



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Scienze ambientali
(LM-75)

Tesi di Laurea

Studio di microinquinanti emergenti in liquidi biologici

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Correlatrice

Dott.ssa Roberta Zangrando

Laureanda

Giulia Calcagno
Matricola 849165

Anno Accademico

2018 / 2019

PREMESSA E OBIETTIVI	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1. MICROINQUINANTI ORGANICI EMERGENTI.....	5
1.2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICA QUALITATIVA DELLE MATRICI PLASMA E URINA.....	8
1.3. INSETTICIDI NEONICOTINOIDI	11
1.4. BISFENOLO A (BPA)	14
1.5. PFAS.....	16
1.6. ANALISI STRUMENTALE	18
1.6.1. <i>Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni (HPLC)</i>	19
1.6.2. <i>Spettrometria di massa</i>	21
1.6.3. <i>L'interfaccia LC-MS e sorgente ionica</i>	21
1.6.5. <i>Lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL</i>	24
1.6.4. <i>Lo spettrometro di massa API 4000</i>	27
2. MATERIALI E METODI.....	29
2.1. STANDARD	29
2.2. SOLVENTI.....	30
2.3. ATTREZZATURA DI LABORATORIO	30
2.4. STRUMENTI ANALITICI	31
2.5. COLONNE CROMATOGRAFICHE	31
2.6. TRATTAMENTO PRELIMINARE DEL CAMPIONE	32
2.6.1. <i>La scelta dei campioni</i>	33
2.6.2. <i>Estrazione e purificazione</i>	35
2.6.3. <i>Riduzione del volume e concentrazione</i>	37
2.7. METODO ANALITICO IN HPLC-HRMS.....	39
2.8. METODI ANALITICI IN HPLC-MS/MS	41
2.8.1. <i>Metodo analitico per gli insetticidi neonicotinoidi</i>	41
2.8.2. <i>Metodo analitico per il bisfenolo A</i>	43
2.8.3. <i>Metodo analitico per i PFAS</i>	44
2.9. ELABORAZIONE DATI	47
2.9.1. <i>SIEVE</i>	47
2.9.2. <i>Xcalibur</i>	51
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	55
3.1. SUSPECT SCREENING: ELABORAZIONE DEI DATI E INDIVIDUAZIONE PUTATIVA DEI COMPOSTI	55
3.2. HPLC-MS/MS	59
3.1.1. <i>Insetticidi neonicotinoidi</i>	59
3.1.2. <i>Bisfenolo-a</i>	61
3.1.3. <i>PFAS</i>	62
3.2. HPLC-HRMS.....	65
4. CONCLUSIONI	72
5. BIBLIOGRAFIA	75
RINGRAZIAMENTI	79

Premessa e obiettivi

Negli ultimi anni, la comunità scientifica a livello internazionale ha manifestato una crescente attenzione per lo studio, nelle varie matrici ambientali, di una classe di sostanze indicata con il termine di “microinquinanti organici emergenti”.

Tale classe è formata da un insieme eterogeneo di sostanze, caratterizzate da concentrazioni ridotte e da scarse informazioni in merito ai rischi reali che presentano per l’ambiente e per la salute umana.

I microinquinanti organici emergenti provengono da varie fonti di origine antropica e sono distribuiti ubiquitariamente nell’ambiente in concentrazioni ridotte.

Nonostante negli ultimi anni siano stati compiuti significativi passi avanti nell’analisi di inquinanti in tracce, una vasta gamma di contaminanti emergenti di interesse ambientale deve ancora essere identificata e quantificata sia in alcune componenti ambientali che in tessuti e liquidi biologici.

Il presente lavoro di tesi, condotto in collaborazione tra l’Università Ca’ Foscari di Venezia, l’Istituto di Scienze Polari CNR e l’Ospedale Civile di Venezia, si inserisce in questo contesto con l’obiettivo di individuare diversi microinquinanti emergenti nei liquidi biologici e le loro implicazioni ambientali.

Lo studio si è articolato in tre fasi distinte:

- Una prima fase preanalitica di raccolta e trattamento del campione biologico presso i laboratori dell’Ospedale Civile di Venezia, sotto la supervisione della Dott.ssa L. Bartoloni.

Le persone oggetto di indagine sono state individuate e scelte opportunamente al fine di poter comprendere la distribuzione degli inquinanti tra la popolazione e soprattutto comprenderne le sorgenti, i processi di trasferimento e l’importanza ambientale.

A questa prima fase sono seguite le caratterizzazioni chimiche presso i laboratori di chimica analitica dell’Università Ca’ Foscari di Venezia e dell’ISP-CNR, sotto la supervisione del Prof. A. Gambaro e della Dott.ssa R. Zangrando, utilizzando tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa sia ad alta che a bassa risoluzione.

- Una seconda fase di ricerca e analisi qualitativa dei microinquinanti emergenti e di ulteriori contaminanti ambientali (*suspect screening*) su campioni di liquidi biologici provenienti da persone di diversa età e residenzialità.

- Una terza fase in cui, vista la presenza in laboratorio di metodi analitici strumentali specifici, è stata svolta un'analisi target mirata all'individuazione dei principali microinquinanti emergenti in liquidi biologici, quali: insetticidi neonicotinoidi, bisfenolo A (BPA) e composti perfluoroalchilici (PFAS).

In conclusione, a nostra conoscenza, questo rappresenta il primo studio con lo scopo di indagare la presenza di numerosi inquinanti presenti in diversi fluidi corporei e di tentare di comprenderne l'origine e il destino ambientale mediante analisi sull'essere umano. Finora questi studi si sono concentrati su campioni ambientali, mentre gli studi di biomonitoraggio umano si sono concentrati su un numero esiguo di analiti con proprietà simili (Plassmann, et al., 2015).

1. Introduzione

1.1. Microinquinanti organici emergenti

Recentemente la comunità scientifica ha orientato la ricerca verso lo studio e il monitoraggio di una classe di sostanze nota come “microinquinanti organici emergenti”.

Il termine microinquinanti organici emergenti trae origine dall'associazione di due aspetti chiave che accomunano un gruppo eterogeneo di sostanze.

Tali sostanze vengono definite *microinquinanti* in quanto caratterizzate, all'interno dei comparti ambientali, da ridotte concentrazioni (nell'ordine dei $\mu\text{g L}^{-1}$ o dei ng L^{-1}) e vengono definite *emergenti* in quanto, a differenza degli inquinanti convenzionali, la comunità scientifica dispone di ridotte informazioni circa i loro effetti negativi su ambiente e organismi viventi e ciò li rende difficilmente inquadrabili in un adeguato contesto normativo.

