

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Risanamento ambientale del glifosato: valutazione dell'utilizzo di
approcci combinati chimico-biologici basati su consorzi di batteri e
microalghe**

Relatore: Prof.ssa Sara Bogialli

Correlatore: Prof.ssa Eleonora Sforza

Controrelatore: Prof. Lucio Littì

Laureando: Dulesha Placido Nanobi Arachchilage Appuhamy

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Simboli e Abbreviazioni

AC activated carbon

AMPA acido amminometilfosfonico

CE Comunità Europea

CNT carbon nanotube

COD chemical oxygen demand

D.Lgs decreto legislativo

DAR dose acuta di riferimento

DGA dose giornaliera ammissibile

DMF N, N dimetilformammide

DMP dimetilfosfite

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations

GLY glifosato GOX glifosato ossidoriduttasi

Hc coercitività

HRMS high resolution mass spectrometry

IARC International Agency for Research on Cancer

IC ion chromatography

ICP inductively coupled plasma

IDA acido imminodiacetico

IUPAC International unite of pure and applied chemistry

LDH Layered Double hydroxides

LMR limiti massimi residui

LSPR localized surface plasmon resonance

MNP Magnetite nanoparticles

M_r magnetizzazione residua

M_s magnetizzazione massima

MWCNT multiwall carbon nanotube

OD optical density

OMS Organizzazione mondiale della sanità

pDA polidopamine

PEP fosfpenolpiruvato

PMIDA N-fosfonometiliminodiacetico

RE removal efficiency

RSD relative standard deviation

S3P shikimate-3-phosphate

SEM scanning electron microscope

SPM superparamagnetic

SQA standard di qualità ambientale

STEM scanning transmission electron microscope

TEM Transmission electron microscope

THFA tetrahydrofolate

TRIZMA tri(hydroxymethyl)aminomethane

INDICE

1. Introduzione	8
2. Glifosato	9
2.1. Proprietà Chimico-Fisiche e ambientali	9
2.2. Metodi di sintesi	12
2.2.1. Percorsi Esteri Alchilici	12
2.2.2. Percorso IDA	14
2.3. Azione del glifosato	15
2.4. Tossicologia del glifosato	16
2.5. Normativa sul Glifosato	17
2.5.1. Acque superficiali e sotterranee.	17
2.5.2. Alimenti	17
3. Metodi di adsorbimento del glifosato	19
3.1. Carbone attivo e biochar per l'adsorbimento del glifosato	19
3.2. Argille per l'adsorbimento del glifosato	20
3.3. Materiali nanostrutturati usati per la rimozione del glifosato	21
3.3.1. Nanotubi di carbonio	21
3.3.2. Nanocompositi	22
3.3.3. Nanoparticelle metalliche	23
4. Metodi di biorisanamento del glifosato	26
4.1. Degradazione batterica del glifosato	26
4.2. Biorisanamento del glifosato mediante microalghe	28
5. Scopo della tesi	29
6. Materiali e metodi	31
6.1. Reagenti e standard	31
6.2. Sintesi delle nanoparticelle di Fe₃O₄(MNP)	32

6.3.	Sintesi delle nanoparticelle MNP@PDA@Ti ⁴⁺ ...	33
6.4.	Caratterizzazione delle MNP e delle MNP@pDA ₃₄	
6.5.	Setup sperimentale per l'adsorbimento del glifosato	35
6.6.	Cromatografia ionica	36
6.7.	Spettrometria di massa ad alta risoluzione	36
6.7.1.	Electrospray ionization (ESI)	37
6.7.2.	Q-Exactive quadrupole-Orbitrap	38
6.8.	Metodo di quantificazione del glifosato con IC-HRMS/MS	39
6.9.	Retta di calibrazione di glifosato	40
6.10.	Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente	41
6.11.	Retta di calibrazione del Titanio	42
6.12.	Clorella Protothecoides	43
6.13.	Pseudomonas stutzeri	44
6.14.	Comomonas Odontotermis sp. Dant 3-8	45
6.15.	Sinomonas Atrocyanea	46
6.16.	Terreno di coltura per la crescita di microalghe e batteri	46
6.17.	Sistema di coltivazione in batch	47
6.18.	Misure di densità ottica	48
6.19.	Peso secco	49
6.20.	Concentrazione cellulare (Conta)	49
6.21.	Quantificazione del numero di pigmenti	50
6.22.	Ortofosfati (PO ₄ ³⁻)	51
6.23.	Ammoniaca (NH ₃)	52
6.24.	Chemical oxygen demand (COD)	53
7.	Risultati e discussione	55
7.1.	Nanoparticelle di Magnetite di Fe ₃ O ₄ (MNP)	55

7.1.1. Proprietà magnetiche delle MNP	55
7.1.2. Studio delle dimensioni delle Nanoparticelle di Fe ₃ O ₄ (MNP)	57
7.2. MNP funzionalizzate con polidopamina (pDA) ...	57
7.2.1. Studio sullo spessore della polidopamina nelle MNP@pDA	58
7.3. Nanoparticelle MNP@pDA funzionalizzate Con Ti ⁴⁺	59
7.3.1. Studi per l'adsorbimento del Glifosato su MNP@pDA@Ti ⁴⁺	60
7.3.2. Studi sulla digestione delle nanoparticelle	61
7.3.3. Risultati delle analisi ICP-MS per le digestioni del TiO ₂	63
7.4. Analisi sulla crescita microalgale e batterica	63
8. Conclusione.....	66
Bibliografia.....	67

1. Introduzione

Ideato dal chimico Jhon E. Franz¹, impiegato presso l'azienda Monsanto negli anni 70, N-(fosfonometil)glicina, chiamato comunemente con il nome di glifosato, risulta essere l'erbicida non selettivo più utilizzato degli ultimi decenni. Le ottime capacità del glifosato di rimuovere le piante infestanti dai raccolti hanno favorito l'incremento delle rese agricole provocando una forte dipendenza dall'erbicida nell'industria alimentare. La diffusione del glifosato è stata supportata dalla produzione e vendita di piante OGM resistenti al glifosato, il cui effetto ha lo scopo di ridurre la citotossicità dell'erbicida nei confronti dei raccolti.

La scelta del glifosato, da parte di agricoltori, aziende agricole, industrie agrochimiche, enti governativi e privati cittadini, è dovuta alla sua capacità di inibire l'enzima essenziale alla produzione degli amminoacidi aromatici nelle piante, causandone di conseguenza la morte.

Il glifosato ha acceso elevati dibattiti dovuti alle preoccupazioni crescenti riguardo al suo impatto ambientale e sulla salute umana; l'utilizzo intensivo del glifosato ha causato la produzione di specie infestanti glifosato-resistenti producendo delle difficoltà nella produzione e gestione dei raccolti.

L'elevata produzione e utilizzo del glifosato hanno incentivato gli studi sui comportamenti dell'erbicida nei vari comparti ambientali, evidenziando come la molecola persista nel suolo e nell'acqua, causando una elevata contaminazione dei sistemi ambientali e della biodiversità. Pertanto, negli ultimi decenni vi è stato un incremento dell'attenzione da parte della ricerca mondiale per studiare nuove metodologie e nuovi materiali per l'adsorbimento e la degradazione del glifosato così da ridurre le concentrazioni e rientrare nei valori limite forniti dalla normativa, nell'attesa di trovare un sostituto più sostenibile e meno impattante sui compartimenti ambientali.

2. Glifosato

2.1. Proprietà Chimico-Fisiche e ambientali

N-(fosfonometil)glicina, chiamato con il nome di glifosato, risulta essere un derivato fosfonometilico dell'amminoacido glicina. Si presenta come solido bianco e inodore. La struttura molecolare del glifosato è caratterizzata da gruppo glicinicico legato ad un gruppo fosfonico².

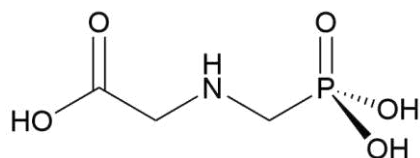


Figura 1. Struttura del Glifosato

Dalla struttura (Figura 1) si può osservare che la presenza del gruppo fosfonico, amminico e carbossilico fa sì che il glifosato risulti essere una molecola anfotera, dotata della capacità di agire sia come acido sia come base, a seconda del pH(Figura 2)³in cui si trova.

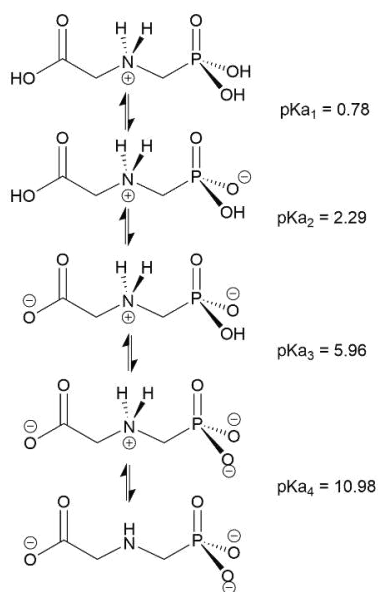


Figura 2. Equilibri delle specie di glifosato in funzione del pH.

Il comportamento acido-base del glifosato è strettamente correlato ai suoi valori di pKa. Il glifosato presenta quattro pKa ($pK_{a1}=0.78$; $pK_{a2}=2.29$; $pK_{a3}=5.96$; $pK_{a4}=10.$) che definiscono quali gruppi funzionali vengano protonati o deprotonati in funzione del pH dell'ambiente in cui la molecola si ritrova (Figura 3) ⁴.

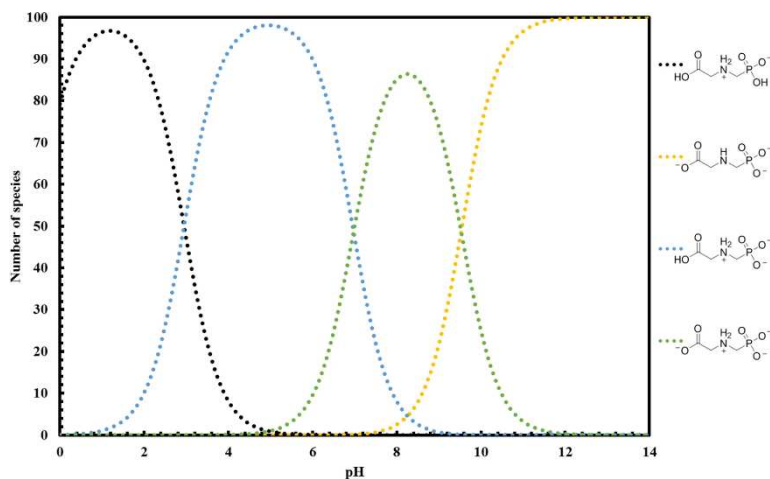


Figura 3. Specie di dissociazione e pKa del Glifosato

Questi valori influenzano le sue proprietà chimiche, determinando in quali condizioni il glifosato forma sali anionici basici o sali cationici in ambienti acido.

Il glifosato presenta una solubilità moderata in acqua, pari a 1.16 g L^{-1} a 25 °C e tende a incrementare significativamente quando viene convertito in sali monobasici (sali isopropilamminici, sodici, potassici, amminici, trimetilsolfonici). Questi sali essendo più solubili, sono comunemente utilizzati nelle formulazioni commerciali di erbicidi, e vengono forniti come soluzioni acquose concentrate al 30%-50% di glifosato.

Né la forma acida del glifosato né i suoi sali sono solubili in solventi organici comuni, proprietà attribuita alla presenza di forti legami a idrogeno intermolecolari presenti nella molecola⁴. Questi legami conferiscono al glifosato una bassa volatilità di $2.59 \cdot 10^{-5} \text{ Pa}$ a 25 °C e un'elevata densità di $1.75 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}$ che suggeriscono una ridotta propensione all'evaporizzazione dalla superficie trattata e alla dispersione aerea. Tali caratteristiche riducono la probabilità che il glifosato rimanga sospeso in aria per lunghi periodi.

Dal punto di vista ambientale, il glifosato si distingue per la sua stabilità alla degradazione chimica, in particolare esso non subisce idrolisi in acqua ultrapura, all'interno della maggior parte degli intervalli di pH rilevanti per l'ambiente.

Il glifosato risulta essere fotoliticamente stabile sia in acqua ultrapura che nei suoli, sebbene la fotodegradazione possa verificarsi in casi specifici, come la presenza di ioni calcio e intensa esposizione a forte luce artificiale⁵. La degradazione fotolitica non costituisce una via principale per la degradazione del glifosato nell'ambiente, al contrario la principale via di degradazione del glifosato nell'ambiente è di natura biologica. I microrganismi presenti nel suolo, in acqua e nei sistemi acqua-sedimento degradano rapidamente il glifosato. Nel suolo, il glifosato viene degradato dalla microflora sia in condizioni aerobiche che anaerobiche, con l'acido amminometilfosfonico (AMPA) come principale metabolita prodotto. Sebbene l'AMPA si degradi a un ritmo più lento rispetto al glifosato, gran parte del glifosato, tra il 79% e l'86%, viene trasformata in anidride carbonica nei primi sei mesi¹. La dissipazione del glifosato nel suolo avviene con un'emivita generalmente inferiore a un anno, e spesso sotto i 38 giorni⁶. Inoltre, il tasso di dissipazione non è influenzato dalla frequenza delle applicazioni, e né il glifosato né l'AMPA tendono ad accumularsi anche dopo applicazioni ripetute nel corso di un anno o oltre⁶. Anche nelle acque ambientali, il glifosato viene principalmente degradato attraverso la biodegradazione, trasformandosi inizialmente in AMPA e anidride carbonica, e successivamente l'AMPA viene ulteriormente degradato in anidride carbonica.

Il glifosato è impiegato esclusivamente come diserbante post-emergente (che agisce su piante già germogliate) e il suo potenziale di assorbimento attraverso il sistema radicale dei suoli è trascurabile. Questa bassa attività nel suolo è attribuita alla rapida degradazione microbica e alla forte affinità del glifosato per i suoli. Inoltre, l'assorbimento del glifosato nelle piante coltivate su suoli trattati precedentemente con il diserbante è generalmente inferiore all'1% del totale applicato, confermando che il glifosato ha una capacità minima di essere assorbito attraverso il sistema radicale delle piante.

2.2. Metodi di sintesi

L'elevata stabilità del glifosato permette di sintetizzare le molecole attraverso molteplici pathway di sintesi variando pH, temperatura e ambiente di reazione, sebbene siano stati segnalati molti percorsi, solo una piccola frazione di questi presenta rese alte e altre caratteristiche che li rendono adatti per operazioni commerciali. Attualmente, esistono due famiglie principali di sintesi per la produzione commerciale di glifosato: i percorsi "esteri alchilici"⁷ e i percorsi "acido imminodiacetico(IDA)"⁸.

2.2.1. Percorsi Esteri Alchilici

Un numero significativo di produttori cinesi utilizza processi di sintesi del glifosato basato su "esteri alchilici". Il più utilizzato è quello sviluppato e brevettato da chimici Alkaloida in Ungheria. Il processo "Alkaloida" prevede la sintesi del glifosato mediante la reazione tra glicina, Dimetilfosfite(DMP) e paraformaldeide⁷(Figura 4).

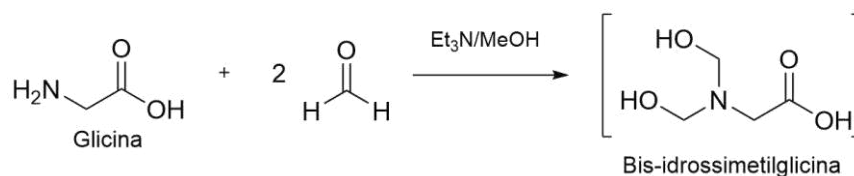


Figura 4. Primo step di reazione del processo Alkaloida con formazione dell'intermedio idrossimetilglicinico

Nel percorso Alkaloida, la reazione avviene in un mezzo non acquoso, dove la glicina viene prima aggiunta a una miscela di trietilammina e paraformaldeide (circa due equivalenti) in metanolo. In queste condizioni si forma l'intermedio idrossimetilglicina⁷.

Successivamente il DMP viene aggiunto alla miscela di reazione, formando un estere fosfonato (Figura 5).

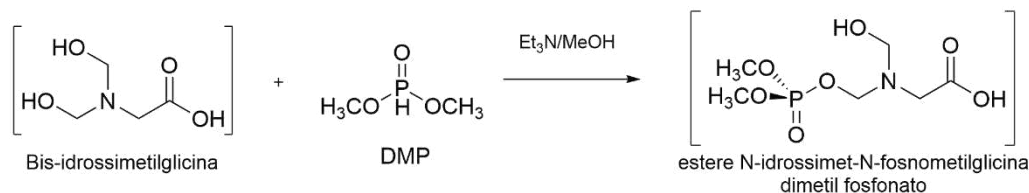


Figura 5. Secondo step di reazione del processo Alkaloida con formazione dell'intermedio estere N-idrossimet-N-fosfometilglicina dimetil fosfonico.

L'acido cloridrico viene aggiunto a temperatura ambiente per rimuovere il gruppo idrossimetile. Successivamente, il riscaldamento della soluzione a 115 °C provoca un'idrolisi dell'estere fosfonato che porta alla formazione del glifosato (Figura 6).

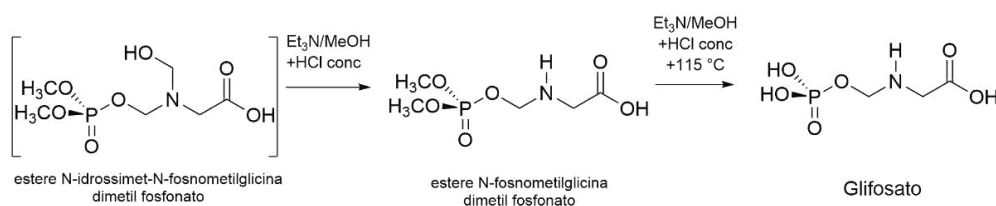


Figura 6. Terzo step del processo Alkaloida con formazione del glifosato

Nel processo di produzione del glifosato, gli intermedi non vengono isolati, permettendo l'esecuzione delle reazioni in un unico contenitore, il che semplifica notevolmente il sistema di reazione. La soluzione finale, contenente glifosato, metanolo e altri componenti, viene successivamente trattata per isolare il glifosato o per ottenere una soluzione adatta come prodotto finale. Tra i principali vantaggi di questo processo vi sono la stabilità del pH, che rimane neutro e la possibilità di operare a temperature più basse. Questi benefici sono il risultato dell'uso di un solvente organico al posto di una soluzione acquosa e della scelta di una base specifica, come l'Et₃N (triethylamine). Queste condizioni ottimali contribuiscono a creare un ambiente di reazione favorevole, migliorando così la resa complessiva del glifosato⁷.

2.2.2. Percorso IDA

Un'altra importante sintesi utilizzata per la produzione commerciale di glifosato si basa sull'acido imminodiacetico (IDA). In questi processi, il sale cloridrato dell'IDA (IDA·HCl) partecipa a una reazione di fosfonometilazione, attraverso una versione modificata della reazione di Mannich, per formare l'acido N-fosfonometiliminodiacetico (PMIDA)⁸(Figura 7).

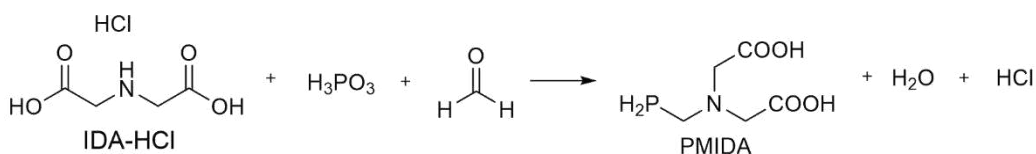


Figura 7. Primo step del processo IDA con formazione dell'acido N-fosfonometiliminodiacetico

L'ultimo step prevede l'ossidazione del gruppo carbossilico del PMIDA che possono essere effettuati utilizzando varie metodologie quali: l'aggiunta dell'acido solforico concentrato; aggiunta di perossido di idrogeno; per elettrolisi⁸(Figura 8).

