

Particelle nanostrutturate di idrossiapatite biomimetica come sistema di delivery di micro e macro elementi nelle colture biologiche

Nanostructured particles of biomimethic hydroxyapatite as delivery system of micro and macro elements in viticulture

Enrico Marengo^{1,*}, Norberto Roveri^{2,**} e Dario Marengo^{3,***}

¹MITS S.R.L., 15057 Rivalta Scrivia (AL), Italy

²LEBSC S.R.L., 40057 Granarolo dell'Emilia (BO), Italy

³MITS S.R.L., 15057 Rivalta Scrivia (AL), Italy

Sintesi. Nanoparticelle biomimetiche di idrossiapatite drogate con ioni metallici (Cu, Fe, Mg, Zn, K) sono state utilizzate in formulazioni contenenti basse concentrazioni di rame (Cu) e zolfo (S) per controllare la peronospora (plasmopara viticola) e l'oidio (erysiphe necator) della vite. I formulati sono stati testati in campo sulla varietà di vino "Dolcetto" coltivata secondo tecniche di agricoltura biologica, e la loro efficacia è stata confrontata con prodotti commerciali contenenti miscela bordolese e zolfo.

I dati indicano che le formulazioni contenenti bassi dosaggi di rame e zolfo possono essere trasportati in modo efficiente dalle nanoparticelle di idrossiapatite biomimetica e possono ridurre la presenza di micota sulle foglie della vite. Nessun residuo di rame e zolfo è stato rilevato in campioni di vino ottenuti da viti in cui è stata utilizzata l'idrossiapatite biomimetica. Il drogaggio di nanoparticelle di idrossiapatite biomimetica con metalli di transizione è un modo efficiente per fornire micro e macro-elementi alle piante a basso livello di dosaggio. Le formulazioni contenenti idrossiapatite funzionano anche come supporti a lento rilascio di macronutrienti come elementi di calcio e fosforo.

Keywords: idrossiapatite biomimetica, vite, agricoltura biologica, nano-fertilizzanti, riduzione dei prodotti fitosanitari a base di rame

Abstract. Biomimetic hydroxyapatite nanoparticles doped with metal ions (Cu, Fe, Mg, Zn, K) were used in formulations containing low concentrations of copper (Cu) and sulphur (S) to control downy mildew (plasmopara viticola) and powdery mildew (erysiphe necator) of grapevines. The formulations were tested in the field on the 'Dolcetto' wine variety cultivated according to organic farming techniques, and their effectiveness was compared to commercial products containing Bordeaux mixture and sulphur.

Data indicate that formulations containing low dosages of copper and sulphur can be efficiently transported by biomimetic hydroxyapatite nanoparticles and can reduce the presence of mycota on vine leaves. No copper and sulphur residues were detected in wine samples obtained from vines in which biomimetic hydroxyapatite was used. Doping biomimetic hydroxyapatite nanoparticles with transition metals is an efficient way to deliver micro- and macro-nutrients to plants at low dosage levels. Formulations containing hydroxyapatite also function as slow-release carriers of macronutrients such as calcium and phosphorous elements.

Keywords: biomimetic hydroxyapatite, grapevine, organic farming, nano-fertilisers, reduction of copper-based plant protection products

* E-mail: enrico.marengo@mitstechnology.it

** E-mail: roveri.norberto@gmail.com

*** E-mail: dario.marengo@mitstechnology.it

1 Il problema – lo stato dell'arte

Nel corso dello scorso secolo, l'aumento esponenziale della popolazione mondiale ha reso necessario lo sfruttamento estensivo dei terreni, principalmente dovuto all'agricoltura intensiva. Quest'ultima è una delle principali cause dell'inquinamento ambientale globale a causa del massiccio uso di fertilizzanti e di pesticidi.



Figura 1. Esempio di agricoltura intensiva.

L'impoverimento del suolo ha portato all'abuso di fertilizzanti e pesticidi per garantire una crescita costante delle colture. Di conseguenza, l'uso massiccio di fertilizzanti e pesticidi è diventato una delle cause principali dell'inquinamento del suolo, aggravando ulteriormente il problema. In particolare, molte coltivazioni, specialmente la viticoltura, richiedono l'uso di prodotti fitosanitari per prevenire o curare le malattie delle piante causate da funghi, crittogame o altri patogeni. A questo scopo, il rame e lo zolfo hanno assunto un ruolo molto importante come anticrittogamici. Nonostante queste specie siano fondamentali per la crescita delle colture, possono diventare tossiche, dannose e irritanti per l'uomo. Infatti, i metodi tradizionali di somministrazione possono provocare una distribuzione disomogenea delle specie chimiche e zone ad alta concentrazione che provocano effetti collaterali. In particolare, le specie rameiche tradizionali tendono ad accumularsi e a diventare nocive per la microfauna naturale del suolo, per le piante e di conseguenza per l'intero ecosistema (compreso l'uomo).

In particolare, molte tipologie di colture, come quella viticola, utilizzano composti a base di rame per la protezione delle piante da diverse patologie causate da oomiceti, funghi e batteri. Una delle prime formulazioni sviluppate a base cuprica è stata la poltiglia bordolese, la cui diffusione è attribuita al fitopatologo francese Alexis Millard che lo utilizzò per la prima volta nel 1882 per il controllo dei parassiti delle colture.



Figura 2. Poltiglia bordolese.

Si tratta di una sospensione di calce (Ca(OH)_2) e solfato di rame pentaidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). A partire dalla poltiglia bordolese, molte altre formulazioni a base di Cu(II) sono state a lungo impiegate; tuttavia il loro utilizzo ha sollevato preoccupazioni e problematiche sulla sostenibilità a lungo tempo e sugli effetti del rame sulla salute umana e sugli ecosistemi, quindi sull'ambiente. Infatti, sebbene i prodotti cuprici offrano numerosi vantaggi (alta tossicità sui patogeni, basso costo, alta stabilità chimica), dall'altro lato, essi hanno rivelato avere una certa fitotossicità.

Principali vantaggi: tossicità relativamente alta per i patogeni delle piante, basso costo, bassa tossicità dei composti di Cu per i mammiferi, loro stabilità chimica e effetti residui duraturi.

Principali svantaggi: fitotossicità, sviluppo di ceppi batterici resistenti al Cu, accumulo nel suolo e effetti negativi sul biota del suolo e sui parametri di qualità degli alimenti. Importante sottolineare il bioaccumulo nei terreni: il rame non viene metabolizzato, né degradato, e tende ad accumularsi nel terreno. Risulta che i composti del rame che si formano nei terreni vengono trasportati dall'acqua piovana inquinando le falde acquifere. Inoltre, il rame ha mostrato tossicità verso i microrganismi presenti nel terreno; questo comporta una demineralizzazione dei terreni (le colonie batteriche vengono soppresse e così non possono mineralizzare i composti organici e si limita la fissazione dell'azoto). Per tutte queste ragioni, l'EU nel corso degli anni sta riducendo sempre di più le quantità di rame ammissibili nei terreni. Alla fine del 2018 la Commissione Europea ha deciso di fissare la massima quantità di rame a 4 kg per ettaro. Ciò nonostante, ancora oggi, l'agricoltura e la viticoltura in particolare dipendono fortemente dal rame, ed è necessario trovare delle soluzioni.

