaceae* (in particolare *Bradyrhizobium*) in risposta al trattamento con nanoparticelle metalliche quali zinco e titanio, si è osservata un'alterazione della comunità batterica e un impatto sulla fissazione dell'azoto e anche sulla decomposizione degli inquinanti organici e dei biopolimeri (VandeVoort & Arai, 2012).

Gli effetti negativi sui microbi del suolo sono stati osservati nei suoli acidi e neutri, mentre in quelli alcalini vi è una tossicità bassa.

Le proprietà del suolo più interessate all'interazione e alla tossicità delle NPs sono il pH e la composizione in sostanza organica. I risultati evidenziano che è di fondamentale importanza identificare le principali variabili del suolo e comprendere l'impatto sulla comunità microbica. Oltre al sistema NPs - suolo è da considerare anche l'altra metà del binomio, cioè la pianta. La dimensione ridotta è certamente un vantaggio in termini sia di produzione sia di impatto ambientale; tuttavia, la rapida mobilitazione all'interno della pianta può rivelarsi anche uno svantaggio. Le nanoparticelle entrano nel corpo della pianta attraverso l'adsorbimento superficiale o attraversando minuscole soluzioni di continuità nei tessuti tegumentali delle piante (definiti cracks in inglese), sfruttando meccanismi di diffusione passiva e poi sono traslocate rapidamente all'interno. La fitotossicità dipende dalla dimensione e dalla concentrazione. Il gruppo di Ma (Ma et al., 2010a) ha dimostrato che le nanoparticelle inferiori a 5 nm possono facilmente essere traslocate mediante i pori della parete cellulare, mentre quelle con dimensioni fino a 20 nm si muovono attraverso i plasmodesmi. La dimensione ridotta potrebbe causare fitotossicità a causa del facile assorbimento e dalla loro traslocazione non selettiva nel sistema vegetale (Mishra et al., 2017).

I protocolli di sintesi delle NPs sono diversi e comprendono tra gli altri: micro-emulsione sol-gel, campi ultrasonici, irradiazione UV fotochimica, tecniche di riduzione. L'attuale area di ricerca tenta di trovare delle soluzioni ecocompatibili che minimizzino l'impatto ambientale e la fitotossicità. Una potenziale soluzione risiede nell'impiego di agenti biologici come batteri, funghi, piante e alghe per la sintesi di nanoparticelle. La superiorità di questo metodo risiede nella possibilità di avere un processo di sintesi rapido, stabile e di fornire NPs più stabili a basso costo. Soppiantando i metodi chimici di produzione, anche l'opinione pubblica sembra più attratta da questa tecnologia. Resta tuttavia una ridotta conoscenza dei rischi connessi a questi prodotti biosintetizzati; quindi, è necessario studiare ulteriormente quest'area stimolante, ma poco esplorata (Mishra et al., 2017).

In ultima analisi si può considerare anche l'aspetto politico e legislativo, per evidenziare le possibili lacune per la completa entrata nel mercato delle nanotecnologie.

Lo scarso sviluppo commerciale dipende dalla presenza di un quadro legislativo ancora incompleto, di orientamenti normativi non chiari e di un'opinione pubblica dubbiosa.

Il principale regolamento UE è il REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) che affronta l'uso di nanomateriali nei prodotti fitosanitari, additivi alimentari e materiali a contatto con gli alimenti. A livello globale solamente l'Unione Europea e la Svizzera hanno emanato con successo disposizioni legislative nano-specifiche per il settore agricolo, alimentare e dei mangimi.

A causa delle divergenze di opinione in tutto il mondo, i prodotti a base di nanoparticelle per scopi agricoli non sono ancora di larga diffusione. È importante migliorare le ricerche future per cercare di colmare lacune di conoscenza e permettere l'introduzione su larga scala di questa nuova tecnologia di frontiera (Mishra et al., 2017).

3 Nanoparticelle

L'organizzazione della vita prevede come unità di base la cellula, ma le interazioni e i processi cellulari naturali hanno luogo a livello subcellulare e a livello molecolare. Le nanoparticelle assumono per questo un potenziale ruolo chiave per la possibilità di comprendere i fenomeni a livello nanometrico, rivelando meccanismi biologici sconosciuti (Saharan & Pal, 2016).

Le nanoparticelle hanno dimensioni perlopiù comprese tra 1 e 100 nanometri, ma possono giungere fino a circa 1 micrometro e sono oggetto di interesse scientifico per le loro proprietà fisico-chimiche. In particolare, sono studiate per l'elevato rapporto superficie/volume e una particolare distribuzione delle cariche elettriche (Saharan & Pal, 2016).

3.1 Proprietà nanoparticelle

Le nanoparticelle si rivelano interessanti nell'ambito biotecnologico proprio grazie a peculiari proprietà che sono state oggetto di indagine di molti lavori scientifici.

Esse sono particelle di materiale inorganico od organico con dimensioni lineari tra 1 nm e 500 nm e possono essere realizzate con componenti metalliche (Au, Ag, ecc.) oppure con materiali semiconduttori (Si, Se, Cd, ecc.) o utilizzando carbonio (es. fullerene); infine possono derivare dalla combinazione di diversi elementi (Alessio, 2017).

Le caratteristiche principali delle NPs sono: la forma, la dimensione, la composizione e il rapporto superficie/volume elevato, che garantisce un'alta reattività grazie ad una spiccata interazione con l'ambiente esterno tramite gli atomi sulla superficie (Alessio, 2017).

Le NPs si trovano principalmente disperse in una soluzione colloidale, vale a dire uno stato disperso composto da aggregati di dimensioni nanoscopiche/microscopiche in una fase liquida; essa è considerata una condizione intermedia tra le soluzioni limpide e le sospensioni.

L'energia dell'interazione con l'ambiente esterno è data dagli elettroni di valenza sulla superficie esterna delle nanoparticelle. L'intensità della forza di richiamo dipende dalla densità di carica di superficie, che a sua volta dipende dalla dimensione e dalla forma (Alessio, 2017).

Le particelle esterne essendo debolmente legate agli ioni metallici sono in grado di rispondere facilmente ad un campo elettrico oscillante nel tempo. Gli elettroni liberi sostengono oscillazioni collettive e si muovono insieme ad una frequenza chiamata "di plasma". Il moto oscillatorio finale prende il nome di plasmone e segue il moto sinusoidale del campo elettrico. Ne consegue che, durante un'analisi spettrofotometrica, il campo elettrico della radiazione incidente genera un dipolo che viene invertito continuamente a causa della radiazione luminosa che si muove di moto oscillante e costringe gli elettroni a vibrare alla frequenza di plasma.

Si ha la frequenza di risonanza quando la frequenza di plasma è uguale alla frequenza della luce incidente ed è solo in questo modo che il campo elettromagnetico è in grado di propagare attraverso un metallo. Tale proprietà è applicabile nell'ambito delle nanoparticelle in quanto anche esse, se costituite con materiale metallico, risentono di questa caratteristica, dovuta non solo al materiale di cui sono costituite, ma anche alle dimensioni e al mezzo che le circonda (Alessio, 2017).

È importante quindi promuovere l'introduzione delle NPs nelle tecnologie avanzate dei materiali, in quanto esse sono in grado di esaltare determinate proprietà rispetto al materiale di partenza.

Per la sintesi di qualsiasi nanomateriale, dunque, è importante considerare questi parametri e cercare la formulazione più idonea al raggiungimento di un'applicazione efficace nei vari ambiti di interesse.

3.2 Applicazioni potenziali nel sistema pianta

Nanoparticelle come biosensori

L'accurata rilevazione e diagnosi dei patogeni delle piante è un passo importante nella corretta gestione delle malattie e aiuta ad eseguire l'applicazione tempestiva di fitofarmaci.

I nanomateriali possono essere utilizzati come biomarcatori o come strumento diagnostico rapido per il rilevamento di patogeni o di sostanze chimiche specifiche sintetizzate in presenza di malattia.

Il vincitore del Premio Nobel P. Ehrlich ha introdotto il concetto di nanoparticelle nel 1906 come "proiettili magici".

Utilizzando le nanoparticelle, il danno ai tessuti vegetali non bersaglio può essere diminuito e il rilascio nell'ambiente di sostanze chimiche non specifiche può essere ridotto al minimo (González-Melend et al. 2008).

Nel corso degli studi è stato dimostrato che in presenza di un attacco alla pianta si osservano cambiamenti fisiologici come l'induzione della difesa sistemica, cioè una risposta generalizzata regolata da metaboliti segnale quali acido jasmonico e acido salicilico. I nanosensori sono in grado di monitorare i livelli di acido ascorbico, acido salicilico nella pianta e nei semi per evidenziare la presenza dell'agente infettivo, grazie all'impiego di sensori CuNP, costituiti da nanoparticelle di rame con elettrodi d'oro (Abd-El salam & Prasad, 2019).

Per l'applicazione di biorilevamento sono stati valutati vari tipi di nanostrutture per sviluppare un biosensore per il riconoscimento di cellule vive, tessuti e microbi. È possibile utilizzare le particelle come carrier e l'immobilizzazione dell'elemento interessato al bio-riconoscimento come DNA o anticorpi; può essere ottenuta usando vari approcci, compreso l'adsorbimento di biomolecole, il legame covalente, l'incapsulamento o una combinazione di metodi.

I nanomateriali utilizzati per la costruzione di biosensori includono nanoparticelle di metallo e ossido di metallo, nanomateriali polimerici. Le nanoparticelle possono essere integrate con altre molecole e metaboliti funzionali quali gli anticorpi per costruire immuno-sensori atti alla rilevazione di infezioni batteriche. (Abd-El salam & Prasad, 2019).

Nanoparticelle come protettivi

I nanomateriali possono essere applicati direttamente su organi come semi, radici e foglie per la protezione da parassiti e agenti patogeni quali insetti, batteri, funghi e virus. Sono state sintetizzate nanoparticelle con componenti metallici come argento, rame, ossido di zinco e biossido di titanio, apprezzate per le proprietà antimicrobiche. Esse hanno un potenziale interessante per la gestione delle malattie fungine e batteriche, in alcuni casi anche virali (Worrall et al., 2018).

Oltre alla protezione superficiale e all'interazione diretta post inoculazione patogena, i nanomateriali costituiti da metalli sono in grado di conferire anche altri elementi implicati invece nella fertilizzazione della pianta. Sono tuttavia oggetto di studio anche i rischi connessi all'uso delle nanotecnologie in campo agronomico per la produzione, la tossicità e l'interazione con il suolo. Un'altra nanoparticella conosciuta di natura biologica è a base di chitosano.

Questo polimero ha proprietà biotiche interessanti come la biodegradabilità, la biocompatibilità, non allergenicità e attività antimicrobica con bassa tossicità per animali ed esseri umani.

Il potenziale delle nanoparticelle di chitosano risiede inoltre nella capacità di indurre resistenza da virus come il mosaico, da infezioni microbiche e in alcuni casi anche da attacchi di insetti (Worrall et al., 2018).

L'azione di questi prodotti può esplicarsi secondo due modalità: le nanoparticelle forniscono esse stesse una protezione delle colture, oppure sono utilizzate come vettori per fitofarmaci di sintesi e altre molecole bioattive alternative, compreso l'RNA a doppio filamento (dsRNA). Le formulazioni a base di nanoparticelle possono essere applicate sulle piante con modalità a spruzzo, per infiltrazione o grazie ad una distribuzione per imbibizione su semi, foglie o radici (Saharan & Pal, 2016).

Le nanoparticelle utilizzate come *carrier* forniscono numerosi vantaggi come: una maggiore persistenza, una migliore solubilità di fitofarmaci scarsamente solubili in acqua, una tossicità ridotta e un aumento dell'assorbimento sito-specifico nel parassita bersaglio. Aumentano, inoltre, l'efficacia dei nanopesticidi incrementando la resistenza alle pressioni ambientali (UV e pioggia), riducendo significativamente il numero di applicazioni, diminuendo la tossicità e i costi.

L'utilizzo delle NPS carrier in ambito agronomico può essere suddiviso in due gruppi a seconda della funzione che viene esercitata sulle piante: il primo riguarda la nutrizione mentre il secondo la difesa delle colture.

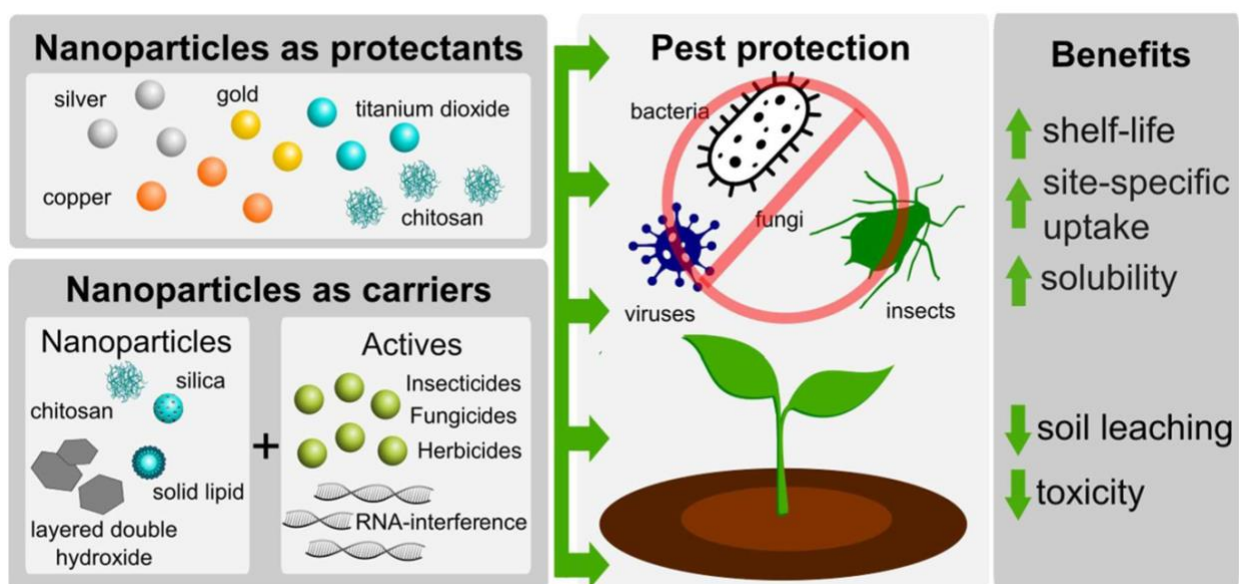


Fig. 1. Nanomateriali come agenti protettivi o vettori per trattamenti alle colture. Questo schema mostra diversi nanomateriali con funzione di protettivi o vettori di principi attivi quali insetticidi, fungicidi, erbicidi o molecole nucleotidiche per l'interferenza a RNA (RNA interference), che hanno come bersaglio un'ampia gamma di parassiti e agenti patogeni. Si evidenziano inoltre i potenziali vantaggi delle applicazioni di nanomateriali, quali una prolungata conservazione delle derrate, un assorbimento specifico nel sito target e una maggiore solubilità, con una contemporanea riduzione al contempo della lisciviazione del suolo e la tossicità (Worrall et al., 2018).