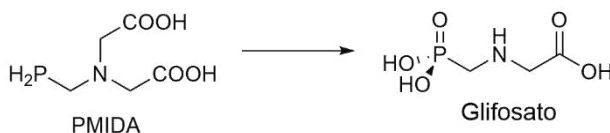


Figura 8. Ultimo step del percorso IDA

2.3. Azione del glifosato

Il glifosato è un erbicida unico nel suo genere, in quanto inibisce specificatamente l'enzima 5-enolpiruvil-3-fosfato sintasi (EPSPS)⁹, un enzima fondamentale della via dello shikimato¹⁰, presente nelle piante, nei funghi e nei batteri, ma assente negli animali. EPSPS, catalizza il trasferimento della porzione enolpiruvilica del fosfoenolpiruvato (PEP) allo shikimato-3-fosfato (S3P), un passaggio cruciale per la produzione di amminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano) (Figura 9, Tabella 1). Il meccanismo di inibizione è particolarmente efficace poiché il sito di legame del glifosato si sovrappone strettamente al sito di legame del PEP, impedendo così la sintesi degli amminoacidi aromatici e bloccando conseguentemente vari metabolismi primari e secondari nelle piante. La carenza di EPSPS porta a una deficienza di amminoacidi aromatici compromettendo il metabolismo delle piante causandone la morte.

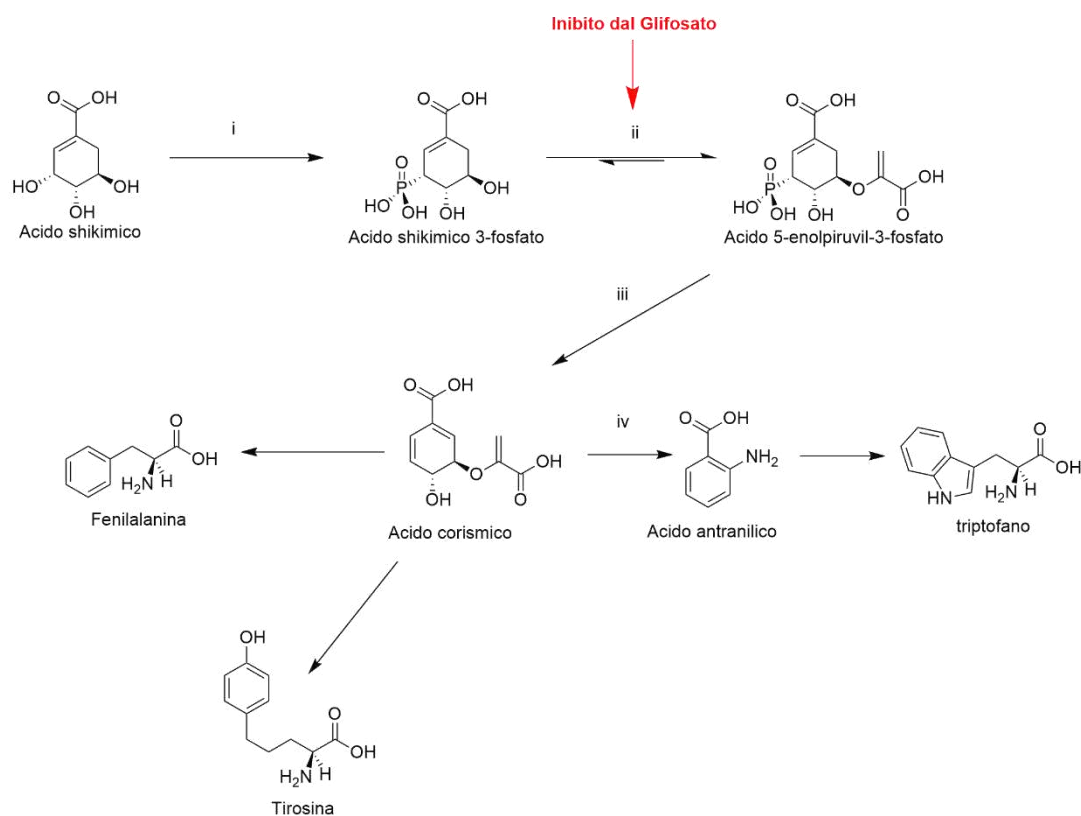


Figura 9. Inibizione del Pathway metabolico dello shikimato. Intermedi deli del patway

Step	Enzima	Classificazione	Cofattore
i	Shikimato kinasi	EC 2.7.1.71	ATP
ii	EPSPS sintasi	EC 2.5.1.19	PEP
iii	Corismato sintasi	EC 4.6.1.4	FMN NADPH
iv	Antranilato sintasi	EC 4.1.3.27	Mg ²⁺

Tabella 1..Enzimi del pathway dello shikimato

2.4. Tossicologia del glifosato

Il glifosato è presente nei prodotti erbicidi commerciali, principalmente sotto forma di sale, è combinato con controioni di isopropilammina, potassio e ammonio, e include tensioattivi per veicolare il principio attivo al sito di azione presente nella pianta. Sebbene, generalmente considerato a bassa tossicità per gli organismi terrestri, alcune formulazioni con specifici tensioattivi, presentano una maggiore tossicità per organismi terrestri e acquatici (uccelli, mammiferi, api e microrganismi)¹¹. Le diverse formulazioni del glifosato, presentano differenti profili tossicologici, pertanto è essenziale una chiara identificazione del prodotto e della forma di glifosato testata per un'interpretazione accurata dei risultati tossicologici.

Ad esempio nei pesci, la forma salina del glifosato è meno tossica rispetto alla sua forma presente a pH 7.5, che a sua volta è meno tossica rispetto alla formulazione originale, con valori di LC₅₀ rispettivamente di 5,4 mg L⁻¹ per i pesci¹¹ e 0,88 mg L⁻¹ per gli anfibi¹². Questo indica che, utilizzando i parametri di tossicità dei pesci, si è più conservativi nei confronti degli anfibi.

Sebbene alcune ricerche abbiano esaminato gli effetti delle esposizioni prolungate al glifosato in laboratorio, queste condizioni non rispecchiano l'esposizione reale nell'ambiente. Pertanto, i risultati di tali studi dovrebbero essere considerati come base per future indagini in contesti più rappresentativi.

2.5. Normativa sul Glifosato

Il glifosato, data la sua vasta diffusione, è stato oggetto di numerosi studi e valutazioni da parte degli enti internazionali quali IARC (Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro), FAO (L'organizzazione delle nazioni unite per l'alimentazione e l'agricoltura) e OMS (Organizzazione mondiale della sanità) ed enti europei quali EFSA (autorità europea per la sicurezza alimentare) ed ECHA (agenzia europea per le sostanze Chimiche).

Le normative forniscono i valori limiti di legge per il glifosato, che tutelano la salute ambientale e umana, sotto forma di Standard di qualità ambientale (SQA). Per SQA (secondo la direttiva la Direttiva Quadro Acque DQA-[Direttiva 2000/60/CE](#)¹³) si intende *”la concentrazione di un particolare inquinante o gruppo di inquinanti nelle acque , nei sedimenti e nel biota, che non deve essere superata, per tutelare la salute umana e ambientale”*. Nelle normative le concentrazioni sono espresse come valore medio annuo e come concentrazione massima ammissibile e sono differenziate per tipologia di acqua.

2.5.1. Acque superficiali e sotterranee.

Il limite delle concentrazioni di glifosato nelle acque superficiali è di 0.1 µg/L (inclusi i suoi metaboliti), con una restrizione più severa per risorse destinate ad uso umano, di 0.5 µg/L¹⁴.

La direttiva 2006/118/CE (recepita in Italia con il D.Lgs. 16 marzo 2009, n.30) discute le norme ambientali inerente alla protezione delle acque sotterranee, in particolare i valori limite per il glifosato e sui relativi prodotti di degradazione risulta essere lo stesso fornito per le acque superficiali, ovvero di 0.1 µg/L.

2.5.2. Alimenti

Il Regolamento (UE) n.293/2013 della Commissione (modifica degli allegati II e III del regolamento (CE)n.396/2005) stabilisce i livelli massimi residui (LMR) per diverse

sostanze attive, tra cui il glifosato, su una vasta gamma di prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale, con lo scopo di proteggere la sicurezza alimentare e proteggere la salute dei consumatori (Tabella 2)¹⁵.

Categoria alimentare	Concentrazione (mg/Kg)
Frutta fresca o congelata	0.01-0.5
Ortaggi freschi o congelati	0.01-5
Legumi da granella	0.01-2
Semi e frutti oleaginosi	0.01-0.05
Cereali	0.01-1
Prodotti di origine animale	0.01-0.5

Tabella 2. Range di Concentrazioni di Glifosato per categoria di alimento, estrapolato dal Regolamento (UE) n 293/2013

L'autorità Europea per la sicurezza Alimentare (EFSA) ha valutato le richieste di modifica degli LMR, concludendo che i nuovi limiti proposti risultano essere sicuri per i consumatori. Inoltre, EFSA ha condotto valutazioni complete dei rischi associati all'esposizione a lungo termine dovuto al consumo regolare di questi alimenti, l'esposizione a lungo termine, l'esposizione a breve termine derivate da un consumo occasionale di questi alimenti, e ha concluso che non comportano un rischio di superamento della dose giornaliera ammissibile (DGA) o della dose acuta di riferimento (DAR)¹⁶.

3. Metodi di adsorbimento del glifosato

In letteratura sono presenti numerosi studi sui metodi di rimozione del glifosato dai sistemi idrici, tra cui fotocatalisi¹⁷, foto-elettrocatalisi¹⁸ e adsorbimento^{19,20}. Tra questi, l'adsorbimento emerge come il metodo più indicato per l'estrazione del glifosato da matrici acquose, grazie alla formazione di legami deboli (elettrostatici, legami a idrogeno, interazioni π - π e forze di Van der Waals²¹), che, seppur poco direzionali, sono reversibili. L'impiego di materiali adsorbenti per il glifosato può presentare alcune criticità, tra cui la variabilità delle prestazioni di alcuni materiali inorganici, le difficoltà nella separazione solido-liquido per gli adsorbenti in polvere come i carboni, e la capacità di rigenerazione degli adsorbenti²². I materiali adsorbenti possono essere classificati in tre principali categorie: carbone attivo (AC), argille, e materiali nanostrutturati²⁰.

3.1. Carbone attivo e biochar per l'adsorbimento del glifosato

Il carbone attivo è largamente impiegato per la depurazione delle acque, grazie alla sua struttura microporosa, alla grande area superficiale e alla sua elevata efficienza nel rimuovere inquinanti.

Recentemente è emersa la possibilità di produrre carbone attivo a partire da rifiuti, una soluzione che permette di abbattere i costi e rendere più accessibile utilizzo dei carboni attivi per l'adsorbimento di contaminanti come il glifosato²³.

I residui agroindustriali, tuttavia, non presentano un'elevata capacità di adsorbimento dovuta alle loro caratteristiche strutturali quali, la bassa area superficiale e la presenza di pori di piccole dimensioni. Quando il biochar passa attraverso un processo di attivazione prende il nome di carbone attivo. Il processo di attivazione può avvenire per via fisica o chimica. L'attivazione fisica prevede l'utilizzo di gas ossidanti, come il vapore acqueo o l'anidride carbonica a temperature superiori ai 800 °C²⁴. Nel metodo chimico, il biochar viene impregnato con sostanze quali, ZnCl₂, H₂SO₄ o KOH, che permettono di attivarlo a temperature più basse, riducendo così i costi

energetici e migliorando la resa del carbonio. Inoltre, l'attivazione chimica tende a produrre materiali con pori più ampi, rendendo questi materiali particolarmente adatti all'adsorbimento di molecole grandi^{25,26}.

In letteratura sono stati testati diversi biochar derivati da diverse tipologie di rifiuti, come ad esempio è stato osservato che il biochar attivato, per pirolisi a 700 °C derivato da lolla di riso fornisce una capacità di adsorbimento del glifosato pari a 123 mg/g a pH 4, suggerendo meccanismi di adsorbimento fisici e chimici. Inoltre, è stato dimostrato che biochar da biomassa legnosa di *Glicidia seppium*, utilizzata per produrre energia elettrica può adsorbire fino a 44 mg/g di glifosato con una cinetica di adsorbimento inferiore a 1 h²⁷.

3.2. Argille per l'adsorbimento del glifosato

Le argille risultano essere materiali naturali con interessanti proprietà adsorbenti, che le rendono particolarmente utili in una vasta gamma di applicazioni ambientali, tra cui la depurazione delle acque. La capacità delle argille di effettuare scambi ionici, unita alla possibilità di effettuare modifiche strutturali, fa sì che questi materiali siano degli ottimi candidati come materiali per l'adsorbimento di molti pesticidi. È stato dimostrato come le argille sintetiche e naturali siano capaci di rimuovere il glifosato ma con livelli di efficienza variabile a seconda del tipo di argilla e delle modifiche chimiche a cui è stata sottoposta²⁸. Né sono un esempio le argille sintetizzate come LDH (Layered double hydroxides), noti come argille anioniche simile all'idrotalcite²⁹, che attraverso i doppi idrossidi stratificati con MgAl presentano una capacità di adsorbimento del glifosato pari a 185,5 mg/g, dovuta ad una elevata superficie specifica e ad una elevata densità di carica.

Oltre al LDH in letteratura sono stati testati altre argille naturali e sintetiche e fibrose quali ,montmorilloniti³⁰, zeoliti³¹, bentoniti modificate³², sepiolite³³ e paligorskite³⁴.

3.3. Materiali nanostrutturati usati per la rimozione del glifosato

Negli ultimi anni, la nanoscienza e la nanotecnologia hanno assunto un ruolo di primo piano a livello globale. Grazie alla loro capacità di manipolare la materia su scala nanometrica, le nanotecnologie hanno ottenuto grande rilievo nel mondo scientifico, permettendo la produzione di nanomateriali sotto forma di metalli, polimeri e materiali compositi. Questi nanomateriali presentano proprietà estremamente specifiche, in grado di rispondere a numerose esigenze tecnologiche e industriali³⁵⁻³⁸. Tra le varie applicazioni dei nanomateriali, una delle più diffuse è quella relative alla rimozione dei contaminanti, sfruttando le caratteristiche uniche e la versatilità di questi materiali. Numerosi studi hanno evidenziato la loro efficacia nell'adsorbimento del glifosato da diverse fonti d'acqua. Tra i nanomateriali più utilizzati per questo scopo si annoverano i nanotubi di carbonio, i nanocompositi, e le nanoparticelle di ossidi metallici³⁹.

3.3.1. Nanotubi di carbonio

Negli ultimi anni, i nanotubi di carboni (CNT) hanno attirato notevole attenzione nel campo della depurazione delle acque, alle loro straordinarie proprietà chimico-fisiche. I CNT, in particolare i nanotubi di carbonio multi-parete (MWCNT), si distinguono per l'ampia superficie specifica, l'elevata stabilità chimica, la resistenza meccanica e la capacità di essere facilmente modificati. Queste caratteristiche li rendono eccellenti materiali adsorbenti per una vasta gamma di contaminanti, inclusi erbicidi come il glifosato⁴⁰. Inoltre, Una strategia particolarmente efficace per il migliorare ulteriormente le capacità adsorbenti dei CNT, risulta essere quella di funzionalizzare la parete interna con nanoparticelle metalliche di ferro (MNPs-Fe), in quanto le proprietà redox e la capacità di interagire con specifici gruppi funzionali, facilita il processo di adsorbimento dei contaminanti come il glifosato. Le proprietà adsorbenti del materiale sono state studiate attraverso analisi cinetiche e termodinamiche. Questi studi hanno evidenziato come MWCNT/MNPs-Fe siano in grado di rimuovere in modo efficace il glifosato da soluzioni acquose. La capacità massima di adsorbimento di questo materiale risulta essere di circa 43 mg/g, con una rimozione del glifosato

del 86 % in tempo di contatto di 120 min. L'analisi dei dati cinetici rivela che l'adsorbimento segue un modello di pseudo primo ordine, suggerendo che il meccanismo dominante sia di natura chimica, con interazioni deboli tra il glifosato e siti attivi presenti sulla superficie dei nanotubi funzionalizzati⁴⁰.

Dal punto di vista termodinamico, l'adsorbimento del glifosato sui MWCNT/MNPS-Fe è risultato termodinamicamente favorevole, con un incremento di efficienza a temperature più basse. Questi risultati indicano che il processo di adsorbimento non solo è efficace, ma può essere ottimizzato ulteriormente per ambienti a bassa temperatura, come quelli tipici dei sistemi di trattamento delle acque reflue⁴⁰.

Un altro aspetto interessante delle MWCNT/MNPs-Fe è la sua rigenerabilità, ovvero un fattore cruciale per le applicazioni pratiche nel trattamento delle acque, in quanto consente un utilizzo ripetuto del materiale, riducendo i costi operativi e l'impatto ambientale⁴⁰.

3.3.2. Nanocompositi

I nano compositi rappresentano una classe di materiali innovativi, formati dall'incorporazione di particelle di dimensioni nanometrica all'interno di una matrice, che può essere organica, inorganica, polimerica. La combinazione unica di proprietà derivati sia dalla struttura nanometrica delle particelle che dalle caratteristiche della matrice giustificano le ottime prestazioni rispetto ai loro equivalenti tradizionali. In particolare, i nanocompositi presentano un'elevata superficie specifica e un'eccellente capacità di scambio ionico che li rende ideali per la rimozione del glifosato. Ne sono un esempio i materiali nanocompositi magnetici a base di nanoparticelle di grafene, chitosano e CoFe_2O_4 che hanno presentato una capacità di adsorbimento del glifosato tra il 48% e il 99%, evidenziando l'efficacia del materiale nella rimozione del glifosato dall'acqua⁴¹. Allo stesso modo sono stati ideati nanocompositi di grafene- MnFe_2O_4 supportato su carbone attivo vegetale (GO- $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{VAC}$). In questo caso, il grafene è stato sintetizzato utilizzando il metodo di Hummers modificato (sintesi per la produzione di ossidi di grafene), seguito dalla funzionalizzazione con nanoparticelle di MnFe_2O_4 e dall'assemblaggio sul carbone attivo. Questo materiale ha dimostrato una capacità massima di adsorbimento del

glifosato di 6.778 mg/g, mostrando un'efficacia straordinaria nel trattamento delle acque contaminate⁴².

3.3.3. Nanoparticelle metalliche

Secondo la IUPAC si definiscono nanoparticelle tutti i materiali di piccole dimensioni che rientrano nel range di $1 \cdot 10^{-9}$ m e $1 \cdot 10^{-7}$ m⁴³, le cui proprietà chimico-fisiche (elevata area superficiale, proprietà ottiche, proprietà magnetiche e meccaniche) dipendono fortemente dalle dimensioni delle singole particelle.

- **Proprietà ottiche delle nanoparticelle**

Gran parte delle nanoparticelle metalliche rispetto ai materiali sfusi presentano una elevata banda di estinzione nel UV-VIS. Tale banda di eccitazione prende il nome di *Risonanza plasmonica di superficie localizzata* (LSPR) e si genera quando la frequenza d'onda del fotone incidente entra in risonanza con la banda di eccitazione collettiva degli elettroni di conduzione (Figura 10).

La lunghezza d'onda del picco dello spettro LSPR dipende dalle dimensioni delle nanoparticelle, forma, spaziatura, dalle proprietà dielettriche, e dalle proprietà dell'ambiente in cui si trovano le nanoparticelle, ovvero solvente, adsorbato e substrato⁴⁴.