2 La ricerca – le particelle nanostrutturate in agricoltura biologica

Al fine di ridurre l'impatto antropico sull'ambiente e, quindi, la quantità di prodotti fitosanitari, così come la quantità di fertilizzanti, oggi la ricerca mira all'approccio a "lento rilascio" che permette di diminuire le quantità di rame nel dosaggio. Questo approccio prevede l'utilizzo di sistemi di delivery in grado di cedere le specie anticrittogamiche lentamente e solo quando necessario, garantendo sempre basse concentrazioni e distribuzioni omogenee. In questo modo si possono evitare le eccessive concentrazioni, tipiche dei prodotti tradizionali, che normalmente avvelenano il suolo. A tale scopo, è stato investigato l'uso di particelle nanostrutturate. Nel 2008, infatti, venne testato l'effetto di particelle nanostrutturate di rame; sfortunatamente, anche queste si rivelarono tossiche. Più recentemente, è stata investigata una particolare formulazione di particelle di idrossiapatite (HA) e Cu (II). L'idrossiapatite è un minerale avente composizione chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, facente parte del gruppo delle apatiti, e i suoi cristalli hanno la forma di un prisma molto sottile dalla forma esagonale. L'idrossiapatite è anche prodotta e riassorbita da tessuti

organici, questa infatti è uno dei componenti principali delle ossa.

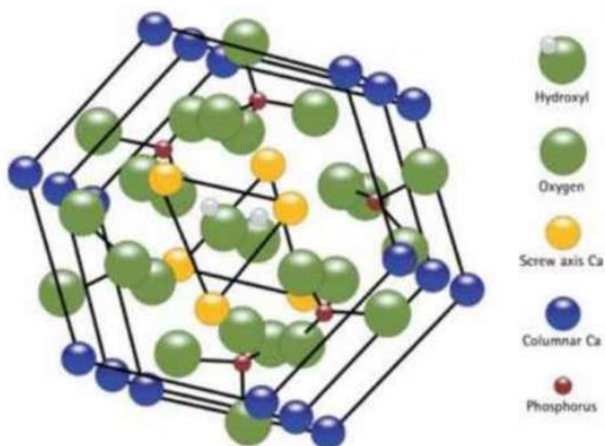


Figura 3. Esempio di struttura di idrossiapatite.

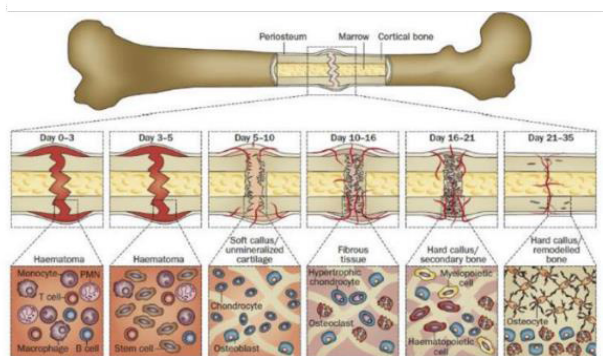


Figura 4. Idrossiapatite nelle ossa.

Per questo motivo si tratta di un materiale biocompatibile e completamente non tossico. L'idrossiapatite, usata in questo studio si è rivelata un ottimo veicolo per il trattamento delle colture. Infatti, questo materiale presenta delle proprietà di drug delivery. Ciò significa che è in grado di veicolare principi attivi all'interno degli apparati circolatori di qualsiasi essere vivente, in primo luogo le piante.

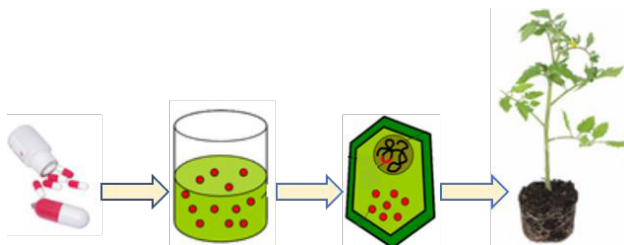


Figura 5. Schema di drug delivery veicolato da NPs.

Ad oggi, è stato studiato l'uso di particelle nanostrutturate, in particolare di idrossiapatite. Infatti, questo minerale ha dimostrato eccellenti proprietà come sistema di delivery in campo agricolo, sia per prodotti fitosanitari che per la distribuzione di micro e macro elementi necessari alla crescita delle piante. Inoltre,

l'idrossiapatite biomimetica, poiché simula la struttura di quella presente negli esseri viventi, è completamente atossica e biocompatibile. In questo scenario, viene presentato un approccio innovativo di somministrazione di micro e macro elementi, che si avvale di particelle di idrossiapatite biomimetica nanostrutturate. Queste particelle sono funzionalizzate con diversi micro e macro elementi che sostengono la crescita delle piante, prevengono le malattie e possono curare i principi di patogenicità. Gli esperimenti condotti hanno dimostrato che questa formulazione permette di utilizzare una dose minore di rame e zolfo rispetto ai prodotti tradizionali (fino a 1/7). Questo, a sua volta, porta a una minore quantità di acqua necessaria e, in questo modo, riduce l'impatto ambientale dei trattamenti viticoli.

In questa particolare formulazione di emulsione di nanoparticelle, l'idrossiapatite può essere usata come carrier di nutrienti e di farmaci. Spesso i prodotti per usi fogliari, presenti sul mercato, contengono alti dosaggi; inoltre, dai produttori viene consigliato di usare quantità in eccesso, poiché si tratta di prodotti idrosolubili che vengono dilavati dalle piogge facilmente, diventando così poco efficaci ai fini del trattamento e pericolosi per l'ambiente. È altresì noto come alcuni prodotti ad usi fogliari, pur risolvendo la problematica della pianta, determinino una modifica del pH del terreno e della pianta stessa con conseguenti effetti negativi. Uno dei problemi principali legati all'utilizzo di questi prodotti per le piante riguarda l'inquinamento delle acque e del suolo. In particolare, un importante problema deriva dall'accumulo nel suolo e nelle falde acquifere. Questo problema si ripercuote, oltre che sul terreno, anche sugli alimenti che da esso derivano e quindi sull'uomo.