In particolare, rientrano nella definizione di microinquinanti organici emergenti una vasta gamma di composti chimici artificiali, tra i quali pesticidi, prodotti farmaceutici ad uso umano e veterinario, sostanze d'abuso, interferenti endocrini e prodotti per l'igiene personale e per la cura della casa.

Questi composti vengono prodotti in grandi quantità e sono utilizzati in tutto il mondo, in quanto oramai risultano essere indispensabili per la società moderna.

Il WWF afferma che tra gli anni '30 del secolo scorso e l'inizio di questo, la produzione globale di prodotti chimici antropogenici è aumentata da 1 ad oltre 400 milioni di tonnellate l'anno e, nonostante nessuno metta in dubbio i significativi benefici che questi prodotti hanno portato alla società, risulta altrettanto chiaro che alcuni di questi prodotti stiano danneggiando l'ambiente e il biota stesso. Ancora più drammatico risulta il fatto che di questi contaminanti non si conoscano a fondo gli effetti a lungo termine (WWF, TOXIC CHEMICALS).

I microinquinanti organici emergenti rappresentano un gruppo relativamente nuovo di contaminanti che fino a poco tempo fa non erano regolati da alcun quadro normativo.

È stato lo sviluppo della strumentazione analitica che ha permesso di investigare la presenza, a livello di tracce, di questi contaminanti.

Il potenziale impatto ambientale e il rischio per la salute umana causati da questi contaminanti emergenti sono un argomento importante che attualmente riveste interesse per la comunità scientifica.

In quest'ottica la Decisione di Esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione, in attuazione della Direttiva 2008/105/CE, ha istituito un elenco di controllo (*Watch List*) delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello europeo per gli ambienti acquatici.

Successivamente, con la Decisione di Esecuzione (UE) 2018/840 della Commissione, l'elenco di controllo è stato aggiornato con l'aggiunta di altre sostanze.

Oltre alle sostanze presenti nella *Watch List*, ulteriori inquinanti emergenti hanno recentemente destato preoccupazione a causa dei possibili effetti dovuti alla loro presenza nell'ambiente, tra questi emergono in particolare il bisfenolo A (BPA) e i composti perfluoroalchilici (PFAS).

La Tabella 1.1 presenta l'elenco dei contaminanti emergenti sottoposti a monitoraggio a livello europeo.

Tabella 1.1 Elenco di controllo delle sostanze sottoposte a monitoraggio, con l'aggiunta di bisfenolo A e PFAS.

Sostanza o gruppo di sostanze	N° CAS	N° UE	Tipologia/Utilizzo	Watch List
17-alfa-Etinilestradiolo (EE2)	57-63-6	200-342-2	Estrogeno di sintesi	2015
17-beta-Estradiolo (E2)	50-28-2	200-023-8	Estrogeno naturale	2015
Estrone (E1)	53-16-7		Estrogeno naturale	2015
Diclofenac	15307-86-5	239-348-5	Sostanza farmaceutica	2015
2,6-di-terz-butil-4-metilfenolo (BHT)	128-37-0	204-881-4	Antiossidante	2015
4-metossicinnamato di 2-etilesele (EHMC)	5466-77-3	226-775-7	Filtro UV	2015
Antibiotici macrolidi:			Sostanze farmaceutiche	2015
• Eritromicina	114-07-8	204-040-1		
• Claritromicina	81103-11-9			
• Azitromicina	83905-01-5	617-500-5		
Metiocarb	2032-65-7	217-991-2	Insetticida	2015
Insetticidi neonicotinoidi:			Insetticidi	2015
• Acetamiprid	135410-20-7			
• Clotianidin	210880-92-5	433-460-1		
• Imidacloprid	105827-78-9	428-040-8		
• Thiacloprid	111988-49-9			
• Thiametoxam	153719-23-4	428-650-4		
Ossadiazone	19666-30-9	243-215-7	Erbicida	2015
Tri-allato	2303-17-5	218-962-7	Erbicida	2015
Metaflumizone	139968-49-3	604-167-6		2018
Amoxicillina	26787-78-0	248-033-8	Sostanza farmaceutica	2018
Ciprofloxacina	85721-33-1	617-751-0	Sostanza farmaceutica	2018
Bisfenolo A	85-05-7		Composto industriale	/
Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS)			Composti industriali	/

Le Decisioni UE 2015/495 e 2018/840 indicano per la stragrande maggioranza di questi contaminanti che il metodo analitico da preferire per l'analisi è di tipo LC-MS/MS e la preparazione del campione che offre i migliori risultati utilizza una SPE (*Solid Phase Extraction*). La maggior parte dei metodi analitici presenti e disponibili in letteratura soddisfa tali disposizioni (Hernández, et al., 2005) (Zhang, et al., 2018) (Buscher, et al., 2015).

Generalmente questi contaminanti sono bioattivi e biocumulativi e possono essere mobili e persistenti in acqua, aria, suolo, sedimenti e recettori ecologici anche a basse concentrazioni (Gavrilescu, et al., 2015).

Tra questi contaminanti, per l'analisi target sono state scelte 3 classi di composti, quali insetticidi neonicotinoidi, bisfenolo A e PFAS.

In questo studio, oltre a queste tre classi principali di contaminanti emergenti, è stato ritenuto interessante allargare la ricerca e comprendere ulteriori sostanze, considerate anch'esse contaminanti, che destano preoccupazione a causa dei possibili effetti dovuti alla loro presenza nell'ambiente.

1.2. Caratterizzazione chimica qualitativa delle matrici plasma e urina

Lo scopo principale del presente lavoro di tesi è la caratterizzazione qualitativa delle matrici plasma e urina mediante analisi HPLC-HRMS. Tale caratterizzazione è volta all'individuazione dei principali microinquinanti organici emergenti all'interno dei fluidi biologici.

Poiché ogni giorno ogni singolo individuo interagisce con l'ambiente che lo circonda, risulta chiaro come possa essere facile entrare in contatto con le sostanze più diverse. Infatti, sono numerosi i prodotti chimici che attualmente vengono utilizzati a livello commerciale e molti di questi possono essere presenti, più o meno intenzionalmente, negli alimenti e nei prodotti di consumo o possono essere rilasciati nell'ambiente. Come conseguenza, gli esseri umani sono esposti a queste sostanze chimiche tramite assorbimento cutaneo, orale o inalatorio (Plassmann, et al., 2015).

A tal proposito è stato ritenuto interessante non limitarsi solamente alla ricerca dei microinquinanti organici emergenti, ma allargare lo studio ad altre classi di contaminanti.

