



Università degli studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso magistrale di laurea in

SCIENZE CHIMICHE

Tesi di laurea

**DETERMINAZIONE DI MICROCONTAMINANTI
ORGANICI NELL'AMBIENTE ANTARTICO
MEDIANTE TECNICHE DI SPETTROMETRIA DI
MASSA E CAMPIONAMENTO PASSIVO**

Relatore

Prof. Emanuele Magi

Correlatrici

Prof.ssa Marina Di Carro

Prof.ssa Anna Maria Cardinale

Candidata

Beatrice Cossu

Anno Accademico

2022/2023

INDICE

1 SCOPO DELLA TESI	3
2 INTRODUZIONE	5
2.1 L'Antartide.....	5
2.2 Contaminanti emergenti	6
2.3 Il progetto Matisse	6
3 CONTAMINANTI AMBIENTALI.....	8
3.1 Contaminanti emergenti.....	8
3.2 Interferenti endocrini.....	10
3.3 Scelta e descrizione degli analiti	11
3.3.1 Farmaci	11
3.3.1.1 FANS.....	12
3.3.1.2 Diuretici.....	13
3.3.1.3 Antibiotici.....	13
3.3.1.4 Anticonvulsioni	14
3.3.1.5 Broncodilatatori.....	14
3.3.1.6 Ipolipidemizzanti.....	15
3.3.1.7 β -bloccanti	16
3.3.2 Filtri UV.....	16
3.3.3 Estrogeni	18
3.3.4 Composti perfluorurati	19
3.3.5 Stimolanti	20
3.3.6. Additivi	23
3.3.7 Diserbanti e fertilizzanti.....	24
4 MATERIALI E METODI	26
4.1 Solventi utilizzati e standard di riferimento	26
4.2 Prelievo dei campioni.....	27
4.3 Metodo di preparazione del campione	29

4.4 Ottimizzazione del metodo	30
4.5 Valutazione del recupero delle SPE	32
4.6 Analisi strumentale	33
5 STRUMENTAZIONE	35
5.1 Il campionamento passivo	35
5.2 La cromatografia	40
5.2.1 Le grandezze cromatografiche.....	40
5.2.1.1 L'efficienza, la ritenzione e la selettività	40
5.2.2 La Cromatografia liquida ad elevate prestazioni	41
5.3 La spettrometria di massa	42
5.3.1 La sorgente ESI	44
5.3.2 Il triplo quadrupolo	47
5.3.3 Il detector	50
6 RISULTATI E DISCUSSIONE	51
6.1 Prove per il trasferimento a secco	51
6.2 Recuperi SPE	56
6.3 Analisi campioni del porto di Genova.....	58
6.4 Analisi campioni antartici	60
6.4.1 Risultati di Road Bay.....	60
6.4.2 Risultati del depuratore	62
6.5 Confronti.....	72
6.5.1 Confronto tra campagne antartiche diverse	72
6.5.2 Confronto tra i livelli del depuratore e nel mare di Road Bay.....	75
6.5.3 Confronto tra concentrazione nelle SPE e nei POCIS.....	76
6.5.4 Confronto tra scarichi di altre base antartiche	77
7 CONCLUSIONI.....	81
8 APPENDICE.....	83
9 BIBLIOGRAFIA.....	87

1 SCOPO DELLA TESI

Il seguente lavoro di tesi è stato svolto nei laboratori dell'Unità Operativa di Chimica Analitica Ambientale del Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale dell'Università degli studi di Genova.

Negli ultimi anni il problema dei contaminanti emergenti si è fatto sempre più rilevante e per questa ragione sono necessari dei monitoraggi continui. Nel seguente lavoro di tesi si è preso in esame l'ambiente marino, in particolare quello antartico, che risulta essere quello meno soggetto all'inquinamento umano. L'Antartide, infatti, se si escludono le basi scientifiche in cui vivono i ricercatori, risulta essere disabitato perciò i livelli di concentrazione dei contaminanti emergenti saranno i più bassi del nostro pianeta. Attualmente non esistono dei sistemi in grado di depurare l'acqua dai contaminanti emergenti, per questo è importante monitorarli. Una parte della contaminazione è sicuramente riconducibile all'impatto antropico delle persone che risiedono in Antartide, ma un contributo importante è dato anche dalle correnti del mare e dal cosiddetto 'Grasshopper effect' (Effetto Cavalletta). Gli inquinanti vengono portati ai poli tramite correnti o intrappolati nel particolato o ad altre molecole e poi lì, a causa delle basse temperature, condensano e si depositano nell'acqua o nel suolo.

Nel seguente lavoro è stata effettuata una valutazione sia qualitativa che quantitativa degli analiti. Questi composti sono presenti in molti prodotti di uso comune, e possono essere raggruppati in alcune categorie in base alla loro funzione (capitolo 3). Molti di questi hanno un'emivita lunga e, anche se sono stati banditi, sono ancora presenti in diversi comparti ambientali. Gli analiti possono essere tossici per l'uomo e per gli animali, infatti, gran parte di essi sono interferenti endocrini.

Il campionamento degli analiti è stato effettuato in maniera passiva e sono stati utilizzati due diversi tipi di strumenti: i POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) e i simil-POCIS. Inoltre, sono state utilizzate le cartucce SPE (Solid-Phase Extraction) per preconcentrare gli analiti campionati con bottiglie Niskin. Lo strumento utilizzato per quantificare gli analiti è la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa.

I campioni sono stati prelevati nella zona di Road Bay e vicino all'uscita dell'acqua dal depuratore in prossimità della base scientifica italiana Mario Zucchelli. Per poter fare delle prove di recupero sono stati analizzati anche dei campioni provenienti dal Mar Ligure, nei pressi di Santa Margherita Ligure e nel porto di Genova.

La ricerca fa parte di un progetto del PNRA (Programma Nazionale di Ricerca in Antartide) denominato Matisse, che si propone di identificare, determinare e valutare i rischi dei composti classificati come ‘contaminanti emergenti’ nell’area del Mare di Ross.

2 INTRODUZIONE

2.1 L'Antartide

L'Antartide è un continente che si trova nell'emisfero australe della Terra, presenta una superficie di circa 14 milioni di km² ed è quasi del tutto coperto da ghiacci che nell'insieme formano la calotta glaciale antartica (solo il 5% è costituito da rocce). Questa vasta distesa di ghiaccio contiene la stragrande maggioranza delle riserve d'acqua dolce del mondo, contribuendo in modo significativo a regolare il livello del mare globale. L'Antartide ospita anche una varietà di ecosistemi unici, adattati alle estreme condizioni climatiche. Tuttavia, la sua inaccessibilità geografica e le estreme temperature hanno reso la sua esplorazione un'impresa difficile. L'Antartide è soggetta al Trattato Antartico, che è entrato in vigore nel 1961, e definisce il continente come una riserva scientifica dedicata alla ricerca pacifica. Questo trattato impone ai 29 Stati che lo hanno stipulato di proteggere l'ambiente antartico, tramite la creazione di vere e proprie aree protette [1].

L'Antartide (figura 1) sebbene si trovi in un'area remota del nostro pianeta e sia meno soggetto all'inquinamento antropico, non ne è assolutamente immune. Le circolazioni marine, i forti venti catabatici e altri effetti (ad esempio il 'Grasshopper effect') possono trasportare i contaminanti in questa zona. Le concentrazioni degli inquinanti nell'Antartide vengono prese come livelli 'naturali' a cui devono fare riferimento i dati delle analisi ottenuti in altre zone del nostro pianeta. Se i cosiddetti 'livelli naturali' si alzano, ne consegue che anche tutti gli altri lo saranno, ciò indica un incremento globale dell'inquinamento.

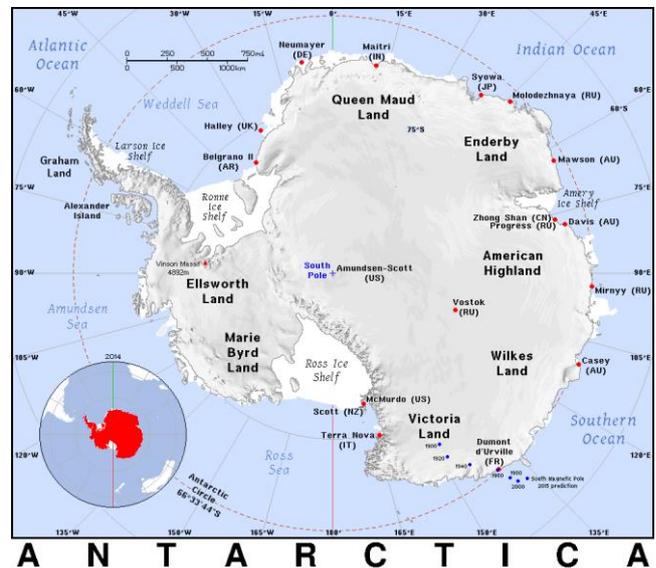


Figura 1. Cartina dell'Antartide

Il Mare di Ross fa parte dell'Oceano Meridionale e si trova nella parte sud del continente. Si estende nella baia che va dalla Terra della Regina Vittoria alla Terra di Marie Byrd. Gran parte del Mare di Ross è coperto da una lastra di ghiaccio chiamata Ross Ice Shelf. È definito area marina protetta dal 2016 dalla Commissione per la conservazione delle risorse biologiche dell'Antartico, di cui fanno parte 24 paesi

compresa l'Unione Europea. Le acque del Mare di Ross sono ricche di nutrienti e sono abitate da molti pesci, foche, pinguini e balene [2].

I campionamenti di questo lavoro di tesi sono stati effettuati nel Mare di Ross in particolare nella zona della Baia di Terranova, in prossimità della base italiana Mario Zucchelli costruita nel 1987-88 (figura 2).



Figura 2. Schema delle basi scientifiche in Antartide

2.2 Contaminanti emergenti

Gli analiti presi in esame in questo lavoro di tesi sono contaminanti emergenti, vengono definiti con questo termine in quanto solo negli ultimi anni la comunità scientifica si è interessata agli effetti tossici che potevano avere. Le loro concentrazioni, infatti, ogni anno stanno aumentando e sebbene non siano tutti composti persistenti come i POPs (Persistent Organic Pollutants), vengono continuamente immessi nell'ambiente poiché si trovano in prodotti di uso quotidiano.

Queste sostanze si trovano nell'ambiente in concentrazioni abbastanza basse (dell'ordine dei ng/L) ma la loro pericolosità sta nel fatto che esse possono essere bioaccumulate [3]. Con questo termine si indica la possibilità di alcune sostanze di accumularsi sia negli uomini che negli animali, trovandosi in una concentrazione più alta di quella ambientale che può essere tossica per l'organismo stesso.

Alcuni composti rientrano anche nella categoria degli interferenti endocrini, ovvero possono interagire con il sistema endocrino e scompensarlo.

Per questi motivi i contaminanti emergenti devono essere monitorati, anche se non per tutti ci sono leggi volte a regolare il loro uso.

Si parlerà nello specifico degli analiti e della loro natura nel capitolo 3 di questa tesi.

2.3 Il progetto Matisse

Lo studio dei contaminanti emergenti nelle aree polari è sempre più importante negli ultimi anni, da quando è stata comprovata la loro tossicità. Il Progetto Matisse si occupa di identificare 'nuovi' contaminanti nella zona della Baia di Terranova dove sono presenti la base italiana di Mario Zucchelli e la base coreana Jang Bogo. Inoltre, il

progetto si pone lo scopo di valutare i rischi legati alla loro presenza nell'ambiente, in particolare in quello marino. La loro presenza nell'acqua è dovuta sicuramente alla degradazione incompleta dei composti durante il trattamento delle acque reflue e alle correnti marine che trasportano queste sostanze dalle zone più popolate della terra ai poli.

L'analisi dei campioni viene effettuata, dopo adeguate pre-concentrazioni, con la tecnica della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, che è in grado di fornire informazioni sia qualitative che quantitative.

Il campionamento dell'acqua avviene tramite l'uso di campionatori passivi che permettono di ottenere i livelli di concentrazione integrati nel tempo, a differenza dei campionamenti 'spot' che invece forniscono una 'fotografia' istantanea relativa solo al preciso momento in cui sono stati prelevati.

Lo scopo del progetto è quindi di valutare come le coste Antartiche e gli ecosistemi reagiscono all'impatto antropico, che è in aumento negli ultimi anni, dovuto alla presenza di nuove basi scientifiche e al turismo polare.

3 CONTAMINANTI AMBIENTALI

3.1 Contaminanti emergenti

I contaminanti emergenti sono un gruppo di sostanze chimiche, naturali o sintetiche, con caratteristiche differenti che possono trovarsi in diversi comparti. Queste sostanze possono essere farmaci, ormoni, prodotti per l'igiene e per la cura personale, ritardanti di fiamma, composti industriali, prodotti per la casa, pesticidi, fertilizzanti e molti altri [4]. Ciascuno di questi può avere un effetto potenzialmente tossico sull'ambiente e sulle specie viventi con cui vengono a contatto. Alcuni di essi, infatti, possono essere sospetti interferenti endocrini, ovvero sostanze che interagiscono con il sistema endocrino di esseri viventi, tra cui l'uomo.

Il termine contaminanti emergenti si riferisce a 'contaminanti apparsi solo di recente' ma anche a contaminanti che destano preoccupazione emergente [5]. I contaminanti emergenti sono definiti così in quanto si parla di sostanze nuove che spesso non sono normate e quindi non sono monitorate. Non sono persistenti come i contaminanti tradizionali ma sono pseudo-persistenti, il problema infatti è che vengono immessi nell'ambiente continuamente.

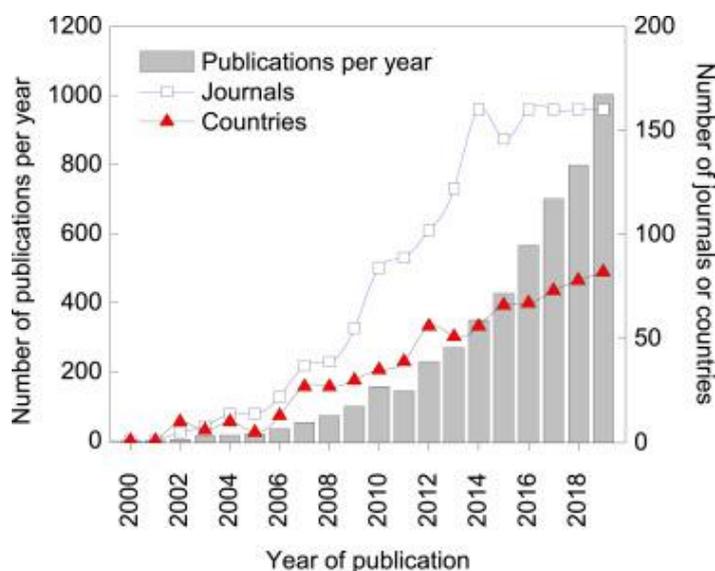


Figura 3. Evoluzione del numero di articoli pubblicati dal 2000 al 2019 secondo Scopus [4].

Da questo grafico (figura 3) si evince che il problema venga sempre più affrontato negli ultimi anni dagli studiosi. Infatti, si nota una crescita esponenziale di articoli scritti proprio su questo tipo di sostanze.

A differenza dei contaminanti emergenti, quelli tradizionali sono stati ampiamente studiati e regolamentati, e per questo vi sono dei metodi consolidati per la loro analisi. Inoltre, di questi è nota la tossicità e il loro impatto ambientale; perciò, ne sono state regolamentate le emissioni e attualmente le loro concentrazioni sono complessivamente diminuite. I contaminanti tradizionali sono sostanze di origine industriale che talvolta

sono immessi nell'ambiente volontariamente, al contrario i contaminanti emergenti spesso finiscono nel comparto ambientale in modo del tutto inconsapevole. Tra i contaminanti tradizionali si possono citare idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili e diossine. Tra questi contaminanti rientrano i POPs (*"Persistent Organic Pollutants"*), inquinanti organici persistenti che rimangono intatti nell'ambiente per lunghi periodi e che si accumulano nel tessuto adiposo dell'uomo e della fauna selvatica.

Sebbene i contaminanti emergenti non siano normati, la maggior parte è presente in una 'watch list' europea, ovvero una lista di sostanze che devono essere mantenute sotto controllo. La lista cambia negli anni in base alle nuove sostanze che vengono immesse nell'ambiente, di seguito viene riportata la tabella con l'elenco di quelle da monitorare aggiornata nel 2022 [6](figura 4).

Elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione di cui all'articolo 8 ter della direttiva 2008/105/CE

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Numero CAS (*)	Numero EU (*)	Metodi di analisi indicativi (*): (*)	Limite massimo ammissibile di rilevazione o quantificazione del metodo (ng/l)
Sulfametossazolo (*)	723-46-6	211-963-3	SPE-LC-MS-MS	100 (11)
Trimetoprim (*)	738-70-5	212-006-2	SPE-LC-MS-MS	100 (11)
Venlafaxina e O-desmetilvenlafaxina (*)	93413-69-5 93413-62-8	618-944-2 700-516-2	SPE-LC-MS-MS	6 (11)
Composti azolici (*)			SPE-LC-MS-MS	
Clotrimazolo	23593-75-1	245-764-8		20 (11)
Fluconazolo	86386-73-4	627-806-0		250 (11)
Imazalil	35554-44-0	252-615-0		800 (11)
Ipconazolo	125225-28-7	603-038-1		44 (11)
Metconazolo	125116-23-6	603-031-3		29 (11)
Miconazolo	22916-47-8	245-324-5		200 (11)
Penconazolo	66246-88-6	266-275-6		1 700 (11)
Procloraz	67747-09-5	266-994-5		161 (11)
Tebuconazolo	107534-96-3	403-640-2		240 (11)
Tetraconazolo	112281-77-3	407-760-6		1 900 (11)
Dimossistrobina Azossistrobina (*)	149961-52-4 131860-33-8	604-712-8 603-524-3	SPE-LC-MS-MS	32 (11) 200 (12)
Famoxadone	131807-57-3	603-520-1	SPE-LC-MS-MS	8,5 (11)
Diflufenican	83164-33-4	617-446-2	SPE-LC-MS-MS	10 (12)
Fipronil	120068-37-3	424-610-5	SPE-HPLC-MS-MS	0,77 (12)
Clindamicina	18323-44-9	242-209-1	SPE-LC-MS-MS	44 (12)
Ofloxacina	82419-36-1	680-263-1	SPE-UPLC-MS-MS	26 (12)
Metformina e guanilurea (*)	657-24-9 141-83-3	211-517-8 205-504-6	SPE-LC-MS-MS	156 000 (12) 100 000 (12)
<i>Agenti di protezione solare (10)</i>				
Butil metossidibenzoilmetano	70356-09-1	274-581-6	SPE-LC-MS-MS/ESI	3 000 (12)
Octocrilene	6197-30-4	228-250-8		266 (12)
Benzofenone-3	131-57-7	205-031-5		670 (12)

Figura 4. Elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione di cui all'articolo 8 ter della direttiva 2008/105/CE.

Alcuni contaminanti emergenti simili ai POPs (ad esempio l'acido perfluorottan solfonico e l'acido perfluorottanoico) sono stati inseriti dal 2009 nella Convenzione di Stoccolma, stipulata nel 2001 nell'ambito del Programma Ambientale delle Nazioni Unite (UNEP) ed entrata in vigore nel 2004. Essa mira a proteggere la salute umana e l'ambiente dagli effetti nocivi degli inquinanti organici persistenti (POPs). Molti di questi possono provocare tumori, allergie, danni al SNC (sistema nervoso centrale), al SNP (sistema nervoso periferico) e possono essere anch'essi degli interferenti endocrini [7]. Sebbene i composti chimici presenti nella Convenzione di Stoccolma siano banditi dalla produzione o fortemente regolamentati da diverso tempo, si possono ancora rilevare in concentrazioni apprezzabili. Essendo quindi persistenti, questi composti sono a contatto con gli organismi per più tempo e possono migrare anche in zone più remote rispetto a dove sono state immessi. Si possono trovare in diversi comparti ambientali in quanto la loro lipofilità fa sì che in acqua siano adsorbiti al particolato marino, ma possono anche trovarsi in atmosfera subendo reazioni di fotodegradazione. Infine, si devono considerare i continui scambi tra i diversi comparti ambientali come, ad esempio, tra aria e suolo o tra acqua e aria.

3.2 Interferenti endocrini

Il sistema endocrino comprende tutte le ghiandole a secrezione interna presenti nel corpo umano che producono ormoni, ovvero sostanze che sono veicolate dal sangue e che agiscono su cellule o tessuti lontani. Il numero di patologie che interessano il sistema endocrino è in aumento negli ultimi anni e cresce in concomitanza con la maggiore espansione delle industrie chimiche. Inoltre, anche l'uso quotidiano di alcuni prodotti chimici ha portato l'insorgenza di disturbi endocrini non solo nell'uomo ma anche in animali. Nel 1996 vi è stato un primo incontro tra diverse autorità di stati Europei e Americani dove si è discusso degli EDCs (endocrine- disrupting chemicals), o in italiano IE (interferenti endocrini) [8]. La definizione di interferenti endocrini che è stata data nell'incontro del '96 è: << un EDCs è una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un individuo, oppure della sua progenie o di una (sotto) popolazione>>. In particolare, gli IE (interferenti endocrini) interferiscono soprattutto sugli ormoni sessuali (estrogeni e androgeni) e sugli ormoni tiroidei.

Gli IE possono agire sul sistema endocrino in modi differenti:

- Mimando l'azione di un ormone;
- Bloccando i recettori di un ormone;
- Alterando la produzione dell'ormone.

Gli effetti dovuti all'esposizione da IE sono molto diversi e dipendono fortemente dal periodo in cui essa avviene: infatti se questo accade nel periodo di gestazione, nell'infanzia o nell'adolescenza avrà sicuramente ripercussioni più gravi o addirittura permanenti. Se l'esposizione avviene in periodi diversi da quelli citati prima gli effetti possono non essere rilevanti.

Nelle donne a causa dell'esposizione a IE possono insorgere patologie come la PCOS (sindrome dell'ovaio policistico), l'endometriosi, tumori uterini o l'infertilità. Negli uomini invece può causare ipospadia, criptorchidismo, tumori ai testicoli e infertilità.

3.3 Scelta e descrizione degli analiti

Gli analiti che sono stati presi in esame in questa tesi sono diversi tra loro sia per struttura chimica che per funzione. Si possono raggruppare nelle seguenti categorie: farmaci, filtri UV, estrogeni, composti perfluorurati, stimolanti, additivi, diserbanti e fertilizzanti.

3.3.1 Farmaci

All'interno di questa categoria è possibile fare un'ulteriore suddivisione degli analiti in:

- FANS (Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei);
- Diuretici;
- Antibiotici;
- Anticonvulsivanti;
- Broncodilatatori;
- Ipolipidemizzanti;
- β -bloccanti.

3.3.1.1 FANS

I FANS sono i farmaci più utilizzati dall'uomo e agiscono inibendo la sintesi delle prostaglandine, mediatrici dell'infiammazione. Essi hanno anche azione analgesica e antipiretica, in quanto riescono ad abbassare la temperatura corporea. Si possono trovare nell'acqua, nel mare, nei suoli o nei sedimenti (figura 5). Ad esempio, si trovano nelle acque di scarico in concentrazioni relativamente alte (dell'ordine del migliaio di ng/L). Gli analiti che fanno parte di questa categoria di sostanze sono il naprossene, il ketoprofene, il diclofenac e l'ibuprofene [9].

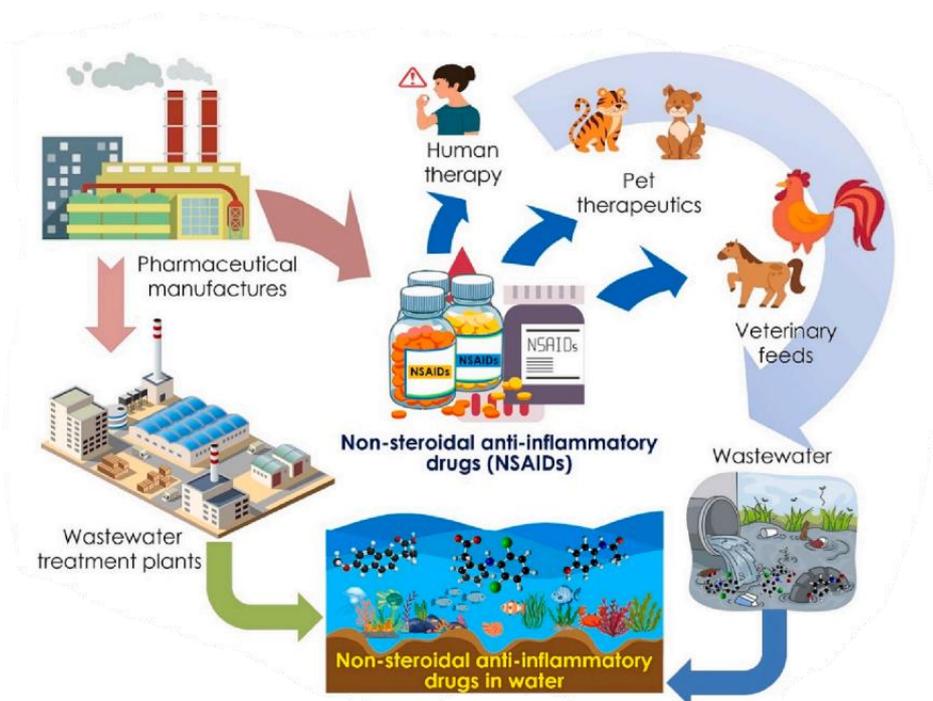


Figura 5. Illustrazione di come i FANS contaminino l'acqua di mare [7].

Queste sostanze possono avere degli effetti avversi sull'uomo, sui pesci e sulle piante. Nell'uomo l'esposizione a questi composti può portare problemi cardiovascolari, renali e complicazioni rettili. Nelle piante interferiscono con il metabolismo, inibiscono la crescita e danneggiano le cellule. Infine, per le specie acquatiche possono essere genotossici, interferenti endocrini e possono portare a deformazioni.

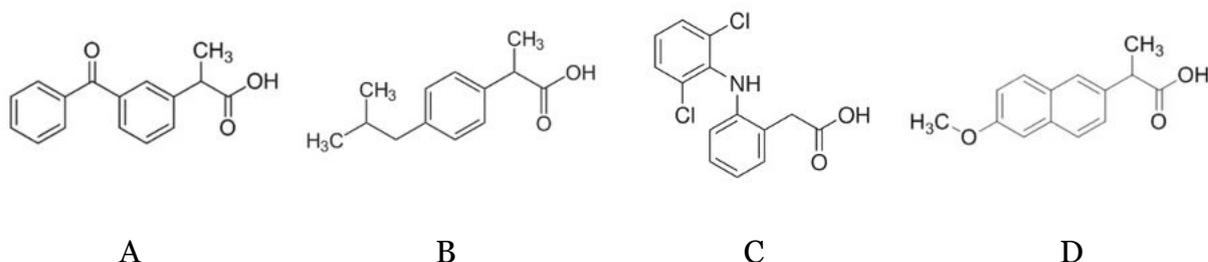


Figura 6. Strutture chimiche del ketoprofene (A), dell'ibuprofene (B), del diclofenac (C) e del naprossene (D).

Dalla struttura (figura 6) si vede che tutti presentano un gruppo acido, un anello aromatico, e un centro lipofilo costituito o da un anello aromatico o da una catena alchilica. Il diclofenac è un arilacetico mentre gli altri tre sono arilproprionici.

Questi composti si trovano in farmaci di uso comune, ad esempio: il naprossene è nel Momendol e nel Naprosyn, il diclofenac nel Voltaren e nel Dicloream, l'ibuprofene nel Nurofen e nel Moment, e il Ketoprofene nell'OKi e nel Fastum gel.

3.3.1.2 Diuretici

I diuretici sono farmaci che favoriscono la diuresi, ovvero favoriscono la produzione dell'urina. Gli analiti che rientrano in questa categoria sono l'idroclorotiazide e la furosemide.

L'idroclorotiazide (figura 7) è un diuretico tiazidico che agisce inibendo il simporto sodio/cloro nel tubolo contorto distale del rene. Fa parte della famiglia delle benzotiadiazine.

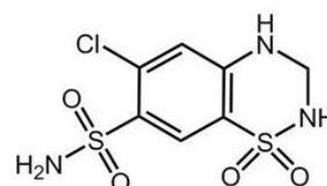


Figura 7. Struttura idroclorotiazide.

La furosemide (figura 8) invece è un diuretico dell'ansa, ovvero agisce a livello dell'Ansa di Henle, che fa parte del nefrone, inibendo il riassorbimento di sodio e cloro [10].

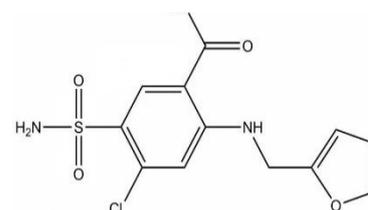


Figura 8. Struttura chimica furosemide.

3.3.1.3 Antibiotici

Gli antibiotici sono sostanze prodotte naturalmente da alcuni microrganismi (spesso modificate chimicamente per renderle più stabili) oppure di origine sintetica, in grado di uccidere i batteri o prevenire la loro moltiplicazione [11]. L'inquinamento dovuto alla presenza di antibiotici nell'acqua di mare può causare stress sui microbi e di conseguenza fa sì che nascano batteri e geni resistenti ad essi, ciò risulta essere una grave minaccia per la salute umana e in generale degli esseri viventi [12]. Nella classe degli antibiotici rientra il cloramfenicolo.