Carriers di fertilizzanti

La produzione di nanoparticelle è utilizzata per modificare formulazioni di fertilizzanti e aumentarne l'assorbimento nelle cellule vegetali in modo da ridurre al minimo la lisciviazione di nutrienti. L'impiego di fertilizzanti nanostrutturati garantisce la delivery mirata e il rilascio lento e controllato. I principi attivi sono rilasciati in risposta a precise esigenze fisiologiche e a fattori scatenanti squilibri. Le attività fisiologiche che sono modulate da queste sostanze sono: la crescita embrionale, l'attività fotosintetica, il metabolismo dell'azoto e la sintesi di carboidrati e proteine e in generale il miglioramento della produttività delle colture (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

Il meccanismo di produzione prevede l'incapsulamento di fertilizzanti o elementi nutritivi e stimolanti all'interno di una nanoparticella realizzata in tre modi: (a) all'interno di materiali nanoporosi, (b) tramite un film sottile polimerico come rivestimento, oppure (c) sotto forma di particelle o emulsioni di dimensioni nanometriche. La pianta riceve il fertilizzante direttamente a seguito di un processo di internalizzazione evitando così la dispersione nell'ambiente (Ma et al., 2010b).

La risposta delle piante all'applicazione di fertilizzanti è variabile e dipende dalla dimensione delle particelle, dalla dose e dalla durata dell'esposizione, dalle specie vegetali e dalle condizioni ambientali. Le nanoparticelle possono essere assorbite attraverso radici, cuticole fogliari o pori stomatici a seconda della modalità di applicazione dei nanofertilizzanti, ovvero come ammendante del suolo, come spray fogliare o come trattamento delle sementi. Le vie di trasporto all'interno della pianta sono diverse e possono coinvolgere il simplasto, attraverso cui le nanoformulazioni entrano nelle cellule legandosi a proteine di trasporto, acquaporine e canali ionici; oppure l'apoplasto attraverso gli spazi intercellulari e lo xilema, come si può vedere nella fig. 2. La morfologia della pianta e le associazioni microbiche influenzano l'assorbimento e la mobilità delle NPs così come anche le proprietà stesse dei nanofertilizzanti (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

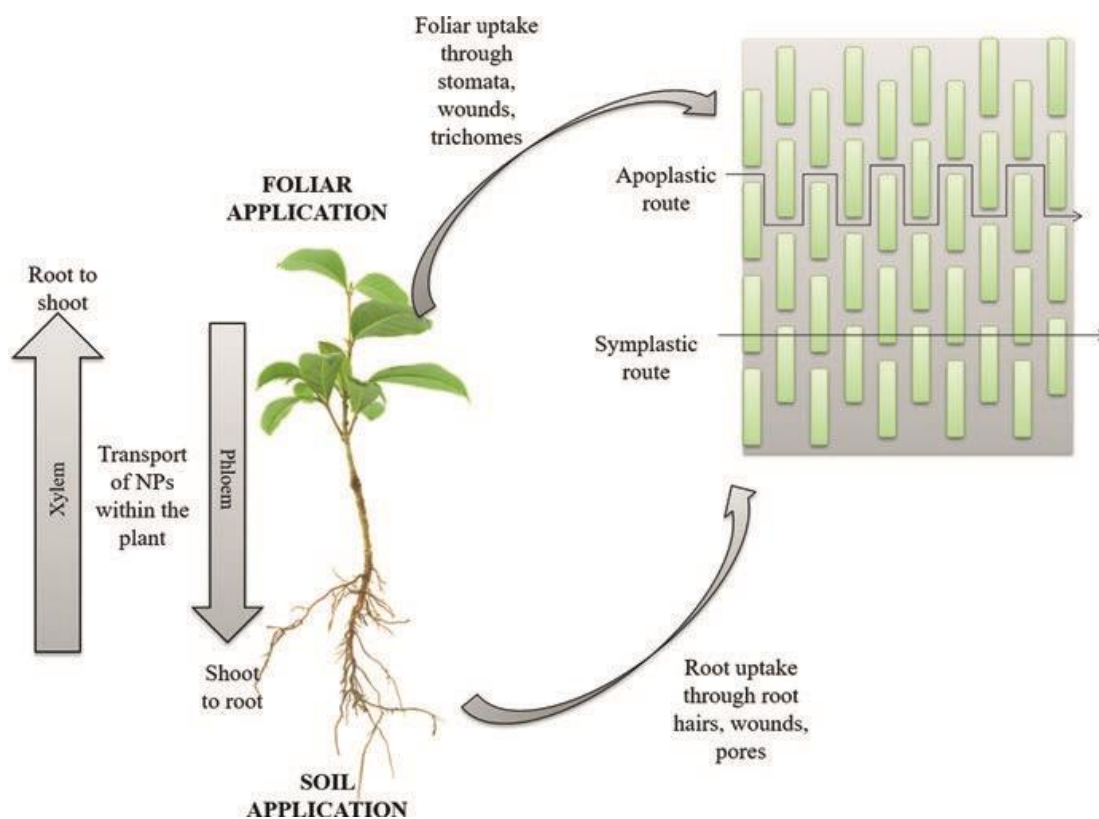


Fig. 2. Via di assorbimento delle NPs distribuite sulla pianta (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

Per quanto riguarda l'entità dei fertilizzanti si tratta di elementi benefici per le piante appartenenti ai macronutrienti come: azoto, urea, NPK, potassio; e micronutrienti come ZnO, CuO, MnO, Fe, idrossiapatite, calcio fosfato $[Ca_3(PO_4)_2]$ e chitosano_NPK (500–60–400 ppm). L'impiego di questi prodotti rispecchiano gli obiettivi delle tecniche di agricoltura di precisione in cui si mira al monitoraggio dell'uso agrochimico di fertilizzanti (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

Le nano-formulazioni permettono una massimizzazione degli indici di uso di nutrienti, aumentando la produttività delle colture. Le principali sfide si focalizzano sul rapporto qualità/quantità delle NPs, l'accumulo nelle piante, l'eco-tossicità a lungo termine, la variabilità chimica o la formulazione per un nutriente specifico (diverse forme di N su scala nanometrica come zeolite nano-porosa, nano-urea a base di chitosano e fertilizzanti N nano-incapsulati) (Abd-Elsalam & Prasad, 2019).

3.3 Carriers per la difesa vegetale

Le nanoparticelle sono comunemente utilizzate come vettori per intrappolare, incapsulare, assorbire o legare molecole attive per sviluppare formulazioni agronomiche efficaci. Di seguito un breve elenco dei nanomateriali più comuni applicati in ambiti biologici:

- Nanoparticelle di silice; sono nanostrutture di forma sferica con fori simili a pori e caricano il principio attivo nel nucleo interno per proteggerlo e fornire un rilascio prolungato, impedendo la degradazione dovuta ai raggi UV. Il silicio serve ad aumentare la tolleranza delle piante contro stress abiotici e biotici.
- Nanoparticelle di chitosano; hanno proprietà idrofobiche e sono spesso mescolate a copolimeri per migliorarne la solubilità; inoltre, grazie a gruppi ionici reattivi presenti nella sua struttura chimica è possibile ottenere diverse trasformazioni. Hanno una buona capacità adesiva, prolungano il tempo di contatto e facilitano l'assorbimento delle molecole bioattive.
- Nanoparticelle lipidiche solide: forniscono una matrice in grado di intrappolare molecole attive lipofile e controllarne il rilascio. Lo svantaggio principale risiede nella bassa efficienza di caricamento.
- I doppi idrossidi stratificati (LDH) sono argille in fogli esagonali con strati di molecole attive intrappolate nello spazio interstrato.

L'utilizzo di questi biomateriali si articola soprattutto nell'ambito dei fitofarmaci (Worrall et al., 2018).

Nanoparticelle come vettori di insetticidi

Il caricamento di insetticidi nelle nanoparticelle è stato attuato già negli anni 2000; gli studi si sono indirizzati ad aumentare la solubilità in acqua riducendo la volatilizzazione e la tossicità. I materiali utilizzati per questo tipo di applicazione sono chitosano e silice e si è osservato anche il rilascio prolungato dell'insetticida. Il principio attivo può essere di vario tipo perché le nanoparticelle si prestano ad inglobare olii essenziali o sostanze inorganiche.

Nanoparticelle come vettori di fungicidi

L'incorporazione all'interno di nanoparticelle è da lungo tempo studiata e come polimeri sono utilizzati sempre silice e chitosano. L'intento è di ridurre i problemi di bassa solubilità in acqua e diminuire la volatilizzazione migliorando la stabilità e fornendo un lento e prolungato rilascio (Worrall et al., 2018).

Nanoparticelle come vettori di erbicidi

Per la realizzazione di carrier di erbicidi è stata utilizzata una vasta gamma di materiali come: strati di argilla di montmorillonite diversamente rivestiti in dipendenza dal pH, carbonato di manganese a guscio cavo, aloisite tubolare nanometrica detta anche caolinite, nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro ammino-attivato e invogli tegumentali di riso di dimensioni nanometriche.

Nanoparticelle e RNAi per la protezione delle piante

Le nanoparticelle possono essere carrier anche di materiale genetico a scopo difensivo per le piante, in particolare è stato studiato il trasporto di molecole di dsRNA. La scoperta del meccanismo dell'*RNA-interference* (RNAi) ha consentito approcci nuovi e innovativi per la gestione degli agenti patogeni (Sherman et al., 2015). Molti processi naturali negli organismi eucarioti, come la regolazione dell'espressione genica, la soppressione dei virus invasori e la protezione generale del genoma hanno dimostrato essere mediati da *small RNAs*. Ciò avviene attraverso un processo ora universalmente chiamato RNAi (Mallory & Vaucheret, 2006).

Il termine RNAi è stato reso popolare da Fire e Mello in seguito al loro lavoro vincitore del Premio Nobel (2006) che ha dimostrato i potenti effetti dell'RNA a doppio filamento (dsRNA) in *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998) e avviato un'intensa ricerca per comprendere i meccanismi alla base dell'RNAi e dei suoi potenziali usi.

L'applicazione topica del dsRNA come materiale tal quale oppure veicolato all'interno di NPs è un'alternativa interessante che verrà affrontata in un paragrafo successivo.

4 Chitosano

Si tratta di uno dei numerosi esempi di nanotecnologie proposti in ambito agrario. Il chitosano è un polimero interessante per la sua capacità di costituire un valido carrier per materiali genetici e agrochimici. La possibilità di incapsulare al suo interno determinate sostanze permette di veicolare nutrienti, molecole bioattive e materiale genetico ai fini di controllo del loro rilascio e stimolazione degli accettori (Li et al., 2020).

È un polimero cationico polisaccaridico che deriva dalla deacetilazione della chitina, processo chimico che prevede il distacco del gruppo acetile dalla molecola tramite l'enzima deacetilasi; grazie alle notevoli potenzialità è diventato oggetto di studio per l'applicazione in diversi ambiti quali medico, farmaceutico e ora anche agrario (Saharan & Pal, 2016).

Il chitosano è un materiale emergente per l'efficienza che la nano-formulazione mostra in virtù dell'area superficiale, dell'induzione di attività di stimolazione per le risposte sistemiche di difesa grazie alla dimensione limitata, all'alta mobilità e bassa tossicità, biodegradabilità, biocompatibilità, all'alta permeabilità e alla capacità di formare film protettivi. Lo sviluppo di nanoparticelle permette di applicare le sue proprietà nella formulazione di vettori efficaci e specializzati (Kashyap et al., 2015).

4.1 Storia

Il materiale di origine del chitosano è la chitina, scoperta per la prima volta nei funghi dallo studioso francese Brano (Li et al., 2020).

La chitina è un biopolimero che si trova in diversi organismi come gusci di crostacei, membrane cellulari di funghi e batteri e costituisce un componente importante degli esoscheletri degli artropodi, dei tendini e dei sistemi escretore, respiratorio e digerente e si trova anche negli iridofori (cellule pigmentate responsabili del cambiamento di colore degli animali dotati di mimetismo) e nell'epidermide dell'occhio di cefalopodi, artropodi e molluschi (Li et al., 2020).

È un omopolisaccaride lineare composto da N-acetilglucosamina, derivato del glucosio, ed è il secondo polisaccaride più abbondante dopo la cellulosa.

Nel 1894 lo scienziato Hopper Seyler usò una soluzione di idrossido di potassio per far bollire la chitina e ottenne la chitina de-acetilata chiamata successivamente chitosano (CHT), che, come tale, non si trova in natura. La de-acetilazione alcalina parziale dà origine a questo polimero lineare, semicristallino, cationico non tossico e biodegradabile composto da (1,4)-2-acetamido-2-deossi-b-D-glucano e (1,4)-2-ammino-2-deossi-b-D-glucano unite da legame 1,4. (Saharan & Pal, 2016).

È dotato di varie proprietà che lo rendono vantaggioso rispetto ad altre biomolecole simili tra cui: solubilità in soluzione acquose e acidi inorganici e organici, con contenuto di glucosamina superiore al 90%, biocompatibilità, biodegradabilità, filmogenicità, tossicità nulla e batteriostaticità; può resistere a infiammazioni e batteri, favorire la guarigione delle ferite e ha resistenza agli acidi, denota proprietà antiulcera e riduce i lipidi e il colesterolo. La sua potenzialità di attivare il sistema immunitario può conferire interessanti sviluppi in diagnostica tumorale ed è consigliato come trattamento in combinazione con farmaci antitumorali (Li et al., 2020).

L'attenzione si è focalizzata su questo materiale dal 1970 per la possibilità di impiego nei biomateriali (Saharan & Pal, 2016).

La disponibilità a fine anni '80 ha permesso la sperimentazione come principio attivo per l'agricoltura. L'idea parte dalle proprietà del CHT di fornire una tolleranza ai patogeni per le piante e indurre la nodulazione radicale (Li et al., 2020).

4.2 Proprietà biologiche

Il chitosano ha una struttura complessa a doppia elica, la sua unità strutturale è il chitobiosio con due unità funzionali (2-acetilaminoglucano e 2-glucosamina). La presenza di numerosi gruppi attivi fornisce alla molecola elevata reattività e consente di modificare la sua struttura tramite diversi tipi di funzionalizzazione quali: carbossilazione, chelazione, acilazione ecc. che la rendono molto versatile. È una sostanza biocompatibile che si scompone gradualmente in amminozuccheri in grado di essere assorbiti dagli organismi (Li et al., 2020).

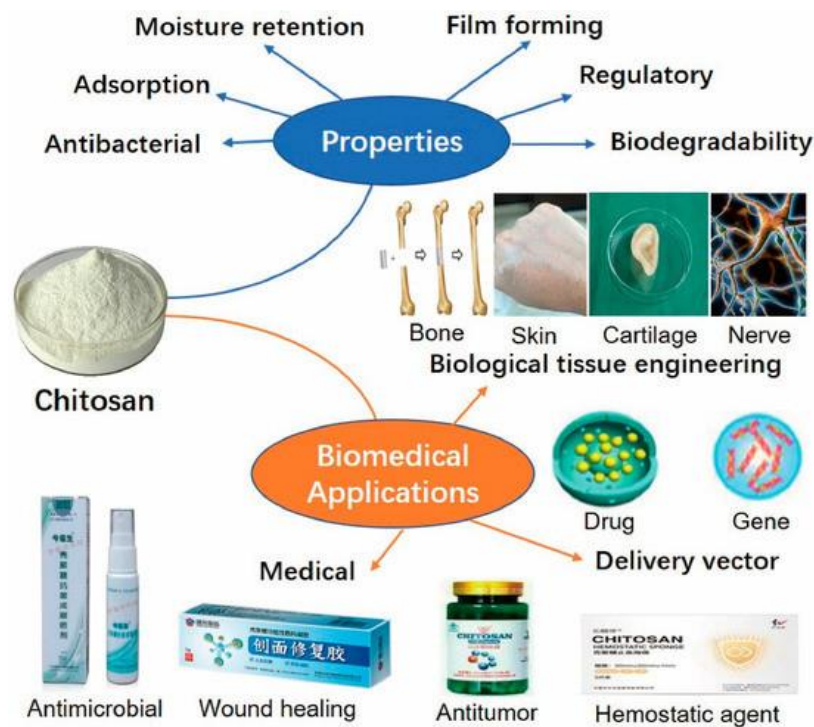


Fig. 3. Proprietà biologiche del chitosano e le corrispettive applicazioni biomediche (Li et al., 2020).