2.1 Il rame in agricoltura

Il Cu è considerato un micronutriente per le piante e gioca un ruolo importante nell'assimilazione di CO₂ e nella sintesi dell'ATP (Adenosina Trifosfato: formato da una base azotata, cioè l'adenina, dal ribosio, che è uno zucchero pentoso, e da tre gruppi fosfato: è uno dei reagenti necessari per la sintesi dell'RNA).

Inoltre, il Cu è un componente essenziale di varie proteine come la plastocianina, proteina idrosolubile contenente rame, del sistema fotosintetico e la citocromo ossidasi della catena di trasporto degli elettroni. L'eccesso di Cu nel suolo svolge un ruolo citotossico, induce stress e causa lesioni alle piante. Questo porta al ritardo della crescita delle piante e alla clorosi delle foglie. L'esposizione delle piante all'eccesso di Cu genera stress ossidativo e specie reattive dell'ossigeno (ROS). Lo stress ossidativo provoca disturbi alle vie metaboliche e danni strutturali alle macromolecole. Il rame riduce la crescita delle radici nell'erba di Rodi (*Chloris gayana*). Nel convolvolo nero (*Polygonum convolvulus*) la mortalità delle piante, la biomassa e la produzione di semi sono ridotte a causa della tossicità del rame.

Nel fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) l'accumulo di Cu nelle radici delle piante determina la malformazione delle radici e la riduzione delle dimensioni.

Negli ultimi decenni, la sostituzione del Cu con altre alternative più favorevoli, che rispettano anche i principi

dell'agricoltura biologica, è stata una priorità dell'agricoltura europea. Tuttavia, l'agricoltura e la viticoltura in particolare dipendono attualmente dalla disponibilità di rame, a meno che non vengano identificate delle alternative.

Le strategie di mitigazione volte a limitare gli effetti negativi dei composti di Cu includono il loro uso ottimizzato attraverso la riduzione del dosaggio, la bonifica del suolo e lo sviluppo di formulazioni innovative.

Il rame è il primo anticrittogamico utilizzato in viticoltura. Insieme allo zolfo, rappresenta il pilastro portante della viticoltura biologica, ampiamente impiegato nella lotta alla *Plasmopara viticola*, comunemente conosciuta come *Peronospora*. Inoltre, il rame favorisce la maturazione dei tralci, ha una buona persistenza sulla vegetazione in assenza di pioggia, ha un'attività secondaria contro altre malattie quali il marciume nero, l'escoriosi o la botrite e ha un prezzo contenuto. Il rame può essere presente in diverse forme: ionica, molecolare e complessata. La forma ionica Cu^{2+} ha attività fungicida; si lega alle pareti delle zoospore denaturando inizialmente le proteine della membrana e poi operando in diverse reazioni respiratorie e redox all'interno della cellula provocandone la morte. Per la somministrazione della forma ionica, vi sono diversi formulati in commercio, quali: poltiglia bordolese ($\text{CaSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$), ossicloruro di rame ($\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$), idrossido di rame ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), ossido di rame (CuO) e solfato di rame (CaSO_4).

Nonostante gli effetti benefici, il rame, essendo un metallo, a differenza degli agrofarmaci di sintesi, non si degrada e si accumula sia nel frutto che nel terreno, dove inibisce lo sviluppo di microrganismi. I principali effetti negativi conseguenza di un uso eccessivo e/o prolungato di rame in agricoltura sono elencati di seguito:

- Le forme di rame immediatamente biodisponibile, mobile e non disponibile si accumulano per l'80% nei primi 40 cm di terreno, per cui le piante pluriennali con apparato radicale profondo non ne risentono, ma quelle annuali manifestano sintomi di tossicità. Questo evidenzia quindi come, trattando con il rame delle colture ormai radicate (come le vigne), potrebbe non presentarsi nell'immediato alcun problema, che si risconterebbe, invece, solo in seguito ad un eventuale innesto di nuove piante. A tal proposito, bisogna ricordare che, la concentrazione normale di rame presente sulla crosta terrestre si aggira intorno a 70 mg/kg; in un vigneto possiamo raggiungere anche i 1300 mg/kg (già 200 mg/kg sono tossici per le viti) per effetto di accumulo, dipendentemente dalla tipologia e qualità d terreno. Infatti, in terreni sabbiosi si riscontrano valori più bassi mentre in quelli argillosi le concentrazioni sono più elevate;
- Il rame interagisce negativamente con la microfauna: si verifica una diminuzione della popolazione di lombrichi e viene inibito il metabolismo dei batteri *Azotobacter*, *Clostridium*, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, tutti responsabili della fissazione dell'azoto. Inoltre, inibendo l'enzima deidrogenasi, il rame provoca l'acidificazione del terreno e di

conseguenza una diminuzione dell'attività biologica del terreno;

- Il rame provoca un rallentamento della crescita delle piante; ad ogni trattamento la crescita vegetativa viene rallentata, così come la maturazione del frutto. Durante la fioritura, il rame può anche causare la perdita di fertilità delle infiorescenze, e un trattamento in condizioni climatiche di freddo-umido può provocare delle ustioni alle foglie.

L'utilizzo del rame nella lotta alla peronospora nei vigneti può inficiare anche il processo di fermentazione alcolica. Esso inibisce l'attività dei lieviti e agisce da catalizzatore accelerando l'azione dell'enzima polifenolossidasi. Se non viene allontanato, insieme alle fecce, può quindi provocare un intorbidimento del vino. Viene rallentata, inoltre, anche la fermentazione malolattica.

2.2 Lo zolfo in agricoltura

Lo zolfo è utilizzato in agricoltura da molto tempo, proprio come il rame, in particolare per la difesa dall'oidio, una patologia vegetale chiamata anche "mal bianco", causata da tanti diversi ceppi di funghi che portano tutti a sintomatologie simili. Lo zolfo è un anticrittogamico ammesso anche in agricoltura biologica, quindi può essere utilizzato dalle aziende agricole certificate e anche dai privati per la cura dell'orto, delle piante da frutto e ornamentali. Lo zolfo svolge questa azione quando si trova allo stato di vapore, con almeno 18-20 °C di temperatura ambientale nel caso di prodotti a grana grossa, e a partire già dai 10 °C per gli zolfi più fini. A temperature basse quindi non è efficace. Anche un'elevata umidità dell'aria pregiudica la sua azione. I diversi prodotti a base di zolfo in commercio si distinguono tra loro per la metodologia di somministrazione, ovvero trattamenti in polvere solidi e trattamenti liquidi, questi ultimi più recenti rispetto ai primi, ed anche per tipologia di grana, ovvero particelle più grandi e particelle più fini. Gli zolfi bagnabili, quelli per trattamenti liquidi, hanno delle grane più fini ed offrono un'azione più veloce e a temperature più basse rispetto a quella dei polverulenti, ma hanno una persistenza minore. In ogni caso, quando si utilizzano prodotti a base di zolfo bagnabile, si preparano delle soluzioni in acqua da irrorare sulle piante, mentre i prodotti a base di zolfo in polvere vengo sparsi direttamente sulle piante usando una solforatrice.