Il cloramfenicolo (figura 9) ha un'azione batteriostatica ma può essere anche battericida in casi particolari. Solitamente è usato per curare infezioni come la meningite, ma può essere assunto in quantità limitata, in quanto può essere tossico e può causare anemia aplastica [13].

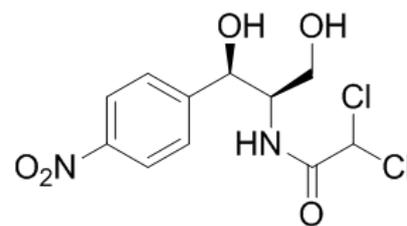


Figura 9. Struttura del cloramfenicolo.

3.3.1.4 Anticonvulsioni

Gli anticonvulsioni sono farmaci che vengono utilizzati per contrastare gli attacchi epilettici, agendo essenzialmente sulle cellule nervose che propagano gli impulsi durante una crisi [14]. In questa categoria di farmaci si trova la carbamazepina.

La carbamazepina (figura 10) è usata soprattutto come antiepilettico ma può trovare applicazione nel contrastare le sindromi nevralgiche, in quanto è anche un analgesico. È uno dei farmaci che si trova di più nelle acque superficiali, pur avendo concentrazioni ridotte dovute ai numerosi processi di ossidazione e degradazione. Nonostante ciò, i metodi per la sua rimozione dalle acque non sono ancora efficienti [15].

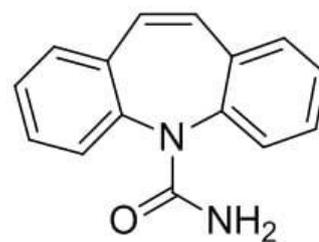


Figura 10. Struttura della carbamazepina.

3.3.1.5 Broncodilatatori

I broncodilatatori sono una tipologia di farmaci in grado di dilatare l'albero bronchiale e sono quindi utilizzati nella cura dell'asma [16]. Tra questi abbiamo la terbutalina, il salbutamolo e il clenbuterolo.

La terbutalina (figura 11) è un agonista β_2 selettivo usato come broncodilatatore, ma è utilizzato anche per prevenire il parto prematuro. Il suo sovradosaggio può portare a tachicardie e aumento della pressione del polso [17].

Il salbutamolo (figura 11) è anch'esso un β_2 agonista selettivo e infatti si lega ai recettori adrenergici beta-2 che sono nella muscolatura liscia dei bronchi. Il salbutamolo presente negli inalatori è una miscela racemica dei suoi enantiomeri R e S, di cui il primo è responsabile degli effetti broncodilatatori mentre il secondo può causare un'inflammatione maggiore delle vie aeree [18].

Il clenbuterolo (figura 11) è un β_2 agonista selettivo ed è solitamente usato in forma racemica per curare l'asma bronchiale. Questa sostanza però può avere anche uno scopo non prettamente terapeutico, in quanto ha effetti anabolizzanti ed è quindi utilizzato illegalmente dagli sportivi per migliorare le loro prestazioni [19].

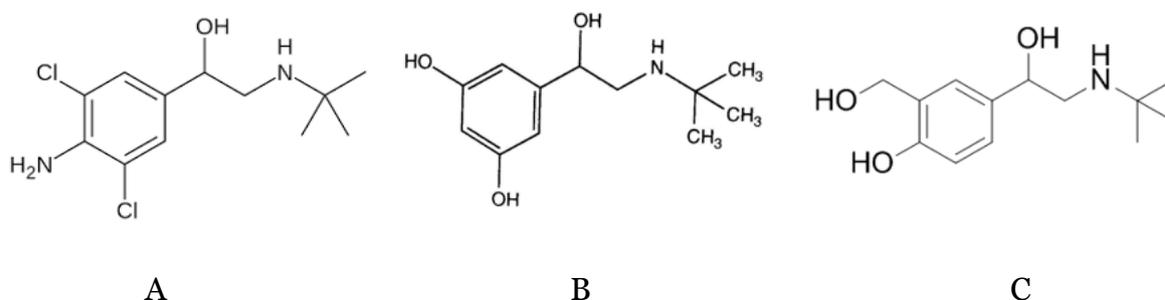


Figura 11. Struttura del clenbuterolo (A), della terbutalina (B) e del salbutamolo (C).

3.3.1.6 Ipolipidemizzanti

I farmaci ipolipidemizzanti sono farmaci in grado di abbassare la concentrazione di lipidi nel sangue, in particolare agendo sui livelli di colesterolo LDL. Questi farmaci sono quindi in grado di ridurre il rischio di coronaropatie e aterosclerosi [20].

Il gemfibrozil (figura 12) è un farmaco ipolipidemizzante, infatti, è molto noto per la sua efficacia nel trattamento dei trigliceridi e per la regolazione del livello di colesterolo nel sangue. Nelle acque superficiali ha un'emivita tra i 119 e 288 giorni, quindi persiste nell'ambiente. Attualmente il metodo più promettente per la sua rimozione dalle acque sembra essere la biodegradazione [21].

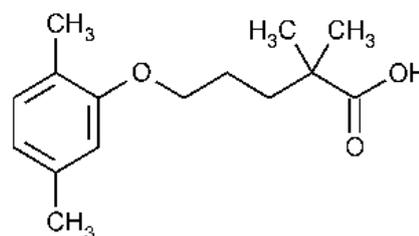


Figura 12. Struttura del gemfibrozil.

Anche la metformina (figura 13) può far parte di questa categoria di farmaci, sebbene la sua funzione principale sia quella di antidiabetico per il trattamento del diabete di tipo 2. La concentrazione nelle acque di questa sostanza è sempre maggiore e può causare effetti tossici sui pesci tra cui: anomalie all'apparato riproduttivo, cambiamenti nel comportamento e anche la morte. Nell'uomo l'uso di metformina può causare acidosi lattica, una condizione che può portare alla morte [22].

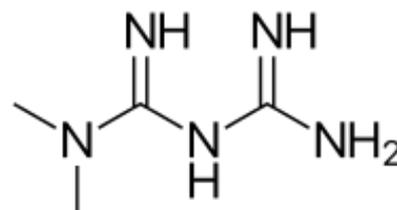


Figura 13. Struttura della metformina.

3.3.1.7 β -bloccanti

Sono farmaci che agiscono sul sistema cardiovascolare agendo sui recettori β di adrenalina e noradrenalina. In particolare, vanno a ridurre la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa. Tra questa categoria di farmaci si trovano il metoprololo e l'atenololo [23].

Il metoprololo (figura 14) è un β bloccante molto utilizzato nella cura delle malattie cardiovascolari. La sua caratteristica principale è che tra tutti i farmaci di questa categoria, questo è il più lipofilo e quindi è quello che si accumula maggiormente nel cervello [24].

L'atenololo (figura 14) è anch'esso un β bloccante, in particolare viene definito <<cardioselettivo>> in quanto agisce principalmente sul cuore. Viene utilizzato per trattare molti disturbi come aritmie, infarti al miocardio e ipertensione [25].

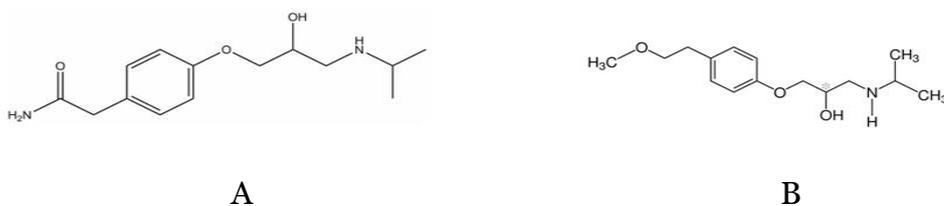


Figura 14. Struttura dell'atenololo (A) e del metoprololo (B).

3.3.2 Filtri UV

I filtri UV sono sostanze in grado di riflettere o assorbire i raggi UV-Vis. Queste sostanze si trovano nelle creme solari, nei cosmetici, nei profumi e in altri prodotti per la cura della persona ma anche in vernici, imballaggi e prodotti plastici. La zona dell'ultravioletto è divisa a sua volta in UVA, UVB e UVC. I raggi UVA sono nel range dei 320-400 nm e non sono assorbiti dallo strato di ozono, gli UVB sono dai 290 ai 320 nm e sono parzialmente assorbiti mentre gli UVC non riescono ad oltrepassare lo strato di ozono [26]. L'esposizione ai raggi ultravioletti incrementa l'incidenza di melanomi e altre malattie cutanee.

Esistono due tipologie di filtri UV: i filtri chimici, che sono in grado di assorbire i raggi UV, ed i filtri fisici, che li riflettono. Spesso le creme solari sono formate da un mix di queste due tipologie.

I filtri UV approvati dalla Food and Drug Administration e usati nei prodotti cosmetici sono 16, mentre quelli approvati dal Comitato scientifico dell'UE sono 27. Queste sostanze sono state ritrovate in matrici diverse tra cui acque superficiali, impianti di trattamento delle acque, nei sedimenti fluviali e addirittura nel latte materno e nella placenta. Essi, infatti, sono in grado di accumularsi in un organismo grazie alla loro lipofilità. Alcuni filtri UV sono stati classificati come interferenti endocrini, in quanto è stata rilevata una loro interazione con le ghiandole endocrine del corpo umano [27].

Gli analiti studiati appartenenti a questa categoria sono: benzofenone-3, etilesilmetossicinnamato, octocrilene, octildimetilamminobenzoato.

Il benzofenone-3 (figura 15) è un filtro chimico che viene utilizzato comunemente nelle creme solari e riesce ad assorbire sia i raggi UVB che una parte dei raggi UVA. Se viene a contatto con la pelle dell'uomo questo composto è in grado di attraversarla e raggiungere il sangue. Sui pesci invece è in grado di alterare il sistema neuroendocrino [26].

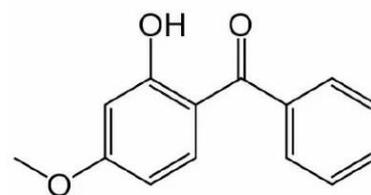


Figura 15. Struttura del benzofenone-3

L'etilesilmetossicinnamato (figura 16) è un composto in grado di assorbire i raggi UVB e viene utilizzato nel campo della cosmesi negli Stati Uniti e nell'Unione Europea in un range di concentrazioni che va dal 7,5 al 10%. Questa sostanza è in grado di permeare nella pelle e di essere rilevabile in concentrazioni basse anche nel sangue e nelle urine. È un interferente endocrino e negli esseri umani agisce sul livello delle concentrazioni di testosterone ed estradiolo [26].

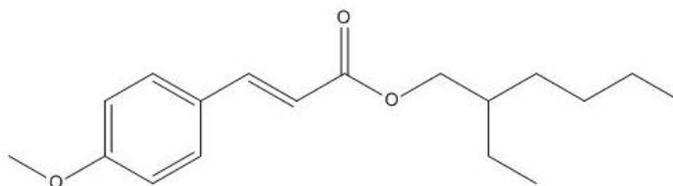


Figura 16. Struttura dell'etilesilmetossicinnamato.

L'octocrilene (figura 17) è un composto presente nelle creme solari e nei prodotti per la cura personale ed è in grado di assorbire gli UVB e i raggi UVA più energetici. Per ora su questo composto non ci sono molte informazioni sul suo accumulo o sulla tossicità [26].

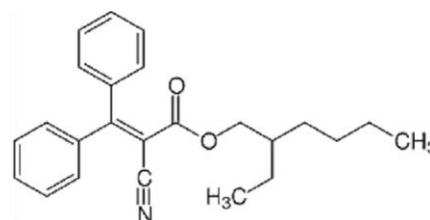


Figura 17. Struttura dell'octocrilene.

L'octildimetilamminobenzoato (OD-PABA) (figura 18) deriva dalla condensazione del 2-etilesanolo e il PABA ovvero l'acido paraamminobenzoico. Il PABA è stato uno dei primi filtri UV utilizzati, ma è stato rimosso dalle creme solari nel 2008 in Europa, in quanto dava reazioni fotoallergiche e aveva effetti estrogenici. Di conseguenza, anche i suoi derivati come OD-PABA stanno scomparendo dal mercato per essere sostituiti da altri composti che non abbiano questi effetti avversi [28].

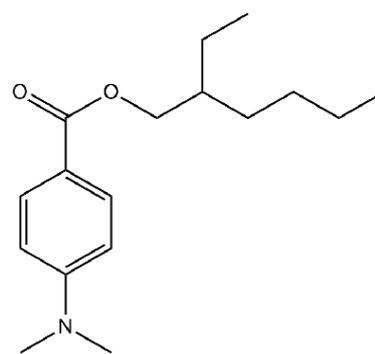


Figura 18. Struttura dell'OD-PABA.

3.3.3 Estrogeni

Gli estrogeni sono i principali ormoni femminili e fanno parte della classe degli steroidi. Questi composti possono avere origine naturale o sintetica, e ricoprono un ruolo fondamentale all'interno degli organismi: essi, infatti, si occupano di regolare la comunicazione tra le cellule e di controllare le principali attività biologiche come la crescita, lo sviluppo e la riproduzione. Negli ultimi anni queste sostanze sono sempre più presenti nell'ambiente acquatico, trovandosi addirittura nell'acqua potabile [29].

Tra le sostanze presenti in questa categoria si trovano: β estradiolo, 17α etinilestradiolo ed estrone.

Il β estradiolo (figura 19) si trova nell'ambiente acquoso in quanto non si riesce a trattarlo negli impianti di trattamento delle acque reflue. La sua presenza nell'acqua è in grado di interagire con la corretta secrezione ormonale ed influenzare il metabolismo epatico. Questa sostanza è in grado di incrementare l'insorgenza di cancro al seno anche a basse concentrazioni [30].

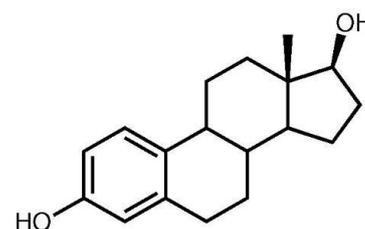


Figura 19. Struttura del β estradiolo

Il 17α etinilestradiolo (figura 20) è un derivato sintetico del β estradiolo ed è utilizzato soprattutto nelle pillole contraccettive. Questa sostanza ha un effetto di

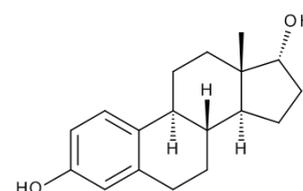


Figura 20. Struttura 17α etinilestradiolo.

interferente endocrino e le conseguenze dell'esposizione possono innescarsi anche molto dopo che è avvenuta.

Ad esempio, se l'esposizione è avvenuta durante lo sviluppo fetale, gli effetti possono riscontrarsi in età adulta [31].

L'estrone (figura 21) è un ormone naturale, detto anche follicolina, che è prodotto nella donna dalla placenta e dai follicoli ovarici. È un interferente endocrino e la principale fonte di inquinamento deriva soprattutto dall'allevamento di bestiame e pollame. Anch'esso si trova nei fiumi, laghi e altri corpi idrici e per questo, tramite il bioaccumulo da parte di organismi acquatici, può entrare nella catena alimentare. L'estrone è monitorato negli ultimi anni anche perché può interferire con il sistema endocrino umano, anche a bassa concentrazione [32].

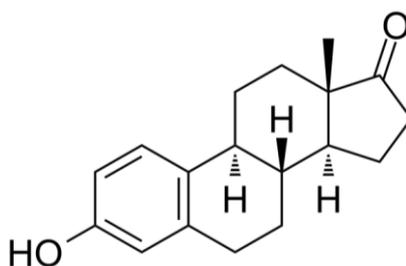


Figura 21. Struttura dell'estrone.

3.3.4 Composti perfluorurati

I composti perfluorurati (PFAS) sono definiti 'sostanze chimiche permanenti' in quanto rimangono nell'ambiente senza degradarsi per un tempo lungo. Questi composti sono caratterizzati da una coda perfluoroalchilica idrofoba e una testa idrofila che può essere di diverso tipo come, ad esempio, un acido carbossilico o solfonico. I PFAS riescono ad interagire con diversi comparti ambientali e possono fungere da 'trasportatori' di altri contaminanti in quanto possono formare micelle.

I PFAS si possono trovare in ambito domestico (nelle pentole, nei tappeti e nei vestiti) o in ambito industriale (vernici, schiume antincendio ed elettronica). Le loro applicazioni sono dovute al fatto che hanno un'elevata stabilità termica e chimica.

Questi composti sono in grado di bioaccumulare e di biomagnificare e per questo possono entrare nella nostra catena alimentare, ciò è sicuramente un'importante via di esposizione. Le loro concentrazioni nell'ambiente devono quindi essere monitorate in quanto sono interferenti endocrini [33].

In questa categoria fa parte il PFOA (acido perfluorottanoico) e il PFOS (acido perfluoroottansolfonico).

Il PFOA (che presenta una testa idrofila definita da un acido carbossilico, figura 22) è una sostanza molto utilizzata come tensioattivo e ritardante di fiamma, per questa ragione si trova nel comparto acquatico in maniera ubiquitaria. Studi recenti sul PFOA hanno evidenziato la sua cancerogenicità e per questo l'Agencia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (US EPA) ha definito che la sua concentrazione nell'acqua non deve superare i 70 ng/L [34].

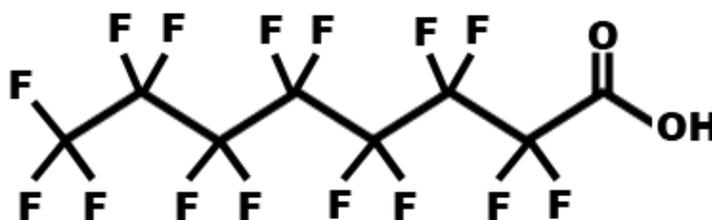


Figura 22. Struttura del PFOA.

Il PFOS (figura 23) presenta una catena perfluoroalchilica e un gruppo di acido solfonico come testa idrofila. Grazie alla sua stabilità termica e chimica viene utilizzato per una grande quantità di prodotti e quindi l'uomo ne è sempre più esposto. Nel 2009 nella Convenzione di Stoccolma ne viene limitato l'uso; tuttavia, ancora oggi è molto presente nell'ambiente. Un aspetto preoccupante di questo composto tossico è che presenta un'emivita nel siero umano di 5,4 anni circa mentre nei mezzi ambientali persiste per 6,7 anni [35].

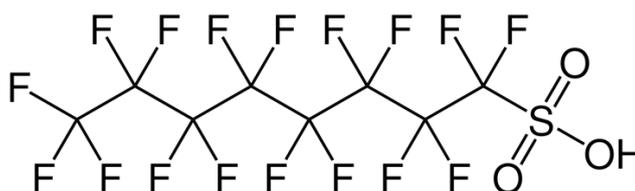


Figura 23. Struttura del PFOS.

3.3.5 Stimolanti

Le sostanze stimolanti sono una serie di composti psicoattivi che agiscono a livello del sistema nervoso centrale e periferico, andando ad aumentare la quantità di neurotrasmettitori rilasciati dopo uno stimolo o bloccando la loro ricaptazione nel cervello. Gli stimolanti, vanno quindi ad agire sulla reattività e sulla prontezza del soggetto esposto ad essi [36]. Spesso queste sostanze vengono utilizzate nei farmaci, ma sono presenti anche in bevande energizzanti e in droghe illecite. Tra queste sostanze si

trovano la caffeina, la teofillina, la teobromina e la paraxantina che vengono raggruppate nella categoria delle xantine. Le xantine sono degli alcaloidi di origine naturale che presentano effetti sul sistema nervoso centrale, su quello cardiovascolare, respiratorio e renale.

La caffeina (figura 24) è una sostanza stimolante che agisce sui recettori dell'adenosina. La caffeina è il costituente più importante del caffè, ma può essere usata negli integratori e anche a scopo terapeutico per la cura di patologie, come il morbo di Parkinson. La caffeina può avere un effetto dannoso in base alla fase di sviluppo dell'individuo in cui è esposto: se avviene in utero durante la gravidanza o in età adolescenziale possono verificarsi cambiamenti fisiologici [37].

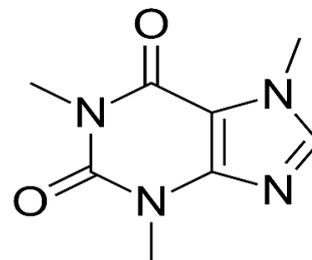


Figura 24. Struttura della caffeina.

La teofillina (figura 25) è uno stimolante respiratorio e broncodilatatore, ed è considerato un farmaco ad indice terapeutico ristretto, ovvero viene assunto in dosi basse per essere certi di non avere effetti avversi. Infatti, in dosaggi eccessivi può causare danni neurologici gravi o essere letale. Si trova in diverse matrici alimentari, tra cui nel cotiledone del cacao, nel caffè verde e nel tè nero [38].

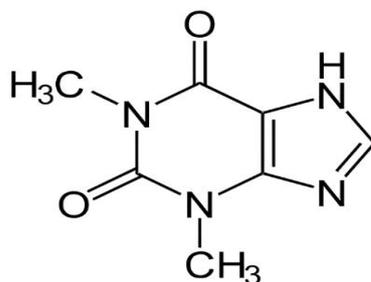


Figura 25. Struttura della teofillina.

La teobromina (figura 26) ha proprietà simili alla caffeina e alla teofillina ma può essere utilizzata anche per proteggere lo smalto dei denti, per sopprimere la tosse e come protezione cardiovascolare. La teobromina è molto presente in bevande energizzanti e nei prodotti contenenti cacao, dove ne determina l'alta qualità. Un effetto negativo dovuta alla presenza della teobromina è la riduzione della cristallizzazione dell'acido urico, che porta alla formazione di calcoli renali [39].

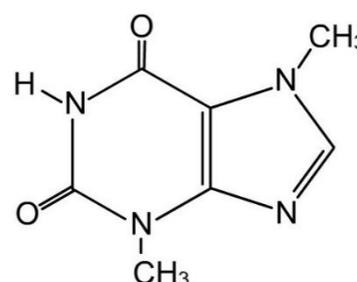


Figura 26. Struttura della teobromina.

La paraxantina (figura 27) è il metabolita principale della caffeina nell'uomo. Lo studio del rapporto tra paraxantina e caffeina serve essenzialmente come marcatore dell'impatto antropogenico in un certo ambiente [40]. Questa sostanza risulta essere meno tossica della caffeina, infatti è anch'essa teratogena, ma in misura minore [41].

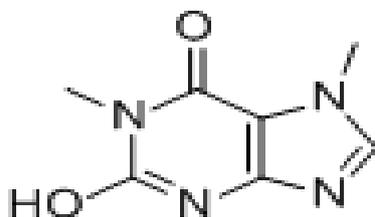


Figura 27. Struttura della paraxantina.

Nella categoria degli stimolanti rientra anche la nicotina (figura 28), che però non fa parte delle xantine. La nicotina è la principale sostanza definita psicoattiva che deriva dal tabacco. La nicotina può essere sia un agonista sia un antagonista dei recettori dell'acetilcolina; quindi i suoi effetti possono essere disparati. Dall'esposizione a lungo termine della nicotina si possono osservare diversi effetti come la dipendenza, depressione, cambiamenti nello sviluppo, malattie cardiovascolari, polmonari e tumori [42].

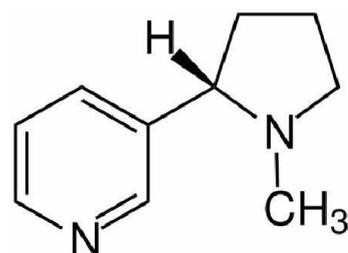


Figura 28. Struttura della nicotina.

Infine, l'ultimo composto che fa parte di questa classe è la taurina (figura 29), amminoacido molto presente in natura che agisce su diversi organi del corpo umano. La funzione più interessante è quella che ha a livello del sistema nervoso: essa infatti può attenuare disturbi legati a malattie come Parkinson e Alzheimer [43]. Questo composto si trova in numerose bevande energizzanti ed è assunto come integratore. Gli effetti collaterali della taurina non sono stati approfonditamente studiati ma non si può escludere che possa interagire con alcuni farmaci dando tossicità [44].

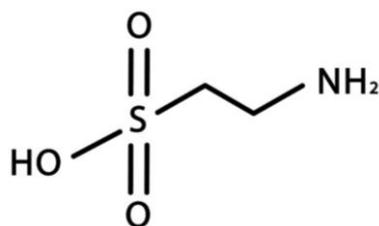


Figura 29. Struttura della taurina.

3.3.6. Additivi

Gli additivi sono sostanze chimiche che vengono aggiunte ad un generico prodotto per conferirgli o per migliorarne le caratteristiche. Esistono diverse tipologie di additivi, in particolare in questo lavoro di tesi sono stati presi in analisi due additivi alimentari (ovvero sucralosio e acesulfame), un additivo per prodotti plastici (bisfenolo A) e un additivo usato nei prodotti per la cura della persona (triclosan).

Il sucralosio e l'acesulfame sono due additivi alimentari che rientrano nella classe degli edulcoranti, essi hanno la funzione di conferire un sapore dolce ad un alimento. Le loro concentrazioni negli alimenti sono strettamente regolate a livello Europeo da un Regolamento che definisce quali sono gli additivi alimentari che possono essere utilizzati e in quali concentrazioni (il Regolamento di cui si fa riferimento è il N.1129/2008 della Commissione Europea del 11 Novembre 2011) [45].

Il sucralosio (figura 30) è un dolcificante artificiale che viene sempre più utilizzato negli ultimi anni, in quanto dona il sapore dolce ad un alimento e in più risulta essere ipocalorico. Il sucralosio deriva da una modifica chimica del saccarosio ed è circa 600 volte più dolce. Il sucralosio non contiene di calorie, questo fa sì che le concentrazioni di glucosio non vengano alterate dopo il suo consumo; perciò, sembrerebbe una sostanza salutare per l'essere umano.

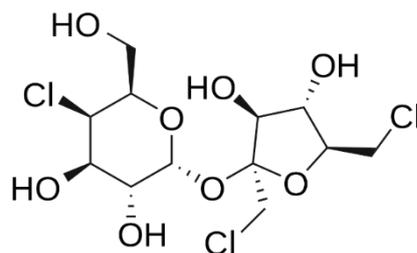


Figura 30. Struttura del sucralosio.

In realtà, recenti studi hanno evidenziato una possibile correlazione tra il sucralosio e l'aumento dell'incidenza di malattie cardiovascolari [46].

L'acesulfame K (figura 31) è uno dei dolcificanti più utilizzati al giorno d'oggi e le sue

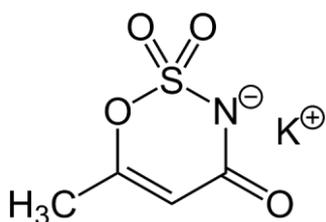


Figura 31. Struttura dell'acesulfame K.

concentrazioni in acqua possono raggiungere i 2,5 mg/L. Ha un potere dolcificante circa 200 volte il saccarosio. Si utilizza in gelatine, gomme da masticare e in cibi da forno, in quanto è stabile ad alte temperature ed è insolubile in acqua.

L'acesulfame è stato correlato in uno studio recente ad un aumento del 20-30% della concentrazione di glucosio, inoltre quando si degrada un suo prodotto noto è l'acetoacetamide che è tossico l'uomo. Infine, l'uso cronico di acesulfame può dare effetti negativi sulla memoria e sull'apprendimento [47].

Il BPA (figura 32) è un composto aromatico che rientra negli additivi per polimeri. È un composto sintetico utilizzato in dispositivi medici, nei contenitori per alimenti, nei giocattoli e in altri prodotti plastici ma anche nella carta termica degli scontrini. È noto che il BPA sia un'interferente endocrino in grado di interferire con la follicogenesi, ma presenta anche neurotossicità e genotossicità. In recenti studi è stato inoltre confermato che questa sostanza è in grado di interferire con la metilazione del DNA e quindi provoca cambiamenti epigenetici [48].

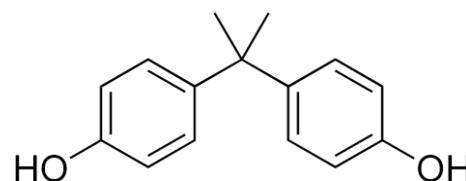


Figura 32. Struttura del BPA.

Il triclosan (figura 33) è un composto di origine sintetica che ha effetto di biocida, per questo viene utilizzato in prodotti per la cura della persona, per la pulizia della casa, in giocattoli e in tessuti e vernici. Il triclosan è un interferente endocrino in grado di oltrepassare la placenta ed entrare in contatto con il feto dove può avere anche un effetto letale [49]. Inoltre, è nota la sua cancerogenità, i suoi effetti avversi sull'intestino e la sua tossicità renale.

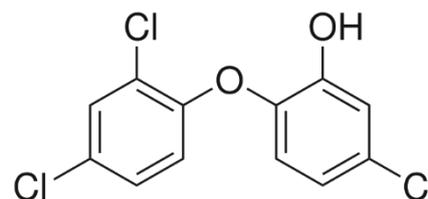


Figura 33. Struttura del triclosan.

