

Polimeri naturali nanostructurați (Nanostructured natural polymers)

Doctorand

Timea KACSO

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Radu OPREAN



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

INTRODUCERE	4
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
CONTRIBUȚII PERSONALE	5
1. Obiective	5
2. Studiul nr.1 - Degradarea hidrolitică a nanoparticulelor de zeină Hydrolytic degradation of zein nanoparticles	6
<i>2.1. Obiective</i>	6
<i>2.3. Materiale și metode</i>	6
<i>2.4. Rezultate și discuții</i>	6
<i>2.5. Concluzii</i>	7
3. Studiul nr. 2 – Degradarea enzimatică a nanoparticulelor de zeină Enzymatic degradation of zein nanoparticles	7
<i>3.1. Obiective</i>	7
<i>3.2. Introducere</i>	8
<i>3.3. Materiale și metode</i>	8
<i>3.4. Rezultate și discuții</i>	8
<i>3.5. Concluzii</i>	9
4. Studiul nr. 3 - Nanoparticule pe bază de zeine și lignină ca tratament pentru semințe de soia: translocare și impact asupra sănătății semințelor și plantelor Zein and lignin-based nanoparticles as soybean seed treatment: translocation and impact on seed and plant health	9
<i>4.1. Obiective</i>	9
<i>4.2. Introducere</i>	9
<i>4.3. Materiale și metode</i>	10

4.4. <i>Rezultate și discuții</i>	10
4.5. <i>Concluzii</i>	11
5. Concluzii generale și observații	11
REFERINȚE SELECTATE	12

CUVINTE CHEIE: polimeri naturali, nanoparticule, transport țintit, cinetica degradării, impact asupra mediului

INTRODUCERE

Posibilitatea de fabricare a nanoparticulelor (NP) cu proprietăți și caracteristici bine definite permite utilizarea mai eficientă al medicamentelor și o terapie țintită a anumitor boli^{1,2}, îmbogățirea nutrițională a alimentelor prin încorporarea de vitamine³ și nutrienți⁴, eliminarea poluanților din sol și apa reziduală^{5,6}, și o utilizare rațională a pesticidelor⁷.

Creșterea populației este urmată de o creștere a necesității de alimente, intensificarea activităților agricole și exploatarea terenurilor arabile^{7,8}. Agricultură se confruntă cu numeroase provocări în satisfacerea cererii globale în creștere pentru alimente, fibre și combustibil. Pentru a depăși acestea și pentru a satisface cerințele, agricultura tradițională a fost neglijată, cu utilizarea tot mai mare a pesticidelor și îngrășămintelor chimice. Utilizarea excesivă și irațională duce la acumularea de compuși toxici în sol și în apele subterane, punând în pericol sănătatea publică⁹. În condițiile date este urgent necesară reducerea cantității de pesticide utilizate și elaborarea unui plan rațional și eficient de aplicare a pesticidelor. Nanotehnologia permite livrarea țintită și eficientă a compușilor chimici prin încorporarea lor în NP inerte și biodegradabile.

Zeina este un polimer natural, iar studiarea căilor sale de degradare oferă informații care pot duce la dezvoltarea de nanoparticule de zeină îmbunătățite, cu viteze de degradare adaptate și performanțe îmbunătățite pentru aplicații specifice, cum ar fi livrarea țintită a medicamentelor, ingineria țesuturilor sau utilizările agricole, permițând dezvoltarea de nanomateriale durabile și ecologice.

Scopul principal al acestei lucrări a fost înțelegerea procesului de degradare a zeinei și a nanoparticulelor de zeină (ZNP), pentru a asigura siguranța acestora atât pentru aplicații biomedicale, cât și agricole, evaluând în același timp impactul nanoparticulelor de zeină asupra mediului înconjurător. Acest lucru a fost realizat prin studierea degradării zeinei și a diferitelor formulări de ZNP în condiții hidrolitice și enzimatică, respectiv prin evaluarea sănătății plantelor atunci când ZNP-urile sunt folosite ca sisteme de livrare pentru aplicații de pesticide.

Pe lângă zeină, a fost evaluat efectul asupra sănătății plantelor și a unui alt polimer natural derivatizat, lignina-PLGA (acid poli(lactic-co-glicolic)). Acest compus este, de asemenea, foarte potrivit pentru sinteza de nanoparticule¹⁰ datorită proprietăților combinate a constituenților: biocompatibilitate, biodegradabilitate și rezistență mecanică îmbunătățită. Diversificarea nanoparticulelor de lignină-PLGA în reglarea proprietăților lor fizice și chimice prin modificări simple le face extrem de versatile pentru diverse aplicații biomedicale, inclusiv livrarea țintită a medicamentelor, imagistica și medicina regenerativă^{11,12}.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Polimerii naturali, obținuți din resurse regenerabile, au devenit reprezentanți importanți în domeniul nanotehnologiei datorită biocompatibilității lor inerente, biodegradabilității și toxicității minime¹³. Acești polimeri pot fi proiectați la scară nanometrică cu proprietăți fizice, chimice și biologice unice^{1,14}. Integrarea polimerilor naturali în nanostructuri a deschis noi posibilități în diverse domenii, cum ar fi medicina¹⁵, știința mediului^{5,9} și ingineria materialelor¹⁶.

Zeina, o proteină naturală din porumb, este un material ideal pentru sinteza nanoparticulelor datorită biocompatibilității, biodegradabilității și naturii inerte^{17,18}. Aceste proprietăți face zeina deosebit de atractivă pentru aplicații biomedicale¹⁹, inclusiv transportul substanțelor active²⁰ și ingineria țesuturilor^{18,21}. Caracterul amfifil permite autoasamblarea în nanoparticule în medii apoase, facilitând încapsularea și eliberarea controlată de substanțe medicamentoase hidrofobe¹⁷, fitochimice^{22,23} și pesticide^{24,25}. Adicional, capacitatea zeinei de a forma suspensii coloidale stabile îi sporește funcționalitatea în diferite formulări²³. Stocul regenerabil și abundent de porumb asigură, de asemenea, că zeina este o alegere durabilă și rentabilă pentru producția de nanoparticule, în concordanță cu accentul tot mai mare pus pe materialele ecologice în nanotehnologie²⁶.

Lignina, un polimer natural care se găsește în principal în pereții celulari ai plantelor, poate fi obținută la ieftin ca produs rezidual din industria celulozei și hârtiei²⁷. Legarea covalentă a ligninei cu PLGA creează un polimer hibrid care beneficiază de proprietățile sinergice ale ambelor componente. Combinând proprietățile naturale și regenerabile ale ligninei cu biocompatibilitatea și biodegradabilitatea bine stabilite a PLGA, cercetătorii pot crea materiale care nu sunt doar eficiente în aplicații biomedicale, ci și ecologice²⁸.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiective

Obiectivul cercetării actuale a fost acela de a evalua polimerii naturali nanostructurați și interacțiunea acestora cu mediul și organismele vii. Una dintre cele mai apreciate caracteristici ale polimerilor naturali este biodegradabilitatea lor, permițând aplicații ecologice. Ca atare, evaluarea degradării lor poate duce la informații importante despre persistența lor în mediu, eliberarea de ingrediente active și o posibilitate de a ajusta sistemele de livrare nanostructurate pe care le formează.

2. Studiul nr.1 - Degradarea hidrolitică a nanoparticulelor de zeină

2.1. Obiective

Obiectivele principale ale acestui studiu au fost evaluarea influenței agenților tensioactivi utilizați (cationici, anionici, neutri) asupra degradării hidrolitice a nanoparticulelor de zeină în condiții relevante pentru mediu (diferite pH-uri și temperaturi), precum și identificarea potențialelor corelații între proprietățile chimice ale ZNP-urilor cu diferite chimii de suprafață și persistența lor teoretică estimată a mediului.

2.2. Introducere

Un material nou și promițător pentru sinteza nanoparticulelor este zeina, principala proteină din endospermul de porumb²⁹. Zeina a fost exploatată cu succes pentru încorporarea și livrarea diversilor compuși hidrofobi, substanțe medicamentoase^{18,30}, vitamine³¹ și suplimente alimentare³².

În agricultură, nanoparticulele de zeină (ZNP) sunt considerate un vehicul de livrare adecvat pentru pesticide, permițând livrarea lor direcționată și susținută către culturi^{8,30,33}. Prin proiectarea ZNP-urilor cu diferite proprietăți de suprafață, acestea pot adera la sistemul radicular și la frunzele plantelor pe care au fost aplicate^{33,34}, măbind timpul de persistență localizat al pesticidelor încărcate. Astfel de practici avansate de gestionare a dăunătorilor ar limita risipa de substanțe agrochimice care apar în difuzarea lor convențională și ar îmbunătăți eficacitatea tratamentului, reducând în același timp impactul poluării cu pesticide asupra solului și apei cauzată de scurgere³⁵.

