

**Progetto PRO.VI.SE.BIO. – U.O. 4**

**RELAZIONE**

**Sull'attività svolta nell'ambito della Convenzione CNR-ICTP/CRA-PAV**

**Istituto di Chimica e Tecnologia dei Polimeri (CNR-ICTP)**

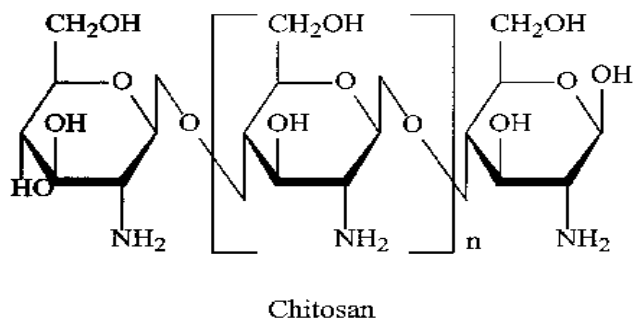
**Sviluppo di nuovi metodi per il trattamento della semente biologica**

Nell'ambito del progetto l'U.O. ICTP del CNR di Pozzuoli utilizzerà biopolimeri a base polisaccaridica per realizzare coating in grado di proteggere il seme biologico da attacchi microbici. Da molti anni l'ICTP è impegnato nella messa a punto di formulazioni di vernici biodegradabili in base acquosa finalizzate ad applicazioni nel settore agricolo per la pacciamatura dei terreni (1). In base alle conoscenze ed alle competenze acquisite negli anni in merito alle potenzialità prestazionali dei diversi polisaccaridi studiati e testati, nell'ambito del progetto "PRO.VI.SE.BIO" l'ICTP ha inizialmente focalizzato la propria attenzione sull'applicazione di polisaccaridi sia di origine marina quali il chitosano, sia di origine terrestre quali i galattomannani: entrambi i biopolimeri, infatti, sono in grado di svolgere in modo sinergico diverse funzioni: essi possono dar luogo a film omogenei ed opportunamente plasticizzati in modo da garantire coating uniformi e continui, possono esplicare attività antimicrobiche se opportunamente additivati con sostanze gradualmente rilasciate dalla matrice polimerica, possono essere degradati e biodegradati in tempi e modalità modulabili e comunque fortemente dipendenti dalle condizioni sperimentali nelle quali si trovano ad operare, possono essere inoltre facilmente ottenuti da fonti rinnovabili.

In questa fase del progetto l'ICTP ha effettuato prove sperimentali utilizzando soluzioni acquose di chitosano e di galattomannani.

**Ricoprimenti a base di chitosano**

Il chitosano è un polisaccaride che si ottiene per deacetilazione della chitina, polisaccaride estratto prevalentemente dall'esoscheletro dei crostacei. E' il secondo polisaccaride più abbondante in natura, dopo la cellulosa, di cui ricorda la struttura; svolge attività antimicrobiche ed antibatteriche ben note sia nel settore biomedicale, farmaceutico, alimentare, sia nel settore agricolo dove è utilizzato sui terreni come antimicrobico e come erbicida (2, 3).



Essendo insolubile in acqua e solubile in ambiente acido, il chitosano dà luogo a film resistenti all'acqua. Questa proprietà lo rende particolarmente interessante se si considera che i semi trattati con esso saranno depositati sul suolo opportunamente bagnato. E' possibile inoltre potenziare le sue proprietà antibatteriche includendo nelle soluzioni, molecole bioattive quali oli essenziali, polifenoli, ormoni vegetali, utilizzati tal quali o sotto forma di complessi idrosolubili con la beta-ciclodestrina. Queste sostanze naturali, ben note per la loro attività antibatterica ed antiossidante, sono utilizzabili nella concia del seme. L'ICTP ha preparato soluzioni a base di chitosano sciolto in soluzioni acquose a base di acido acetico ed acido lattico, i due solventi organici più comunemente utilizzati per questo polimero. Sono state preparate soluzioni di chitosano in acido acetico al 3% e in acido lattico all'1.5%.