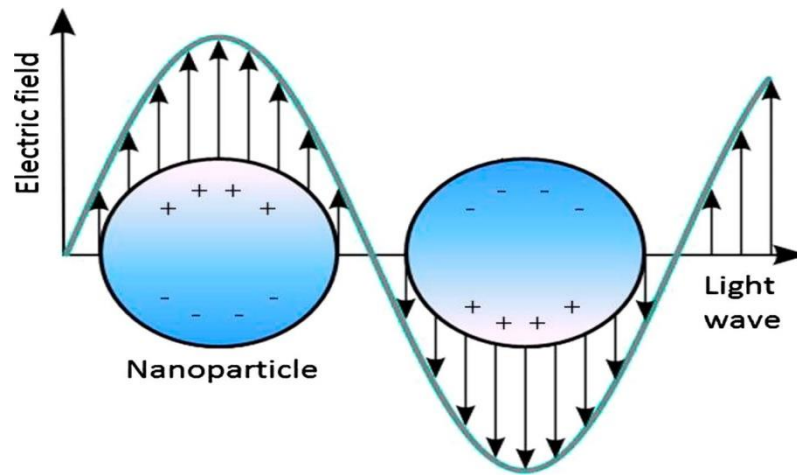


Figura 10. Rappresentazione del LSPR (risonanza plasmonica di superficie localizzata) sulla superficie delle nanoparticelle.

- **Proprietà magnetiche**

Le proprietà magnetiche delle nanoparticelle dipendono molto dalle: dimensioni, forma, composizione e struttura core-shell, ognuno dei quali può essere modificato per ottimizzarne le prestazioni.

Quando le nanoparticelle si ritrovano con dimensioni inferiori ai 20 nm, si osserva una variazione dalle proprietà ferromagnetiche alle proprietà superparamagnetiche, caratterizzate da un rapido allineamento dei momenti magnetici in presenza di un campo esterno. Aumentando le dimensioni, si ha un incremento della magnetizzazione di saturazione, ovvero il massimo valore assoluto che la magnetizzazione che un materiale ferromagnetico può raggiungere, quando quest'ultimo sia sottoposto ad un campo magnetico esterno, fino al raggiungimento di un valore simile a quello dei materiali sfusi⁴⁵.

- **Proprietà meccaniche**

Le proprietà meccaniche delle nanoparticelle risultano uniche ed applicabili in vari campi. Queste proprietà includono durezza, modulo elastico, adesione, attrito e comportamento sotto carico che differiscono dai materiali sfusi, date le ridotte dimensioni e l'elevata superficie specifica.

La durezza e il modulo elastico variano in funzione delle dimensioni del materiale, in generale minori sono le dimensioni delle nanoparticelle maggiore sarà il modulo elastico e la durezza. Questa tendenza è attribuita alla presenza delle dislocazioni, difetti atomici e tensioni di reticolo che ne aumentano le resistenze meccaniche rispetto ai materiali di bulk.

Un altro aspetto fondamentale delle proprietà meccaniche delle nanoparticelle riguarda l'adesione e l'attrito.

L'adesione tra nanoparticelle e le superfici è influenzata da varie forze, come le forze di van der Waals, forze elettrostatiche e le forze capillari. In letteratura sono presenti studi in cui sono stato misurato l'adesione di molteplici nanoparticelle e osservato che le forze adesive sono proporzionali al raggio delle particelle.

L'attrito è fortemente influenzato dalla forma delle nanoparticelle, in quanto particelle sferiche tendono a rotolare sulla superficie, riducendone attrito e usura, al contrario nanoparticelle con forma irregolare e con forte adesione alle superfici sono inclini a scivolare⁴⁶.

- **Proprietà termiche**

Le nanoparticelle metalliche sono ampiamente riconosciute per la loro elevata conduttività termica rispetto ai fluidi ai fluidi utilizzati tradizionalmente per il trasferimento di calore.

I nanofluidi vengono generalmente realizzati disperdendo particelle solide su scala nanometrica all'interno di liquidi, quali acqua, etilenglicole o oli. Inoltre, il trasferimento di calore avviene principalmente sulla superficie delle particelle, e pertanto importante l'utilizzo di particelle con ampia area superficiale così da migliorare l'efficienza di trasferimento termico e aumentare la stabilità della sospensione⁴⁷.

4. Metodi di biorisanamento del glifosato

In letterature vi sono presenti molteplici studi che studiano processi di degradazione del glifosato ma i migliori candidati risultano essere i microrganismi quali: batteri e microalghe che attraverso le proprie attività metaboliche riescono a degradare il glifosato in sostanze innocue per l'ambiente e per le specie animali. Per questo motivo l'utilizzo dei microrganismi risulta essere una metodologia sicura, a basso costo e per rimuovere lo xenobiotico dall'acqua e dal suolo. La degradazione del glifosato mediante microrganismi è giustificata dal fatto che questi ultimi utilizzano il pesticida come fonte di azoto, carbonio e fosforo. I limiti più grossi nell'utilizzare questa metodologia nel degradare il glifosato risiedono nel fatto che non si riesce a garantire una elevata prestazione della mineralizzazione del pesticida in quanto si ha la formazione di sottoprodotti quali AMPA e sarcosina. Inoltre, questi processi richiedono tempi prolungati di crescita e condizioni ottimali per ottenere la massima prestazione di degradazione. Per ovviare la problematica dovuta alla produzione dei sottoprodotti del glifosato è conveniente associare i metodi biologici ad un'altra metodologia così da incrementare l'efficienza di degradazione del glifosato e dei suoi derivati.

4.1. Degradazione batterica del glifosato

In letteratura sono stati studiati diversi tipologie di batteri capaci di metabolizzare il glifosato. In generale i batteri riescono a metabolizzare il glifosato attraverso due vie metaboliche. La prima via metabolica è associata all'attività dell'enzima glifosato ossidoreduttasi (GOX) che agisce scindendo la molecola di glifosato in due metaboliti, gliossilato e AMPA (acido amminometilfosfonico)⁴⁸. Il gliossilato entra nel ciclo dell'acido tricarbossilico e viene ossidato in anidride carbonica. L'AMPA può essere degradato per azione di due enzimi differenti:

- il primo risulta essere Carbonio-Fosforo liasi (CP liasi) che genera fosfato e metilammina. La metilammina a sua volta viene convertita in ammoniaca (fonte diretta di azoto) e formaldeide che entra nel ciclo del tetraidrofolato (THFA)⁴⁸.

- Il secondo enzima, ovvero l'enzima ammino transferasi, converte l'AMPA in fosfonoformaldeide, che a sua volta viene trasformata dall'enzima fosfanatasi in fosfato e formaldeide che entra nel ciclo del tetraidofolato (THFA)⁴⁹.

La seconda via riportata per la biodegradazione del glifosato coinvolge l'enzima C-P liasi che, attraverso la sua attività idrolitica, genera fosfato e sarcosina; in una fase successiva attraverso l'attività dell'enzima sarcosina ossidasi, la sarcosina viene trasformata nell'amminoacido glicina, che viene utilizzato direttamente per il metabolismo e la biosintesi microbica, e formaldeide (che viene inserita nel ciclo THFA. (Figura 11)

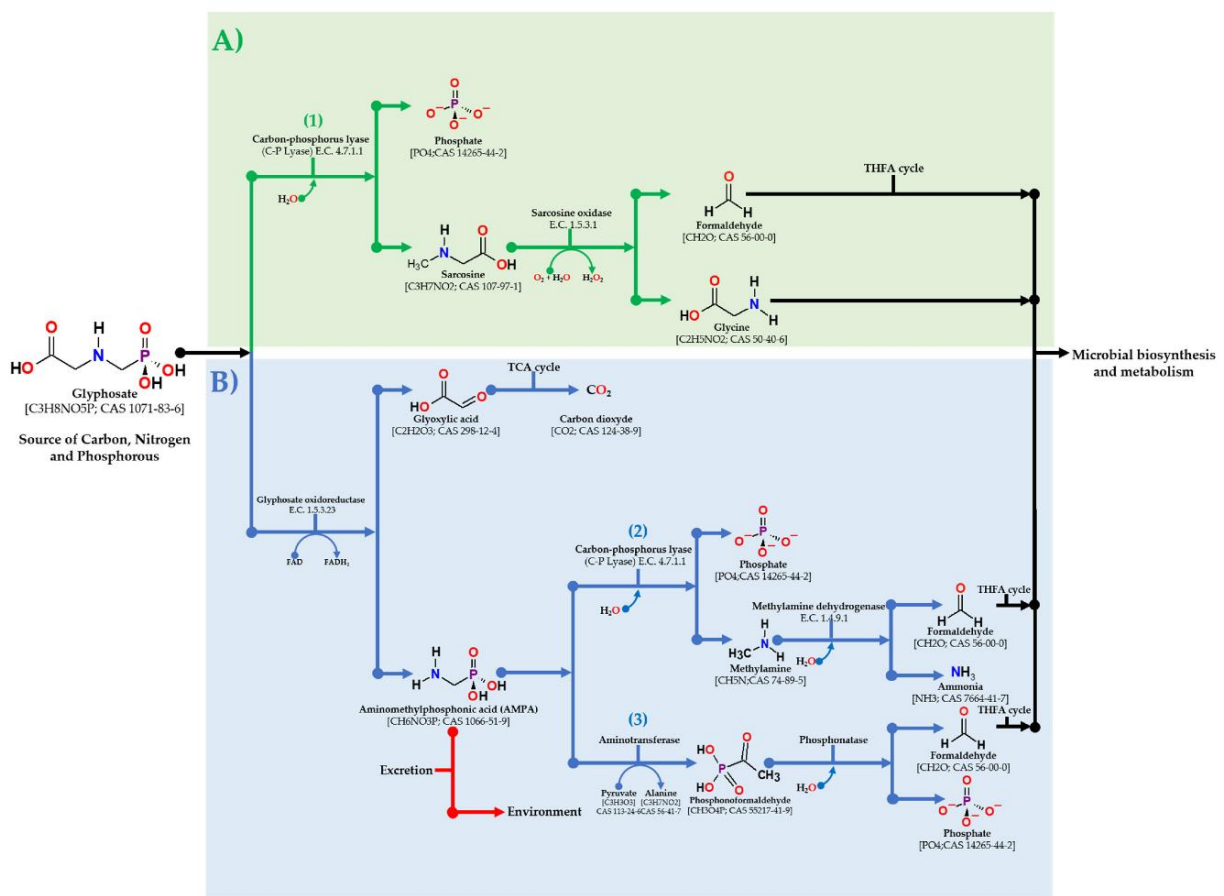


Figura 11. Pathway di degradazione del glifosato da parte dei batteri.

4.2. Biorisanamento del glifosato mediante microalghe

Negli ultimi anni vi è stato un incremento dell'interesse delle microalghe e per le sue capacità di assorbire, adsorbire e degradare i pesticidi come il glifosato. La biodegradazione del glifosato da parte delle microalghe può essere generalizzata suddividendola in tre fasi: nella prima fase il contaminante viene reso più solubile, degradabile e meno tossica attraverso reazioni ossidazione, riduzione e idrossilazione promosse dal citocromo P450⁵⁰. A seguire si ha la coniugazione tra le specie che si sono formate nella fase precedente e glutazione mediata dall'enzima glutatione-S-transferasi, analogamente i coniugati possono reagire con glucosio e malonato attraverso i corrispondenti enzimi⁵⁰. L'ultimo step della biodegradazione prevede il trasporto dei prodotti ottenuti negli step precedenti all'interno di vacuoli, all'interno della quale verranno accumulati e degradati⁵⁰. (Figura 12)

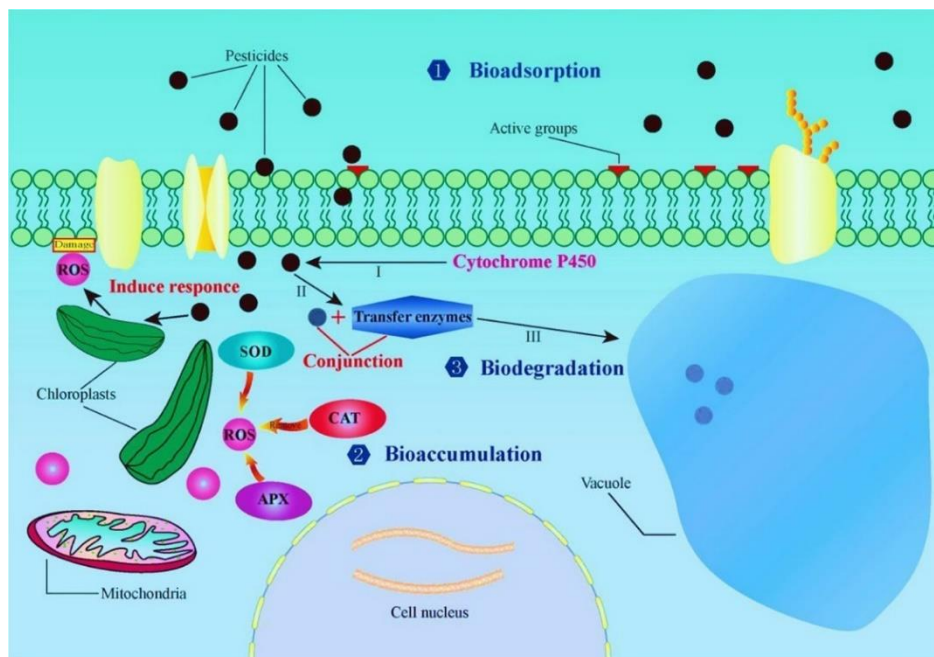


Figura 12. Illustrazione dimostrativa del processo di bioaccumulo e biodegradazione dei pesticidi da parte delle microalghe.

5. Scopo della tesi

La scelta dei materiali e dei metodi per l'adsorbimento e la degradazione del glifosato risulta essere determinante al fine di ricercare nuovi processi che siano capaci di ridurre l'impatto sui vari compartimenti ambientali e sulla salute animale, con tecniche che siano quanto più *ecofriendly* e poco costose.

Lo scopo della presente tesi è quello di effettuare degli studi preliminari e di verifica che ponga le basi per lo studio di un sistema che sia capace di effettuare, in continuo, sia l'adsorbimento, che la degradazione del glifosato, andando a combinare le capacità adsorbenti delle nanoparticelle metalliche core-shell MNP@PDA@Ti⁴⁺ con le ottime proprietà degradative della combinazione tra il consorzio batterico (*Pseudomonas stutzeri* LMG 1228; *Comamonas odontotermitis* sp. Dant 3-8 LMG 23579, *Sinomonas atrocynea* LMG 3814) e la microalga *Chlorella protothecoides*, al fine di ridurre la concentrazione di glifosato al di sotto del valore limite fornito dalla normativa, *D.Lgs 152/2006*¹⁴, ovvero di 0.1 µg/L (figura 13).

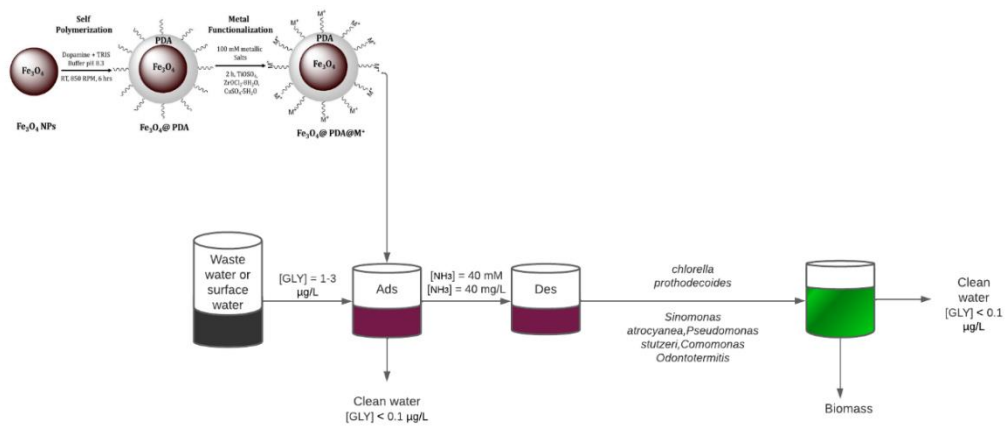


Figura 13. schema ideale del sistema in continuo per l'adsorbimento e la degradazione del glifosato.

Nella prima parte del progetto si è cercato di caratterizzare le MNP@PDA@Ti⁴⁺ e ricavare quante più informazioni possibili circa la struttura delle nanoparticelle e le sue capacità adsorbenti, mediante studi TEM, STEM, EDX, spettrometria di massa IC-Orbitrap e ICP-MS.

Nella seconda parte si è cercato di monitorare la crescita delle microalghe e i consorzi batterici in presenza ed in assenza del glifosato.

6. Materiali e metodi

6.1. Reagenti e standard

L'acqua ultrapura utilizzata per tutte le preparazioni è stata ottenuta mediante MilliQ Plus (Millipore, Bedford, MA, USA; resistività 18.2MΩ·cm) e Purelab® Chorus (ELGA, High Wycombe, UK; resistività 18.2MΩ·cm). I reagenti e i materiali utilizzati vengono indicati nelle Tabelle 3-4-5.

Marca	Nome reagente	Formula condensata	Cas Number
MERCK (Sigma – Aldrich Co) (St. Louis, USA)	Cloruro di ferro (III) esaidrato	FeCl ₃ ·6H ₂ O, 97%	10025-77-1
	Solfato di ferro (II) eptaidrato	FeSO ₄ ·7H ₂ O, ≥99%	7782-63-0
	Trizma® cloridrato	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ ·HCl, ≥99%	1185-53-1
	Dopamina cloridrato	(HO) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂ ·HCl, ≥98%	62-31-7
	Ossisolfato di titanio (IV)	TiOSO ₄ ≥29%	13825-74-6
	Idrossido di ammonio	NH ₄ OH, 28-30%	1336-21-6
	Acido cloridrico	HCl, 37%	7647-01-0
	Acido Nitrico	HNO ₃ , 69%	7697-37-2
	Acido Solforico	H ₂ SO ₄ , 95.0-98.0%	7664-93-9
	Acido Formico	HCOOH ≥98%	64-18-6
	Acetonitrile	CH ₃ CN ≥99.9%	75-05-8
	Glifosato standard	(HO) ₂ P(O)CH ₂ NHCH ₂ CO ₂ H	1071-83-6
	Cloruro di sodio	NaCl ≥99.0%	7647-14-5
	Cloruro di calci bi idrato	CaCl ₂ ·2H ₂ O ≥99%	10035-04-8
	Solfato di magnesio eptaidrato	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10034-99-8
	Cloruro di ammonio	NH ₄ Cl ≥99.5%	12125-02-9
	Acetato di sodio	CH ₃ COONa ≥99.0%	127-09-3
	Idrogeno fosfato di potassio	K ₂ HPO ₄ ≥98.0%	7758-11-4
	Estratto di carne	-	68990-09-0
	Dimetilformammide	HCON(CH ₃) ₂	68-12-2
Fenolo	C ₆ H ₆ O	108-95-2	

Suisse Partner (Switzerland)	Technology	antimonio potassio tartrato	$C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot xH_2O$	331753-56-1
		ammonio molibdato tetraidrato	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	12054-85-2
		acido ascorbico	$C_6H_8O_6$	50-81-7
		Soluzione standard di Ti (CCS5)	-	7784-27-2

Tabella 3. Reagenti chimici utilizzati.

Marca	Tipo di analisi	Codice
Hydrocheck Spectratest	NH ₃	6201
Spectroquat	COD	-

Tabella 4. Kit per analisi colorimetriche per le analisi indicate.

Marca	Nome specie	Codice
Culture Collection of Algae at Göttingen University	Chlorella protothecoides SAG33.80	6201
Belgian co-ordinated collections of micro-organisms	Pseudomonas stutzeri	LMG 1228
	Comamonas odontotermitis sp	LMG 23579
	Sinomonas atrocyanea	LMG 3814

Tabella 5. Microalghe e batteri utilizzati.