2.3. Materiale și metode

Zeina, o proteină naturală, a fost selectată ca și compus model pentru sinteza nanoparticulelor. Au fost dezvoltate mai multe formulări cu surfactanți ionici și neionici ca stabilizatori, a fost efectuată caracterizarea dimensiunii și a încărcăturii în medii apoase cu diferite condiții de pH. S-a observat degradarea hidrolitică a NP-urilor și a fost efectuat un studiu de degradare accelerată pentru a determina cinetica de degradare. Pe baza rezultatelor obținute a fost aproximată persistența ZNP-lor în medii apoase.

2.4. Rezultate și discuții

NP-urile reconstituite în apă distilată (pH = 7) au prezentat un diametru hidrodinamic și un indice de polidispersitate mai mari decât cele suspendate în soluții tampon. Toate ZNP liofilizate reconstituite au prezentat o distribuție polidispersă moderată până la largă, cea mai slabă dispersie fiind înregistrată în apă distilată (PdI = 0,7 - 0,9). S-au observat modificări semnificative în sarcina de suprafață a particulelor polimerice prin modificarea pH-ului mediului de dispersie.

În timpul degradării hidrolitice accelerate la temperaturi ridicate, subunitățile zeinei se descompun, formând peptide cu masă moleculară mai mică (10,86 kDa - 12

kDa). La temperaturi mai scăzute (<50-60°C), în perioada studiată (14 zile) s-a produs doar o descompunere parțială a zeinei, demonstrată printr-o scădere treptată a concentrației fracțiilor principale, în special în medii alcaline. În timp, picurile principale corespunzătoare subunităților de zeină părinte nu numai că scad în înălțime, ci se și lărgesc ca urmare a produselor de degradare cu greutate moleculare similare.

Dependența de timp a concentrației relative înregistrate de zeină a urmat cinetica de ordinul întâi. Constantele empirice de cinetică ale vitezei de degradare au fost corelate cu valorile de temperatură și pH studiate. Rezultatele au indicat că ZNP-le în general au fost mai stabile în medii acide, prezentând o uzură mai accentuată la pH 9. În mod surprinzător, ZNP-le sintetizate cu unul dintre agenții tensioactivi neionici prezintă o tendință opusă, indicând că degradarea hidrolitică a ZNP-lor ar putea fi, de asemenea, controlată, după natura surfactantului utilizat. Cu toate acestea, ZNP-le cu sarcină de suprafață, dispersie și dimensiune aparent similare, obținute cu diverși agenți tensioactivi neionici au demonstrat timpi de persistență estimați semnificativ diferiți, indiferent de valoarea pH-ului.

2.5. Concluzii

Degradarea controlată a ZNP-urilor liofilizate sintetizate în prezența diferiților agenți tensioactivi cationici și neionici a arătat că, în general, mediile alcaline promovează o degradare chimică mai rapidă, totuși natura surfactantului utilizat poate inversa tendința observată. Determinarea modului în care chimia de suprafață a ZNP-lor influențează profilul lor de degradare hidrolitică permite reglarea fină a acestor sisteme de nanolivrare, oferind o utilizare mai sigură și mai durabilă în agricultură. În condiții reale de mediu, în care expunerea la soare, microbiota, umiditatea etc. contribuie și mai mult la degradarea NP-lor pe bază de proteine, degradarea lor va avea loc într-un timp mai scurt, asigurând utilizarea sigură, responsabilă și durabilă a acestei tehnologii.

3. Studiul nr. 2 – Degradarea enzimatică a nanoparticulelor de zeină

3.1. Obiective

Obiectivul principal al acestui studiu este de a evalua digestia enzimatică a zeinei sub formă de NP în cazul ingestiei orale. Digestia ZNP-lor a fost studiată prin incubare în lichide gastrice și intestinale reconstituite. Pe lângă digestia enzimatică convențională în fază omogenă, ZNP-le au fost digerate și cu enzime imobilizate pe dispozitive microfluidice.

3.2. Introducere

Sistemele de livrare de dimensiuni nanometrice, cum ar fi nanoparticulele, sunt utilizate pentru livrarea țintită a substanțelor medicamentoase³⁶, vitaminelor³, antioxidanților³⁷ sau pesticidelor²⁴.

Sub formă de nanoparticule, zeina este un sistem de livrare adecvat pentru încorporarea de compuși farmaceutici, vitamine și suplimente alimentare³⁸. ZNP-le, ca sisteme de administrare orală, întâmpină condiții dure în interiorul tractului gastro-intestinal, care le modifică nu numai structura fizică, ci și proprietățile chimice, deoarece fiind proteină, zeina este expusă degradării enzimatică³⁹. Majoritatea studiilor privind ZNP pentru livrarea țintită se concentrează pe substanța încorporată și rareori pe modificările cantitative pe care ZNP-le le suferă în urma digestiei³⁹.

3.3. Materiale și metode

Studiile de digestie cu tripsină au fost efectuate în soluție, în 3 medii diferite de digestie și cu tripsină imobilizată pe un dispozitiv microfluidic (digestie pe cip).

ZNP au fost incubate la 37°C în lichid gastric simulat (pepsină) și lichid intestinal (pancreatină) și probele au fost colectate la 0, 2, 5, 10, 20, 30 și 60 de minute după incubare.

Scăderea concentrației compusului părinte a fost monitorizată prin electroforeză capilară pe gel (CGE) cu detecție UV.

3.4. Rezultate și discuții

O scădere a celor două fracții proteice principale ale zeinei (24,1 kDa și 28,4 kDa) a fost urmărită și determinată cantitativ, ca principală schimbare vizibilă care a avut loc în urma procesului de digestie. În timpul digestiei enzimatică se observă o lărgire și o scădere a înălțimii acestor două picuri datorită formării de lanțuri polipeptidice puțin mai scurte cu greutatea molară într-un interval destul de apropiat. Simultan, proteoliza duce la apariția unui pic larg corespunzător unui amestec de polipeptide mai scurte cu o masă molară medie de ~10 kDa.

Zeina pulbere și ZNP-le sunt susceptibile la activitatea enzimatică în soluții organice și apoase, cu cea mai mare rată de digestie observată pentru un amestec de 80% ACN / 20% 25mM (NH₄)HCO₃, datorită solubilității optime a zeinei și accesibilității față de activitatea enzimei. Digestia enzimatică a ZNP-lor pe dispozitive microfluidice a fost similară cu cele obținute în fază omogenă.

O digestie peptică aproape totală a compusului de bază (α -zeină) are loc după 60 de minute de incubare a ZNP-lor în lichidul gastric reconstituit. ZNP-le incubate în lichidul intestinal reconstituit după digestia gastrică au fost digerate total la începutul fazei intestinale, în timp ce particulele incubate exclusiv în lichidul intestinal au arătat o digestie lentă, parțială a zeinei.

3.5. Concluzii

Mediul în care are loc digestia influențează foarte mult disponibilitatea zeinei față de activitatea enzimatică, cu randamente mai mari observate pentru mediile în care zeina este solubilă. Structura zeinei în spațiu este un alt factor important, agregatele tind să fie mai rezistente la digestie decât zeina bine dispersată, nanostructurată. ZNP-le au fost aproape total digerate după o oră de incubație gastrică, în timp ce digestia zeinei în pulbere a fost mai lentă. Digestia enzimatică a ZNP-lor influențate de caracteristicile lor permite o uzură programabilă a acestor nanostructuri de administrare orală, pe baza profilului de eliberare dorit al compușilor încorporați. Dispozitivele microfluidice s-au dovedit a fi o metodă alternativă promițătoare de digestie la tehnicile în soluție, cu timpi de digestie mai scurți și viteză de digestie crescută.

4. Studiul nr. 3 - Nanoparticule pe bază de zeină și lignină ca tratament pentru semințe de soia: translocare și impact asupra sănătății semințelor și plantelor

4.1. Obiective

Pentru a înțelege mai bine impactul asupra mediului și rolul nanoparticulelor polimerice (PNP) în protecția semințelor și dezvoltarea plantelor de soia, acest studiu s-a concentrat pe urmărirea PNP-lor în semințe după tratament și în timpul germinării, determinând în același timp efectul lor asupra indicatorilor de creștere a plantelor, efectul asupra dăunătorilor care nu sunt vizați (în acest caz, insecte) și activitatea antifungică.