L'utilizzo di zolfo nel biologico è legiferato nell'Allegato II del Reg CE 889/08, uno dei riferimenti europei sulla certificazione biologica, in vigore fino al 2021. Anche i nuovi Regolamenti europei sull'agricoltura biologica che sostituiranno gli attuali, lasciano la possibilità di utilizzare lo zolfo nei trattamenti. Nonostante ciò, l'abuso di tale elemento nel terreno può avere effetti negativi, seppur minori come entità a quelli del rame:

- Lo zolfo può essere tossico verso alcuni insetti utili, in particolare verso gli acari predatori;
- L'efficacia dell'azione dello zolfo in agricoltura, legata all'emissione del suo vapore, è influenzata molto dalla luminosità, tanto che l'effetto può essere 5 volte superiore in una giornata di bel tempo e cielo sereno. Viceversa, il suo effetto

viene inibito in giornate con cielo coperto. In ogni caso una riduzione del prodotto da impiegare, a parità di risultato e quindi di assenza di malattia, non può che rappresentare un vantaggio per tutti, dal punto di vista economico per il viticoltore e ambientale per il terreno;

- La temperatura è un'altra variabile da tenere in considerazione. Infatti, l'azione dello zolfo è blanda o addirittura nulla a temperature inferiori ai 18°C, viceversa è massima nell'arco di 23-25°C. L'effetto dello zolfo diventa poi pericoloso quando le temperature sono molto elevate; infatti, sopra 30°C, la polvere di zolfo passa allo stato gassoso e si combina con l'ossigeno trasformandosi in triossido di zolfo (SO₃), corrosivo e molto pericoloso. Conseguentemente il triossido di zolfo a contatto con l'acqua si trasforma in acido solforico, ancora più nocivo.

In ogni caso, una riduzione del prodotto da impiegare, a parità di risultato e quindi in assenza di malattia, non può che rappresentare un vantaggio, dal punto di vista economico e ambientale.

3 la soluzione – particelle di idrossiapatite biomimetica in vigneto

Lo studio delle nanoparticelle naturali e biomimetiche di idrossiapatite [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] (HA-np) suscita più interesse per il loro basso grado di tossicità, biocompatibilità e accettabilità ambientale.

Fase stechiometrica apatitica dell'idrossiapatite: fosfato di calcio più stabile e meno solubile in condizioni ambientali, le apatiti nanocristalline sono non stechiometriche, carenti di calcio (e OH⁻) e possono incorporare ioni sostituiti nei loro cristalli nanometrici. Le loro carenze di calcio e di idrossido sono responsabili di una maggiore solubilità rispetto all'HA-np stechiometrico.

Le apatiti sintetiche presentano eccellenti proprietà biologiche come biocompatibilità, bioattività, mancanza di tossicità o risposte infiammatorie e immunitarie e anche una bioriassorbibilità relativamente elevata. Queste proprietà possono essere notevolmente migliorate migliorando il loro biomimetismo, cioè preparandoli con dimensioni, morfologia, (nano)caratteristiche strutturali e chimiche simili a quelle biologiche.

Queste ricerche hanno permesso di brevettare particelle nanostrutturate, con diametro maggiore di 100 nm, di Idrossiapatite biomimetica funzionalizzata opportunamente con una serie di micro e macroelementi che possano, del tutto naturalmente e biocompatibilmente, sostenere la crescita della pianta e prevenire e curare possibili principi di patogenicità.

Al fine di valutare l'efficienza del prodotto che utilizza HA-np come vettore di Cu e S rispetto all'uso di prodotti convenzionali, si è testato in vivo l'efficienza nella prevenzione delle patologie, ma anche la riduzione della quantità utilizzata di Cu e S e la riduzione della contaminazione del terreno.

Di seguito si esaminano i risultati ottenuti nell'applicazione di un sistema di protezione delle colture basato su HA-np biomimetica funzionalizzata con Cu rispetto all'uso di formulazioni commerciali diffuse come Siam 20 e Tiovit jet contenenti rispettivamente la miscela bordolese e lo zolfo (S). Le HA-np biomimetiche sono state dopate con ioni di ferro (Fe), Cu, boro (B), zinco (Zn), magnesio (Mg) e sono state fatte reagire con una soluzione di solfato di rame (per ottenere il prodotto Bio Active 1 Copper) e con soluzioni di zolfo (per ottenere il prodotto Bio Sulphur).

Da notare che metalli pesanti come Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V e Zn sono richiesti in quantità minime dagli organismi, ma quantità eccessive di questi elementi possono diventare dannose. Alcuni dei metalli pesanti (Fe, Cu e Zn) sono essenziali per le piante e gli animali, la loro disponibilità nel medium varia, e metalli come Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni e Co sono micronutrienti essenziali, il cui assorbimento in eccesso rispetto alle esigenze delle piante provoca effetti tossici.

Al fine di testare le proprietà di questo prodotto, è stata condotta una campagna di test in vivo su un'area di 7000 m² di una coltura viticola di vino rosso "dolcetto" dal 05/2021. La restante area di 7000 m² di vigneto è stata appositamente trattata con prodotti cuprici tradizionali a base di poltiglia bordolese al fine di fornire un confronto fra i due prodotti.

Tre prove sperimentali consecutive sono state condotte da agosto 2021 a settembre 2021 (Tabelle 2 e 3) presso il vigneto Altare (La Morra, Cuneo, LAT 44° 38' 23" N - LONG 7° 56' 55" E) lavorando su viti in piena terra (*Vitis vinifera* L.) di varietà Dolcetto. Sullo stesso vigneto, è in corso, per il secondo anno consecutivo, una campagna test somministrando gli stessi prodotti dell'anno precedente seguendo un rigoroso protocollo.

Alla fine della campagna di test si è calcolato il peso di rame e di zolfo utilizzato nelle due formulazioni: per somministrare il rame con i prodotti tradizionali, ne sono stati necessari 7 kg, e per lo zolfo circa 3 kg; viceversa, sono stati necessari solo 900 g di rame e 700 g di zolfo per la somministrazione con particelle di idrossiapatite biomimetica. Inoltre, sono state eseguite analisi del terreno per verificare la tendenza al bioaccumulo del rame; le analisi hanno rivelato che il bioaccumulo provocato dai prodotti tradizionali è circa il doppio di quello conseguente alla somministrazione di particelle nanostrutturate di HA biomimetica funzionalizzate. Se ne può dedurre che la formulazione con queste particelle ha migliorato significativamente l'assimilazione di questo microelemento da parte delle piante; ciò consente di ridurre le quantità di rame impiegato a vantaggio dell'impatto ambientale totale del trattamento fitosanitario.