6.2. Sintesi delle nanoparticelle di Fe₃O₄(MNP)

Le nanoparticelle di ossido di ferro utilizzate nel presente progetto sono state ottenute attraverso un metodo di coprecipitazione in quanto permette di ottenere dei prodotti efficienti per l'adsorbimento del glifosato in tempi contenuti.

In particolare, 5,2 g di FeCl₃·6H₂O e 2,8 g di FeSO₄·7H₂O, in un rapporto stechiometrico Fe (III)/Fe(II) di 2:1, sono stati disciolti in 25 mL di una soluzione di HCl a una

concentrazione di $0,41 \text{ mol L}^{-1}$. La soluzione così ottenuta, contenente ioni Fe (III) e Fe(II), è stata aggiunta goccia a goccia in un becher contenente 250 mL di una soluzione di NaOH $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, mantenuta a una temperatura di $80\text{-}85 \text{ }^\circ\text{C}$, sotto agitazione vigorosa e in atmosfera inerte di N_2 .

Dopo il completamento dell'aggiunta della soluzione Fe (III)/Fe (II), la miscela di reazione è stata ulteriormente agitata per 30 minuti, mantenendo la temperatura costante a $83 \text{ }^\circ\text{C}$. Le nanoparticelle magnetiche ottenute, visibili come precipitato nero, sono state successivamente separate dal liquido mediante l'uso di un magnete al neodimio. Le MNP sono state lavate tre volte con acqua ultrapura per rimuovere eventuali residui di reagenti, fino a raggiungimento del pH neutro.

Infine, il Prodotto è stato essiccato overnight sottovuoto, pesando 2.1283 g di prodotto finito.

6.3. Sintesi delle nanoparticelle MNP@PDA@Ti⁴⁺

Le nanoparticelle magnetiche sintetizzate (MNP) sono state rivestite con polidopamina (pDA) e successivamente funzionalizzate con Ti (IV). Per il rivestimento, le MNP nude sono state disperse in una soluzione di dopamina 15 mmol L^{-1} , preparata in un tampone Tris-HCl 100 mM a pH 8,3 (100 mL), utilizzando ultrasuoni per 1 minuto. La polimerizzazione della dopamina è stata effettuata mediante agitazione magnetica continua, per 6 ore a temperatura ambiente.

Dopo il completamento della polimerizzazione, le MNP rivestite (MNP@pDA) sono state lavate sei volte con 20 mL di una miscela acetonitrile- H_2O [50:50 (v/v)] per eliminare la dopamina non reagita. Successivamente, le particelle MNP@pDA sono state risciacquate con 20 mL di acetonitrile e asciugate sottovuoto overnight.

Per la funzionalizzazione con ioni metallici, 20 mg di MNP@pDA vengono sospese con 20 mL di una soluzione acquosa 100 mM di TiOSO_4 . Le miscele sono state agitate per 2 ore a temperatura ambiente e successivamente lavate più volte con una soluzione di acido formico allo 0,1% (v/v). I campioni finali, funzionalizzati con il metallo (MNP@pDA@Ti⁴⁺), vengono conservati in 200 μL di acido formico allo 0,1% a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fino al momento dell'utilizzo.

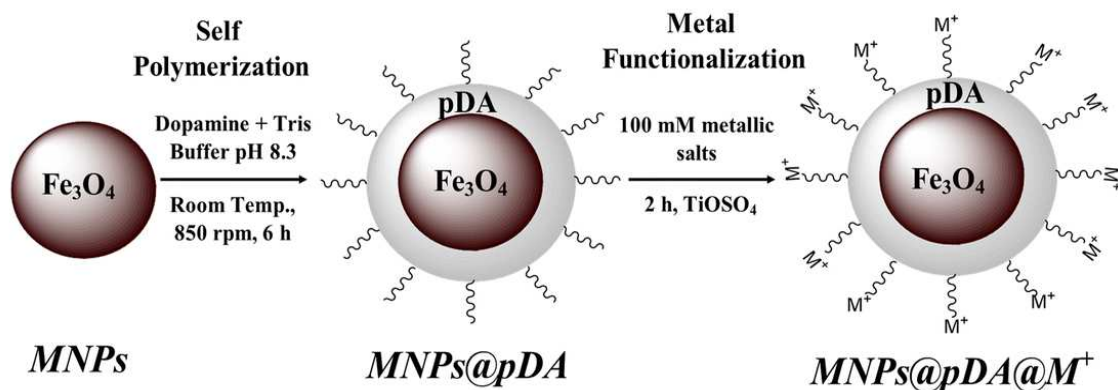


Figura 14. Schema di sintesi delle $MNP@pDA@Ti^{++}$

6.4. Caratterizzazione delle MNP e delle $MNP@pDA$

Le nanoparticelle MNP e $MNP@pDA$ sono state caratterizzate attraverso gli scatti, TEM, SEM, STEM e EDX mediante JEOL JEM-F200. Le immagini ottenute sono state elaborate utilizzando il software dedicato, ImageJ 1.50i, ottenendo una distribuzione dimensionale calcolata su 350 particelle, espressa in diametro medio $MNP \pm$ deviazione standard, di $10.1 \text{ nm} \pm 2.8 \text{ nm}$ e uno spessore di polidopamina calcolata su 350 punti (Figura 15, a), espressa in spessore medio $MNP@pDA \pm$ deviazione standard, di $3.7 \text{ nm} \pm 1.8 \text{ nm}$ (Figura 15,b).

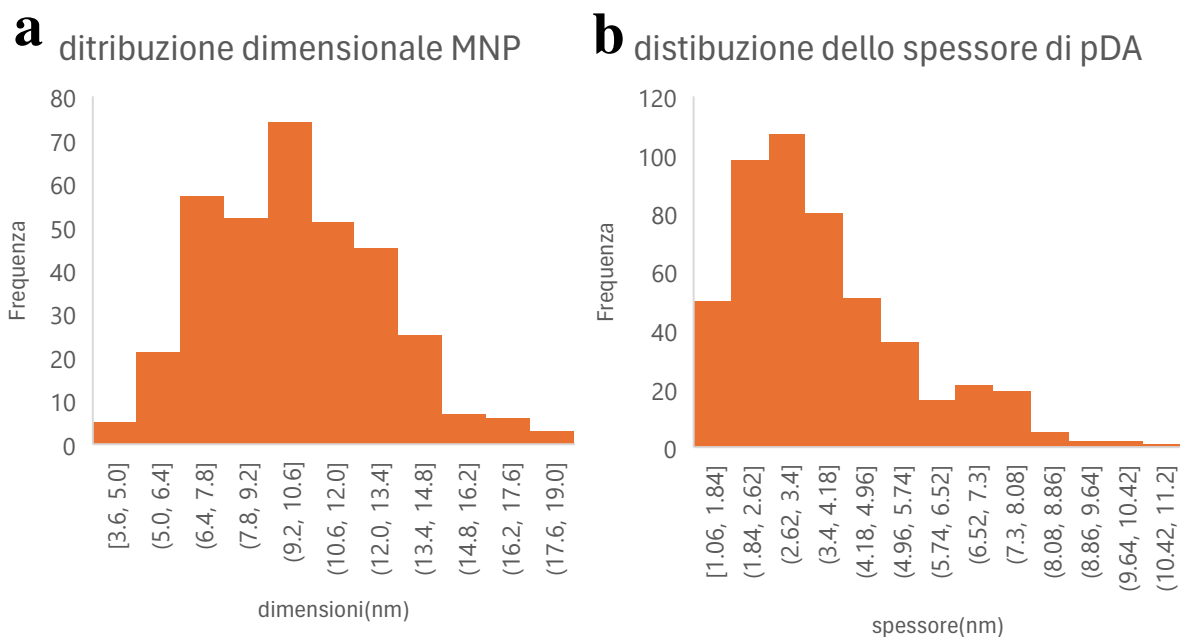


Figura 15.a) Distribuzione dimensionale delle nanoparticelle MNP. b) Distribuzione dello spessore di polidopamina di MNP@pDA.

6.5. Setup sperimentale per l'adsorbimento del glifosato

Per valutare l'efficacia delle MNP@pDA@Ti⁴⁺ nell'adsorbimento del glifosato, sono stati condotti test in duplicato a diverse concentrazioni di GLY: 1, 5, 10, 100, 500, 1000, 2000, 5000 e 10000 $\mu\text{g/L}$. Sono stati preparati tubi Falcon da 15 mL contenenti 10 mL di soluzione standard di glifosato alle concentrazioni indicate. Dopo l'aggiunta di 1 mg di nanoparticelle, i campioni sono stati mescolati con un vortex per 30 secondi e lasciati incubare per 30 minuti. Al termine dell'incubazione, un magnete al neodimio è stato utilizzato per far sedimentare le nanoparticelle sul fondo. Successivamente, al surnatante è stata prelevata un'aliquota di 1 mL, centrifugata a 13000 RPM per 5 minuti, e trasferita in vial da 1,5 mL per le analisi IC-MS(Figura 16).

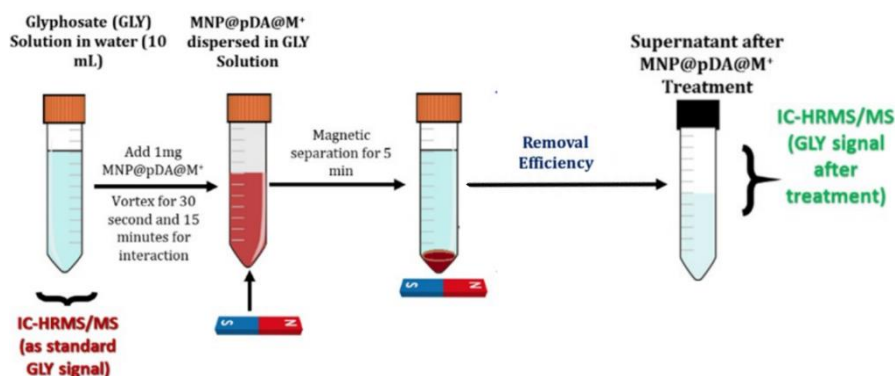


Figura 16. Rappresentazione schematica della procedura adottata per l'adsorbimento del glifosato con MNP@pDA

6.6. Cromatografia ionica

La cromatografia ionica è una tecnica analitica impiegata per separare specie ioniche in soluzioni acquose, basandosi su proprietà chimiche dell'analita come carica, dimensioni e affinità con la fase stazionaria all'interno della colonna. Queste caratteristiche rendono la tecnica particolarmente adatta all'analisi del glifosato, una molecola polare costituita da gruppi fosfonici e amminici. Grazie alla sua struttura, il glifosato interagisce efficacemente con il materiale presente all'interno della colonna scelta, permettendo una separazione precisa e una quantificazione accurata del composto.

6.7. Spettrometria di massa ad alta risoluzione

Il principio fondamentale della spettrometria di massa consiste nella generazione di ioni a partire da composti organici e inorganici, che vengono poi analizzati in base al loro rapporto massa su carica (m/z) e alla loro abbondanza ionica. La ionizzazione si verifica all'interno di una sorgente ionica, che può operare a bassa pressione (come nella ionizzazione elettronica, EI) o a pressione atmosferica (ad esempio, la ionizzazione elettrospray, ESI). La prima tipologia è ideale per molecole di basso peso molecolare, poco polari, volatili e termicamente stabili; la seconda, invece, consente di analizzare molecole non volatili, sensibili al calore, con un ampio spettro di polarità.

La spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR-MS) permette la misura della massa con elevata risoluzione. L'alta risoluzione rappresenta la capacità strumentale di distinguere segnali di ioni con m/z molto simili. Il potere risolvete è definito come l'abilità di un analizzatore di massa di discriminare picchi adiacenti, ed è tanto maggiore quanto minore è il $\Delta m/z$ che può essere distinto. Questo potere risolvete può essere valutato sperimentalmente in base all'ampiezza del picco misurato a un'altezza specifica, la quale varia in funzione dello strumento utilizzato.

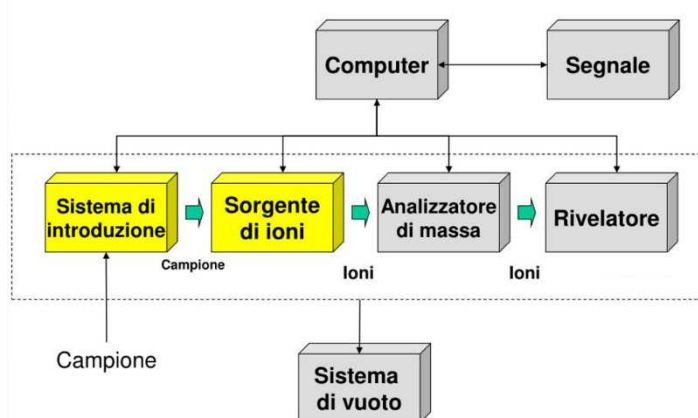


Figura 17. Rappresentazione schematica dello spettrometro di massa

6.7.1. Electrospray ionization (ESI)

I metodi più comunemente utilizzati per l'analisi della spettrometria di massa su matrici ambientali si fondano sulla tecnica di ionizzazione elettrospray (ESI). Questa è una metodologia di ionizzazione delicata che consente il passaggio degli ioni dalla fase liquida a quella gassosa. È particolarmente adatta per analizzare molecole di grandi dimensioni e ad alto peso molecolare, incluse quelle che possono formare ioni con carica multipla, composti non volatili, piccole molecole polari, complessi metallici ionici e analiti inorganici solubili. La nebulizzazione e la ionizzazione del campione avvengono in condizioni di pressione atmosferica, tramite l'applicazione di un potenziale elettrico di circa 4 kV, supportato dall'uso di un gas inerte. Gli ioni generati vengono quindi trasportati verso l'analizzatore di massa attraverso un sistema

di vuoto differenziale, fino a raggiungere pressioni nell'ordine di 10^{-6} - 10^{-8} bar (Figura 18).

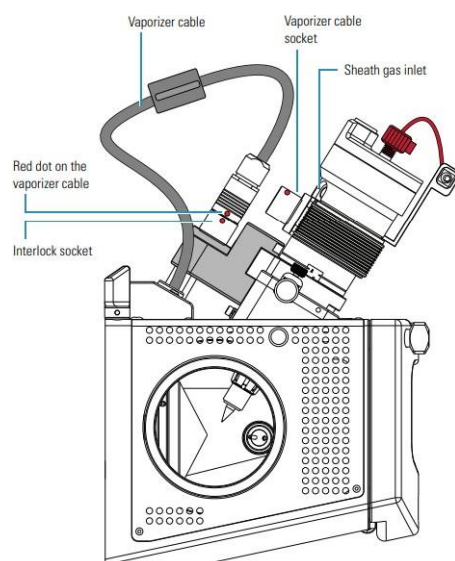


Figura 18. Rappresentazione della sorgente Thermo Scientific™ HESI II Probe

6.7.2. Q-Exactive quadrupole-Orbitrap

L'analizzatore Orbitrap rappresenta una trappola ionica in grado di immagazzinare ioni attraverso un campo elettrostatico, generato dall'applicazione di un potenziale tra un elettrodo centrale e dei contro elettrodi. Gli ioni introdotti oscillano e ruotano attorno all'elettrodo centrale a causa del campo elettrico, formando percorsi a spirale. Il movimento degli ioni attorno all'elettrodo centrale produce una corrente la cui frequenza dipende dal rapporto m/z degli ioni e la cui intensità è proporzionale al numero di ioni aventi lo stesso m/z . Questa corrente viene raccolta dai contro elettrodi esterni e convertita da segnale nel dominio delle frequenze a segnale nel dominio m/z tramite una trasformata di Fourier.

Nel caso dello strumento Q-Exactive Plus hybrid quadrupole-Orbitrap, l'analizzatore Orbitrap è preceduto da un analizzatore quadrupolare che funge da filtro di massa, permettendo la selezione e la successiva frammentazione della molecola target nella cella di collisione (Figura 19).

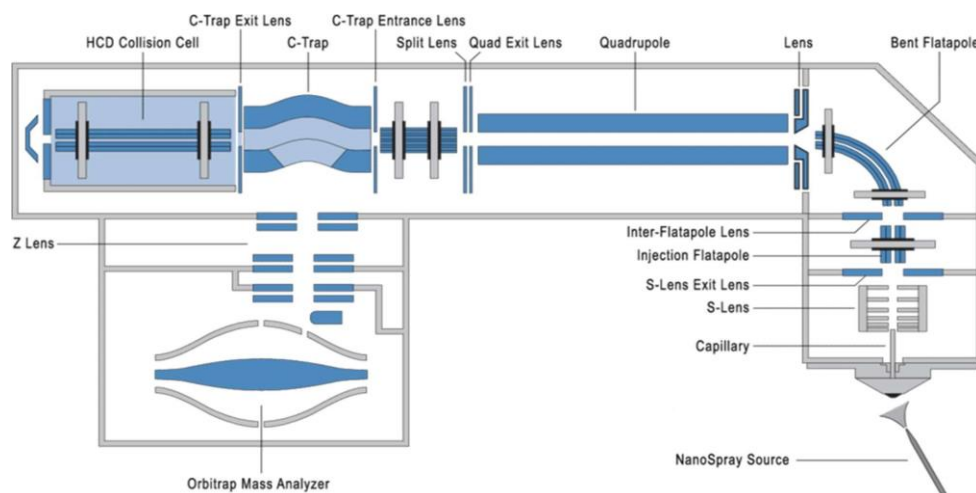


Figura 19. Rappresentazione del Thermo Scientific™ Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap™
mass

6.8. Metodo di quantificazione del glicosato con IC-HRMS/MS

Dopo aver trattato le soluzioni contaminate, gli MNP sono stati separati magneticamente dalla soluzione a intervalli di tempo specifici e il residuo è stato determinato mediante cromatografia ionica accoppiata a spettrometria di massa tandem ad alta risoluzione (IC-HRMS/MS) utilizzando lo strumento Dionex ICS-6000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo-Orbitrap™ Q Exactive™ (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). L'IC era dotato di un modulo di pompaggio (ICS6000 SP), di un generatore di eluente tramite cartuccia (ICS-6000 EG), di un termostato a colonna (ICS-6000 DC), di un soppressore di ioni elettrochimico (Dionex ADRS 600 2 mm) e di un rivelatore di conducibilità (ICS-6000 CD)^{1,2}. La separazione è stata eseguita dallo Ion-Pac AS 19-4 μm (2 x 250 mm) come colonna analitica e dallo Ion-Pac AS 19-4 μm (2 x 50 mm) come precolonna. Il volume di iniezione utilizzato è di 25 μl ad una velocità di flusso dell'eluente di 0,25 mL/min.

A seguire viene descritto il profilo del gradiente in fase mobile (t in min): t₀₋₆, 20 mM KOH; t₆₋₁₄, 20-55 mM KOH; t₁₄₋₂₁, 55 mM KOH; t₂₁₋₂₂, 55-20 mM KOH, t₂₂₋₃₀, 20 mM KOH. L'acetonitrile è stato aggiunto dopo la colonna a una velocità di flusso di 0,15 mL/min.

