



Luigi Campanella, Cecilia Costanza  
Dipartimento di Chimica  
Università di Roma "La Sapienza"  
luigi.campanella@uniroma1.it  
cecilia.costanza@uniroma1.it

## FOTOSENSORE PER PROVE DI TOSSICITÀ. PARTE 2

*Alla ricerca di test di tossicità sempre più semplici, rapidi ed economici viene proposto un nuovo approccio teso a correlare la tossicità con la stabilità, in particolare a stress fotochimico. Il dispositivo sperimentale comprende un generatore monocromatico di luce ultravioletta, una sospensione di diossido di titanio in forma anatasio ed un rilevatore di potenziale elettrochimico di superficie.*

### Scopo del lavoro

In questo lavoro viene proposto come metodo innovativo un test chimico per la valutazione della persistenza ambientale, o ecopersistenza, correlata alla tossicità di un composto; questo test è un metodo alternativo alla sperimentazione animale tradizionale perché è un test non biologico in grado di fornire determinate informazioni sperimentali senza ricorrere all'impiego di animali.

I test di tossicità basati sulla valutazione della ecopersistenza possono avere sviluppi in campi completamente diversi dalle scienze ambientali e dalla tossicologia.

In questo iter si propongono alcune applicazioni atipiche, oltre a quelle tradizionali, del test di ecopersistenza, tramite fotocatalisi eterogenea con il fotosensore a biossido di titanio. Nel test qui esposto si assume tentativamente come indice di valutazione della *permanenza ambientale*  $P_{amb}$  o di *ecopersistenza* il rapporto tra il tempo  $t$  di ritardo o di attivazione necessario, a partire dal tempo zero, ad indurre la degradazione, e la pendenza  $s$  della curva del potenziale del  $TiO_2$  nel tempo  $s_{TiO_2}$

(V. Fig. 2, parte 1), dopo tale tempo; l'aumento del potenziale del  $TiO_2$  nel tempo corrisponde all'aumento nel tempo dell'acidità:

$$P_{amb} = t/s_{TiO_2}$$

In alcuni casi la degradazione si verifica senza bisogno di tempo di attivazione,  $t=0$ , pertanto  $P_{amb}=0$ , e, come indice di valutazione della capacità di degradazione, si assume  $s_{TiO_2}$ .

Tanto più è grande  $P_{amb}$ , tanto più la matrice testata può essere caratterizzata come recalcitrante e persistente al degrado: per i materiali per i quali la persistenza è una qualità positiva i valori alti di questo indice indicano la durabilità; per i materiali per i quali la persistenza è una qualità negativa, i valori alti di questo indice indicano la difficile degradabilità. Pertanto questo indice, pur essendo sempre lo stesso, viene utilizzato per fini diversi e con significati diversi a seconda della matrice testata, con lo scopo di studiare nel campo ambientale la determinazione dell'ecopersistenza di composti tossici marker anche su

matrici reali e viene determinato dopo aver effettuato, per via fotocinetica con biossido di titanio, la degradazione delle matrici reali semplici e complesse (in alcuni casi preliminarmente invecchiate artificialmente), dei composti organici, inquinanti e non.

### Applicazioni del test di ecopersistenza

Il test di ecopersistenza è stato inoltre applicato per lo studio della degradabilità e della persistenza ambientale di alcuni inquinanti recalcitranti, come coloranti, farmaci (tra questi anche i 6 farmaci studiati nella seconda fase del Progetto Europeo Rempharmawater al quale ha partecipato l'Italia), pesticidi, tensioattivi, effettuando anche, nel contempo, test di tossicità su alcuni di questi prima e dopo la fotodegradazione. Inoltre per la valutazione del rischio di sostanze inquinanti il test è anche applicato a due tipi di matrici reali, suoli e acque di fiumi, che per l'interazione della luce solare con specie fotosensibilizzanti, quali nitrati e acidi umici, possono essere in grado di produrre specie chimiche reattive che attivano la degradazione dell'inquinante [44]:

- due tipi di suoli (sabbioso ed argilloso) prima e dopo il trattamento con un chemioterapico inquinante; infatti le sostanze chemioterapiche o i metaboliti, usati in veterinaria, una volta somministrati all'animale, possono essere sparsi in forma diretta (animali portati al pascolo) o indiretta (utilizzo delle feci come concime);
- acque di tre diversi fiumi. Infatti anche se le acque di fiume sono in genere sottoposte a trattamento nei depuratori, alcune tecniche utilizzate negli impianti di trattamento dei reflui non sono in grado di eliminare completamente tutti i composti inquinanti [41, 42].

### Proporzionalità tra tossicità e $P_{amb}$

I clorofenoli (ChloroPhenols, CP) sono composti cancerogeni e in grado di condensare a clorodibenzodiossine, sono ampiamente diffusi nell'ambiente per le loro diverse applicazioni. Sono stati ampiamente prodotti a partire dagli anni Cinquanta e utilizzati come fungicidi, diserbanti, come conservanti del legno e come precursori per la produzione di clorofenossi erbicidi. L'esposizione occupazionale a clorofenoli si registra soprattutto negli impianti di produzione e nelle attività di trattamento del legno. In alcuni lavoratori esposti è stato riscontrato un aumento del livello urinario di clorofenoli e anche un aumento della concentrazione nel tessuto adiposo di dibenzodiossine e dibenzofurani.

Tab. 1 - Standard di qualità delle acque per alcuni alogenofenoli e pesticidi. La concentrazione fissata costituisce lo standard da rispettare nelle acque dolci superficiali (D), nelle lagune (L) e nelle acque marine (M)

Composto	-A- 2015 (µg/L)	-B- 2008 (µg/L)
2-Clorofenolo	1 D 0,1 M-L	10 D 1 M-L
3-Clorofenolo	1 D 0,1 M-L	5 D 0,5 M-L
4-Clorofenolo	1 D 0,1 M-L	4 D 0,4 M-L
Dieldrin	0,00005	0,0001
Dimetoato	0,01	0,1

Tab. 2 - Concentrazione soglia di contaminazione nel suolo e nel sottosuolo riferita alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare

	Siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (mg/kg espressi come ss)	Siti ad uso commerciale ed industriale (mg/kg espressi come ss)
2-Clorofenolo	0,5	25
Dieldrin	0,01	0,1

ni. La principale via di assorbimento sembra essere quella cutanea.