#### **Ricoprimenti a base di galattomannani.**

I galattomannani sono miscele di polisaccaridi che derivano dai semi di piante leguminose; chimicamente sono formate da unità di mannosio e galattosio fortemente ramificate e dunque in grado di dar luogo a soluzioni fortemente viscosi e/o sospensioni colloidali. La loro eccezionale capacità filmogena con film stabili in acqua ed in grado di reidratarsi aumentando anche di trenta volte il loro peso iniziale senza distruggere il network tridimensionale, rende questi biopolimeri interessanti dal punto di vista applicativo per la concia del seme; i galattomannani formano un film continuo; essendo in grado di reidratarsi, è possibile includere nella matrice polimerica principi bioattivi successivamente rilasciati. (4) A tal proposito sono state preparate soluzioni acquose a concentrazione nota di galattomannani e sostanze antimicrobiche sono state additivate seguendo la stessa metodologia utilizzata per il chitosano.

I semi sui quali sono state effettuate prove di bagnabilità sono stati procurati dalla U.O CRA\_PAV Dr. Riccioni:

Carota, seme convenzionale, fornito da ENSE/CAC

Fagiolo, seme convenzionale, fornito da ENSE/CAC

Cece varietà Pascià, seme convenzionale, fornito da ENSE/CAC,

Grano duro varietà Cappelli, seme autoprodotta fornito da AIAB,

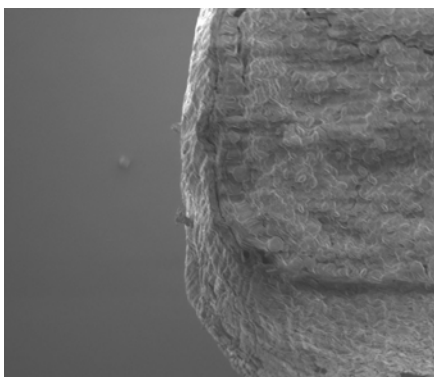
Grano tenero varietà Capo, seme autoprodotta, provenienza Friuli Venezia Giulia.

A causa delle ridotte dimensioni dei semi di carota, la metodologia di ricoprimento idonea dovrà essere opportunamente modulata; prove preliminari sono state fatte invece sugli altri semi.

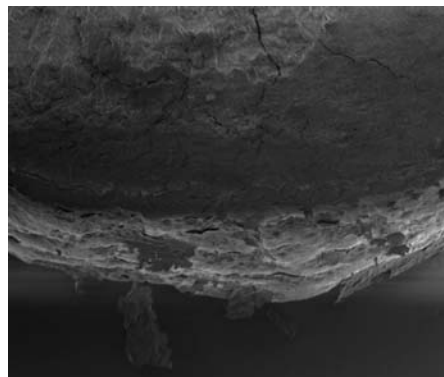
Le soluzioni dei polimeri selezionati, chitosano e galattomannani, sono state additivate con il 30% in peso di olio di timo bianco (5). Le prove sui semi sono state effettuate a Roma presso i laboratori del CRA utilizzando l'apparecchiatura in dotazione. Si tratta di un Rotostat per la concia chimica dei semi. Sono stati posti nella camera quantità di semi comprese tra i 25 ed i 40 g e sono state aggiunte 1 o 2 ml delle diverse soluzioni preparate. Sui semi sono stati effettuati 1, 2, 3 o sei trattamenti successivi per variare lo spessore dei coatings. Una prima analisi effettuata attraverso un microscopio ottico ha evidenziato la diversa bagnabilità più o meno accentuata dei semi in base alla diversa superficie del tegumento; tuttavia la microscopia elettronica a scansione (SEM), effettuata in via preliminare sui semi di grano duro ricoperti di film a base di chitosano, hanno evidenziato la formazione di un film continuo e ben adeso alla superficie del seme; eccessivi trattamenti e dunque spessori elevati, tuttavia, determinano il distacco del film stesso dalla superficie del seme; tra i fattori responsabili della continuità del film e della perfetta adesione superficiale, laddove sia stata confermata la bagnabilità dei semi stessi, lo spessore sembra essere sicuramente un fattore importante.