È stata condotta, pertanto, un'analisi qualitativa a largo spettro (*untargeted HR-MS/MS analysis*), mediante la tecnica analitica HPLC-HRMS, che consente di affrontare le sfide poste dall'analisi di una miscela complessa e andare quindi a studiare la presenza di tutti i numerosi composti (target, sospetti e non target) presenti nei campioni. L'obiettivo principale di tale analisi è appunto la rilevazione del maggior numero possibile di contaminanti presenti nei campioni e, quando possibile, la loro identificazione.

Un'identificazione affidabile richiede sia un elevato potere risolvete sia un'elevata precisione spettrale al fine di aumentare la selettività sullo sfondo della matrice e di ottenere una corretta assegnazione della formula molecolare (Krauss, et al., 2010).

La ricerca dei contaminanti presentati in questa sezione va sotto il nome di analisi dei sospetti (*suspect screening*), in quanto la massa esatta dello ione corrispondente al composto d'interesse e il pattern isotopico vengono calcolati a partire dalla formula molecolare della sostanza sospetta e possono essere utilizzati per individuare tale sostanza nel campione (Schymanski, et al., 2015).

L'approccio dell'analisi dei sospetti infatti non si basa sugli standard di riferimento per l'identificazione, ma sulle informazioni disponibili per tali composti come la formula e la struttura molecolare e la massa esatta, che possono essere utilizzate in modo efficiente nel processo di identificazione e conferma (Krauss, et al., 2010).

A tal fine, nei laboratori dell'Università era già stato sviluppato un database (libreria) contenente un elenco di contaminanti di interesse che è stato successivamente ampliato, nel corso di questo lavoro di tesi per adattarlo allo scopo del presente progetto. Tale libreria è stata costruita raccogliendo le informazioni da numerosi studi presenti in letteratura.

L'elenco comprende 1164 sostanze, raccolte in famiglie, come pesticidi, sostanze farmaceutiche, composti industriali, conservanti, fragranze, composti naturali e alcuni dei loro rispettivi metaboliti, e le rispettive informazioni (formule molecolari e masse esatte).

In parallelo, al fine di integrare i dati ottenuti da questa caratterizzazione qualitativa a largo spettro e poiché in laboratorio erano già presenti i metodi strumentali HPLC-MS/MS, è stata condotta anche un'analisi target.

L'analisi di specifici microinquinanti, quali, in questo caso, insetticidi neonicotinoidi, bisfenolo A e PFAS, pertanto, risulta essere un'analisi target in quanto coinvolge degli standard di riferimento, che vengono misurati nelle stesse condizioni analitiche in modo da poter identificare gli analiti con sicurezza (Schymanski, et al., 2015).

La Figura 1.1 illustra la strategia di identificazione che va seguita in un'analisi untargeted HRMS.

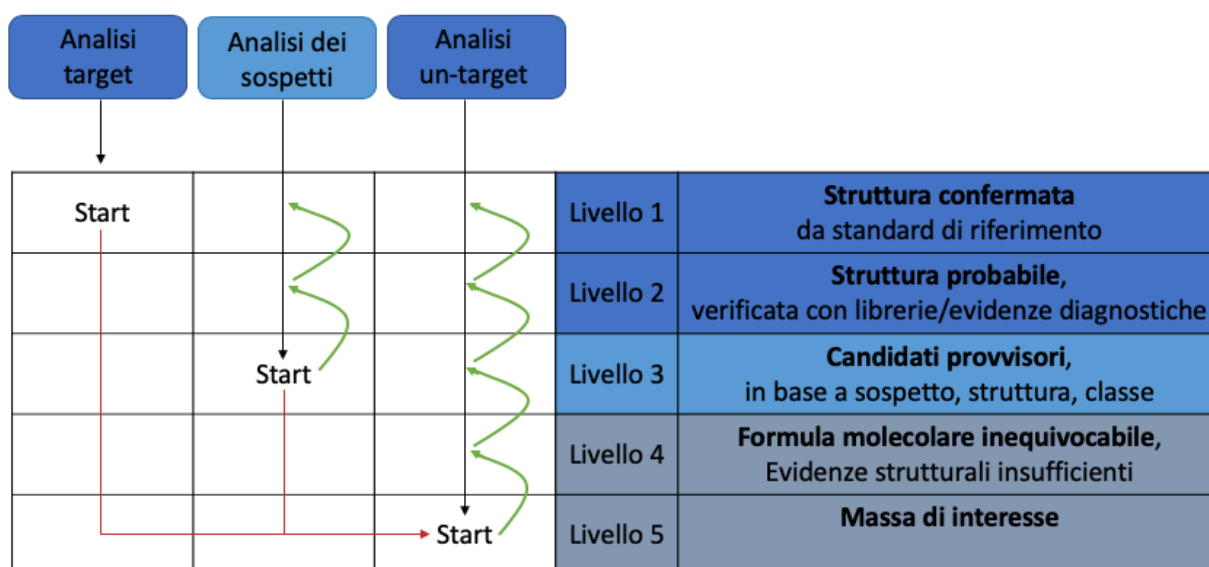


Figura 1.1: Approccio nell'identificazione dei composti (Schymanski, et al., 2015).

Come mostra la figura 1.1, i composti target partono direttamente dal Livello 1, in quanto sono disponibili gli standard di riferimento; i sospetti sono candidati sperimentali, attribuiti putativamente e partono dal Livello 3, le evidenze si basano principalmente sulla struttura del composto in esame; e i composti untarget partono dal Livello 5, in quanto non sono disponibili informazioni su di essi.

Se sono fruibili e reperibili sufficienti informazioni (massa esatta, addotto, tempo di ritenzione, frammentazione) i composti sospetti e untarget possono acquisire confidenza e salire di livello.

I composti con un'identità confermata diventano quindi composti target in indagini future.

1.3. Insetticidi neonicotinoidi

Gli insetticidi neonicotinoidi, da quando sono stati introdotti nel mercato dei pesticidi agli inizi degli anni '90, risultano essere tra gli insetticidi più utilizzati al mondo (Yamamoto, 1999).

Questi insetticidi di nuova generazione hanno un largo impiego nella lotta al controllo degli insetti parassiti nella coltivazione di frutta e verdura, negli ambienti residenziali, ma anche come trattamento topico sugli animali domestici per l'eliminazione delle pulci.

È stato stimato che nel 2008 gli insetticidi neonicotinoidi rappresentavano oltre il 20% del mercato mondiale dei pesticidi, per un totale di € 6.633.000.000 (Jeschke, et al., 2011), un trend che risulta essere crescente, dal momento che nel 2014 questo valore è salito oltre il 25% (Bass, et al., 2015).

Il loro nome deriva dalla somiglianza della loro struttura molecolare a quella della nicotina, un insetticida naturale (Figura 1.2).