Le condizioni MS utilizzate sono: ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità negativa, tensione di spruzzo 2,8 kV, temperatura capillare 320°C, portata del gas della guaina 40 u.a., portata del gas ausiliario 20 u.a., temperatura del gas ausiliario 280°C, livello RF 55. I dati sono stati acquisiti in modalità di monitoraggio a reazione parallela, selezionando la specie [M-H] - per lo ione primario e l'energia di frammentazione riportati nella Tabella 4. L'integrazione del picco cromatografico di ciascun analita è stata eseguita selezionando Extracted Ion Chromatogram (EIC) del corrispondente frammento ionico (Tabella 4) con un'accuratezza di 5 ppm

Analita	Ione primario(m/z)	Ione di Frammentazione(m/z)	Energia di collisione (NCE)
Glifosato	110.0013	62.9926	50

Tabella 6. Parametri per l'identificazione dei picchi del glifosato

Per la valutazione dell'adsorbimento dell'analita, i dati sono stati espressi come diminuzione percentuale dei segnali di GLY nella soluzione acquosa, o come efficienza di rimozione (RE%) dove il segnale iniziale, indicato come segnale₀, rappresenta il valore senza adsorbimento, mentre il segnale di post-adsorbimento, registrato al termine dell'incubazione (t), è indicato come segnale.

$$RE\% = \frac{(segnale_0 - segnale_t)}{segnale_0} \cdot 100$$

6.9. Retta di calibrazione di glifosato

I punti di calibrazione ottenuti con glifosato standard, nel range 1-100 µg/L sono stati scelti sulla base delle concentrazioni basse attese presenti nei surnatanti, a seguito dei test di adsorbimento. Anche la precisione strumentale, calcolata come rapporto percentuale tra la deviazione standard e la media delle aree estratte (RSD%) su due misure ripetute per ciascuna concentrazione, è risultata in un range compreso tra l'1% e il 20%. Di seguito

viene riportato il grafico rappresentante la retta di calibrazione per il glifosato (Figura 20).

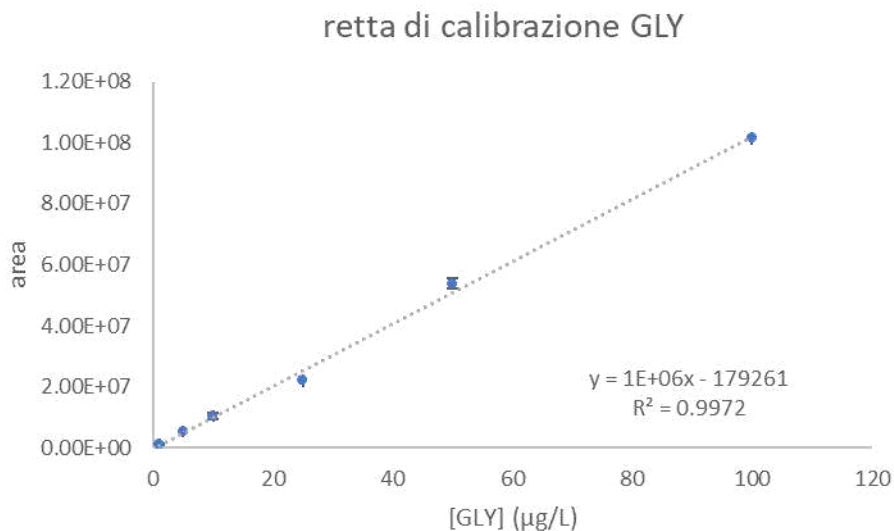


Figura 20. Retta di calibrazione del GLY ottenuta mediante calibrazione esterna in acqua milliQ

6.10. Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente

L'ICP-MS, o Spettrometria di Massa con Plasma Accoppiato Induttivamente, è una tecnica analitica impiegata per il rilevamento e la quantificazione di elementi chimici, in particolare metalli e alcuni non-metalli, in tracce. Il funzionamento di questa tecnica si basa sull'interazione di due tecnologie principali: il plasma accoppiato induttivamente (ICP) e la spettrometria di massa (MS). Il campione, generalmente in forma liquida, viene nebulizzato e introdotto in una torcia al plasma che opera a temperature estremamente elevate, intorno ai 6000-10000 K. A queste temperature, gli atomi e le molecole presenti nel campione vengono ionizzati, trasformandosi in ioni positivi. Successivamente, questi ioni vengono trasportati all'interno dello spettrometro di massa, dove sono separati in base al loro rapporto massa/carica (m/z), mediante un quadrupolo.

Una volta separati, gli ioni vengono rilevati da un rivelatore, che misura la quantità di ciascuna specie ionica presente, permettendo così di determinare la concentrazione

degli elementi nel campione. Questa tecnica offre diversi vantaggi, tra cui un'alta sensibilità, che permette di rilevare concentrazioni di elementi fino a parti per trilione (ppt), e un ampio intervallo dinamico che consente la quantificazione di elementi in un'ampia gamma di concentrazioni.

Nel presente elaborato la tecnica ICP-MS è stata utilizzata per quantificare la concentrazione di Ti^{4+} ottenuti dai diversi processi di digestione utilizzati.

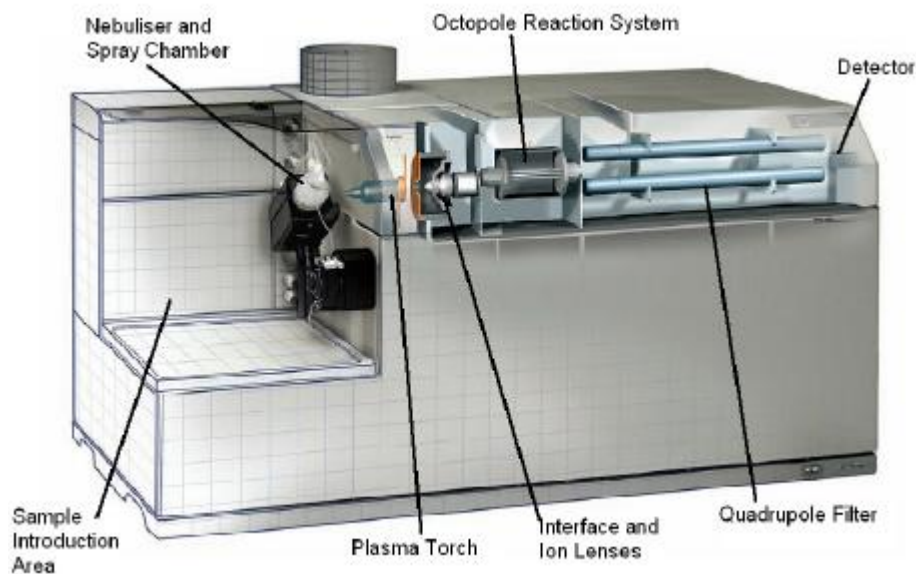


Figura 21. Rappresentazione schematica di un ICP-MS.

6.11. Retta di calibrazione del Titanio

I punti di calibrazione ottenuti utilizzando lo Standard CCS5, nel range 1-500 $\mu\text{g/L}$ sono stati scelti per permettere la quantificazione del Ti^{4+} presente nelle varie soluzioni di $MNP@pDA@Ti^{4+}$, digerite con vari rapporti di acidi concentrati quali, $HNO_3-H_2SO_4$ e HNO_3-HCl . Di seguito viene riportato il grafico rappresentante la retta di calibrazione per il Ti^{4+} .

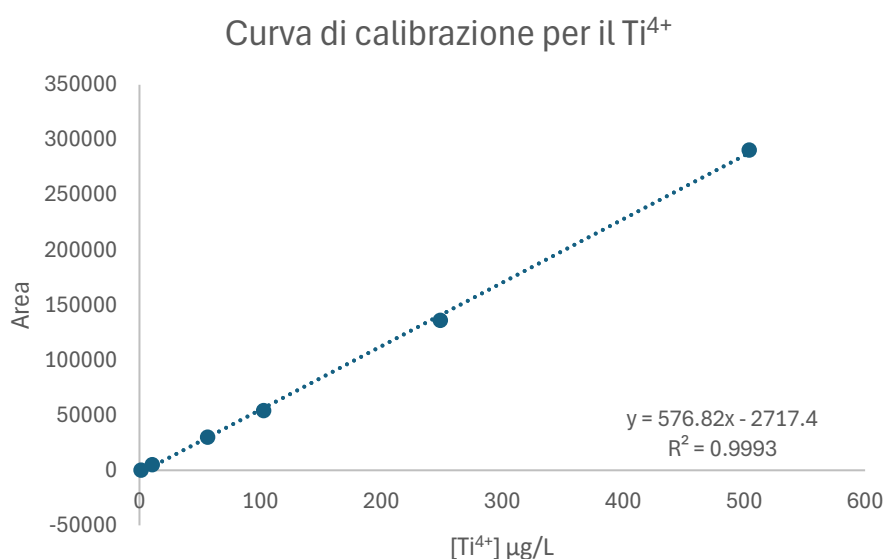


Figura 22. Retta di calibrazione ottenuta per Ti^{4+} .

6.12. Clorella Protothecoides

Chlorella Protothecoides, è un organismo appartenente al dominio Eukaryota e al regno Protista, è una microalga unicellulare scoperta nel 1890 da Beijerinck. Questa specie è la prima microalga con un nucleo ben definito a essere stata identificata e si distingue per la sua crescita in acqua dolce, con cellule sferiche di diametro variabile tra 2 e 10 micrometri. Una delle sue caratteristiche più notevoli è il suo elevato tasso di crescita; il tempo di raddoppio della biomassa cellulare è di circa 19 ore, grazie alla rapida riproduzione asessuata delle cellule.

I mitocondri di *C. vulgaris* sono responsabili dei processi metabolici per l'ottenimento di energia, presentando una struttura a doppie membrane, proteine e fosfolipidi. Un altro elemento distintivo è la presenza di un singolo cloroplasto ben definito, facilmente osservabile al microscopio. Inoltre, *C. vulgaris* può presentare un'organizzazione sia isolata che coloniale, formando gruppi di cellule che possono arrivare fino a 64 unità.

Questa microalga ha dimostrato di avere rese migliori in condizioni di crescita mixotrofica rispetto a quelle autotrofiche ed eterotrofiche. Con il termine *mixotrofica* si intende una strategia nutrizionale intermedia che combina le modalità autotrofa ed eterotrofa, permettendo l'acquisizione di carbonio organico e/o di altri elementi essenziali, come azoto, fosforo e ferro. Le coltivazioni mixotrofiche consentono di raggiungere concentrazioni di biomassa tra 2 e 5 g/L al giorno⁵¹

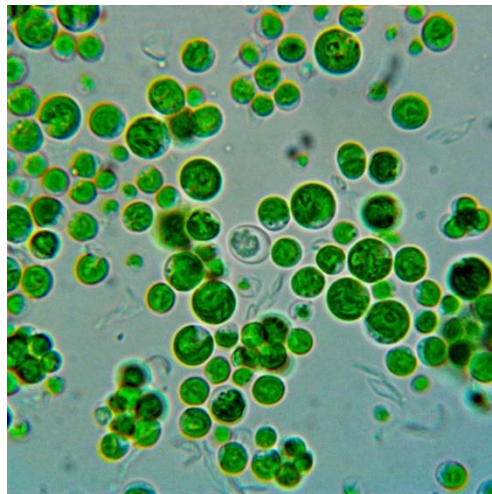


Figura 23. Rappresentazione di Chlorella Prothodecooides.

6.13. Pseudomonas stutzeri

Pseudomonas stutzeri è un batterio Gram-negativo appartenente al genere *Pseudomonas* e si presenta con una forma a bastoncino, dotato di flagelli polari che gli conferiscono mobilità. È un organismo aerobico facoltativo, in grado di vivere sia in presenza che in assenza di ossigeno, grazie alla sua capacità di adattarsi a diversi substrati organici per ricavare energia. In condizioni anaerobiche, può effettuare la denitrificazione, un processo che lo rende in grado di ridurre nitrati e nitriti ad azoto molecolare (N_2), caratteristica che lo rende particolarmente utile nel trattamento delle acque reflue e nella riduzione dei nitrati nel suolo.

Questo batterio è ampiamente diffuso in ambienti naturali, come acqua, suolo e sedimenti marini, dove svolge un ruolo chiave nei processi di biorisanamento, essendo capace di

degradare composti organici inquinanti, tra cui gli idrocarburi. La sua versatilità metabolica gli consente di crescere su un'ampia gamma di substrati organici e inorganici, oltre a poter accumulare polifosfati e produrre siderofori, molecole che sequestrano ferro, un elemento essenziale per molte funzioni cellulari⁵².

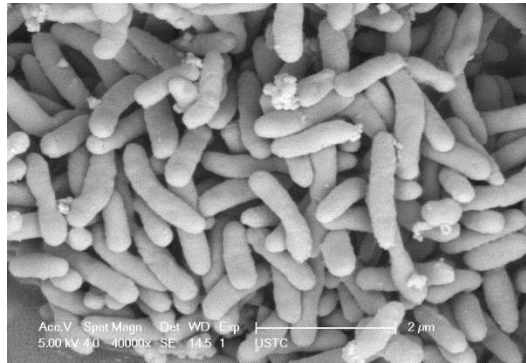


Figura 24. *Pseudomonas stutzeri*

6.14. *Comomonas Odontotermis* sp. Dant 3-8

Comamonas odontotermis è un batterio Gram-negativo appartenente al genere *Comamonas*, caratterizzato da una forma a bastoncino e dalla presenza di flagelli polari, che gli permettono di muoversi. Come tutti i batteri Gram-negativi, possiede una parete cellulare sottile, racchiusa da una membrana esterna.

Metabolicamente, è un organismo aerobico, capace di utilizzare l'ossigeno per le proprie funzioni vitali, ma in grado di adattarsi anche a condizioni con ridotto contenuto di ossigeno. Ottiene energia ossidando composti organici, classificandosi come chimioorganotrofo.

Questo batterio è stato isolato per la prima volta dalle interiora delle termiti, dove svolge un ruolo essenziale nella digestione del legno, degradando lignina e cellulosa. La sua capacità di decomporre questi materiali lo rende un elemento chiave nel metabolismo delle termiti, permettendo loro di nutrirsi efficacemente del legno.

La simbiosi con questi insetti è fondamentale: *Comamonas odontotermis* scompone composti complessi e fornisce nutrienti necessari alla loro sopravvivenza.

Grazie a queste proprietà, è oggetto di studi per le sue applicazioni biotecnologiche, in particolare nel campo del biorisanamento⁵³.

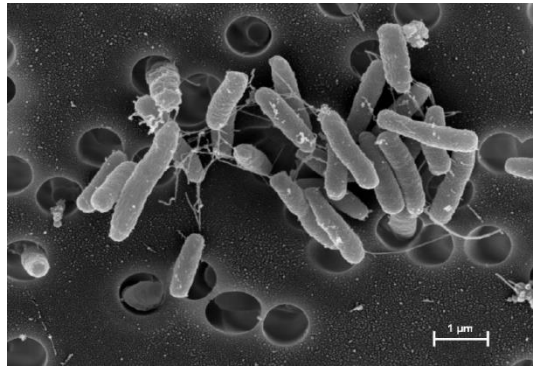


Figura 25. Comomonas odontothermitis.

6.15. Sinomonas Atrocyanea

Sinomonas atrocyanea è un batterio appartenente al genere *Sinomonas*, noto per la sua capacità di produrre un pigmento blu scuro. Il nome della specie deriva dal latino, con *atra* che significa nero e *cyanea* che indica blu scuro. Questa specie è stata originariamente descritta come *Arthrobacter atrocyaneus* nel 1960. Le cellule di *Sinomonas atrocyanea* crescono in condizioni aerobiche e mesofile, prosperando in presenza di ossigeno e a temperature moderate.

Dal punto di vista morfologico, le cellule possono assumere forme diverse, passando da bastoncello a cocco in base alle condizioni di crescita. Le colonie risultano generalmente circolari, convesse e di colore grigio-bianco dopo due giorni di coltivazione su terreni specifici a 37°C^{54,55}.

6.16. Terreno di coltura per la crescita di microalghe e batteri

Il terreno utilizzato per il mantenimento e per le prove di crescita delle microalghe e del consorzio batterico viene rappresentato nella Tabella 7

reagente	Concentrazione (mg/L)
NaCl	7
CaCl ₂ 2H ₂ O	4
MgSO ₄ 7H ₂ O	2
Estratto di carne	100
NH ₄ Cl	199
CH ₃ COONa	99
K ₂ HPO	18

Tabella 7. Refluo sintetico utilizzato.

6.17. Sistema di coltivazione in batch

I reattori batch utilizzati per gli esperimenti erano bottiglie QuickfitDrechsel® con un volume di 250 mL e un diametro di 5 cm. Gli esperimenti venivano condotti all'interno di un incubatore termostato, mantenuto a una temperatura di 30°C e a un'intensità luminosa di 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Le colture venivano costantemente mescolate tramite un agitatore magnetico. A seconda del tipo di esperimento, la CO₂ veniva aggiunta attraverso il gorgogliamento di una miscela aria-CO₂ (5% v/v) o, nel caso di esperimenti con solo gorgogliamento di aria, tramite l'uso quotidiano di un compressore.

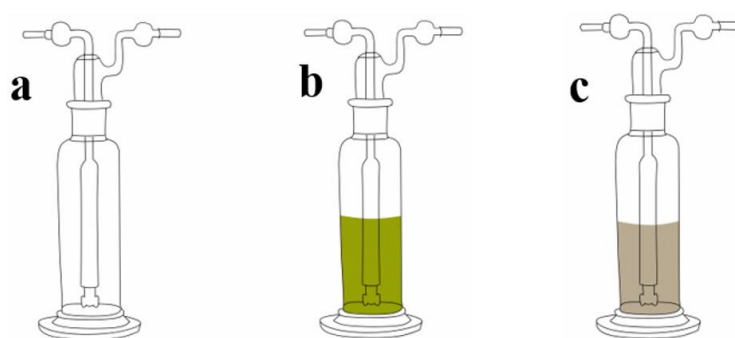


Figura 26. a) rappresentazione delle bottiglie di Drechsel. b) rappresentazione di una coltura di *C. protothecoides*. c) Rappresentazione di una coltura di *Pseudomonas stutzeri*; *Comamonas odontotermitis* e *Sinomonas atrocynea*

Inizialmente, sono stati allestiti degli esperimenti preliminari (Figura 26) al fine di confrontare la crescita in batch di *C. protothecoides*, del consorzio costituito dai tre microrganismi in acque reflue sintetiche (Tabella 7), in presenza ed in assenza di 50 µg/L di glifosato. Tali esperimenti sono stati svolti in doppio biologico e doppio tecnico ed hanno avuto una durata di 4 giorni per la microalga scelta e 2 giorni per il consorzio batterico, sufficienti ad osservare l'inizio della fase stazionaria di crescita in *C. protothecoides* e nel consorzio.

6.18. Misure di densità ottica

La misura della densità ottica (OD), o Assorbanza, effettuata a una lunghezza d'onda di 750 nm, ha permesso di monitorare la crescita delle microalghe, evitando l'assorbimento della luce da parte di carotenoidi e clorofille. Inoltre, i valori di OD sono stati rilevati anche al picco di assorbimento della clorofilla a, a una lunghezza d'onda di 680 nm. Le misurazioni della densità ottica sono state condotte utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio (Shimadzu UV-1900) su un volume di 2 mL di ogni campione. Come bianco di riferimento per ogni misurazione è stato impiegato il terreno di coltura utilizzato nei diversi esperimenti.

Dopo aver ottenuto la misura della densità ottica, è stato possibile calcolare la concentrazione cellulare, poiché la concentrazione del campione e il suo OD presentano una correlazione lineare, come descritto dalla legge di Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon \cdot C$$

In questa equazione, C rappresenta il cammino ottico e ε il coefficiente di assorbimento molare.

In caso di valori di $A > 1.00$ (abs), è stato necessario diluire il campione per mantenersi all'interno dell'intervallo di correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione cellulare. Il valore della concentrazione cellulare è stato quindi calcolato moltiplicando il fattore di diluizione per la misura di OD ottenuta. In ogni esperimento, le misurazioni dell'assorbanza sono state eseguite quotidianamente su tutti i campioni. La costante di

crescita massima (μ_{max}) della coltura è stata calcolata tramite interpolazione lineare del logaritmo dell'OD misurato durante la fase di crescita esponenziale.