L'Allegato A al Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose (G.U. 8 gennaio 2004, n. 5 e D.M. 6 novembre 2003, n. 367) [45] definisce per le sostanze pericolose, individuate a livello comunitario, standard di qualità nella matrice acquosa e, per alcune di esse, standard di qualità nei sedimenti delle acque marino-costiere, lagunari e degli stagni costieri. Gli standard fissati sono finalizzati a garantire a breve termine la salute umana e a lungo termine la tutela dell'ecosistema acquatico. Per alcuni clorofenoli e alcuni pesticidi gli standard di qualità nelle acque sono riportati nella Tab. 1.

L'Allegato 5 del Titolo V (degli Allegati alla Parte Quarta) al T.U. 2006-03-29 concernente lo Schema di Decreto Legislativo recante norme in materia ambientale [46] individua la concentrazione soglia di contaminazione nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare e la concentrazione soglia di contaminazione nelle acque sotterranee (che sono riferibili anche a sostanze tossicologicamente affini). Questi valori sono riportati nelle Tab. 2 e 3 per un clorofenolo e per un pesticida.

Nel suolo sono presenti composti fenolici e chinonici derivati o dalla lignina o da altre molecole, sintetizzate dagli stessi microrganismi, i quali sono condensati ossidativamente per formare polimeri come costituenti di base del materiale umico [47-49]. Questo processo può avvenire attraverso reazioni chimiche, autoossidazioni o per mezzo di ossidazione con enzimi di origine microbica, quali fenolossidasi e perossidasi.

Il fenolo, per le sue proprietà antisettiche è usato come disinfettante; è una materia prima molto comune nella produzione di coloranti, di farmaci e di polimeri; è tossico e cancerogeno. L'idrochinone (paradifenolo) è facilmente ossidabile a chinone; per le sue proprietà riducenti è impiegato come rivelatore fotografico ed è un metabolita del benzene nell'organismo umano. Il benzene è primariamente metabolizzato dal fegato ad idrochinone per opera di un citocromo, il CYP2E1, altamente polimorfico nella popolazione umana. L'idrochinone, idrofilo, diffonde nell'organismo ed a livello del midollo osseo attraverso un enzima altamente polimorfico, la mieloperossidasi, viene trasformato

Tab. 3 - Concentrazione soglia di contaminazione nelle acque sotterranee

	Valore limite (µg/l)
2-Clorofenolo	180
Dieldrin	0,03

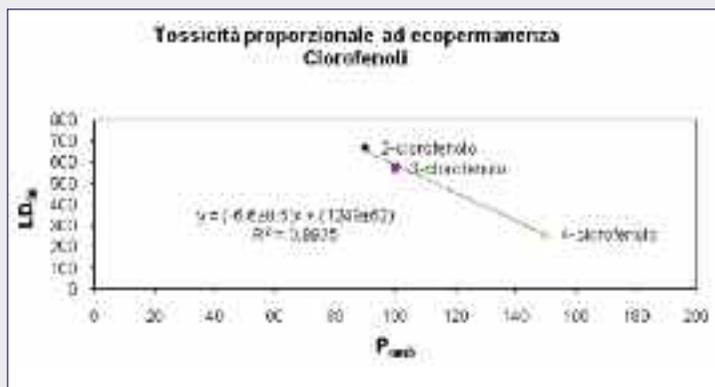


Fig. 3 - Tossicità  $\propto$   $P_{amb}$  per clorofenoli



Fig. 4 - Tossicità  $\propto$   $P_{amb}$  per pesticidi

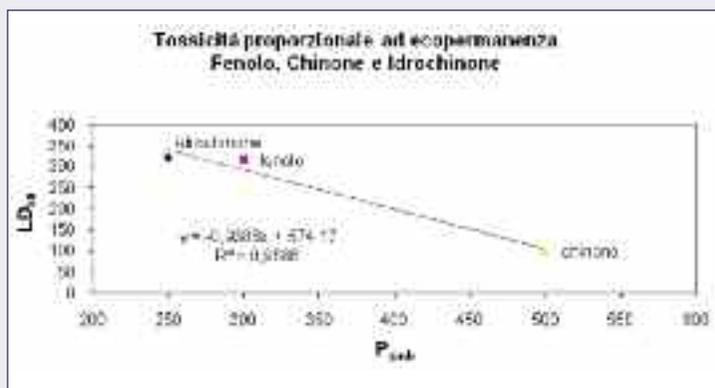


Fig. 5: Tossicità  $\propto$   $P_{amb}$  per fenolo, idrochinone e chinone

in un composto molto ematotossico: il benzochinone. Tuttavia il benzochinone può essere “detossificato” ad idrochinone e quindi escreto, tramite un altro enzima polimorfico la NAD(P)H deidrogenasi1, chinone (NQO1). Nella popolazione umana sono presenti soggetti caratterizzati da diverse “combinazioni” dei geni polimorfici che potranno essere più o meno “sfavorevoli”. Per esempio chi possiede una variante poco attiva del CYP2E1 produrrà poco idrochinone e se possiede anche una mieloperossidasi poco attiva produrrà pochissimo benzochinone. Se poi possiede anche una variante molto attiva di NQO1, il poco benzochinone formato verrà prontamente detossificato ad idro-

chinone che verrà escreto. Tali individui risulteranno assai “resistenti” agli effetti tossici conseguenti l’esposizione a benzene. Al contrario chi possiede una variante molto attiva del CYP2E1, così come per la mieloperossidasi, ed una variante inattiva o “lenta” di NQO1 accumula nel midollo elevati livelli di benzochinone [50].

In questo lavoro al fine di trovare una *relazione tra la tossicità e la persistenza ambientale* sono state eseguite prove su alcune molecole target inquinanti e tossiche (clorofenoli, pesticidi come aldrin, dieldrin e dimetoato, e fenolo, idrochinone, chinone), delle quali sono noti i valori di  $LD_{50}$  nella stessa specie animale, ratto, e tutte solubili in acqua. I risultati dei test di ecopersistenza, effettuati su soluzioni a concentrazione  $10^{-5}$  mol/L, sono in relazione lineare con i valori di tossicità (Fig. 3-5): la persistenza ambientale aumenta proporzionalmente al diminuire della  $LD_{50}$ .

