



Richiesta per borsa di studio da attivare ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

La sottoscritta Carbone Marilena qualifica professore associato afferente al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche Interno: 4470 email: carbone@uniroma2.it

CHIEDE

L'attivazione di una borsa di studio di dottorato ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021. A tal fine comunica quanto segue:

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo: Scienze Chimiche Area per la quale si presenta la richiesta (selezionare solo una delle due):

- Innovazione
- Green

Tipologia di cofinanziamento (pari ad euro 8000 una tantum):

- Nome dell'Ente finanziatore pubblico o privato: CNR Istituto di Fotonica e Nanotecnologie

Persona di Riferimento: Dr. Annamaria Gerardino Telefono: 06 41522242 (uff.), 06 41522203 (lab.). Email: annamaria.gerardino@cnr.it

- Fondi di ricerca dipartimentali

Progetto di Ricerca (massimo 10.000 battute complessive spazi inclusi) che comprenda

Descrizione del Progetto:

Il progetto di dottorato si propone implementare la sintesi green di FHP (fluorescent highlighting particles) a base di ZnO e MIP (molecular imprinted polymers) per la rivelazione di pesticidi clorurati e di ocratossine (micotossine clorurate) mediante spettroscopia a fluorescenza e tecniche di imaging. L'obiettivo è di sviluppare procedure di identificazione rapide, simultanee e non distruttive da impiegare nella catena alimentare, in particolar modo sulle spezie.

L' "European Green Deal" è un percorso di trasformazione dell'Europa in una società a impatto climatico zero, giusta e prospera, proposto dalla Commissione Europea, all'interno del quale un ruolo primario viene rivestito dalla strategia "Farm to Fork" (F2F) studiata per trasformare il sistema alimentare europeo, rendendolo più sostenibile sotto diversi aspetti. In quest'ottica, vengono positivamente valutate misure che coinvolgono l'intera filiera alimentare, dalla produzione al consumo, passando per la distribuzione. Inoltre, una delle missioni individuate dal programma è "zero residui e zero contaminazione". Di conseguenza diventa di fondamentale importanza l'individuazione rapida e non distruttiva di eventuali contaminanti accidentali o deliberati che compromettano lo standard F2F di colture e alimenti. L'esposizione involontaria a fungicidi e pesticidi è un fattore di rischio per la salute dei consumatori. Analogamente le micotossine come l'ocratossina A (OTA) rappresentano il più alto rischio per la salute umana per la loro sospetta cancerogenicità. La verifica della presenza di eventuali contaminanti nelle spezie, tra l'altro è di particolare importanza, considerato l'alto consumo, stimato a 385.000 t nel 2012 e in aumento¹. La "European Crop Protection Association", che monitora la quantità



di sostanze attive nei prodotti fitosanitari suddivisi in diverse categorie (fungicidi, erbicidi, insetticidi, regolatori di crescita delle piante), ha stimato che, in Italia, solo i fungicidi ammontano a 18.736 t in agricoltura e orticoltura². Tra i pesticidi utilizzati in agricoltura, i pesticidi clorurati e gli insetticidi (es. penconazolo, tebuconazolo, tetraconazolo) trovano largo impiego nelle spezie ed erbe come pepe nero, peperoncino, prezzemolo, rosmarino, timo, alloro, menta, per citarne alcuni per cui sono documentati effetti negativi³. Ad oggi, la rilevazione di pesticidi clorurati e fungicidi come il penconazolo è operata mediante metodi cromatografici classici⁴ insieme a metodi di rilevazione immunoenzimatici o elettrochimici scalabili⁵, ma sono costosi e/o poco pratici e richiedono un'estrazione preventiva. L'Ocratossina A (OTA) è prodotta principalmente da *Penicillium verrucosum*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* e può contaminare i prodotti agricoli prima del raccolto o più comunemente durante lo stoccaggio. L'OTA è stata classificata dall'IARC come probabile cancerogena per l'uomo (Gruppo 2B) (IARC, 1993). Il Regolamento CE n. 1137/2015 ha fissato limiti massimi di 15-20 µg /kg nelle spezie e nelle miscele speziate. L'OTA è una micotossina nefrotossica, epatotossica, neurotossica, teratogena, immunosoppressiva e cancerogena per l'uomo e numerose specie animali. Il suo principale organo bersaglio è il rene, dove le lesioni si trovano principalmente nell'epitelio del tubulo prossimale⁶. Diversi studi hanno valutato la presenza di OTA in spezie ed erbe⁷⁻⁹ e analogamente ai pesticidi clorurati, la loro rilevazione viene effettuata con mezzi classici, relativamente poco pratici e dispendiosi.