Dopo i risultati incoraggianti avuti nel corso del I anno di attività del progetto, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui ricoprimenti a base di chitosano sciolto in acido lattico con l'aggiunta di olio di timo bianco. E' stato quindi preparato un litro di soluzione di chitosano all'1% in una soluzione acquosa di acido lattico all'1.5%. A questa soluzione è stato aggiunto olio di timo fino al 50% in peso rispetto al chitosano. L'olio di timo è stato scelto in quanto è un antisettico naturale. I semi di grano duro varietà Simeto e grano tenero varietà Sagittario sono stati pellicolati nell'apparecchiatura Rotostat per la concia chimica del seme in dotazione al CRA di Roma alle seguenti condizioni: 5ml di soluzione pellicolante per 200 grammi di seme, tenuti in rotazione per 20 secondi. Una volta asciugato il seme all'aria si è passati al secondo trattamento effettuato alle stesse condizioni, e così via fino al numero di strati desiderato. I successivi trattamenti hanno avuto lo scopo di verificare se e come lo spessore del coating potesse influenzare la capacità protettiva sul seme e germinativa dello stesso dopo la conservazione. I semi così trattati sono stati confrontati con i semi non trattati. I semi sono stati analizzati con il microscopio elettronico a scansione Quanta Fei 200 in modalità normale per valutare lo stato del ricoprimento. A titolo di esempio sono

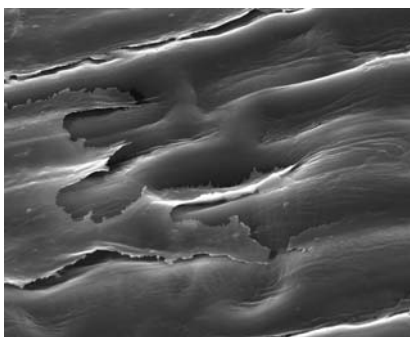
riportate le micrografie prese su due semi di grano duro e tenero con tre strati di chitosano. In entrambe le foto è visibile la pellicola di chitosano che ricopre il seme indicando che tre passaggi non sono sufficienti per garantire un perfetto ricoprimento, ma che comunque c'è affinità tra il tegumento e la pellicola. Nella terza figura è riportato un seme sottoposto a sei trattamenti, più efficace. In confronto è mostrato il seme di grano duro senza alcun tipo di ricoprimento



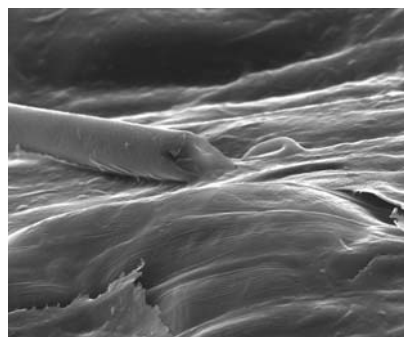
Grano duro senza trattamento



Grano duro dopo sei trattamenti



Seme di grano duro 3 strati



Seme di grano tenero tre strati

I semi pellicolati sono stati anche sottoposti a due diversi trattamenti: nel primo caso i semi sono stati tenuti in capsula di Petri a saturazione di umidità ed osservati dopo 24 e 48 ore per verificare se il trattamento avesse influenza sulla germinazione.

Nel secondo caso i semi sono stati tenuti per 24 ore in ambiente a saturazione di umidità, poi sono stati tenuti per 24 ore in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  ed osservati successivamente al microscopio elettronico a scansione in modalità ambientale. Questo trattamento viene effettuato per uccidere il germinello del seme ed effettuare quindi un'analisi sulla qualità del seme. L'analisi dei semi al

microscopio per entrambi i trattamenti è stata effettuata dalla Dr.ssa Laura Orzali del CRA-Pav. I risultati sono riportati nella relazione che accludo.

Dr. Mario Malinconico

ICTP



Mario Malinconico

#### Riferimenti Bibliografici

- 1) Monitoring of the degradation dynamics of agricultural films by IR thermography,  
P. Mormile, L. Petti, M. Rippa, B. Immirzi, M. Malinconico, G. Santagata *Polymer Degradation and Stability* 92 (2007) 777-784
- 2) Yu-Bey Wu, Shu-Huei Yu, Fwu-Long Mi, Chung-Wei Wu, Shin-Shing Shyu, Chih-Kang Peng, An-Chong Chao, *Carbohydrate Polymers* 57 (2004) 435–440
- 3) Hong Kyoon No, Na Young Park, Shin Ho Lee, Samuel P. Meyers, *International Journal of Food Microbiology* 74 (2002) 65– 72
- 4) Controlled release of antihypertensive drug from the interpenetrating network poly(vinyl alcohol)–guar gum hydrogel microspheres  
Soppimath, Kumares S.; Kulkarni, Anandrao R.; Aminabhavi, Tejraj M. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Volume 11, Number 1, 2000 , pp. 27-43(17)
- 5) Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils  
Maria C. Rota, Antonio Herrera, Rosa M. Martí´nez, Jose A. Sotomayor, Mari´a J. Jordan *Food Control* 19 (2008) 681–687