## Parte sperimentale

### Materiali e Reagenti

#### Tipi di biossido di titanio

Il biossido di titanio utilizzato, Degussa P25 in prevalenza anatasio con un rivestimento di rutilo sulla superficie, è un biossido di titanio nanoparticellato, altamente disperso, fabbricato in accordo al processo AEROSIL®. (I dati chimico-fisici sono: area superficiale specifica:  $50 \pm 15$  m<sup>2</sup>/g; dimensione media delle particelle primarie: 21 nm; pH in una sospensione al 4%: 3,5-4,5).

#### Sostanze organiche

**Farmaci:** Ofloxacina, Diclofenac, Propranololo, Carbamazepina, Sulfametossazolo e Nifurossazide (Sigma); Acido Clofibrico (Aldrich); Acido salicilico (Merck); Betadine® (Soluzione commerciale al 10% di povidone ioduro).

**Coloranti:** Acid blue 29, Acid blue 1, Alizarin red S monohydrate e Reactive blue 2 (Aldrich); Rame II ftalocianina acido tetrasolfonico sale tetrasodico (Fluka).

**Pesticidi:** Carbendazim, Aldrin, Dieldrin, Terbutilazina e Dimetoato (Riedel de-Haën).

**Tensioattivi:** Triton X-114, Tween 60, Dodeciltrimetilammonio bromuro e Acido dodecilbenzenosolfonico sale sodico (Aldrich); Sodio dodecil-solfato e Tetrabuttilammoniotoluen-4-solfonato (Fluka).

#### Altri materiali

*o*-clorofenolo, *m*-clorofenolo, *p*-clorofenolo (Fluka), idrochinone (Merck), fenolo, *p*-chinone (Sigma).

Potassio cloruro (Sigma).

#### Suoli

Possono essere: franco-limosi (LR) o sabbiosi (SR).

I suoli sono stati seccati in stufa a 35 °C, macinati e setacciati al vaglio da 2 mm (standard); sono stati successivamente riposti in stufa su

Tab. 4 - CSC (capacità scambio cationico) e basi di scambio nei suoli franco-limosi (LR) e nei suoli sabbiosi (SR) irrigati per tre mesi con acqua di rete

Suolo	CSC (meq 100 g <sup>-1</sup> )	Na (meq 100 g <sup>-1</sup> )	Mg (meq 100 g <sup>-1</sup> )	K scamb (meq 100 g <sup>-1</sup> )	Ca (meq 100 g <sup>-1</sup> )
LR	37,27±0,16	0,90±0,01	3,59±0,04	2,08±0,04	30,69±0,15
SR	5,17±0,06	0,38±0,01	0,46±0,02	0,86±0,04	3,46±0,06

Tab. 5 - pH, carbonio organico, sostanza organica, azoto totale e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nei suoli franco-limosi (LR) e nei suoli sabbiosi (SR) irrigati per tre mesi con acqua di rete

Suolo	pH (unità)	C org. (g kg <sup>-1</sup> )	Sost. Org. (%)	N totale (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
LR	7,13±0,01	7,80±0,02	1,34±0,01	0,12±0,01	29,25±1,42
SR	7,60±0,01	4,37±0,02	0,75±0,01	0,07±0,01	96,16±2,80

strato sottile a 50 °C per 48 ore. I campioni di terreno sono stati prelevati dopo irrigazione di 3 mesi con acqua della rete di Roma. Le caratteristiche chimico-fisiche dei suoli testati sono riportate nelle Tab. 4 e 5.

#### Acque di fiumi

Campioni di acque prelevati dai fiumi Tevere, Aniene, Nilo.

#### Apparecchiature

*Sorgente di luce UV* - Polilight®, una sorgente luminosa di alta intensità con le seguenti caratteristiche: uso di filtri di interferenza di altissima qualità; lunghezza d'onda centrale UV-350 nm; larghezza di banda in nm per una trasmissione fino all'1%: 315-385.

*Per il test di persistenza ambientale* - Potenziometro Orion modello 420 A pH Meter per la determinazione del potenziale del TiO<sub>2</sub> (l'incertezza associata ad ogni lettura di potenziale del potenziometro è stata

di ±0,1 mV). L'apparecchiatura è illustrata in Fig. 6.

#### Misure di ecopersistenza

Il fotocatalizzatore biossido di titanio è stato utilizzato in due modi (in sospensione e, solo per alcune misure, anche immobilizzato):

1) in fase stazionaria *immobilizzato* sotto forma di *elettrodo a stato solido*. Il fotoreattore è una beuta di vetro Pyrex da 100 mL (con un foro laterale in basso chiuso da

un tappo di gomma, contenente all'interno un filo di Pt sul quale sono immobilizzati con colla 30 mg di TiO<sub>2</sub>). Il Polilight a 350 nm è stato posto all'esterno del fotoreattore. Per ogni misura è stato utilizzato un volume di 50 mL di una soluzione acquosa di un composto organico; 2) *in sospensione* con la sospensione a fungere da elettrodo. Il fotoreattore è un becker di vetro Pyrex da 150 ml. Il Polilight a 350 nm è stato posto all'interno del fotoreattore ad una distanza di 0,5 cm dalla superficie libera della sospensione. Per ogni analisi la sospensione è formata da 50 mg di TiO<sub>2</sub> in 105 mL di

- soluzione di sostanza organica alla concentrazione esaminata;
- acqua di fiume.

Come elettrodo di riferimento si è usato un elettrodo a calomelano saturo, collegato al fotoreattore da un ponte salino a KCl 3 M.

Il sistema è stato rivestito da fogli di alluminio per la protezione dell'operatore dai raggi UV.

