

## Studio dell'inibizione dei metallo-enzimi ureasi e ammoniaca mono-ossigenasi utilizzando materiali ottenuti tramite crystal-engineering

È stato stimato che la popolazione mondiale raggiungerà i 9 miliardi entro il 2050.<sup>1</sup> Per sostenere la conseguente domanda di cibo, sarà necessaria un'espansione del 70-100% nella produzione agricola globale.<sup>2</sup> L'azoto (N) è un nutriente essenziale per l'agricoltura e la produzione alimentare,<sup>3</sup> e sussistono preoccupazioni circa l'impatto umano sul ciclo N globale.<sup>4-5</sup> A differenza del fosforo (P), N possiede un'alta reattività nell'ambiente ed è soggetto a perdite significative, sia nelle falde acquifere sotterranee che nell'atmosfera.<sup>5-9</sup> Pertanto, nuovi approcci di gestione dei nutrienti azotati sono essenziali per la fertilizzazione sostenibile del suolo e la produttività delle colture.

L'urea è il fertilizzante azotato più importante, e rappresenta oltre il 60% dell'uso globale di fertilizzanti.<sup>10</sup> L'urea è prodotta usando ammoniaca ottenuta utilizzando il metodo Haber, un processo ad alta intensità energetica che richiede alta temperatura e pressione in presenza di un catalizzatore, utilizzando fino all'1% di energia globale ed il 4% di gas naturale.<sup>11-12</sup> Al momento della deposizione nel suolo, l'urea viene rapidamente idrolizzata in ammonio e bicarbonato, un processo catalizzato dall'ureasi, un enzima Ni-dipendente che si trova nel suolo sia come enzima intracellulare sia extra-cellulare.<sup>13-14</sup>

Questa idrolisi provoca un rapido aumento del pH nel mezzo che porta alla formazione di ammoniaca e conseguente perdita di N dal suolo. Lo ione ammonio formato dall'idrolisi dell'urea funge da nutriente per le piante ma subisce anche un processo di nitrificazione aerobica da parte di batteri del suolo, che porta alla formazione di nitrito ed eventualmente nitrato. In questo processo, l'ossidazione iniziale di ammonio in idrossilammina è catalizzata dall'ammonio monoossigenasi (AMO), un enzima Cu-dipendente, seguita dalla formazione di nitrito catalizzata dalla idrossilammina ossidoriduttasi, un enzima Fe-dipendente, e infine dalla formazione di nitrato, catalizzata dalla nitrito-ossidoriduttasi, un enzima Mo-dipendente.<sup>15</sup> Il nitrato così formato in questi processi viene assorbito dalle radici delle piante o entra in un percorso di denitrificazione anaerobica, convertito in nitrito dalla nitrato-reduttasi, un enzima Mo-dipendente, ed eventualmente in forme gassose di N come ossido nitrico (NO), protossido di azoto (N<sub>2</sub>O) e infine azoto molecolare,<sup>16</sup> mentre una grande porzione di nitrato viene infine rilasciata nelle falde acquifere sotterranee.<sup>15</sup>

Come conseguenza di questi processi, fino al 50% del fertilizzante azotato applicato al suolo non viene utilizzato dalle colture e viene perso nell'ambiente, sia come specie gassose che ulteriormente contribuiscono in modo significativo all'effetto serra<sup>17</sup> e alla formazione di particolato atmosferico,<sup>18</sup> o come lisciviazione di nitrato, fonte di eutrofizzazione.<sup>19-21</sup> Questa perdita rappresenta un costo economico e ambientale molto significativo. Lo sviluppo di tecnologie volte ad aumentare l'efficienza dell'uso di N attraverso la stabilizzazione dell'N ambientale è stato proposto e attuato con vari gradi di successo. In particolare, sono altamente richiesti metodi in grado di modulare il ciclo N mantenendo questo nutriente in una forma biodisponibile per le piante, limitando al contempo la mobilità ambientale.<sup>22-23</sup>

Lo sviluppo di fertilizzanti ad alta efficienza (Enhanced Efficiency Fertilizers, EEF), si rende quindi necessario<sup>21</sup>. Tuttavia, mentre esiste una vasta gamma dei prodotti EEF sul mercato, questi hanno applicazioni di nicchia rispetto ai prodotti tradizionali che servono un'agricoltura su larga scala. Un'alternativa agli EEF sono sostanze che agiscono come inibitori dei due enzimi principalmente responsabili della riduzione dell'efficienza di fertilizzazione del suolo N, vale a dire l'ureasi e l'AMO.