3.3.7 Diserbanti e fertilizzanti

I diserbanti sono sostanze chimiche sia organiche che inorganiche in grado di sterminare le erbe infestanti [50]. Tra i diserbanti, in particolare si è visto l'acido 2,4-diclorofenossiacetico, comunemente chiamato 2,4-D (figura 34). Questa sostanza è presente in diversi comparti ambientali, tra cui l'acqua, l'aria e la terra (in conseguenza a ciò si trova anche nei prodotti alimentari). L'uomo entra in contatto con il 2,4-D e per questo il composto viene metabolizzato ed eliminato tramite le urine. In diversi studi è stato confermato che il 2,4-D è una sostanza cancerogena, tossica per la riproduzione e per lo sviluppo [51].

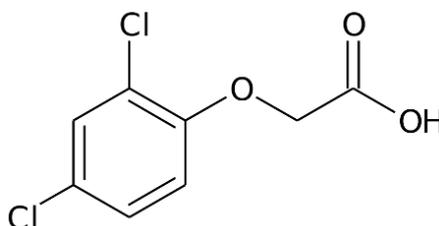


Figura 34. Struttura del 2,4-D.

I fertilizzanti sono sostanze in grado di agevolare la fertilità di un terreno, in questo lavoro di tesi si è trattato in particolare del clorquet e del mepiquat (figura 35) [52]. Entrambi sono composti quaternari dell'ammonio e vengono utilizzati per regolare e velocizzare la crescita delle piante, del fiore e dei frutti. Il clorquet è stato classificato come sospetto interferente endocrino nell'elenco delle sostanze chimiche tossiche dal National Institute of Occupational Safety and Health degli Stati Uniti, poiché si sono riscontrati effetti avversi sulla riproduzione di alcune specie di animali venute a contatto con esso. Sia clorquet che mepiquat sono inseriti in una lista europea destinata ai pesticidi che devono essere monitorati, dando delle soglie limite di concentrazione entro le quali possono essere usati [53].

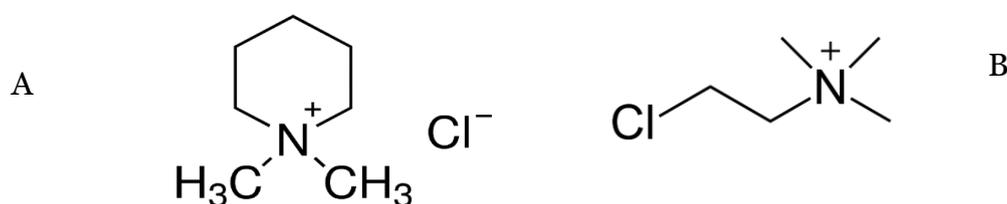


Figura 35. Struttura del cloruro di mepiquat (A) e del clorquet (B).

Infine, in questa categoria di diserbanti e fertilizzanti rientra anche la daminozide (figura 36), nota anche come alar, composto chimico in grado di ritardare la maturazione della frutta [54]. La tossicità di questa sostanza è dovuta al fatto che ha effetti neurotossici, teratogeni e può essere classificato come interferente endocrino [55]. Il suo uso infatti è regolamentato.

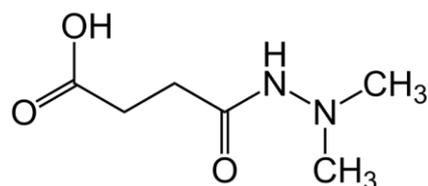


Figura 36. Struttura daminozide.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Solventi utilizzati e standard di riferimento

I solventi utilizzati, tutti di grado HPLC-MS, sono acqua ultra-pura, Metanolo (MeOH), acetonitrile (ACN), Diclorometano (DCM) e alcool isopropilico (IPA) che sono stati acquistati dalla VWR (Radnor,PA,USA), mentre l'acido acetico è stato comprato dalla Sigma-Aldrich (St. Louis,MO,USA).

Le soluzioni standard sono state preparate andando a diluire gli standard puri e le soluzioni certificate (con una purezza sopra al 98%) nel MeOH o diluendo 1:1 in MeOH:H₂O.

Gli standard degli analiti sono stati acquistati da diversi fornitori:

- Sigma-Aldrich (St. Louis,MO,USA) è stata acquistata la paraxantina (PRX), la teofillina (TFL), la carbamazepina (CARB), il benzofenone-3 (BP-3), l'octildimetilparamminobenzoato (OD-PABA), l'etilesilmetossicinnamato (EHMC), l'octocrilene (OC), l'acido perfluorottanoico (PFOA), l'acido perfluorottanesolfonico (PFOS), l'acesulfame (ACS), il sucralosio (SCL), il bisfenolo A (BPA), l'estrone (E1), il β -estradiolo (E2), il 17 α -etinilestradiolo (EE2), l'ibuprofene (IBU), il gemfibrozil (GEM) e il triclosan (TCS);
- Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) è stato comprato il salbutamolo (SLBT);
- Fluka Analytical (Saint Gallen, Switzerland) è stata acquistata la caffeina (CAFF), il ketoprofene (KETO), il naprossene (NAPR) e il diclofenac (DCF).

Le soluzioni standard sono state utilizzate in questo lavoro di tesi per costruire la retta di calibrazione e per fare aggiunte (spike) sui campioni reali. Con la retta di calibrazione è possibile avere informazioni sulla sensibilità strumentale, andando a vedere come è la proporzionalità tra il segnale e la concentrazione dell'analita. Lo spike viene effettuato su campioni reali, a cui si aggiunge una concentrazione nota che dovrebbe essere simile alla concentrazione attesa del nostro analita, e permette di capire se il segnale ottenuto presenta una soppressione o un aumento dovuto all'effetto matrice.

Per il campionamento 'spot' sono state utilizzate delle SPE della Supelco (Bellefonte, PA USA) e della Waters (Vimodrone, Italia).

Nei laboratori di ricerca del DCCI dove si è svolta questa tesi, sono stati realizzati anche dei campionatori passivi simil-POCIS, che presentavano come fase la HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) e come membrane un tessuto di poliestere.

I POCIS usati per queste analisi presentano la fase di HLB e le membrane di polietere solfone (PES) assemblati dalla ditta E&H services (Praga, Repubblica Ceca).

Infine, per la preparazione dell'acqua di mare sintetica utilizzata nelle prove di recupero sono stati utilizzati: cloruro di sodio (NaCl , $\geq 99\%$) della Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA), solfato di sodio (Na_2SO_4 , 99%) e cloruro di potassio (KCl , 99.5%) provenienti da Carlo Erba Reagenti (Rodano, MI, Italia).

4.2 Prelievo dei campioni

I campioni antartici analizzati in questo lavoro di tesi sono stati prelevati in due diversi punti. Alcuni POCIS, infatti, sono stati posizionati in una vasca di raccolta delle acque reflue che uscivano dal depuratore della base Mario Zucchelli e sono stati lasciati a campionare per un certo periodo di tempo (figura 37).



Figura 37. Rappresentazione del campionamento passivo delle acque reflue.



Figura 38. Raffigurazione del punto di prelievo dell'acqua di mare.

Gli altri campionatori passivi sono stati posizionati in mare in prossimità dello scarico del depuratore, nella zona di Road Bay ($74^{\circ}41.725' \text{ S}$; $164^{\circ}07.155' \text{ S}$) a circa 3 metri di profondità (figura 38).

Il campionamento spot è stato eseguito prelevando con una bottiglia Niskin in materiale plastico l'acqua del mare, mentre con una di vetro l'acqua in uscita dal depuratore. L'acqua campionata è stata fatta passare nelle cartucce SPE, impaccate con 200 mg di fase HLB. Le cartucce sono state poi conservate a -20°C .

Il tempo in cui i campionatori passivi sono stati lasciati nelle acque reflue del depuratore è possibile dividerlo in 5 periodi:

- I periodo dal 3/11/22 al 17/11/22;
- II periodo dal 17/11/22 al 30/11/22;
- III periodo dal 8/12/22 al 24/12/22;
- IV periodo dal 26/12/22 al 11/01/23;
- V periodo dal 12/01/23 al 28/01/23.

In media ciascun campionario è stato lasciato in acqua circa due settimane. In alcuni periodi è stato utilizzato anche un metodo di campionamento spot, in particolare questo è stato effettuato nelle seguenti date:

- 3 novembre 2022;
- 17 novembre 2022;
- 8 dicembre 2022;
- 24 dicembre 2022;

Per quanto riguarda il campionamento passivo dell'acqua di mare in prossimità del depuratore, questo è stato effettuato solamente in due periodi:

-dal 31/10/22 al 19/11/22;

-dal 11/01/23 al 25/01/23.

Il campionamento con le bottiglie Niskin, invece, è stato eseguito solo in data 8 gennaio 2023 e 23 gennaio 23.

Per preparare le cartucce è stato necessario condizionarle con 3 mL di MeOH e 5 mL di acqua ultra-pura, solo dopo ciò sono state caricate con un volume di circa 500 mL di acqua (reflua o di mare).

Inoltre, per eseguire le prove di recupero per la validazione di una modifica del metodo tradizionale, sono stati analizzati dei POCIS provenienti da Santa Margherita Ligure campionati a settembre 2021 e lasciati in acqua per circa 12 giorni (vedere figura 39, la zona OS1 è dove sono stati prelevati i campioni). Inoltre, sono state processate le acque nelle bottiglie apposite e i POCIS che hanno campionato nel Porto di Genova. Il campionamento spot è stato fatto il 7, il 17 e il 28 Febbraio 2023, mentre quello dei POCIS nel periodo dal 7 al 28 Febbraio 2023.



Figura 39. Zona di prelievo dei campioni di Santa Margherita e del Porto di Genova.

4.3 Metodo di preparazione del campione

I campioni Antartici sono stati conservati a -20°C , fino al momento del processamento che è avvenuto nel laboratorio dell'Università di Genova. Per iniziare, sono stati fatti scongelare per circa 20 minuti. Successivamente, seguendo il metodo classico per i POCIS e i simil-POCIS, la fase HLB è stata trasferita con 20 mL di H₂O Milli-Q in cartucce per le SPE dotate di un frit al loro interno. Per eseguire questa operazione, è stato posizionato un imbuto di vetro sulla cartuccia, e sopra ad esso i POCIS sono stati aperti in due parti, prima però sono stati svitati i bulloni che tenevano uniti i due anelli in acciaio inossidabile. Su ciascuna delle due parti è stata fatta passare l'acqua per trasferire la fase verso il fondo della cartuccia, cercando di fare attenzione a lasciarne il meno possibile sulla membrana. Successivamente, la fase è stata coperta con un altro frit, e lasciata ad asciugare collegando l'apparato su cui era posta la cartuccia (figura 40) ad una pompa da vuoto. È stato quindi valutata la quantità di fase trasferita andando a pesare la cartuccia (preventivamente pesata). Infine, la cartuccia è stata posta in freezer per una notte.



Figura 40. Foto della strumentazione per l'eluizione delle SPE.

Successivamente, la cartuccia è stata montata nell'apposito apparato, e sotto ad essa, sono stati posizionati dei palloncini per raccogliere l'eluato. Inizialmente, sono stati introdotti 4 mL di MeOH e si è lasciato che la fase si bagnasse completamente, dopo ciò è stato eluito con ulteriori 16 mL di metanolo. Dopo questi passaggi, i rubinetti sono stati aperti completamente per far defluire tutto il metanolo ed è stata attivata la pompa per eliminare eventuali residui di solvente.

A questo punto è stato cambiato eluente e sono stati usati 5 mL di una miscela 80:20 v/v di DCM:IPA (diclorometano : isopropanolo). Infine, è stato aperto il rubinetto delle SPE ed è stata accesa la pompa da vuoto per circa un'ora, affinché la fase si asciugasse completamente.

Il palloncino contenente l'eluato è stato collegato al rotavapor (Rotavapor® R-100, BUCHI, Svizzera) per eliminare tutto il solvente. Successivamente è stato staccato il palloncino dal rotavapor e aggiunto 1 mL di MeOH. Il solvente è stato prelevato con una siringa dentro il palloncino, filtrato tramite un filtrino idrofilico di PTFE da 0,2 µm attaccato ad essa e trasferito tutto in un vial. Infine, dopo opportune diluizioni, è stato analizzato con HPLC-MS/MS.

Per quanto riguarda le SPE, è stata eseguita una procedura simile, ma partendo direttamente con 4 mL di MeOH e proseguendo nello stesso modo.

In questo lavoro di tesi è stata apportata una modifica al metodo scritto sopra: il trasferimento della fase dei POCIS nelle cartucce SPE non è stato effettuato con acqua, ma a secco. Infatti, dopo aver fatto asciugare il POCIS per una notte sotto cappa, sono stati aperti sopra l'imbuto di vetro e, anziché utilizzare i 20 mL di acqua, è stata utilizzata una spatolina per rimuovere la fase attaccata alle membrane facendola cadere nelle SPE sottostanti. Per valutare se questa modifica potesse andare bene o meno sono state fatte delle prove di recupero, che verranno discusse nei capitoli successivi.

4.4 Ottimizzazione del metodo

In questo lavoro di tesi, si è voluto capire se fosse possibile trasferire a secco, quindi senza l'aiuto dell'acqua, la fase dei POCIS nelle cartucce SPE. Per farlo, è stato necessario fare delle prove utilizzando 5 POCIS provenienti da Santa Margherita Ligure e processandoli sia con il metodo tradizionale sia con quello a secco, al fine di evidenziarne le differenze. Il potenziale vantaggio che avrebbe il trasferimento a secco è legato al fatto che non si perderebbero quegli analiti che vengono di solito lavati via con l'acqua.

Uno di questi POCIS è stato processato normalmente in umido e l'acqua utilizzata per il trasferimento (20 mL di acqua Milli Q) è stata divisa in 3 aliquote da 6 mL ciascuna.

Nella cartuccia dove è stata trasferita la fase si fa lo spike (per avere una concentrazione finale dopo la diluizione di 10 µg/L) degli analiti, per verificare il recupero e l'effetto matrice.

Le 3 aliquote di prima sono state processate in modo differente: una è stata lasciata tal quale, per verificare se gli analiti fossero già nel campione o meno, nelle altre due è stato effettuato uno spike (per avere una concentrazione finale dopo la diluizione di 10 µg/L) per comprendere dove si ripartissero gli analiti nel processo.

Dopo, è stato effettuato il processo di salting out, ovvero un metodo per estrarre in modo efficiente le sostanze organiche. All'acqua del trasferimento è stato aggiunto dell'acetonitrile, in proporzione 5:1, in modo da avere una preconcentrazione. È stato scelto proprio questo solvente organico in quanto, essendo miscibile con l'acqua, poteva garantire un'efficienza di estrazione massima. Nella pratica, sono stati prelevati 5,5 mL dell'aliquota e aggiunti 1,1 mL di acetonitrile. Il tutto è stato agitato un minuto al vortex. Successivamente sono stati aggiunti i sali: 220 mg di NaCl e 840 mg di MgSO₄ per ciascun mL di H₂O. È stato utilizzato nuovamente il vortex per 1 minuto e dopo si è lasciato ad agitare in centrifuga per 9 minuti, in questo modo si avrà una migliore stratificazione. Dopo questo passaggio sono stati ottenuti nella provetta due strati: in alto quello dell'acetonitrile e in basso quello acquoso. In fondo alla provetta sono rimasti depositati i sali, che hanno il compito di aumentare la forza ionica e di favorire il passaggio in fase organica degli analiti. Infine, è stato prelevato il surnatante con una siringa e filtrato per togliere eventuali residui di sale.

L'aliquota tal quale, ovvero quella su cui non era stato fatto lo spike, è stata divisa ulteriormente in due: in una si effettua lo spike a 10 µg/L prima dell'analisi strumentale mentre nell'altra no. Infine, tutte le aliquote sono state diluite 1:10 in un solvente di ACN:H₂O (95:5) prima dell'analisi in HPLC/MS-MS.

Gli altri 4 POCIS sono stati trasferiti nelle SPE a secco, utilizzando esclusivamente una spatolina. Su due delle quattro cartucce è stato effettuato uno spike a 10 µg/L prima di porre il secondo frit, successivamente è stato aggiunto in tutte e quattro 1 mL di acqua per bagnare la fase. Infine, sono state messe nel congelatore per una notte.

Il giorno seguente le cartucce sono state lasciate a temperatura ambiente per farle scongelare. Successivamente sono stati fatti passare 5 mL di H₂O in ciascuna cartuccia e

raccolti in dei palloncini di vetro. Ciascuna aliquota è stata divisa in due (circa 1,2 mL ognuna), in modo tale da avere più repliche (per ogni POCIS ce ne saranno due).

A questo punto è stato eseguito il processo di salting out secondo quanto precedentemente descritto. Successivamente, ciascun campione è stato diviso in due repliche e diluito a 10 in un solvente di ACN:H₂O in proporzione 95:5. Una delle repliche è stata analizzata tal quale, mentre nell'altra è stato fatto un ulteriore spike a 10 µg/L.

Le acque sono state analizzate per valutare la perdita degli analiti polari durante l'eluizione con l'acqua. Per fare ciò sono stati calcolati i recuperi e gli effetti matrice.

Infine, le cartucce SPE, contenenti le fasi dei POCIS trasferiti prima, sono state eluite seguendo il procedimento descritto nel capitolo 4.3. I campioni prima dell'analisi in HPLC/MS-MS sono stati diluiti di 10 volte, utilizzando un solvente di H₂O: MeOH in proporzione 1:1. I risultati delle analisi di tutti i campioni preparati verranno trattati nel capitolo 6.1.

4.5 Valutazione del recupero delle SPE

Per completare questo lavoro di tesi, sono state condotte delle analisi per calcolare il recupero delle cartucce SPE. Per fare ciò quattro cartucce della marca Waters sono state impaccate ponendo all'interno la fase HLB e due frit. Successivamente sono state condizionate con 5 mL di metanolo, che è stato lavato via facendo passare 5 mL di acqua MilliQ. Nel frattempo, è stata preparata l'acqua che dovrà essere campionata dalle cartucce, andando a preparare quattro becker da 100 mL di acqua MilliQ e aggiungendo in 3 di questi uno spike a 1 µg/L. L'acqua lasciata tal quale è stata fatta passare in una delle cartuccia SPE che è stata considerata come bianco procedurale.

Infine, dopo aver caricato tutta l'acqua presente nei becker, la fase di tutte le cartucce è stata lavata con altri 5 mL ciascuno di acqua MilliQ e lasciata ad asciugare. Sia l'acqua caricata sia quella del lavaggio sono state raccolte, al fine di determinare in quali passaggi della metodica sono stati persi di più gli analiti. In particolare, nelle acque caricate rimarranno gli analiti che, passati nelle cartucce, non hanno interagito con la fase. Nelle acque di lavaggio saranno presenti gli analiti che, sebbene abbiano interagito con la fase, lo hanno fatto troppo labilmente. Nell'eluato si troveranno gli analiti che

hanno interagito correttamente con la fase. Infine, è possibile che alcuni analiti siano rimasti sulla fase anche dopo l'eluizione .

Le acque caricate e di lavaggio, prima dell'analisi strumentale sono state diluite 1:1 con il MeOH. I campioni derivati dall'eluizione delle cartucce SPE (eseguita sempre con il metodo del capitolo 4.3) invece sono stati diluiti di 10 volte prima dell'analisi in HPLC/MS-MS. I risultati di queste analisi verranno trattati nel capitolo 6.2.

4.6 Analisi strumentale

Le analisi sono state eseguite tramite un cromatografo 1200 SL Liquid Chromatograph della Agilent (Santa Clara, CA, USA) che utilizza una colonna polare C18 della Kinetex® (100 mm × 2.1 mm; con grandezza delle particelle di 2.6 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Il cromatografo è accoppiato con uno spettrometro di massa con triplo quadrupolo della Agilent 6430.mass spectrometer (MS), con sorgente di ioni di tipo electrospray (ESI). Il software utilizzato per l'acquisizione dei dati è MassHunter 10.0.

Per l'analisi sono state usate due modalità di acquisizione MS: una definita 'polarity switching', dove le modalità di ionizzazione si alternano continuamente tra positivo e negativo, e l'altra 'ioni negativi'. Con la modalità 'polarity switching', invertendo più volte al secondo la polarità applicata tra il capillare e il controlettrodo, si riescono a far passare sia ioni che ionizzano con un voltaggio positivo sia quelli che lo fanno con un voltaggio negativo, mentre con l'altra modalità solo quelli negativi. Per tutte e due le modalità il volume di iniezione è 10 µL, mentre la temperatura è mantenuta costante a 40°C. Nella modalità 'polarity switching' le fasi A e B utilizzate per l'eluizione a gradiente, sono rispettivamente di H₂O e di ACN, entrambe acidificate all' 0,001% v/v con acido acetico. Il programma di eluizione a gradiente per questo metodo è come riportato in Tabella 1.

	0 MINUTI	2 MINUTI	7 MINUTI	10 MINUTI
FASE A	60%	30 %	30 %	60%
FASE B	40%	70 %	70 %	40%
Velocità di flusso	0,3 mL/min	0,3 mL/min	0,4 mL/min	0,3 mL/min

Tabella 1. Programma della modalità 'polarity switching'.

L'analisi con questo metodo dura circa 16 minuti, infatti dopo il decimo minuti ci sono circa 6 minuti per il riaggiustamento della colonna.

Per il metodo 'in negativo', invece, si utilizzano H₂O e ACN neutri come fase A e B (tabella 2), e la durata delle analisi totale è di 14 minuti con un flusso costante di 0,3 mL/min. Questo metodo è stato utilizzato per sette analiti (BPA, estradiolo, 17- α etinilestradiolo, estrone e triclosan), mentre tutti gli altri sono stati analizzati con il metodo precedente.

	6 MINUTI	5 MINUTI	7 MINUTI	14 MINUTI
FASE A	60%	10 %	60 %	60%
FASE B	40%	90 %	40 %	40%

Tabella 2. Programma della modalità 'ioni negativi'.

Per entrambi i metodi le impostazioni della sorgente ESI erano: la temperatura a 300°C, la velocità del flusso di gas di essiccamento N₂ a 11 L/min, la pressione del nebulizzatore a 15 psi e la tensione del capillare a 4000 V [56].

Lo spettrometro di massa è stato utilizzato in modalità MRM (multiple reaction monitoring) per aumentare la sensibilità (di questa se ne parlerà nel capitolo 5.3.2). Sono state utilizzate due transizioni MRM per ciascun analita (ad eccezione di ketoprofene, ibuprofene e paraxantina), impiegando la transizione più abbondante per l'analisi quantitativa e la seconda per la conferma qualitativa.

5 STRUMENTAZIONE

5.1 Il campionamento passivo

I campionatori passivi sono dispositivi in grado di campionare gli analiti sfruttando la diffusione degli inquinanti, grazie alla formazione di un gradiente di concentrazione tra mezzo da monitorare (ad esempio aria o acqua) e campionatore. Questa tipologia di campionatori risulta essere molto utile in quanto fornisce dei valori di concentrazioni integrati nel tempo dell'intero campionamento e non solamente di un momento specifico. Nella determinazione dei livelli di concentrazione degli inquinanti nell'aria, esso risulta molto utile poiché permette di valutare l'esposizione effettiva di una persona a queste sostanze.

Il campionamento passivo utilizzato in questo lavoro di tesi è avvenuto tramite l'uso di POCIS, questi permettono un monitoraggio integrativo degli inquinanti nell'acqua. Con questo tipo di campionatori gli analiti vengono accumulati direttamente in situ. La tecnica si basa, infatti, sul campionamento spontaneo dell'analita, il quale muovendosi nel mezzo senza che vi sia impressa alcuna forza, passa dal mezzo campionato alla fase del campionatore. Il passaggio è dovuto alla differenza di concentrazione tra la fase ricevente e il mezzo che si vuole campionare, affinché ciò avvenga è necessaria un'affinità tra gli analiti e la fase.

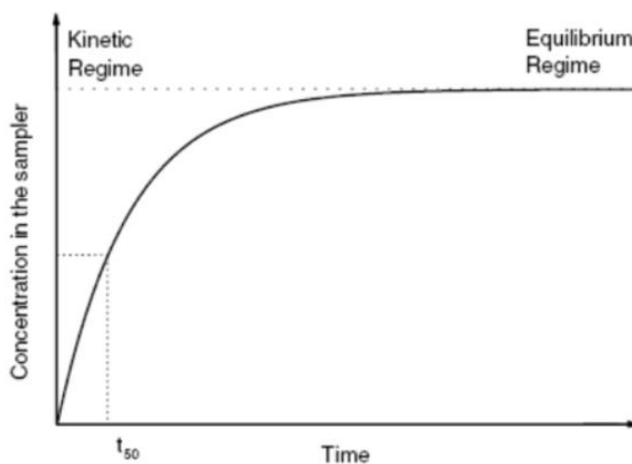


Figura 41. Cinetica di accumulo degli analiti in campionatori passivi.

Dal grafico riportato in Figura 41, si nota che la cinetica di accumulo di un analita in un campionatore passivo è formata da due fasi principali: il regime cinetico e il regime di equilibrio. Quando si raggiunge il plateau nel regime di equilibrio la velocità di accumulo dell'analita nel campionatore eguaglierà quella di rilascio dell'analita nel mezzo campionato. Per raggiungere il regime di equilibrio ci vuole diverso tempo, in

quanto l'unica forza che agisce è la differenza di potenziale chimico. Per tale ragione non si utilizza quasi mai il campionatore passivo al regime di equilibrio ma si rimane in quello cinetico e si considera la relazione (equazione 1):

$$C_s(t) = C_w \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{Equazione 1. Cinetica di un campionatore passivo.}$$

In questa equazione $C_s(t)$ indica la concentrazione di analita nel campionatore dopo un certo tempo (t), C_w indica la concentrazione dell'analita nell'acqua, mentre k_1 e k_2 sono le costanti di accumulo e rilascio nell'ambiente. Quando si è in regime cinetico la k_2 (relativa al rilascio nell'ambiente dell'analita) viene assunta come trascurabile rispetto a k_1 e quindi l'equazione si può semplificare in: $C_s(t) = C_w k_1 t$. Solitamente lo scopo delle analisi è cercare di misurare il valore di C_w , per farlo si può riscrivere questa equazione in un'altra che abbia $M_s(t)$ al posto di $C_s(t)$ e R_s al posto di $k_1 \cdot V$ (comparare il volume perché si è passati da una concentrazione a una massa). In questo modo la relazione ottenuta è (equazione 2):

$$M_s(t) = C_w R_s t, \quad \text{Equazione 2. Espressione semplificata della cinetica.}$$

dove $M_s(t)$ è la massa di analita trattenuta dal campione, mentre R_s (sampling rate) è la velocità di accumulo espressa in litro/giorno. Scegliendo quindi un generico tempo t si è in grado di definire la massa d'acqua privata dell'analita. Solitamente tramite l'espressione si ottiene il valore C_w che indica la concentrazione media pesata nel tempo dell'analita (detta anche TWA, ovvero time weighted average concentration) in quella specifica acqua. Al fine di ricavare R_s è necessario conoscere i parametri che possono influenzarlo:

- Velocità e turbolenza dell'acqua favoriscono R_s più alti, infatti in un'acqua stagnante questo parametro è basso. Questo è dovuto al fatto che, non essendoci il movimento dell'acqua dovuto alle correnti, l'unica forza che muove gli analiti è la differenza di potenziale chimico; perciò, il processo di accumulo sarà più lento;
- La temperatura può far variare il valore di parametri cinetici come R_s ma ha un peso poco rilevante rispetto agli altri. Ad esempio, uno studio sui contaminanti emergenti nelle acque ha dimostrato che i valori di R_s degli analiti considerati rimane pressoché costante alle temperature di 5°C e 25°C [57];

- Il biofouling altera i valori di R_s , solitamente diminuendoli. Infatti, più lo strato vegetativo che si forma sulla superficie del campionatore è grande, più l'accumulo degli analiti è lento.

Il parametro R_s non è sempre un valore costante ma cambia per ciascun analita. Esso, inoltre, non dipende dalla concentrazione, come potrebbe suggerire la legge di Fick che lega la diffusione alla concentrazione nel mezzo in modo proporzionale, ma ne è indipendente poiché i campionatori passivi si usano solo a concentrazioni basse (tracce o ultratracce) degli analiti, grazie anche al fatto che possono fungere anche da sistemi di preconcentrazione.

Per ricavare sperimentalmente il valore di R_s è necessario conoscere la C_w ; infatti, basta utilizzare la formula inversa dell'equazione che per i POCIS è: $C_w = C_s M_{ads} / R_s t$. Per ottenere il valore di C_w si devono fare degli spike a concentrazioni note dell'analita nel mezzo da campionare (così si ha C_s), e misurare in tempi diversi la quantità che va nel campionatore. Costruendo poi una retta che ha sull'asse delle x il tempo (t) e sull'asse delle y ng/POCIS (modo per esprimere i ng/g di fase nel POCIS), si ricava il valore di R_s che è la pendenza della retta. Infine, sono stati proposti in letteratura diversi metodi per la calibrazione dei POCIS, per esempio nel nostro laboratorio ne è stato sviluppato uno in grado di calcolare l' R_s per alcuni analiti come pesticidi, FANS e composti perfluorurati [58].

Grazie al campionamento passivo si ottiene un valore medio della concentrazione di un analita in un certo tempo e si può anche capire se ci sono stati sversamenti oppure no. Con il campionamento spot questo non sempre avviene e dipende fortemente dal periodo in cui si è campionato. Il campionamento passivo non sostituisce il campionamento spot ma semplicemente fornisce informazioni diverse. I vantaggi di questo tipo di campionamento sono:

- riunire in un solo passaggio il campionamento, la preconcentrazione e la purificazione (ad esempio se utilizzo i POCIS verranno campionate principalmente le sostanze polari);
- non alterare la speciazione campionando solo il disciolto;
- non utilizzare energia e semplificare la metodologia di preparazione del campione.