I risultati della determinazione analitica dei valori di pH e di Cu mg/kg e S mg/kg ottenuti dal terreno in cui sono state trattate le uve rispettivamente con i prodotti commerciali tradizionali (Siam 20 e Tiovit jet) e con i metodi sperimentali (Rame Bio eco attivo 1 e Zolfo Bio eco attivo) sono riportati in Tabella sotto:

	Siram 20 WG	Bio Active 1 Copper	Tiovit jet	Bio sulphur
Prodotto usato in 600 L	10 kg	6 L	8 -10 kg	6 L
Prodotto usato in 200 L	3,5 kg	2L	2,5 – 3,5 kg	2L
Quantità totale di prodotto usato in 7.000 m ² (10 trattamenti totali)	35 kg	20 L	35 kg	20 L
Percentuale (w/w) di principio attivo nella formulazione	20%	5%	80%	40%
Quantità di agente attivo per ogni trattamento	0,7 kg	0,1 kg	2 – 2,8 kg	0,8 – 1,1 kg
Quantità totale di principio attivo (10 trattamenti totali)	7 kg	1 kg	28 kg	8 – 11 kg

È stata inoltre monitorata l'insorgenza di alcune patologie specifiche delle viti e la loro severità. Una speciale attenzione è stata data alla Plasmopara viticola e all' Erysiphe necator, che possono essere contrastate rispettivamente dal rame e dallo zolfo. Ciò è stato fatto tramite una valutazione visiva, tenendo nota del colorito del fogliame, della resa produttiva e dello stato generale del vigneto. Il monitoraggio del vigneto ha permesso di appurare che, pur impiegando quantità significativamente ridotte di rame e zolfo, con questo innovativo sistema si è potuto contrastare l'insorgenza delle patologie; questo obiettivo è stato raggiunto con i prodotti tradizionali, ma con quantità nettamente maggiori di microelementi. Anche le indagini di severità hanno confermato che le piante che hanno manifestato la patologia, trattate con le particelle nanostrutturate di HA biomimetica funzionalizzata, hanno esplicitato una sintomatologia meno aggressiva e più trattabile rispetto alle piante con patologia trattate con prodotti tradizionali.

Di seguito vengono mostrate alcune immagini che mostrano il confronto tra i risultati ottenuti con i trattamenti tradizionali e quelli con particelle di idrossiapatite biomimetica funzionalizzata. In particolare, nella Figura 6 si vedono le foglie delle piante trattate con prodotti tradizionali a base di zolfo e rame: appare evidente come tutto il bordo delle foglie presenti importanti segni di essiccazione e degradazione.



Figura 6. Pianta trattata con prodotti tradizionali a base di zolfo e rame.

La Figura 7 mostra le foglie di piante trattate con idrossiapatite biomimetica funzionalizzata: in questo caso appare evidente come tutta la superficie della foglia sia perfettamente verde e non presenti segni evidenti di essiccazione superficiale o lungo i bordi.



Figura 7. Pianta trattata con idrossiapatite biomimetica funzionalizzata.

Questo risultato è attribuibile alla speciale formulazione dei prodotti a base di idrossiapatite biomimetica funzionalizzata che risultano essere meno aggressivi sulla foglia, garantendo comunque una protezione dalle malattie fungine.

Le Figure 8 e 9 sottostanti mostrano le immagini condotte al microscopio elettronico a scansione (SEM) di alcune foglie di piante che hanno subito applicazioni con prodotti tradizionali di rame e zolfo (a destra) e con prodotti a base di idrossiapatite funzionalizzata (a sinistra). In particolare, in alto viene mostrata la parte superiore delle due foglie trattate con i diversi prodotti e in basso la parte inferiore.

È possibile notare che le foglie trattate con idrossiapatite biomimetica funzionalizzata (Fig. 8) appaiono punteggiate da piccoli aggregati rispetto a quelle che hanno invece subito applicazioni con i prodotti tradizionali (Fig. 9) dove sono presenti agglomerati di rame e zolfo molto più evidenti per dimensione e altamente cristallini.

In particolare, sulla superficie della foglia trattata con idrossiapatite (Fig. 8), è possibile osservare le microparticelle di Zolfo (di forma sferica, cerchiato in giallo) e le microparticelle inorganiche di fosfato di calcio (di forma irregolare, cerchiato in blu). Si nota come queste particelle ricoprano uniformemente tutta la superficie della foglia, svolgendo così la propria azione. Nella parte sottostante dell'immagine è riportata invece la parte inferiore della foglia. Anche in questo caso è possibile osservare come, sia le microparticelle di Zolfo, sia le particelle inorganiche di fosfato di calcio ricoprano in modo omogeneo tutta la superficie della foglia.

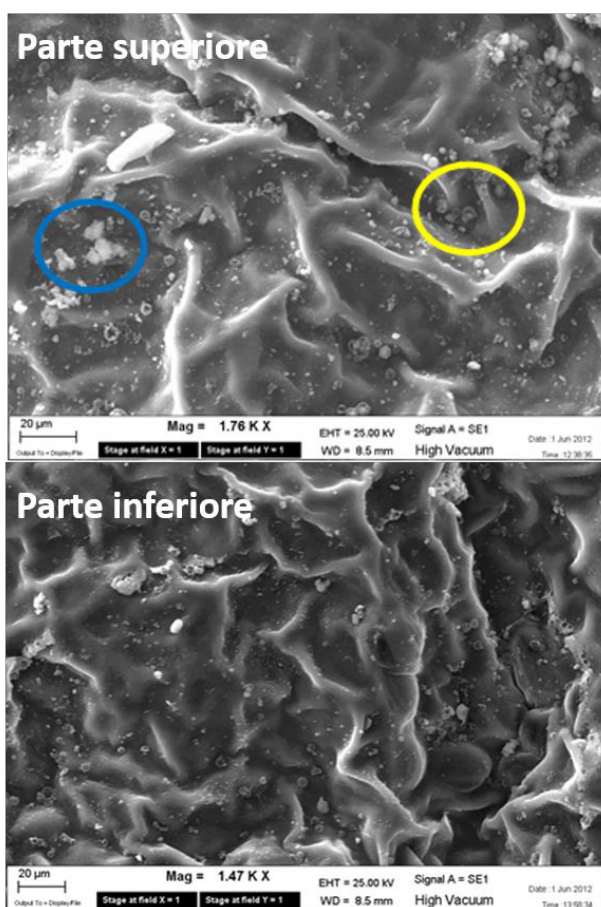


Figura 8. Pianta trattata con idrossiapatite biomimetica.

Nella Figura 9 invece è possibile notare come il prodotto tradizionale (evidenziato dai cerchi rossi) si distribuisca sulla superficie della foglia in modo completamente differente rispetto ai prodotti con idrossiapatite biomimetica osservati nelle immagini SEM di Figura 8. Infatti, mentre questi ultimi si distribuiscono su tutta la superficie fogliare, i prodotti tradizionali ricoprono la foglia in modo più disomogeneo.