L'utilizzo di nuovi materiali ottenuti tramite ingegneria cristallina e metodi di sintesi altamente ecosostenibili è stato dimostrato rappresentare una nuova metodologia per lo sviluppo di materiali ibridi che contengano sia l'urea come fertilizzante azotato che componenti che possano inibire l'ureasi e l'AMO, in un progetto in collaborazione tra il gruppo di Ingegneria Cristallina del Dipartimento di Chimica e il gruppo di Chimica Bioinorganica del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna. In particolare, la sintesi e la caratterizzazione di materiali co-cristallini multifunzionali di urea che contengono inibitori dell'ureasi come catecolo<sup>24</sup> e Zn(II),<sup>25</sup> (quest'ultimo è anche un micronutriente essenziale) sono stati recentemente descritti, mentre più recentemente un nuovo materiale contenente Zn(II), urea e tiourea (quest'ultimo agente inibitore di AMO) è stato riportato costituire un materiale multi-funzionale capace di bloccare sia la idrolisi dell'urea che la nitrificazione dell'ammonio in test effettuati sia in vitro che utilizzando colonie multibatteriche.<sup>26</sup>

Il presente progetto ha lo scopo di sviluppare ulteriormente questa linea di ricerca, esplorando la possibilità di ottenere nuovi materiali policristallini con proprietà chimico-fisiche e bio-chimiche più favorevoli di quelli attualmente disponibili, sfruttando la collaborazione tra gli stessi gruppi di ricerca che hanno contribuito allo sviluppo dei primi materiali ibridi descritti sopra.