In questo lavoro di tesi, come già riportato, sono stati impiegati i campionatori passivi POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers), essi sono formati da due anelli in

acciaio inox che tengono unite due membrane in polietere solfone. All'interno delle membrane è posta una fase adsorbente (Figura 42).

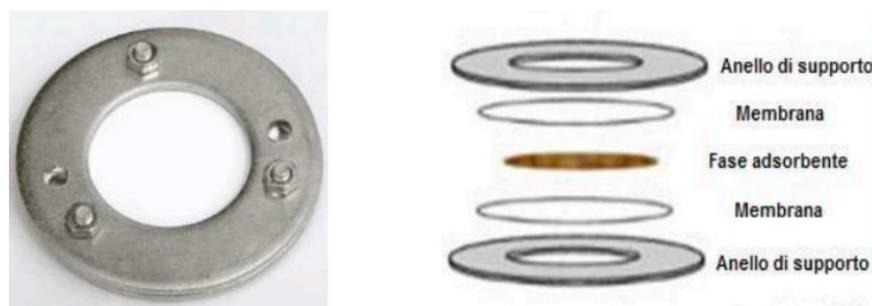


Figura 42. Struttura del POCIS.

La fase che viene utilizzata di più attualmente è la Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance), questa è formata da una miscela di N-vinilpirrolidone e divinilbenzene: uno trattiene le sostanze polari mentre l'altro quelle meno. Grazie a questo mix la fase è molto versatile, infatti riesce a trattenere le sostanze che rientrano in un certo range di polarità e non solo quelle aventi una polarità specifica. Le fasi migliori, infatti, non sono quelle specifiche per una certa sostanza ma quelle in grado di trattenere più analiti possibili in un certo range di polarità.

Per quanto riguarda le due membrane nei POCIS, esse presentano una porosità alta ma con diametro dei pori piccolo, ciò è responsabile dell'effetto barriera. Infatti, la membrana, risulta essere un ostacolo per l'analita, il quale deve passare attraverso questi canali per arrivare alla fase adsorbente. Nei pori si forma uno strato di acqua interno ed esterno alla membrana che influenza l' R_s . Il film risulta essere più sottile quando il movimento dell'acqua è più turbolento ed influenza meno il valore di R_s , che è più alto. Lo strato d'acqua si chiama 'boundary layer control' e si tiene conto nel calcolo del valore dell' R_s secondo l'equazione 3.

$$R_s = (D_w / l_w) A$$

Equazione 3. Espressione che lega R_s al 'boundary layer'.

Nell'equazione sopra riportata D_w è il coefficiente di diffusione in acqua, l_w è lo spessore dello strato d'acqua nelle membrane e A è l'area superficiale del campione.

Con il parametro relativo all'area si fa riferimento alla somma delle aree delle due membrane (che è la parte dove passano gli analiti). Più l'area è piccola più il valore di R_s sarà basso. Per quanto riguarda il valore di l_w , più spesso è il film e minore sarà l' R_s , perciò, è necessario porsi in condizioni sperimentali per minimizzare questo parametro.

Infine, il D_w è un valore che dipende dalla struttura della molecola di analita considerato [59].

Nonostante lo sviluppo dei campionatori passivi, il campionamento più comune per le matrici acquose è quello 'spot', detto anche discreto, esso rappresenta una fotografia del livello di concentrazione dei contaminanti in un determinato momento nel tempo. Il limite di questo campionamento sta nel fatto che la concentrazione potrebbe non essere stabile nel tempo e quindi fornisce informazioni che dipendono, in modo molto stretto, dal momento in cui è stato effettuato. In questa categoria rientra il campionamento effettuato con bottiglie Niskin a cui segue il passaggio di preconcentrazione nelle cartucce SPE, esse risultano essere molto utili per gli analiti presenti in concentrazioni molto basse in matrici acquose. Infatti, tramite l'uso di queste cartucce avviene anche una purificazione e la matrice, se si utilizza una fase corretta, viene in gran parte eliminata. Inoltre, può essere utilizzata anche come tecnica di conservazione: la cartuccia non eluita può essere tenuta in freezer a bassa temperatura, questo consente un trasporto più agevole rispetto a quando si lascia il campione di acqua nella bottiglia Niskin.

L'utilizzo delle SPE prevede diverse fasi: il condizionamento della cartuccia, il passaggio della matrice acquosa, il lavaggio della matrice tramite opportuno solvente e l'eluizione (Figura 43).

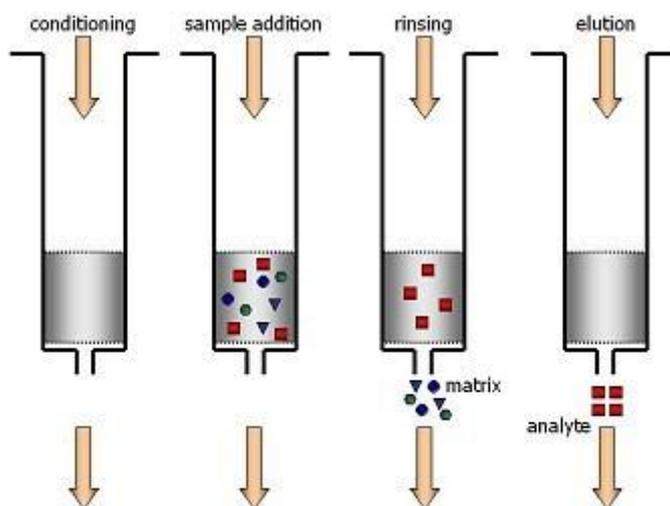


Figura 43. Passaggi eluizione con SPE.

5.2 La cromatografia

La cromatografia è un metodo analitico che permette di separare le diverse sostanze in una miscela. Questa tecnica è stata ideata nei primi anni del '900 da un botanico di nome Mikail Tswett, che l'ha utilizzata per separare i pigmenti. Esistono due tipi principali di cromatografia: liquida e gassosa. Quella che interessa questo lavoro di tesi è quella liquida detta LC (Liquid Chromatography). Il principio fondamentale su cui si basa la cromatografia è la presenza di due fasi: la fase mobile e quella stazionaria, che si trova all'interno di una colonna. La fase mobile ha un'affinità con gli analiti e quindi saranno poi questi ultimi a doversi ripartire tra questa fase e quella stazionaria. Nella LC si utilizza un gradiente relativo alla forza dei solventi della fase mobile di eluire gli analiti. Le colonne hanno solitamente dimensioni differenti, ed infatti devono essere corte abbastanza per permettere una buona separazione e, allo stesso tempo, un'analisi veloce. Quando viene diminuita la lunghezza della colonna viene ridotto anche il 'percorso cromatografico utile', ovvero la porzione in cui l'analita riesce a ripartirsi tra fase mobile e fase stazionaria in base a degli equilibri definiti dall'affinità per l'una o per l'altra fase. Se una miscela è formata da sostanze simili tra loro, la lunghezza della colonna è fondamentale affinché possano essere eluite una dopo l'altra e non tutte insieme. Nella LC è necessario l'impaccamento con particelle aventi diametro sempre minore, in quanto si è reso necessario ridurre il diametro della colonna stessa [60].

5.2.1 Le grandezze cromatografiche

Per definire un picco si utilizzano tre diversi parametri: l'efficienza, la risoluzione e la selettività.

5.2.1.1 L'efficienza, la ritenzione e la selettività

L'efficienza è definita dal numero di piatti teorici e dall'altezza del piatto. Infatti, l'efficienza di una colonna cromatografica aumenta quando il numero dei piatti diventa più grande e l'altezza del piatto più piccola. L'origine dei termini 'altezza del piatto' e 'numero dei piatti' deriva da uno studio teorico di due ricercatori (Martin e Synge) in cui trattarono la colonna cromatografica come se fosse una colonna di distillazione formata da diversi strati stretti, posti uno sotto l'altro, denominati piatti teorici. I due scienziati ipotizzarono che in ciascun piatto s'instaurasse un equilibrio del soluto tra fase mobile e stazionaria. In pratica, i piatti teorici sono quella porzione di colonna in cui si ipotizza avvengano gli equilibri competitivi tra fase mobile e stazionaria. Il numero di piatti dipende dalla lunghezza della colonna rapportata all'altezza del piatto. Il movimento del

soluti lungo la colonna fu trattato come un trasferimento a gradini di una fase mobile equilibrata da un piatto all'altro.

La ritenzione (o capacità), invece, è il parametro che indica quanto tempo l'analita sta all'interno della colonna. Più questo valore è alto, più l'affinità con la fase stazionaria è maggiore.

La selettività, infine, è il rapporto tra due parametri di capacità, permette quindi di confrontare due picchi e informare sulla loro distanza nel cromatogramma. Questo parametro è importante per riuscire a creare le condizioni per avere un cromatogramma con picchi distanziati.

5.2.2 La Cromatografia liquida ad elevate prestazioni

In figura 44 è riportato lo schema semplificato di uno strumento HPLC (high performance liquid chromatography), ovvero un cromatografo liquido ad alte prestazioni.

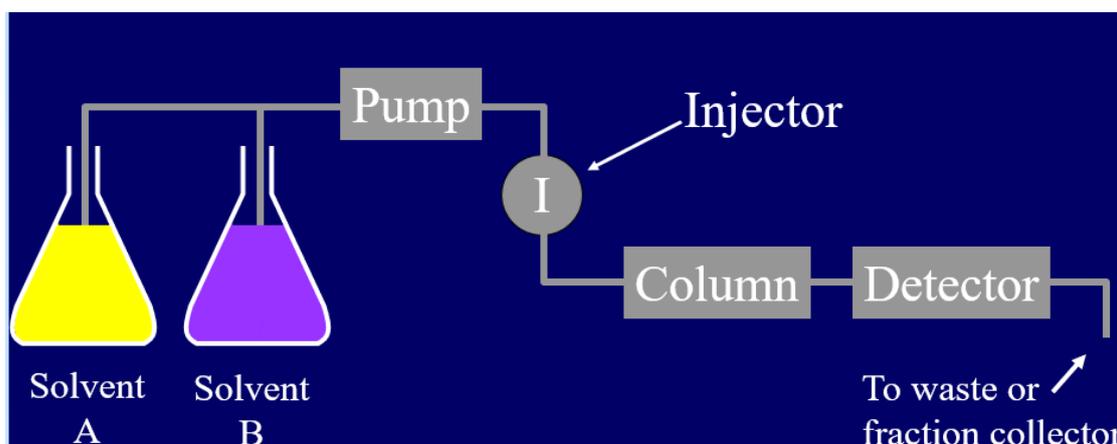


Figura 44. Schema di un HPLC.

Nella figura 44 sono rappresentati i solventi, che miscelati tra loro secondo opportune proporzioni, formeranno l'eluente corretto per l'analisi. Eventualmente le proporzioni tra i due solventi possono cambiare durante le analisi per avere un gradiente di eluizione. Se invece, durante le analisi, non si cambia la forza del solvente si chiama eluizione isocratica. I solventi prima di essere utilizzati devono essere privati di eventuali gas disciolti, che possono portare a velocità di flusso non riproducibili o ad un allargamento della banda.

Nella strumentazione è presente una pompa, che è necessaria per vincere la resistenza che oppone la fase stazionaria al passaggio di un liquido. Questa rispetto alla LC classica

risulta essere più performante, infatti arriva fino ai 414 bar. Nelle moderne strumentazioni questa è una parte fondamentale poiché, avendo ridotto le dimensioni delle particelle che impaccano la colonna, la resistenza dovuta al passaggio del liquido è più forte.

Un'altra parte importante è l'iniettore, che consente di aggiungere il campione senza alterare il flusso dei solventi. Il volume delle aggiunte può essere minimo di 1 μL e deve essere costante durante le analisi affinché si possa avere una buona riproducibilità. Per non inficiare sull'efficienza dello strumento, è necessario aggiungere volumi piccoli di campione, in modo tale che non si abbia un allargamento delle bande.

Infine, c'è la colonna cromatografica, che è il cuore di questa strumentazione, e il detector (o rivelatore) che permette di trasformare i segnali chimici in impulsi elettrici. In questo caso il rivelatore è uno spettrometro di massa (verrà trattato nel capitolo 5.3).

Le colonne più comuni hanno dimensioni comprese tra i 10 cm e i 15 cm, con un volume interno di 4,6 mm e impaccate con particelle da 5 μm [60].

5.3 La spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica che mira a differenziare ioni gassosi in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Questa tecnica si può applicare sia ad atomi che molecole. Per avere uno spettro di massa, le molecole devono frammentarsi, rompendo le loro strutture originarie, ed essere trasformate in specie cariche. Nello spettro che si ottiene, quindi, saranno rivelate solo le specie ioniche in fase gassosa. Lo spettro di massa può dare sia informazioni qualitative che quantitative; infatti, conoscendo il meccanismo di formazione dei frammenti che si formano si può risalire alla molecola originaria. Esso si trova sottoforma di un grafico dove il rapporto m/z è messo in relazione con l'intensità relativa del picco.



Figura 45. Processo di formazione dei frammenti nella MS.

L'impatto di una molecola con elettroni energetici impartisce un'energia sufficiente affinché la molecola formi un radical catione, definito ione molecolare. Quest'ultimo ha la massa uguale a quella della molecola neutra ma ha un elettrone in meno. Gli ioni

molecolari possono frammentarsi e così avviene un rilassamento che produce ioni con masse più piccole (figura 45).

Lo spettrometro di massa è caratterizzato tra tre parti fondamentali (figura 46):

- la sorgente di ioni;
- l'analizzatore di masse ioniche;
- il misuratore ionico o detector.

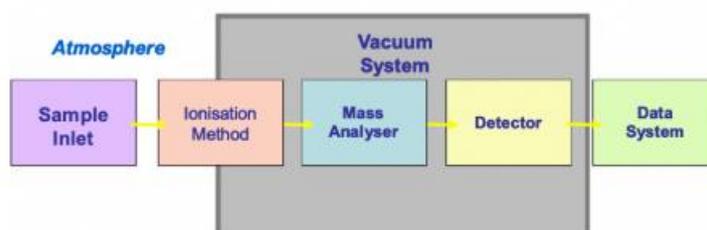


Figura 46. Schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

In aggiunta a queste c'è anche il sistema di introduzione del campione, che in questo lavoro di tesi è rappresentato dall' HPLC (descritto nel capitolo precedente 5.2) e il data system cioè lo strumento che deve gestire i dati, ovvero il computer.

Tra il sistema di introduzione del campione e lo spettrometro di massa è necessaria la presenza di un'interfaccia. Questa deve essere in grado di:

- eliminare l'eccesso di eluente, limitando i flussi in entrata dell'MS a valori opportuni, compatibilmente con il sistema di pompaggio. Si vuole, infatti, avere un flusso arricchito di analita e povero di eluente;
- ridurre la pressione, in quanto si passa da pressione atmosferica ad una pressione di qualche mbar;
- trasferire in modo ottimale il campione fino alla sorgente dell'MS.

Esistono delle sorgenti che possono fungere anche da interfaccia e fanno parte delle tecniche API (Atmospheric Pressure Ionization), esse riescono a ionizzare le molecole in fase gas in condizione di pressione atmosferica. In questa tipologia di sorgenti rientra quella che è stata utilizzata per queste analisi, ovvero l'ESI (ElectroSpray Ionization).

Le sorgenti, inoltre, si possono dividere in due tipologie: quelle hard e quelle soft. Le sorgenti hard sono sorgenti molto energetiche, a tal punto che è permessa sia la ionizzazione sia la frammentazione della molecola. Lo spettro che deriva da queste sorgenti avrà tanti picchi, che corrisponderanno a tutti i frammenti che si sono formati. A differenza delle hard, le sorgenti soft sono poco energetiche e non hanno un surplus di energia che permette una buona frammentazione della molecola. Nello spettro sarà presente solamente il picco dello ione molecolare.

5.3.1 La sorgente ESI

L'ESI fa parte delle sorgenti soft, ovvero poco energetiche, che riescono a frammentare di meno la molecola. Questo accade poiché tutta l'energia viene utilizzata per ionizzare la molecola e non ne rimane altra per far sì che avvenga la frammentazione.

Questa sorgente si definisce Electrospray in quanto nebulizza il liquido e, grazie all'azione di un campo elettrostatico, si vanno a formare delle piccole goccioline cariche.

L'uso di questa sorgente ha diverse caratteristiche, una tra queste deriva dal fatto che essendo una tecnica di ionizzazione soft, gli spettri che si ottengono sono più semplici ed è possibile avere una frammentazione controllata se si agisce su alcuni parametri di questa sorgente. Inoltre, con questa tecnica si possono ionizzare macromolecole ed è accoppiabile alla cromatografia.

I processi che stanno alla base dell'ESI non sono del tutto conosciuti ma possono essere schematizzati in quattro step:

- formazione di goccioline cariche di elettrolita disciolto nel solvente;
- riduzione delle dimensioni delle goccioline e conseguente esplosione;
- formazione di ioni gassosi;
- processi di modificazione degli ioni gassosi.

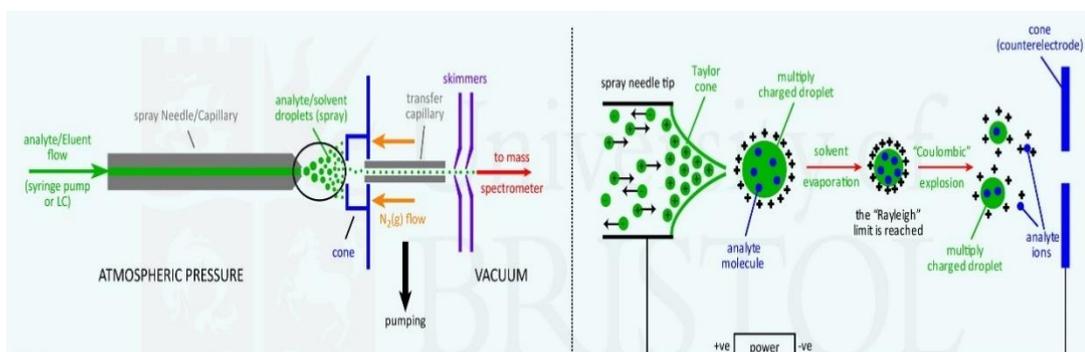


Figura 47. A sinistra interfaccia tra HPLC e ESI, a destra ingrandimento della parte cerchiata nella figura a sinistra.

Nella figura 47 è mostrata l'interfaccia tra la colonna HPLC e la sorgente ESI. Nella colonna cromatografica si inietta una soluzione elettrolitica che, tra la fine del capillare (elettrodo) e il controlettrodo si trasforma in nebulizzato carico. Ciò avviene grazie all'applicazione di una differenza di potenziale di qualche kV. Il controlettrodo separa la parte a pressione atmosferica dal vuoto dell'analizzatore di massa.

L'applicazione di una differenza di potenziale tra i due elettrodi genera un campo elettrico, che può essere visto come un circuito. Il solvente elettrolitico che fluisce dal capillare è conduttore e chiude il circuito. Il campo elettrico applicato può penetrare dentro il capillare, dove fluisce il liquido, e far prendere agli ioni una disposizione particolare. Gli ioni presenti nella soluzione che hanno la stessa polarità del capillare si dispongono sulla superficie del liquido, mentre quelli con polarità opposta tendono a stare verso il centro (figura 48). Questa disposizione delle cariche viene mantenuta anche nelle goccioline che si formano dopo la nebulizzazione.



Figura 48. Disposizione delle cariche nel capillare e nelle goccioline.

Gli ioni sulla superficie del liquido sono attratti dal controlettrodo, ma anche trattenuti dalle forze di coesione superficiale, questo fa sì che si formi il cono di Taylor (come mostrato in figura 47 a destra). Il cono non è chiuso, bensì si ha la formazione di un jet: nella parte finale il liquido inizia a vibrare, formando delle onde vorticosi, che aumentano via via che ci si avvicina al controlettrodo. Nel momento in cui le vibrazioni si faranno molto intense, si staccherà la goccia, formando l'aerosol di particelle cariche. Spesso la sorgente ESI prevede anche un controflusso di gas inerte, solitamente azoto, per favorire la formazione dell'aerosol. Le gocce che si formano devono essere il più piccole possibili per favorire l'efficienza di ionizzazione, che è agevolata da un rapporto superficie/volume elevato. Le dimensioni della goccia sono dipendenti da diversi fattori, uno tra questi è la differenza di potenziale: se questo è grande anche il diametro della goccia lo sarà. Le condizioni ottimali suggeriscono quindi un voltaggio non troppo elevato, in quanto potrebbe innescare anche un altro effetto ovvero il Corona Discharge, una scintilla che si innesca tra gli elettrodi.

Dopo la formazione delle goccioline queste vengono accelerate contro il controlettrodo e le loro dimensioni si ridurranno per due fattori:

-l'evaporazione del solvente;

-le esplosioni coulombiane: dovute alla troppa vicinanza tra le cariche all'interno della goccia. La forza di repulsione prevale sulla tensione superficiale e si ha l'esplosione.

Per la formazione degli ioni gassosi dalle goccioline esistono due teorie principali: Charged Residue Model e Ion Evaporation Model (figura 49).

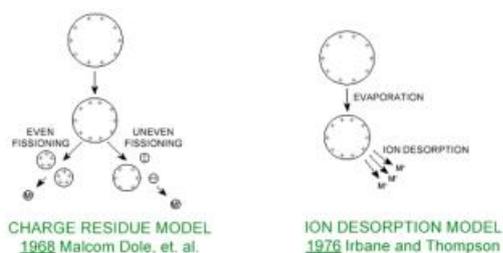


Figura 49. Schema delle due teorie per la produzione degli ioni gassosi.

Nella prima teoria dopo ogni esplosione coulombiana si formano goccioline più piccole di quelle iniziali, fino a che si avranno gocce contenenti un singolo ione. Quando in quest' ultime evaporerà il solvente rimasto, si avranno solo ioni in fase gassosa. Questa teoria però ha due limiti, il primo è che il percorso che devono fare le gocce per arrivare al controlettrodo è breve; quindi, non c'è lo spazio fisico affinché si riesca ad avere così tante esplosioni coulombiane che portino allo ione gassoso. La seconda limitazione riguarda il fatto che questo processo non dipenderebbe dalla natura chimico-fisica dell'analita, e quindi non spiegherebbe la selettività che si ha nel processo di formazione degli ioni.

Nella seconda teoria si pensa che il solvente evapori ma che non avvenga alcuna esplosione coulombiana. L'analita, infatti, prende una carica ed esce dal solvente, mentre la goccia continua il suo percorso. Questa teoria riesce a spiegare la selettività del processo in quanto, in base a certe caratteristiche dell'analita, potrà formarsi lo ione gassoso o meno.

Probabilmente il reale meccanismo potrebbe comprendere sia le esplosioni sia l'allontanamento dell'analita dal solvente.

Lo ione che si ottiene con questa tecnica non è lo ione molecolare, ma lo ione pseudo molecolare: un addotto formato dalla molecola e lo ione idrogeno (MH^+). In base alle macromolecole di partenza potranno formarsi anche ioni multicarica, in cui alla molecola vengono addizionati un numero maggiore di idrogenioni.

5.3.2 Il triplo quadrupolo

Molto spesso quando si usa una sorgente soft, per avere maggiori informazioni, si utilizza per le analisi uno spettrometro di massa tandem (MS-MS), in cui al posto di avere un unico quadrupolo ne ha due. La strumentazione utilizzata per le analisi è definita a triplo quadrupolo, in quanto presenta un altro quadrupolo come camera di collisione (Figura 50).

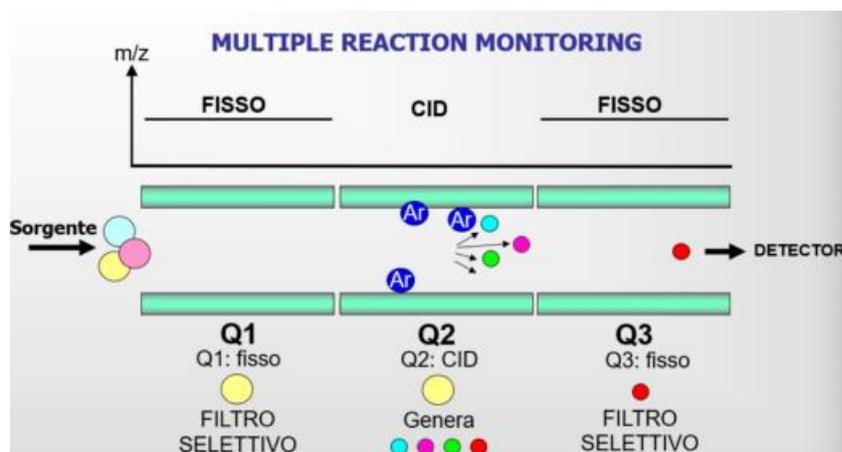


Figura 50. Schema di un triplo quadrupolo.

Un tipo molto comune di analizzatore di massa è il quadrupolo, esso è formato da 4 barre metalliche di forma cilindrica, a cui è applicata una differenza di potenziale generata da una corrente continua e alternata. Le barre hanno a coppie la stessa polarità e può essere o positiva o negativa. Per passare da una all'altra si applica una corrente alternata, data da delle radiofrequenze. La risultante delle correnti determina la traiettoria dello ione dentro il quadrupolo. Infatti, lo ione entra dentro il quadrupolo, e inizia a oscillare con una traiettoria definita dalla risultante delle diverse correnti. Solo alcune traiettorie permetteranno agli ioni di uscire dall'analizzatore, le altre invece faranno impattare gli ioni sulle barre metalliche di polarità opposta e verranno scaricati.

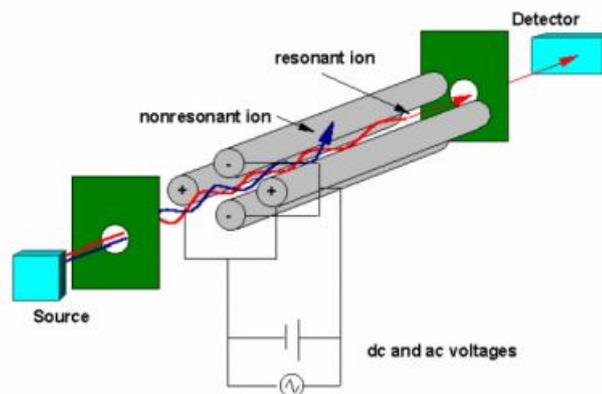


Figura 51. Schema di un quadrupolo.

I segni che vengono riportati sulle barre (figura 51) sono definiti solamente dalla corrente continua. Prendendo come esempio il caso di uno ione positivo e considerando solo le barre positive, si potrebbe osservare una forza di repulsione dovuta alla stessa polarità, che porterebbe gli ioni verso il centro del quadrupolo. Quando si applica una corrente alternata, se questa è sufficientemente alta, si può far cambiare temporaneamente polarità alle barre e gli ioni positivi questa volta ne saranno attratti. Nel momento in cui si applicano sia la corrente continua che quella alternata gli ioni con massa più grande risentono meno di questa variazione e quindi continueranno il loro moto verso l'uscita dell'analizzatore. Gli ioni leggeri invece, hanno meno inerzia e risentono maggiormente di questi cambiamenti, e progressivamente si avvicineranno alla barra fino ad essere scaricati. Ioni più grandi riescono a passare mentre i più leggeri no, il risultato di ciò è un filtro 'passa-alto'. Se si prendono in esame le barre negative il processo è esattamente opposto: gli ioni sono attratti verso le barre quando prevale la corrente continua, mentre vanno verso il centro quando prevale corrente alternata. In questo caso, gli ioni pesanti che hanno meno inerzia tenderanno quindi ad andare verso le barre e da ciò risulta un filtro 'passa-basso'.

Combinando le due coppie di barre si sommeranno i due effetti e quindi passerà solo lo ione con una traiettoria stabile.

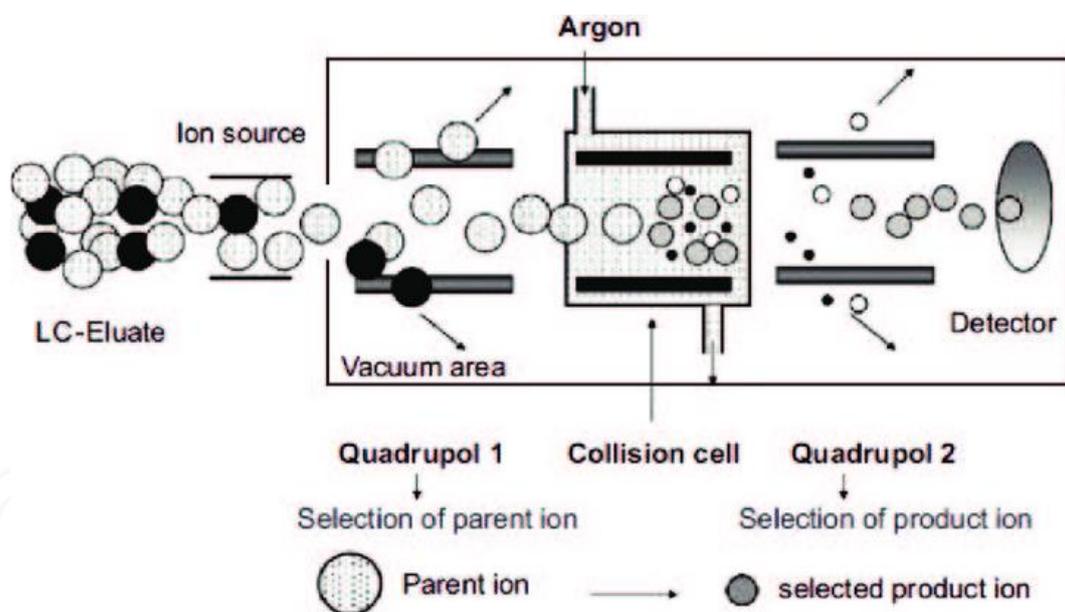


Figura 52. Schema della spettrometria di massa tandem.