Per raggiungere un adsorbimento equilibrato del TiO<sub>2</sub> nella soluzione



Fig. 6 - Apparecchiatura per il test di ecopersistenza

della sostanza organica o nella sospensione e per la stabilizzazione dell'elettrodo, prima dell'irradiazione, il fotoreattore è stato mantenuto per 30 minuti al buio costantemente sotto agitazione. Dopo l'accensione del Polilight e dopo la ristabilizzazione dell'elettrodo, il potenziale del TiO<sub>2</sub> è stato rilevato durante il tempo di irradiazione ad intervalli costanti di 10 minuti per l'intera durata dell'analisi. Durante l'irradiazione il fotoreattore è stato sempre mantenuto sotto agitazione per avere una sospensione omogenea, per promuovere l'adsorbimento sulla superficie del TiO<sub>2</sub> ed evidenziare l'assorbimento a luce UV.

La durata delle misure analitiche di fotodegradazione per la determinazione dell'indice di ecopersistenza è stata:

- 240 minuti per coloranti, farmaci, per gli inquinanti pesticidi e tensioattivi, per entrambi i suoli;
- 480 minuti per le acque di fiume (per le acque del Tevere e del Nilo sono state effettuate ulteriori misure protrando la fotodegradazione fino a 40 ore, tuttavia senza variazioni apprezzabili rispetto ai risultati ottenuti dopo 480 minuti).

*Metodi, procedure, misure di conferma e di confronto per la possibile validazione del test di ecopersistenza*

Per la possibile validazione del test di ecopersistenza sono stati utilizzati metodi di conferma e metodi di confronto in grado di fornire informazioni esaustive o complementari con uno o più indici di valutazione per la quantificazione al livello di interesse della qualità del metodo di ecopersistenza qui sviluppato.

L'aumento del potenziale del biossido di titanio durante l'irradiazione UV corrisponde a pH più acidi ed a crescenti concentrazioni di radicali superossido, che si formano sia per reazione degli elettroni della banda di conduzione del TiO<sub>2</sub> con l'ossigeno (V. eq. 4, Schema, parte 1), sia dalla degradazione del composto organico (V. eq. 11, Schema, parte 1). Durante la fotodegradazione aumenta anche la conducibilità specifica nel tempo di irradiazione perché aumenta la concentrazione di specie ioniche. Inoltre la fotodegradazione di un composto organico non è un processo che garantisce, in sé, un miglioramento della qualità ambientale, in quanto si potrebbero formare prodotti di degradazione addirittura più tossici del prodotto di partenza; viceversa, attraverso il processo di mineralizzazione, si producono solo H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e acidi minerali volatili. La fotodegradazione costituisce, comunque, una condizione necessaria, ma non sufficiente, per ottenere una mineralizzazione.

Pertanto, a conferma del test di ecopersistenza, è stata utilizzata una combinazione di metodi sensoristici e biosensoristici, e la degradazione fotochimica è stata monitorata oltre che attraverso il fotosensore di biossido di titanio, materiale fotocatalizzatore e fotosensore di acidità, già descritto, anche attraverso:

- un biosensore a superossido dismutasi (SOD) per la misura della concentrazione dei radicali liberi superossido;
- un sensore per la misura della conducibilità specifica nel tempo;
- un biosensore a cellule di lievito per la determinazione della tossicità

delle soluzioni di inquinanti prima e dopo la fotodegradazione.

Inoltre gli spettri UV-vis sulle soluzioni delle sostanze organiche prima e dopo la fotodegradazione permettono di determinarne l'efficienza.

Il protocollo di procedura applicato fornisce, attraverso questi sensori, un insieme di indici quantizzabili di persistenza ambientale, di concentrazione radicalica, di conducibilità, di tossicità, di efficienza di abbattimento, che permettono di conoscere lo stato di degradazione e che possono essere applicati per le diverse finalità delle matrici differenti.

## Risultati e discussione

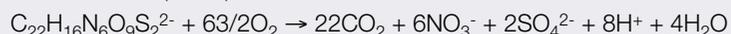
### *Inquinanti e matrici ambientali*

#### *Coloranti*

Sono stati testati cinque coloranti di differente struttura chimica (Tab. 6): azoica (acid blue 29), antrachinonica (alizarin red S monohydrate e reactive blue 2), metalloorganica (rame II ftalcianina acido tetrasolfonico sale tetrasodico), poliaromatica (acid blue 1); i primi due coloranti sono stati testati anche con il sistema TiO<sub>2</sub> immobilizzato-Polilight" esterno.

Le equazioni stechiometriche dell'ossidazione totale dei coloranti sono:

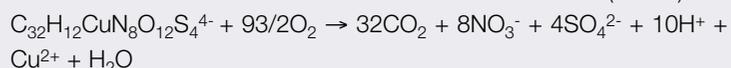
- acid blue 29 (AB29):



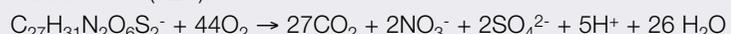
- alizarina red S monohydrate (ARS):



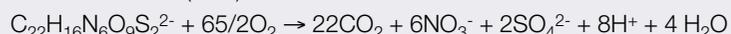
- rame II ftalcianina acido tetrasolfonico sale tetrasodico (CuPht):



- acid blue 1 (AB1):



- reactive blue 2 (RB2):



Coloranti Formula bruta (senza idratanti)	Formula di struttura	Conc. (M)	Area (m <sup>2</sup> /min)	P <sub>amb</sub> (m <sup>2</sup> /min)
Rame II Ftalcianina acido tetrasolfonico sale tetrasodico C <sub>32</sub> H <sub>12</sub> CuN <sub>8</sub> O <sub>12</sub> S <sub>4</sub> N <sub>4</sub> (964,24)		10 <sup>-5</sup>	0,107140 000	0
Acid blue 29 C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (516,50)		10 <sup>-5</sup>	0,051140 004	0
Alizarin red S monohydrate C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> SNa · H <sub>2</sub> O (301,28)		10 <sup>-5</sup>	0,051140 006	0
Acid blue 1 (Patentblau V F. C. I. 42045) C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (558,68)		10 <sup>-5</sup>	0,075440 000	0
Reactive blue 2 C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (516,50)		10 <sup>-5</sup>	-	170,140 1

Tab. 6 - Indici di degradabilità s<sub>TiO2</sub>, P<sub>amb</sub> per soluzioni di coloranti 10<sup>-5</sup> M

Tab. 7 - Indici di persistenza ambientale  $P_{amb}$  per soluzioni di coloranti  $10^{-4}$  M (per acid blue 29 anche  $10^{-3}$  M e  $10^{-5}$  M) determinati con il sistema  $TiO_2$  immobilizzato-Polilight® esterno

Coloranti	Conc. (M)	$P_{amb}$ (min <sup>2</sup> /mV)
Acid blue 29	$10^{-3}$	n.d.*
	$10^{-4}$	n.d.*
	$10^{-5}$	n.d.*
Alizarina red S monoidrato	$10^{-4}$	n.d.*

\* n.d. = non determinabile: non si riesce a stimare la persistenza ambientale perché il potenziale del  $TiO_2$  continua a diminuire per l'intera durata delle analisi (protratta sino a 8 ore)

In Tab. 6 sono riportati i risultati degli indici di degradabilità  $s_{TiO_2}$  e di persistenza ambientale  $P_{amb}$  per i coloranti testati alla concentrazione usata.