Esso è caratterizzato da una serie di proprietà che definiscono i suoi ambiti di azione, e sono brevemente riportate qui di seguito.

GRADO DI DEACETILAZIONE

Fa riferimento al rapporto tra le unità strutturali 2-acetilaminoglucano (Glc-NAc) e 2-glucosamina (GlcN). La chitina per idrolisi enzimatica e chimica in condizioni alcaline fornisce il chitosano.

Il grado di de-acetilazione (DD, quantità di gruppi acetili idrolizzati) influenza il numero di gruppi amminici liberi lungo le catene e nel CH per definizione deve essere inferiore al 50%. Il DD della chitina varia, a seconda della preparazione, dal 60 al 100% e il peso molecolare da 300 a 1000 kDa e può essere determinato attraverso varie tecniche: la titolazione potenziometrica del pH e la spettroscopia IR sono tra le più usate (Saharan & Pal, 2016).

DEPOLIMERIZZAZIONE DEL CHITOSANO

A pH neutro il CH ha un'elevata viscosità e una scarsa solubilità che ne limitano l'uso; quindi, si utilizza la molecola a basso PM tramite depolimerizzazione chimica, fisica o enzimatica.

Il processo chimico della riduzione del peso molecolare del CH consiste in un'idrolisi acida o in una reazione ossidativa con HNO₂ che attaccando il gruppo amminico della D-glucosamina è in grado di scindere il legame glicosidico e produrre oligomeri di dimensioni ridotte.

Il processo fisico impiega radiazioni come raggi gamma Co-60 producendo dimeri o trimeri, ma con basse rese.

La depolimerizzazione enzimatica infine consiste nell'uso di enzimi specifici come chitinasi, glucanasi e chitosanasi, oppure non specifici per produrre chitosano solubile a basso peso molecolare (Saharan & Pal, 2016).

CARICA DI SUPERFICIE E MODIFICA FUNZIONALE

La molecola di chitosano è caratterizzata da una reattività dei gruppi amminici primari in posizione C-2 e dei gruppi idrossilici in posizione C-6 delle unità di glucosamina. Per migliorare proprietà del polimero quali l'idrosolubilità, la stabilità e la capacità di adsorbimento si adotta la degradazione ad oligosaccaride del chitosano. Si utilizzano poi una serie di modifiche chimiche e fisiche (ossidazione, chelazione, esterificazione, carbosilazione, alchilazione e reticolazione) al fine di massimizzare la processabilità, l'attività antimicrobica e la capacità di interagire con altre molecole per applicazioni specifiche (Li et al., 2020).

Il processo più comune consiste nella reticolazione, in cui l'aggiunta di agenti reticolanti quali gluteraldeide, gliosale e polianione tri-polifosfato (TPP) aumenta la capacità di adsorbimento del chitosano.

STABILITÀ E VISCOSITÀ

La stabilità in termini di variazione della viscosità del chitosano dipende dal suo peso molecolare che può essere migliorato tramite un accorciamento della molecola.

È stato scoperto che la dispersione di nanochitosano con alto peso molecolare è più stabile e meno reattiva di quella ottenuta con chitosano a basso PM.

La viscosità della soluzione polimerica è una misura diretta della lunghezza della catena e del peso molecolare; nel caso della dispersione del nanochitosano, essa diminuisce con la riduzione della dimensione delle particelle, in quanto una elevata dimensione delle particelle aumenta la viscosità.

L'incorporazione di un agente reticolante con il TPP altera i parametri fisico-chimici, ovvero la dimensione delle NPs, il potenziale zeta e la resa di produzione, che a cascata influiscono sulle sue proprietà funzionali.

È importante considerare tutti parametri al fine di ridurre la dimensione delle nanoparticelle, formando una struttura compatta durante il processo di reticolazione (Saharan & Pal, 2016).

4.3 Risposte fisiologiche al chitosano nelle piante

Nei primi esperimenti condotti su pisello (*Pisum sativum* L.) e pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è stato dimostrato che il CHT attiva una risposta difensiva contro gli stress abiotici e biotici. L'interazione della pianta con CHT comporta un accumulo di perossido di idrogeno, che induce la sintesi di metaboliti secondari come lignina, polifenolici e fitoalessine, sostanze utilizzate per la difesa. La proprietà biostimolante non si esplica soltanto con questi effetti, ma determina altri cambiamenti fisiologici tra cui: apposizione di callosio, aumento di calcio citosolico, attivazione di MAP-chinasi, alterazione della cromatina, sintesi di alcaloidi e regolatori (acido abscissico, acido jasmonico) (Malerba & Cerana, 2016).

Attraverso gli studi dell'interazione pianta-CHT si è potuto dimostrare che tale polimero effettivamente è in grado di biostimolare e indurre delle risposte difensive nelle diverse specie vegetali. Non sono ancora del tutto svelati i meccanismi con cui eserciti l'attività antimicrobica ma è noto che il CHT è in grado di influenzare direttamente l'espressione genica, e di innescare risposte biochimiche di difesa tramite reazioni enzimatiche a catena. A seguito del riconoscimento della molecola ci sono diverse molecole-segnale coinvolte nella risposta tra cui: composti reattivi dell'ossigeno, ossido nitrico, calcio e fitormoni; queste risposte sono in grado di combattere e sconfiggere il patogeno generando inoltre una resistenza nelle piante (Malerba & Cerana, 2016).

4.4 Applicazione su piante coltivate

Il CHT è stato applicato su piante cerealicole, ornamentali, da frutto e medicinali.

Essendo un materiale simile alla chitina, componente della parete cellulare nei funghi, è in grado di avere un effetto fungicida su miceti a diversa composizione nella parete.

L'idea di sfruttare questa molecola nasce in seguito alla necessità di fronteggiare il problema degli attacchi patogeni.

I fungicidi di sintesi restano ancora la soluzione più utilizzata, ma lo sviluppo di una cultura della sostenibilità potrebbe garantire al chitosano un ruolo promettente. È stato dimostrato che esso possiede attività fungicida ad ampio spettro per numerosi funghi fitopatogeni tra cui: *Alternaria kikuchiana* nella pera, *Botrytis cinerea* nella vite, *Rhizoctonia solani* nel riso e *Fusarium oxysporum* nel fagiolo e molti altri patogeni (Malerba & Cerana, 2016).

Sebbene l'attività antifungina sia più pronunciata rispetto all'attività antimicrobica, è stato osservato che il chitosano è più efficace contro i Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi, a causa della diversa composizione della parete cellulare batterica che influenza diversamente l'ingresso. L'azione antivirale è stata meno studiata, ma di recente è stata invece scoperta l'azione protettiva contro altri organismi patogeni come gli insetti (Malerba & Cerana, 2016).

L'applicazione sulle piante del polimero di interesse non ha solamente effetto protettivo da stress biotici, ma è anche biostimolante. Esso esplica tale proprietà tramite il miglioramento della crescita e produttività nelle piante di pomodori, nell'origano greco (Malerba & Cerana, 2016).

L'aggiunta di CHT al suolo aumenta l'altezza, il diametro della chioma e l'area fogliare. È in grado di migliorare la produzione nel grano e migliora l'embriogenesi delle microspore nella colza ed evidenzia effetti positivi anche su specie floricole. Il chitosano migliora la capacità di germinazione dei semi, la lunghezza delle radici, l'altezza della piantina, l'indice di vigore del seme (SVI) e aumenta l'attività delle radici. Potenzia anche le risposte fisiologiche come la sintesi della clorofilla, la fotosintesi e l'allargamento dei cloroplasti. Inoltre, influisce direttamente sulla nutrizione delle piante migliorando la fertilità del suolo, migliorando la fissazione dell'azoto e aumentando l'assorbimento di minerali (Malerba & Cerana, 2016).

I composti a base di chitosano possono essere applicati su foglie, frutti come cetriolo, mela, agrumi, kiwi, pesca, pera, fragola e ciliegia dolce. La presenza del chitosano sulla superficie riduce la perdita di acqua, inibisce lo scambio di gas, diminuisce la perdita di nutrienti e previene la crescita di microrganismi sul frutto e migliora il metabolismo antiossidante (Malerba & Cerana, 2016).

Le proprietà aggiuntive di alto valore contrassegnano il chitosano come biopolimero altamente richiesto in vari ambiti.

Con il progresso della nanotecnologia, il chitosano è destinato a diventare protagonista nella realizzazione di nanomateriali che sono adattati per una futura applicazione nelle piante.

La moderna sperimentazione sta evidenziando il vasto potenziale del nanochitosano rispetto al bulk material, cioè al chitosano non modificato, in quanto presenta delle caratteristiche fisico-chimiche superiori che forniscono, tra le altre, proprietà biologiche utili per la difesa delle piante. (Saharan & Pal, 2016)

5 Nanoparticelle di chitosano

Le nanoparticelle di chitosano sono scelte per questo lavoro per le loro potenzialità e per la superiorità rispetto al materiale originale. Vengono di seguito analizzate nella loro complessità per fornire un quadro generale sulla loro sintesi e applicazione in ambito agronomico.

5.1 Metodi di sintesi

Per quanto riguarda la produzione delle NPs di chitosano sono stati studiati diversi metodi per ottenere la formulazione più idonea e sfruttare in maniera completa le loro potenzialità. Di seguito è presentata una rassegna dei principali metodi di sintesi (Saharan & Pal, 2016).

- ***METODO EMULSION CROSS-LINKING (RETICOLAZIONE)***

Il metodo persegue innanzitutto la realizzazione di un'emulsione composta da goccioline microscopiche che sono stabilizzate a dimensioni nanometriche tramite reticolazione. L'emulsione si ottiene mescolando una soluzione acquosa di chitosano nell'olio con l'aggiunta di un tensioattivo adatto. La dimensione delle goccioline è controllata regolando la quantità dei composti impiegati. La reticolazione successivamente impiega un agente reticolante come glutaraldeide, formaldeide, acido solforico e attraverso agitazione si ottiene la nano-formulazione. La soluzione è filtrata e lavata con esano, seguito da trattamento con alcol per rimuovere l'olio; il tensioattivo è rimosso tramite precipitazione con sali e centrifugazione. I precipitati possono essere liofilizzati per ottenere il nanomateriale fine.

La tecnica usata comporta degli svantaggi dovuti alla realizzazione dell'emulsione, alla rimozione del tensioattivo e alla complessità dei vari lavaggi; tuttavia, mostra anche dei vantaggi riconducibili all'elevata efficienza di caricamento, al rilascio controllato con maggiore biodisponibilità e alla modulazione delle dimensioni (Saharan & Pal, 2016).

- ***METODO EMULSION-DROPLET COALESCENCE***

Questo metodo riprende i principi dell'emulsione e precipitazione, senza utilizzare il processo della reticolazione.

Si preparano due emulsioni: una con olio, una soluzione acquosa di chitosano e principio attivo, mentre l'altra è composta da una soluzione acquosa di chitosano con NaOH. Entrambe sono miscelate ad alta velocità per indurre collisioni casuali tra le goccioline e la loro precipitazione porta ad ottenere particelle di piccole dimensioni. In questo caso sono esposti sul nanomateriale gruppi amminici reattivi che possono legare principi attivi e ciò garantisce una maggiore efficienza di caricamento rispetto al metodo descritto in precedenza (Saharan & Pal, 2016).

- ***METODO IONIC GELATION (GELIFICAZIONE IONICA)***

Questa formulazione è il metodo più comunemente utilizzato per la sintesi di nanoparticelle di chitosano stabili, non tossiche e prive di solventi organici, ed è il metodo impiegato anche per la sperimentazione di questa tesi. La sintesi delle NPs di chitosano (chiamate in seguito Chit-NPs) si basa sulle interazioni elettrostatiche tra gruppi amminici carichi positivamente e agenti reticolanti carichi negativamente. In questa procedura viene sciolto in una soluzione acida il chitosano e mescolato sistematicamente in una soluzione acquosa di agenti reticolanti con carica negativa. In questo modo si evita la reticolazione chimica, ma si attua un'azione fisica reversibile mediante interazione elettrostatica. Come crosslinker (agente reticolante) si utilizza il tripolifosfato (TPP), un polianione, interessante perchè non presenta tossicità. Esso è aggiunto goccia a goccia sotto costante agitazione alla soluzione acida di chitosano. Il processo di interazione consiste in una gelificazione ionica che precipita per formare particelle. Le dimensioni e la carica superficiale delle NPs sono influenzate dalle dimensioni e dai rapporti dei vari reagenti. Importante, inoltre, considerare la de-acetilazione del chitosano per la formazione delle NPs, in quanto più elevata è la percentuale di materiale de-acetilato maggiore è l'interazione elettrostatica; quest'ultima è regolata anche dalla velocità di agitazione per la possibilità di interazione tra cariche opposte. I vantaggi di questa formulazione risiedono nella possibilità di realizzare NPs attraverso una procedura priva di elementi tossici e sostanze di sintesi; inoltre non comporta alcun passaggio aggiuntivo per la rimozione dell'olio e del tensioattivo, rendendo il processo più preciso e affidabile.

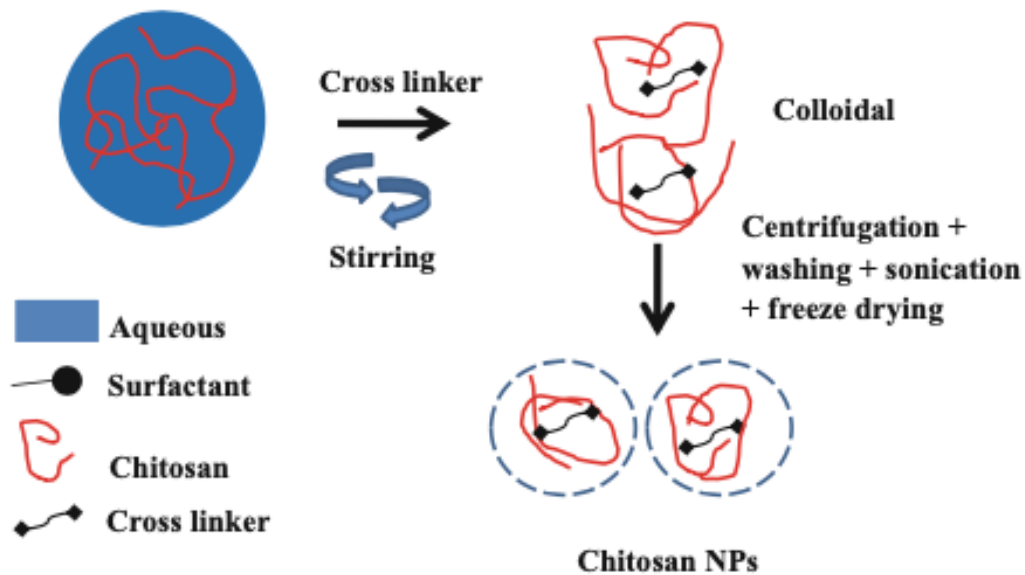


Fig. 4. Metodo di gelificazione ionica (Saharan & Pal, 2016).