4.2. Introducere

Nanoparticulele polimerice (PNP) sunt propuse ca sisteme de livrare adecvate într-o multitudine de aplicații agricole, cum ar fi pentru livrarea de erbicide⁴⁰, insecticide^{41,42}, fungicide^{43,44} și regulatori de creștere a plantelor⁴⁵.

Studiile axate pe nanoparticule (NP) ca sisteme de livrare pentru tratarea semințelor au raportat în mod specific activitatea biochimică a substanței încorporate⁴⁴, activitatea biologică a formulării (de exemplu, activitate antifungică, pesticidă) relevantă pentru scopul propus^{43,45,46} sau efectul pesticidelor asupra mediului⁴⁷⁻⁵⁰. Între timp, efectele NP-lor neîncărcate asupra calității semințelor, germinării și creșterii plantelor sunt în general necunoscute, precum și celelalte aspecte ecotoxicologice, cum ar fi efectul agrochimicelor asupra speciilor nevizate, care au câștigat, de asemenea, puțină atenție⁵¹. Din cunoștințele noastre, nu au fost publicate studii privind translocarea și impactul nanoparticulelor de zeină (ZNP) și nanoparticulelor de lignină

grefat cu acid poli(lactic-co-glicolic) (PLGA) (LNP) asupra dezvoltării plantelor atunci când sunt utilizate ca tratament pentru semințe.

4.3. Materiale și metode

Nanoparticulele de zeină au fost sintetizate cu un surfactant cationic, bromură de didodecildimetilamoniu (DMAB) ($122,9 \pm 0,8$ nm, $+59,7 \pm 4,4$ mV) și un agent tensioactiv neionic, Tween 80 ($118,7 \pm 1,7$ nm, $+26$ mV, $+26,1$ mV). Nanoparticulele de lignină -acid poli(lactic-co-glicolic) (LNP) au fost produse fără agenți tensioactivi ($52,9 \pm 0,2$ nm, $-54,9 \pm 0,5$ mV).

Soia a fost aleasă ca plantă model datorită importanței sale în agricultură și economie⁵². Pentru a evalua potențialele efecte asupra organismelor care nu sunt vizate, a fost ales *Chrysodeixis includens*, un important defoliator al boabelor de soia. Eficacitatea antifungică împotriva *Rhizoctonia solani* a azoxistrobinei nanolivate cu PNP ca tratament pentru semințe a fost de asemenea investigată. *R. solani* a fost ales pentru acest experiment datorită naturii sale agresive, capabilă să provoace degradarea semințelor, putrezirea pre și post-emergentă, precum și putregaiul hipocotilului și al rădăcinii.

4.4. Rezultate și discuții

Toate semințele de soia au prezentat semne de germinare după primele 24 de ore, caracterizate printr-o creștere a dimensiunii și indicii de dezvoltare a radiclelor. Nu au existat diferențe observabile în germinarea semințelor între diferitele tratamente în studiul de față, indiferent de natura particulelor utilizate, dimensiunea, încărcătura sau concentrația aplicată.

Tratamentul semințelor cu ZNP și LNP a avut un efect redus asupra viabilității semințelor și creșterii plantelor de soia tratate cu concentrații mari de PNP. Au fost observate unele diferențe marginale în parametrii de creștere a plantelor între plantele martor și plantele tratate, dar viabilitatea plantelor nu a fost afectată semnificativ în general. Deși s-au înregistrat diferențe semnificative statistic la unele concentrații de NP, nu a putut fi detectată nicio corelație sau dependență specifică de doză.

Vizualizarea sub microscop a semințelor negerminate a arătat că ZNP-le au aderat la suprafața interioară și exterioară a învelișului semințelor. Deși, în timpul germinării, semințele de soia suferă transformări morfologice și chimice, nu a avut loc translocarea PNP-le din învelișul seminței în interiorul cotiledoanelor, deoarece au rămas lipite de învelișul seminței.

LNP-le încărcate cu azoxistrobin au oferit o protecție eficientă (aproape de 100%) în comparație cu toate formulările studiate la $0,5$ mg/mL. Formularea comercială a oferit o protecție similară statistic, plantele prezentând doar 20% leziuni de suprafață. ZNP-D-urile încărcate cu azoxistrobin au arătat o protecție similară cu formularea comercială și LNP-le încărcate cu azoxistrobin. ZNP-T-urile încărcate au fost ineficiente împotriva *R. solani*, deși au oferit o protecție puțin mai bună decât azoxistrobinul dizolvat în apă, unde plantele prezentau leziuni de 50% față de 80%.

Rezultatele obținute sugerează că tratarea semințelor cu nanoparticule nu afectează mortalitatea larvelor de lepidoptere în urma consumului de țesut de frunze al semințelor tratate.

4.5. Concluzii

Nanoparticulele polimerice au fost sintetizate pe baza de polimeri biodegradabili, zeină și lignină, ușor de obținut din resurse naturale. Acest studiu indică faptul că tratarea cu ZNP și LNP a semințelor au avut un efect redus sau deloc asupra viabilității semințelor și creșterii plantelor de soia tratată cu concentrații mari de PNP. Imagistica microscopică a arătat că PNP-le au aderat numai la suprafața exterioară și interioară a învelișului semințelor, fără a pătrunde în cotiledoane. Astfel, tratamentul cu ZNP și LNP al semințelor s-a dovedit a nu interfera cu procesul de germinare și poate fi potrivit pentru sistemele de transport a compușilor activi în procesul de tratare a semințelor. LNP-le încărcate cu azoxistrobin (grad tehnic) au oferit o protecție antifungică aproape completă (~100%) plantelor de soia împotriva *R. solani* atunci când sunt utilizate ca tratament pentru semințe, în timp ce ZNP-D au afișat o eficacitate similară cu formula comercială (~80% protecție). Deși ZNP-T încărcate cu azoxistrobin nu au oferit o protecție eficientă, au îmbunătățit efectul antifungic al azoxistrobinei libere. NP-urile pe bază de polimeri de zeină și lignină deschid calea către o alternativă sigură și naturală pentru a îmbunătăți utilizarea pesticidelor în tratarea semințelor, fără a interfera cu fiziologia plantelor.

5. Concluzii generale și observații

Obiectivul cercetării a fost acela de a evalua interacțiunea polimerilor naturali nanostructurați cu mediul și organismele vii. În acest scop, zeina, un polimer natural, a fost aleasă ca și compus model pentru sinteza nanoparticulelor, iar comportamentul său sub formă nanostructurată față de factori externi a fost evaluat prin degradare hidrolitică și enzimatică. În plus, evaluarea *in vivo* a efectului polimerilor naturali nanostructurați asupra sănătății plantelor și mortalității insectelor a fost efectuată cu succes pentru ZNP și LNP.

6. Originalitatea tezei

Originalitatea acestei lucrări constă în evaluarea extensivă a polimerilor naturali nanostructurați și a interacțiunii acestora cu mediul prin studierea comportamentului modelului de polimer selectat, zeina, în medii cu o complexitate crescândă, de la medii apoase simple, prin condiții enzimactice simulate până la studii *in vivo* a interacțiunii lor cu mediul organic.

Degradarea ZNP-lor în medii apoase a fost caracterizată în condiții acide și bazice și într-o gamă largă de temperaturi. De asemenea, a fost determinată influența

surfactantului utilizat pentru sinteza ZNP (ionică sau neionică) asupra profilului de degradare al NP-ilor. Pe baza rezultatelor studiilor hidrolitice, a fost determinată cinetica de degradare a tuturor ZNP-urilor studiate și a fost derivat un model matematic complex pentru aproximarea timpului de persistență a ZNP-ilor în medii apoase. Din cunoștințele noastre, în literatură nu au fost raportate studii similare de degradare accelerată și modele matematice pentru ZNP.

Cele mai multe studii privind ZNP-urile ca sisteme de administrare orală se concentrează pe caracterizarea compusului încorporat, în timp ce nanostructurile sunt evaluate doar prin caracteristicile lor fizice, iar digestia zeinei este examinată calitativ. Această lucrare se concentrează asupra sistemului de livrare și reduce lipsa de cunoștințe, oferind o determinare cantitativă a degradării enzimatică a zeinei în timp.

Adițional, a fost dezvoltată o nouă abordare pentru digestia enzimatică a zeinei, printr-un reactor enzimatic imobilizat pe suprafața unui cip microfluidic.