Per CuPht, AB29, AB1, ARS il potenziale (pH) del  $TiO_2$  aumenta subito (diminuisce) in funzione del tempo di irradiazione, senza necessità di tempo di attivazione, perché inizia subito la degradazione ossidativa del colorante a  $CO_2$ ,  $H_2O$  e acidi minerali; poiché il tempo di attivazione è 0, anche  $P_{amb}$  è 0, pertanto è stato assunto come indice di degradabilità la pendenza della curva del potenziale del  $TiO_2$  nel tempo:  $s_{TiO_2}$ . Per il reactive blue 2  $P_{amb}$  è  $\neq 0$ .

I coloranti presentano atomi di zolfo: AB1 ha due gruppi solfonici posti sull'anello benzenico, AB29 ha due gruppi solfonici, posti entrambi sull'insieme naftalenico poco reattivo; ARS ha il gruppo solfonico posto sull'anello del diidrossibenzeno più reattivo di altre parti della molecola per la presenza di gruppi donatori OH, CuPht ha quattro gruppi solfonici posti sugli anelli benzenici dei gruppi isoindolici, RB2 ha tre gruppi solfonici uno sull'anello antrachinonico poco reattivo, malgrado la presenza del gruppo donatore  $NH_2$ , gli altri due sui due diversi anelli benzenici.

Dai dati riportati in Tab. 6 si possono ricavare la scala di degradabilità:  $CuPht > AB29 > AB1 > ARS > RB2$

in accordo con i risultati della letteratura [2, 3, 51]. Nel colorante rame ftalocianina la presenza dello ione  $Cu^{2+}$ , al centro della molecola simmetrica, in condizioni aerobiche previene la ricombinazione elettrone-lacuna (eq. 17), favorendo così la reazione di ossidazione in accordo a quanto riportato in letteratura [52]. L'alizarina e il reactive blue 2 con anello antrachinonico poco reattivo risultano i coloranti meno degradabili. L'alizarina ha il più basso coefficiente stechiometrico di formazione dell' $H^+$  rispetto agli altri coloranti, nel tempo si possono verificare reazioni successive di consumo del protone. Il Reactive blue 2 risulta persistente e l'aumento di pH all'inizio della fotodegradazione potrebbe essere correlato alla formazione di ammoniaca come ioni ammonio derivanti dalla degradazione del gruppo amminico.

I coloranti: acid blue 29 e alizarin red S monohydrate sono stati anche testati con il sistema  $TiO_2$  immobilizzato-Polilight esterno (Tab. 7).

Per entrambi i coloranti il potenziale (pH) del  $TiO_2$  diminuisce (aumenta) nel tempo, non raggiunge il minimo e non aumenta, non si riesce

così a stimare la  $P_{amb}$ . H. Lachheb *et al.* [2] e C. Guillard *et al.* [3] hanno studiato la degradazione fotocatalitica dell'alizarina e di altri coloranti e l'influenza della struttura chimica del colorante sulla degradazione fotocatalitica. Per quanto riguarda le cinetiche delle variazioni del pH durante la reazione di mineralizzazione dell'alizarina, in accordo alla stechiometria della reazione generale di ossidazione, il pH del mezzo di reazione dovrebbe diminuire; tuttavia il pH in una sospensione di  $TiO_2$ , irradiata dall'UV, è un parametro piuttosto complesso dal momento che esso influenza: a) l'equilibrio di dissociazione dell'acqua, b) la carica superficiale del titanio rispetto al suo pzc (punto di carica zero), c) lo stato di reazione dei reagenti organici e dei loro metaboliti. Il pH influenza contemporaneamente lo stato superficiale del titanio e lo stato di ionizzazione di molecole organiche ionizzabili.

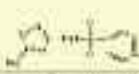
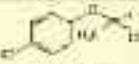
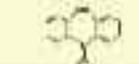
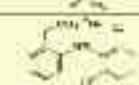
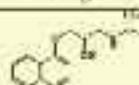
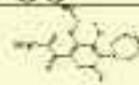
L'alizarina ha il più basso coefficiente stechiometrico di formazione dell' $H^+$  rispetto agli altri coloranti. L'aumento di pH nel tempo potrebbe essere correlato a reazioni successive di consumo del protone, e, per l'acid blue 29, principalmente alla formazione di ammoniaca come ioni ammonio derivanti dalla degradazione di gruppi amminici.

Dal confronto tra i dati delle Tab. 6 e 7 si nota che il sistema  $TiO_2$  in sospensione-Polilight interno funziona meglio in generale del sistema  $TiO_2$  immobilizzato-Polilight esterno per le soluzioni di coloranti, anche a parità di concentrazione (acid blue 29  $10^{-5}$  M); ciò è attribuibile alla mancanza di fenomeni di riflessione che si possono verificare con il Polilight all'esterno della beuta, ad un'irradiazione maggiore ed uniforme con il Polilight interno, ad una maggiore superficie attiva del catalizzatore in sospensione rispetto al  $TiO_2$  immobilizzato.