Nella spettrometria di massa tandem tutti gli ioni che arrivano al primo quadrupolo se ne seleziona uno (ione genitore), che entra nella camera di collisione dove avviene un trasferimento di energia cinetica (figura 52). Per fare ciò, si accelera facendo urtare lo ione con particelle neutre (come argon o elio) o cariche e avviene una ulteriore frammentazione. In questo caso la frammentazione non sarà su tutti ioni genitori e infatti ce ne saranno alcuni che rimarranno intatti ed entreranno nel secondo quadrupolo.

L'uso di questa strumentazione può comportare diversi vantaggi, tra cui una maggiore sensibilità e la possibilità di avere informazioni sul percorso frammentativo dell'analita.

La spettrometria di massa tandem può lavorare in diverse modalità, nel nostro caso si utilizza la Multiple Reaction Monitoring (MRM), il cui scopo principale è quello di massimizzare la sensibilità e migliorare i LOD. Si bloccano entrambi gli analizzatori su una particolare finestra di m/z , il primo sulla finestra dello ione genitore mentre il secondo su quella del frammento più abbondante e caratteristico. Si migliora la sensibilità perché si massimizza il rapporto segnale/rumore, in quanto entrambi i quadrupoli non dovendo effettuare scansioni producono pochissimo rumore. Operando in questo modo nello spettro si avrà un solo ione, che deriva dalla frammentazione dello ione genitore.

5.3.3 Il detector

Il detector è la parte successiva all'analizzatore di massa, la sua funzione è quella di contare gli ioni che lo colpiscono. Il detector più comune è simile al tubo fotomoltiplicatore, ovvero è formato da un dinodo (parte metallica) caricato negativamente, in grado di convertire un fascio di ioni in un fascio di elettroni. Uno ione colpisce il materiale del detector che è elettroemissivo e converte gli ioni in elettroni, successivamente gli elettroni vengono attratti e accelerati verso la parete opposta e si ha un secondo urto dove si ha una moltiplicazione degli elettroni: questo processo avviene più volte e in questo modo si ha un'amplificazione elettrica (figura 53).

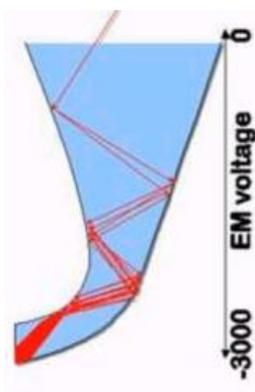


Figura 53. Schema di un elettromoltiplicatore.

Il segnale ottenuto viene elaborato dal data system e si ottiene uno spettro che mette in relazione l'abbondanza ionica con il rapporto m/z .

6 RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Prove per il trasferimento a secco

Nel capitolo 4.4 è stato descritto un nuovo metodo di trasferimento, che rispetto a quello tradizionale non prevede l'utilizzo di acqua. Affinché questa modifica possa essere apportata è necessario analizzare i campioni preparati e calcolare il recupero e l'effetto matrice per tutti i passaggi eseguiti.

Il recupero è quel parametro che indica la percentuale di analita perso durante il processo di preparazione del campione rispetto alla quantità totale. Più il recupero si avvicina al 100% più il metodo è efficiente.

$$\text{recupero (R)} = \frac{\text{Area}(\text{spike pre}) - \text{Area}(\text{tal quale})}{\text{Area}(\text{spike post}) - \text{Area}(\text{spike pre})} \times 100$$

Equazione 4. Formula per il calcolo del recupero.

In equazione 4 [61] [62]:

- Area (spike pre) è l'area del picco dell'analita nel campione in cui è stato fatto lo spike nelle cartucce SPE quando è stata trasferita la fase del POCIS;
- Area (tal quale) è l'area del picco dell'analita nel campione in cui non è stato fatto alcuno spike;
- Area (spike post) è l'area del picco dell'analita nel campione in cui è stato fatto lo spike prima del salting out e prima dell'analisi strumentale.

L'effetto matrice, invece, è la variazione del segnale analitico dovuto a effetti chimici/fisici della matrice. Il segnale può essere sia soppresso che sia sovrastimato a causa di questo effetto. In questo lavoro di tesi è stata utilizzata questa equazione (5) per valutarne l'entità [63]:

$$ME = \frac{\text{Area}(\text{spike post}) - \text{Area}(\text{spike pre})}{\text{Area}(\text{std a } 10 \text{ ppb})} \quad \text{Equazione 5. Calcolo effetto matrice.}$$

L'ME per essere accettabile deve essere compreso tra l'80% e il 120%. In questa equazione compare un nuovo termine, Area (standard a 10 µg/L), che rappresenta l'area di ciascun analita in uno standard a 10 µg/L. È stata scelta questa concentrazione in quanto corrisponde al livello atteso nel campione. Gli analiti meno soggetti all'effetto matrice sono: acesulfame, cloramfenicolo, daminozide, nicotina clenbuterolo e metoprololo.

Dopo aver calcolato recupero ed effetto matrice è possibile risalire alla quantità di analita che viene eluito con l'acqua usata per il condizionamento delle cartucce (**Recupero H₂O**). Questo valore si ottiene indirettamente facendo il **rapporto tra il recupero totale nelle acque e il recupero con il processo di salting out**.

Gli analiti presi in esame sono elencati nella tabella 3 seguente:

Tabella 3. Recuperi della metodica.

ANALITI	Recupero totale	Recupero nell'acqua di condizionamento
Acesulfame	29±5%	41±7%
Cloramfenicolo	<1%	<1%
Furosemide	<1%	<1%
Idroclorotiazide	<1%	<1%
2,4 -D	<1%	<1%
Caffeina	<1%	<1%
Teofillina	<1%	<1%
Sucralosio	1,2±0,5%	2,0±0,5%
Paraxantina	<1%	1,2±0,9%
Daminozide	<1%	<1%
Atenololo	3±1%	7,4±0,8%
Nicotina	2±3%	6±2%
Clenbuterolo	<1%	<1%
Metoprololo	<1%	<1%
Terbutalina	6±3%	6±2%
Clormequat	10±3%	39±3%

I valori del recupero degli analiti eluiti con l'acqua sono trascurabili tranne che per acesulfame, clormequat, atenololo, nicotina e terbutalina. Da questi risultati si può dedurre che tendenzialmente gli analiti non vengono lavati via, se non quelli elencati che probabilmente hanno un'affinità maggiore con l'acqua piuttosto che con la fase delle SPE. Successivamente sono stati analizzati gli eluati delle cartucce SPE in cui era stata trasferita la fase dei POCIS. Qui di seguito è riportata una tabella (4) dove viene schematizzata l'analisi qualitativa dei picchi. Da essa si può capire quali analiti sono stati rilevati e se erano presenti in concentrazioni apprezzabili per una successiva quantificazione.

Tabella 4. Analisi qualitativa degli analiti.

Analiti	Analiti eluiti dopo trasferimento con acqua mQ	Analiti eluiti dopo trasferimento a secco
Acesulfame	ND	ND
Taurina	<LOQ/D	<LOQ/D
Paraxantina+ Teofillina	ND	ND
Daminozide	ND	ND
Teobromina	NM	ND
Caffeina	<LOQ/D	<LOQ/D
Sucralosio	<LOQ	<LOQ
PFOA	D	D
Idroclorotiazide	ND	ND
2,4-D	ND	<LOQ /ND
Furosemide	ND	ND
Cloramfenicolo	ND	ND
Carbamazepina	<LOQ/D	D
PFOS	NM	ND
Ketoprofene	ND	ND
Naprossene	ND	<LOQ /ND
Metformina	ND	ND
Atenololo	ND	ND
Salbutamolo	ND	<LOQ
Clormequat	ND	BL
Terbutalina	ND	<LOQ
Nicotina	ND	ND
Diclofenac	<LOQ	D
Ibuprofene	ND	ND
BP-3	<LOQ/D	D
Gemfibrozil	ND	<LOQ
Metoprololo	ND	<LOQ
Clenbuterolo	BL	<LOQ/D
OD-PABA	D	D
Etilsilmetossicinnamato	D	<LOQ
Octocrilene	<LOQ	<LOQ/D
BPA	ND	ND
E2	ND	ND
EE2	ND	ND
E1	ND	ND
Triclosan	<LOQ/D	D

Nota: D (detected), LOD (minore del limite di quantificazione), BL (livello del bianco), ND (non detected), <LOQ/D (una replica <LOQ e una D) e <LOQ/ND (una replica <LOQ e una ND).

Dalla tabella 4 si evince che, in termini qualitativi, i due metodi di trasferimento sono molto simili. Questi rilevano gli stessi analiti e addirittura, in alcuni casi, i picchi risultano essere migliori con il trasferimento a secco. La rivelazione, in termini qualitativi, è migliorata per analiti come: terbutalina, salbutamolo, diclofenac, BP-3, gemfibrozil e metoprololo.

Se si volesse fare una vera e propria quantificazione, essa sarebbe possibile soltanto per gli analiti indicati con la D in tabella 4.

Anche per gli eluati sono stati calcolati gli effetti della matrice e i recuperi, essi sono elencati nella tabella tabella 5. L'effetto matrice rientra tra l'80% e il 120% per la maggior parte degli analiti tranne che per: taurina, paraxantina+teofillina, daminozide, caffeina, sucralosio, idroclorotiazide e ketoprofene. Questo sicuramente influenzerà anche il calcolo dei recuperi.

Gli analiti che sono stati definiti quantificabili 'D' presentano un recupero percentuale vicino al 100%. Gli analiti con il recupero peggiore sono quelli in cui non è stato riportato alcun numero ma solo un trattino. Questi non sono stati recuperati in percentuale abbastanza considerevole (sopra il 5%).

In tabella 5 è presente un dato particolare, quello del ketoprofene, che presenta una deviazione standard molto elevata: questo è possibile in quanto in alcune repliche l'effetto matrice è alto, quindi i valori si disperdono di più intorno alla media.

Tabella 5. Recupero analiti da eluizione delle cartucce con il metodo precedentemente descritto.

Analiti	Recupero
Acesulfame	29±11%
Taurina	-
Paraxantina+ Teofillina	84±4%
Daminozide	-
Caffeina	92±20%
Sucralosio	127±30%
PFOA	174±9%
Idroclorotiazide	84±24%
2,4-D	68±6%
Furosemide	44±6%
Cloramfenicolo	107±16%
Carbamazepina	86±18%
Ketoprofene	365±338%
Naprossene	33±11%
Metformina	-
Atenololo	69,5±0,6%
Salbutamolo	59±7%
Clormequat	-
Terbutalina	88±4%
Nicotina	21±3%
Diclofenac	61±3%
Ibuprofene	47±5%
BP-3	58±5%
Gemfibrozil	36±4%
Metoprololo	82,4±0,4%
Clenbuterolo	71±3%
OD-PABA	79±4%
Etilsilmetossicinnamato	72±2%
Octocrilene	91±4%
BPA	138±20%
E2	103±30%
EE2	98±24%
E1	102±10%
Triclosan	113±6%

Sommando i recuperi dati dall' eluizione con l'acqua e quelli relativi all'eluizione con gli opportuni solventi della cartuccia SPE si ottiene il recupero totale. Questo è stato calcolato solo per alcuni analiti, ovvero quelli che avevano i recuperi nelle acque sopra 1%. In particolare, essi sono riportati in tabella 6.

Tabella 6. Recupero totale di alcuni analiti.

Analiti	Recupero totale
Acesulfame	70±13%
Atenololo	76±1%
Cloromequat	39±3%
Terbutalina	94±4 %
Nicotina	28±3%

I recuperi con la modifica sono quindi abbastanza buoni per poter passare al nuovo metodo con trasferimento a secco: questo permette di guadagnare più tempo e di non perdere più gli analiti che sarebbero rimasti nell'acqua di trasferimento.

6.2 Recuperi SPE

Sono state svolte le analisi dei campioni la cui preparazione è stata descritta nel capitolo 4.5; il cui fine era quello di calcolare il recupero delle cartucce SPE.

Per capire dove si ripartiscono gli analiti durante la preparazione del campione prima delle analisi, sono stati calcolati diversi tipi recupero:

- dell'analita che non interagisce con la fase;
- della quantità di analita che viene lavato via;
- di analita che viene recuperato con l'eluizione.

Se dal recupero totale ideale del 100% si sottrae la somma di questi tre recuperi si ottiene la percentuale di analita che non viene eluito e rimane sulla fase. Nella tabella 7 sono mostrati i valori dei recuperi con le deviazioni standard.

Tabella 7. Valori percentuali dei recuperi degli analiti.

ANALITI	%	%	%
	recupero eluizione	recupero acqua caricata	recupero del lavaggio
Acesulfame	4±3	97±10	5,3±0,1
Taurina	<1	166±19	<1
Paraxantina + Teofillina	87±8	1,8±0,4	<1
Daminozide	<1	99±5	<1
Teobromina	94±18	1±14	<1
Sucralosio	94±13	59±65	15±4
Caffeina	93±11	15±3	<1
Idroclorotiazide	94±9	1,5±0,1	<1
Cloramfenicolo	87±4	<1	<1
PFOA	95±4	4±4	<1
Furosemide	69±2	4±12	<1
2,4-D	88±2	<1	<1
Carbamazepina	86±5	<1	<1
Metformin	2±1	93±7	4,1±0,1
Atenololo	93±4	1,8±0,3	<1
Salbutamolo	95±4	<1	<1
Cloromequat	0,5±0,7	116±32	3
Terbutalina	94±5	<1	<1
Mepiquat	1±2	130±61	3
Nicotina	43±8	-	<1
Ketoprofene	87±7	-	<1
Naprossene	85±6	3±3	<1
PFOS	93±4	<1	<1
Metoprololo	81±6	<1	<1
Clenbuterolo	83±1	7,2±0,5	<1
Diclofenac	81±3	<1	<1
Ibuprofene	86±11	<1	<1
BP-3	86±26	12±1	1,2±0,6
Gemfibrozil	84±5	<1	<1
OD-PABA	25±3	2±1	<1
Etilsilmetossicinnamato	30±3	17±2	1,6±0,6
Octocrilene	23±6	1±7	4,8±0,3
BPA	89±12	<1	<1
β-estradiolo	87±10	<1	<1
17 α- etinil estradiolo	93±4	<1	<1
Estrone	88±17	<1	<1
Triclosan	99±9	<1	<1

Dai dati mostrati nella tabella 7 si evince che, dall'uso delle cartucce e da tutta la procedura di eluizione, il recupero degli analiti in generale è quasi del 100%. Si trovano però delle eccezioni come ad esempio i fertilizzanti, i filtri UV e alcuni stimolanti, che

non hanno recuperi prossimi al 100%, ma sono o troppo bassi oppure troppo alti. Nel caso in cui il valore percentuale del recupero risulta essere basso, si può dedurre che l'analita non è stato eluito ed è rimasto sulla fase, oppure che l'effetto matrice abbia soppresso il segnale. Nel caso contrario, quando il recupero è troppo alto, la causa può essere sempre attribuita all'effetto matrice che ha amplificato il segnale.

In generale questa tecnica presenta un buon recupero per la maggior parte degli analiti ed è per questo viene utilizzata per la preconcentrazione di microcontaminanti organici nell'acqua.

6.3 Analisi campioni del porto di Genova

Nel capitolo 4.2, dove sono stati elencati tutti i luoghi dove sono stati prelevati dei campioni, tra questi è stato citato il porto di Genova, in cui sono stati posizionati dei campionatori passivi e spot (seguiti da preconcentrazione in SPE e denominati spot-SPE).

I POCIS e i simil-POCIS sono stati posti nell'acqua di mare per 21 giorni, mentre il campionamento spot è stato eseguito ogni 10 giorni circa. I campioni prelevati sono stati processati con il metodo descritto nel capitolo 4.3 e dopo opportune diluizioni sono stati analizzati all'HPLC/MS-MS.

Dall'analisi qualitativa si può già fare un confronto tra gli analiti che sono stati rilevati con i due tipi di campionatori. I risultati sono esplicitati nella tabella 8.

Per prima cosa è possibile fare delle considerazioni sui due diversi campionamenti; infatti, alcuni analiti vengono rilevati con un metodo e non con l'altro. Tra questi analiti ci sono sicuramente la taurina e il gemfibrozil, che a differenza dei POCIS e simil-POCIS, non vengono rilevati nello spot-SPE. Per quanto riguarda sucralosio e OD-PABA, la situazione è esattamente opposta. Prendendo in considerazione il naprossene e la nicotina, la differenza sostanziale sta nel fatto che entrambi sono rilevati e quantificabili sia nei POCIS che nei simil-POCIS in tutte le repliche, mentre nello spot-SPE sono ND per due campionamenti mentre nel terzo sono minori del limite di quantificazione. In generale si può affermare che gli analiti quantificabili siano molto di più nei POCIS e nei simil-POCIS rispetto che nello spot-SPE.

Tabella 8. Risultati qualitativi campioni del porto.

Analiti	POCIS		SIMIL- POCIS		Spot-SPE		
	1°	2°	1°	2°	7/2/23	17/2/23	28/2/23
Acesulfame	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Taurina	D	D	D	D	ND	ND	D
Paraxantina+ Teofillina	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND
Caffeina	D	D	BL	BL	D	D	D
Sucralosio	ND	ND	ND	ND	D	D	<LOQ
PFOA	D	D	D	D	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2,4-D	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND
Carbamazepina	D	D	D	D	D	D	D
PFOS	D	D	D	<LOQ	-	-	-
Ketoprofene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Naprossene	D	D	D	<LOQ	ND	<LOQ	ND
Metformina	-	-	-	-	ND	ND	ND
Atenololo	D	D	ND	ND	ND	ND	ND
Salbutamolo	D	ND	ND	ND	<LOQ	ND	<LOQ
Terbutalina	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nicotina	D	D	D	D	ND	<LOQ	ND
Diclofenac	D	D	D	D	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ibuprofene	D	D	D	D	<LOQ	D	ND
BP-3	BL	BL	BL	BL	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Gemfibrozil	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND
Metoprololo	D	D	<LOQ	<LOQ	BL	BL	BL
Clenbuterolo	D	D	ND	ND	BL	BL	BL
OD-PABA	BL	BL	BL	BL	D	D	D
Etilsilmestossicinnamato	BL	BL	BL	BL	<LOQ	ND	<LOQ
BPA	BL	BL	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND
Triclosan	<LOQ	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Nota: D (detected), LOD (minore del limite di quantificazione), BL (livello del bianco), ND (non detected), <LOQ/D (una replica <LOQ e una D) e <LOQ/ND (una replica <LOQ e una ND).

Un altro confronto che si può fare riguarda la differenza tra POCIS e simil-POCIS. In generale, si può notare che non ci siano grandi differenze nel campionamento degli analiti ma ci sono alcune eccezioni. Tra queste ci sono il caso del clenbuterolo e dell'atenololo, che sono rilevati in modo da essere quantificabili nei POCIS tradizionali mentre negli altri non sono presenti. Poi ci sono caffeina e metoprololo che invece sono

quantificabili nei POCIS ma non nei simil-POCIS, perché è minore del LOQ. Un ultimo esempio può essere quello della paraxantina e della teofillina che sono rilevate, ma non quantificabili, nei POCIS mentre nei simil-POCIS no.

6.4 Analisi campioni antartici

I campioni antartici analizzati in questa tesi sono provenienti da due punti di campionamento diversi: all'uscita del depuratore e nel mare nella zona limitrofa ad esso. Questa distinzione è importante anche nel momento in cui si diluiscono gli estratti, preparati con il metodo descritto nel capitolo 4.3, prima dell'analisi all'HPLC/MS-MS: quelli dei campioni del mare dovranno essere diluiti di 10 volte mentre gli altri 100 volte, nelle SPE del depuratore anche di 1000 volte. Quelli del mare vengono diluiti di meno poiché, essendo poco concentrati, non si riuscirebbe a rilevarli allo strumento e a quantificarli.

Per la quantificazione è stato calcolato l'effetto matrice (equazione 6) [63]:

$$ME \text{ (matrix effect)} = \frac{\text{Area campione spikato} - \text{Area campione tal quale}}{2 * \text{Area dello standard a 5ppb}}$$

Equazione 6. Formula per l'effetto matrice.

Si considera l'area dello standard preparato a 5 µg/L poiché è circa la concentrazione attesa degli analiti. Se l'effetto matrice non risulta essere tra 80% e 120% è necessaria una correzione che si ottiene con la seguente equazione (7) [61] [62]:

$$C \text{ (corretta)} = \frac{C \text{ (tal quale)}}{ME}$$

Equazione 7. Formula per correggere la concentrazione.

Il software dell'HPLC-MS/MS oltre all'area del picco fornisce come dato anche la concentrazione calcolata, quando l'effetto matrice è fuori dal range è necessario che questa venga corretta.

6.4.1 Risultati di Road Bay

Nella tabella 9 sono mostrati i risultati delle analisi delle due SPE in cui è stata preconcentrata l'acqua campionata a Road Bay in due giornate diverse di gennaio. I risultati sono tutti espressi in ng/L, in quanto questa è la concentrazione reale nell'acqua di mare.

Tabella 9. Risultati SPE di Road Bay in ng/L diluiti 10 volte.

	SPE del 08/01/23	SPE del 23/01/23-
Taurina	ND	0,07±0,03
PFOA	<LOQ	ND
PFOS	<LOQ	ND
Diclofenac	4,0±0,7	ND
Ibuprofene	4,6±0,9	ND
Octocrilene	<LOQ	ND
BPA	79±3	<LOQ
Triclosan	<LOQ	<LOQ

Quello che si nota dai dati nella tabella 9 è che gli analiti, nei campioni prelevati in data 23 gennaio 2023, o non vengono campionati o mostrano livelli di concentrazione inferiori rispetto al campionamento precedente (come il BPA). L'unica eccezione sta nella taurina, che è presente nel secondo campionamento e non nel primo. Tutti gli altri analiti non sono stati riportati in tabella in quanto non erano stati rivelati, né nel primo né nel secondo giorno di campionamento.

Per quanto riguarda i POCIS e simil-POCIS esposti a Road Bay i dati ottenuti sono presenti nella tabella 10, in essa sono elencati solo gli analiti che sono stati rivelati in una concentrazione maggiore del limite di quantificazione. La distinzione dei due POCIS e dei due simil-POCIS sta nel diverso periodo di campionamento quelli indicati con '1°' si riferiscono al periodo che va da 31 ottobre al 19 novembre, mentre quelli con '2°' vanno dal 11 gennaio al 25 gennaio.

Tabella 10. Dati degli analiti campionati nei POCIS e nei SIMIL-POCIS. I dati sono espressi in µg/g.

	POCIS 1°	POCIS 2°	SIMIL- POCIS 1°	SIMIL- POCIS 2°
Paraxantina+Teofillina	0,200±0,200	0,230±0,020	<LOQ	<LOQ
Caffeina	4±1	2,4±0,9	<LOQ	2±1
PFOS	0,018±0,007	0,017±0,006	ND	ND
Diclofenac	0,023±0,001	0,021±0,007	ND	ND
Ibuprofene	0,027±0,009	0,021±0,001	0,021±0,001	0,030±0,020

In generale si può affermare che le concentrazioni rimangono quasi costanti durante i diversi periodi e anche nei due diversi campionatori. Gli altri analiti che non è stato possibile quantificare sono: acesulfame, taurina, teobromina, PFOA, ketoprofene, naprossene, atenololo, terbutalina, BP3, gemfibrozil e octocrilene.

6.4.2 Risultati del depuratore

Nella tabella 11 riportata qui sotto, invece, sono illustrati i risultati degli estratti delle SPE del depuratore diluiti 100.

Tabella 11. Risultati SPE del depuratore diluiti 100 in ng/L.

	SPE 03/11/22	SPE 17/11/22	SPE 08/12/22	SPE 24/12/22
Acesulfame	ND	ND	150±40	ND
Taurina	190±20	190±70	<LOQ	29±4
PFOA	125±3	140±10	<LOQ	<LOQ
Idroclorotiazide	610±50	870±80	1100±200	690±60
PFOS	240±20	94±8	36,6±0,8	33±4
Nicotina	2128±9	1100±100	2580±50	870±30
Diclofenac	6170±40	3640±70	1400±60	787±8
Ibuprofene	8300±100	4763±4	32600±900	2690±80
BP-3	541,3±0,5	340±10	ND	160±20
Etilsilmetossicinnamato	<LOQ	<LOQ	60±10	106±4
Octocrilene	1600±100	390±20	390±50	<LOQ
BPA	400±20	808±3	120±20	120±10
Estrone	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Triclosan	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Nella tabella 11 si può notare che tutti gli analiti tranne BP3 e acesulfame sono presenti in tutte le date di campionamento.

Per i POCIS e i simil- POCIS che hanno campionato le acque in uscita dal depuratore, i risultati sono raggruppati in diverse tabelle in base al periodo di campionamento. In questo modo è immediato il confronto tra i due campionatori. Tutti i dati sono espressi in µg/g (microgrammi di analita per grammi di fase ricevente del campionatore) e gli analiti sono stati denominati con degli acronimi, la cui legenda è nell'appendice 4.

Figura 54. Concentrazione analiti nel primo periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.

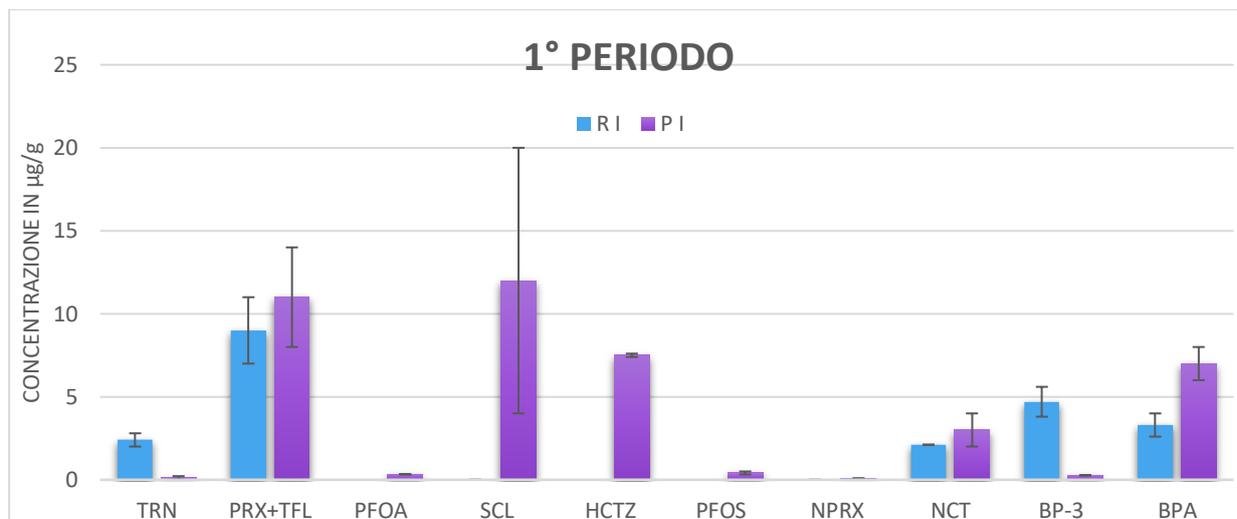
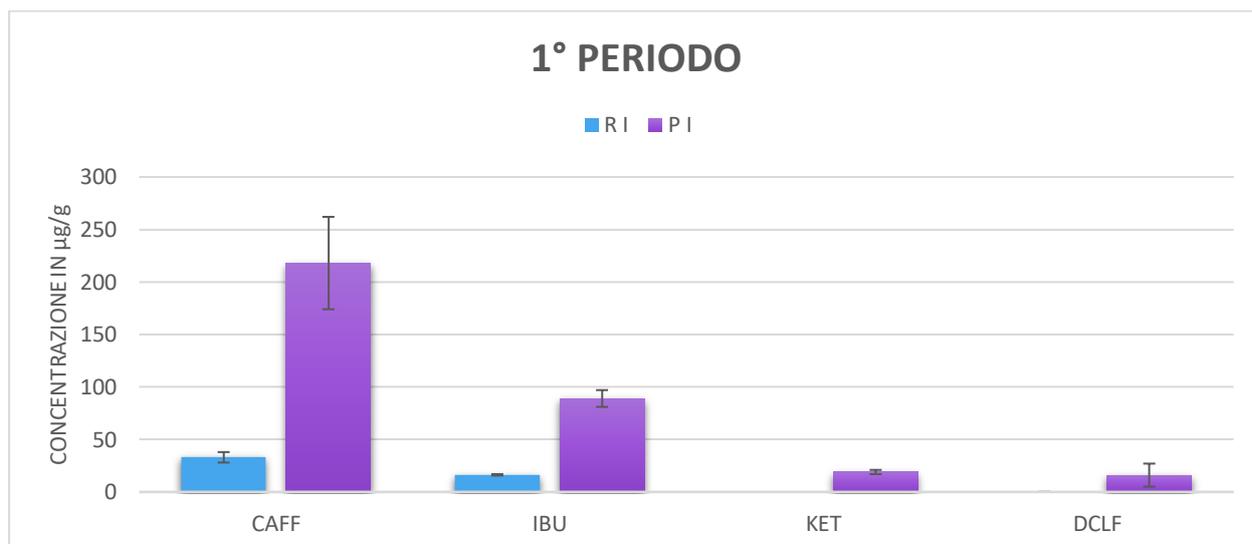


Figura 55. Analiti a più alta concentrazione del primo periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.