Studiul final al acestei lucrări a investigat polimerii naturali nanostructurați într-un mediu complex, cu NP ca sisteme de livrare pentru tratarea semințelor. NP-urile sintetizate fără surfactant dintr-un biopolimer nou, lignina-PLGA, împreună cu cele fabricate din zeină cu un surfactant ionic (DMAB) și neionic (Polysorbate 80) au fost aplicate pe semințele de soia pentru a evalua efectul acestora asupra sănătății plantelor. Din cunoștințele noastre, nu au fost publicate alte studii care să utilizeze aceste nanostructuri polimerice ca tratament pentru semințe. Activitatea antifungică a NP-ilor încărcate cu azoxistrobin a fost comparată cu o formulare comercială, arătând că încorporarea ingredientului activ în LNP îi îmbunătățește activitatea antifungică. Mai mult, acesta este primul experiment care documentează efectul semințelor tratate cu ZNP și LNP asupra unei insecte dăunătoare care nu este vizat.

În ansamblu, cercetarea multilaterală efectuată în cadrul acestei teze aduce progrese semnificative în domeniul nanotehnologiei, contribuind la dezvoltarea nanoparticulelor biodegradabile, reprezentând astfel un progres semnificativ atât în domeniul sănătății, cât și al conservării mediului.

REFERINȚE SELECTATE

1. Wang Y, Qian M, Xie Y, Zhang X, Qin Y, Huang R. Biodegradable nanoparticles-mediated targeted drug delivery achieves trans-spatial immunotherapy. *Fundam. Res.* 2022;
2. Chen S, Greasley SL, Ong ZY, Naruphontjirakul P, Page SJ, Hanna J V., et al. Biodegradable zinc-containing mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy. *Mater. Today Adv.* 2020;6:100066.
3. Bedhiafi T, Idoudi S, Fernandes Q, Al-Zaidan L, Uddin S, Dermime S, et al. Nano-vitamin C: A promising candidate for therapeutic applications. *Biomed. Pharmacother.* 2023;158:114093.

4. Sabliov C, Chen H, Yada R, editors. *Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients*. 1st ed. 2015. p. 272–88.
5. El-Sayed MMH, Elsayed RE, Attia A, Farghal HH, Azzam RA, Madkour TM. Novel nanoporous membranes of bio-based cellulose acetate, poly(lactic acid) and biodegradable polyurethane in-situ impregnated with catalytic cobalt nanoparticles for the removal of Methylene Blue and Congo Red dyes from wastewater. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2021;2:100123.
6. Rathod S, Preetam S, Pandey C, Bera SP. Exploring synthesis and applications of green nanoparticles and the role of nanotechnology in wastewater treatment. *Biotechnol. Reports.* 2024;41:e00830.
7. Nam NN, Trai NN, Thuy NP, Nam PQ, Linh LT, Khoa Do HD. Current and Emerging Nanotechnology For Sustainable Development of Agriculture: Implementation Design Strategy and Application. *Heliyon.* 2024;10:e31503.
8. de Oliveira JL, Campos EVR, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnol. Adv.* 2014;32:1550–61.
9. Paul SK, Mazumder S, Naidu R. Herbicidal weed management practices: History and future prospects of nanotechnology in an eco-friendly crop production system. *Heliyon.* 2024;10:e26527.
10. Astete CE, De Mel JU, Gupta S, Noh Y, Bleuel M, Schneider GJ, et al. Lignin-Graft-Poly(lactic- co -glycolic) Acid Biopolymers for Polymeric Nanoparticle Synthesis. *ACS Omega.* 2020;5:9892–902.
11. Pylypchuk I V., Karlsson M, Lindén PA, Lindström ME, Elder T, Sevastyanova O, et al. Molecular understanding of the morphology and properties of lignin nanoparticles: unravelling the potential for tailored applications. *Green Chem.* 2023;4415–28.
12. Morsali M, Moreno A, Loukovitou A, Pylypchuk I, Sipponen MH. Stabilized Lignin Nanoparticles for Versatile Hybrid and Functional Nanomaterials. *Biomacromolecules.* 2022;23:4597–606.
13. Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Glob. Heal. J.* 2023;7:70–7.
14. Hock N, To D, Armengol ES, Summonte S, Seybold A, Federer C, et al. Design of biodegradable nanoparticles for enzyme-controlled long-acting drug release. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2023;89:105085.
15. Khan NH, Mir M, Qian L, Baloch M, Ali Khan MF, Rehman A ur, et al. Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. *J. Adv. Res.* 2022;36:223–47.
16. Marchianò V, Matos M, Marcet I, Carmen Blanco-López M, Gutiérrez G, Cioffi N, et al. Preparation and characterization of biodegradable gelatine and starch films embedding cerium oxide nanoparticles stabilized by PLGA micelles for antibiofilm applications. *J. Mol. Liq.* 2024;398:0–8.

17. Giteru SG, Ali MA, Oey I. Recent progress in understanding fundamental interactions and applications of zein. *Food Hydrocoll.* 2021;120:106948.
18. Paliwal R, Palakurthi S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Release.* 2014;189C:108–22.
19. Bodoki E, Vostinaru O, Samoila O, Dinte E, Bodoki AE, Swetledge S, et al. Topical nanodelivery system of lutein for the prevention of selenite-induced cataract. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2018;#pagerange#.
20. Li Y, Su H, Wang W, Yin Z, Li J, Yuan E, et al. Fabrication of taxifolin loaded zein-caseinate nanoparticles and its bioavailability in rat. *Food Sci. Hum. Wellness.* 2023;12:2306–13.
21. Zhou P, Xia Y, Cheng X, Wang P, Xie Y, Xu S. Enhanced bone tissue regeneration by antibacterial and osteoinductive silica-HACC-zein composite scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials.* 2014;35:10033–45.
22. Takma DK, Bozkurt S, Koç M, Korel F, Nadeem HŞ. Characterization and encapsulation efficiency of zein nanoparticles loaded with chestnut fruit shell, cedar and sweetgum bark extracts. *Food Hydrocoll. Heal.* 2023;4.
23. Mariano A, Li YO, Singh H, McClements DJ, Davidov-Pardo G. Encapsulation of orange-derived hesperetin in zein/pectin nanoparticles: Fabrication, characterization, stability, and bioaccessibility. *Food Hydrocoll.* 2024;153:110024.
24. Kacsó T, Hanna EA, Salinas F, Astete CE, Bodoki E, Oprean R, et al. Zein and lignin-based nanoparticles as soybean seed treatment: translocation and impact on seed and plant health. *Appl. Nanosci.* 2022;12:1557–69.
25. Salinas F, Astete CE, Waldvogel JH, Navarro S, White JC, Elmer W, et al. Effects of engineered lignin-graft-PLGA and zein-based nanoparticles on soybean health. *NanoImpact.* 2021;23:100329.
26. Kacsó T, Neaga IO, Erincz A, Astete CE, Sabliov CM, Oprean R, et al. Perspectives in the design of zein-based polymeric delivery systems with programmed wear down for sustainable agricultural applications. *Polym. Degrad. Stab.* 2018;155:130–5.
27. Nilsson TY, Wagner M, Inganäs O. Lignin Modification for Biopolymer/Conjugated Polymer Hybrids as Renewable Energy Storage Materials. *ChemSusChem.* 2015;8:4081–5.
28. S. S, Shabbirahmed AM, Haldar D, Patel AK, Singhania RR. Influence of reaction conditions on synthesis and applications of lignin nanoparticles derived from agricultural wastes. *Environ. Technol. Innov.* 2023;31:103163.
29. Patel AR, Velikov KP. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2014;19:450–8.
30. Perlatti B, Souza Bergo PL de, Fernandes da Silva MF das G, Batista J, Rossi M. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for