### Farmaci

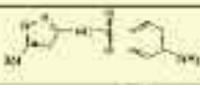
#### Farmaci - $TiO_2$ immobilizzato - Polilight esterno

Sono stati testati i 6 farmaci studiati nella seconda fase del Progetto Europeo Rempharmawater al quale ha partecipato l'Italia: ofloxacina

Farmaci	Formula bruta (peso molecolare) (F.M. 253.50)	Formula di struttura	Conc. (M)	$P_{amb}$ (min <sup>2</sup> /mV)
Sulfamonomessazolo	$C_{12}H_{11}N_3O_2S$ (F.M. 253.50)		$10^{-3}$	2.500±35
Acido Clotfonico	$C_{12}H_{11}ClO_2$ (F.M. 214.65)		$10^{-3}$	1.428±69
Carbamazepina	$C_{15}H_{13}N_3O$ (F.M. 236.30)		$10^{-3}$	1.222±33
Didofenac	$C_{17}H_{15}Cl_2NO_2Na$ (F.M. 317.10)		$10^{-3}$	80.0±2.3
Propranololo	$C_{17}H_{25}NO_2$ (F.M. 285.50)		$10^{-3}$	45.50±0.95
			$10^{-4}$	2.200±134
Ofloxacina	$C_{18}H_{20}FN_3O_3$ (F.M. 361.40)		$10^{-3}$	5.55±0.64

Tab. 8 - Indice di persistenza ambientale  $P_{amb}$  per soluzioni di farmaci  $10^{-3}$  M (per propranololo anche  $10^{-4}$  M). Il  $TiO_2$  è immobilizzato. Il Polilight è esterno

SICUREZZA

Farmaci Formula bruta (P.M. g/mol)	Formula chimica	Conc. (mol/L)	$P_{amb}$ ( $min^2/mV$ )
Sulfametossazolo $C_{10}H_{11}N_3O_2S$ (243,3)		$10^{-3}$	$756 \pm 50$
		$10^{-4}$	$337 \pm 15$
		$10^{-5}$	$130 \pm 10$
Acido salicilico $C_7H_6O_3$ (138,12)		$10^{-4}$	n.d.*
Acido Clofibrico $C_{11}H_{11}ClO_2$ (214,65)		$2,8 \cdot 10^{-5}$	$364 \pm 30$
Betadine $(C_9H_9I_2NO) n \cdot lx$		416 mg/l (10% principio attivo)	n.d.*
Nifurossazide (275,25)		$9,7 \cdot 10^{-6}$	$24,19 \pm 0,61$

\* n.d. = non determinabile: non si riesce a stimare la persistenza ambientale perché il potenziale del  $TiO_2$  continua a diminuire per l'intera durata delle analisi (protratta sino a 8 ore)

Tab. 9 - Indice di persistenza ambientale  $P_{amb}$ , per soluzioni di farmaci.  $TiO_2$  in sospensione-Polilight interno

(farmaco antibatterico ad ampio spettro), diclofenac (farmaco antinfiammatorio non steroideo), propranololo (farmaco betabloccante, antiaritmico, antiipertensivo), carbamazepina (farmaco antiepilettico, analgesico), acido clofibrico (farmaco antiiperlipoproteico, che agisce sulla biosintesi del colesterolo), sulfametossazolo (sulfamidico isossazolico).

In Tab. 8 sono riportati le loro formule brute e di struttura, la concentrazione usata, l'indice di persistenza ambientale  $P_{amb}$ .

Dai dati di  $P_{amb}$  riportati in Tab. 8 si deduce che: sulfametossazolo, acido clofibrico e carbamazepina sono, nell'ordine, i farmaci più persistenti nell'ambiente perché i valori di  $P_{amb}$  sono dell'ordine di grandezza di  $10^3 \text{ min}^2/\text{mV}$ ; diclofenac, propranololo, ofloxacina sono i meno persistenti nell'ambiente perché i valori di  $P_{amb}$  sono dell'ordine di grandezza di  $10^1 \text{ min}^2/\text{mV}$  per i primi due e di  $10^0 \text{ min}^2/\text{mV}$  per il terzo; i valori di  $P_{amb}$  per il propranololo in soluzione  $10^{-4} \text{ M}$  dimostrano che, all'aumentare della diluizione, la fotodegradazione con il  $TiO_2$  immobilizzato ed il Polilight esterno è meno efficiente.

#### Farmaci - $TiO_2$ in sospensione - Polilight interno

Sono stati testati i farmaci: sulfametossazolo e acido clofibrico (i farmaci più persistenti con l'elettrodo a  $TiO_2$  immobilizzato), acido salicilico (farmaco antifungino, antipiretico, cheratolitico) per studiare l'effetto del gruppo -COOH sulla degradabilità, Betadine (soluzione antisettica e antibatterica) per studiare l'effetto di una miscela e non di una singola sostanza, nifurossazide (farmaco antidiarroico).

In Tab. 9 sono riportati i farmaci studiati, le loro formule brute e di struttura, la concentrazione usata, l'indice di persistenza ambientale  $P_{amb}$ . Per l'acido salicilico e per il Betadine il potenziale (pH) del  $TiO_2$  diminuisce (aumenta) nel tempo, non raggiunge il minimo e non aumenta, non si riesce così a stimare la persistenza ambientale, per l'acido sali-

cilico probabilmente per la presenza del gruppo -COOH dal momento che  $P_{amb}$  è un parametro collegato all'acidità; per la sua composizione in miscela che lo rende resistente alla degradazione fotochimica. L'acido clofibrico, pure a basse concentrazioni, si conferma un farmaco persistente ( $P_{amb}=3.638 \text{ min}^2/\text{mV}$ ), anche se di meno del Betadine, probabilmente perché composto puro e non miscela.

La Nifurossazide è risultato il farmaco meno ecopersistente ( $P_{amb}=24,19 \text{ min}^2/\text{mV}$ ).