- **METODO MICELLARE INVERSO**

Il principio consiste nel generare micelle inverse termodinamicamente stabili, mono-disperse e isotropiche. Per il metodo micellare inverso è necessario miscelare un solvente organico e un tensioattivo adatto per la preparazione di una soluzione di goccioline di micelle microscopiche e fini. Le soluzioni acquose acide di chitosano assieme al principio attivo da incapsulare sono aggiunte alle micelle inverse isotropiche in agitazione costante. Successivamente si aggiunge un agente reticolante che porta alla formazione di particelle di dimensioni nanometriche. Per giungere al materiale secco sono necessari dei processi di evaporazione del solvente organico e la precipitazione del tensioattivo. È un metodo utile per la realizzazione di NPs nell'intervallo di 50-100 nm rispetto ad altri metodi in cui si superano i 200 nm; tuttavia, è caratterizzato da passaggi laboriosi e impegnativi.

- **METODO DELLA SETACCIATURA**

L'obiettivo principale di tale protocollo consiste nella realizzazione di NPs di chitosano stabili e mono-disperse per applicazioni raffinate. Nella ricerca della formulazione più idonea non è stato ancora trovato un metodo per la sintesi di particelle delle dimensioni desiderabili. È stato perciò proposto il filtraggio dei nanomateriali attraverso un setaccio di dimensione fissa in modo da accumulare il materiale filtrato con percentuali più elevate di NPs monodisperse.

- ***METODO DELL' ESSICAZIONE A SPRUZZO (SPRAY DRYING)***

Questo metodo è utilizzato per la sintesi di polvere secca, granuli di pellet di nanoparticelle di chitosano. La soluzione acquosa acida insieme all'agente reticolante all'ingrediente attivo è sospinta attraverso un ugello con un flusso di aria calda.

L'aria compressa induce la reticolazione e la riduzione dimensionale del materiale: il solvente evapora e si ottiene una forma secca di chitosano.

I parametri di regolazione delle dimensioni delle NPs comprendono la dimensione dell'ugello, la velocità dell'aria compressa, la sua temperatura e i gradi di reticolazione del chitosano. I vantaggi di questo metodo risiedono in un costo limitato del processo, nella possibile applicazione per la sintesi di particelle senza reticolazione e nell'efficienza dell'incapsulamento (Saharan & Pal, 2016).

5.2 Fattori che influenzano la sintesi di CHT- NPs

A fronte della messa a punto dei vari metodi per la realizzazione di NPs, assume sempre più rilevanza il problema dell'impatto sulla salubrità dell'ecosistema, che spinge a elaborare nuove strategie per sviluppare nano-formulazioni ecocompatibili, biodegradabili e non tossiche nei confronti della crescita e protezione delle piante. Sono valorizzati dunque i metodi caratterizzati da una sintesi stabile, ad elevata resa, non tossica e priva di solventi organici.

La formulazione più allettante si è osservata nel metodo di "gelificazione ionica" in cui le NPs sono prodotte tramite interazioni elettrostatiche, senza l'aiuto di solventi chimici tossici. Con l'utilizzo del sale tripolifosfato di sodio polianionico (TPP) come agente reticolante si ottiene un legame chimico con il chitosano, evitando agenti emulsionanti e reticolanti chimici. Il metodo ha acquisito un interesse crescente grazie alle sue caratteristiche ed è tra i più studiati e utilizzati; esso è stato scelto anche per la sintesi delle NPs in questo elaborato di tesi.

Sono di seguito riportati alcuni fattori che influenzano i caratteri fisico-chimici dei nanomateriali a base di chitosano, al fine di ampliare i dettagli specifici per la loro sintesi.

- ***CONCENTRAZIONE DI CHITOSANO E TPP***

Il valore della concentrazione al momento della sintesi chiaramente influenza le caratteristiche fisico-chimiche delle NPs. In condizioni acide, il chitosano possiede dei gruppi amminici che sono protonati causando una repulsione elettrostatica tra le molecole che ne impedisce l'agglomerazione.

Il materiale, tuttavia, è influenzato anche da una seconda interazione che fa riferimento al legame idrogeno tra le catene di polimeri (interazione intermolecolare) che tende a riavvicinarle. Il rapporto tra queste due interazioni determina la dimensione delle NPs. Ulteriori studi effettuati per ottimizzare la sintesi hanno dimostrato che intervalli di concentrazione di chitosano e TPP, compresi rispettivamente tra 2,0-1,5 mg/ml e 1,0-0,5 mg/ml permettono l'ottenimento di particelle su scala nanometrica (Saharan & Pal, 2016).

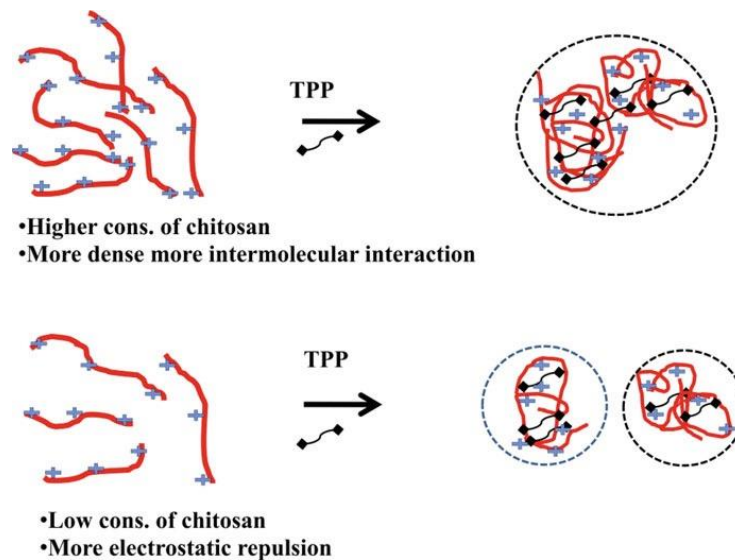


Fig. 5. Effetti della concentrazione del chitosano e del TPP sulle dimensioni delle CHT-NPs (Saharan & Pal, 2016).

Valori più elevati di chitosano aumentano i legami idrogeno generando particelle più grandi; allo stesso modo concentrazioni di TPP elevate diminuiscono il potenziale zeta delle NPs, poiché esso dipende per la maggior parte dai gruppi amminici positivi liberi che l'agente reticolante impegna in legami idrogeno. La stabilità in questo modo cala a seguito di una riduzione di repulsione elettrostatica, che causa un'aggregazione delle nanoparticelle dotate di potenziale zeta nullo o molto basso (Kashyap et al., 2015).

• **EFFETTO DEL RAPPORTO DI MASSA DI CHITOSANO E TPP**

Per la sintesi è importante conoscere il rapporto di massa tra il substrato e l'agente reticolante; quale riferimento si usa l'esperimento condotto da Fan et al. (2012). Esso consiste nel mescolare diversi volumi di TPP in 10 ml di chitosano. Il risultato evidenzia che un aumento del volume di TPP da 2,5 a 3,5 ml ha aumentato le dimensioni delle NPs e anche il potenziale zeta è diminuito a causa della neutralizzazione dei gruppi amminici protonati da parte degli anioni TPP. Il rapporto, dunque, più comunemente utilizzato per ottenere le nanoparticelle di chitosano deve essere compreso nell'intervallo tra 2,5: 1 e 5:1 (Kashyap et al., 2015).

- **EFFETTO DEL pH DELLA SOLUZIONE DI REAZIONE**

Il chitosano si solubilizza facilmente in ambiente acido a bassa concentrazione, ma è insolubile a pH neutro o alcalino. La densità di carica superficiale è fortemente influenzata dal pH in quanto gli ioni H^+ protonano i gruppi amminici del chitosano (Saharan & Pal, 2016). L'effetto del pH sulla dimensione delle particelle e sul potenziale zeta è stato spiegato da Gan e collaboratori (2005) (Gan et al., 2005).

Per quanto riguarda la componente dimensionale, durante la reazione di reticolazione si è osservato che un graduale aumento del pH quando eccede valori di 5,5 provoca un aumento delle dimensioni e della precipitazione. Invece, con valori di pH inferiori a 5 le dimensioni erano nettamente inferiori.

Rispetto al potenziale zeta invece si evidenzia una relazione inversa rispetto alle dimensioni: infatti con valori di pH inferiori a 5 il potenziale zeta aumenta a causa della protonazione del chitosano. Per ottenere una dimensione media delle particelle contenuta e un potenziale zeta positivo netto il valore ideale di acidità richiesto corrisponde ad un pH attorno a 4,5-5,5 (Fan et al. 2012).

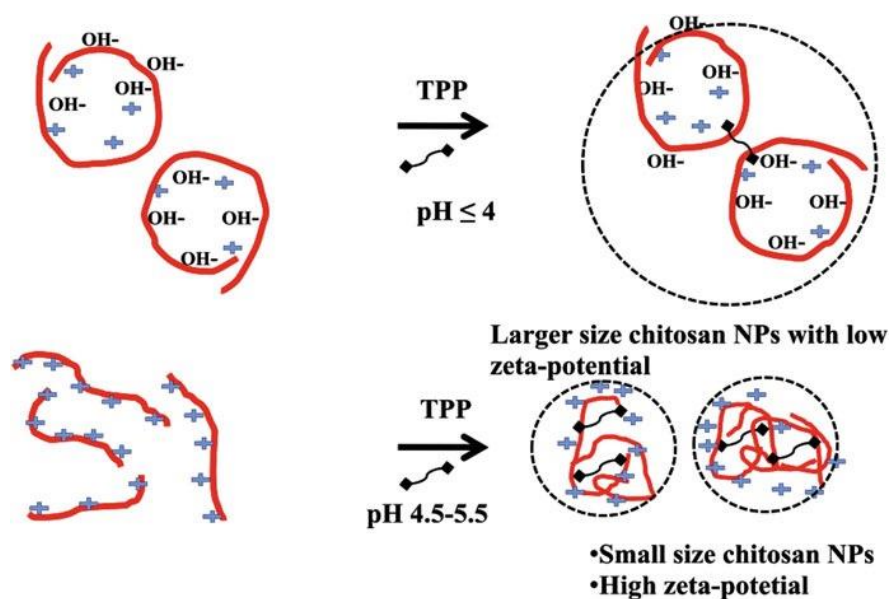


Fig. 6. Effetti del pH sulle dimensioni e potenziale zeta delle CHT-NPs (Saharan & Pal, 2016).

- **EFFETTO DELLA CONCENTRAZIONE DI ACIDO ACETICO**

L'acido acetico è utilizzato per sciogliere il chitosano e le variazioni di concentrazione sono state studiate per comprenderne l'effetto nella formazione delle nanoparticelle.

Esso aumenta la concentrazione di ioni H^+ che rende la soluzione conduttiva e permette la reticolazione con il TPP. È importante considerare sia la dimensione delle NPs sia la monodispersione; nel caso dell'acido acetico presente in concentrazione inferiore (0,1 mg/ml) si è osservata una interazione variabile tra TPP e chitosano, causa insufficiente reticolazione. All'aumentare della quantità di acido, al contrario, si ottiene un numero di particelle più piccole, ma a causa di un aumento dei controioni, che mascherano i gruppi amminici (carichi) coinvolti nei punti di reticolazione, alcune si aggregano formando una distribuzione granulometrica più ampia quando il pH è decisamente acido (vedi fig. 6). Dagli esperimenti presentati in letteratura si osserva che la concentrazione idonea sia di circa 0,2 mg/ml (Saharan & Pal, 2016).

- **EFFETTO DELLA TEMPERATURA DELLA SOLUZIONE DI CHITOSANO**

Anche il fattore termico influenza la sintesi di nanoparticelle. È stato notato che al diminuire della temperatura nella soluzione di chitosano si verifica un aumento del volume specifico della molecola e una diminuzione della flessibilità. Ciò è dovuto al fatto che i legami idrogeno tra i gruppi polari del chitosano e le molecole di acqua creano uno scudo di idratazione attorno alle particelle, che ne impedisce l'aggregazione. A basse temperature la rigidità del chitosano è elevata, fattore che è favorevole alla stabilizzazione delle strutture delle NPs (Saharan & Pal, 2016).

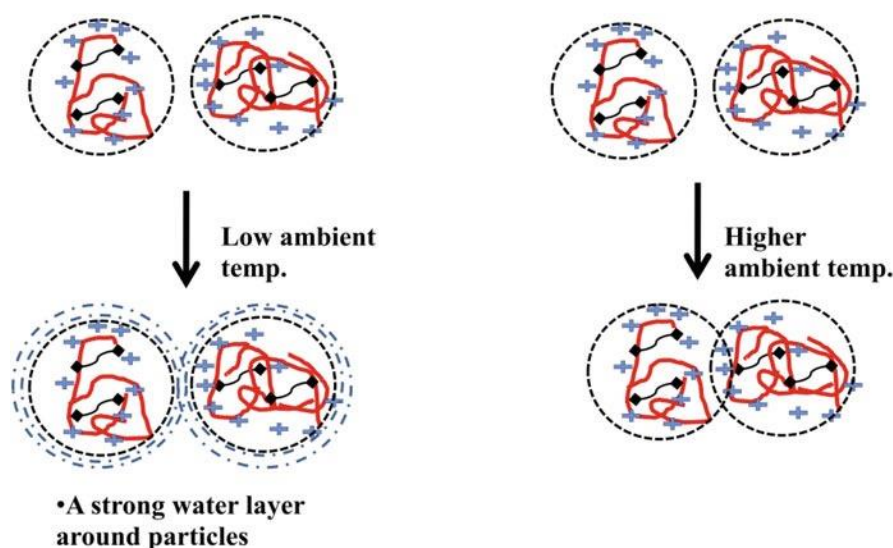


Fig. 7. Effetto della temperatura sulla sintesi delle NPs (Saharan & Pal, 2016).

- ***EFFETTO DELL'AGITAZIONE SULLA RETICOLAZIONE***

L'agitazione durante le interazioni ioniche tra il gruppo amminico e il TPP elude l'aggregazione delle particelle e permette di ottenere una distribuzione dimensionale migliore e un legame simmetrico. L'aumento della velocità da 200 a 600 giri/min permette una reticolazione più efficace, impedendo quella intermolecolare con il chitosano in eccesso.

Velocità superiori, tuttavia, eliminano le forze repulsive e le interazioni simmetriche formando particelle di dimensione maggiore (Saharan & Pal, 2016).

5.3 Tecniche di caratterizzazione

A seguito della sintesi delle nanoparticelle è fondamentale misurare vari caratteri chiave come la dimensione media, la distribuzione, la densità di carica (potenziale zeta), l'indice di polidispersione (PDI), il legame chimico, la forma e la topografia delle particelle. Le NPs di chitosano sono state impiegate per l'incapsulamento di vari materiali, tra cui farmaci micronutrienti, molecole biologiche e metalli che possono essere caratterizzati con lo spettrofotometro ad assorbimento atomico.

DIMENSIONE DELLE PARTICELLE, POTENZIALE ZETA E INDICE DI POLIDISPERSIONE

Per misurare la dimensione delle particelle in sospensione si utilizza la tecnica della diffusione dinamica della luce (Dynamic Light Scattering, DLS), che misura la velocità delle particelle, influenzata da temperatura, viscosità e dimensione.

Le particelle seguono il moto browniano causato dalla collisione con le molecole di solvente e la velocità è definita dal coefficiente di diffusione traslazionale (D) che può essere convertito in dimensione delle particelle usando l'equazione di Stokes-Einstein:

$$dH = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Dove dH = diametro idrodinamico, k = costante di Boltzmann, T = temperatura assoluta, η = viscosità del solvente e D = coefficiente di diffusione traslazionale.