- Agrochemicals. Insectic. - Dev. Safer More Eff. Technol. 2013.
31. Peñalva R, Esparza I, González-Navarro CJ, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2015;30:450–7.
 32. Soltani S, Madadlou A. Gelation characteristics of the sugar beet pectin solution charged with fish oil-loaded zein nanoparticles. *Food Hydrocoll.* 2015;43:664–9.
 33. Prasad A, Astete CE, Bodoki AE, Windham M, Bodoki E, Sabliov CM. Zein Nanoparticles Uptake and Translocation in Hydroponically Grown Sugar Cane Plants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;
 34. Ristroph KD, Astete CE, Bodoki E, Sabliov CM. Zein Nanoparticles Uptake by Hydroponically Grown Soybean Plants. *Environ. Sci. Technol.* 2017;51:14065–71.
 35. Sekhon B. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2014;7:31.
 36. Sadeghi S, Lee WK, Kong SN, Shetty A, Drum CL. Oral administration of protein nanoparticles: An emerging route to disease treatment. *Pharmacol. Res.* 2020;158:104685.
 37. Hashemi N, Krøyer Rasmussen M, Tsochatzis ED, Corredig M. In vitro digestion and intestinal absorption of curcumin-loaded zein nanoparticles. *J. Funct. Foods.* 2023;110.
 38. Tran PHL, Duan W, Lee BJ, Tran TTD. Drug stabilization in the gastrointestinal tract and potential applications in the colonic delivery of oral zein-based formulations. *Int. J. Pharm.* 2019;569:118614.
 39. Cheng CJ, Ferruzzi M, Jones OG. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. *Food Hydrocoll.* 2019;87:229–36.
 40. Tong Y, Wu Y, Zhao C, Xu Y, Lu J, Xiang S, et al. Polymeric Nanoparticles as a Metolachlor Carrier: Water-Based Formulation for Hydrophobic Pesticides and Absorption by Plants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65:7371–8.
 41. Gabriel Paulraj M, Ignacimuthu S, Gandhi MR, Shajahan A, Ganesan P, Packiam S M, et al. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;104:1813–9.
 42. Lichtenberg SS, Laisney J, Elhaj Baddar Z, Tsyusko O V., Palli SR, Levard C, et al. Comparison of Nanomaterials for Delivery of Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *J. Agric. Food Chem.* 2020;68:7926–34.
 43. Kumar S, Kumar D, Dilbaghi N. Preparation, characterization, and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017;24.
 44. Yang D, Wang N, Yan X, Shi J, Zhang M, Wang Z, et al. Microencapsulation of

- seed-coating tebuconazole and its effects on physiology and biochemistry of maize seedlings. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;114:241–6.
45. Pereira AES, Sandoval-Herrera IE, Zavala-Betancourt SA, Oliveira HC, Ledezma-Pérez AS, Romero J, et al. γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydr. Polym.* 2017;157:1862–73.
 46. Saharan V, Sharma G, Yadav M, Choudhary MK, Sharma SS, Pal A, et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;75:346–53.
 47. Campos EVR, De Oliveira JL, Da Silva CMG, Pascoli M, Pasquoto T, Lima R, et al. Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. *Sci. Rep.* 2015;5:1–14.
 48. Atwood LW, Mortensen DA, Koide RT, Smith RG. Evidence for multi-trophic effects of pesticide seed treatments on non-targeted soil fauna. *Soil Biol. Biochem.* 2018;125:144–55.
 49. Smalling KL, Hladik ML, Sanders CJ, Kuivila KM. Leaching and sorption of neonicotinoid insecticides and fungicides from seed coatings. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*. 2018;53:176–83.
 50. Nettles R, Watkins J, Ricks K, Boyer M, Licht M, Atwood LW, et al. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl. Soil Ecol.* 2016;102:61–9.
 51. Grillo R, Fraceto LF, Amorim MJB, Scott-Fordsmann JJ, Schoonjans R, Chaudhry Q. Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. *J. Hazard. Mater.* 2021;404:124148.
 52. Goldsmith PD. *Economics of Soybean Production, Marketing, and Utilization*. Soybeans. 2008;117–50.

Nanostructured natural polymers (Polimeri naturali nanostructurați)

PhD Student

Timea KACSO

PhD Supervisor

Prof. Dr. Radu OPREAN



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

INTRODUCTION	4
STATE OF THE ART	5
PERSONAL CONTRIBUTION	5
1. Objectives	5
2. Study no.1 - Hydrolytic degradation of zein nanoparticles	6
<i>2.1. Objectives</i>	6
<i>2.3. Material and methods</i>	6
<i>2.4. Results and discussions</i>	6
<i>2.5. Conclusions</i>	7
3. Study no. 2 - Enzymatic degradation of zein nanoparticles	7
<i>3.1. Objectives</i>	7
<i>3.2. Introduction</i>	8
<i>3.3. Materials and methods</i>	8
<i>3.4. Results and discussions</i>	8
<i>3.5. Conclusions</i>	9
4. Study no. 3 - Zein and lignin-based nanoparticles as soybean seed treatment: translocation and impact on seed and plant health	9
<i>4.1. Objectives</i>	9
<i>4.2. Introduction</i>	9
<i>4.3. Materials and methods</i>	9
<i>4.4. Results and discussions</i>	10
<i>4.5. Conclusions</i>	10

5. General conclusions and remarks	11
---	-----------

SELECTED REFERENCES	12
----------------------------	-----------

KEYWORDS: natural polymers, nanoparticles, targeted delivery, degradation kinetics, environmental impact

INTRODUCTION

The possibility of manufacturing nanoparticles (NPs) with well-defined properties and characteristics allows for a more efficient drug management and a targeted therapy of certain diseases^{1,2}, nutritional enrichment of food through incorporation of vitamins³ and nutrients⁴, elimination of pollutants from soil and waste water^{5,6}, and a rational use of pesticides⁷.

Population growth is followed by an increase of food demand, intensification of agricultural activities and the exploitation of arable lands^{7,8}. Agriculture faces numerous challenges in meeting the growing global demand for food, fiber, and fuel. To overcome these and to satisfy the demands, traditional agriculture was neglected, with the increasing use of chemical pesticides and fertilizers. Excessive and irrational use lead to the accumulation of toxic compounds in soil and underground water, endangering public health⁹. In given conditions it is imperiously necessary to reduce the quantity of used pesticides and the development of a rational and efficient pesticide application plan. Nanotechnology allows for the targeted and efficient delivery of chemical compounds by their incorporation in inert and biodegradable NPs.

Zein is a natural polymer, and studying its degradation pathways provides insights that can lead to the development of improved zein nanoparticles with tailored degradation rates and enhanced performance for specific applications, such as targeted drug delivery, tissue engineering, or agricultural uses, allowing for the development of sustainable and eco-friendly nanomaterials.

The main scope of this present work was to understand the degradation process of zein and zein nanoparticles (ZNP), as means to ensure that the byproducts are non-toxic and safe for both biomedical and agricultural applications, while also assessing the environmental impact of zein nanoparticles. This was achieved by studying the degradation of zein and various ZNP formulations under hydrolytic and enzymatic conditions, respectively by the assessment of plant health when ZNPs are employed as delivery systems for pesticide applications.

Besides zein, another naturally derived polymer's, lignin-PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)), effect on plant health was assessed. These composites are also highly suitable for nanoparticle synthesis¹⁰ due to their combined properties of biocompatibility, biodegradability, and enhanced mechanical strength. The adaptability of lignin-PLGA nanoparticles in tuning their physical and chemical properties through simple modifications makes them highly versatile for various biomedical applications, including targeted drug delivery, imaging, and regenerative medicine^{11,12}.

STATE OF THE ART

Natural polymers, derived from renewable resources, have emerged as a significant focus in the realm of nanotechnology due to their inherent biocompatibility, biodegradability, and minimal toxicity¹³. These polymers can be engineered at the nanoscale to exhibit unique physical, chemical, and biological properties^{1,14}. The integration of natural polymers into nanostructures has opened up new possibilities across diverse fields such as medicine¹⁵, environmental science^{5,9}, and materials engineering¹⁶.

Zein, a naturally occurring protein derived from corn, is an ideal material for nanoparticle synthesis due to its biocompatibility, biodegradability, and non-toxic nature^{17,18}. These attributes make zein particularly appealing for biomedical applications¹⁹, including drug delivery²⁰ and tissue engineering^{18,21}. Its amphiphilic properties enable it to self-assemble into nanoparticles in aqueous environments, facilitating the encapsulation and controlled release of hydrophobic drugs¹⁷, phytochemicals^{22,23} and pesticides^{24,25}. Additionally, zein's ability to form stable colloidal suspensions enhances its functionality in various formulations²³. The renewable and abundant supply of corn also ensures that zein is a sustainable and cost-effective choice for nanoparticle production, aligning with the growing emphasis on environmentally friendly materials in nanotechnology²⁶.

Lignin, a natural polymer found primarily in the cell walls of plants, can be obtained at low cost as waste product from the pulp and paper industry²⁷. Covalently bonding lignin with PLGA creates a hybrid polymer that benefits from the synergistic properties of both components. By combining the natural, renewable properties of lignin with the well-established biocompatibility and biodegradability of PLGA, researchers can create materials that are not only effective in biomedical applications but also environmentally friendly²⁸.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Objectives

The objective of the current research was to assess nanostructured natural polymers and their interaction with the environment and living organisms. One of the most valued characteristics of natural polymers is their biodegradability, allowing for environmentally friendly applications. As such, assessment of their degradation can lead to important information about their persistence in the environment, release of active

ingredients and a possibility to fine-tune the nanostructured delivery systems they form.