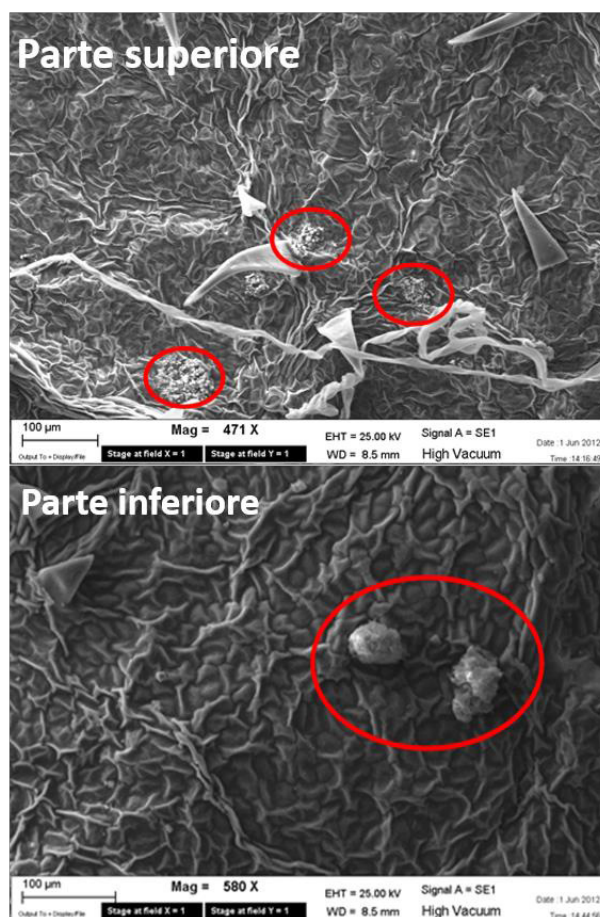


Figura 9. Pianta trattata con prodotti tradizionali.

3.1 Il rame in agricoltura

I mosti conservati a - 20 °C sono stati analizzati rispetto ai parametri enologici classici, come il pH, l'acidità totale (TA), i residui di concentrazione di Cu e S nell'uva. Sono state raccolte tre repliche di ciascun parametro. I dati sono espressi come valori medi ed errore standard.

L'acidità totale (TA) riferita all'acido tartarico, il pH unitario, il Cu mg/kg e l'S mg/kg come solfato di potassio sono stati misurati nel vino rosso "Dolcetto" prodotto rispettivamente con trattamenti tradizionali e sperimentali. I risultati sono riportati nella Tabella sotto:

Tipo di vino	Acidità totale [g/L]	pH	Cu [mg/kg]	S [mg/kg]
Vino rosso « Dolcetto » trattato con Siamam	6,12 ± 0,28	3,6 ± 0,1	< 0,1	0,60 ± 0,04
Vino rosso « Dolcetto » trattato con Bio Active 1 Copper	5,95 ± 0,28	3,6 ± 0,1	< 0,1	0,60 ± 0,04

4 Conclusioni

Questi promettenti risultati, infine, confermano che l'utilizzo di questa innovativa formulazione è in grado di abbassare sostanzialmente l'impatto ambientale del rame, garantendo ottimi risultati contro le patologie.

Due nuove formulazioni che contengono Cu e S a concentrazioni inferiori rispetto ai composti commerciali tradizionali sono state testate in campo sulla varietà di vino Dolcetto nel periodo da maggio 2021 a settembre 2021. I prodotti testati contengono particelle biomimetiche di idrossiapatite come agenti veicolanti che agiscono come un innovativo sistema di rilascio di ioni Cu e S. Sono stati forniti approfondimenti strutturali sulle caratteristiche chimiche dell'interazione tra nanoparticelle di idrossiapatite, Cu e S. Le nanoparticelle di idrossiapatite biomimetiche possono migliorare l'attività biologica delle sostanze bioattive utilizzate in agricoltura biologica e sono risultate efficaci quanto i composti tradizionali testati.