Il DLS stima le fluttuazioni dipendenti dal tempo nell'intensità di scattering (dispersione) per determinare il coefficiente di diffusione traslazionale (D) e successivamente calcolare la grandezza idrodinamica, che dipende dalla dimensione delle particelle, chiamata anche diametro idrodinamico medio. Questa grandezza misura il diametro della particella insieme allo strato di molecole d'acqua o ioni o componenti del mezzo adesi sulla superficie. I gruppi amminici del chitosano forniscono una carica netta positiva che interagisce con le eventuali sostanze anioniche, determinando così la diffusione del mezzo e il diametro idrodinamico. (Saharan & Pal, 2016)

Il PDI (indice di poli-dispersione) invece fornisce un'indicazione sulla distribuzione dimensionale delle particelle; assume valori compresi nell'intervallo tra 0 e 1; valori superiori a 1 indicano particelle altamente poli-disperse, mentre se sono inferiori semplicemente identificano particelle mono-disperse. La variabilità del valore di PDI è dovuta ai diversi rapporti di massa e concentrazioni di chitosano e TPP durante la preparazione, secondo i diversi metodi di sintesi utilizzati, mantenendo tuttavia una dimensione media tra 50 e 750 nm. L'omogeneità della distribuzione delle particelle è importante al momento di una funzionalizzazione e le interazioni tra i vari componenti sono rilevabili attraverso la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR); lo spettro risultante rappresenta l'assorbimento e la trasmissione molecolare delle radiazioni infrarosse, creando un'impronta molecolare delle particelle. Un altro aspetto importante è la carica superficiale, nota come potenziale zeta. Esso è dato dalla differenza di potenziale tra le superfici delle particelle in sospensione. (Saharan & Pal, 2016)

La sua rilevanza risiede nella stabilità delle nanoparticelle, maggiore è la carica positiva maggiore è la repulsione tra le particelle, che restano separate senza creare agglomerati. L'attività biologica delle particelle è influenzata, inoltre, dal potenziale zeta, in quanto il chitosano, carico positivamente, ha una maggiore affinità verso le membrane biologiche ed altri anioni (Saharan & Pal, 2016). I nanomateriali a base di chitosano hanno potenziali zeta positivi perché i gruppi amminici e idrossilici del CHT formano legami idrogeno con i gruppi ossidrilici dell'acqua. Con l'aggiunta di TPP, il potenziale zeta diminuisce gradualmente e ad un certo livello la carica positiva sulla particella del CHT è neutralizzata dalla carica negativa del gruppo fosfato. La graduale diminuzione è dovuta alla reticolazione tra i gruppi fosfato del TPP e i gruppi amminici del chitosano. Per verificare le dimensioni, la forma e la topografia dei nanomateriali si possono effettuare analisi con la microscopia elettronica a trasmissione o a scansione (TEM e SEM). (Saharan & Pal, 2016)

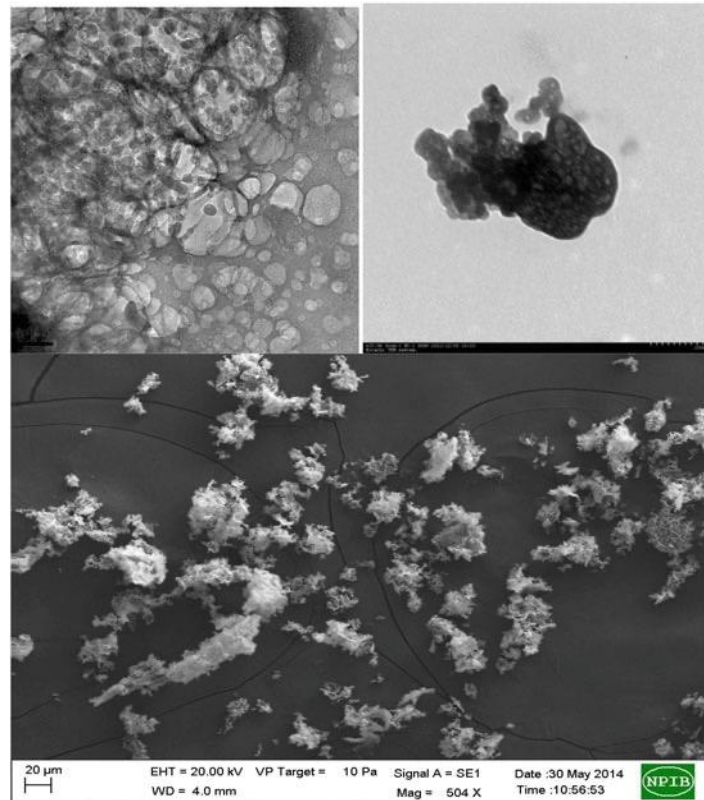


Fig. 8. NPs visualizzate al microscopio TEM e SEM (Saharan & Pal, 2016).

5.4 Impieghi agronomici

I dispositivi derivati dalla nanotecnologia sono già impiegati come sistemi vettori di sostanze per combattere i patogeni delle colture agrarie. Il chitosano risulta versatile per la produzione di nanoparticelle in grado di veicolare sulle piante sostanze chimiche e nutrienti.

Esso adsorbe facilmente sull'epidermide di foglie e steli e prolunga il tempo di contatto, favorendo l'acquisizione di molecole bioattive. Qui di seguito si riporta una breve sintesi dei potenziali materiali utilizzati per la funzionalizzazione di nanoparticelle di chitosano con funzione di trasporto:

- **Pesticidi**

I principi attivi sono incapsulati in nanoparticelle per ovviare al problema della solubilità e della deriva.

- **Fertilizzanti e micronutrienti**

Per ottenere un miglioramento della resa è necessario avere un'elevata efficienza di utilizzo dei nutrienti per la crescita, come pure delle risorse idriche. C'è un'elevata dispersione di fertilizzanti causa il mancato utilizzo o la lisciviazione e si traduce in un forte inquinamento ambientale.

La formulazione di nanoparticelle con chitosano e materiali funzionalizzanti come azoto granulare, fosforo e potassio ha evidenziato un rilascio controllato e lento dei nutrienti, senza impatto negativo sul suolo. Negli ultimi anni le nanoparticelle sono state sperimentate anche per la distribuzione fogliare di micronutrienti.

Grazie alla bassa tossicità le nano-formulazioni garantiscono, sebbene siano costose, una produttività delle piante e l'assenza di impatti ambientali indesiderabili che ammortizzano i costi iniziali.

- **Erbicidi**

Le malerbe sono da sempre antagoniste delle piante coltivate e responsabili delle conseguenti perdite produttive. L'utilizzo di polisaccaridi naturali permette di monitorare e rimuovere l'eccesso di erbicida e metalli dal suolo e dall'acqua.

- **Trasformazione genetica**

L'impiego dell'ingegneria genetica permette la regolazione e il controllo di alcune funzioni metaboliche delle piante coltivate, in modo da ottenere una produzione ingente e omogenea. L'assorbimento di molecole biologiche come il DNA e plasmidi è impedito dalla parete cellulare; quindi, si è optato per il trasporto grazie a nanoparticelle di chitosano capaci di creare interazioni elettrostatiche e sfuggire alle nucleasi (Malerba & Cerana, 2016).

L'applicazione delle nanoparticelle è effettuata sia su monocotiledoni sia dicotiledoni. Nel caso si vogliano applicare tecnologie di ricombinazione genetica, le nanoparticelle di CHT possono essere usate per superare il silenziamento transgenico.

6 RNA interference – cenni e applicazione

È stato studiato recentemente un metodo alternativo di difesa delle colture basato sull'interferenza dell'RNA (*RNA-interference*). Essa è una strategia di silenziamento genico post-trascrizionale che può essere mediato dal trasferimento di sequenze di RNA interferente sintetico a doppio filamento (dsRNA) all'interno della cellula. Questo processo è in grado di determinare la degradazione dell'RNA omologo e il *knockdown* del gene bersaglio specifico. L'idea di sfruttare questa tecnologia nasce dalla necessità di controllare i parassiti delle piante riducendo il massiccio impiego dei fitofarmaci di sintesi.

Lo studio del meccanismo dell'RNAi ha dimostrato che l'acido nucleico oltre alle funzioni di RNA messaggero, transfer e ribosomiale, è in grado di regolare l'espressione dei geni contribuendo alla formazione del fenotipo (Saurabh et al., 2014).

L'RNAi coinvolge il silenziamento genico a livello di trascrizione o a livello post-trascrizionale. Il silenziamento dell'espressione genica è avviato da lunghe sequenze del dsRNA che sono degradate da endonucleasi per produrre brevi filamenti di RNA interferenti (*small interfering RNA*, siRNA), oppure dsRNA lunghi in media tra le 21 e le 27 paia di basi. Il siRNA si lega con altre proteine in un complesso di silenziamento, che separa i due filamenti consentendo l'accoppiamento di basi specifico tra il siRNA e l'mRNA target. Ciò porta all'eliminazione dell'mRNA specifico mediante degradazione enzimatica o alla soppressione della traduzione.

In definitiva, la proteina corrispondente e la sua funzione associata sono eliminate all'interno delle cellule di quell'organismo (Saurabh et al., 2014). La capacità di silenziare l'espressione dell'mRNA ha creato numerose nuove opportunità grazie allo sviluppo di applicazioni RNAi promettenti in ambito farmaceutico e agrario (Mallory & Vaucheret, 2006).

Per quest'ultimo, i prodotti che utilizzano la modalità d'azione RNAi mostrano interessanti potenzialità per il controllo di insetti, batteri, funghi, virus e infestanti, in quanto hanno un grado di efficacia e selettività superiore a quanto è stato possibile ottenere fino ad oggi utilizzando pesticidi convenzionali. Questi prodotti possono essere progettati per colpire con precisione mRNA specifici in una specie definita, per la quale sono stati sviluppati appositamente, lasciando inalterati altri organismi (Sherman et al., 2015). I prodotti a base di RNAi in fase di sviluppo saranno utili per il controllo delle popolazioni resistenti di parassiti delle piante grazie alla loro modalità d'azione mirata. L'industria agricola sta sviluppando questi prodotti in virtù del loro elevato potenziale per avere profili di sicurezza migliorati e un'eccellente specificità. La distribuzione di prodotti che utilizzano la modalità d'azione RNAi come bio-controllo può avvenire tramite applicazioni spray, imbibizione o con prodotti granulari.

In alternativa, la modalità d'azione RNAi può essere attivata quale fattore protettivo già incorporato nella pianta (PIP), prodotto da un transgene stabilmente integrato. Un numero crescente di studi basati su RNAi in pianta è stato sviluppato, valutato e ha ricevuto l'approvazione da parte delle agenzie di regolamentazione internazionali. Essi comprendono indagini su un ampio numero di specie vegetali, dal mais alla patata, nonché su una serie di tratti genetici, tra cui la resistenza ai virus e la modifica della composizione dell'olio (ad esempio, un minore contenuto di acidi grassi trans) nell'olio di soia (Sherman et al., 2015). I prodotti di bio-controllo a base di RNAi distribuibili tramite spray sono ancora in fase di sviluppo.

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (US EPA) prevede che questi prodotti rientreranno in quattro categorie, vale a dire: 1) agenti di controllo diretto; 2) repressori del fattore di resistenza; 3) perturbatori dello sviluppo; e 4) stimolatori della crescita (Agency, s.d.). Questi prodotti di bio-controllo a base di RNA saranno probabilmente utilizzati su colture in pieno campo e vivai, nonché in ambienti chiusi per strutture di stoccaggio e serre. Lo sviluppo di prodotti per la protezione delle colture che sfruttano la modalità d'azione naturale dell'RNAi aggiunge un ulteriore strumento utile ad incrementare produttività agricola (Mallory & Vaucheret, 2006). È possibile sfruttare il meccanismo dell'RNAi anche attraverso la funzionalizzazione di nanoparticelle (Kashyap et al., 2015). Il chitosano, in particolare, ha rivelato una significativa capacità per il trasporto di formulazioni a base di piccoli RNA interferenti. Grazie alla natura cationica, infatti, esso può formare un complesso con l'acido nucleico e durante la sintesi delle nanoparticelle. Zhang et al. hanno dimostrato che le nanoparticelle di chitosano rilasciano con successo dsRNA in forma stabilizzata nelle larve di zanzara (Zhang et al., 2004).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo consisteva nella messa a punto di un protocollo in cui fossero definiti i criteri e le condizioni di sintesi per ottenere nanoparticelle stabili e di dimensioni il più ridotte possibili, come richiesto per un'efficiente futura applicazione in campo come vettori nella distribuzione mirata di molecole di interesse agronomico.

Lo schema sperimentale è stato concepito mettendo a confronto due modalità per ridurre il peso molecolare del polimero utilizzato: la filtrazione della soluzione madre di chitosano e la sua degradazione ossidativa tramite acqua ossigenata seguendo il protocollo di Zhao e Wu (Zhao & Wu, 2006).

Ulteriori verifiche necessarie per massimizzare l'effetto di riduzione delle dimensioni; esse vengono elencate di seguito:

1. La determinazione del tempo di degradazione ottimale
2. La verifica del volume di sintesi
3. La scelta del numero di impulsi (*pulses*) di sonicazione necessari per rimescolare la miscela di sintesi e per disperdere gli eventuali aggregati.

A seguito della scelta del protocollo di sintesi più rispondente ai vincoli qualitativi, ci si era prefissi di effettuare un test sull'applicabilità delle NPS di chitosano quali vettori di fattori biostimolanti. In particolare, l'obiettivo era dimostrare la possibilità di utilizzare molecole di dsRNA quali agenti funzionalizzanti delle particelle e verificare l'effettivo caricamento e ritenzione di questi metaboliti per future applicazioni in ambito di trattamenti antifungini.

MATERIALI E METODI

L'obiettivo della sperimentazione si è incentrato sull'individuazione di un metodo di sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle a base di chitosano (NPs). Ci si proponeva di verificare la possibilità e l'eventuale efficienza di funzionalizzazione con RNA totale da estrazione batterica, includente il dsRNA derivato dalla proteina verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*) di medusa (dsRNA-GFP), quale modello per una futura sperimentazione sulla RNAi.

Si intendeva determinare anche i parametri idonei in termini di concentrazione del nano-formulato e di additivi (es. bagnanti, disperdenti) per massimizzare il grado di mono-disperzione del nanomateriale.

Di seguito si indica il percorso seguito:

1. Prove per l'individuazione dei migliori protocolli di sintesi delle nanoparticelle
2. Funzionalizzazione con dsRNA
3. Determinazione di dimensione e carica di particelle vuote e funzionalizzate
4. Elettroforesi in gel di agarosio per la determinazione della capacità di ritenzione delle NPs con e senza l'aggiunta del bagnante.

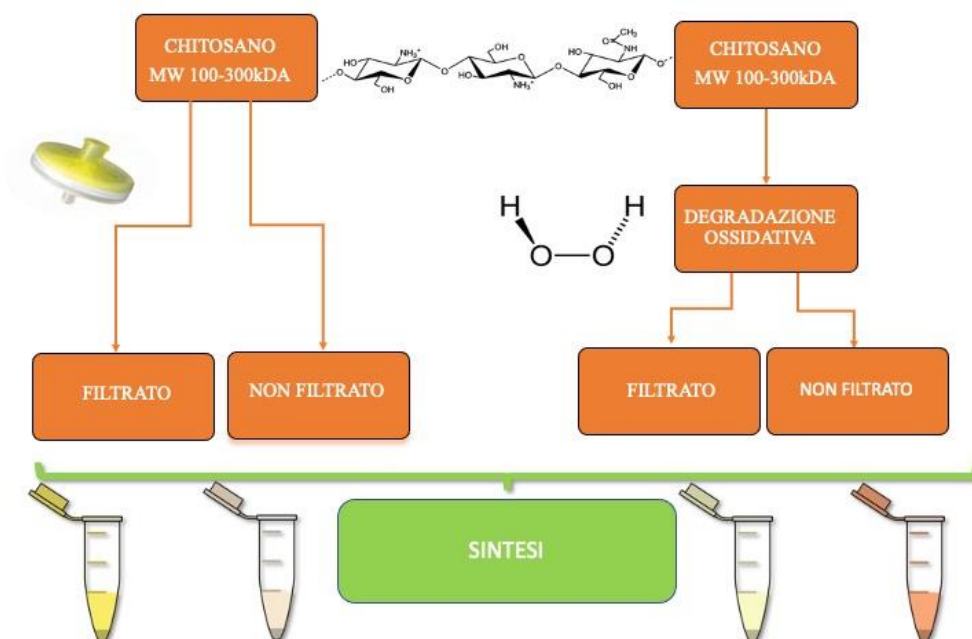


Fig. 9. Graphical abstract esplicativo dei due metodi di sintesi eseguiti.