Con la nicotina condividono anche il meccanismo d'azione, infatti, esplicano un'azione insetticida grazie all'attività agonista esercitata sui recettori postsinaptici nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs) degli insetti parassiti (Kimura-Kuroda, 2012).

In altre parole, agiscono sul sistema nervoso centrale degli insetti, alterandolo, causando l'eccitazione dei nervi, dei deficit neurocomportamentali e una paralisi che porta alla morte.

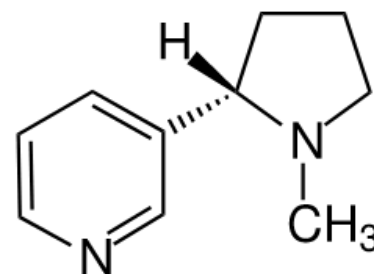


Figura 1.2: Struttura molecolare della nicotina.

I principali vantaggi che hanno reso i neonicotinoidi degli insetticidi così utilizzati risiedono nella loro tossicità selettiva verso gli insetti parassiti, con un correlato basso rischio per l'uomo e per gli altri mammiferi, e la loro elevata efficacia (Rose, 2012).

La selettività verso i nAChRs degli insetti sembra essere dovuta alla zona carica negativamente del gruppo nitro o ciano presente nei neonicotinoidi stessi. Nei recettori nicotinici dell'acetilcolina degli insetti, la zona dove si andrebbero a posizionare i gruppi carichi negativamente dei neonicotinoidi è carica positivamente, in quanto presenta residui cationici di amminoacidi, e ciò consente il loro attacco. Al contrario nei recettori nicotinici dell'acetilcolina dei mammiferi, la zona dove si andrebbero a posizionare i gruppi carichi negativamente dei

neonicotinoidi è anch'essa carica negativamente e pertanto causa la repulsione dei neonicotinoidi stessi.

Inoltre, poiché si legano e vanno ad agire su un sito specifico, non sviluppano problemi di resistenza da parte degli insetti al loro meccanismo d'azione al contrario di quanto invece accade per altri insetticidi, come i carbammati, gli organofosfati o gli insetticidi piretroidi sintetici.

Lo sviluppo, a partire dalla struttura chimica della nicotina, di composti cloronicotinilici, caratterizzati dalla presenza nella molecola di un gruppo cloropiridinilico, ha rappresentato la nascita della prima generazione di insetticidi neonicotinoidi. A questa categoria appartengono l'imidacloprid, l'acetamiprid e il thiacloprid.

Questi sono stati successivamente seguiti dallo sviluppo di composti clorotiazolilici, caratterizzati dalla presenza nella molecola di un gruppo clorotiazolico, che vanno a costituire la seconda generazione di neonicotinoidi. A questa seconda categoria appartengono il thiamethoxam e il clothianidin (Figura 1.3).

L'imidacloprid è stato il primo dei neonicotinoidi agli inizi degli anni '90 ad essere registrato per l'utilizzo contro gli insetti parassiti negli Stati Uniti (Fishel, 2019).

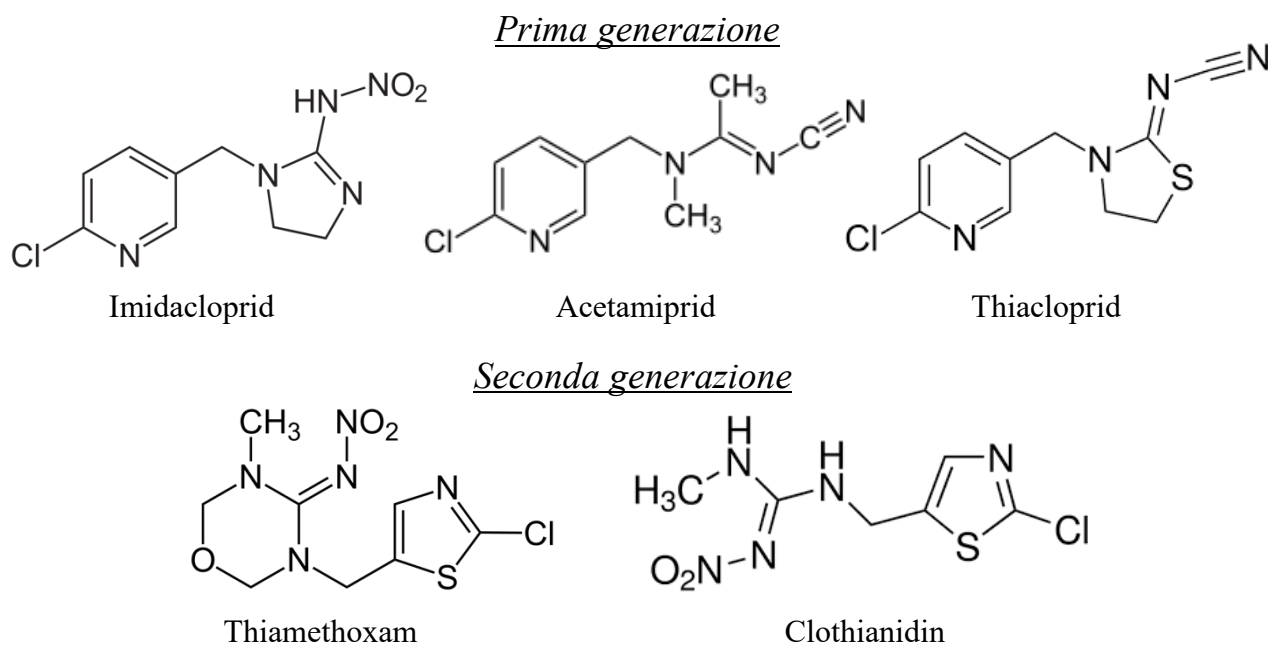


Figura 1.3: Struttura molecolare dei principali insetticidi neonicotinoidi.

I principi attivi neonicotinoidi vengono comunemente applicati su semi, come concianti; su suoli coltivati, prati e frutteti mediante irrorazione o irrigazione a goccia; su strutture in legno, per la disinfestazione dalle termiti; e infine su animali domestici, per la protezione dalle pulci.

Poiché i neonicotinoidi sono una classe di insetticidi sistemici, essi sono altamente solubili e sono inclini ad essere assorbiti e distribuiti attraverso l'apparato xilematico in tutti i tessuti della pianta, compresi quelli del fiore, del polline e del frutto (Sánchez-Bayo, 2014). Questo è il motivo per cui i neonicotinoidi vengono ampiamente utilizzati nel trattamento delle sementi. Tuttavia, è anche il motivo per cui aumenta la probabilità di una contaminazione ambientale e l'esposizione di organismi non-target (Han, et al., 2018).

Data la loro bassissima volatilità, la loro presenza nell'ambiente si può riscontrare nei suoli, nelle acque e negli eventuali esseri viventi con cui sono entrati in contatto.