#### Matrici ambientali

##### Suoli

Si è studiato l'effetto sul suolo della presenza della soluzione di un inquinante, il sulfametossazolo (seconda fase del Progetto Europeo Rempharmawater). Tale farmaco è stato scelto perché è tra i più persistenti nell'ambiente, come risulta anche dai valori elevati (notevolmente più alti rispetto a quelli degli altri farmaci) di  $P_{amb}$  determinati in questo lavoro. Gli andamenti del potenziale del biossido di titanio in funzione del tempo di irradiazione con luce UV e i risultati del test di persistenza ambientale (Tab. 10) confermano che la presenza della soluzione di sulfametossazolo determina un notevole aumento della persistenza ambientale per entrambi i tipi di suoli:  $P_{amb}$  ( $min^2/\text{mV}$ ) aumenta da 0 (sabbioso + acqua) a 632 (sabbioso + sulfametossazolo) e da 24 (limoso + acqua) a 2.979 (limoso + sulfametossazolo); la differenza di  $P_{amb}$  tra i due tipi di suoli non trattati (0 per il sabbioso e 24 per il limoso) può essere attribuita al più elevato contributo in sostanza organica del suolo limoso rispetto al suolo sabbioso (vedi Tab. 5); per innescare la degradazione degli acidi umici e della sostanza organica è richiesto infatti un tempo di attivazione di 20 minuti per il suolo limoso rispetto a 0 minuti per il sabbioso. I suoli limosi hanno capacità di scambio cationico più elevata dei suoli sabbiosi (Tab. 4) e pertanto una maggiore disponibilità di elementi nutritivi, i suoli sabbio-

Tab. 10 - Risultati del test di persistenza ambientale per suoli sabbiosi e limosi trattati e non con sulfametossazolo

Tipi di suolo (1 g)	$P_{amb}$ ( $min^2/mV$ )
Sabbioso + Sulfametossazolo $10^{-4} \text{ M}$	$632 \pm 30$
Sabbioso + Acqua	$0,0 \pm 0,0$
Limoso + Sulfametossazolo $10^{-4} \text{ M}$	$2,979 \pm 150$
Limoso + Acqua	$24 \pm 1$

Tab. 11 - Indici di ecopersistenza per acque di fiume.

Acque di fiumi	$P_{amb}$ ( $min^2/mV$ )
Tevere	n.d.*
Aniene	$12,93 \pm 0,01$
Nilo	n.d.*

\* n.d. = non determinabile: non si riesce a stimare la persistenza ambientale perché il potenziale del  $TiO_2$  continua a diminuire per l'intera durata delle analisi, protratta sino a 40 ore, per le acque del Tevere e del Nilo

si hanno bassa capacità di scambio cationico e quindi bassa capacità di trattenere gli elementi nutritivi.

Il fotosensore può quindi trovare applicazioni nel monitoraggio di bonifiche o biorisanamento.

#### Acque di fiumi

In Tab. 11 sono riportati gli indici di ecopersistenza per le acque di fiume testate.

Per le acque del Tevere e del Nilo il potenziale (pH) del  $TiO_2$  diminuisce (pH aumenta) nel tempo, ed è impossibile stimare il valore di ecopersistenza: si può quindi concludere che la degradazione è molto scarsa e molto lenta probabilmente per formazione di ioni ammonio da reazioni di consumo di protoni nelle acque e formazione dell'ammoniacca dalla degradazione dei gruppi amminici e per la carica batterica presente in tali acque.

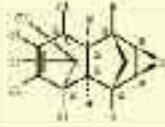
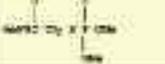
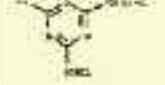
Dai dati riportati in Tab. 11, benché si tratti di matrici complesse per le quali non si potrebbe nemmeno effettuare un confronto, si può concludere che la scala di persistenza è:

Tevere  $\approx$  Nilo  $\gg$  Aniene.

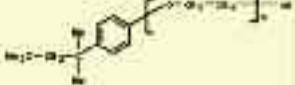
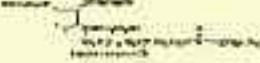
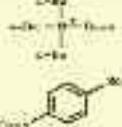
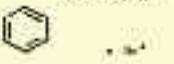
#### Pesticidi

In Tab. 12 sono riportati i pesticidi testati: dieldrin (pesticida organoclorurato), dimetoato, carbendazim (pesticida benzimidazolico), terbutilazina (erbicida s-triazinico), le loro formule brute e di struttura, la concentrazione usata, gli indici di persistenza ambientale  $P_{amb}$ .

Dai valori riportati in Tab. 12 si deduce che la terbutilazina è un pesticida poco persistente; in letteratura [53] la rapida degradazione della terbutilazina è spiegata dalla formazione di specie reattive durante l'irradiazione, dalla reazione dei radicali  $OH^\bullet$  preferenzialmente con i gruppi alchilici, dalla successiva idrossilazione della molecola in posizione 2. La  $P_{amb}$  del dimetoato è attribuibile probabilmente alla presenza di

Pesticidi Formula bruta (peso molecolare)	Formula di struttura	Conc. (M)	$P_{amb}$ ( $min^2/mV$ )
Dieldrin $C_{12}H_8Cl_{10}O$ (380,91)		$1 \times 10^{-5}$	$200 \pm 10$
Dimetoato $C_8H_{12}NO_2PS_2$		$4,93 \times 10^{-5}$	$133 \pm 10$
Carbendazim $C_9H_7N_3O_2$ (191,19)		$1 \times 10^{-4}$	$104 \pm 8$
Terbutilazina $C_8H_{10}ClN_6$ (229,71)		$1 \times 10^{-4}$	$5,4 \pm 0,2$

Tab. 12 - Indici di persistenza ambientale  $P_{amb}$  per soluzioni di pesticidi

Tensioattivo Formula bruta (peso molecolare)	Formula di struttura	Conc. (M)	$P_{amb}$ ( $min^2/mV$ )
Triton X-114 $C_{20}H_{34}O_7$ (364,79)		$10^{-4}$	$400 \pm 10$
Tween 60 $C_{24}H_{46}O_{10}$ (478,72)		$10^{-4}$	$18 \pm 2$
Tetrabutylammonio-4-cluansolfonato $C_{24}H_{44}NO_4S$ (413,67)		$10^{-4}$	$128 \pm 14$
Sodio dodecilsolfato $C_{12}H_{25}O_4SNa$ (288,39)	$CH_3-(CH_2)_{11}-OSO_3Na^+$	$10^{-4}$	5,1
Dodeciltrimetilammonio bromuro $C_{12}H_{27}NBr$ (306,35)	$CH_3-(CH_2)_{11}-N(CH_3)_3Br$	$10^{-4}$	$0,13 \pm 0,02$
Sodio dodecil benzensolfonato $C_{12}H_{25}SO_3Na$ (348,48)		$10^{-4}$	$418 \pm 11$