2. Study no.1 - Hydrolytic degradation of zein nanoparticles

2.1. Objectives

The main objectives of this study were to assess the influence of the used surfactants (cationic, anionic, neutral) on the hydrolytic degradation of zein nanocarriers under environmentally relevant conditions (different pHs and temperatures), as well as identifying potential correlations between the physical-chemical properties of ZNPs with different surface chemistries and their estimated theoretical environmental persistence.

2.2. Introduction

A novel and promising material for nanocarrier synthesis is zein, the main protein from corn endosperm²⁹. Zein was successfully exploited for the entrapment and delivery of various hydrophobic compounds, drugs^{18,30}, vitamins³¹, and dietary supplements³².

In agriculture, zein nanoparticles (ZNPs) are considered a suitable delivery vehicle for pesticides, allowing their targeted and sustained delivery to the crops^{8,30,33}. By designing the ZNPs with various surface properties, they can adhere to the root system and foliage of plants applied on to^{33,34}, increasing the localized persistence time of the loaded pesticides. Such advanced pest management practices would limit the waste of agrochemicals occurring in their conventional broadcasting, and improve the efficacy of the treatment, while minimizing the impact of the pesticide pollution on soil and water caused by runoff³⁵.

2.3. Material and methods

Zein, a natural protein was selected as model compound for nanoparticle synthesis. Several formulations were developed with ionic and non-ionic surfactants as stabilizers, size and charge characterization was performed in aqueous media with different pH conditions. Hydrolytic degradation of NPs was observed and an accelerated degradation study was performed to determine the degradation kinetics. Based on the obtained results the persistence of ZNPs in aqueous media was approximated.

2.4. Results and discussions

NPs reconstituted in distilled water (pH = 7) displayed a higher hydrodynamic diameter and polydispersity index than those suspended in buffer solutions. All reconstituted freeze-dried ZNPs showed a moderate to broad polydisperse distribution,

the poorest dispersity being recorded in distilled water (PDI = 0.7 – 0.9). Significant changes in the polymeric particles' surface charge were observed by changing the pH of the dispersion media.

During accelerated hydrolytic degradation at elevated temperatures, zein subunits break up, forming peptides with lower molecular mass (10.86 kDa - 12 kDa). At lower temperatures (<50-60°C), within the studied period of time (14 days) only a partial breakdown of zein occurred, shown by a gradual decrease in the concentration of the main fractions, especially in alkaline media. Over time, the main peaks corresponding to the parent zein subunits not only decrease in height, but also broaden as a result of degradation products with similar molecular weights

The time dependence of the recorded relative zein concentration followed first-order kinetics. The empirical kinetic degradation rate constants were correlated with the studied temperature and pH values. Results indicated that ZNPs in general were more stable in acidic media, showing a more accentuated wear down at pH 9. Surprisingly ZNPs synthesized with one of the non-ionic surfactants shows an opposite trend, indicating that the hydrolytic degradation of ZNPs might also be controlled by the nature of the employed surfactant. Nevertheless, ZNPs with apparently similar surface charge, dispersity and size, obtained with various non-ionic surfactants demonstrated noticeably different estimated persistence times regardless of the pH value.

2.5. Conclusions

Controlled degradation of freeze-dried ZNPs synthesized in the presence of different cationic and non-ionic surfactants showed that in general alkaline media promotes a faster chemical degradation, however the nature of the used surfactant may reverse the observed trend. Determining how the surface chemistry of ZNPs impact their hydrolytic degradation profile allows for the fine-tuning of these nanodelivery systems, providing a safer and more sustainable use in agriculture. In real environmental conditions, where sun exposure, microbiota, humidity, etc. further contributes to the weathering of protein-based NPs, their environmental wear down will occur in a shorter time, assuring safe, responsible and sustainable use of this technology.

3. Study no. 2 - Enzymatic degradation of zein nanoparticles

3.1. Objectives

The main objective of this study is to assess the enzymatic digestion of zein NPs in case of oral ingestion. Zein NPs' digestion was studied by incubation in reconstituted gastric and intestinal fluids. Besides the conventional enzymatic digestion in homogenous phase, zein NPs were also digested with enzymes immobilized on microfluidic devices.

3.2. Introduction

Nano-sized delivery systems, such as nanoparticles are used for the targeted delivery of drugs³⁶, vitamins³, antioxidants³⁷ or pesticides²⁴.

As nanoparticles, zein is a suitable delivery system for the incorporation of pharmaceutical compounds, vitamins, and food supplements³⁸. ZNPs, as oral delivery systems, face harsh conditions inside the gastro-intestinal tract, that modify not only their physical structure, but also their chemical properties as the zein protein is exposed to enzymatic degradation³⁹. Majority of studies regarding ZNPs for targeted delivery focus on the incorporated component, and rarely on the quantitative changes that ZNPs suffer due to digestion³⁹.

3.3. Materials and methods

Digestion studies were performed with trypsin in-solution, in 3 different digestion media, and with trypsin immobilized on a microfluidical device (on-chip digestion).

Zein NPs were incubated at 37°C in simulated gastric fluid (pepsin) and intestinal fluid (pancreatin) and samples were collected at 0, 2, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes after incubation.

The decrease of the parent compound's concentration was monitored by capillary gel electrophoresis (CGE) with UV detection.

3.4. Results and discussions

A decrease in zein's two main protein fractions (24.1 kDa and 28.4 kDa) was tracked and determined quantitatively, as the main noticeable change that occurred as a result of the digestion process. During the enzymatic digestion a broadening and decrease in height of these two peaks is observed due to the formation of slightly shorter polypeptide chains with molar weights in rather close range. Simultaneously the proteolysis leads to the appearance of a broad peak corresponding to a mixture of even shorter polypeptides with an average molar weight of ~10 kDa.

Bulk zein and ZNPs are susceptible to enzymatic activity in organic and aqueous solutions, with highest digestion rate observed for a mixture of 80% ACN / 20% 25mM (NH₄)HCO₃, due to zein's optimal solubility and accessibility towards the enzyme's activity. Enzymatic digestion of ZNPs on microfluidic devices were similar to those obtained in homogenous phase.

An almost total peptic digestion of the parent compound (α -zein) occurs after 60 minutes of incubation of ZNPs in reconstituted gastric fluid. ZNPs incubated in reconstituted intestinal fluid following gastric digestion were totally digested in the beginning of the intestinal phase, while particles incubated solely in intestinal fluid showed a slow, partial digestion of zein.

3.5. Conclusions

The media in which digestion takes place greatly influences zein's availability to enzyme activity, with higher digestion rates noted for media where zein is soluble. Zein's structure in space is another important factor, aggregates tend to be more resistant to digestion than well-dispersed, nanostructured zein. ZNPs were almost totally digested after one hour of gastric incubation, while bulk zein's digestion was slower. Enzymatic digestion of ZNPs influenced by their characteristics allows for a programmable wear down of these oral delivery nanostructures, based on the desired release profile of the incorporated compounds. Microfluidic devices proved to be a promising alternative digestion method to in-solution techniques with shorter digestion times and increased digestion rate.

4. Study no. 3 - Zein and lignin-based nanoparticles as soybean seed treatment: translocation and impact on seed and plant health

4.1. Objectives

To better understand polymeric nanoparticles' (PNPs) environmental impact and role in seed protection and soybean plant development, this study focused on tracking PNPs in seeds after treatment and during germination while determining their effect on plant growth indicators, non-target pests (in this case, insects), and antifungal activity.

4.2. Introduction

Polymeric nanoparticles (PNPs) are proposed as suitable delivery systems in a multitude of agricultural applications, such as for the delivery of herbicides⁴⁰, insecticides^{41,42}, fungicides^{43,44}, and plant growth regulators⁴⁵.

Studies focused on nanoparticles (NPs) as delivery systems for seed treatment specifically reported the biochemical activity of the entrapped agrochemical⁴⁴, the biological activity of the formulation (e.g., antifungal, pesticide activity) relevant for the intended purpose^{43,45,46} or the effect of pesticides on the environment⁴⁷⁻⁵⁰. Meanwhile, the effects of non-loaded NPs on seed quality, germination, and plant growth are generally unknown, nor are the other ecotoxicological aspects, such as the effect of agrochemicals on non-target species, which have also gained little attention⁵¹. To our knowledge, no studies have been published on the translocation and impact of zein nanoparticles (ZNPs) and lignin-graft-poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles (LNPs) on plant development when used as a seed treatment.