Inoltre, la persistenza di questi principi attivi nell'ambiente è moderatamente lunga.

L'uomo può essere esposto ai neonicotinoidi tramite ingestione, inalazione o contatto diretto (Zhang, et al., 2018).

I neonicotinoidi, a causa della loro proprietà sistemica, non riescono ad essere rimossi mediante lavaggio dalla frutta e verdura che vengono raccolte da piante trattate. Pertanto, l'ingestione di neonicotinoidi dal consumo di frutta e verdura, molto probabilmente, rappresenta la via di esposizione primaria per l'uomo.

Inoltre, a differenza di altri insetticidi, il carattere idrofilo dei neonicotinoidi potrebbe portare ad un'esposizione all'ingestione attraverso acqua potabile contaminata. Ciò è particolarmente probabile se le fonti di approvvigionamento idrico sono vicine a terreni agricoli in cui i neonicotinoidi vengono frequentemente applicati mediante semina di semi concianti, irrorazione diretta o irrigazione.

Sempre a causa della loro proprietà sistemica, i neonicotinoidi si distribuiscono dalla pianta anche nel polline e, con esso, si disperdono in aria grazie al vento o agli impollinatori. Ciò significa che, nel momento in cui il polline viene trasportato in aria, i neonicotinoidi potrebbero essere inalati dall'uomo e assorbiti nelle vie respiratorie e nei polmoni umidi a causa della loro elevata solubilità.

I neonicotinoidi vengono metabolizzati velocemente all'interno dei fluidi corporei, formando numerosi metaboliti, più o meno tossici.

1.4. Bisfenolo A (BPA)

Bisfenolo A, solitamente abbreviato in BPA, è il nome comune che viene normalmente utilizzato per il 2,2-(4,4-diidrossifenil)propano (Figura 1.4).

È un composto organico che presenta due gruppi fenolici vicinali.

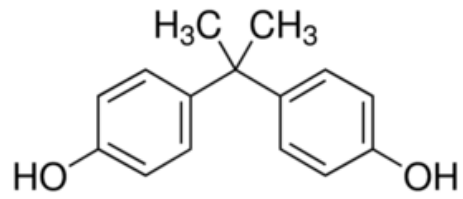


Figura 1.4: Struttura molecolare del bisfenolo A

La sintesi del bisfenolo A è stata scoperta nel 1891 dal russo Dianin A. P (Dianin, 1891).

Viene sintetizzato attraverso la condensazione dell'acetone, da cui il suffisso A nel nome comune, con due equivalenti di fenolo. Tale reazione è catalizzata da un acido.

Il metodo di sintesi è molto efficiente, con il solo sottoprodotto di acqua.

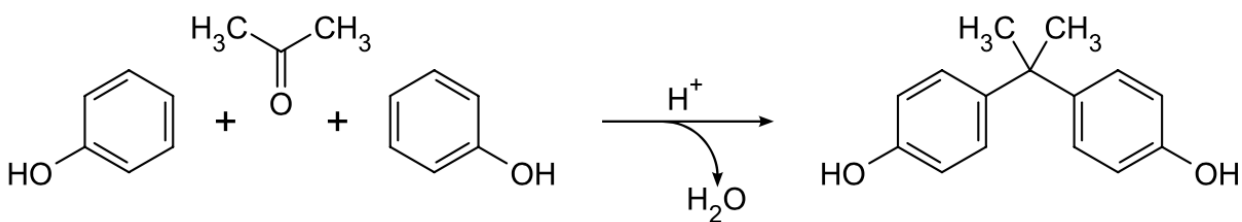


Figura 1.5: Processo di sintesi del BPA

Attualmente la produzione annuale di BPA ha raggiunto 7.7 milioni di tonnellate (Industry Experts, 2016), pertanto è un composto ad alto volume di produzione.

Fin dai primi anni '50, è stato utilizzato nell'industria come importante monomero nella sintesi di resine epossidiche, policarbonati, polisulfonati e poliuretani (Vogel, 2009).

I policarbonati vengono utilizzati per produrre recipienti per uso alimentare (bottiglie, stoviglie in plastica e contenitori), giochi per bambini, lenti per occhiali e altri prodotti per l'uso quotidiano.

Le resine epossidiche vengono utilizzate nella produzione di pellicole e rivestimenti interni di lattine per alimenti e bevande.

Il 17 giugno 2017 ad Helsinki, il Comitato degli Stati Membri (MSC) dell'ECHA (*European Chemical Agency*) ha classificato il BPA come una SVHC (*Substance of Very High Concern*) sulla base delle sue proprietà di interferente endocrino ambientale, che possono causare effetti negativi sulla salute umana, come l'interferenza con il sistema riproduttivo.

L'esposizione al BPA è da considerarsi ubiquitaria e persistente e, se esposti ad elevate dosi, può causare seri danni alla salute umana: può aumentare il rischio cancerogeno, alterazioni cardiovascolari e il diabete.

È stato dimostrato che il BPA, in normali condizioni d'uso, fuoriesce dai prodotti che lo contengono, in quanto il legame chimico tra le varie molecole è altamente instabile, migrando in questo modo in cibi e bevande. Tali studi hanno dimostrato anche che il BPA può essere misurato nei fluidi biologici umani, come nel siero, nelle urine, nel liquido amniotico, nel fluido follicolare e nel sangue del cordone ombelicale (Vandenberg, et al., 2007).

È stato riportato che la media dei livelli di BPA nelle urine di diverse popolazioni varia tra 0.11 e 3.2 ng mL⁻¹, con un tasso di rilevamento del 52 - 100%, mentre nel siero varia tra 0 e 2.5 ng mL⁻¹ (Vandenberg, et al., 2007).

Comunque, in seguito all'esposizione, il corpo umano lo metabolizza ed elimina velocemente.

Nonostante l'esposizione principale a tale sostanza avvenga per ingestione attraverso la dieta, in piccola misura può avvenire anche per inalazione e per assorbimento cutaneo.

La più completa e recente valutazione effettuata sull'esposizione dell'uomo al BPA e alla sua tossicità è stata pubblicata dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) nel 2015. Gli esperti hanno concluso che, ai livelli attuali di esposizione, il BPA non rappresenta alcun rischio per la salute umana. Infatti, l'esposizione media (per ingestione, inalazione e/o assorbimento cutaneo) è ben al di sotto del livello di sicurezza (4 µg Kg⁻¹ di peso corporeo al giorno) (EFSA, 2015).

1.5. PFAS

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche, note con l'acronimo di PFAS, sono un gruppo di sostanze chimiche di sintesi in uso dagli anni '50.