Tab. 13 - Indici di persistenza ambientale  $P_{amb}$  per soluzioni di tensioattivi

numerosi eteroatomi nella sua molecola (3 atomi di O, 2 atomi di S, 1 atomo di P). La  $P_{amb}$  del dieldrin può essere spiegata, in accordo con la letteratura [54], attraverso l'interazione coulombiana elettronica tra la molecola del pesticida e i siti attivi sulla superficie del biossido di titanio; infatti il dieldrin presenta sei atomi di cloro, ciascuno dei quali possiede tre coppie di elettroni non legati nella sua banda di valenza, pertanto l'alta densità elettronica attorno alla struttura del carbonio può promuovere legami elettrostatici tra gli atomi di alogeno e i siti attivi positivi sulla superficie del catalizzatore. La  $P_{amb}$  del carbendazim è probabilmente dovuta alla presenza dell'anello benzimidazolico e del gruppo estereo. La scala di persistenza ambientale dei pesticidi testati è: dieldrin > dimetoato > carbendazim > terbutilazina.

#### Tensioattivi

In Tab. 13 sono riportati i tensioattivi testati: non ionici (triton X-114, tween 60), cationici (dodeciltrimetilammonio bromuro, tetrabutylammoniotoluen-4-solfonato), anionici (sodio dodecilsolfato, acido dodecilbenzensolfonico sale sodico), le loro formule brute e di struttura, la concentrazione usata, gli indici di persistenza ambientale  $P_{amb}$  e l'efficienza di degradazione X%, ricavata dagli spettri UV-vis.

Sodio dodecilsolfato (SDS) e dodeciltrimetilammonio bromuro (DTA Br) hanno la più bassa  $P_{amb}$  probabilmente per la presenza nella loro molecola solo di lunghe catene alifatiche; la presenza dell'anello benzenico e delle lunghe catene alifatiche rende il sodio dodecilbenzensolfonato (Na DBS) e tetrabutylammoniotoluen-4-solfonato (TBATS) i



tensioattivi a più alta  $P_{amb}$ . La scala di persistenza ambientale dei tensioattivi testati è:

Na DBS > Triton x-114 > TBATS > Tween 60 > SDS > DTA Br.

### Discussione dei risultati di matrici ambientali

In generale c'è una correlazione tra la degradazione, la concentrazione della sostanza da degradare ed il tipo di sostanza; la concentrazione dei radicali cresce nel tempo, quindi la reazione di fotodegradazione avviene sotto il controllo radicalico.

I risultati ottenuti per le categorie di composti studiati hanno mostrato la bassa persistenza ambientale di:

- dei farmaci: ofloxacina, propranololo, diclofenac;
- di tutti i coloranti fotodegradati con il  $TiO_2$  in sospensione (rispetto alla più alta persistenza ambientale dei coloranti fotodegradati con il  $TiO_2$  immobilizzato);
- del pesticida terbutilazina;
- dei tensioattivi sodio dodecilsolfato e sodio dodecilbenzensolfonato, in accordo con la letteratura.

Il sistema  $TiO_2$  immobilizzato-Polilight esterno funziona meglio all'aumentare della concentrazione; il sistema  $TiO_2$  in sospensione-Polilight interno funziona meglio, invece, all'aumentare della diluizione. In generale il sistema  $TiO_2$  in sospensione-Polilight interno funziona meglio del sistema  $TiO_2$  immobilizzato-Polilight esterno per la mancanza di fenomeni di riflessione, per l'irradiazione maggiore ed uniforme, per la maggiore superficie attiva del catalizzatore in sospensione rispetto al  $TiO_2$  immobilizzato, come si nota dal confronto degli indici di persistenza ambientale, di degradabilità, di efficienza di degradazione.

### Conclusioni

Questa ricerca ha proposto un fotosensore a base di biossido di titanio per la stima della permanenza ambientale con applicazioni a:

- valutazione della persistenza di sostanze inquinanti,
- misura del danno ambientale (suolo, acque).
- con l'osservanza del principio di precauzione per la tutela della salute umana, per la salvaguardia dell'ambiente.

### Bibliografia

- [44] R. Andreozzi *et al.*, *Chemosphere*, 2003, **50**(10), 1319.
- [45] D.M. 6 novembre 2003, n. 367 "Regolamento concernente la fissazione di standard di qualità nell'ambiente acquatico per le sostanze pericolose", ai sensi dell'art. 3, comma 4, del decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152. (G.U. 8 gennaio 2004, n. 5).
- [46] T.U. 2006-03-29 concernente lo Schema di Decreto Legislativo recante norme in materia ambientale.
- [47] W. Flaig *et al.*, Chemical composition and physical properties of humic substances, in *Soil Components*, J.E. Gieseking (Ed.), Vol 1, pag. 1-211, Springer-Verlag, New York, 1975.
- [48] K. Haider *et al.*, Humus chemistry, in *Soil Biochemistry*, E.A. Paul, A.D. McLaren (Eds.), **4**, 195-244, Marcel Dekker, New York, 1975.
- [49] R.D. Sjoblad, J.M. Bollag, Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms, in *Soil Biochemistry*, E.A. Paul, J.N. Ladd (Eds.), **5**, 113-152, Marcel Dekker, New York, 1981.
- [50] R. Barale, "Le basi genetiche della suscettibilità individuale", *Genetica, Mutagenesi ed Epidemiologia Ambientale*, Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Università di Pisa.
- [51] Y. Du, J. Rabani *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 11970.
- [52] Z. Ling *et al.*, *J. Chem. Soc., Faraday Transaction*, 1995, **91**(5), 917.
- [53] Y. Sanlaville *et al.*, *Chemosphere*, 1996, **33**(2), 353.
- [54] E.R. Bandala *et al.*, *Catalysis Today*, 2002, **76**, 189.

## ABSTRACT

### Photosensor for Toxicity Tests. Part 2

Always looking for faster, cheaper and simpler toxicity tests we designed, realised and checked an experimental tool able to combine chemical catalysis, photochemical degradation and surface potential variation in order to establish an index related to the toxicity of a tested compound or matrix.