La materia prima usata, il chitosano, aveva un peso molecolare di 100.000-300.000 g/mol. Seguendo l'obiettivo di ridurre la dimensione delle nanoparticelle, prima di tutto si è tentato di ridurre il peso molecolare del polimero di partenza nella soluzione madre in due modi: prima tramite la degradazione del chitosano con acqua ossigenata e successivamente attraverso la filtrazione.

1 Degradazione del chitosano

Il protocollo di degradazione ossidativa è stato tratto dal lavoro di Zhao e Wu (Zhao & Wu, 2006). La polvere di chitosano (5 g) è stata dissolta in 150 ml di acido acetico al 3% (v/v); successivamente sono stati aggiunti goccia a goccia 50 ml di una soluzione di perossido di idrogeno (H₂O₂) al 6%, mentre il tutto veniva mescolato con un agitatore magnetico. La soluzione è stata poi incubata in acqua a 40° C per tempi diversi (4, 7 e 24 h nelle prove preliminari, solo 24 h nelle successive). In seguito, è stata aggiunta una soluzione 10 M di NaOH per precipitare il chitosano parzialmente degradato; sono stati effettuati dei lavaggi successivi con acqua deionizzata fino al raggiungimento della neutralità della soluzione. Il chitosano è stato poi trattato tramite essiccazione sottovuoto a temperatura ambiente e risospeso in una soluzione acida (55 mM HCl, 12,6 mM KOH, 12,6 mM acido acetico; pH 3,5) tramite miscelazione per un tempo superiore a 12 h. Come controllo è stata prodotta un'altra soluzione madre in cui il chitosano è stato direttamente dissolto nel suddetto tampone.

2 Filtrazione

Un ulteriore metodo possibile per ridurre le dimensioni del polimero consiste nella filtrazione. Nel nostro caso sono stati usati dei filtri per siringa da 0,2 µm. Il procedimento prevede semplicemente il passaggio della soluzione attraverso il filtro al fine di escludere particelle di dimensioni superiori al nostro scopo.

3 Sintesi NPs

Le nanoparticelle sono state ottenute tramite il metodo *ionic gelation* (Grenha, 2012), usando TPP (sodio trifosfato pentabasicco, PM 367,86 g/mol) come *crosslinker* e TWEEN™20 come tensioattivo.

La quantità di chitosano aggiunta per ogni ml di miscela è stata di 1,57 mg e il rapporto tra chitosano e TPP era di 5:2.

La reazione di sintesi è stata condotta in soluzione acquosa a temperatura ambiente, aggiungendo prima il chitosano al TWEEN™20 e all'acqua deionizzata, e infine il TPP tramite una pompa peristaltica. Il composto è stato lasciato in agitazione per un'ora. In una prova preliminare sono stati saggiati diversi volumi di sintesi, mentre il volume standard di riferimento era di 2,1 ml.

4 Purificazione delle NPs

Dopo la sintesi, le NPs (figura 10) sono state sottoposte ad un processo di purificazione consistente in due fasi di *pelleting* tramite centrifugazione a 16000 g per 10 min. Infine sono risospese in 1 ml di acqua deionizzata. In ultimo, per ottimizzare la mono-dispersione delle nanoparticelle è stato applicato un processo di sonicazione a 50 W in ghiaccio. Per determinare il tempo di esposizione sono state effettuate delle prove con un numero diverso di pulses successivi della durata di 15 secondi. La scelta definitiva è stata di 3 ripetizioni successive.

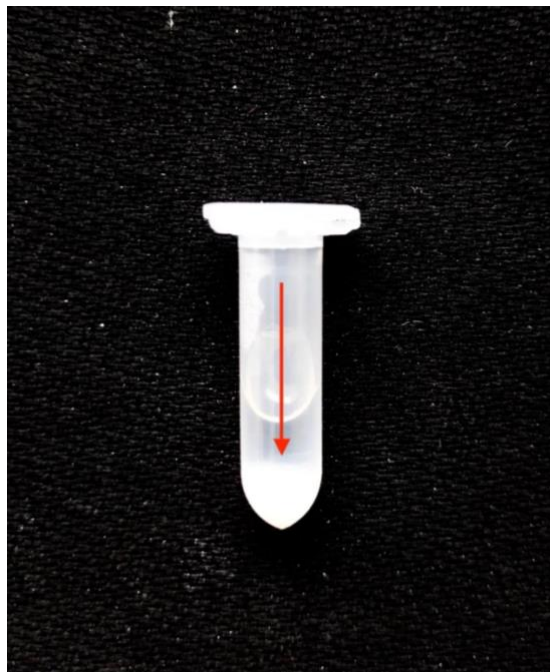


Fig. 10. Aspetto macroscopico delle NPs dopo la sintesi ed il trattamento di sonicazione.

5 Funzionalizzazione dsRNA

La modalità per funzionalizzare le NPs seguiva la medesima procedura sopra descritta con la semplice incorporazione della soluzione dopante durante il mescolamento e prima dell'aggiunta del TPP.

La sequenza nucleotidica usata come fonte per la funzionalizzazione consisteva nell'RNA totale ottenuto da un ceppo trasformato di *E. coli* capace di sintetizzare il dsRNA della proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*). Il metodo specifico è descritto nel lavoro di Nerva e collaboratori (Nerva et al., 2020), i quali hanno partecipato alla sperimentazione fornendo il materiale.

Per ogni mg di chitosano sono stati addizionati 6 µg di dsRNA; in caso di necessità il pH della soluzione di sintesi è stato corretto con acido acetico 2,4 M per raggiungere un valore compreso tra 5,0 e 5,5.

6 Determinazione di dimensione e carica

Tutte le nanoparticelle, vuote e funzionalizzate sono state analizzate per osservare le loro proprietà. La loro distribuzione dimensionale e la carica sono state determinate mediante *Dynamic Light Scattering* (DLS) utilizzando lo strumento *Particle sizer/ζ potential Analyzer PSS Nicomp 380 ZLS* (figura 11).

La misurazione è stata effettuata a temperatura ambiente in soluzione acquosa, su sospensioni di NPs purificate (100 µl di campione in un volume totale di 3 ml).

Il DLS è una tecnica non invasiva adatta a misurare la dimensione di particelle con diametro compreso tra pochi nm e qualche µm, disperse in un solvente. Le particelle quando sono illuminate da una fonte di luce monocromatica diffrangono la radiazione ad un'intensità la cui variazione dipende dalla dimensione delle stesse, dalla forma e dalla differenza dell'indice di rifrazione tra la particella ed il solvente. La diffusione o *scattering* è il processo in cui le particelle emettono la radiazione della stessa frequenza di quella incidente, ma con intensità differente a causa di una rapida oscillazione del campo elettrico. La particella in questo modo si polarizza, disponendo gli elettroni lungo le linee del campo elettrico; il dipolo varia con il tempo e ciò dipende in ultima analisi dalla dimensione delle particelle. Le variazioni di intensità netta sono inferiori per particelle di dimensioni maggiori, in quanto diffondono meno nella soluzione generando minori fluttuazioni. Le superfici delle particelle disperse sono alterate a seconda dello strato adsorbito. Un esempio comune di questo fenomeno è l'adsorbimento delle proteine sulla superficie delle NPs, con la formazione della caratteristica corona proteica. Le particelle disperse mostrano una superficie idratata avvolta da un guscio di molecole del solvente, di natura diversa rispetto ai componenti delle particelle stesse.

Il DLS è in grado di misurare il diametro idrodinamico; tuttavia, fornisce risultati con una certa sovrastima, a causa appunto delle molecole di acqua che circondano le NPs (Bhattacharjee, 2016).

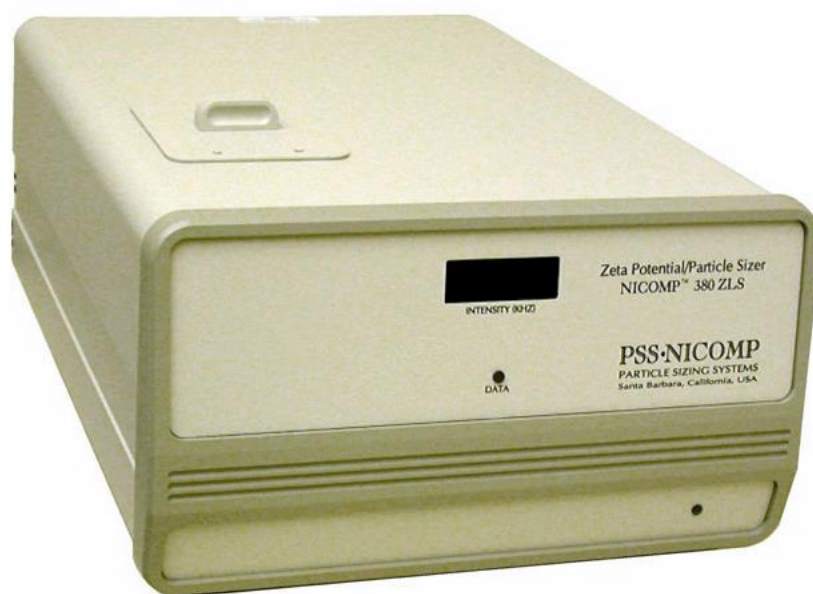


Fig. 11. Particle sizer/ ζ potential Analyzer PSS Nicomp 380 ZLS.

7 Elettroforesi

La tecnica dell'elettroforesi prevede l'utilizzo di un campo elettrico per separare e visualizzare frammenti di materiale genetico in base al loro peso molecolare ed alla loro carica. Il supporto per l'esecuzione dell'elettroforesi è un gel ottenuto dalla gelificazione di una soluzione contenente agarosio, polimero di carboidrati estratto dalle alghe, e come tampone TBE (trisborato EDTA). Gli acidi nucleici migrano sempre verso il polo positivo e ad un controllo negativo non contenente materiale genetico, per poter valutare o meno la presenza del prodotto estratto. Il risultato della corsa elettroforetica consiste in una serie di bande visualizzabili mediante colorazione del gel con bromuro d'etidio, molecola in grado di intercalarsi tra le basi del DNA che emette fluorescenza se esposta agli UVA a 254 nm (DNA Gel Electrophoresis, s.d.). Oggi esistono dei coloranti sostitutivi, meno pericolosi per la salute umana. Nel nostro caso è stato impiegato il *GelGreen® Nucleic Acid Stain* di Sigma-Aldrich.

L'elettroforesi è stata condotta per verificare la capacità di ritenzione del dsRNA da parte delle nanoparticelle. I campioni utilizzati consistevano in NPs funzionalizzate, purificate o meno; inoltre è stato analizzato anche il relativo surnatante per verificare se la sonicazione avesse causato il rilascio del dsRNA. Lo standard di riferimento impiegato è stato acquisito dalla ditta fornitrice *The Ambion®* che ha fornito lo *standard RNA Control 250*, evidenziato con un segmento in corrispondenza del punto di migrazione per una molecola di 2000 nucleotidi.



Fig. 12. Mini-Sub Cell®GT Agarose Gel Electrophoresis System.

L'analisi è stata condotta in gel di agarosio 1,5 % in tampone TBE 1X con lo strumento *Mini-Sub Cell®GT Agarose Gel Electrophoresis System* (figura 12). Il colorante *GelGreen®* è stato impiegato per marcare i nucleotidi, diluendolo 1:10000 all'interno della miscela di solubilizzazione dell'agarosio. Ogni pozzetto è stato caricato con 20 μ l di campione e 5 μ l di tampone di colorazione del gel (blu di bromofenolo 0,01% p/v, glicerolo 30% v/v). L'elettroforesi è stata eseguita a 60 V per 100 min; quindi, il gel è stato esposto alla luce UV (*UV Transilluminator 2000; Bio-Rad Laboratories, Inc., CA-USA*) ed è stata scattata un'immagine da fotocamera.

8 Impiego di un agente bagnante

Con lo scopo di formulare delle sospensioni di NPs funzionali alla distribuzione sulle colture, è stata considerata anche la possibilità di utilizzare un additivo della funzione surfactante. Tra i diversi prodotti commerciali già in uso in agricoltura è stato scelto l'alcol isodecilico etossilato (EIA, 100 g/l di produzione della CIFO SRL) per il suo frequente utilizzo. Per la seconda prova inerente all'elettroforesi, i campioni di NPsD e NPsF sono stati risospesi in soluzioni acquose a diversa concentrazione di EIA (0,1; 0,05 e 0,025%) invece che in semplice acqua deionizzata.

RISULTATI

L'intento principale dell'esperimento consisteva nell'individuare il miglior modo per sintetizzare le nanoparticelle di chitosano di dimensioni più piccole possibili, in funzione di una adeguata interazione con la pianta (Saharan & Pal, 2016), e per garantire un'efficace funzionalizzazione con materiale genetico. Per quanto riguarda la prima parte del lavoro ci siamo concentrati sulla definizione di un protocollo ideale per la realizzazione delle nanoparticelle (vedi figura 9).

Per la riduzione del peso molecolare del chitosano di partenza, si è proceduto ad applicare il metodo della degradazione ossidativa messo a punto da Zhao e Wu (Zhao & Wu, 2006), a confronto con una tesi di controllo (CTRL) nella quale la soluzione madre non era preventivamente trattata con acqua ossigenata.

Si è cercato innanzitutto di individuare il miglior tempo di esposizione all'acqua ossigenata della soluzione madre, e successivamente di produrre le NPs a partire da soluzioni con un diverso grado di degradazione del chitosano. Il piano sperimentale prevedeva la comparazione di una serie di 4 diversi tempi, 0- 4 -7- 24 h; i risultati dimostrano che all'aumentare del tempo di esposizione, la degradazione del chitosano permette di ottenere delle nanoparticelle di dimensioni inferiori, rispetto al tempo iniziale. Come evidenziato in figura 13 l'esposizione per 24 h consente la sintesi di NPs di dimensioni sotto la soglia dei 750 nm.

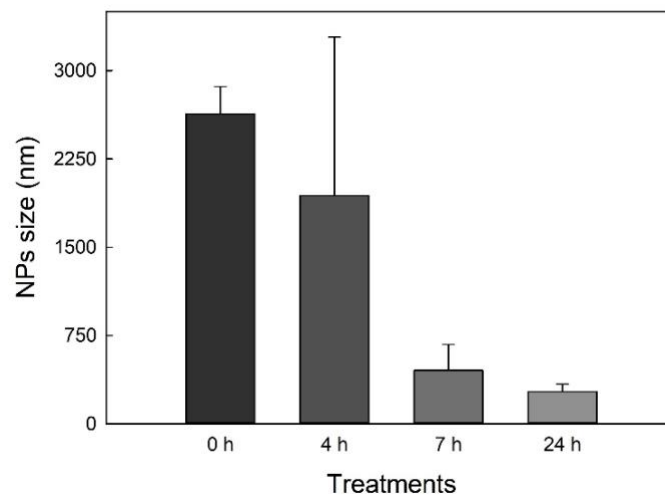


Fig. 13. Tempi di esposizione del chitosano al trattamento di degradazione. I risultati evidenziano che i primi due trattamenti (0 h e 4 h) mantengono le NPs con una dimensione elevata, mentre il trattamento a 24 h è il migliore perché garantisce la dimensione minima delle nanoparticelle. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard ($n=3$).