Sono composti organici formati da una catena alchilica di lunghezza variabile (generalmente da 4 a 16 atomi di carbonio) totalmente fluorurata e da un gruppo funzionale idrofilico (generalmente un acido carbossilico o solfonico).

Le due molecole più conosciute di questa famiglia sono l'acido perfluorooctanoico (PFOA) e l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS).

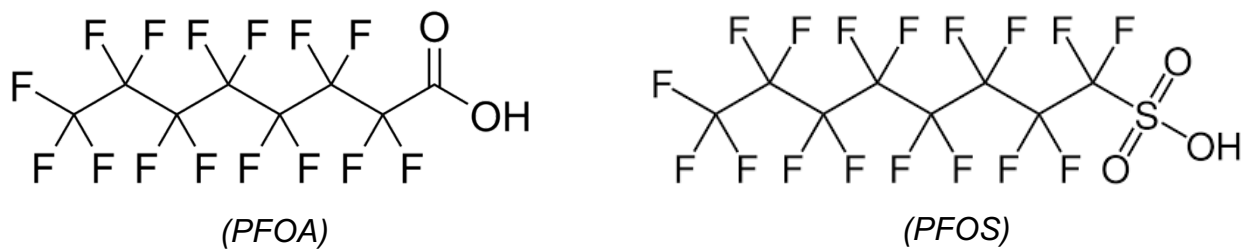


Figura 1.6: Le due molecole più studiate e utilizzate di PFAS. A sinistra l'acido perfluorooctanoico (PFOA) e a destra l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS).

La presenza dei numerosi legami carbonio-fluoro, che presentano una forte energia di legame, conferisce a questi composti particolari caratteristiche fisico-chimiche come la stabilità termica e chimica, la repellenza all'acqua e ai grassi e la tensioattività che li rendono versatili in un'ampia gamma di applicazioni industriali e prodotti di largo consumo (Buck, et al., 2011).

Sono stati utilizzati come emulsionanti e tensioattivi in prodotti per la pulizia, nella formulazione di insetticidi, in rivestimenti protettivi, schiume antincendio e vernici. Sono impiegati anche nella produzione di capi d'abbigliamento impermeabili, nella concia delle pelli, in prodotti per stampanti e pellicole fotografiche.

I PFAS inoltre vengono utilizzati nei rivestimenti dei contenitori per gli alimenti, come ad esempio nei cartoni delle pizze d'asporto e nella produzione di PTFE.

Molti fattori contribuiscono al rilascio di PFAS nell'aria, nel suolo e nell'acqua, tra questi spiccano le emissioni delle strutture di produzione e lavorazione dei PFAS, le operazioni di smaltimento e il rilascio da parte dei prodotti che li contengono.

Come conseguenza alla produzione estensiva, al loro utilizzo diffuso, alle loro peculiari caratteristiche fisico-chimiche e pertanto alla loro persistenza nell'ambiente, questi composti

sono spesso stati rilevati, anche in concentrazioni significative, in campioni ambientali e in organismi viventi, incluso l'uomo.

È stato dimostrato che una continua esposizione ai PFAS, al di sopra di determinati livelli, può portare ad effetti negativi sulla salute (USEPA, 2016).

Una volta nell'organismo i PFAS hanno un'emivita piuttosto lunga: vanno ad accumularsi principalmente nel sangue e nel fegato e possono provocare problemi di epatotossicità, immunotossicità, neurotossicità, ma anche alterazioni ormonali nella riproduzione e nello sviluppo (EFSA, 2011).

La principale fonte di esposizione per l'uomo è l'ingestione per mezzo della dieta, ma vi sono altre due fonti di esposizione altrettanto importanti, l'acqua potabile e l'aria.

Nel 2009 il PFOS è stato inserito nell'allegato B della Convenzione di Stoccolma che elenca le sostanze soggette a limitazioni per la produzione e per l'utilizzo. Il PFOS è stato classificato come POP (*Persistent Organic Pollutants*), data la sua diffusa presenza, tossicità e capacità di persistere nell'ambiente e negli organismi viventi (Wang, et al., 2010).

Pertanto, le sostanze per- e polifluoroalchiliche sono considerate oggi come sostanze chimiche di interesse emergente, in parte a causa della loro persistenza ambientale e biologica e in parte a causa del loro potenziale per un'esposizione umana diffusa (Worley, et al., 2017).

1.6. Analisi strumentale

Nel presente lavoro di tesi le analisi sono state effettuate utilizzando tecniche analitiche ifenate. La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è stata accoppiata con due diversi spettrometri di massa, nel ruolo di analizzatori:

- Triplo quadrupolo (API 4000, Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada)
- Orbitrap (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific, Germania)

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa è la tecnica analitica principale utilizzata per l'analisi dei microinquinanti emergenti; sfrutta i pregi delle due tecniche ottimizzandone i risultati: la cromatografia liquida permette la separazione delle singole componenti di una miscela complessa e la spettrometria di massa le analizza una per volta.

Per questo è una tecnica molto sensibile e selettiva.

Sono stati utilizzati due spettrometri di massa diversi, uno ad alta e uno a bassa risoluzione.

L'LTQ Orbitrap XL, spettrometro di massa ad alta risoluzione è composto non da uno, ma da due distinti analizzatori: orbitrap e trappola ionica lineare. I punti di forza di tale strumento risiedono appunto nell'alta risoluzione (fino a 100000) e nell'elevata accuratezza di massa (<2 ppm).

LTQ Orbitrap XL inoltre permette la frammentazione degli ioni precursori, fornendo così utili informazioni strutturali sugli analiti stessi.

L'API 4000, spettrometro di massa con rivelatore a triplo quadrupolo, è stato utilizzato con lo scopo di svolgere un'analisi target per indagare la presenza specificatamente di analiti, quali insetticidi neonicotinoidi, bisfenolo A e PFAS.

Focalizzandosi solo su specifici analiti, il triplo quadrupolo è in grado, grazie alla sua elevata sensibilità e selettività, di andare ad individuarli all'interno di matrici complesse come quelle in esame.

1.6.1. Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni (HPLC)

La cromatografia è una tecnica analitica strumentale che permette la separazione delle singole componenti di un campione sulla base della loro diversa interazione con una fase mobile e una fase stazionaria, all'interno di una colonna cromatografica.

L'interazione con le fasi mobile e stazionaria permette agli analiti di eluire in tempi differenti. È indispensabile che gli analiti siano solubili nella fase mobile liquida.

La fase stazionaria è costituita da particelle solide impaccate, di granulometria molto fine (1.8-10 μm) ed è alloggiata all'interno di una colonna, adatta a sopportare le alte pressioni a cui lavora lo strumento.