6.19. Peso secco

La determinazione del peso secco (DW) ha consentito di calcolare la concentrazione di biomassa (C_x , g/L) all'interno del reattore. Questa misura, negli esperimenti condotti in continuo, è stata utilizzata anche per verificare il raggiungimento dello stato stazionario. Per la misurazione, sono stati utilizzati filtri in nitrocellulosa con pori di 0,45 μm per *C. protothecoides* e di 0,22 μm per le colture batteriche e per i reattori contenenti microalghe e batteri.

Il filtro, dopo essere stato asciugato per 10 minuti a 100°C per eliminare l'umidità, è stato pesato (tara, g). Successivamente, il campione da filtrare, solitamente di 12 mL, veniva passato attraverso il filtro utilizzando una beuta sottovuoto, su cui è stato montato un imbuto Buchner in acciaio. Dopo il filtraggio, il filtro contenente il campione è stato posto in forno per 2 ore a 105°C e poi nuovamente pesato (peso lordo, g).

La concentrazione di biomassa, espressa in termini di peso secco (g/L), è stata calcolata utilizzando la seguente equazione.

$$DW \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{(\text{peso}_{\text{lordo}} - \text{tara}) \cdot 1000}{Vol_{\text{campione}}}$$

Per gli esperimenti in continuo a stato stazionario, venivano raccolti almeno 4 punti in giorni diversi per garantire la precisione delle misurazioni.

6.20. Concentrazione cellulare (Conta)

La concentrazione cellulare di *C. protothecoides* nei campioni contenenti monoculture di *C. protothecoides* è stata determinata utilizzando una cameretta di conta Bürker. Tuttavia, la concentrazione delle specie batteriche non è misurabile con questa tecnica. Il vetrino della camera di Bürker ha dimensioni di 7,5 cm x 3,5 cm e uno spessore di 4 mm. La camera è composta da due celle identiche di 3 mm³, ciascuna delle quali presenta un

reticolo che suddivide l'area in 9 quadranti, ognuno con un lato di 1 mm. Ogni quadrante è delimitato da tre linee ed è ulteriormente suddiviso in 16 quadratini.



Figura 27. Rappresentazione della camera Bürker

Per eseguire la conta cellulare di *C. protothecoides*, la cameretta è stata caricata con 20 μL di campione, previamente diluito in base alla concentrazione stimata. La conta è stata effettuata utilizzando un microscopio ottico con ingrandimento 25X, analizzando 3 quadranti seguendo la diagonale. Dopo aver contato il numero di cellule in ciascuno dei tre quadranti, la concentrazione cellulare è stata calcolata tramite l'equazione rappresentata a seguire.

$$\text{Con. Cellulare} = \frac{(\sum \text{cell. contate})}{3} \cdot D \cdot 10^4$$

Il valore ottenuto indica il numero di cellule presenti in un mL, il termine 10^4 è un fattore di conversione legato al volume della camera mentre D rappresenta il fattore di diluizione.

6.21. Quantificazione del numero di pigmenti

Il contenuto di clorofilla *a* e carotenoidi è stato quantificato su campioni prelevati quotidianamente, in doppio, per tutta la durata degli esperimenti batch. A tale scopo, 1 mL di coltura è stato posto in due provette Eppendorf™ da 1,5 mL ciascuna. Negli esperimenti condotti in continuo, i campioni sono stati prelevati, sempre in doppio, per ciascun giorno di stato stazionario. Le provette contenenti 1 mL di ciascun campione sono

state centrifugate per 10 minuti a 13.500 rpm, permettendo la formazione di un pellet. Al termine della centrifugazione, il surnatante è stato rimosso e al pellet è stato aggiunto 1 mL di N, N-dimetilformammide (DMF), un solvente capace di solubilizzare le pareti e membrane cellulari, consentendo l'estrazione dei pigmenti in soluzione. Questa operazione è stata eseguita al buio per evitare la degradazione dei pigmenti fotosensibili. Le provette contenenti i pigmenti sono state conservate al buio per almeno 24 ore a -18°C per garantire la completa estrazione dei pigmenti presenti. Prima della lettura, i campioni sono stati nuovamente centrifugati per far precipitare i residui di membrane e pareti cellulari. Il surnatante contenente i pigmenti è stato quindi utilizzato per l'acquisizione dello spettro di assorbimento. La rilevazione dello spettro di assorbimento è stata effettuata utilizzando cuvette in quarzo, con un intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 350 e 750 nm, attraverso uno spettrofotometro e il software Vision 32. Per garantire la correlazione lineare tra assorbanza e concentrazione, i campioni sono stati diluiti, assicurando che l'assorbimento rimanesse compreso tra 0,1 e 1. Il contenuto di clorofilla a e carotenoidi è stato quindi calcolato utilizzando le apposite equazioni di Wellburn (1994).

$$Chla \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = (Ads_{664} - Abs_{750}) \cdot D \cdot \varepsilon \cdot \left(\frac{V_{DMF}}{V_s} \right)$$

$$Car \left(\frac{\mu g}{L} \right) = [(Abs_{664} - Abs_{750}) - (Abs_{664} - Abs_{750}) \cdot 0.04] \cdot D \cdot \varepsilon \cdot \left(\frac{V_{DMF}}{V_s} \right)$$

In queste equazioni, è stato utilizzato un fattore di diluizione, mentre il coefficiente di assorbimento è stato impostato a 11,92 per la clorofilla a e a 4 per i carotenoidi. Gli assorbimenti sono stati normalizzati a 750 nm e i risultati ottenuti sono stati successivamente rapportati alla concentrazione della coltura, espressa in g/L, per ottenere le misure finali in mg/g.

6.22. Ortofosfati (PO₄³⁻)

Il contenuto di ortofosfati è stato analizzato mediante un saggio. Per la reazione sono stati utilizzati 2 mL di campione e 400 µL di reagente, costituito da 500 µL di acido solforico 5N (H₂SO₄, 2,5M), 100 µL di antimonio potassio tartrato (1,36 g/L), 200 µL di ammonio

molibdato tetraidrato (30 g/L) e 200 μ L di acido ascorbico (54 g/L). È stato fondamentale preparare il reagente immediatamente prima dell'utilizzo, poiché risulta instabile.

Il tempo di reazione è stato fissato a 10 minuti, dopo i quali si è formato un complesso fosfomolibdico di colore blu. La concentrazione di questo complesso è stata misurata mediante spettrofotometria, con una lettura alla lunghezza d'onda di 705 nm. Una volta ottenuta l'assorbanza del campione reagito, la concentrazione di ortofosfati è stata calcolata per interpolazione, utilizzando una retta di taratura ottenuta da soluzioni a concentrazioni note di K_2HPO_4 .

$$PO_4^{3-} \left(\frac{mg}{L} \right) = 7.535 \cdot abs + 0.088 \cdot R^2 = 0.996$$

I campioni sono stati opportunamente diluiti per garantire che i valori rientrassero nel range di linearità della retta di taratura.

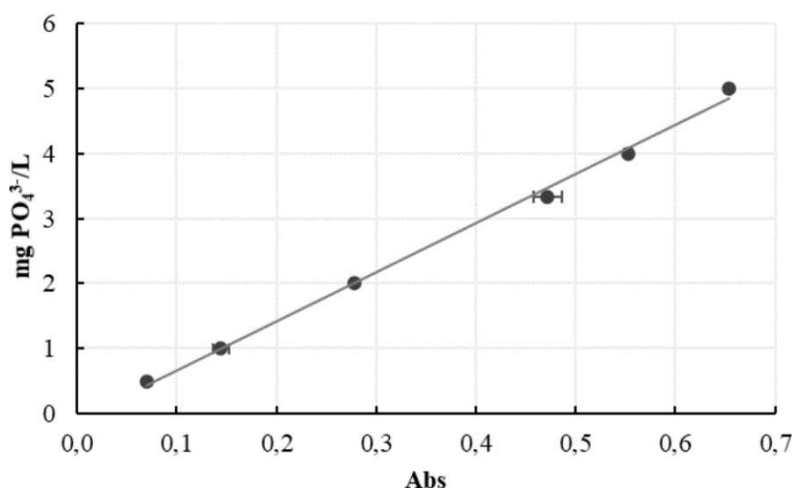


Figura 28. Retta di calibrazione per l'analisi degli ortofosfati,

6.23. Ammoniaca (NH₃)

Per la misurazione della concentrazione di ammoniaca presente nei campioni è stato impiegato il kit commerciale Hydrocheck Spectratest (codice 6201), che si basa su una reazione colorimetrica. La reazione si sviluppa in condizioni alcaline attraverso la formazione di un complesso colorato tra il reagente Nessler e l'ammonio. Il tempo di

reazione è di 5 minuti, e la misurazione viene effettuata su 2,5 mL di campione. Al termine dei 5 minuti, l'assorbanza è stata misurata a una lunghezza d'onda di 445 nm, e la concentrazione di ammoniaca è stata calcolata mediante l'equazione rappresentata a seguire.

$$NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) = 11.133 \cdot abs + 0.4524 \cdot R^2 = 0.994$$

Quest'ultima è stata ottenuta utilizzando soluzioni a concentrazione nota di ammoniaca, permettendo così di determinare il contenuto di ammoniaca nei campioni analizzati.

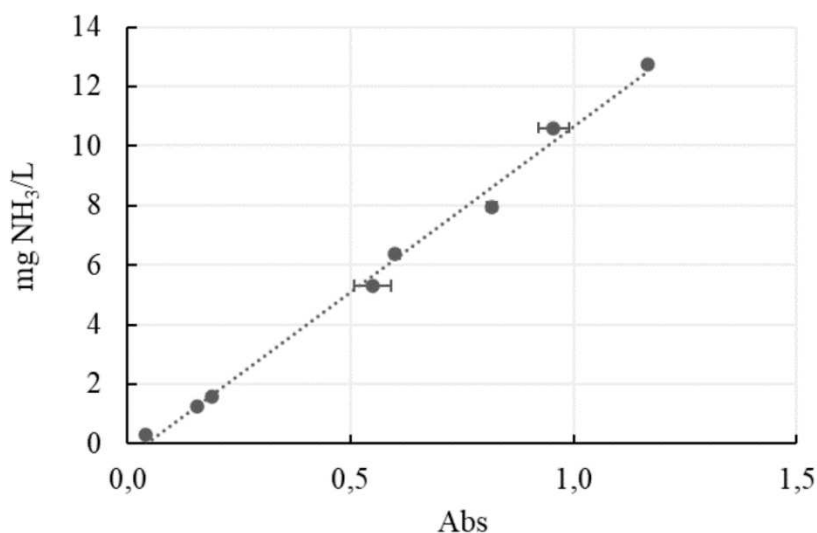


Figura 29. Retta di calibrazione per l'analisi dell'ammoniaca.

6.24. Chemical oxygen demand (COD)

L'analisi COD si basa sulla quantificazione dell'ossigeno sviluppato dalla reazione tra il dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e le sostanze organiche ossidabili presenti nei campioni. Il metodo utilizzato impiega i reagenti A e B della Spectroquant®, che consentono di determinare la concentrazione di COD (Domanda Chimica di Ossigeno) in un intervallo di 10-150 mg/L.

Per effettuare le misure, è stato sufficiente aggiungere 100 μL di reagente A e 950 μL di reagente B a 1 mL di campione opportunamente diluito. I campioni sono stati poi incubati a 100 °C per due ore utilizzando un termoblocco. Al termine di questo periodo, i campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente. Successivamente, è stata misurata l'assorbanza dei vari campioni a 445 nm, utilizzando acqua deionizzata come bianco. Le misure di assorbanza ottenute sono state poi sostituite in una curva di calibrazione, costruita con acetato di sodio, per determinare i mg/L di COD presenti nei campioni analizzati.

$$\text{COD} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = -240.1 \cdot \text{abs} + 254.8 \cdot R^2 = 0.986$$

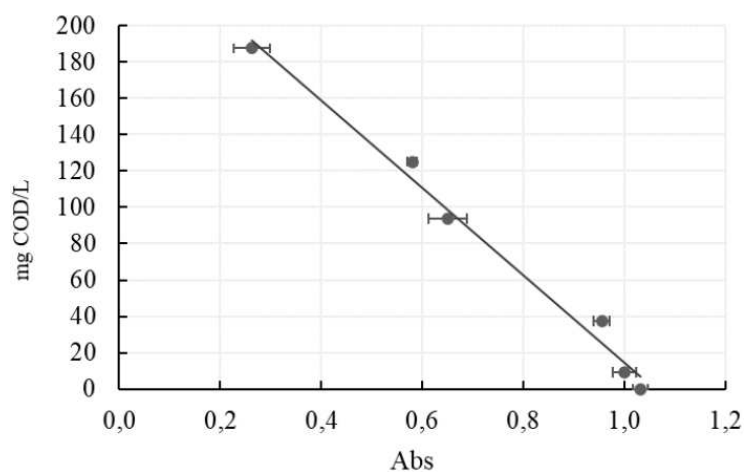


Figura 30. Retta di calibrazione per l'analisi di COD.

7. Risultati e discussione

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate le MNP@pDA@Ti^{4+} per effettuare le prove di adsorbimento, in quanto risultano essere i materiali innovativi con la più elevata selettività per il glifosato e per i suoi prodotti di degradazione, AMPA e GLUF (glufosinato) paragonati ai materiali forniti in letteratura. Inoltre, il materiale scelto risulta essere facile da sintetizzare e riutilizzabile fino ad un massimo di quattro cicli adsorbimento/rigenerazione e con tempi di incubazioni di 15 min, fornendo prestazioni elevate per l'adsorbimento del glifosato in termini di costi e tempo⁵⁶.

Per giustificare ulteriormente la scelta delle MNP@pDA@Ti^{4+} , a seguire verranno descritte più nel dettaglio le nanoparticelle e verranno forniti e discussi i risultati ottenuti dai test effettuati.

7.1. Nanoparticelle di Magnetite di Fe_3O_4 (MNP)

Nel presente elaborato sono state utilizzate le nanoparticelle di Fe_3O_4 (MNP) come core delle nanoparticelle MNP@pDA@Ti^{4+} , con lo scopo di usufruire delle sue ottime proprietà magnetiche, che facilitano l'estrazione del materiale dalla matrice in cui si trova, e per la facilità nel funzionalizzare la superficie esterna, permettendo di valutare e di incrementare l'efficienza di rimozione del glifosato.

7.1.1. Proprietà magnetiche delle MNP

Le nanoparticelle Fe_3O_4 mostrano un comportamento superparamagnetico (SPM) o ferromagnetico (FM) in funzione della range dimensionale di cui sono costituite.

Nella Figura 31,a si ha un confronto della magnetizzazione delle nanoparticelle superparamagnetiche e ferromagnetiche al variare del campo magnetico esterno applicato. La curva di isteresi in arancione, che rappresenta il comportamento del materiale ferromagnetico, è caratterizzata da una magnetizzazione di saturazione (M_s), ovvero il valore massimo di magnetizzazione che un materiale può raggiungere, da una Coercitività (H_c) e da una magnetizzazione residua (M_r), che indicano rispettivamente la resistenza alla smagnetizzazione e la quantità di magnetizzazione

che un materiale riesce a trattenere in assenza di un campo magnetico esterno applicato. Per le nanoparticelle SPM (Curva verde), H_c ed M_r sono uguali a zero, indicando che il materiale scelto non mostra proprietà magnetiche senza un campo magnetico applicato; tuttavia, risponde magneticamente in presenza di un campo magnetico esterno⁵⁷.

Dalla Figura 31, b in cui viene rappresentata la variazione coercitività al variare della magnetizzazione, si può osservare come proprietà magnetiche delle nanoparticelle dipendano fortemente dalle dimensioni. Si osserva che per dimensioni al di sotto dei 25 nm la coercitività risulta essere nulla quindi il materiale mantiene le proprietà superparamagnetiche; al di sopra dei 25 nm il materiale presenta un incremento della coercitività, indicando che si ha un comportamento non più superparamagnetico ma ferromagnetico⁵⁷.

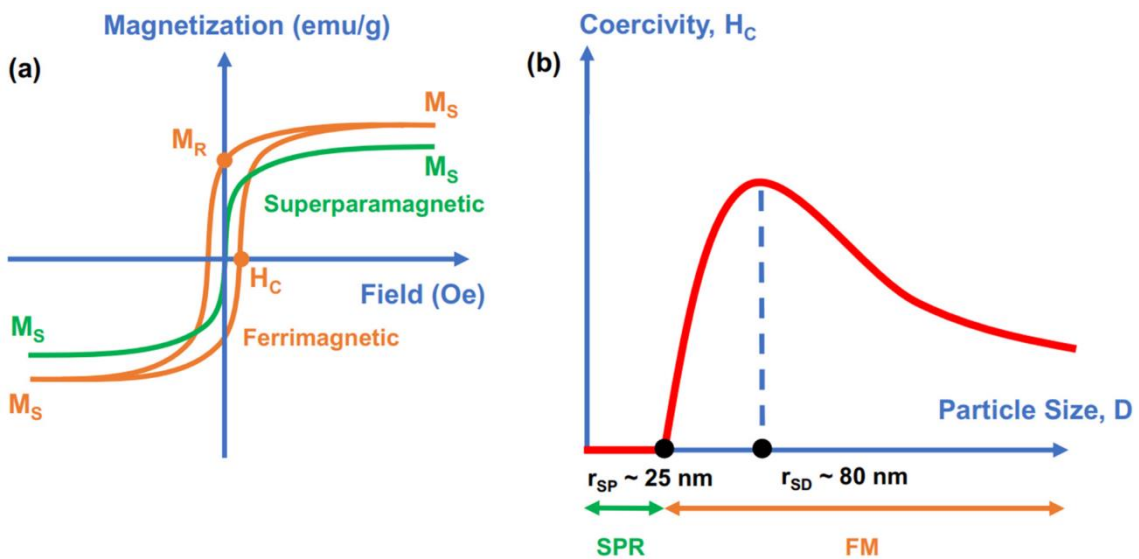


Figura 31.(a) Magnetizzazione in funzione del campo magnetico applicato per nanoparticelle di Fe_3O_4 superparamagnetiche (SPM) (in verde) e ferrimagnetiche (in arancione). (b) Relazione tra dimensioni, Coercitività e comportamento magnetico delle nanoparticelle di Fe_3O_4 .

7.1.2. Studio delle dimensioni delle Nanoparticelle di Fe₃O₄ (MNP)

Le analisi TEM confermano che le nanoparticelle di Fe₃O₄ presentino dimensioni paragonabile con i risultati ottenuti da R.Dogra et al⁵⁶, con un diametro medio delle singole nanoparticelle di 10.1 nm in un range dimensionale che varia tra i 3.6 nm e 18.3 nm. Inoltre, le nanoparticelle risultano essere visibilmente agglomerate, confermando questo comportamento con la letteratura⁵⁶.