Nel primo periodo la caffeina è l'analita presente in maggiore quantità, questo sicuramente è dovuto all'apporto antropico della base scientifica. Sono presenti anche diversi farmaci, che riescono ad essere campionati meglio tramite l'utilizzo di POCIS tradizionali (si tratta soprattutto di ibuprofene, ketoprofene e diclofenac). Il BP3 e la taurina, invece, sono due analiti che vengono campionati meglio con i simil-POCIS (R) (figura 54-55).

Figura 56. Concentrazione analiti nel secondo periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.

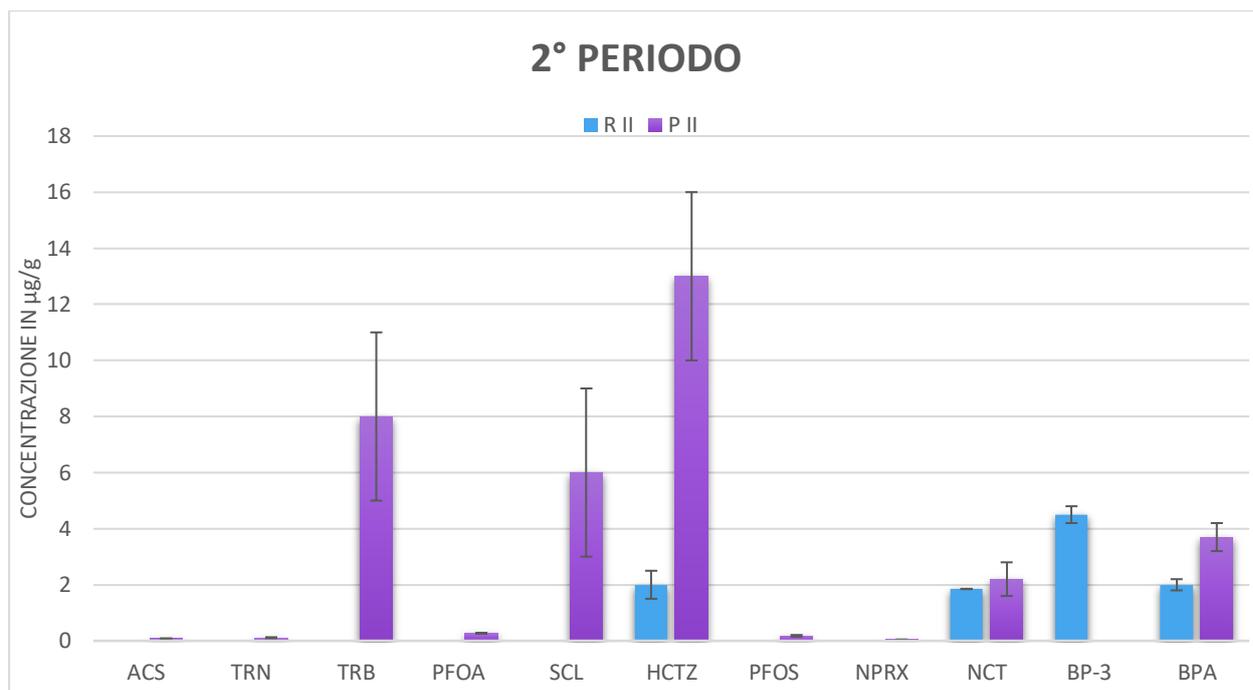
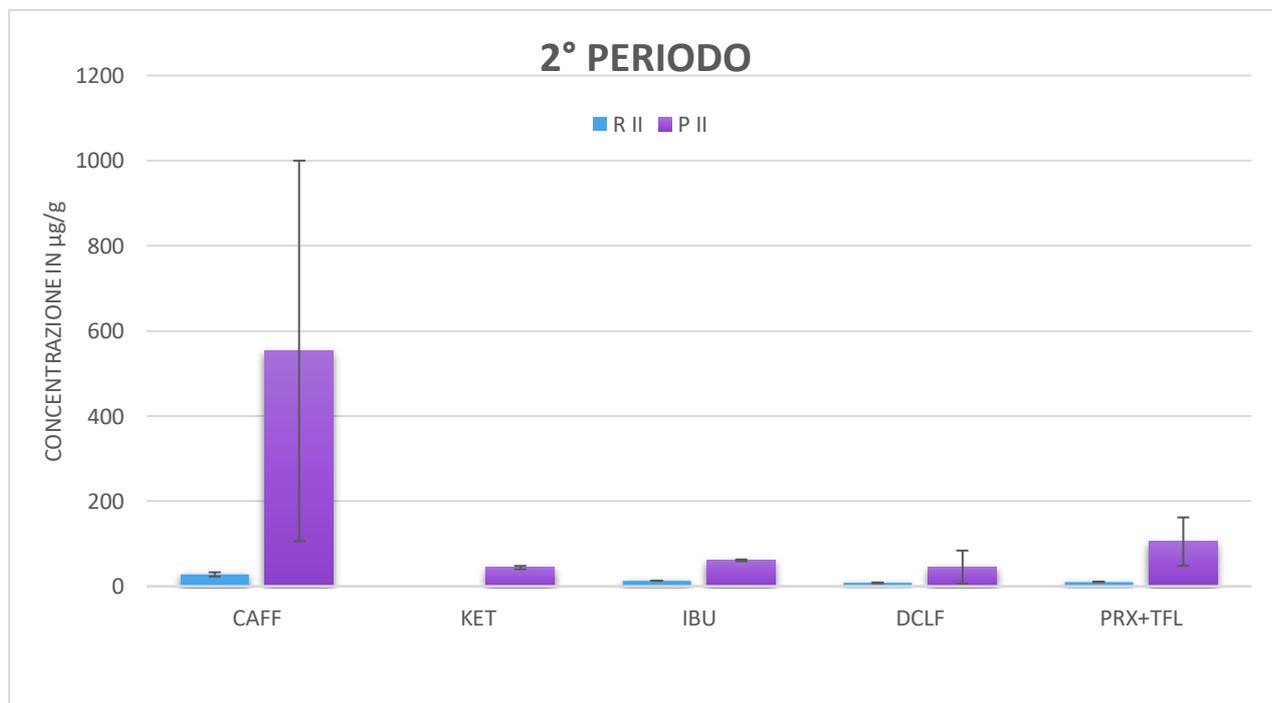


Figura 57. Analiti a più alta concentrazione del secondo periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.



Anche in questo secondo periodo la caffeina è sempre l'analita a concentrazione più alta, seguito dai farmaci. Il dato della caffeina nei POCIS presenta una grande deviazione standard, quindi vi è una variabilità del dato importante che potrebbe essere dovuta all'effetto matrice. In questo periodo sono quantificabili nei POCIS anche teobromina ed acesulfame che prima non erano presenti (figura 56-57).

Figura 58. Concentrazione analiti nel terzo periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.

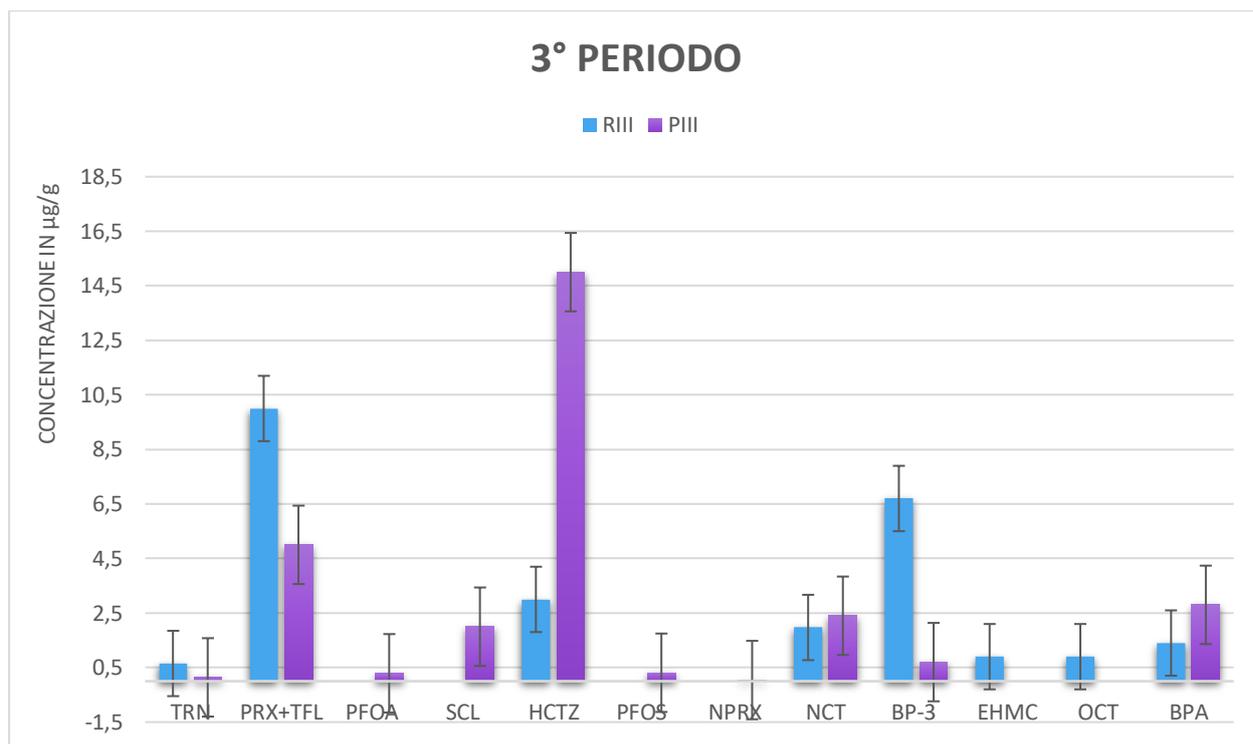
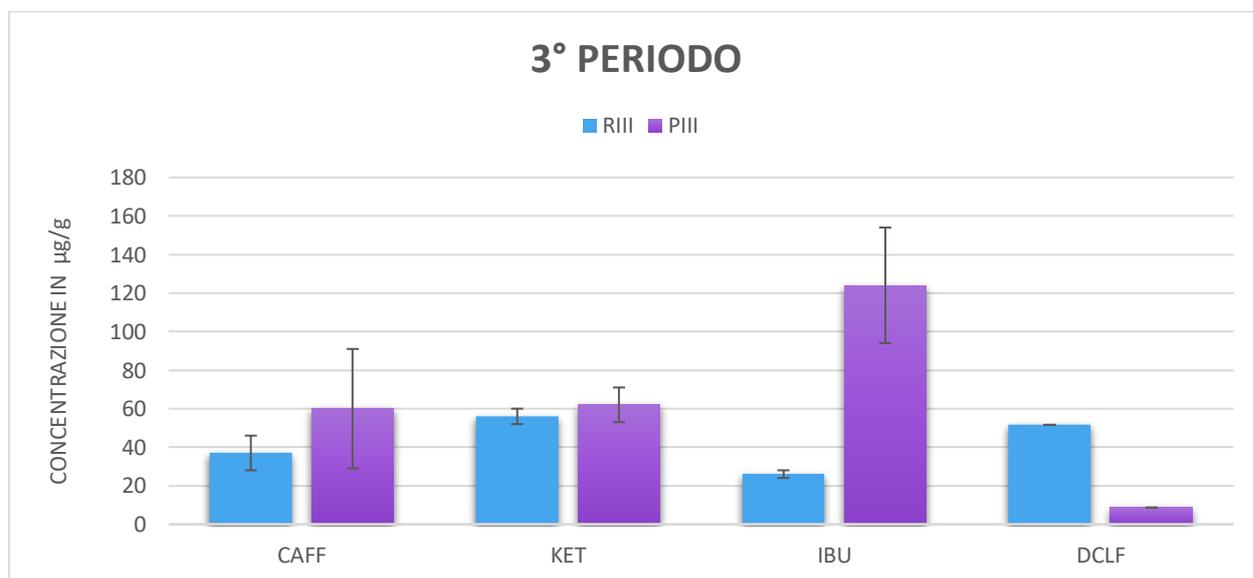


Figura 59. Analiti a più alta concentrazione del terzo periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.



In questo periodo aumentano le concentrazioni dei FANS, in particolare quella dell'ibuprofene e del ketoprofene, che superano addirittura la caffeina campionata dai POCIS. Inoltre, per la prima volta compaiono l'etilesilmetossicinnamato e l'octocrilene nei campionatori simil-POCIS (R) e non nei POCIS (figura 58-59).

Figura 60. Concentrazione analiti nel quarto periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.

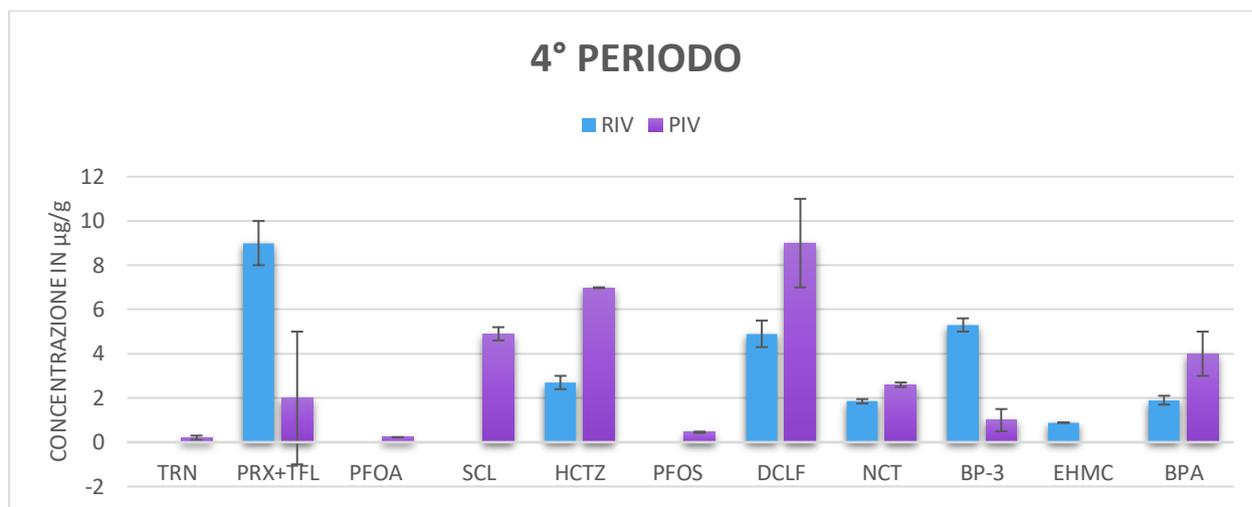
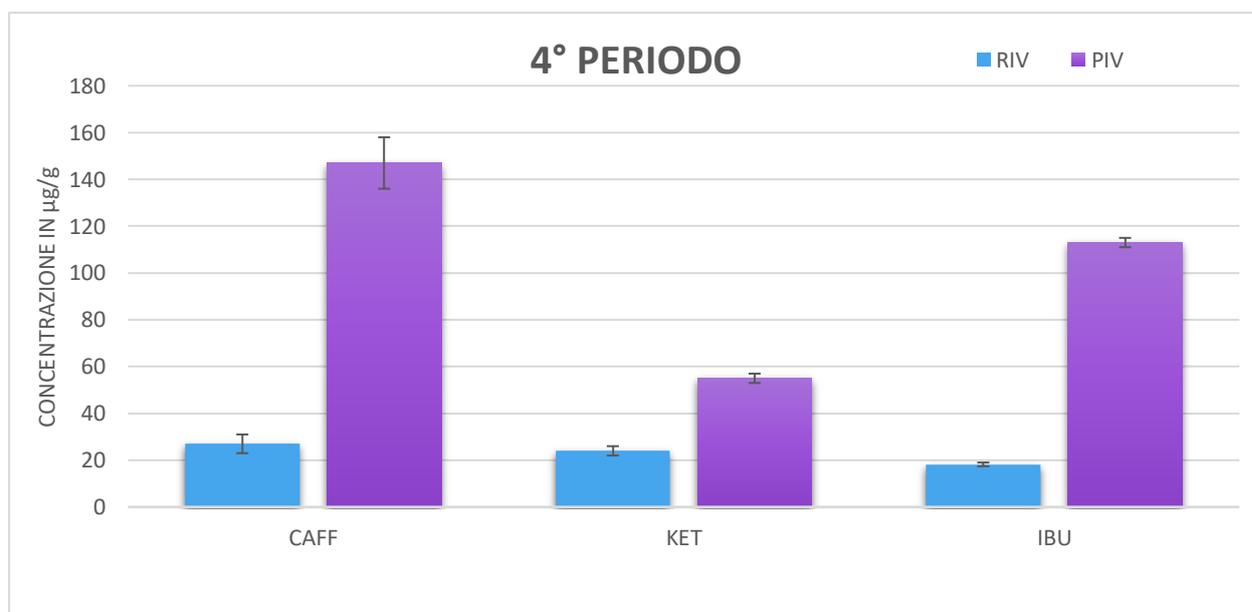


Figura 61. Analiti a più alta concentrazione del quarto periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.



La caffeina campionata dai POCIS in questo periodo aumenta, e rimane l'analite più presente sempre seguito dai farmaci come ketoprofene e ibuprofene. La concentrazione di diclofenac rispetto al mese precedente diminuisce molto, mentre gli altri FANS rimangono più o meno costanti (figura 60-61).

Figura 62. Concentrazione analiti nel quinto periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.

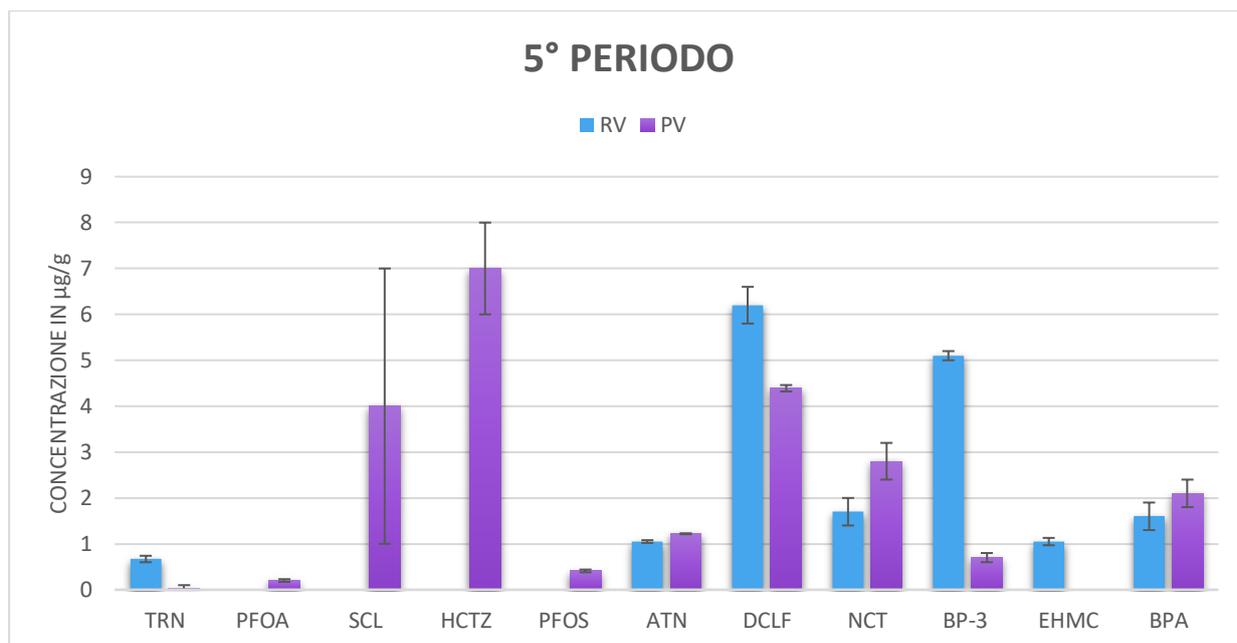
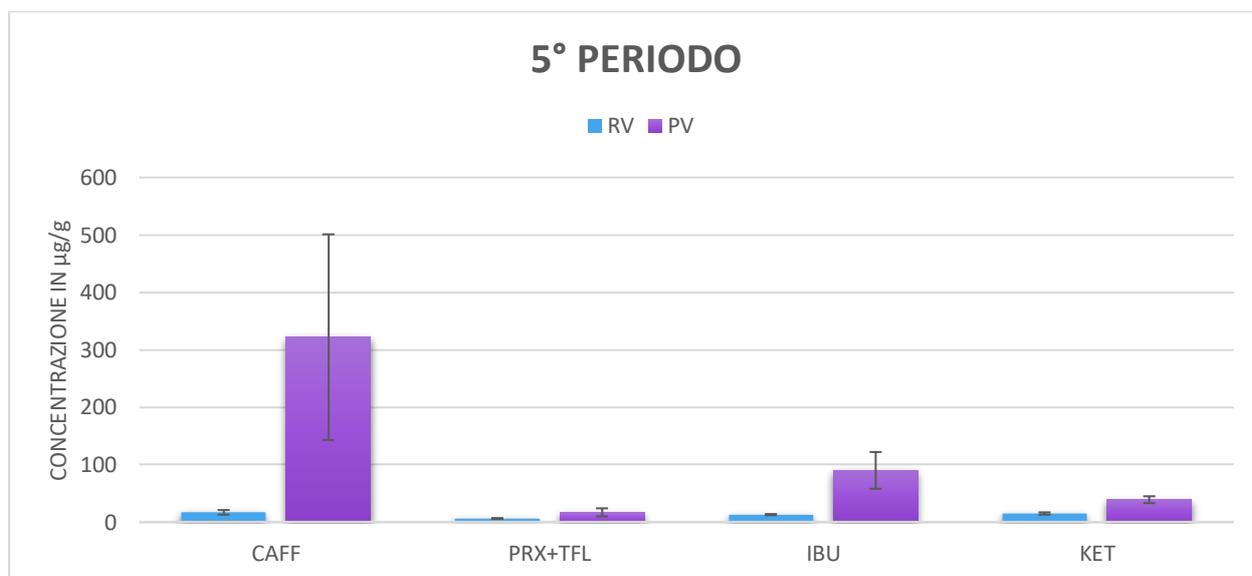


Figura 63. Analiti a più alta concentrazione del quinto periodo. Con R sono indicati i simil-POCIS e con P i POCIS.



Anche in questo ultimo periodo gli analiti a maggiore concentrazione sono sempre gli stessi. La caffeina nei POCIS raggiunge un valore più alto del precedente periodo, mentre per quanto riguarda il campionamento con simil-POCIS (R), qui si ottiene il dato più basso. In questo periodo di campionamento ritorna ad essere presente l'atenololo (figura 62-63).

Per gli analiti che sono presenti in tutti i periodi si possono costruire dei grafici che mostrano il loro andamento nell'intero periodo dei campionamenti. Di seguito sono stati riportati alcuni esempi significativi.

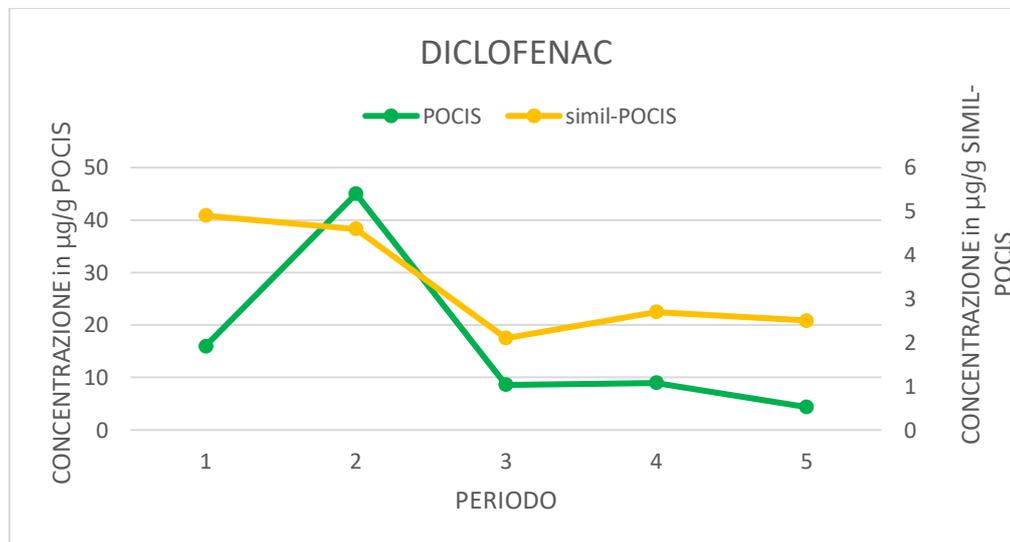


Figura 64. Concentrazione diclofenac nei diversi periodi nei POCIS e nei SIMIL-POCIS.

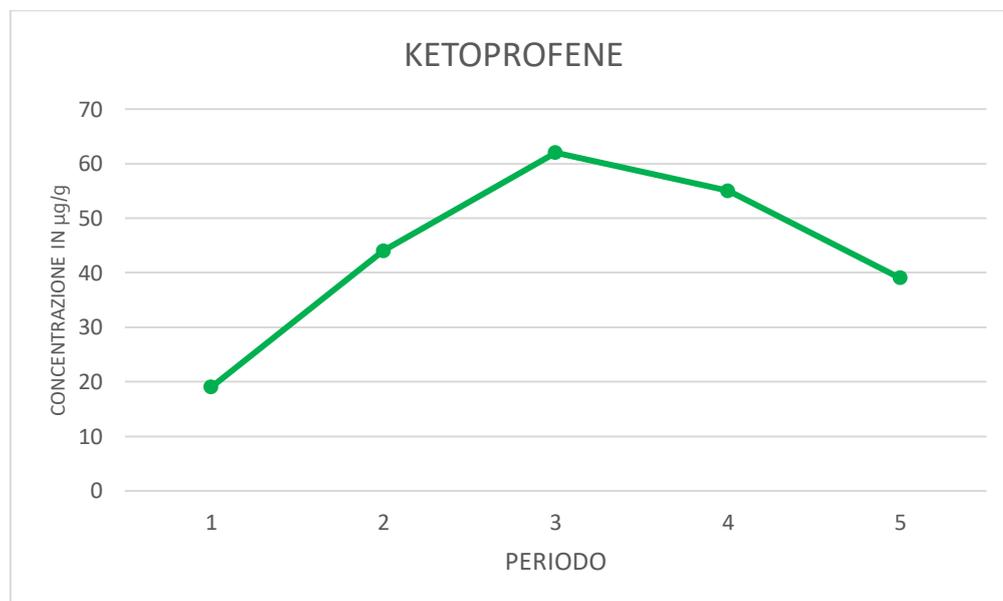


Figura 65. Concentrazione ketoprofene nei diversi periodi nei POCIS.

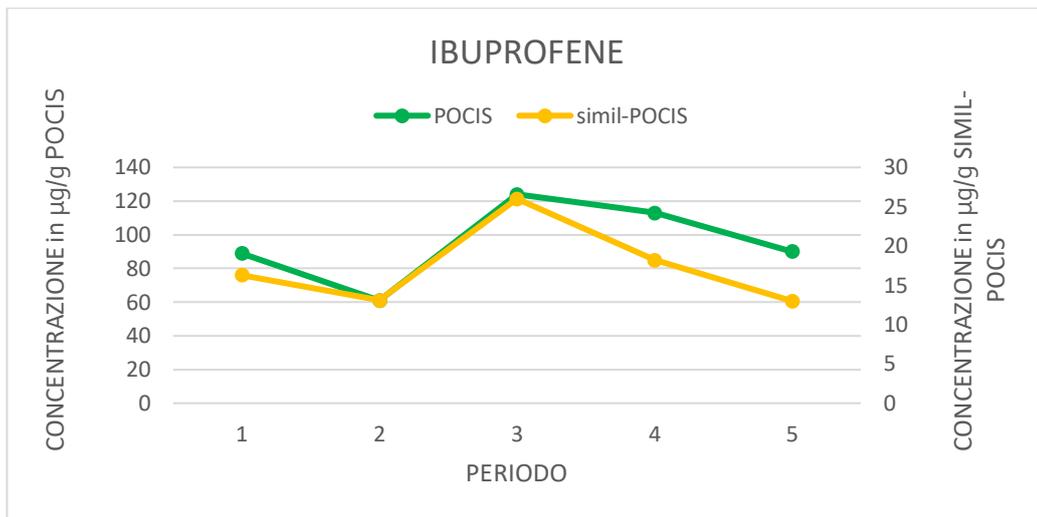
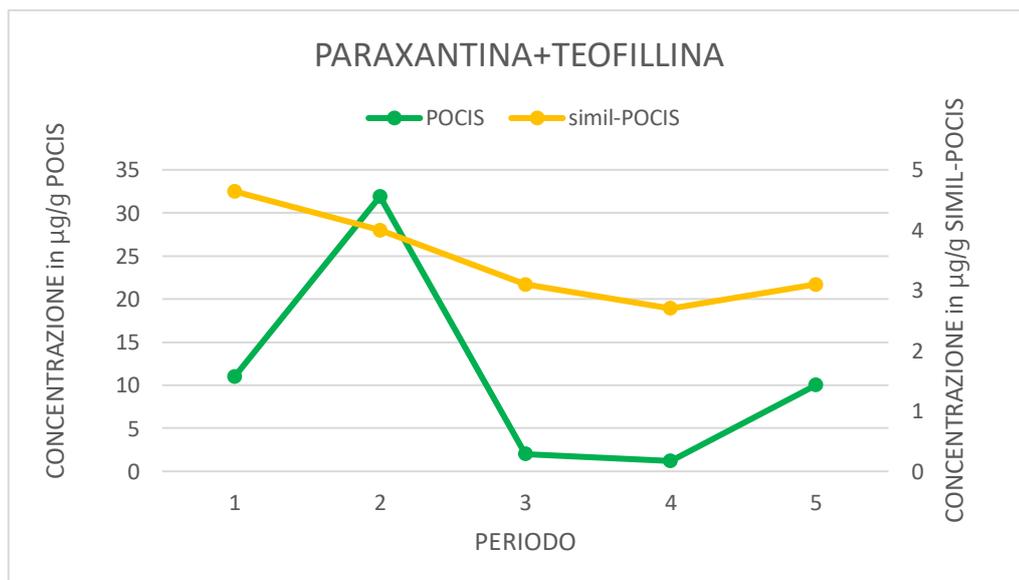


Figura 66. Concentrazione ibuprofene nei diversi periodi nei due campionatori.