La fase mobile può essere costituita da un liquido puro o da una miscela di solventi a composizione nota e viene fatta fluire attraverso la fase stazionaria della colonna cromatografica. Lo strumento opera in condizioni di alta pressione e in un range di temperature che varia tra 20°C e 80°C.

La circolazione della fase mobile all'interno della colonna avviene grazie alla presenza di un sistema di pompaggio. La velocità di flusso è costante ed è generalmente compresa tra 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ e 5 mL min^{-1} , in base al diametro della colonna.

L'eluizione della fase mobile può essere isocratica, se durante l'intera corsa cromatografica la composizione della fase mobile rimane costante, o a gradiente, se le quantità relative dei solventi variano nel corso dell'analisi.

Il tempo di eluizione dei diversi composti presenti nel campione è dato dalle loro diverse caratteristiche chimiche: analiti che presentano poca affinità con la fase stazionaria non vengono trattenuti e perciò escono molto velocemente trasportati dalla fase mobile; mentre analiti che presentano un'affinità maggiore con la fase stazionaria vengono trattenuti ed usciranno in tempi più lunghi.

In uscita alla colonna è presente un detector che, collegato ad un computer, acquisisce ed elabora il dato analitico, restituendo un cromatogramma.

Per il presente lavoro di tesi, sono stati utilizzati due diversi cromatografi liquidi ad alte prestazioni:

- HPLC Agilent Serie 1100, accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX)
- UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific Dionex), accoppiato allo spettrometro LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)



Figura 1.7: A sinistra immagine di un HPLC Agilent Serie 1100 e a destra immagine di un UHPLC UltiMate 3000.

I due cromatografi presentano componenti simili, infatti sono entrambi costituiti da un serbatoio per i solventi della fase mobile, da un sistema degaser finalizzato all'eliminazione delle eventuali bolle presenti nei solventi, da una pompa, da un autocampionatore e da un vano termostato per l'alloggiamento della colonna cromatografica.

1.6.2. Spettrometria di massa

La tecnica analitica strumentale chiamata spettrometria di massa consente di separare gli ioni contenuti in una miscela complessa, ottenuti precedentemente tramite ionizzazione degli analiti, in base al loro rapporto m/z .

Le componenti principali di uno spettrometro di massa, schematizzate in Figura 1.8, sono:

- la sorgente, nella quale avvengono la volatilizzazione e la ionizzazione degli analiti;
- l'analizzatore che separa gli ioni prodotti nella sorgente in base al loro rapporto m/z ;
- il detector che rileva gli ioni in uscita dall'analizzatore e attraverso l'emissione secondaria di elettroni genera un segnale elettrico che andrà poi a produrre lo spettro di massa.

Affinché gli ioni riescano a spostarsi all'interno dello strumento, al suo interno deve essere garantito il vuoto attraverso un sistema di pompaggio.



Figura 1.8: Schema generale di uno spettrometro di massa.

1.6.3. L'interfaccia LC-MS e sorgente ionica

Per molto tempo, l'interfacciamento di un HPLC con uno spettrometro di massa ha rappresentato un grande problema a causa della natura liquida dell'eluente e delle diverse pressioni di esercizio presenti in sorgente e nell'analizzatore, dovute alla necessità di quest'ultimo di lavorare sottovuoto.

Negli anni '90, con lo sviluppo delle sorgenti API (Atmospheric Pressure Ionisation) il problema è stato risolto: queste infatti sono in grado di ionizzare gli analiti e rimuovere completamente l'eluente in un sistema a pressione atmosferica e costituiscono un'interfaccia capace di trasmettere gli ioni all'analizzatore senza perturbarne il vuoto.

Le sorgenti API si dividono in 3 tipologie: la sorgente ESI (ElectroSpray Ionisation), la sorgente APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) e la sorgente APPI (Atmospheric Pressure Photo Ionisation).

Per l'analisi dei contaminanti ricercati in questo lavoro di tesi è stata utilizzata una sorgente ESI, che risulta la sorgente più indicata per tali tipologie di analiti (Krauss, et al., 2010). Inoltre, in generale, la ESI è la sorgente più efficiente per un numero molto ampio di composti che si presentano già in forma ionizzata o facilmente ionizzabile all'interno di una soluzione.

La sorgente ESI utilizza una tecnica di ionizzazione e di volatilizzazione per elettro-nebulizzazione a pressione atmosferica: essa converte ioni presenti in soluzione in ioni in fase gassosa.

La soluzione contenente gli analiti separati in colonna fluisce all'interno della sorgente attraverso un capillare metallico, chiamato *needle*, al quale è applicato un elevato potenziale elettrico positivo o negativo.

Un flusso di gas, coassiale al capillare, ha la funzione di nebulizzare la soluzione alla sua uscita dal capillare. Si forma così un sottile aerosol, uno spray costituito da gocce cariche dal diametro di qualche micron, che sono attratte verso l'apertura posta sul controlettrodo, che cattura gli ioni e li introduce nello spettrometro (Silverstein, et al., 2016).

La desolvatazione dello spray avviene nello spazio compreso tra l'uscita del *needle* e il controlettrodo ed è favorita dalla temperatura della sorgente e dal flusso di un gas controcorrente ausiliario che ha il compito di assistere il gas coassiale nell'evaporazione del solvente e di mantenere il vuoto all'interno dello spettrometro.

La progressiva diminuzione del volume delle goccioline porta ad un aumento della densità di carica superficiale. Tale processo persiste fino al raggiungimento del "limite di Rayleigh", in cui la tensione superficiale della goccia non è più in grado di sopportare la repulsione coulombiana fra le cariche e si ha la disgregazione delle gocce in singoli ioni (esplosione di Coulomb). Questo meccanismo si ripete fino a che tutto il solvente è evaporato e gli ioni si sono completamente volatilizzati (Skoog, et al., 2009).

Lo schema del processo di ionizzazione e volatilizzazione di una sorgente ESI è riportato in Figura 1.9.