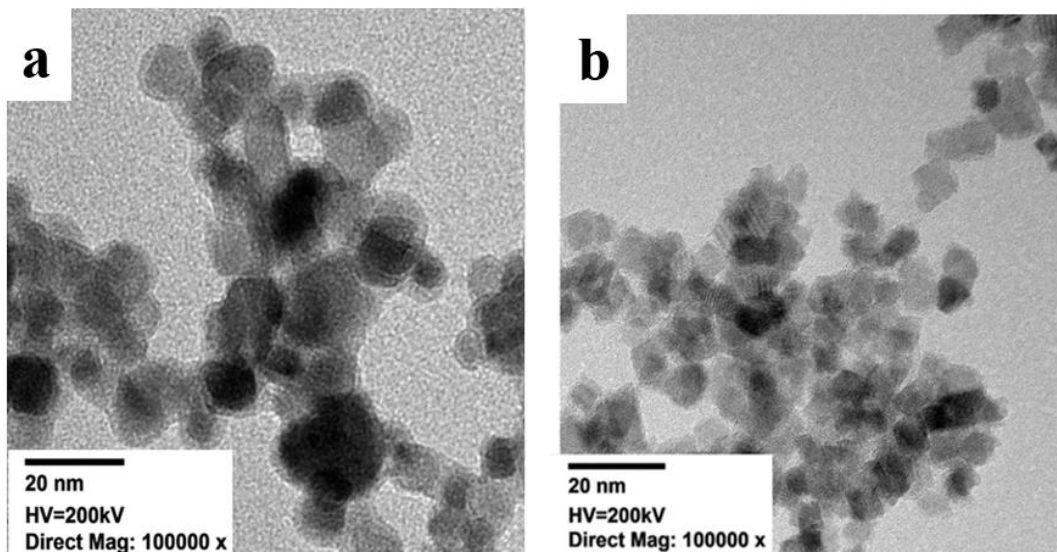


Figura 32. Visualizzazione delle nanoparticelle MNP di Fe₃O₄ mediante analisi TEM (15a-15b). (a) immagini TEM delle nanoparticelle ottenute da R. Dogra et al. a 30000 x (b) nanoparticelle ottenute per il presente elaborato a 100000 X

7.2. MNP funzionalizzate con polidopamina (pDA)

La polidopamina è un materiale bioispirato e biocompatibile utilizzato negli ultimi anni per la modifica superficiale di molteplici materiali inorganici e organici in quanto permette una flessibilità nella progettazione di sistemi bersaglio rispetto ad altri biopolimeri forniti dalla letteratura. La giustificazione della biocompatibilità sta nel fatto che la polidopamina risulta essere il principale pigmento dell'eumelanina, mostrando molte caratteristiche simili in termini di proprietà ottiche ed elettriche. Nel presente

elaborato la polidopamina viene utilizzata come coating delle nanoparticelle di Fe_3O_4 , l'adesione su quest'ultime avviene grazie alla presenza dei gruppi funzionali imminici, amminici e catecolici. I processi della formazione della polidopamina attorno alle nanoparticelle di ossido di ferro sono influenzate da molteplici parametri quali, la concentrazione di dopamina iniziale, il pH e il tipo di tampone e agente ossidante utilizzato⁵⁸.

La concentrazione della dopamina influenza notevolmente la morfologia delle nanoparticelle, infatti un aumento della concentrazione che varia tra i 0.1 g/L ai 5 g/L determina un aumento dello spessore della polidopamina da un paio di nm fino a 50 nm e un aumento della rugosità superficiale⁵⁸.

Nel presente caso l'autopolimerizzazione della dopamina viene effettuata attraverso un metodo di ossidazione in una soluzione tampone di tri(idrossimetil)amminometano (TRIZMA) ad un pH di 8.5. Studi recenti hanno dimostrato che l'utilizzo del Trizma è fondamentale per favorire la polimerizzazione della dopamina in quanto viene accoppiato covalentemente al polimero attraverso il legame che si viene a formare tra l'ammina primaria del Trizama e l'intermedio dopamina-chinone⁵⁸.

Oltre ai parametri precedentemente descritti, è necessario considerare anche l'effetto del pH nell'ambiente di reazione. A pH basico, si può osservare un consumo dei protoni idrogeno prodotti man mano che la sintesi del pDA progredisce, permettendo così lo spostamento dell'equilibrio redox verso la produzione del polimero. Pertanto, un aumento del pH iniziale si traduce in un aumento dello spessore del guscio di pDA nel caso di rivestimenti e in una riduzione delle dimensioni delle particelle nel caso della produzione di nanoparticelle di pDA⁵⁸.

7.2.1. Studio sullo spessore della polidopamina nelle MNP@pDA

Dalle analisi TEM delle nanoparticelle MNP@pDA si è riscontrato che la sintesi attuata ha prodotto nanoparticelle con uno spessore maggiore di polidopamina rispetto ai prodotti ottenuti in letteratura da R. Dogra et al⁵⁶. Nel presente caso si è ottenuto uno spessore medio dello strato di polidopamina di 8.1 nm rispetto ai valori ottenuti in precedenza di uno spessore medio di 2

nm⁵⁶. Le motivazioni sul perché la sintesi ha prodotto un coating con spessore maggiore non sono stati chiariti ma verranno approfondite in studi futuri.

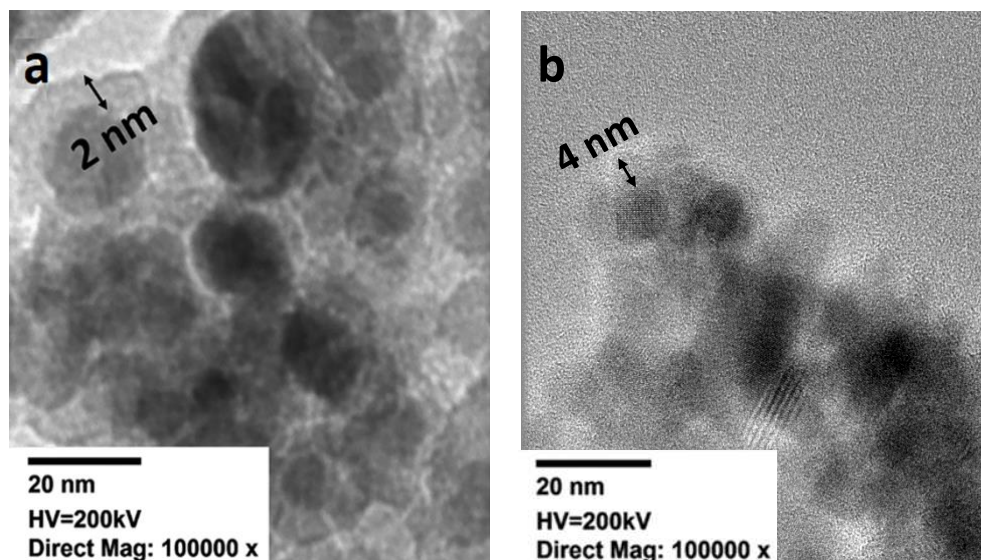


Figura 33. Visualizzazione delle nanoparticelle MNP di Fe_3O_4 mediante analisi TEM (16a-16b).
(a) immagini TEM delle MNP@pDA ottenute da R. Dogra et al. a 100000 x (b) MNP@pDA
ottenute per il presente elaborato a 100000 X

7.3. Nanoparticelle MNP@pDA funzionalizzate Con Ti^{4+}

In letteratura sono presenti molteplici studi che dimostrano come l'utilizzo di metalli di transizione per la funzionalizzazione delle nanoparticelle, genera un incremento della selettività del materiale scelto per l'adsorbimento di molecole contenenti i gruppi fosfonici come il glifosato. Negli studi effettuati da R. Dogra et al.⁵⁶, sono stati utilizzati diversi metalli, ovvero Ti^{4+} , Zr^{4+} e Cu^{2+} osservando un incremento notevole dell'efficienza di rimozione del glifosato rispetto alle nanoparticelle MNP nude e alle nanoparticelle MNP@pDA⁵⁶. MNP@pDA@ Ti^{4+} è risultato essere la nanoparticella più prestante in termini di efficienza di rimozione (RE%) del glifosato fornendo valori pari al 95.7%. Pertanto, si è scelto di utilizzare nuovamente il Ti^{4+} per le sue elevate prestazioni e per i relativi costi contenuti⁵⁶.

7.3.1. Studi per l'adsorbimento del Glifosato su $MNP@pDA@Ti^{4+}$

Per valutare le prestazioni del materiale in termini di RE% sono stati effettuati test di adsorbimento di glifosato mantenendo costante la concentrazione di $MNP@pDA@Ti^{4+}$ a 100 mg/L e variando le concentrazioni di glifosato tra 1 $\mu\text{g/L}$ e 12000 $\mu\text{g/L}$ in un tempo di incubazione di 30 min.

Nella Figura 34,b è rappresentata la variazione di RE% rispetto alla variazione del rapporto tra i microgrammi di glifosato e i grammi di nanoparticelle utilizzate per i test di adsorbimento. Si può osservare che rispetto ai dati forniti da R.Dogra et al.(Figura 17,a)⁵⁶sono state ottenute nanoparticelle con prestazioni, in termini di efficienza di rimozione del glifosato, che mantengono valori di RE% al 99 % anche a concentrazioni più elevate di glifosato pari a 12000 $\mu\text{g/L}$.

Si ipotizza che lo spessore maggiore di polidopamina abbia causato un incremento della superficie disponibile, facilitando l'adesione di una quantità superiore di titanio, che ne giustifica l'incremento notevole delle prestazioni di adsorbimento del glifosato sulla superficie delle nanoparticelle. Tuttavia, per comprendere al meglio le motivazioni dell'incremento di prestazione sono state effettuate della analisi ICP-MS per valutare la quantità di titanio depositata sulla superficie delle nanoparticelle.

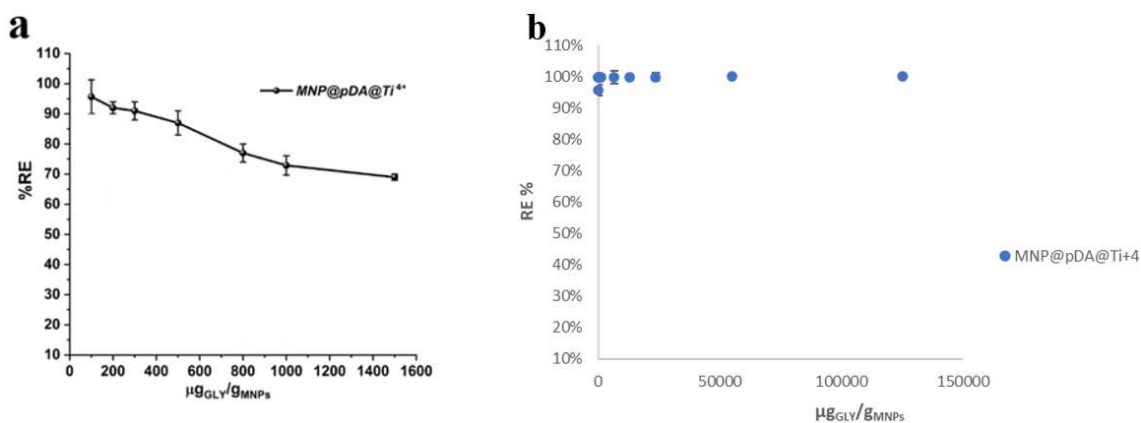


Figura 34. a) Test di adsorbimento con $[MNP@pDA@Ti^{4+}]$ a 100 $\mu\text{g/L}$ a tempi di incubazione di 15 min effettuati da R. Dogra et al. b) Test di adsorbimento con $[MNP@pDA@Ti^{4+}]$ a 100 $\mu\text{g/L}$ a tempi di incubazione di 30 min effettuati nel presente elaborato.

7.3.2. Studi sulla digestione delle nanoparticelle

Al fine di valutare la quantità di Ti depositato sulle MNP@pDA@Ti^{4+} si è proceduto a studiare un nuovo metodo di digestione acida per le nanoparticelle, mediante l'utilizzo di HNO_3 , H_2SO_4 e HCl .

In una prima fase è stata effettuata una digestione delle MNP@pDA@Ti^{4+} con HNO_3 concentrato ad una temperatura di $100\text{ }^\circ\text{C}$, così da permettere la totale ossidazione del core e della shell di polidopamina delle nanoparticelle.

Tuttavia, le condizioni ossidanti non sono state sufficienti per permettere la solubilizzazione del Ti^{4+} , che è precipitato sotto forma di TiO_2 ; pertanto, si è proceduto ad effettuare ulteriori test che permettano di studiare la digestione del biossido di titanio mediante la combinazione di HNO_3 con diversi rapporti di H_2SO_4 e HCl .

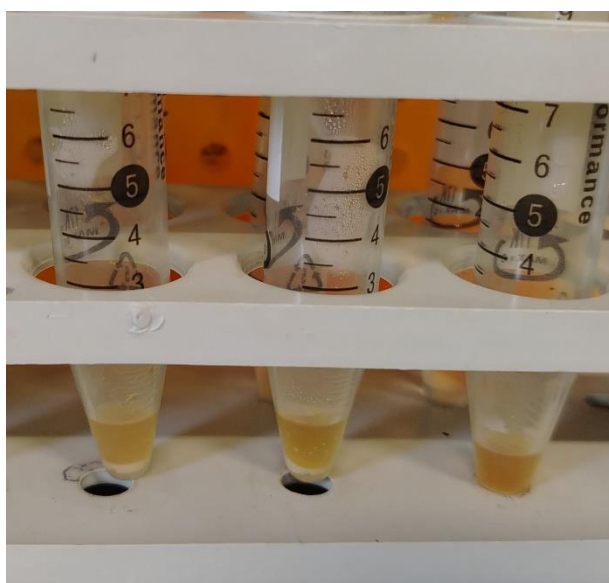
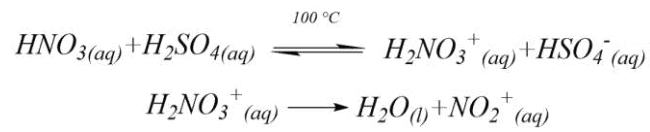


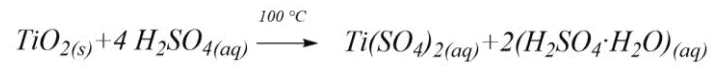
Figura 35. Immagine dimostrativa della formazione del precipitato di TiO_2

La Combinazione tra HNO_3 e H_2SO_4 concentrato è stata scelta per due motivazioni, la prima è quello di produrre, ione nitronio NO_2^+ , ovvero una specie altamente reattiva che reagisce con la struttura cristallina del TiO_2 favorendo così i processi di solubilizzazione del titanio⁵⁹. Nell'equazione 1 si osserva come un eccesso di H_2SO_4 faciliti la protonazione del HNO_3 permettendo così la formazione dello ione nitronio



Equazione 1. Processo di formazione dello ione nitronio.

La seconda motivazione sta nella possibilità di ossidare il TiO_2 e sfruttare le proprietà dello ione solfato come legante bidentato permettendo la complessazione e la stabilizzazione del Ti^{4+} in soluzione⁶⁰. (Equazione 2)



Equazione 2. Processo di digestione del TiO_2 con H_2SO_4 conc.

7.3.3. Risultati delle analisi ICP-MS per le digestioni del TiO₂

I risultati delle analisi ICP-MS delle prove digestione effettuate con HNO₃- H₂SO₄ e HNO₃-HCl a diversi rapporti per un tempo di 4 h dimostrano (Tabella 8) che all'incrementare di H₂SO₄ e HCl si ha un incremento del titanio ricavato dal metodo di digestione utilizzato. Inoltre, l'utilizzo di H₂SO₄ fornisce rese di Ti % (p/p), depositato sulle nanoparticelle, maggiori permettendo di comprendere che la combinazione tra HNO₃ e H₂SO₄ risulta essere la migliore per la digestione delle nanoparticelle MNP@pDA@Ti⁴⁺. Inoltre, la precisione strumentale, calcolata come rapporto percentuale tra la deviazione standard e la media delle aree estratte (RSD%) su tre misure ripetute per ciascuna concentrazione, è risultata essere sempre inferiore al 10%

n campioni	Digestione	%Ti NPs
1	HNO ₃ (0.5 g) + H ₂ SO ₄ (0.2g)	14.2
2	HNO ₃ (0.5 g) + H ₂ SO ₄ (0.2g)	17.0
3	HNO ₃ (0.5 g) + H ₂ SO ₄ (0.2g)	22.0
4	HNO ₃ (0.5 g)	1.9
5	HNO ₃ (0.5 g) + HCl (0.5g)	2.4
6	HNO ₃ (0.5 g) + HCl (1.0g)	5.7
7	HNO ₃ (0.5 g) + HCl (2.0g)	12.1

Tabella 8. Digestioni del TiO₂ a diversi rapporti di acidi concentrati.

7.4. Analisi sulla crescita microalgale e batterica

Al fine di comprendere e verificare le capacità di crescita del consorzio batterico e della microalga *Chlorella Protodecoides* in presenza e in assenza di glifosato, ad una concentrazione di 50 µg/L, sono stati allestiti vari esperimenti che hanno permesso di valutare l'influenza del pesticida sui vari parametri studiati.

Dalla Figura X si possono osservare i parametri di OD e Conta cellulare effettuate per la microalga e per il consorzio batterico e si denota che la presenza del glifosato abbia incrementato la proliferazione dei microorganismi. Pertanto, sono stati riconfermati gli le ipotesi presentate negli studi di G.Novello et al⁶¹., ovvero che sia il consorzio batterico che *C. protodecoides* sfruttano il pesticida per la propria crescita (Figura 36).

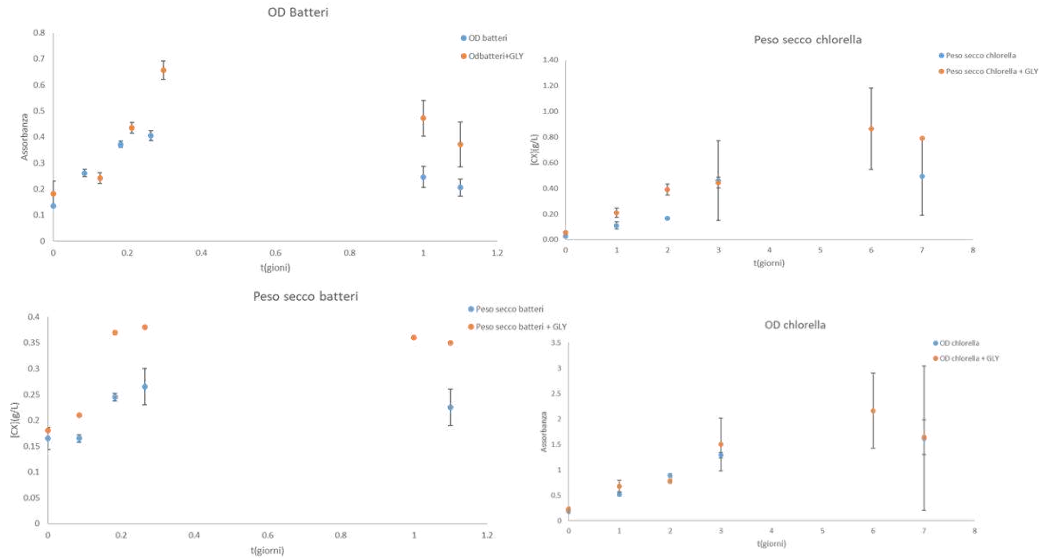


Figura 36. Confronto delle curve OD Chlorella Protodecoides, OD consorzio, peso secco Chlorella, Peso secco Consorzio in presenza ed in assenza di Glifosato.