4.3. Materials and methods

Zein nanoparticles (ZNPs) were synthesized with a cationic surfactant, didodecyldimethylammonium bromide (DMAB) (122.9±0.8 nm, +59.7±4.4 mV) and a

non-ionic surfactant, Tween 80 (118.7 ± 1.7 nm, $+26.4 \pm 1.1$ mV). Lignin-graft-poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles (LNPs) were made without surfactants (52.9 ± 0.2 nm, -54.9 ± 0.5 mV).

Soybean was chosen as a model plant due to its importance in agriculture and the economy⁵². To assess the potential of non-target effects, *Chrysodeixis includens*, an important defoliator of soybeans, was chosen. Antifungal effectiveness of azoxystrobin against *Rhizoctonia solani* nanodelivered with PNPs as a seed treatment was also investigated. *R. solani* was chosen for this experiment due to its aggressive nature, capable of causing seed decay, pre- and post-emergence damping-off, as well as hypocotyl and root rot.

4.4. Results and discussions

All soybean seeds presented signs of germination after the first 24 hours, characterized by an increase in size and indications of radicle development. There were no observable differences in seed germination between various treatments in the present study, regardless of the nature of the particles used, their size, charge, or the applied concentration.

ZNP and LNP seed treatments had little to no effect on seed viability and plant growth of soybeans treated with high concentrations of PNPs. Some marginal differences were observed in plant growth parameters between control plants and treated plants, but plant viability was not significantly affected overall. Although statistically significant differences were recorded at some NP concentrations, no correlation or specific dose-dependence could be detected.

Imaging of non-germinated seeds showed that ZNPs adhered to the interior and exterior surface of the seed coat. Although, during germination soybean seeds undergo morphological and chemical transformations, PNPs did not translocate from the seed coat to the interior of the cotyledons, as they remained adhered to the seed coat.

The LNPs with entrapped azoxystrobin provided effective protection (close to 100%) compared to all formulations studied at 0.5 mg/mL (Fig.21.C). The commercial formulation provided statistically similar protection, with plants presenting only 20% surface lesions. ZNP-Ds loaded with azoxystrobin showed similar protection to the commercial formulation and LNPs delivered azoxystrobin. Loaded ZNP-Ts were ineffective against *R. solani*, although they provided slightly better protection than azoxystrobin dissolved in water, where plants presented 50% lesions compared to 80%.

These results suggest that the nanoparticle seed treatments do not affect the mortality of lepidopteran larvae following consumption of leaf tissue of treated seeds.

4.5. Conclusions

Polymeric nanoparticles were synthesized based on biodegradable polymers, zein and lignin, easily obtained from natural resources. This study indicates that ZNP and LNP seed treatments had little to no effect on seed viability and plant growth of soybeans treated with high concentrations of PNPs. Microscopical imaging revealed

that PNPs adhered only to the outer and inner surface of the seed coat without penetration in the cotyledons. Thus, ZNP and LNP treatment of seeds was found to not interfere with the germination process and may be suitable for seed treatment delivery systems of active compounds. Azoxystrobin-loaded (technical grade) LNPs offered almost complete antifungal protection (~100%) for soybean plants against *R. solani* when used as a seed treatment, while ZNP-D displayed similar effectiveness as the commercial formulation (~80% protection) closely. Although the ZNP-T loaded with azoxystrobin did not offer effective protection, it improved the antifungal effect of free azoxystrobin. Zein and lignin polymer-based NPs open the way towards a safe and natural alternative to improve pesticide use in seed treatment without interfering with plant physiology.

5. General conclusions and remarks

The objective of the current research was to assess the interaction of nanostructured natural polymers with the environment and living organisms. In this purpose, zein, a natural polymer, was chosen as a model compound for nanoparticle synthesis and its nanostructured behavior towards external factors was assessed through hydrolytic and enzymatic degradation. Further, in vivo assessment of nanostructured natural polymers' effect on plant health and insect mortality was successfully performed for ZNPs and LNPs.

6. Originality of the thesis

The originality of this work consists in the comprehensive assessment of nanostructured natural polymers and their interaction with the environment through the study of the selected model polymer, zein's behavior in gradually increasing complexity of environments, from simple aqueous media, through simulated enzymatic conditions to in vivo studies of their interaction with an organic environment.

ZNPs degradation in aqueous media was characterized in acidic and basic conditions and in a wide range of temperatures. Influence of surfactant used for ZNP synthesis (ionic or non-ionic) on the degradation profile of NPs was also determined. Based on the results from the hydrolytic studies, degradation kinetics of all ZNPs was determined and a complex mathematical model was derived for the approximation of ZNPs persistence time in aqueous media. To our knowledge, no similar accelerated degradation studies and mathematical models for ZNPs were reported in literature.

Most studies regarding ZNPs as oral delivery systems focus on the characterization of the incorporated compound, while the nanostructures are only assessed by their physical characteristics and zein's digestion is examined qualitatively.

This work brings focus on the delivery system and closes the knowledge gap, providing a quantitative determination of zein's enzymatic degradation over time.

In addition, a novel approach for enzymatic digestion of zein was developed, through an enzymatic reactor immobilized on the surface of a microfluidic chip.

The final study of this work investigated nanostructured natural polymers in a complex environment, with NPs as delivery systems for seed treatment. NPs synthesized without surfactant from a novel biopolymer, lignin-PLGA, together with those manufactured from zein with an ionic (DMAB) and a non-ionic (Polysorbate 80) surfactant were applied on soybean seeds to assess their effect on plant health. To our knowledge, no other studies using these polymeric nanostructures as seed treatment were published. Azoxystrobin-loaded NPs' antifungal activity was compared with a commercial formulation, showing that the incorporation of the active ingredient in LNPs improves its protective activity. Moreover, this is the first experiment to document the effect of ZNP and LNP treated seeds on an insect pest.

Overall, the multifaceted research conducted within this thesis brings significant advancements in the field of nanotechnology, contributing to the development of biodegradable nanoparticles thus representing a significant advancement in both healthcare and environmental sustainability.

SELECTED REFERENCES

1. Wang Y, Qian M, Xie Y, Zhang X, Qin Y, Huang R. Biodegradable nanoparticles-mediated targeted drug delivery achieves trans-spatial immunotherapy. *Fundam. Res.* 2022;
2. Chen S, Greasley SL, Ong ZY, Naruphontjirakul P, Page SJ, Hanna J V., et al. Biodegradable zinc-containing mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy. *Mater. Today Adv.* 2020;6:100066.
3. Bedhafi T, Idoudi S, Fernandes Q, Al-Zaidan L, Uddin S, Dermime S, et al. Nano-vitamin C: A promising candidate for therapeutic applications. *Biomed. Pharmacother.* 2023;158:114093.
4. Sabliov C, Chen H, Yada R, editors. *Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients*. 1st ed. 2015. p. 272–88.
5. El-Sayed MMH, Elsayed RE, Attia A, Farghal HH, Azzam RA, Madkour TM. Novel nanoporous membranes of bio-based cellulose acetate, poly(lactic acid) and biodegradable polyurethane in-situ impregnated with catalytic cobalt nanoparticles for the removal of Methylene Blue and Congo Red dyes from wastewater. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2021;2:100123.
6. Rathod S, Preetam S, Pandey C, Bera SP. Exploring synthesis and applications of