Bibliografia

1. Foley, J.A.; Ramankutty, N.; Brauman, K.A.; Cassidy, E.S.; Gerber, J.S.; Johnston, M.; Mueller, N.D.; O'Connell, C.; Ray, D.K.; West, P.C.; Balzer, C.; Bennett, E.M.; Carpenter, S.R.; Hill, J.; Monfreda, C.; Polasky, S.; Rockstrom, J.; Sheehan, J.; Siebert, S.; Tilman, D.; Zaks, D.P.M. Solutions for a Cultivated Planet. *Nature* 2011, **478**, 337-342
2. Muneret, L.; Mitchell, N.; Seufert, V.; Aviron, S.; Djoudi, E.A.; Pétilon, J.; Plantegenest, M.; Thiéry, D.; Rusch, A. Evidence that Organic Farming Promotes Pest Control. *Nature Sustainability*, 2018, **1**, 361-368
3. Lamichhane, J.R.; Osdaghi, E.; Behlau, F.; Köhl, J.; Jones, J. B.; Aubertot, J.-N. Thirteen Decades of Antimicrobial Copper Compounds Applied in Agriculture. A Review. *Agronomy for Sustainable Development* 2018, **38**, 28-47
4. La Torre, A.; Iovino, V.; Caradonia, F. Copper in Plant Protection: Current Situation and Prospects. *Phytopathologia Mediterranea* 2018, **57**, 201-236
5. Rai, M.; Ingle, A.P.; Pandit, R.; Paralikar, P.; Shende, S.; Gupta, I.; Biswas, J.K.; Silvério da Silva, S. Copper and Copper Nanoparticles: Role in Management of Insect-pests and Pathogenic Microbes. *Nanotechnol Rev* 2018, **7**, 303-315
6. Borkow, G.; Gabbay, J. Copper as a Biocidal Tool. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, **12**, 2163-2175
7. Rehman, M.; Liu, L.; Wang, Q.; Saleem, M.H.; Bashir, S.; Ullah, S.; Peng, D. Copper Environmental Toxicology, Recent Advances, and Future Outlook: a Review. *Environ Sci Pollut Res* 2019, **26**, 18003-18016
8. Altimira, F.; Yáñez, C.; Bravo, G.; González, M.; Rojas, L.A.; Seeger, M. Characterization of Copper-resistant Bacteria and Bacterial Communities from Copper-polluted Agricultural Soils of Central Chile. *BMC Microbiology* 2012, **12**, 193-205
9. Kunito, T.; Saeki, K.; Nagaoka, K.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S. Characterization of Copper-resistant Bacterial Community in Rhizosphere of Highly Copper-contaminated Soil. *European Journal of Soil Biology* 2001, **37**, 95-102
10. Hu, H.-W.; Wang, J.-T.; Li, J.; Li, J.-J.; Ma, Y.-B.; Chen, D.; He, J.-J. Field-based Evidence for Copper Contamination Induced Changes of Antibiotic Resistance in Agricultural Soils. *Environ Microbiol*. 2016, **11**, 3896-3909
11. Rehman, M.; Liu, L.; Wang, Q.; Saleem, M.H.; Bashir, S.; Ullah, S.; Peng, D. Copper Environmental Toxicology, Recent Advances, and Future Outlook: a Review. *Environmental Science and Pollution Research* 2019, **26**, 18003-18016
12. Fuller, R.J.; Norton, L.R.; Feber, R.E.; Johnson, P.J.; Chamberlain, D.E.; Joys, A.C.; Mathews, F.; Stuart, R.C.; Townsend, M.C.; Manley, W.J.; Wolfe, M.S.; Macdonald, D.W.; Firbank, L.G. Benefits of Organic Farming to Biodiversity Vary Among Taxa. *Biology Letters* 2005, **1**, 431-434
13. Kabir, M.; Iqbal, M.Z.; Shafiq, M.; Farooqi, Z.R. Effects of Lead on Seedling growth of *Thespesia populnea* L. *Advances in Environmental Biology*, 2009, **3**, 184-190
14. Thomas, F.; Malick, C.; Endreszl, E.C.; Davies, K.S. Distinct Responses to Copper Stress in the Halophyte, *Mesembryanthemum Crystallinum*. *Physiol. Plant*. 1998, **102**, 360-368
15. Pichhode, M.; Kumar Nikhil, K. Effect of Copper Mining Dust on the Soil and Vegetation in India: A Critical Review. *International Journal of Modern Sciences and Engineering Technology* 2015, **2**, 73-76
16. Demirevska-Kepova, K.; Simova-Stoilova, L.; Stoyanova, Z.; Holzer, R.; Feller, U. Biochemical Changes in Barley Plants After Excessive Supply of Copper and Manganese. *Environ Exp Bot* 2004, **52**, 253-266
17. Katare, J.; Pichhode, M.; Nikhil, K. Effect of Different Mining Dust on the Vegetation of District Balaghat, M.P. - A Critical Review. *International Journal of Science and Research* 2015, **4**, 603-607
18. Katare, J.; Pichhode, M.; Nikhil, K. Growth of *Terminalia bellirica* on the Malanjkhanda Copper Mine Overburden Dump Spoil Material. *International Journal of Research* 2015, **3**, 14-24
19. Lewis, S.; Donkin, M.E.; Depledge, M.H. Hsp 70 Expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) Exposed to Environmental Stressors. *Aqua Toxicol* 2001, **51**, 277-291
20. Stadtman, E.R.; Oliver, C.N. Metal Catalyzed Oxidation of Proteins. Physiological Consequences. *J Biol Chem* 1991, **266**, 2005-2008
21. Pichhode, M.; Nikhil, K. Effect of Copper Dust on Photosynthesis Pigments Concentrations in Plants Species. *International Journal of Engineering Research and Management* 2015, **02**, 63-66
22. Hegedus, A.; Erdei, S.; Horvath, G. Comparative Studies of H₂O₂ Detoxifying Enzymes in Green and Greening Barley Seedlings Under Cadmium Stress. *Plant Sci* 2001, **160**, 1085-1093
23. Sheldon, A.R.; Menzies, N.W. The Effect of Copper Toxicity on the Growth and Root Morphology of Rhodes Grass (*Chloris gayana* Knuth.) in Resin