Nei grafici mostrati in figura 64, 65 e 66 si evidenziano gli andamenti di alcuni farmaci antinfiammatori, nello specifico: diclofenac, ibuprofene e ketoprofene. Il diclofenac nel campionamento con i POCIS presenta un massimo nel secondo periodo, mentre gli altri due analiti lo hanno nel terzo. Il ketoprofene presenta una sola linea nel grafico (figura 65), in quanto non è stato possibile quantificarlo con i simil-POCIS. Il diclofenac presenta un andamento diverso nei due campionatori, mentre nel caso dell'ibuprofene le due tendenze sono simili tra loro. Ciò non vuol dire che anche le quantità nei due campionatori siano le stesse, ma solamente che la variazione di concentrazione nei diversi periodi è analoga.

Figura 67. Concentrazione paraxantina e teofillina nei diversi periodi nei due campionatori.



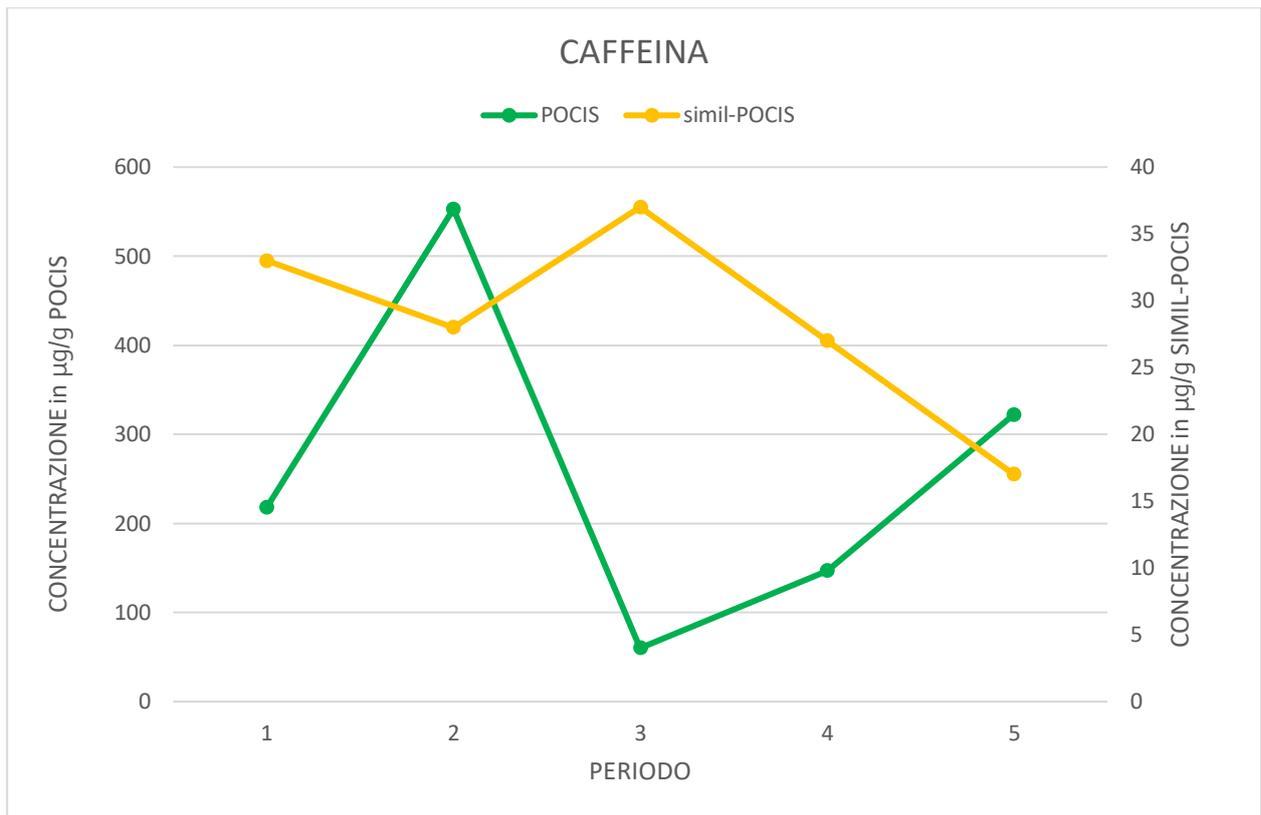


Figura 68. Concentrazione caffeina nei diversi periodi nei due campionatori.

Per quanto riguarda la caffeina nei POCIS, che si è visto essere l'analita presente in maggiore concentrazione, il suo andamento fino al terzo periodo rispecchia quello di teofillina e paraxantina; solamente nel quarto periodo varia, infatti al posto di rimanere quasi costante, la concentrazione aumenta. Nonostante questa piccola differenza, questo risultato si rivela essere coerente con il fatto che gli analiti sono correlati tra loro: la paraxantina, infatti, è il metabolita principale nel corpo umano della caffeina. Per quanto riguarda l'andamento nei campionatori simil-POCIS, questi due analiti non mostrano un andamento del tutto simile; infatti, la caffeina sembra variare di più da un periodo all'altro, mentre la paraxantina sembra diminuire quasi linearmente, per poi avere una risalita nell'ultimo periodo (figura 67-68).

Insieme a questi analiti, fa parte della categoria degli stimolanti anche la nicotina, che non presenta un andamento simile a quello degli altri due ma ha una buona correlazione tra il campionamento con POCIS e quello con i simil-POCIS (figura 69).

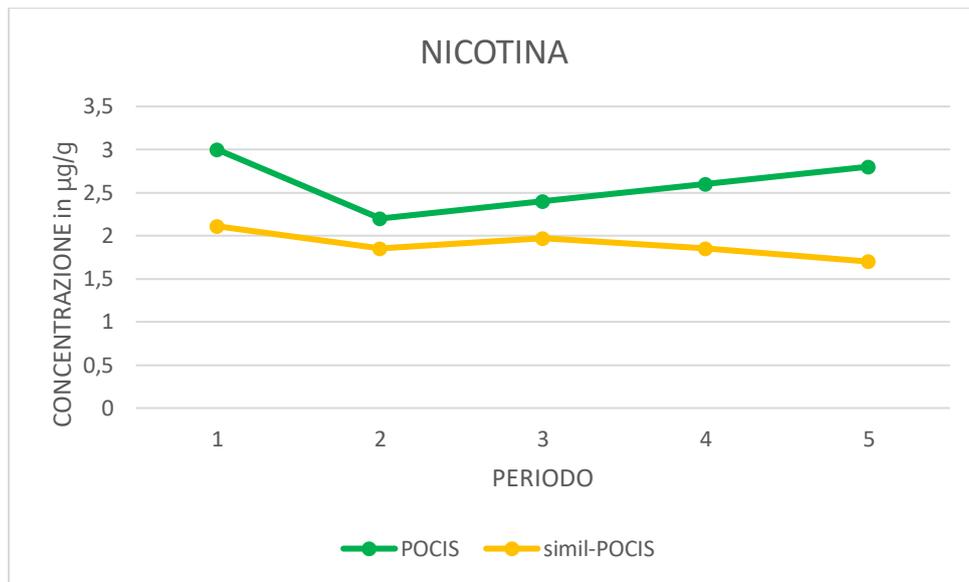


Figura 69. Concentrazione della nicotina nel tempo nei POCIS e nei SIMIL-POCIS.

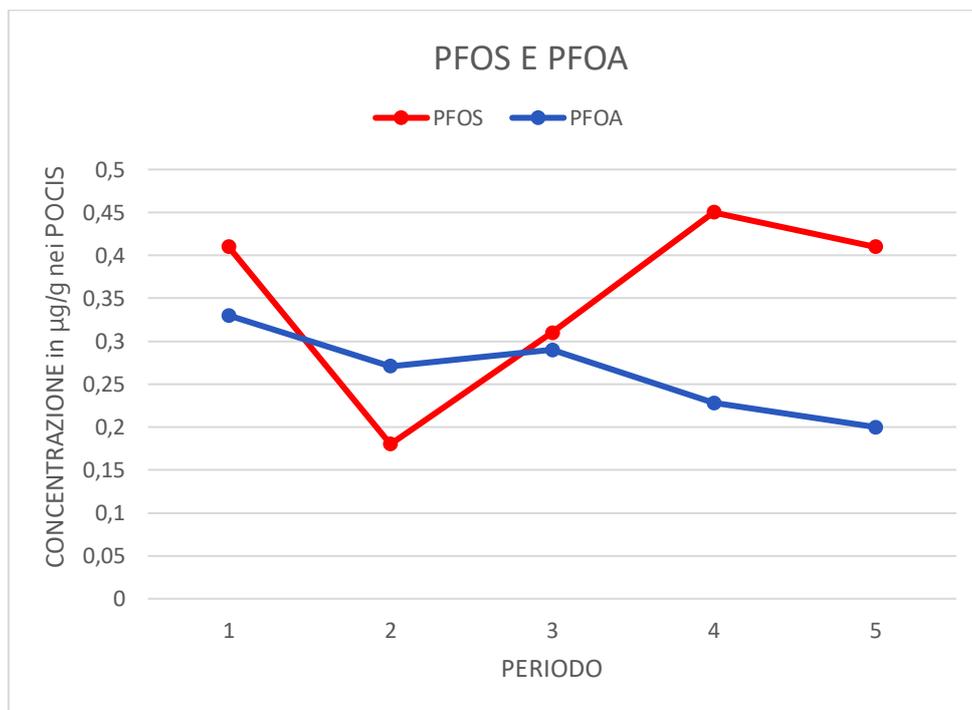


Figura 70. Concentrazione dei composti perfluorurati nei POCIS.

Infine, in questo grafico sono presenti due composti perfluorurati campionati con i POCIS, che sebbene differiscano solamente per il gruppo presente nella testa idrofoba, hanno due andamenti ben diversi. Il PFOS ha un andamento più altalenante rispetto al PFOA, che invece varia la sua concentrazione in modo graduale (figura 70).

6.5 Confronti

6.5.1 Confronto tra campagne antartiche diverse

Un altro confronto che può essere effettuato è quello tra gli analiti campionati all'uscita del depuratore tramite spot-SPE negli anni 2022-2023 e quelli dell'anno precedente. Gli analiti ritrovati in entrambi gli anni sono 10 mentre quelli totali presenti nel 2022-2023 sono 15. Gli analiti che non sono stati riportati in tabella 12 sono: acesulfame, PFOA, PFOS, etilesilmetossicinnamato e idroclorotiazide.

Tabella 12. Analiti campionati con spot-SPE in diversi anni in ng/mL.

ANALITI	Dati 2021-2022	Dati 2022-2023
Taurina	0,2±0,1	0,13±0,08
Nicotina	1,1±0,9	5±10
Diclofenac	0,8±0,8	3±2
Ibuprofene	1,0±0,8	10±10
Benzofenone-3	1,3±0,6	0,4±0,2
Octocrilene	1±1	0,9±0,5
Bisfenolo A	0,31±0,09	0,4±0,3
Paraxantina+Teofillina	3±1	11±8
Caffeina	11±7	23±12
Ketoprofene	10±6	2±1

I valori presenti in tabella 12 sono una media dei dati di campionamento delle quattro giornate in cui sono stati effettuati campionamenti spot delle acque del depuratore. Nella tabella 12 sono mostrati gli analiti che erano presenti nei rilevamenti di tutte e due le annate. Della categoria dei FANS, il diclofenac è più alto in concentrazione rispetto all'anno precedente mentre per il ketoprofene è esattamente l'opposto. Considerando i filtri UV invece, il BP3 ha concentrazione inferiore all'anno precedente. Bisfenolo A, taurina, ibuprofene e octocrilene invece mantengono le loro concentrazioni praticamente costanti nei due periodi considerati, mentre la nicotina è quasi quadruplicata nel 2022-2023. Infine, è possibile notare che anche la caffeina aumenta la sua concentrazione e parallelamente lo fa anche il suo metabolita principale ovvero la paraxantina.

Tra gli analiti presenti in questa campagna e non in quella precedente c'è l'acesulfame, che è stato rilevato e quantificato solo nel campione del 8 Dicembre con una concentrazione di 0,15 ng/mL. Altri analiti presenti nell'ultima campagna che non sono stati riportati in tabella 12 sono: l'idroclorotiazide e il PFOS che sono rilevati in tutti le

giornate di campionamento, e PFOA ed etilesilmetossicinnamato che sono presenti rispettivamente il 3 e 17 novembre per il primo e 8 e 24 dicembre per il secondo.

Dopo aver paragonato i valori di concentrazione derivati dal campionamento spot, si passa al confronto tra i POCIS nei diversi anni. Anche in questo caso i dati riportati in tabella 13 sono gli intervalli delle concentrazioni di tutti i periodi di campionamento. Gli analiti presenti nella tabella per l'anno 2022-2023 sono 17, di cui 15 sono presenti anche in quello precedente.

Tabella 13. Analiti campionati con POCIS in diversi anni in ng/g.

ANALITI	Dati 2021- 2022	Dati 2022- 2023
Sucralosio	-	2-12
Taurina	-	0,11-0,3
Acesulfame	0,13-0,42	0,08
Paraxantina+Teofillina	99-160	2-105
Teobromina	2,84-29,80	8
Caffeina	75-151	60-553
PFOA	0,066-0,288	0,2-0,33
Idroclorotiazide	2,95-11,9	6,98-15
PFOS	0,13-0,35	0,18-0,45
Ketoprofene	48,4-133,1	19-62
Naprossene	22-147	0,042-0.074
Atenololo	0,21-2,52	1,22
Nicotina	1,71-7,45	2,2-3
Diclofenac	1,76-5,70	4,39-45
Ibuprofene	1,68-7,93	61-124
BP-3	2,12-4,92	0,27-1
BPA	1,72-2,67	2,1-7
E1	0,59	-
Triclosan	0,12-0,17	-

Tra gli analiti presenti in tabella 13 la caffeina risulta essere più che raddoppiata negli anni, nonostante ciò, però la paraxantina e la teofillina presentano una concentrazione più bassa. Questo solitamente non accade poiché, essendo la paraxantina il principale metabolita nell'uomo della caffeina, le loro concentrazioni dovrebbero essere correlate. Questa particolarità potrebbe essere dovuta all'elevato effetto matrice che interessa paraxantina e teofillina in queste analisi. I composti perfluorurati, il BPA e l'idroclorotiazide invece sono tutti più alti negli anni 2022-2023. Anche i FANS, come

diclofenac e ibuprofene, aumentano la loro concentrazione mentre il ketoprofene la diminuisce. Tra i FANS si deve evidenziare il caso del naprossene che mostra una concentrazione inferiore rispetto agli anni passati, bisogna però tener presente che il dato è ottenuto solo sulla media dei primi tre periodi perché in quelli dopo non era più rilevabile. Anche acesulfame, teobromina e atenololo non sono presenti in tutti i periodi ma solamente in uno solo, quindi quelli riportati in tabella 13 non corrispondono a delle medie per questi analiti. Infine, tra gli analiti presenti negli anni 2021-2022 ci sono E1 e triclosan, viceversa quelli rilevati nel 2022-23 sono sucralosio e taurina.

Infine, in tabella 14 sono elencati gli intervalli dei valori ottenuti in questo lavoro di tesi e quelli dell'anno precedente, tramite il campionamento con simil-POCIS. Gli analiti presenti in entrambe le campagne sono 8, mentre quelli che sono presenti solo nel 2022-2023 sono quattro in più.

Tabella 14. Analiti campionati con simil-POCIS in diversi anni in ng/g.

ANALITI	Dati	
	2021-2022	2022-2023
Taurina	NI	0,65-0,70
Etilsilmetossicinnamato	-	0,88-1,05
Paraxantina+Teofillina	1,5-5,3	6,3-10,5
Caffeina	11-24,5	17-37
PFOA	0,054-0,107	-
Idroclorotiazide	1,23-2,77	2-3
PFOS	0,088-0,120	-
Ketoprofene	12-43	15-56
Naprossene	3,83-44,81	-
Atenololo	NI	1,05
Nicotina	NI	1,7-2
Diclofenac	0,44-2,61	15-51,59
Ibuprofene	0,79-3,75	13-26
BP-3	5,07-11,13	4,5-6,7
BPA	0,87-2,31	1,4-3,3
E1	0,075-0,085	-
Triclosan	0,22-0,70	-
Octocrilene	0,35-2,90	0,9

Nota: Con NI sono indicati gli analiti che non sono stati inseriti nel metodo.

Con i campionatori simil-POCIS si nota una maggiore quantità di analiti che sono presenti solamente in una sola annata. Negli anni 2021-2022 sono presenti 4 analiti che non si trovano l'anno successivo: PFOA, naprossene, E1 e triclosan. Al contrario nel 2022-2023 si trova l'etilesilmetossicinnamato. Degli analiti NI solo la nicotina è presente in tutti e cinque i periodi; infatti, la taurina è stata quantificata solo in tre e l'atenololo in uno. Per quanto riguarda gli analiti presenti in entrambe le campagne, tra questi ci sono caffeina, paraxantina e teofillina che aumentano nel 2022-2023, quindi a differenza del caso precedente questo risultato rispecchia l'andamento classico. Anche i FANS tranne il naprossene, il BPA e l'octocrilene presentano una concentrazione maggiore nell'ultima annata. L'unico analita che diminuisce da un anno all'altro è il BP3.

Le variazioni trovate da un anno all'altro possono essere ricondotte ad eventuali effetti matrici che influenzano i segnali, e a fattori come, ad esempio, il numero di persone presenti nella base e il loro abituale consumo di certi prodotti. Inoltre, si deve considerare che i POCIS e i simil-POCIS dell'anno 2022-2023 sono stati trasferiti nelle SPE con il metodo di trasferimento a secco mentre quelli del 2021-2022 con quello con l'acqua.

6.5.2 Confronto tra i livelli del depuratore e nel mare di Road Bay

Un ulteriore confronto da fare è quello tra POCIS e simil-POCIS provenienti dal depuratore e da Road Bay. In mare gli analiti sono più diluiti quindi ci si aspetta di trovare dei valori più alti per il depuratore. Nella tabella seguente (tabella 15) sono mostrati i valori per quegli analiti che sono quantificabili in entrambi i punti di campionamento.

Tabella 15. Confronto tra la media dei valori degli analiti campionati con POCIS/simil-POCIS nel depuratore e a Road Bay in ng/g.

	POCIS DEP	POCIS RB	SIMIL- POCIS DEP	SIMIL- POCIS RB
Paraxantina+Teofillina	32±42	0,210±0,020	8±1	<LOQ
Caffeina	260±189	3±1	28±7	<LOQ
PFOS	0,300±0,100	0,018±0,001	<LOQ	ND
Diclofenac	16±16	0,022±0,001	35±14	ND
Ibuprofene	95±24	0,024±0,004	17±5	0,026±0,006

Gli analiti che nel depuratore erano più concentrati sono quelli che poi si ritrovano anche nei campioni del mare. Infatti, gli analiti passando dal depuratore al mare si diluiscono a tal punto che la loro concentrazione, talvolta diventi più bassa del limite di quantificazione e non possano essere rilevabili.

6.5.3 Confronto tra concentrazione nelle SPE e nei POCIS

Per quanto concerne i POCIS messi a campionare nel depuratore è possibile fare un confronto delle concentrazioni con quelle dello spot- SPE poste nello stesso luogo. I dati fino ad ora riportati sono relativi alla massa della fase HLB presente in ciascun POCIS. Per poter fare il paragone è quindi necessario convertire i dati provenienti dall'analisi dei POCIS (che sono in $\mu\text{g/g}$) in una concentrazione in $\mu\text{g/L}$. A tale scopo si utilizza l'equazione (8):

$$C_w = \frac{C_s * M_s}{R_s * t}$$

Equazione 8. Formula per il calcolo della concentrazione degli analiti in acqua campionati con POCIS.

Dove:

- C_w è la concentrazione nell'acqua degli analiti campionati tramite i POCIS;
- C_s è la concentrazione degli analiti nella fase HLB;
- M_s massa della fase HLB trasferita nelle cartucce SPE;
- R_s è il sampling rate è la velocità di accumulo, espressa in L/giorno;
- t è il tempo di campionamento in giorni.

Nella tabella seguente (tabella 16) sono espressi i valori delle SPE come media delle concentrazioni di tutti i campionamenti, mentre per i POCIS i dati sono mediati solamente per tre i primi tre periodi. È stata fatta questa scelta poiché solo nei primi tre periodi sono state fatti dei campionamenti spot, in questo modo il confronto risulta essere sulla stessa finestra temporale. Oltre alla media sono mostrati in tabella anche i range di concentrazione. I valori di R_s utilizzati nella determinazione della C_w sono stati calcolati tramite delle analisi svolte nel laboratorio di Chimica Analitica del DCCI.

Tabella 16. Valori di concentrazione in µg/L nell'acqua del depuratore.

ANALITI	Dati SPE 2022-2023	Cw calcolata 2022-2023	Media dati SPE	Media Cw
PFOA	0,125-0,140	0,018-0,022	0,130±0,010	0,019±0,001
PFOS	0,033-0,240	0,041-0,086	0,100±0,090	0,060±0,020
Diclofenac	0,787-6,170	0,96-5,47	2±2	2±2
Ibuprofene	2,69-32,60	7,69-14,20	12±13	10±3
Naprossene	-	0,0042-0,0076	-	0,005±0,001
Bisfenolo A	0,120-0,808	0,31-0,81	3±5	0,500±0,200
Caffeina	7,5-36	6,45-65,31	23±12	31±30
Ketoprofene	1,02-3,30	3,29-10,50	2±1	7±3

Dalla tabella si evince che le concentrazioni Cw e quelle delle spot-SPE sono molto simili tra di loro per la maggior parte degli analiti, addirittura quelle del diclofenac sono uguali. Le uniche eccezioni sono BPA e PFOA che hanno la Cw di un ordine di grandezza di più basso rispetto ai valori calcolati sulla SPE.

6.5.4 Confronto tra scarichi di altre base antartiche

L'Antartide presenta diverse basi scientifiche ed ognuna di esse produce degli scarichi che vanno in mare. Alcune basi sono dotate dei sistemi di depurazione altri invece ne sono sprovvisti. È possibile fare un confronto tra i diversi scarichi delle basi, al fine di capire se immettono nel mare gli stessi analiti della base italiana Mario Zucchelli (tabella 17). In generale le differenze potrebbero essere dovute ad una migliore efficienza dei sistemi di depurazione oppure agli analiti che sono in quantità non rilevabili.

Tabella 17. Concentrazioni degli analiti negli scarichi campionati in diverse basi scientifiche in Antartide.

Analiti	Periodo di campionamento	Range di concentrazione (µg/L)	Area dello studio	Rif. bibliografico
BPA	2009	0,03	McMurdo	[64]
	2009	0,03	Scott Base	[64]
	2012-2013	0.0047 - 0.986	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Esperanza	[65]
	2017, 2019	nd	Arctowski	[66]
	2022-2023	0,12-0,808	Mario Zucchelli	
BP-3	2009	0,080	McMurdo	[64]
	2009	0,12	Scott Base	[64]
	2012-2013	0.0167 - 0.195	Scott Base	[64]
	2012-2013	0,02	Esperanza	[67]
	2019	nd	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd-0,619	Mario Zucchelli	

Analiti	Periodo di campionamento	Range di concentrazione (µg/L)	Area dello studio	Rif. bibliografico
Caffeina	2012-2013	71	Esperanza	[68]
	2019	3,3	Arctowski	[66]
	2022-2023	7,51-36	Mario Zucchelli	
Carbamazepinea	2012-2013	nd or <LOQ	Esperanza	[68]
	2017, 2019	nd – 0,0088	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	
Diclofenac	2012-2013	15	Esperanza	[68]
	2017, 2019	0,074 – 0,747	Arctowski	[66]
	2022-2023	0,787 – 6,17	Mario Zucchelli	
E1	2009	nd	McMurdo	[64]
	2009	0,09	Scott Base	[64]
	2012-2013	0,0031 – 0,3310	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Esperanza	[65]
	2017, 2019	nd – 0,0799	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	
E2	2009	nd	McMurdo	[64]
	2009	nd	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Esperanza	[65]
	2017, 2019	nd	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	
EE2	2009	nd	McMurdo	[64]
	2009	nd	Scott Base	[64]
	2012-2013	0,0115 – 0,0778	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Esperanza	[65]
	2017, 2019	nd	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	
EHMC	2009	nd	McMurdo	[64]
	2009	nd	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Esperanza	[67]
	2022-2023	<LOQ – 0,106	Mario Zucchelli	
Ibuprofene	2012-2013	10	Esperanza	[68]
	2019	0,48	Arctowski	[66]
	2022-2023	2,69 – 32,60	Mario Zucchelli	
Ketoprofene	2012-2013	nd or <LOQ	Esperanza	[68]
	2019	0,015	Arctowski	[66]
	2022-2023	1,02- 3,30	Mario Zucchelli	

Analiti	Periodo di campionamento	Range di concentrazione (µg/L)	Area dello studio	Rif. bibliografico
Naprossene	2012-2013	0,10	Esperanza	[68]
	2017, 2019	0,662– 2,653	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	
PFOA	2012-2013	0,53	Esperanza	[67]
	2022-2023	nd – 0,14	Mario Zucchelli	
PFOS	2012-2013	nd	Esperanza	[67]
	2022-2023	0,031- 0,240	Mario Zucchelli	
Octocrilene	2012-2013	nd	Esperanza	[67]
	2022-2023	<LOQ – 1,6	Mario Zucchelli	
OD-PABA	2012-2013	nd	Esperanza	[67]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	
Triclosan	2009	nd	McMurdo	[64]
	2009	0,24	Scott Base	[64]
	2012-2013	0,0752 – 0,807	Scott Base	[64]
	2012-2013	nd	Esperanza	[65]
	2019	nd	Arctowski	[66]
	2022-2023	nd	Mario Zucchelli	

Un analita che presenta delle differenze tra diverse basi è la caffeina. Nella base italiana Mario Zucchelli i livelli di questo analita sono abbastanza alti ma non come quelli della base argentina Esperanza. La base polacca Arctowski, pur non essendo provvista di un sistema di depurazione, scarica una quantità inferiore di caffeina rispetto alle altre due. Questi dati sono sicuramente legati al numero di ricercatori presenti nella base, alle loro abitudini, ed esempio legate al consumo di caffeina.

Tra i FANS elencati nella tabella 17, l'unico a non essere stato determinato nelle nostre analisi è il naprossene, che invece è presente nella base polacca e in quella argentina. I dati relativi all'ibuprofene e al ketoprofene invece sono più alti nella base italiana rispetto alle altre due. Il diclofenac, invece, presenta la concentrazione più alta nella base argentina, seguita poi da quella italiana e polacca.

Nella categoria degli additivi, il BPA è stato trovato nella base italiana, in quella statunitense (Mc Murdo) e in quella neozelandese (Scott Base). In quella argentina e polacca invece non è stato rilevato. Il triclosan invece è presente solo nella base neozelandese.

Per la categoria degli estrogeni, essi sono stati ritrovati solamente nella base neozelandese in concentrazioni basse.

Per i composti perfluorurati i dati a disposizione sono solo quelli della base argentina con cui si potrebbe fare il paragone. In particolare, il PFOS è presente solo nella base italiana mentre il PFOA si trova soprattutto nella stazione Esperanza.

Infine, per la classe dei filtri UV, l'OD-PABA non è stato rilevato in nessuna base di cui si hanno i dati. Per quanto riguarda l'octocrilene e l'etilesilmetossicinnamato, essi sono presenti solo nella base italiana, in range che va da valori inferiori al limite di quantificazione a qualche $\mu\text{g/L}$.

Nella base italiana sono stati rilevati anche altri analiti, di cui però non sono stati trovati altri dati per fare un confronto. Gli analiti in questione sono acesulfame (nd-0,21 $\mu\text{g/L}$), taurina (<LOQ-0,19 $\mu\text{g/L}$), idroclorotiazide (0,61-1,95 $\mu\text{g/L}$), nicotina (0,87-31,02 $\mu\text{g/L}$), paraxantina e teofillina (<LOQ-7,2 $\mu\text{g/L}$).