- green nanoparticles and the role of nanotechnology in wastewater treatment. *Biotechnol. Reports*. 2024;41:e00830.
7. Nam NN, Trai NN, Thuy NP, Nam PQ, Linh LT, Khoa Do HD. Current and Emerging Nanotechnology For Sustainable Development of Agriculture: Implementation Design Strategy and Application. *Heliyon*. 2024;10:e31503.
 8. de Oliveira JL, Campos EVR, Bakshi M, Abhilash PC, Fraceto LF. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnol. Adv.* 2014;32:1550–61.
 9. Paul SK, Mazumder S, Naidu R. Herbicidal weed management practices: History and future prospects of nanotechnology in an eco-friendly crop production system. *Heliyon*. 2024;10:e26527.
 10. Astete CE, De Mel JU, Gupta S, Noh Y, Bleuel M, Schneider GJ, et al. Lignin-Graft-Poly(lactic- co -glycolic) Acid Biopolymers for Polymeric Nanoparticle Synthesis. *ACS Omega*. 2020;5:9892–902.
 11. Pylypchuk I V., Karlsson M, Lindén PA, Lindström ME, Elder T, Sevastyanova O, et al. Molecular understanding of the morphology and properties of lignin nanoparticles: unravelling the potential for tailored applications. *Green Chem*. 2023;4415–28.
 12. Morsali M, Moreno A, Loukovitou A, Pylypchuk I, Sipponen MH. Stabilized Lignin Nanoparticles for Versatile Hybrid and Functional Nanomaterials. *Biomacromolecules*. 2022;23:4597–606.
 13. Haleem A, Javaid M, Singh RP, Rab S, Suman R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Glob. Heal. J.* 2023;7:70–7.
 14. Hock N, To D, Armengol ES, Summonte S, Seybold A, Federer C, et al. Design of biodegradable nanoparticles for enzyme-controlled long-acting drug release. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2023;89:105085.
 15. Khan NH, Mir M, Qian L, Baloch M, Ali Khan MF, Rehman A ur, et al. Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. *J. Adv. Res.* 2022;36:223–47.
 16. Marchianò V, Matos M, Marcet I, Carmen Blanco-López M, Gutiérrez G, Cioffi N, et al. Preparation and characterization of biodegradable gelatine and starch films embedding cerium oxide nanoparticles stabilized by PLGA micelles for antibiofilm applications. *J. Mol. Liq.* 2024;398:0–8.
 17. Giteru SG, Ali MA, Oey I. Recent progress in understanding fundamental interactions and applications of zein. *Food Hydrocoll.* 2021;120:106948.
 18. Paliwal R, Palakurthi S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Release*. 2014;189C:108–22.
 19. Bodoki E, Vostinaru O, Samoila O, Dinte E, Bodoki AE, Swetledge S, et al. Topical nanodelivery system of lutein for the prevention of selenite-induced cataract. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2018;#pagerange#.
 20. Li Y, Su H, Wang W, Yin Z, Li J, Yuan E, et al. Fabrication of taxifolin loaded zein-

- caseinate nanoparticles and its bioavailability in rat. *Food Sci. Hum. Wellness*. 2023;12:2306–13.
21. Zhou P, Xia Y, Cheng X, Wang P, Xie Y, Xu S. Enhanced bone tissue regeneration by antibacterial and osteoinductive silica-HACC-zein composite scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*. 2014;35:10033–45.
 22. Takma DK, Bozkurt S, Koç M, Korel F, Nadeem HŞ. Characterization and encapsulation efficiency of zein nanoparticles loaded with chestnut fruit shell, cedar and sweetgum bark extracts. *Food Hydrocoll. Heal*. 2023;4.
 23. Mariano A, Li YO, Singh H, McClements DJ, Davidov-Pardo G. Encapsulation of orange-derived hesperetin in zein/pectin nanoparticles: Fabrication, characterization, stability, and bioaccessibility. *Food Hydrocoll*. 2024;153:110024.
 24. Kacsó T, Hanna EA, Salinas F, Astete CE, Bodoki E, Oprean R, et al. Zein and lignin-based nanoparticles as soybean seed treatment: translocation and impact on seed and plant health. *Appl. Nanosci*. 2022;12:1557–69.
 25. Salinas F, Astete CE, Waldvogel JH, Navarro S, White JC, Elmer W, et al. Effects of engineered lignin-graft-PLGA and zein-based nanoparticles on soybean health. *NanoImpact*. 2021;23:100329.
 26. Kacsó T, Neaga IO, Erincz A, Astete CE, Sabliov CM, Oprean R, et al. Perspectives in the design of zein-based polymeric delivery systems with programmed wear down for sustainable agricultural applications. *Polym. Degrad. Stab*. 2018;155:130–5.
 27. Nilsson TY, Wagner M, Inganäs O. Lignin Modification for Biopolymer/Conjugated Polymer Hybrids as Renewable Energy Storage Materials. *ChemSusChem*. 2015;8:4081–5.
 28. S. S, Shabbirahmed AM, Haldar D, Patel AK, Singhania RR. Influence of reaction conditions on synthesis and applications of lignin nanoparticles derived from agricultural wastes. *Environ. Technol. Innov*. 2023;31:103163.
 29. Patel AR, Velikov KP. Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. 2014;19:450–8.
 30. Perlatti B, Souza Bergo PL de, Fernandes da Silva MF das G, Batista J, Rossi M. Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals. *Insectic. - Dev. Safer More Eff. Technol*. 2013.
 31. Peñalva R, Esparza I, González-Navarro CJ, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. 2015;30:450–7.
 32. Soltani S, Madadlou A. Gelation characteristics of the sugar beet pectin solution charged with fish oil-loaded zein nanoparticles. *Food Hydrocoll*. 2015;43:664–9.
 33. Prasad A, Astete CE, Bodoki AE, Windham M, Bodoki E, Sabliov CM. Zein

- Nanoparticles Uptake and Translocation in Hydroponically Grown Sugar Cane Plants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;
34. Ristroph KD, Astete CE, Bodoki E, Sabliov CM. Zein Nanoparticles Uptake by Hydroponically Grown Soybean Plants. *Environ. Sci. Technol.* 2017;51:14065–71.
 35. Sekhon B. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 2014;7:31.
 36. Sadeghi S, Lee WK, Kong SN, Shetty A, Drum CL. Oral administration of protein nanoparticles: An emerging route to disease treatment. *Pharmacol. Res.* 2020;158:104685.
 37. Hashemi N, Krøyer Rasmussen M, Tsochatzis ED, Corredig M. In vitro digestion and intestinal absorption of curcumin-loaded zein nanoparticles. *J. Funct. Foods.* 2023;110.
 38. Tran PHL, Duan W, Lee BJ, Tran TTD. Drug stabilization in the gastrointestinal tract and potential applications in the colonic delivery of oral zein-based formulations. *Int. J. Pharm.* 2019;569:118614.
 39. Cheng CJ, Ferruzzi M, Jones OG. Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. *Food Hydrocoll.* 2019;87:229–36.
 40. Tong Y, Wu Y, Zhao C, Xu Y, Lu J, Xiang S, et al. Polymeric Nanoparticles as a Metolachlor Carrier: Water-Based Formulation for Hydrophobic Pesticides and Absorption by Plants. *J. Agric. Food Chem.* 2017;65:7371–8.
 41. Gabriel Paulraj M, Ignacimuthu S, Gandhi MR, Shajahan A, Ganesan P, Packiam S M, et al. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;104:1813–9.
 42. Lichtenberg SS, Laisney J, Elhaj Baddar Z, Tsyusko O V., Palli SR, Levard C, et al. Comparison of Nanomaterials for Delivery of Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *J. Agric. Food Chem.* 2020;68:7926–34.
 43. Kumar S, Kumar D, Dilbaghi N. Preparation, characterization, and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017;24.
 44. Yang D, Wang N, Yan X, Shi J, Zhang M, Wang Z, et al. Microencapsulation of seed-coating tebuconazole and its effects on physiology and biochemistry of maize seedlings. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;114:241–6.
 45. Pereira AES, Sandoval-Herrera IE, Zavala-Betancourt SA, Oliveira HC, Ledezma-Pérez AS, Romero J, et al. γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydr. Polym.* 2017;157:1862–73.
 46. Saharan V, Sharma G, Yadav M, Choudhary MK, Sharma SS, Pal A, et al. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic

- fungi of tomato. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;75:346–53.
47. Campos EVR, De Oliveira JL, Da Silva CMG, Pascoli M, Pasquoto T, Lima R, et al. Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. *Sci. Rep.* 2015;5:1–14.
 48. Atwood LW, Mortensen DA, Koide RT, Smith RG. Evidence for multi-trophic effects of pesticide seed treatments on non-targeted soil fauna. *Soil Biol. Biochem.* 2018;125:144–55.
 49. Smalling KL, Hladik ML, Sanders CJ, Kuivila KM. Leaching and sorption of neonicotinoid insecticides and fungicides from seed coatings. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 2018;53:176–83.
 50. Nettles R, Watkins J, Ricks K, Boyer M, Licht M, Atwood LW, et al. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl. Soil Ecol.* 2016;102:61–9.
 51. Grillo R, Fraceto LF, Amorim MJB, Scott-Fordsmand JJ, Schoonjans R, Chaudhry Q. Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. *J. Hazard. Mater.* 2021;404:124148.
 52. Goldsmith PD. *Economics of Soybean Production, Marketing, and Utilization.* Soybeans. 2008;117–50.