- Buffered Solution Culture. *Plant and Soil* 2005, **278**, 341–349
24. Pichhode, M.; Nikhil, K. Effect of Copper Dust on Photosynthesis Pigments Concentrations in Plants Species. *International Journal of Engineering Research and Management* 2015, **02**, 63-66
 25. Kjær, C.; Elmegaard, N. Effects of Copper Sulfate on Black Bindweed *Polygonum Convolvulus L.* *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1996, **33**, 110–117
 26. Cook, C. M.; Kostidou, A.; Vardaka, E.; Lanaras, T. Effects of Copper on the Growth, Photosynthesis and Nutrient Concentrations of *Phaseolus* Plants. *Photosynthetica* 1997, **34**, 179–193
 27. Katare, J.; Pichhode, M.; Nikhil, K. Growth of *Terminalia bellirica* on the Malanjhand Copper Mine Overburden Dump Spoil Material. *International Journal of Research* 2015, **3**, 14-24
 28. Reganold, J.P.; Wachter, J.M. *Organic Agriculture in the Twenty-First Century Nature Plants* 2016, **2**, 1-8
 29. European Commission, 2002. Commission regulation (EC) No. 473/2002. *Off. J. Eur. Comm.* **L75**, 21e24
 30. Commission Implementing Regulation (EU) (2018/1981 of 13 December 2018)
 31. La Torre, A.; Righi, L.; Iovino, V.; Battaglia, V. Evaluation of Copper Alternative Products to Control Grape Downy Mildew in Organic Farming. *J Plant Pathol* 2019, **101**, 1005–1012
 32. Dagostin, S.; Schärer, H.J.; Pertot, I.; Tamm, L. Are There Alternatives to Copper for Controlling Grapevine Downy Mildew in Organic Viticulture? *Crop Prot.* 2011, **30**, 776–788
 33. Tamm, L.; Thuerig, B.; Apostolov, S.; Blogg, H.; Borgo, E.; Corneo, P.E.; Fittje, S.; de Palma, M.; Donko, A.; Experton, C.; Alcázar Marín, É.; Morell Pérez, Á.; Pertot, I.; Rasmussen, A.; Steinshamn, H.; Vetemaa, A.; Willer, H.; Herforth-Rahmé, J. Use of Copper-Based Fungicides in Organic Agriculture in Twelve European Countries. *Agronomy* 2022, **12**, 673-694
 34. Battiston, E.; Antoniello, L.; Di Marco, S.; Fontaine, F.; Mugnai, L. Innovative Delivery of Cu (II) Ions by a Nanostructured Hydroxyapatite: Potential Application in Planta to Enhance the Sustainable Control of *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 2019, **109**, 748-759
 35. Cabús, A.; Pellini, M.; Zanzotti, R.; Devigili, L.; Maines, R.; Giovannini, O.; Mattedi, L.; Mescalchin, E. Efficacy of Reduced Copper Dosages Against *Plasmopara viticola* in Organic Agriculture. *Crop Protection* 2017, **96**, 103-108
 36. Napoli, M.; Cecchi, S.; Grassi, C.; Baldi, A.; Zanchi C.A.; Orlandini, S. Phytoextraction of Copper from a Contaminated Soil Using Arable and Vegetable Crops. *Chemosphere* 2019, **219**, 122–129
 37. Dagostin, S.; Hans-Jakob Schärer, H.-J.; Pertot, I.; Tamm, L. Are There Alternatives to Copper for Controlling Grapevine Downy Mildew in Organic Viticulture? *Crop Protection* 2011, **30**, 776-788
 38. Miernicki, M.; Hofmann, T.; Eisenberger, I.; von der Kammer, F.; Praetorius, A. Legal and Practical Challenges in Classifying Nanomaterials According to Regulatory Definitions. *Nat. Nanotechnol.* 2019, **14**, 208–216
 39. Bleeker, E.A.J.; de Jong, W.H.; Geertsma, R.E.; Groenewold, M.; Heugens, E.H.W.; Koers-Jacquemijns, M.; van de Meent, D.; Popma, J.R.; Rietveld, A.G.; Wijnhoven, S.W.P.; Cassee, F.R.; Oomen, A.G. Considerations on the EU Definition of a Nanomaterial: Science to Support Policy Making. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2013, **65**, 119–125
 40. DeRosa, M.; Monreal, C.; Schnitzer, M.; Walsh, R.; Sultan, Y. Nanotechnology in Fertilizers. *Nature Nanotech* 2010, **5**, 91
 41. Zulfiqar, F.; Navarro, M.; Ashraf, M.; Nudrat, A. A.; Munné-Bosch, S. Nanofertilizer Use for Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. *Plant Science* 2019, **289**, 110270-110281
 42. Cervantes-Avilés, P.; Huang, X.; Keller, A.A. Dissolution and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Root Exudates and Soil Leachate: Implications for Nanoagrochemical Application. *Environ. Sci. Technol.* 2021, **55**, 13443–13451
 43. Avellan, A.; Yun, J.; Morais, B.P.; Clement, E.T.; Rodrigues, S.M.; Lowry, G.V. Critical Review: Role of Inorganic Nanoparticle Properties on Their Foliar Uptake and in Planta Translocation. *Environ. Sci. Technol.* 2021, **55**, 13417–13431
 44. Shang, H.; Ma, C.; Li, C.; Zhao, J.; Elmer, W.; White, J.C.; Xing, B. Copper Oxide Nanoparticle-Embedded Hydrogels Enhance Nutrient Supply and Growth of Lettuce (*Lactuca sativa*) Infected with *Fusarium oxysporum f. sp. lactucae*. *Environ. Sci. Technol.* 2021, **55**, 13432–13442
 45. Baddar, Z.E.; Unrine, J.M. Effects of Soil pH and Coatings on the Efficacy of Polymer Coated ZnO Nanoparticulate Fertilizers in Wheat (*Triticum aestivum*). *Environ. Sci. Technol.* 2021, **55**, 13532–13540
 46. Shen, M.; Liu, W.; Zeb, A.; Lian, J.; Wu, J.; Lin, M. Bioaccumulation and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles in Soil-grown *Brassica chinensis L.* and Potential Risks. *Journal of Environmental Management* 2022, **306**, 114454-114462
 47. Read, T.L.; Doolette, C.L.; Howell, N.R.; Kopittke, P.M.; Cresswell, T.; Lombi, E. Zinc Accumulates in the Nodes of Wheat Following the Foliar Application of 65Zn Oxide Nano- and Microparticles. *Environ. Sci. Technol.* 2021, **55**, 13523–13531
 48. Gao, X.; Kundu, A.; Bueno, V.; Rahim, A.A.; Ghoshal, S. Uptake and Translocation of Mesoporous SiO₂ Coated ZnO Nanoparticles to *Solanum lycopersicum* Following Foliar Application. *Environ. Sci. Technol.* 2021, **55**, 13551–13560
 49. Turon, P.; Del Valle, L.J.; Alemán, C.; Puiggali, J. Biodegradable and Biocompatible Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles. *Appl. Sci.* 2017, **7**, 60-87
 50. Sanchez, C.; Arribart, H.; Giraud Guille, M.M. *Nat. Mater.* 2005, **4**, 277–288
 51. Li, Z.; Huang, J. Effects of Nanoparticle Hydroxyapatite on Growth and Antioxidant System in

- Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) from Cadmium-Contaminated Soil. *J. Nanomater.* 2014 (2014), 1-7
52. Marchiol, L.; Filippi, A.; Adamiano, A.; Degli Esposti, L.; Iafisco, M.; Mattiello, A.; Petrusa, E.; Braidot E. Influence of Hydroxyapatite Nanoparticles on Germination and Plant Metabolism of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Preliminary Evidence. *Agronomy* 2019, **9**, 161-178
53. Kottegoda, N.; Sandaruwan, C.; Priyadarshana, G.; Siriwardhana, A.; Rathnayake, U.A.; Arachchige, D.M.B.; Kumarasinghe, A.R.; Dahanayake, D.; Karunaratne, V.; Amaratunga, G.A.J. Urea-Hydroxyapatite Nanohybrids for Slow Release of Nitrogen *ACS Nano* 2017, **11**, 1214–1221
54. Maghsoodi, M.R.; Najafi, N.; Reyhanitabar, A.; Oustan, S. Hydroxyapatite Nanorods, Hydrochar, Biochar, and Zeolite for Controlled Release Urea Fertilizers. *Geoderma* 2020, **379**, 114644-114659.
55. Shanmugam, S.; Gopal, B. Copper Substituted Hydroxyapatite and Fluorapatite: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Properties. *Ceramics International* 2014, **40**, 15655–15662
56. Stanić, V.; Dimitrijević, S.; Antić-Stanković, J.; Mitrić, M.; Jokić, B.; Plećaš, I.B.; Raičević, S. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Copper and Zinc-doped Hydroxyapatite Nanopowders. *Applied Surface Science* 2010, **256**, 6083–6089
57. Wintz, H.; Fox, T.; Vulpe, C. Responses of Plants to Iron, Zinc and Copper Deficiencies. *Biochem. Soc. Trans.* 2002, **30**, 766–768
58. Reeves, R.D.; Baker, A.J.M. Metal-accumulating plants. In *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley 2000, 193–229. ISBN 9780471192541
59. Monni, S.; Salemma, M.; Millar, N. The Tolerance of *Empetrum nigrum* to Copper and Nickel. *Environ. Pollut.* 2000, **109**, 221–229
60. Fertilized Compositions Based on a Substituted Calcium Phosphate and/or Calcium Carbonate Compound. Roveri, N.; Cecchini, A.; Morselli, S.; Lelli, M.; Mercuri, R. European Patent EP WO2016189521A3
61. Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *Journal American Chemical Society* 1938, **60**, 309-319
62. Nara, S.; Komiya, T. *Starch/Stärke* 1983, **35**, 407-411
63. Patterson, A. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. *Phys. Rev.* 1939, **56**, 978–98