L'obiettivo del progetto è implementare un mezzo di rilevamento di micotossine e pesticidi clorurati (tebuconazolo e tetraconazolo), rapido, multianalita, non distruttivo e a basso impatto ambientale, da applicare al controllo di spezie selezionate, in particolare peperoncino, noce moscata, rosmarino e basilico. Il progetto si sviluppa in tre fasi interconnesse:

- Sintesi di “evidenziatori” fluorescenti
- Interazione con i campioni di spezie selezionate
- Rilevazione tramite spettroscopia di fluorescenza ed imaging congiunta all'analisi dei dati multivariati per la caratterizzazione di matrici alimentari contaminate, e validazione del metodo.

Per realizzare l'obiettivo ci si avvarrà di un dispositivo portatile per spettroscopia e imaging NIR-UV-Vis e fluorescenza, messo a punto presso l'Istituto di Fotonica e Nanotecnologie del CNR e testato con successo per la detezione di aflatossine nelle mandorle¹⁰. Poiché pesticidi clorurati e OTA non sono intrinsecamente fluorescenti (né sono rilevabili con il metodo elettrochimico diretto), richiedono trattamenti aggiuntivi per la loro rilevazione. Per garantire la fluorescenza estrinseca dei contaminanti si prevede di utilizzare nanoparticelle di ZnO, un materiale a minimo impatto ambientale, a differenza, ad esempio, dei quantum dots di CdTe, che sono fluorescenti, ma inquinanti. Inoltre, il gruppo di ricerca proponente ha recentemente messo a punto un metodo di sintesi di nanoparticelle di ZnO (ZnO-NPs) completamente green¹¹, vale a dire con uso esclusivo di acqua come solvente e procedure a temperature massime di 40°C. E' necessario, inoltre, procedere alla funzionalizzazione delle ZnO-NPs per ottenere una interazione selettiva con i contaminanti clorurati. Si prevede quindi di creare un capping delle ZnO-NPs con materiali di tipo APTES che interagiscono selettivamente con specie clorate. In aggiunta, per agire sulla selettività verranno sintetizzati MIPs. In generale, in saggi enzimatici, le micotossine vengono riconosciute attraverso interazione anticorpo-antigene, considerate altamente selettive e diversi saggi immunologici o metodi di separazione disponibili in commercio si basano su di essa. I MIPs possono imitare lo stesso meccanismo di "chiave-serratura" dei sistemi naturali anticorpo-antigene ma sono meno costosi e talvolta più stabili rispetto ai materiali basati su saggi immunologici. Nello specifico, MIPs saranno sintetizzati mediante procedure sol-gel usando monomeri e agenti reticolanti derivati del silicio



(APTES, APTMS) che presentano $-NH_2$ o equivalenti per legarsi al $-Cl$ dell'OTA e/o dei pesticidi clorurati mediante sostituzione. Inoltre, la loro efficacia è già stata, in una certa misura, verificata^{12,13} e sono di basso impatto ambientale.

A questo seguiranno caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate e verifica dell'interazione NPs-contaminanti clorurati e loro selettività. Per la caratterizzazione dei materiali si prevede di utilizzare XRD, SEM e spettroscopia IR (ATR). La detezione delle proprietà fluorescenti e di selettività verrà effettuata in prima battuta in soluzioni e/o dispersioni acquose, attraverso misure di fluorimetria. Successivamente verranno testate matrici alimentari a contaminazione controllata con il dispositivo portatile, in associazione ad un metodo classico (es. HPLC su omogeneizzato e liofilizzato) per validare le misure. In particolare, per ogni tipo di spezia/erba, verranno preparati set di campioni di calibrazione mediante contaminazione controllata della matrice, omogeneizzazione e divisione in aliquote per la caratterizzazione parallela utilizzando metodi convalidati (HPLC e HPLC + spettrometria di massa rispettivamente per micotossine e pesticidi/fungicidi) e approccio spettrale. Più in dettaglio, peperoncino, noce moscata, rosmarino e basilico commerciali saranno essiccati a $40^\circ C$ per 48 h, macinati e omogeneizzati. I campioni saranno quindi contaminati con diverse quantità di pesticidi clorurati o fungicidi (tebuconazolo, tetraconazolo). Le restanti aliquote di omogeneizzato contaminato di ogni campione verranno analizzate tal quali o dopo liofilizzazione mediante fluorescenza e/o spettroscopia NIR. Inoltre, gli omogeneizzati contaminati verranno miscelati con una quantità nota di FHP "rivelatori" funzionalizzati selezionati e analizzati di conseguenza. I campioni non contaminati verranno prodotti con la stessa procedura e testati per confronto.

. L'analisi dei dati partirà da un livello di pre-elaborazione finalizzato all'ottimizzazione, compressione e integrazione dei dati per la fase di analisi successiva (eliminazione del fondo, minimizzazione del rumore, media, levigatura, eliminazione dei valori anomali). Una volta ottimizzata la pre-elaborazione dei dati per ogni caso considerato, questi verranno trasferiti su un cloud per la successiva fase di elaborazione che includerà la fusione dei dati e l'analisi multivariata (inizialmente con approcci non supervisionati, e in una seconda fase con tecniche supervisionate) per arrivare a classificazioni in termini di classi di contaminazione residua. Una volta raggiunta una quantità di dati statisticamente significativa, le tecniche di analisi convenzionali saranno integrate da approcci di machine learning o deep learning.