1. Evans, A., *The Feeding of the Nine Billion: Global Food Security*. Chatham House: London, 2009.
2. Godfray, H. C. J.; Beddington, J. R.; Crute, I. R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J. F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S. M.; Toulmin, C., Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* **2010**, *327* (5967), 812-818.
3. Roy, R. N.; Finck, A.; Blair, G. J.; Tandon, H. L. S., *Plant Nutrition for Food Security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 2006; p 348.
4. Galloway, J. N.; Dentener, F. J.; Capone, D. G.; Boyer, E. W.; Howarth, R. W.; Seitzinger, S. P.; Asner, G. P.; Cleveland, C. C.; Green, P. A.; Holland, E. A.; Karl, D. M.; Michaels, A. F.; Porter, J. H.; Townsend, A. R.; Vöösmary, C. J., Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* **2004**, *70* (2), 153-226.
5. Erisman, J. W.; Sutton, M. A.; Galloway, J.; Klimont, Z.; Winiwarter, W., How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* **2008**, *1*, 636.
6. Duce, R. A.; LaRoche, J.; Altieri, K.; Arrigo, K. R.; Baker, A. R.; Capone, D. G.; Cornell, S.; Dentener, F.; Galloway, J.; Ganeshram, R. S.; Geider, R. J.; Jickells, T.; Kuypers, M. M.; Langlois, R.; Liss, P. S.; Liu, S. M.; Middelburg, J. J.; Moore, C. M.; Nickovic, S.; Oshlies, A.; Pedersen, T.; Prospero, J.; Schlitzer, R.; Seitzinger, S.; Sorensen, L. L.; Uematsu, M.; Ulloa, O.; Voss, M.; Ward, B.; Zamora, L., Impacts of Atmospheric Anthropogenic Nitrogen on the Open Ocean. *Science* **2008**, *320* (5878), 893.
7. Canfield, D. E.; Glazer, A. N.; Falkowski, P. G., The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. *Science* **2010**, *330* (6001), 192.
8. Oikawa, P. Y.; Ge, C.; Wang, J.; Eberwein, J. R.; Liang, L. L.; Allsman, L. A.; Grantz, D. A.; Jenerette, G. D., Unusually high soil nitrogen oxide emissions influence air quality in a high-temperature agricultural region. *Nature Communications* **2015**, *6*, 8753.
9. Zhang, X.; Davidson, E. A.; Mauzerall, D. L.; Searchinger, T. D.; Dumas, P.; Shen, Y., Managing nitrogen for sustainable development. *Nature* **2015**, *528*, 51.
10. Prud'homme, M. *Global Fertilizer Supply and Trade*; Dubai, UAE, 2016.
11. Patil, B. S.; Wang, Q.; Hessel, V.; Lang, J., Plasma N<sub>2</sub>-fixation: 1900–2014. *Catalysis Today* **2015**, *256*, 49-66.
12. Baltrusaitis, J., Sustainable Ammonia Production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2017**, *5* (11), 9527-9527.
13. Maroney, M. J.; Ciurli, S., Nonredox nickel enzymes. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4206-28.
14. Mazzei, L.; Musiani, F.; Ciurli, S., Urease. In *The Biological Chemistry of Nickel*, Zamble, D.; Rowińska-Żyrek, M.; Kozłowski, H., Eds. Royal Society of Chemistry: 2017; pp 60-97.
15. Beeckman, F.; Motte, H.; Beeckman, T., Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Curr Opin Biotechnol* **2018**, *50*, 166-173.
16. Maia, L. B.; Moura, J. J., How biology handles nitrite. *Chem Rev* **2014**, *114* (10), 5273-357.
17. Coskun, D.; Britto, D. T.; Shi, W.; Kronzucker, H. J., Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature Plants* **2017**, *3*, 17074.
18. Paulot, F.; Jacob, D. J., Hidden cost of U.S. agricultural exports: particulate matter from ammonia emissions. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (2), 903-908.
19. Tilman, D.; Fargione, J.; Wolff, B.; Antonio, C.; Dobson, A.; Howarth, R.; Schindler, D.; Schlesinger, W. H.; Simberloff, D.; Swackhamer, D., Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science* **2001**, *292* (5515), 281.
20. Galloway, J. N.; Cowling, E. B., Reactive Nitrogen and The World: 200 Years of Change. *AMBIO* **2002**, *31* (2), 64-71.
21. Chen, D.; Suter, H.; Islam, A.; Edis, R.; Freney, J. R.; Walker, C. N., Prospects of improving efficiency of fertiliser nitrogen in Australian agriculture: a review of enhanced efficiency fertilisers. *Aust. J. Soil Res.* **2008**, *46* (4), 289-301.
22. Galloway, J. N.; Aber, J. D.; Erisman, J. W.; Seitzinger, S. P.; Howarth, R. W.; Cowling, E. B.; Cosby, B. J., The Nitrogen Cascade. *Bioscience* **2003**, *53* (4), 341-356.
23. Lassaletta, L.; Billen, G.; Grizzetti, B.; Anglade, J.; Garnier, J., 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters* **2014**, *9* (10), 105011.
24. Casali, L.; Mazzei, L.; Shemchuk, O.; Sharma, L.; Honer, K.; Grepioni, F.; Ciurli, S.; Braga, D.; Baltrusaitis, J., Novel Dual-Action Plant Fertilizer and Urease Inhibitor: Urea-Catechol Cocrystal. Characterization and Environmental Reactivity. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2019**, *7* (2), 2852-2859.
25. Casali, L.; Mazzei, L.; Shemchuk, O.; Honer, K.; Grepioni, F.; Ciurli, S.; Braga, D.; Baltrusaitis, J., Smart urea ionic co-crystals with enhanced urease inhibition activity for improved nitrogen cycle management. *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54* (55), 7637-7640.
26. Mazzei, L.; Broll, V.; Casali, L.; Silva, M.; Braga, D.; Grepioni, F.; Baltrusaitis, J.; Ciurli, S., Multifunctional Urea Cocrystal with Combined Ureolysis and Nitrification Inhibiting Capabilities for Enhanced Nitrogen Management. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2019**, *7* (15), 13369-13378.

**Piano di attività:**

Si può prevedere che gli esperimenti inizieranno dopo un periodo di start-up di tre-quattro settimane (spesi per la focalizzazione del progetto, la ricerca in letteratura, la scelta delle sostanze chimiche e la definizione delle priorità degli esperimenti).

Il progetto può essere approssimativamente diviso in "sottosezioni", che sono elencate di seguito:

i) Preparazione da soluzione e per via meccanochimica ("green chemistry") e caratterizzazione di co-cristalli molecolari e ionici, e più in generale di materiali multicomponenti e multifunzione contenenti metalli e molecole organiche di interesse agrochimico: nutrienti, inibitori di ureasi, inibitori di AMO.

ii) Effetto della formazione di co-cristalli sulla stabilità termica, igroscopicità e solubilità dell'urea o dell'inibitore.

iii) Test effettuati sia in vitro, sia utilizzando colonie multibatteriche, per valutare la capacità e l'efficienza di inibizione dei sistemi ottenuti.