Una volta scelta il trattamento della soluzione madre per 24 h in acqua ossigenata, si è proseguito con altre prove per l'individuazione del volume di sintesi più idoneo.

Il rapporto dei reagenti per la sintesi delle nanoparticelle è stato mantenuto costante, come spiegato in precedenza. L'intento era di comprendere l'influenza del volume sulla dimensione delle nanoparticelle. In figura 14 si può osservare che l'utilizzo di diversi volumi di sintesi non altera in maniera significativa la dimensione finale delle NPs, tranne nel caso di volumi molto bassi (0.05 X in figura 14). A seguito di questi risultati per motivi tecnici è stato prescelto il volume di sintesi di 2,1 ml che in figura 14 è indicato come diluizione 1X.

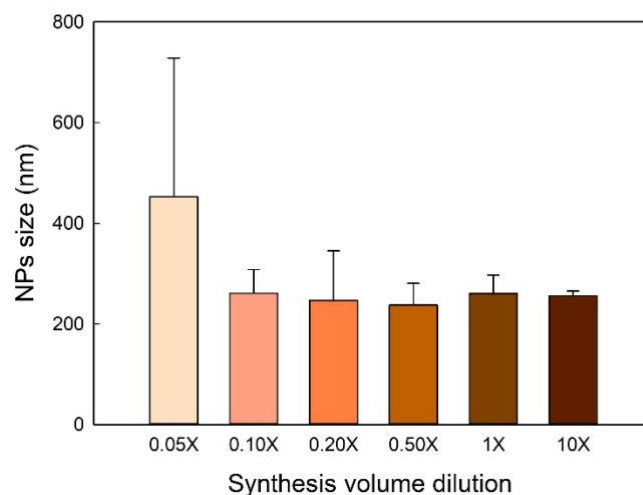


Fig. 14. Sintesi di NPs con l'utilizzo di diversi volumi. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard ($n=6$).

Un altro aspetto ottimizzato è stato l'incremento della mono-dispersività delle NPs. Per questo motivo è stata saggiata anche la durata del trattamento di sonicazione, che è noto favorire la rottura di eventuali aggregati, ma allo stesso tempo può deteriorare la struttura delle NPs trattandosi di un trattamento fisico piuttosto drastico. La sonicazione è una tecnica che consiste nel sottoporre una sospensione agli ultrasuoni al fine di provocare la rottura di eventuali aggregati per ottenere frammenti di massa molecolare uniforme. Come si vede in figura 15, le nanoparticelle sintetizzate sono state esposte ad una serie di diversi *pulses* della durata di 15 secondi ciascuno. I risultati evidenziano che il numero idoneo di ripetizioni corrisponde a 3 in quanto la grandezza delle NPs decresce ad un livello di costante (plateau a circa 250 nm).

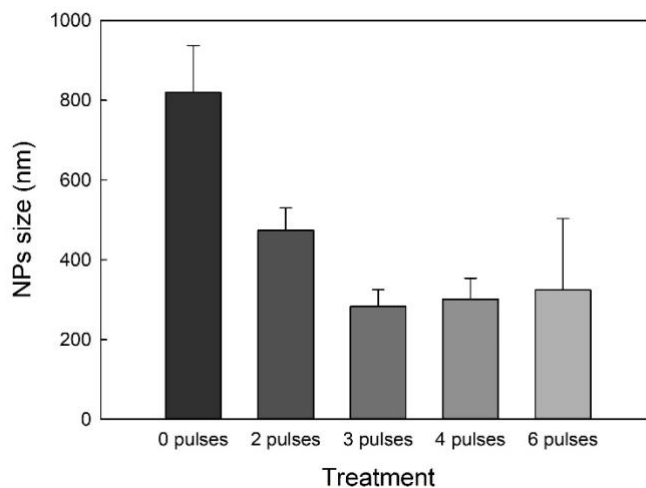


Fig. 15. Numero di impulsi del trattamento sonicazione. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard ($n=3$).

Definiti questi ulteriori aspetti del protocollo, è stato considerato anche il trattamento della filtrazione della soluzione madre di chitosano, per tentare di ridurre ulteriormente le dimensioni del polimero di partenza in aggiunta al trattamento ossidativo. A questo scopo è stata usata come controllo una soluzione madre in cui il CHT non era stato preventivamente degradato con acqua ossigenata. Sono state confrontate quindi tra loro le due soluzioni filtrate e non filtrate. Come mostrato in figura 16, la filtrazione è stata determinante per ridurre le dimensioni delle NPs ottenute dalla soluzione madre controllo (*CTRL no filtration*). Al contrario il diametro idrodinamico delle nanoparticelle ottenute tramite il chitosano degradato risulta inferiore quando non sia stata effettuata la filtrazione. La decisione finale ha privilegiato le NPs ottenute da soluzione madre CTRL solo filtrata (che saranno chiamate in seguito NPsF) e quelle sintetizzate da soluzione madre degradata non filtrata (da qui in avanti denominate NPsD), assegnando la preferenza ai protocolli che avevano restituito il nanomateriale con le caratteristiche più compatibili per una futura applicazione sulle piante quali vettore di molecole ad elevato valore biotecnologico. L'analisi delle dimensioni delle NPsF al DLS è stata confermata anche osservando l'immagine delle NPs in fig. 17, acquisita al microscopio TEM (gentile concessione della Dott.ssa Federica Tramer dell'Università degli Studi di Trieste), in cui si evidenzia che le nanoparticelle di chitosano presentavano una forma sferoidale e dimensioni pari a ca. 170 ± 60 nm ($n=3$), inferiori rispetto a quelle ricavate dalla misurazione tramite il DLS, che ne misura invece il raggio idrodinamico.

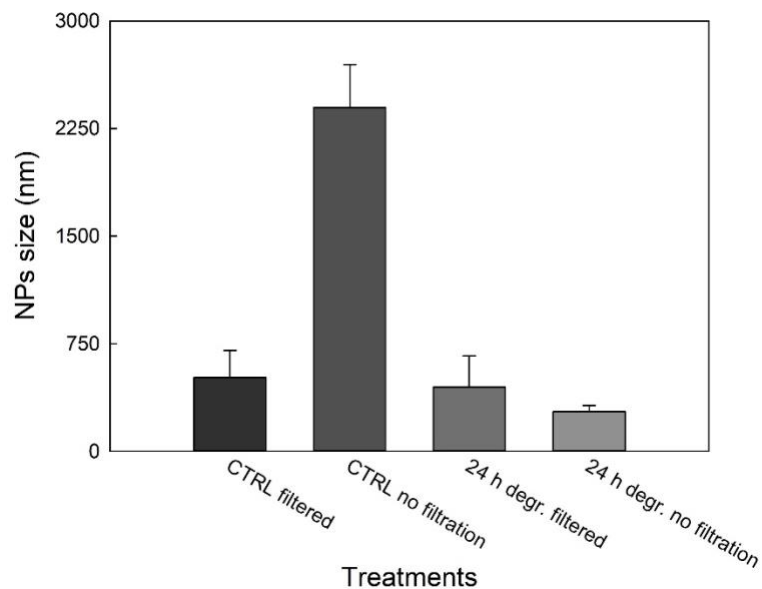


Fig. 16. Effetti della filtrazione e della degradazione con H_2O_2 per 24 h della soluzione madre di chitosano sulla dimensione delle nanoparticelle. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard ($n=6$).

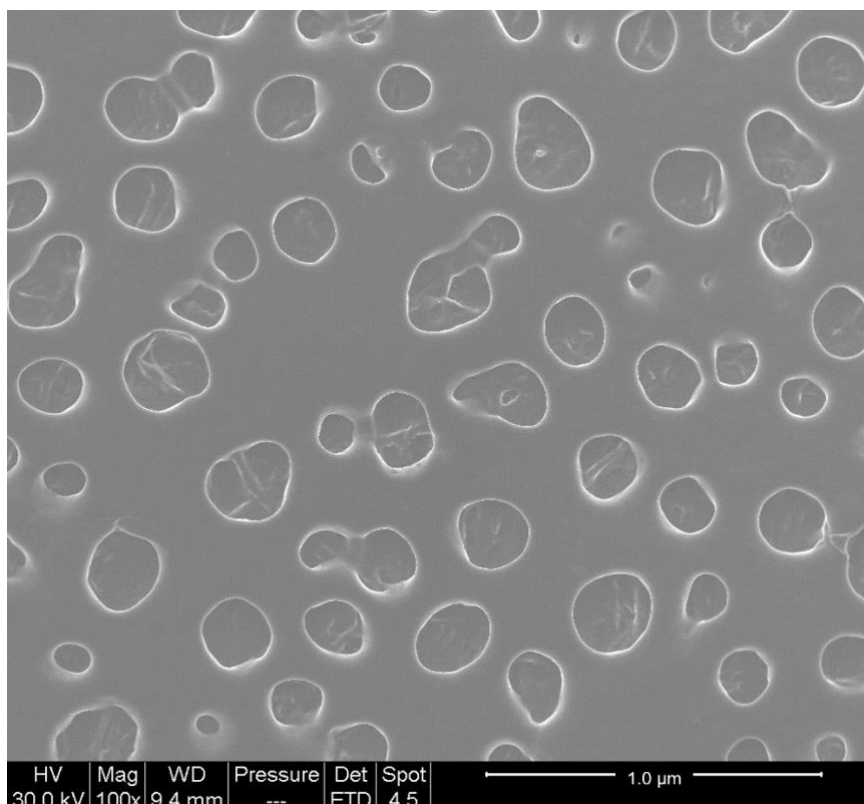


Fig. 17. Foto di nanoparticelle di chitosano acquisita al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM), per gentile concessione della Dott.ssa Federica Tramer dell'Università degli Studi di Trieste.

Per questo i due protocolli di sintesi prescelti sono stati successivamente impiegati per verificare la possibile funzionalizzazione con il materiale nucleotidico.

Le NPs vuote e funzionalizzate con dsRNA così ottenute sono state caratterizzate mediante analisi del diametro idrodinamico e della carica superficiale con la tecnica della diffusione dinamica della luce (DLS), utilizzando lo strumento *Particle sizer/ζ potential Analyzer PSS Nicomp 380 ZLS*.

Nel pannello A della figura 18 si osserva che, per quanto riguarda la dimensione, le NPsD risultavano significativamente più piccole delle NPsF, mostrando una dimensione media di circa 300 nm.

Nel pannello B della figura 18, invece, è visibile un incremento delle dimensioni delle NPsD rispetto al controllo in seguito alla funzionalizzazione. La significatività della differenza è stata valutata in entrambi i pannelli tramite l'applicazione del test T di Student, per il confronto di medie di dati appaiati.

Per quanto riguarda la carica superficiale, non si osserva alcuna variazione importante, perché con entrambe le preparazioni si ottengono particelle con potenziale zeta praticamente nullo e dunque le NPs presentano caratteristiche superficiali sostanzialmente idrofobiche.

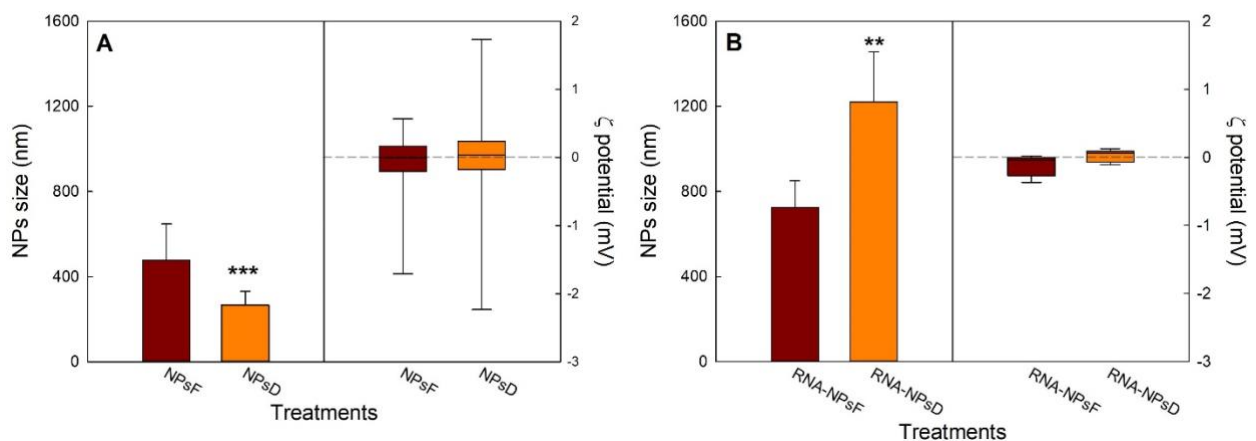


Fig. 18. Analisi della dimensione delle NPsF e NPsD vuote e funzionalizzate con RNA. Nel pannello A si osserva che la dimensione delle NPsD vuote è significativamente inferiore alle NPsF. Nel pannello B sono mostrati a seguito della funzionalizzazione con nucleotidi. Le NPsD incrementano in maniera significativa la loro dimensione rispetto a quelle filtrate. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard ($n = 6$). La significatività del test T è $***P = 0.000$ (A) e $**P = 0.017$ (B).

Come ultima prova si è effettuata un'ulteriore analisi mediante corsa elettroforetica per verificare l'efficienza della funzionalizzazione in termini di ritenzione del materiale genetico, quando sottoposte ad un campo elettrico (vedi figura 19).

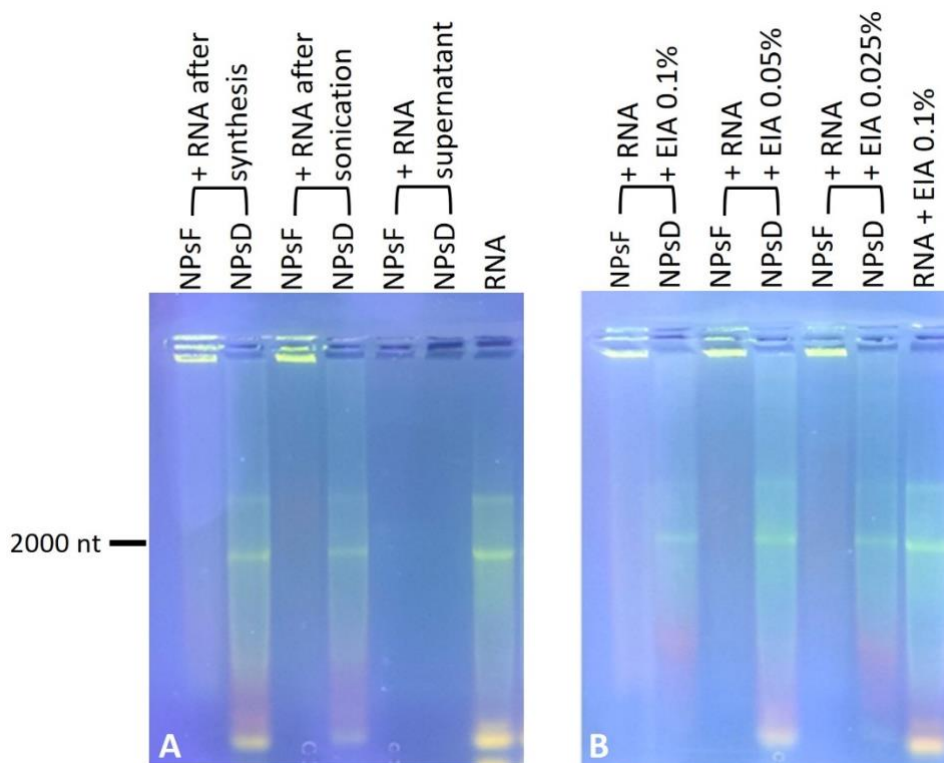


Fig. 19. Gel di agarosio per lo studio della capacità di ritenzione delle NPsF, e NPsD sottoposte al solo caricamento con dsRNA, a confronto con le stesse NPs trattate con sonicazione e il relativo surnatante (panello A). Nel pannello B è stata studiata l'interazione delle NPsD e NPsF, vuote e funzionalizzate in presenza di un agente bagnante.