Sono stati effettuati inoltre ulteriori analisi colorimetriche per PO_4^{3-} , NH_4 e COD per valutare la prestazione di riduzione di questi parametri mediante l'utilizzo di Chlorella Protodecoides, in presenza ed in assenza di glifosato. Dai risultati ottenuti si è potuto dedurre che per tutti parametri studiati le prestazioni non vengono limitati dalla presenza del pesticida. (Figura 37-38-39)

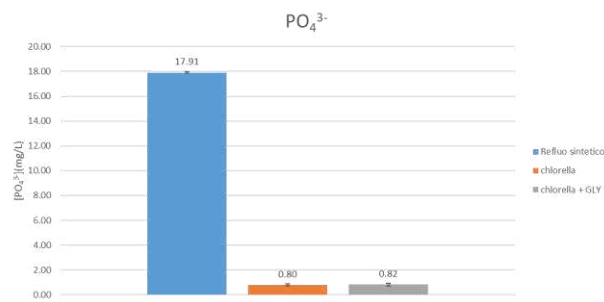


Figura 37. Analisi colorimetrico per i PO_4^{3-}

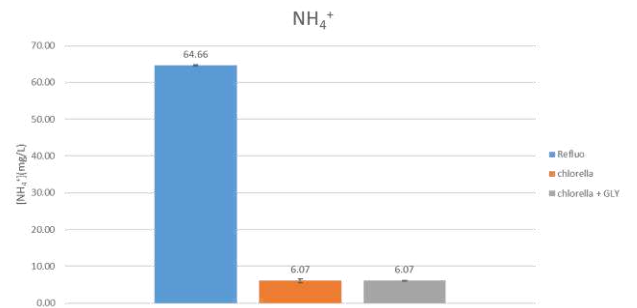


Figura 38. Analisi colorimetrica per NH_4^+

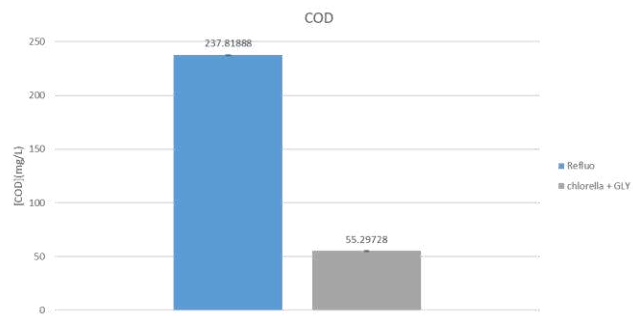


Figura 37. Analisi colorimetrica per COD

8. Conclusion

Nel presente progetto sono state ottenute nanoparticelle $MNP@pDA@Ti^{4+}$ con un RE% che si mantiene al 99% anche a concentrazione alte di glifosato. Inoltre, la digestione acida delle nanoparticelle con $H_2SO_4-HNO_3$ ha permesso di comprendere, un'informazione assente in letteratura, ovvero il processo di mineralizzazione delle $MNP@pDA@Ti^{4+}$ avviene in due step, in cui si ha prima l'ossidazione dello shell organico e del core, seguita dalla precipitazione del Titanio sotto forma di TiO_2 , e poi la digestione del Ti^{4+} grazie alla formazione di complessi del metallo, stabili in soluzione.

Il metodo che utilizza H_2SO_4 per la digestione delle nanoparticelle è risultato essere migliore in quanto la resa del titanio aumenta con l'aumentare della quantità di solfato.

In studi futuri si effettueranno ulteriori test di digestione per ottimizzare il metodo di digestione acida delle nanoparticelle così da comprendere e giustificare le informazioni relative alle prestazioni di adsorbimento del glifosato da parte delle nanoparticelle.

Inoltre, si cercherà di comprendere anche la motivazione della formazione dello strato più spesso di polidopamina. Si cercherà anche di comprendere e ideare le condizioni ottimali per nanoparticelle, microalga *Clorella Protodecoides* e consorzio batterico per effettuare studi di un sistema in continuo, che permetta di rimuovere il glifosato in maniera efficiente dalle acque di scarico e da acque superficiali.

Bibliografia

- (1) Molin, W. T. Glyphosate, a Unique Global Herbicide. J. E. Franz, M. K. Mao, and J. A. Sikorski, ACS Monograph 189, 1997. 653 Pp. *Weed Technol.* **1998**, *12* (3), 564–565. <https://doi.org/10.1017/S0890037X0004433X>.
- (2) Tomlin, C.; Council, B. C. P. *The Pesticide Manual: A World Compendium*; BCPC, 2009.
- (3) Pereira, H. A.; Hernandez, P. R. T.; Netto, M. S.; Reske, G. D.; Vieceli, V.; Oliveira, L. F. S.; Dotto, G. L. Adsorbents for Glyphosate Removal in Contaminated Waters: A Review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19* (2), 1525–1543. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01108-4>.
- (4) Meddeb-Limem, S.; Fredj, A. B. Computational Study of the Dimerization of Glyphosate: Mechanism and Effect of Solvent. *RSC Adv.* **2024**, *14* (32), 23184–23203. <https://doi.org/10.1039/D4RA04300F>.
- (5) Aguer, J.-P.; Richard, C. Transformation of Fenuron Induced by Photochemical Excitation of Humic Acids. *Pestic. Sci.* **1996**, *46* (2), 151–155. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199602\)46:2<151::AID-PS328>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199602)46:2<151::AID-PS328>3.0.CO;2-#).
- (6) Giesy, J. P.; Dobson, S.; Solomon, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*; Ware, G. W., Ed.; Springer: New York, NY, 2000; pp 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2.
- (7) Hajnoczki, M. B. nee; Gulyas, I.; Gyoker, I.; Zsupan, K.; Csorvassy, I.; Salamon, Z.; Somogyi, G.; Szentkiralyi, I.; Timar, T.; Czapary, E. B. nee; Fodor, I.; Repasi, J. Process for the Preparation of N-Phosphonomethyl-Glycine. US4486359A, December 4, 1984. <https://patents.google.com/patent/US4486359A/en> (accessed 2024-09-02).
- (8) Pinel, C.; Landrison, E.; Lini, H.; Gallezot, P. Effect of the Nature of Carbon Catalysts on Glyphosate Synthesis. *J. Catal.* **1999**, *182* (2), 515–519. <https://doi.org/10.1006/jcat.1998.2374>.
- (9) de María, N.; Becerril, J. M.; García-Plazaola, J. I.; Hernández, A.; de Felipe, M. R.; Fernández-Pascual, M. New Insights on Glyphosate Mode of Action in Nodular Metabolism: Role of Shikimate Accumulation. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (7), 2621–2628. <https://doi.org/10.1021/jf058166c>.

- (10) Herrmann, K. M.; Weaver, L. M. THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1999**, *50* (Volume 50, 1999), 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- (11) Gill, J. P. K.; Sethi, N.; Mohan, A.; Datta, S.; Girdhar, M. Glyphosate Toxicity for Animals. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *16* (2), 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>.
- (12) Edginton, A. N.; Sheridan, P. M.; Stephenson, G. R.; Thompson, D. G.; Boermans, H. J. Comparative Effects of pH and Vision® Herbicide on Two Life Stages of Four Anuran Amphibian Species. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23* (4), 815–822. <https://doi.org/10.1897/03-115>.
- (13) *Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque*; 2000; Vol. 327. <http://data.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj/ita> (accessed 2024-09-02).
- (14) *DECRETO LEGISLATIVO 3 aprile 2006, n. 152 - Normattiva*. <https://www.normattiva.it/uri-res/N2Ls?urn:nir:stato:decreto.legislativo:2006-04-03;152> (accessed 2024-09-02).
- (15) *Regolamento (UE) n. 293/2013 della Commissione, del 20 marzo 2013, che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di emamectina benzoato, etofenprox, etoxazolo, flutriafol, glifosato, fosmet, piraclostrobina, spinosad e spirotetrammato in o su determinati prodotti Testo rilevante ai fini del SEE*; 2013; Vol. 096. <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/293/oj/ita> (accessed 2024-09-02).
- (16) *Glifosato | EFSA*. <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/glyphosate> (accessed 2024-09-02).
- (17) Yang, Y.; Deng, Q.; Yan, W.; Jing, C.; Zhang, Y. Comparative Study of Glyphosate Removal on Goethite and Magnetite: Adsorption and Photo-Degradation. *Chem. Eng. J.* **2018**, *352*, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.07.058>.
- (18) Rubí-Juárez, H.; Cotillas, S.; Sáez, C.; Cañizares, P.; Barrera-Díaz, C.; Rodrigo, M. A. Use of Conductive Diamond Photo-Electrochemical Oxidation for the Removal of Pesticide Glyphosate. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, *167*, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.04.048>.

- (19) Ighalo, J. O.; Ajala, O. J.; Adeniyi, A. G.; Babatunde, E. O.; Ajala, M. A. Ecotoxicology of Glyphosate and Recent Advances in Its Mitigation by Adsorption. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, 28 (3), 2655–2668. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11521-5>.
- (20) Vargas-Delgadillo, D. P.; Giraldo, L.; Moreno-Piraján, J. C. Nanostructured Materials for Glyphosate Capture—A Mini-Review. *Front. Sustain.* **2022**, 3. <https://doi.org/10.3389/frsus.2022.888422>.
- (21) Herath, I.; Kumarathilaka, P.; Al-Wabel, M. I.; Abduljabbar, A.; Ahmad, M.; Usman, A. R. A.; Vithanage, M. Mechanistic Modeling of Glyphosate Interaction with Rice Husk Derived Engineered Biochar. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, 225, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.01.017>.
- (22) Yu, P.; Li, X.; Zhang, X.; Zhou, H.; Xu, Y.; Sun, Y.; Zheng, H. Insights into the Glyphosate Removal Efficiency by Using Magnetic Powder Activated Carbon Composite. *Sep. Purif. Technol.* **2021**, 254, 117662. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117662>.
- (23) Hadi, P.; To, M.-H.; Hui, C.-W.; Lin, C. S. K.; McKay, G. Aqueous Mercury Adsorption by Activated Carbons. *Water Res.* **2015**, 73, 37–55. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.018>.
- (24) Yusof, N.; Ismail, A. F. Post Spinning and Pyrolysis Processes of Polyacrylonitrile (PAN)-Based Carbon Fiber and Activated Carbon Fiber: A Review. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2012**, 93, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.10.001>.
- (25) Mohsen Nourouzi, M.; Chuah, T. G.; Choong, T. S. Y. Adsorption of Glyphosate onto Activated Carbon Derived from Waste Newspaper. *Desalination Water Treat.* **2010**, 24 (1), 321–326. <https://doi.org/10.5004/dwt.2010.1461>.
- (26) Mohsen Nourouzi, M.; Chuah, T. G.; Choong, T. S. Y. Adsorption of Glyphosate onto Activated Carbon Derived from Waste Newspaper. *Desalination Water Treat.* **2010**, 24 (1), 321–326. <https://doi.org/10.5004/dwt.2010.1461>.
- (27) Mayakaduwa, S. S.; Kumarathilaka, P.; Herath, I.; Ahmad, M.; Al-Wabel, M.; Ok, Y. S.; Usman, A.; Abduljabbar, A.; Vithanage, M. Equilibrium and Kinetic Mechanisms of Woody Biochar on Aqueous Glyphosate Removal. *Chemosphere* **2016**, 144, 2516–2521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.080>.

- (28) Li, H.; Sheng, G.; Teppen, B. J.; Johnston, C. T.; Boyd, S. A. Sorption and Desorption of Pesticides by Clay Minerals and Humic Acid-Clay Complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2003**, *67* (1), 122–131. <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.1220a>.
- (29) Li, F.; Wang, Y.; Yang, Q.; Evans, D. G.; Forano, C.; Duan, X. Study on Adsorption of Glyphosate (*N*-Phosphonomethyl Glycine) Pesticide on MgAl-Layered Double Hydroxides in Aqueous Solution. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *125* (1), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.04.037>.
- (30) Khoury, G. A.; Gehris, T. C.; Tribe, L.; Torres Sánchez, R. M.; dos Santos Afonso, M. Glyphosate Adsorption on Montmorillonite: An Experimental and Theoretical Study of Surface Complexes. *Appl. Clay Sci.* **2010**, *50* (2), 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.07.018>.
- (31) Zavareh, S.; Farrokhzad, Z.; Darvishi, F. Modification of Zeolite 4A for Use as an Adsorbent for Glyphosate and as an Antibacterial Agent for Water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *155*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.043>.
- (32) Sprankle, P.; Meggitt, W. F.; Penner, D. Adsorption, Mobility, and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil. *Weed Sci.* **1975**, *23* (3), 229–234. <https://doi.org/10.1017/S0043174500052929>.
- (33) Junior, H. B.; da Silva, E.; Saltarelli, M.; Crispim, D.; Nassar, E. J.; Trujillano, R.; Rives, V.; Vicente, M. A.; Gil, A.; Korili, S. A.; de Faria, E. H.; Ciuffi, K. J. Inorganic–Organic Hybrids Based on Sepiolite as Efficient Adsorbents of Caffeine and Glyphosate Pollutants. *Appl. Surf. Sci. Adv.* **2020**, *1*, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2020.100025>.
- (34) Rodrigues, P. V.; Silva, F. A. N. G.; Pontes, F. V. M.; Barbato, C. N.; Teixeira, V. G.; Assis, T. C. de; Brandão, V. S.; Bertolino, L. C. Adsorption of Glyphosate by Palygorskite. *Mater. Res.* **2023**, *26*, e20220335. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2022-0335>.
- (35) Kumar, P.; Bansal, V.; Kim, K.-H.; Kwon, E. E. Metal-Organic Frameworks (MOFs) as Futuristic Options for Wastewater Treatment. *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, *62*, 130–145. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.12.051>.
- (36) Xu, Y.; Wang, H.; Li, X.; Zeng, X.; Du, Z.; Cao, J.; Jiang, W. Metal–Organic Framework for the Extraction and Detection of Pesticides from Food Commodities.

Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **2021**, *20* (1), 1009–1035. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12675>.

(37) Mazari, S. A.; Ali, E.; Abro, R.; Khan, F. S. A.; Ahmed, I.; Ahmed, M.; Nizamuddin, S.; Siddiqui, T. H.; Hossain, N.; Mubarak, N. M.; Shah, A. Nanomaterials: Applications, Waste-Handling, Environmental Toxicities, and Future Challenges – A Review. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9* (2), 105028. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105028>.

(38) Saleh, T. A. Nanomaterials: Classification, Properties, and Environmental Toxicities. *Environ. Technol. Innov.* **2020**, *20*, 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>.

(39) Kimbi Yaah, V. B.; Ahmadi, S.; Quimbayo M, J.; Morales-Torres, S.; Ojala, S. Recent Technologies for Glyphosate Removal from Aqueous Environment: A Critical Review. *Environ. Res.* **2024**, *240*, 117477. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117477>.

(40) Diel, J. C.; Franco, D. S. P.; Nunes, I. dos S.; Pereira, H. A.; Moreira, K. S.; de L. Burgo, T. A.; Foletto, E. L.; Dotto, G. L. Carbon Nanotubes Impregnated with Metallic Nanoparticles and Their Application as an Adsorbent for the Glyphosate Removal in an Aqueous Matrix. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9* (2), 105178. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105178>.

(41) Briceño, S.; Reinoso, C. CoFe₂O₄-Chitosan-Graphene Nanocomposite for Glyphosate Removal. *Environ. Res.* **2022**, *212*, 113470. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113470>.

(42) Marin, P.; Bergamasco, R.; Módenes, A. N.; Paraiso, P. R.; Hamoudi, S. Synthesis and Characterization of Graphene Oxide Functionalized with MnFe₂O₄ and Supported on Activated Carbon for Glyphosate Adsorption in Fixed Bed Column. *Process Saf. Environ. Prot.* **2019**, *123*, 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.12.027>.

(43) Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84* (2), 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>.

(44) Khlebtsov, N. G.; Dykman, L. A. Optical Properties and Biomedical Applications of Plasmonic Nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **2010**, *111* (1), 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2009.07.012>.

- (45) Kolhatkar, A. G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C.; Lee, T. R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (8), 15977–16009. <https://doi.org/10.3390/ijms140815977>.
- (46) Guo, D.; Xie, G.; Luo, J. Mechanical Properties of Nanoparticles: Basics and Applications. *J. Phys. Appl. Phys.* **2013**, *47* (1), 013001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/1/013001>.
- (47) Lee, S.; Choi, S. U.-S.; Li, S.; Eastman, J. A. Measuring Thermal Conductivity of Fluids Containing Oxide Nanoparticles. *J. Heat Transf.* **1999**, *121* (2), 280–289. <https://doi.org/10.1115/1.2825978>.
- (48) Castrejón-Godínez, M. L.; Tovar-Sánchez, E.; Valencia-Cuevas, L.; Rosas-Ramírez, M. E.; Rodríguez, A.; Mussali-Galante, P. Glyphosate Pollution Treatment and Microbial Degradation Alternatives, a Review. *Microorganisms* **2021**, *9* (11), 2322. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112322>.
- (49) Sviridov, A. V.; Shushkova, T. V.; Ermakova, I. T.; Ivanova, E. V.; Epiktetov, D. O.; Leontievsky, A. A. Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **2015**, *51* (2), 188–195. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020209>.
- (50) Nie, J.; Sun, Y.; Zhou, Y.; Kumar, M.; Usman, M.; Li, J.; Shao, J.; Wang, L.; Tsang, D. C. W. Bioremediation of Water Containing Pesticides by Microalgae: Mechanisms, Methods, and Prospects for Future Research. *Sci. Total Environ.* **2020**, *707*, 136080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136080>.
- (51) Furlanetto, L. <1995>. Valutazione delle cinetiche di crescita di *Chlorella vulgaris* su impianto pilota a luce pulsata. *Valutazione delle cinetiche di crescita di Chlorella vulgaris su impianto pilota a luce pulsata* **2022**.
- (52) Lalucat, J.; Bennisar, A.; Bosch, R.; García-Valdés, E.; Palleroni, N. J. Biology of *Pseudomonas Stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70* (2), 510–547. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00047-05>.
- (53) Chou, J.-H.; Sheu, S.-Y.; Lin, K.-Y.; Chen, W.-M.; Arun, A. B.; Young, C.-C. *Comamonas Odontotermis* Sp. Nov., Isolated from the Gut of the Termite *Odontotermes Formosanus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57* (4), 887–891. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64551-0>.

- (54) Zhou, Y.; Wei, W.; Wang, X.; Lai, R. Proposal of *Sinomonas Flava* Gen. Nov., Sp. Nov., and Description of *Sinomonas Atrocyanea* Comb. Nov. to Accommodate *Arthrobacter Atrocyaneus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59* (2), 259–263. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000695-0>.
- (55) Herrera-Sepúlveda, A.; ArgenteL-Martínez, L.; Peñuelas-Rubio, O.; Azizoglu, U. First Report of *Sinomonas Halotolerans* from *Parkinsonia Aculeata* Rhizosphere. *Biologia (Bratisl.)* **2024**, *79* (2), 621–627. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01581-6>.
- (56) Dogra, R.; Roverso, M.; Bernardo, G. D.; Zanut, A.; A. Monikh, F.; Pettenuzzo, S.; Pastore, P.; Bogialli, S. Metallic Functionalization of Magnetic Nanoparticles Enhances the Selective Removal of Glyphosate, AMPA, and Glufosinate from Surface Water. *Environ. Sci. Nano* **2023**, *10* (9), 2399–2411. <https://doi.org/10.1039/D3EN00129F>.
- (57) Nguyen, M. D.; Tran, H.-V.; Xu, S.; Lee, T. R. Fe₃O₄ Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications. *Appl. Sci.* **2021**, *11* (23), 11301. <https://doi.org/10.3390/app112311301>.
- (58) Siciliano, G.; Monteduro, A. G.; Turco, A.; Primiceri, E.; Rizzato, S.; Depalo, N.; Curri, M. L.; Maruccio, G. Polydopamine-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: From Design to Applications. *Nanomaterials* **2022**, *12* (7), 1145. <https://doi.org/10.3390/nano12071145>.
- (59) Mudunkotuwa, I. A.; Anthony, T. R.; Grassian, V. H.; Peters, T. M. Accurate Quantification of TiO₂ Nanoparticles Collected on Air Filters Using a Microwave-Assisted Acid Digestion Method. *J. Occup. Environ. Hyg.* **2016**, *13* (1), 30–39. <https://doi.org/10.1080/15459624.2015.1072278>.
- (60) Dubenko, A. V.; Nikolenko, M. V.; Aksenenko, E. V.; Kostyniuk, A.; Likoza, B. Mechanism, Thermodynamics and Kinetics of Rutile Leaching Process by Sulfuric Acid Reactions. *Processes* **2020**, *8* (6), 640. <https://doi.org/10.3390/pr8060640>.
- (61) NOVELLO, G. Consorzi alghe-batteri per la bioremediation di contaminanti emergenti: il caso del glifosato. **2023**.