In conclusione, esistono chiaramente delle differenze tra le concentrazioni di analiti scaricati nell'ambiente marino antartico, questo può essere dovuto al sistema di trattamento delle acque reflue, al numero di ricercatori presenti in una base e alle loro abitudini (se consumano nicotina o caffeina ad esempio). In generale si può affermare che i dati che si hanno a disposizione sono pochi e non sempre sono riportate in letteratura le metodologie utilizzate per le analisi. I dati riportati dalla letteratura sono quindi puramente indicativi.

7 CONCLUSIONI

I contaminanti emergenti sono sostanze che possono essere dannose per l'uomo e per l'ambiente. Da questa problematica nasce la necessità di monitorare tali sostanze, che sono generalmente di uso comune e vengono immesse continuamente nell'ambiente. In questo lavoro di tesi sono stati ricercati i contaminanti emergenti presenti nelle acque antartiche, in prossimità della base Mario Zucchelli.

Per campionare gli analiti dall'acqua sono stati utilizzati due diversi approcci: il campionamento passivo e quello puntuale o spot. Per il campionamento spot sono state utilizzate delle bottiglie Niskin, successivamente l'acqua campionata è stata processata con la tecnica di preconcentrazione SPE. Per il campionamento passivo invece sono stati utilizzati i campionatori POCIS e una loro modifica sviluppata nei laboratori di Chimica Analitica del DCCI.

Per le analisi dei campioni è stata usata la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa tandem (MS/MS), in modalità MRM. Inoltre, sono state utilizzate due diverse modalità di acquisizione dell'MS, una definita 'polarity switching' e una detta 'ioni negativi'.

In questo lavoro di tesi, è stata apportata una modifica al metodo precedentemente utilizzato per preparare i campioni prima dell'analisi, la cui validità è stata verificata tramite delle prove di recupero.

Sono state eseguite delle prove di recupero per la preconcentrazione con SPE, ed i risultati ottenuti sono soddisfacenti per quasi la totalità degli analiti.

In generale gli analiti presenti in concentrazione più alta in tutti i periodi del campionamento antartico erano la caffeina e alcuni FANS, come ketoprofene, ibuprofene e diclofenac. Il confronto tra i due tipi di campionatori passivi (POCIS e simil-POCIS) ha evidenziato andamenti differenti per la maggior parte degli analiti, mentre nicotina e ibuprofene sono stati campionati in modo analogo dai due dispositivi.

I dati ottenuti durante questa campagna sono stati paragonati con quelli dell'anno precedente. Gli analiti presenti in entrambe le campagne non mostrano differenze sostanziali nelle concentrazioni misurate. Tuttavia, sono stati aggiunti nuovi analiti al metodo di analisi e rivelati composti che nell'annata precedente erano in quantità troppo bassa da essere quantificati.

Un ulteriore punto di riflessione sono state le differenti concentrazioni misurate nel depuratore e nel mare in prossimità di esso. Gli analiti presenti in mare, che sono stati rivelati in quantità superiori al limite di quantificazione, erano quelli più concentrati nel depuratore.

Inoltre, si è voluto calcolare la concentrazione nell'acqua degli analiti campionati con i POCIS nel depuratore per compararle alle concentrazioni trovate con il campionamento spot-SPE. Per fare ciò è stato necessario convertire in ng/L, tramite un'equazione, i dati ottenuti dall'analisi dei POCIS in ng per grammo di fase di HLB. Il confronto non ha evidenziato differenze particolarmente significative.

Infine, per avere una visione più generale della concentrazione degli analiti introdotti nell'ambiente marino antartico dalle basi scientifiche, sono stati confrontati i dati da noi ottenuti con quelli presenti in letteratura, relativamente ad altre stazioni scientifiche. Purtroppo, alcune stazioni non possiedono nemmeno un sistema di depurazione delle acque reflue, quindi questo confronto ha potuto fornire soltanto un'idea approssimativa della situazione, anche perchè i dati di letteratura sono stati ottenuti con metodi non immediatamente confrontabili con quello usato in questo lavoro di tesi.

8. APPENDICE

Appendice 1. Quantificazione analiti campionati nel depuratore e processati con le SPE nei diversi giorni e a diverse diluizioni. I risultati sono in ng/mL, non sono presenti gli analiti che non era quantificabili in tutti i periodi.

	SPE 03/11/22- dil1000	SPE 17/11/22- dil1000	SPE 08/12/22- dil1000	SPE 24/12/22- dil1000	SPE 03/11/22- dil100	SPE 17/11/22- dil100	SPE 08/12/22- dil100	SPE 24/12/22- dil100
ACS	ND	ND	0,21±0,03	ND	ND	ND	0,15±0,04	ND
TRN	0,19±0,04	<LOQ	<LOQ	0,07±0,06	0,19±0,02	0,19±0,07	<LOQ	0,029±0,004
PRX-TFL	6,9±0,1	6,8±0,4	20,6±0,5	<LOQ	ND	ND	ND	ND
PFOA	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	0,125±0,003	0,14±0,01	<LOQ	<LOQ
TBR	ND	ND	LOQ	LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ
CAFF	28±1	22,1±0,4	36±1	7,51±0,04	ND	ND	ND	ND
HCTZ	0,62±0,02	0,9±0,2	1,95±0,05	0,86±0,03	0,61±0,05	0,87±0,08	1,1±0,2	0,69±0,06
PFOS	0,17±0,03	0,08±0,03	<LOQ	0,031±0,008	0,24±0,02	0,094±0,008	0,0366±0,0008	0,033±0,004
KET	1,02±0,09	2,4±0,1	1,3±0,1	3,3±0,1	ND	ND	ND	ND
NCT	1,47±0,02	1,45±0,07	3,1016±0,0008	1,08±0,04	2,128±0,009	1,1±0,1	2,58±0,05	0,87±0,03
DCLF	4,8±0,1	4,6±0,1	1,7±0,2	1,32±0,09	6,17±0,04	3,64±0,07	1,40±0,06	0,787±0,008
IBU	8,5±0,5	5,3±0,1	14,83±0,07	3,75±0,07	8,3±0,1	4,763±0,004	32,6±0,9	2,69±0,08
BP-3	0,619±0,005	0,35±0,01	ND	0,33±0,04	0,5413±0,0005	0,34±0,01	ND	0,16±0,02
EHMC	<LOQ	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND
OCT	1,08±0,02	0,7±0,2	1,2±0,3	<LOQ	1,6±0,1	0,39±0,02	0,39±0,05	ND

	SPE 03/11/22- dil100	SPE 17/11/22- dil100	SPE 08/12/22- dil100	SPE 24/12/22- dil100
BPA	0,40±0,02	0,808±0,003	0,12±0,02	0,12±0,01
E1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
TRCL	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Appendice 2. Quantificazione analiti campionati con i POCIS nei diversi periodi e a diverse diluizioni. I risultati sono in µg/g, non sono presenti gli analiti che non era quantificabili in tutti i periodi.

	dil1000- I	dil1000- II	dil1000- III	dil1000- IV	dil1000- V	dil100- I	dil100- II	dil100- III	dil100- IV	dil100- V
ACS	<LOQ	0,236±0,034	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ	0,08±0,01	<LOQ	ND	<LOQ
TRN	<LOQ	0±0	0,02±0,02	0±0	0,04±0,06	0,13±0,09	0,11±0,02	0,14±0,08	0,2±0,1	0,3±0,1
PRX- TFL	33±12	105±57	5±2	2±3	17±7	11±3	31,9±0,9	2±1	1,2±0,9	10±2
TBR	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	ND	8±3	ND	ND	<LOQ
PFOA	0,6±0,9	0,5±0,3	0,1±0,1	0,1±0,1	0,054±0,004	0,33±0,02	0,271±0,007	0,29±0,06	0,228±0,004	0,20±0,03
CAFF	218±44	553±447	60±31	147±11	322±179	ND	ND	ND	ND	ND
SCL	12±8	6±3	2±2	4,9±0,3	4±3	4±2	2,2±0,5	1,6±0,2	4±1	5±2
HCTZ	7,5±0,1	13±3	15±2	6,98±0,02	7±1	4,0±0,2	5,8±0,6	8±1	4±2	5,4±0,8
PFOS	0,6±0,3	<LOQ	<LOQ	0,5±0,6	0,9±0,2	0,41±0,09	0,18±0,03	0,31±0,03	0,45±0,03	0,41±0,03
KET	19±2	44±4	62±9	55±2	39±6	ND	ND	ND	ND	ND
NPRX	0,79±0,04	1,0±0,3	0,7±0,2	<LOQ	<LOQ	0,074±0,009	0,043±0,007	0,042±0,002	<LOQ	<LOQ
ATN	ND	ND	ND	ND	2,4±0,7	ND	ND	ND	ND	1,22±0,01
DCLF	351±16	2454±2849	188±23	145±44	88±1	16±11	45±39	8,65±0,01	9±2	4,39±0,07
SLBTM	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	<LOQ
IBU	89±8	61±2	124±30	113±2	90±32	ND	ND	ND	ND	ND
NCT	6,8±0,8	5,6±0,3	5,3±0,7	4,0±0,6	4,4±0,5	3±1	2,2±0,6	2,4±0,2	2,6±0,1	2,8±0,4
BP-3	0,3±0,1	<LOQ	2,0±0,9	1,6±0,1	0,7±0,7	0,27±0,01	<LOQ	0,7±0,2	1,0±0,5	0,7±0,1
BPA	ND	ND	ND	ND	ND	7±1	3,7±0,5	2,8±0,4	4±1	2,1±0,3
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND

Appendice 3. Quantificazione analiti campionati con i SIMIL-POCIS nei diversi periodi e a diverse diluizioni. I risultati sono in µg/g non sono presenti gli analiti che non era quantificabili in tutti i periodi.

	dil1000- I	dil1000- II	dil1000- III	dil1000- IV	dil1000- V	dil100- I	dil100- II	dil100- III	dil100- IV	dil100- V
ACS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TRN	2,4±0,4	<LOQ	4±1	<LOQ	1,7±0,3	0,70±0,05	<LOQ	0,65±0,02	<LOQ	0,67±0,07
PRX-TFL	9±2	10,5±0,7	10±1	9±1	6,3±0,2	4,64±0,06	4±1	3,1±0,2	2,7±0,8	3,1±0,3
CAFF	33±5	28±5	37±9	27±4	17±4	ND	ND	ND	ND	ND
HCTZ	<LOQ	2,0±0,5	3,0±0,3	2,7±0,3	1,84±0,07	<LOQ	1,9±0,2	3,2±0,4	2,6±0,3	ND
PFOS	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
KET	<LOQ	49±11	56±4	24±2	15±2	ND	ND	ND	ND	ND
DCLF	ND	ND	ND	ND	ND	9±1	8±1	4±1	4,9±0,6	6,2±0,4
ATN	ND	ND	ND	ND	1,05±0,03	ND	ND	ND	ND	0,206±0,005
IBU	16,3±0,7	13,1±0,3	26±2	18,2±0,8	13±1	ND	ND	ND	ND	ND
BP-3	4,7±0,9	4,5±0,3	6,7±0,3	5,3±0,3	5,1±0,1	1,4±0,1	0,72±0,07	2,9±0,1	2,110±0,072	2,0±0,5
NCT	7±2	5,7±0,5	5,8±0,3	5,0±0,5	4,9±0,5	2,108±0,006	1,849±0,006	1,97±0,06	1,85±0,10	1,7±0,3
EHMC	ND	ND	1,3±0,1	1,85±0,05	1,5±0,3	ND	ND	0,9±0,1	0,884±0,009	1,05±0,08
OCT	<LOQ	<LOQ	0,9±0,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,665±0,006	<LOQ	<LOQ
BPA	ND	ND	ND	ND	ND	3,3±0,7	2±0,2	1,4±0,1	1,9±0,2	1,6±0,3
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND
TRCL	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Appendice 4. Legenda degli acronimi di tutti gli analiti.

ACS	Acesulfame
TRN	Taurina
PRX-TFL	Paraxantina+Teofillina
TBR	Teobromina
PFOA	PFOA
CAFF	Caffeina
SCL	Sucralosio
HCTZ	Idroclorotiazide
PFOS	PFOS
2,4-D	2,4-D
FRSM	Furosemide
CMPH	Cloramfenicolo
CRBZ	Carbamazepina
KET	Ketoprofene
NPRX	Naprossene
DCLF	Diclofenac
ATN	Atenololo
IBU	Ibuprofene
SLBTM	Salbutamolo
BP-3	Benzofenone-3
TRBT	Terbutalina
CMQ	Clormequat
GEM	Gemfibrozil
NCT	Nicotina
MPQ	Mepiquat
OD-PABA	Octildimetilamminobenzoato
EHMC	Etilsilmetossicinnamato
MTPRL	Metoprololo
OCT	Octocrilene
CLNB	Clenbuterolo
BPA	Bisfenolo A
E1	Estrone
TRCL	Triclosan
EE2	17- α etinilestradiolo
E2	β -estradiolo
DMZ	Daminozide
MET	Metformina

9 BIBLIOGRAFIA

- [1] «Kevin A. Hughes, Peter Convey, John Turner, Developing resilience to climate change impacts in Antarctica: An evaluation of Antarctic Treaty System protected area policy, *Environmental Science & Policy*, Volume 124, 2021, Pages 12-22».
- [2] «Bryan Clark Howard, World's Largest Marine Reserve Created Off Antarctica, in *National Geographic*, 28-10-2016. <https://www.nationalgeographic.com/science/article/ross-sea-marineprotected-area-antarctica>».
- [3] «Xiaolan Hu, Shilin Gong, Quan He, Jian-Lin Wu, Na Li, Less is more: A new perspective for toxicity of emerging contaminants by structures, protein adducts and proteomics, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 167, 2023».
- [4] H. Ramirez-Malule, D. H. Quiñones-Murillo, e D. Manotas-Duque, «Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis», *Emerg. Contam.*, vol. 6, pp. 179–193, 2020».
- [5] «Henry MacKeown, Barbara Benedetti, Marina Di Carro, Emanuele Magi, The study of polar emerging contaminants in seawater by passive sampling: A review, *Chemosphere*, Volume 299».
- [6] «Gazzetta Ufficiale». [Online]. Disponibile su: https://www.gazzettaufficiale.it/do/gazzetta/Unione_europea/3/pdfPaginato?dataPubblicazioneGazzetta=20220926&numeroGazzetta=72&tipoSerie=S2&tipoSupplemento=GU&numeroSupplemento=0&progressivo=0&edizione=0&elenco30giorni=false&home=&numPagina=369
- [7] S. O. Idowu, N. Capaldi, L. Zu, e A. D. Gupta, A c. di, «Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)», in *Encyclopedia of Corporate Social Responsibility*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 2336–2336».
- [8] European Environment Agency., *The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments: the Weybridge+15 (1996 2011) report*. LU: Publications Office, 2012. Consultato: 22 novembre 2023. [Online]. Disponibile su: <https://data.europa.eu/doi/10.2800/41462>»
- [9] N. C. Huynh, T. T. T. Nguyen, D. T. C. Nguyen, e T. V. Tran, «Occurrence, toxicity, impact and removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): A review», *Sci. Total Environ.*, vol. 898, p. 165317, nov. 2023».
- [10] «<https://www.treccani.it/enciclopedia/furosemide/>».
- [11] «[Antibiotico-resistenza salute.gov.it](https://www.salute.gov.it/antibiotico-resistenza)».
- [12] T. Fayaz, N. Renuka, e S. K. Ratha, «Antibiotic occurrence, environmental risks, and their removal from aquatic environments using microalgae: Advances and future perspectives», *Chemosphere*, vol. 349, p. 140822, feb. 2024.
- [13] «Laferriere CI, Marks MI. Chloramphenicol: properties and clinical use. *Pediatr Infect Dis*. 1982 Jul-Aug;1(4):257-64. PMID: 7177917.».
- [14] «https://www.treccani.it/enciclopedia/anticonvulsivante_%28Dizionario-di-Medicina%29/».
- [15] «Jeanne Trognon, Claire Albasi, Jean-Marc Choubert, A critical review on the pathways of carbamazepine transformation products in oxidative wastewater treatment processes, *Science of The Total Environment*, 2023».
- [16] «https://www.treccani.it/enciclopedia/farmacobroncodilatatore_%28Dizionario-di-Medicina%29/».
- [17] «H.A. Spiller, Terbutaline, Editor(s): Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, 2014, Pages 484-485».
- [18] «Niall Durrant, Salbutamol: hero or villain?, *Paediatrics and Child Health*, Volume 33, Issue 4, 2023, Pages 97-103».

- [19] «Michele Protti, Paolo M. Sberna, Rocco Sardella, Tomaz Vovk, Laura Mercolini, Roberto Mandrioli, VAMS and StAGE as innovative tools for the enantioselective determination of clenbuterol in urine by LC-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 195, 2021».
- [20] «https://www.treccani.it/enciclopedia/terapia-ipolipemizzante_%28Dizionario-di-Medicina%29/».
- [21] «Neha Kamal, Raveendran Sindhu, Preeti Chaturvedi Bhargava, Biodegradation of emerging organic pollutant gemfibrozil: Mechanism, kinetics and pathway modelling, *Bioresource Technology*, Volume 374, 2023».
- [22] «Lei Dong, Shuai Li, Jie Huang, Wen-Jun Li, Mukhtiar Ali, Co-occurrence, toxicity, and biotransformation pathways of metformin and its intermediate product guanyurea: Current state and future prospects for enhanced biodegradation strategy, *Science of The Total Environment*, Volume 921, 2024».
- [23] «<https://www.treccani.it/enciclopedia/betabloccanti/?search=betabloccanti>».
- [24] «Pirkko Kriikku, Samu Pelkonen, Maija Kaukonen, Ilkka Ojanperä, Propranolol and metoprolol: Two comparable drugs with very different post-mortem toxicological profiles, *Forensic Science International*, Volume 327, 2021».
- [25] «Carl A. Gruetter, Atenolol, Editor(s): S.J. Enna, David B. Bylund, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007, Pages 1-6».
- [26] «Joanna A. Ruskiewicz, Adi Pinkas, Beatriz Ferrer, Tanara V. Peres, Aristides Tsatsakis, Michael Aschner, Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review, *Toxicology Reports*, Volume 4, 2017, Pages 245-259».
- [27] «Review Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters Jiaying Wang 1,2, Liumeng Pan 1, Shenggan Wu 3, Liping Lu 1, Yiwen Xu 1, Yanye Zhu 1, Ming Guo 4 and Shulin Zhuang 1,2,5,* 1 Institute of Environmental Science, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Academic Editor: Huixiao Hong Received: 25 May 2016; Accepted: 25 July 2016; Published: 3 August 2016».
- [28] «P. Calza, D. Vione, F. Galli, D. Fabbri, F. Dal Bello, C. Medana, Study of the photochemical transformation of 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate (OD-PABA) under conditions relevant to surface waters, *Water Research*, Volume 88, 2016, Pages 235-244».
- [29] «Fan Huang, Junwang Tang, Like Xu, Luiza C. Campos, Deciphering the synergistic effects of photolysis and biofiltration to actuate elimination of estrogens in natural water matrix, *Water Research*, Volume 249, 2024».
- [30] «Keran Yang, Ming Liu, Xiulan Weng, Gary Owens, Zuliang Chen, Fenton-like oxidation for the simultaneous removal of estrone and β -estradiol from wastewater using biosynthesized silver nanoparticles, *Separation and Purification Technology*, Volume 285, 2022».
- [31] «Anne-Sophie Voisin, Dietmar Kültz, Frédéric Silvestre, Early-life exposure to the endocrine disruptor 17- α -ethinylestradiol induces delayed effects in adult brain, liver and ovotestis proteomes of a self-fertilizing fish, *Journal of Proteomics*, Volume 194, 2019, Pages 112-124».
- [32] «Dongyang Liu, Hanzhi Wang, Yue Teng, Qirui Wu, Chunming Tang, Xinxin Gao, Chaoqi Chen, Liandong Zhu, Biochemical responses of freshwater microalgae *Chlorella sorokiniana* to combined exposure of Zn(II) and estrone with simultaneous pollutants removal, *Journal of Environmental Management*, Volume 348, 2023».
- [33] «Pratishtha Khurana, Noha Hasaneen, Rama Pulicharla, Guneet Kaur, Satinder Kaur Brar, Co-transport of PFCs in the environment- An interactive story, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, Volume 5, 2022».

- [34] «Peiru Luo, Yangyang Zhang, Zifang Peng, Qingyun He, Wuduo Zhao, Wenfen Zhang, Dan Yin, Yanhao Zhang, Jianwei Tang, Photocatalytic degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA) from water: A mini review, *Environmental Pollution*, Volume 343, 2024».
- [35] «Miao Zhang, Xueyan Gu, Liu Wu, Nannan Wan, Yu Liu, Zaijun Xin, Tianbing Chen, Shuai Liu, Mingqi Li, Mi Deng, Qiyu Wang, A new mechanistic insight into the association between environmental perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) exposure and attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD)-like behavior, *NeuroToxicology*, Volume 99, 2023, Pages 254-263».
- [36] «Erin Kaleta, Chapter 14 - Central nervous system stimulants, Editor(s): Hema Ketha, Uttam Garg, *Toxicology Cases for the Clinical and Forensic Laboratory*, Academic Press, 2020, Pages 227-238».
- [37] «Lance Kuo-Esser, Ramon Chen, Kylie Lawson, Kennedy Kuchinski, Nijah Simmons, Mauricio Dominguez, Tommy Scandura, Martin Vo, Emma Dasenbrock-Gammon, Natalie Hagan, Haley Esposito, Molly Thompson, Steven Le, Wilber Escorcia, Hanna N. Wetzel, Early-life caffeine exposure induces morphological changes and altered physiology in *Caenorhabditis elegans*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 690, 2024».
- [38] «Subramaniyan Vinoth, Sea-Fue Wang, Lanthanum vanadate-based carbon nanocomposite as an electrochemical probe for amperometric detection of theophylline in real food samples, *Food Chemistry*, Volume 427, 2023».
- [39] «Elaiyappillai Elanthamilan, Moorthy Sasikumar, Sea-Fue Wang, Building nickel tungstate nanospheres anchored polyaniline conductive matrixes for trace level electrochemical determination of theobromine in food samples, *Applied Surface Science Advances*, Volume 18, 2023».
- [40] «J.L. Rodríguez-Gil, N. Cáceres, R. Dafouz, Y. Valcárcel, Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distributions and probabilistic risk assessment, *Science of The Total Environment*, Volume 612, 2018, Pages 1058-1071».
- [41] «Martin Purpura, Ralf Jäger, Michael Falk, An assessment of mutagenicity, genotoxicity, acute-, subacute and subchronic oral toxicity of paraxanthine (1,7-dimethylxanthine), *Food and Chemical Toxicology*, Volume 158, 2021.
- [42] «Thomas J. Gould, Epigenetic and long-term effects of nicotine on biology, behavior, and health, *Pharmacological Research*, Volume 192, 2023».
- [43] «Chaoran Chen, ShuFang Xia, Jialiang He, Guangli Lu, Zhenxing Xie, Hongjie Han, Roles of taurine in cognitive function of physiology, pathologies and toxication, *Life Sciences*, Volume 231, 2019».
- [44] «Andrew Shao, John N. Hathcock, Risk assessment for the amino acids taurine, l-glutamine and l-arginine, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 50, Issue 3, 2008, Pages 376-399».
- [45] <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:it:PDF>.
- [46] «Sydney Risdon, Sylvain Battault, Alonso Romo-Romo, Matthieu Roustit, Loic Briand, Grégory Meyer, Paloma Almeda-Valdes, Guillaume Walther, Sucralose and Cardiometabolic Health: Current Understanding from Receptors to Clinical Investigations, *Advances in Nutrition*, Volume 12, Issue 4, 2021, Pages 1500-1513».
- [47] «Analysis of Caloric and Noncaloric Sweeteners Present in Dairy Products Aimed at the School Market and Their Possible Effects on Health by Laura S. Briones-Avila †, Mara A. Moranchel-Hernández †, Daniela Moreno-Riolobos †, Taísa S. Silva Pereira ORCID, Ana E. Ortega Regules, Karen Villaseñor López and Laura M. Islas Romero * Health Sciences Department, Universidad de las Américas Puebla, UDLAP, Ex-Hacienda Santa Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula 72810,

- Mexico * Author to whom correspondence should be addressed. † These authors contributed equally to this work. *Nutrients* 2021».
- [48] «Hamed Shoorei, Mohammad Seify, Seyedeh Fahimeh Talebi, Jamal Majidpoor, Yeganeh Koohestanidehaghi, Majid Shokoohi, Different types of bisphenols alter ovarian steroidogenesis: Special attention to BPA, *Heliyon*, Volume 9, Issue 6, 2023».
- [49] «Paulina Jedynak, Lucile Broséus, Jörg Tost, Florence Busato, Stephan Gabet, Cathrine Thomsen, Amrit K. Sakhi, Isabelle Pin, Rémy Slama, Johanna Lepeule, Claire Philippat, Prenatal exposure to triclosan assessed in multiple urine samples and placental DNA methylation, *Environmental Pollution*, Volume 335, 2023».
- [50] «https://www.treccani.it/enciclopedia/diserbanti_%28Enciclopedia-Italiana%29/».
- [51] «Jiangtao Liu, Tingting Yang, Ying Li, Shulan Li, Yuanyuan Li, Shunqing Xu, Wei Xia, Associations of maternal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during early pregnancy with steroid hormones among one-month-old infants, *Science of The Total Environment*, Volume 912, 2024».
- [52] «<https://www.treccani.it/enciclopedia/fertilizzanti/>».
- [53] «Zhiyong Yu, Fen Jin, Jianying Hu, Xi Zhang, Jingfang Sun, Min Yang, An improved method for analyzing chlormequat and mepiquat in source waters by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, Volume 678, Issue 1, 2010, Pages 90-95».
- [54] «Sohini Singha Roy, Sujay Ghosh, Genes regulating wing patterning in *Drosophila melanogaster* show reduced expression under exposure of Daminozide, the fruit ripening retardant, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 75, 2020».
- [55] «Xiaoxia Wang, Weidong Hao, Reproductive and developmental toxicity of plant growth regulators in humans and animals, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volume 196, 2023».
- [56] «Barbara Benedetti, Matteo Baglietto, Henry MacKeown, Chiara Scapuzzi, Marina Di Carro, Emanuele Magi, An optimized processing method for polar organic chemical integrative samplers deployed in seawater: Toward a maximization of the analysis accuracy for trace emerging contaminants, *Journal of Chromatography A*, Volume 1677, 2022».
- [57] «Emanuele Magi, Marina Di Carro, Cristiana Mirasole, Barbara Benedetti, Combining passive sampling and tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceuticals and other emerging pollutants in drinking water, *Microchemical Journal*, Volume 136, 2018, Pages 56-60».
- [58] «Marina Di Carro, Luca Bono, Emanuele Magi, A simple recirculating flow system for the calibration of polar organic chemical integrative samplers (POCIS): Effect of flow rate on different water pollutants, *Talanta*, Volume 120, 2014, Pages 30-33».
- [59] «Alvarez, David A et al. “Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (2004) ».
- [60] Holler, Skoog e Crouch, *Chimica Analitica Strumentale*, 2009^a ed., vol. II. Edises.
- [61] «Anneli Kruve, Riin Rebane, Karin Kipper, Maarja-Liisa Oldekop, Hanno Evard, Koit Herodes, Pekka Ravio, Ivo Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I, *Analytica Chimica Acta*, Volume 870, 2015, Pages 29-44».
- [62] «Anneli Kruve, Riin Rebane, Karin Kipper, Maarja-Liisa Oldekop, Hanno Evard, Koit Herodes, Pekka Ravio, Ivo Leito, Tutorial review on validation of liquid

- chromatography–mass spectrometry methods: Part II, *Analytica Chimica Acta*, Volume 870, 2015, Pages 8-28».
- [63] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, e C. M. Chavez-Eng, «Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS», *Anal. Chem.*, vol. 75, fasc. 13, pp. 3019–3030, lug. 2003».
- [64] «Philipp Emnet, Sally Gaw, Grant Northcott, Bryan Storey, Lisa Graham, Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base, *Environmental Research*, Volume 136, 2015, Pages 331-342».
- [65] «S. Esteban, L. Moreno-Merino, R. Matellanes, M. Catalá, M. Gorga, M. Petrovic, M. López de Alda, D. Barceló, A. Silva, J.J. Durán, J. López-Martínez, Y. Valcárcel, Presence of endocrine disruptors in freshwater in the northern Antarctic Peninsula region, *Environmental Research*, Volume 147, 2016, Pages 179-192».
- [66] «Małgorzata Szopińska, Joanna Potapowicz, Katarzyna Jankowska, Aneta Luczkiewicz, Ola Svahn, Erland Björklund, Christina Nannou, Dimitra Lambropoulou, Żaneta Polkowska, Pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in Admiralty Bay as a result of untreated wastewater discharge: Status and possible environmental consequences, *Science of The Total Environment*, Volume 835, 2022».
- [67] N. Domínguez-Morueco *et al.*, «Anthropogenic contaminants in freshwater from the northern Antarctic Peninsula region», *Ambio*, vol. 50, fasc. 3, pp. 544–559, 2021.
- [68] S. González-Alonso *et al.*, «Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region», *Environ. Pollut.*, vol. 229, pp. 241–254, 2017.