I campioni a confronto erano costituiti dai due tipi di NPs sia in presenza sia in assenza di un trattamento di sonicazione, nonché in presenza e assenza dell'aggiunta di bagnante EIA. È stato, inoltre, analizzato anche il loro surnatante finale per verificare l'eventuale rilascio aspecifico nella soluzione di stoccaggio dell'agente funzionalizzante.

Per quanto riguarda la capacità di ritenzione si osserva nella figura 19 che solo le NPsF sono state in grado di trattenere il dsRNA (il segnale di fluorescenza dell'RNA è localizzato solo nel pozzetto di corsa iniziale, indice del fatto che l'RNA rimane legato alle NPs). Il fenomeno si spiega in quanto la corsa elettroforetica prevede la formazione di un campo elettrico in grado di spostare le molecole di dsRNA libero (carico negativamente) verso il polo positivo. Questo è proprio quanto avviene nel caso del dsRNA puro (figura 19 ultima lane), ma purtroppo lo stesso comportamento è osservabile anche nel caso dell'RNA legato alle NPsD, indice del fatto che queste ultime non erano in grado di trattenere i nucleotidi quando sottoposte ad un intenso campo elettrico.

Invece le NPsF sono state in grado di impedire il rilascio, come sperato. In aggiunta, nel caso di entrambe le tesi allo studio si è potuto verificare che il trattamento di sonicazione non ha alterato le proprietà delle nanoparticelle e non ha causato il rilascio di materiale dopante nel surnatante, come si può vedere dall'assenza di segnale fluorescente nelle *lanes* 5 e 6.

Quest'ultima prova infine è stata ripetuta utilizzando NPsD e NPsF risospese in diverse concentrazioni di bagnante EIA (0,1%; 0,05% e 0,025%), visibile nella figura 19B. L'utilizzo di questo prodotto mostra che non c'è un'evidente variazione delle proprietà delle nanoparticelle e della capacità di ritenzione.

DISCUSSIONE

L'analisi dei nanomateriali è stata affrontata per fornire indicazioni utili al loro impiego in ambito agronomico. Essi possono essere utilizzati quali tecnologie innovative per affrontare le nuove sfide in campo agricolo grazie allo scarso impatto ambientale, al basso costo di produzione e alla sostenibilità garantita dall'utilizzo di componenti naturali. Si propone di impiegarli in nuove tecniche di fertilizzazione e protezione delle colture, per permettere l'aumento della produzione senza incrementare gli input energetici; si cerca di ridurre le perdite dovute alla scarsa efficienza d'uso delle risorse e alle malattie in campo e nel post-raccolta, durante le fasi di conservazione e distribuzione.

Questo lavoro di tesi ha studiato il chitosano quale materiale utilizzabile per la sintesi di nanoparticelle, in virtù del suo potenziale effetto sinergico con gli agenti dopanti. Esso è in grado di stimolare autonomamente risposte acclimatative e fisiologiche nelle piante. È stato necessario configurare un protocollo in grado di garantire la sintesi di nanoparticelle rispondenti alle caratteristiche funzionali e di qualità richieste per una futura applicazione in pieno campo oppure in ambienti controllati come le serre. Le proprietà fondamentali che hanno fatto propendere per l'uso di questo polimero sono le seguenti: dimensioni ridotte, monodispersione, assenza di fitotossicità, facilità di solubilità in soluzione acquosa tale da permettere la copertura ottimale della coltura e un'adequata persistenza. La biodegradazione lenta nel tempo, in particolare, è una proprietà principe del chitosano così come della cellulosa, e permette alle NPs di svolgere efficacemente la loro funzione protettiva.

Tali proprietà sono state verificate su due differenti preparazioni di nanoparticelle, ottenute da chitosano filtrato (NPsF) e degradato non filtrato (NPsD).

La scelta si è basata su un iniziale trattamento della soluzione madre di chitosano con lo scopo di ridurre le dimensioni del polimero di partenza (vedi fig. 9). Si è applicato, in prima istanza, il metodo della degradazione ossidativa che è in grado di ridurre le dimensioni del chitosano attraverso la rottura delle catene del polimero. Le nanoparticelle sono state sintetizzate utilizzando questa soluzione madre di chitosano degradato ed eseguendo una serie di prove per verificarne la dimensione. Si è studiato il tempo di esposizione al trattamento ossidativo, ottenendo come risultato migliore un periodo di 24 h (fig.13); è stato osservato poi il potenziale effetto del volume di sintesi, che non ha influito sulla dimensione delle particelle (fig.14). È stato, inoltre, ottimizzata la mono-dispersione tramite trattamenti di sonicazione in grado di favorire la rottura di eventuali aggregati. La dimensione minore delle NPs è stata ottenuta dal trattamento di sonicazione con 3 pulses successivi di 15 secondi (fig.15).

Oltre alla degradazione del chitosano prima della sintesi vera e propria, è stato provato anche il trattamento della filtrazione, sempre nell'ottica di ottenere NPs di dimensione più piccole possibile. Per confronto, tale processo è stato applicato anche alla soluzione madre non degradata. Sono stati dunque confrontate le due modalità di sintesi (a partire da chitosano tal quale o degradato) sottoposte o meno a filtrazione, allo scopo di ottenere particelle con dimensioni il più possibile ridotte. Dalle evidenze sperimentali, le nanoparticelle ottenute con la soluzione degradata non filtrata (NPsD) e le ottenute tramite la soluzione filtrata e non degradata (NPsF) sono state scelte quali nanomateriali da impiegare nel proseguo della ricerca (fig.16).

Il parametro dimensionale è stato il fattore preferenziale ed è stato determinato mediante *Dynamic Light Scattering analyzer (DLS)* (fig.11). La misurazione, effettuata in soluzione acquosa, restituisce dei risultati sovrastimati in quanto le molecole di acqua si coordinano attorno alle NPs aumentandone le dimensioni (raggio idrodinamico). L'osservazione è confermata osservando l'immagine delle NPs acquisita al microscopio TEM, fornita della Dott.ssa Federica Tramer dell'Università degli Studi di Trieste, in cui si evidenzia che particelle di chitosano hanno forma sferica ma soprattutto dimensioni inferiori (ca. 170 ± 60 nm) rispetto a quelle ricavate dalla misurazione tramite il DLS (fig.17).

L'analisi dimensionale è stata ripetuta a seguito della funzionalizzazione, per saggiare l'effetto del materiale genetico sulla grandezza delle NPs (fig.18). Le due tipologie di NPs mostrano comportamenti diversi perché le NPsD, mostrano dimensioni maggiori rispetto alle NPsF. Questo indica che il materiale genetico ha interagito con la diversa struttura delle nanoparticelle modificando l'ingombro sterico e variando così la dimensione. Questo comportamento è evidenziabile in maniera significativa nel caso delle NPsD, dove trattamento ossidativo subito dal materiale di partenza ha alterato la capacità di ritenzione delle nanoparticelle.

Questo aspetto è stato approfondito anche attraverso un trattamento con campo elettromagnetico (elettroforesi), in cui è chiaramente evidenziata la tendenza delle NPsD al rilascio del materiale genetico contenuto al loro interno. Le NPsF, al contrario, hanno mostrato una buona capacità di ritenzione del materiale funzionalizzante, mostrando migliori parametri fisici (fig.19).

L'applicazione dei due metodi di sintesi per valutare la possibile funzionalizzazione delle NPs con nucleotidi apre la strada ad un futuro utilizzo quale tecnica di contrasto a patologie fungine in campo (sfruttamento del meccanismo di *RNA-interference*). In quest'ottica è stata anche saggiata l'aggiunta, dopo la sintesi delle NPs, di un agente bagnante, già impiegato in agricoltura, in grado di migliorare l'adesione sulle foglie delle piante e garantire un'adeguata persistenza. L'aggiunta del tensioattivo con funzione adesivante è stata utile per validare ulteriormente la capacità di ritenzione delle nanoparticelle (fig.19B). Non essendovi alcuna variazione è possibile affermare che la formulazione finale delle NPsF soddisfa le caratteristiche richieste per una futura applicazione in ambito agronomico.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE FUTURE

9 Importanza pratica

Lo scopo finale della sperimentazione era la messa a punto di sistemi navetta per molecole biologicamente attive contro agenti di stress biotico delle piante. Tali sistemi sono basati sull'impiego di nanomateriali per garantire trattamenti efficienti, ecologicamente poco impattanti e soprattutto poco inquinanti per il suolo. Si è scelto il polimero del chitosano quale prodotto dell'economia circolare proprio per utilizzare quale componente base del nanomateriale un metabolita largamente presente in natura e biodegradabile nel lungo periodo, trasformabile mediante metodi di sintesi che garantiscano un basso consumo energetico e apprezzabile sostenibilità ambientale.

10 Importanza scientifica

Il valore scientifico del metodo di sintesi sperimentato consiste in un affinamento delle informazioni derivate dalla letteratura.

La realizzazione di nanoparticelle di chitosano è già stata messa a punto da studi precedenti, tuttavia, l'approccio seguito ha cercato di apportare miglioramenti alle nozioni già acquisite nell'ottica di un'applicazione in campo agrario. La sperimentazione della funzionalizzazione è considerata un *proof of concept* della possibilità di funzionalizzazione dei nanomateriali e della loro futura applicazione fogliare, per attuare il meccanismo dell'*RNA interference*, sfruttando l'effetto protettivo esercitato dal nanomateriale. I risultati ottenuti suggeriscono la possibilità di effettuare trattamenti con dsRNA incapsulato e protetto all'interno di NPs di chitosano. Il successivo rilascio e trasferimento del dsRNA all'interno dei tessuti fogliari potrebbe esercitare un'azione protettiva contro le infezioni di patogeni, a condizione che siano sviluppate linee produttive ad alta resa per la sintesi di nanomateriali funzionalizzati e altresì tecniche agronomiche per una distribuzione efficace di un quantitativo necessariamente minimo di prodotti di interferenza sulle superfici delle piante. I più innovativi sistemi di distribuzione fogliare con il recupero delle particelle di soluzione rimaste in sospensione rappresenterebbe sicuramente una strategia sinergica per la migliore applicazione di nanomateriali funzionalizzati. Il continuo studio e ulteriori ricerche aiuteranno a identificare i limiti e a incrementare l'efficienza d'uso di tali tecnologie innovative.

11 Prospettive future

Questa sperimentazione prevede una serie di studi ulteriori per verificare l'efficacia della funzionalizzazione prima *in vitro* su patogeni allevati in coltura axenica e poi *in vivo* su foglie e successivamente *in planta*. I futuri sviluppi comporteranno uno *scaling-up* progressivo, verificando con cura l'assenza di effetti collaterali sull'ecosistema agrario in termini non solo di fitotossicità, ma anche di mantenimento della biodiversità che l'ambiente agrario si impegna a conservare.

BIBLIOGRAFIA

Abd-Elsalam, K. A., & Prasad, R. (A c. Di). (2019). *Nanobiotechnology Applications in Plant Protection: Volume 2*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13296-5>

Agency, E. P. (s.d.). EPA Research 2014-2020. Recuperato 19 settembre 2022, da <https://www.epa.ie/our-services/research/epa-research-2030/past-epa-research-strategies/epa-research-2014-2020/>

Alessio, E. (2017). Materiale didattico del corso «Metalli in Medicina» parte IV «Nanoparticelle» Università degli Studi di Trieste Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche. moodle@UniTS. https://moodle2.units.it/pluginfile.php/143606/mod_resource/content/1/3%20Nanoparticelle%2C%20Terapia%20Fototermica%20e%20radiosensibilizzatori.pdf

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

DNA Gel Electrophoresis: Concept, Procedure, and Applications | Basic Methods in Cellular and Molecular Biology | JoVE. (s.d.). Recuperato 23 settembre 2022, da <https://www.jove.com/v/5057/dna-gel-electrophoresis?language=Italian>

Elizabeth A. Worrall, Aflaq Hamid, Karishma T. Mody, Neena Mitter, & Hanu R. Pappu. (2018). *Nanotechnology for Plant Disease Management*. *Agronomy (Basel)*, 8(12), 285. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120285>

Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., & McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 44(2–3), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>

Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291–300. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.654121>

Kashyap, P., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>

Li, B., Elango, J., & Wu, W. (2020). Recent Advancement of Molecular Structure and Biomaterial Function of Chitosan from Marine Organisms for Pharmaceutical and Nutraceutical Application. *Applied Sciences*, 10(14), 4719-. <https://doi.org/10.3390/app10144719>

Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010a). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment*, 408(16), 3053–3061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>

Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010b). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment*, 408(16), 3053–3061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>

- Malerba, M., & Cerana, R. (2016). Chitosan Effects on Plant Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 996. <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants (vol 38, pg D31, 2006). *Nature Genetics - NAT GENET*, 38, 850–850. <https://doi.org/10.1038/ng0706-850b>
- Mishra, S., Keswani, C., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F., & Singh, H. B. (2017). Integrated Approach of Agri-nanotechnology: Challenges and Future Trends. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00471>
- Nerva, L., Sandrini, M., Gambino, G., & Chitarra, W. (2020). Double-Stranded RNAs (dsRNAs) as a Sustainable Tool against Gray Mold (*Botrytis cinerea*) in Grapevine: Effectiveness of Different Application Methods in an Open-Air Environment. *Biomolecules*, 10(2), 200. <https://doi.org/10.3390/biom10020200>
- Saharan, V., & Pal, A. (2016). *Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3601-6>
- Sala, O. E., Stuart Chapin, F., III, Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M., & Wall, D. H. (2000). Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science*, 287(5459), 1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>
- Saurabh, S., Vidyarthi, A. S., & Prasad, D. (2014). RNA interference: Concept to reality in crop improvement. *Planta*, 239(3), 543–564.
- Sherman, J. H., Munyikwa, T., Chan, S. Y., Petrick, J. S., Witwer, K. W., & Choudhuri, S. (2015). RNAi technologies in agricultural biotechnology: The Toxicology Forum 40th Annual Summer Meeting. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 73(2), 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.001>
- Throbäck, I. N., Johansson, M., Rosenquist, M., Pell, M., Hansson, M., & Hallin, S. (2007). Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 189–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00632.x>
- VandeVoort, A. R., & Arai, Y. (2012). Effect of Silver Nanoparticles on Soil Denitrification Kinetics. *Industrial Biotechnology*, 8(6), 358–364. <https://doi.org/10.1089/ind.2012.0026>
- Worrall, E., Hamid, A., Mody, K., Mitter, N., & Pappu, H. (2018). Nanotechnology for Plant Disease Management. *Agronomy*, 8(12), 285. <https://doi.org/10.3390/agronomy8120285>
- Zhang, H., Oh, M., Allen, C., & Kumacheva, E. (2004). Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery. *Biomacromolecules*, 5(6), 2461–2468. <https://doi.org/10.1021/bm0496211>
- Zhao, J., & Wu, J. (2006). Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 34(11), 1555–1559. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(07\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(07)60015-2)