Obiettivi formativi:

- Sviluppo della capacità di valutare il problema scientifico in base a delle linee guida generali e ad obiettivi specifici.
- Sviluppo di sensibilità a tematiche ambientali e consolidamento di procedure di laboratorio, in un contesto eco-friendly.
- Versatilità nella valutazione e nell'utilizzo dei mezzi di sintesi, spettroscopia multispettrale ai fini di ottimizzare i parametri rispetto agli obiettivi.
- Apprendimento e consolidamento di tecniche spettroscopiche a scopo diagnostico e analisi dati.



- Interazione con ambienti di ricerca diversi, sviluppo di capacità di cogliere gli aspetti innovativi derivanti da approcci da prospettive diverse, adattamento e integrazione.

Attività previste:

- Sintesi delle nanoparticelle di ZnO e loro funzionalizzazione. Sintesi di MIP. Valutazione dei parametri di sintesi finalizzata all'ottenimento di condizioni "eco-friendly".
- Caratterizzazione delle nanoparticelle, con o senza funzionalizzazione, con tecniche di diffrazione di raggi-X, SEM, spettroscopia IR.
- Ottimizzazione delle caratteristiche delle nanoparticelle di ZnO e dei MIP in funzione della loro caratterizzazione e delle prestazioni nella detezione di pesticidi e micotossine clorurate, attraverso misure di fluorimetria.
- Applicazione di metodi di validazioni con tecniche classiche di cromatografia (HPLC)
- Ottimizzazione delle tecniche di spettroscopia di fluorescenza per l'analisi dei segnali delle nanoparticelle che agiscono da nanosensori per la rivelazione della presenza delle sostanze contaminanti
- Sviluppo di tecniche di analisi dati multivariate per la classificazione dei campioni analizzati

Attinenza del progetto all'area indicata:

L'impianto del progetto proposto è del tipo Green-to-Green-to-Green (G2G2G), vale a dire "green synthesis" per un "green purpose", all'interno del "Green Deal". Ci si propone, infatti, di monitorare la presenza di contaminanti clorurati, attraverso un sistema multispettrale non invasivo con l'impiego di evidenziatori fluorescenti eco-friendly, ottenuti con sintesi green, nell'ottica "zero residui, zero contaminanti". Inoltre, il metodo proposto consente di rilevare simultaneamente le micotossine clorurate (e in particolare OTA) e residui di pesticidi clorurati in matrici contenenti spezie, con notevole risparmio di risorse.

Risultati attesi:

Ci si aspetta di mettere a punto un metodo di analisi non invasivo di contaminanti clorurati, pesticidi e micotossine, in matrici alimentari, in particolare spezie, che utilizzino un dispositivo portatile multispettrale, ed evidenziatori fluorescenti a basso impatto ambientale, sintetizzati con metodi green. Dal punto di vista formativo, il risultato atteso è l'approccio eco-friendly e flessibile a tematiche di interesse ambientale e nella fattispecie alimentare. Inoltre, l'apprendimento e il consolidamento di procedure di laboratorio, caratterizzazione spettroscopica e analisi dati, finalizzati ad un risultato, le cui scelte siano orientate verso metodi green.



Riferimenti bibliografici

1. van Asselt et al., Food Control 83 (2018) 7 e 17
2. European Crop Protection Association (ECPA). <http://www.ecpa.eu/information-page/industry-statistics-italy>.
3. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Report (2015), JMPR_2015%20Report.pdf
4. W. Yao, Z. Zhang, S. Song, X. Hao & Y. Xu, L. Han, Food Analytical Methods (2019) 12:176–189. 1
5. Ermolaeva et al., Food Analytical Methods (2019) 12:2785–2801
6. Mally et al., Chemical Research in Toxicology 18 (2005) 1242-52
7. Reinholds et al., Food Additives & Contaminants: B, 2017 VOL. 10, NO. 1, 5 – 14
8. Martins et al., Food Addit. Contam. 18 (2001) 315–319
9. Iha and Trucksess, Food Additives & Contaminants: Part A 27 (2019) 1142-1147
10. Bertani et al. Food Control, vol. 112, ISSN: 0956-7135, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.107073 -
11. Donia et al. Symmetry Room temperature syntheses of zno and their structures
12. Babazadeh et al. Sci Rep 10 (2020)14327
13. Carbone, report interno, disponibile su richiesta

Azienda pubblica o privata coinvolta nazionale o straniera in cui si prevede di far svolgere il periodo obbligatorio da 6 a 12 mesi previsto dal Decreto Ministeriale:

CNR Istituto di Fotonica e Nanotecnologie, sede di Roma.

Firma

Per il CNR, Istituto di Fotonica
E Nanotecnologie

Dr. Annamaria Gerardino