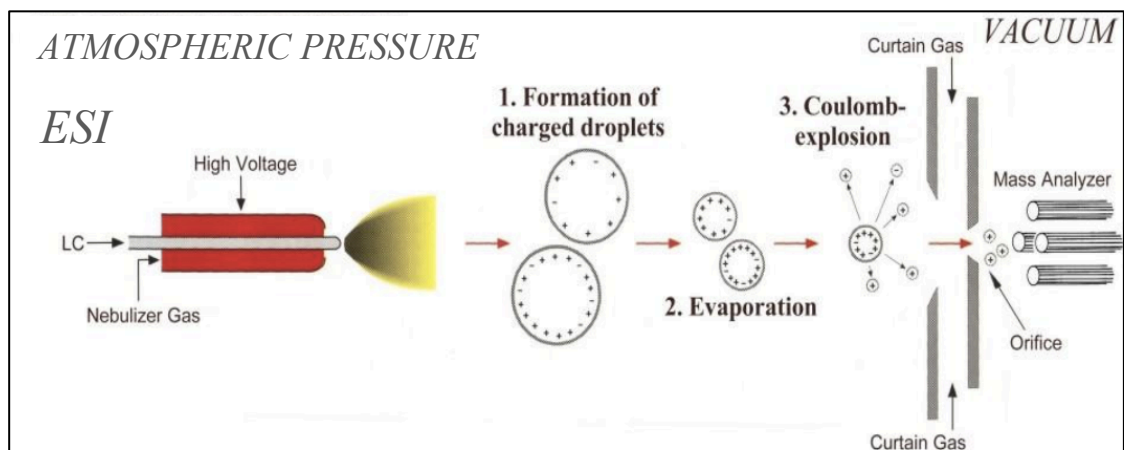


Figura 1.9: Schema di una sorgente ESI.

Le sorgenti ESI utilizzate nell'LTQ Orbitrap XL e nell'API 4000 hanno caratteristiche costruttive diverse.

Il *probe* della sorgente ESI dell'LTQ Orbitrap XL è posto a 60° rispetto all'asse dell'analizzatore. Gli ioni formati all'interno della sorgente sono attirati dentro un capillare in metallo riscaldato, al fine di abbattere i neutri che entrano e di far evaporare i residui di solvente.

Il *probe* nella sorgente ESI dell'API 4000, invece, è posto a 90° rispetto all'asse in cui si trova l'analizzatore. La geometria di questa disposizione incrementa la sensibilità e riduce il rumore chimico (AB SCIEX, 2010).

In questo modo i neutri cadono direttamente nel condotto di scarico.

Inoltre, con un'angolazione di 45° rispetto al *probe*, sono inseriti due getti "turbo heaters" che immettono in sorgente gas riscaldato con lo scopo di accelerare l'evaporazione del solvente.

1.6.5. Lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL

Lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Germania), schematizzato in Figura 1.10, è costituito:

- da una sorgente, già descritta in precedenza, e dalla relativa zona di interfaccia e di focalizzazione degli ioni;
- da due analizzatori, la trappola ionica lineare (LTQ) e l'orbitrap;
- dalla C-Trap, un quadrupolo a trasmissione totale sagomato che ha la funzione di stoccare per un breve periodo gli ioni e poi trasferirli tutti contemporaneamente in brevi impulsi;
- e da una cella di collisione HCD utilizzata per esperimenti di frammentazione ad alta energia.

Poiché sono presenti due analizzatori, lo strumento LTQ Orbitrap XL è definito come spettrometro di massa "ibrido".

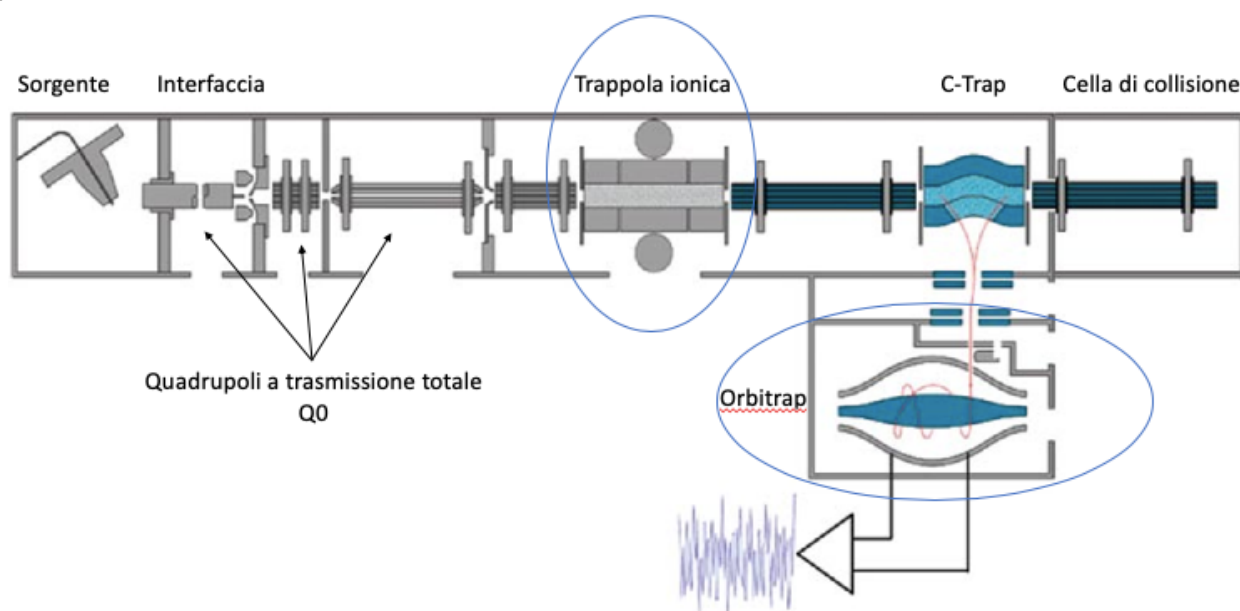


Figura 1.10: Schema dello spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL.

Gli ioni prodotti dalla sorgente prima di arrivare alla trappola ionica passano attraverso il capillare metallico dell'interfaccia, dove vengono attirati dalla differenza di potenziale ad esso applicato e il solvente residuo viene evaporato.

All'uscita del capillare vi è la *tube lens* che a sua volta focalizza gli ioni.

La *tube lens* costituisce un parametro di grande importanza nell'intensità con cui una specie ionica sarà rilevata, il suo valore dipende dal range di m/z che si vuole investigare: valori bassi sono ottimali per range di m/z bassi; mentre valori elevati sono ottimali per range di m/z più elevati.

A questo punto gli ioni passano attraverso un sistema costituito da due quadrupoli e un ottapolo in serie che ha la sola funzione di focalizzarli, accelerarli e convogliarli alla trappola ionica lineare.

Lo strumento LTQ Orbitrap XL può lavorare in modalità full scan utilizzando la trappola ionica a bassa risoluzione oppure l'orbitrap ad alta risoluzione.

Studi di frammentazione possono essere condotti con la trappola ionica oppure con la cella di collisione HCD, mentre gli esperimenti di MS^n possono essere condotti esclusivamente con la trappola ionica.

Gli ioni frammento ottenuti dalle frammentazioni condotte nella trappola ionica possono essere rilevati mediante gli elettromoltiplicatori della trappola ionica stessa, in bassa risoluzione, oppure possono essere inviati all'orbitrap e rilevati successivamente in alta risoluzione.

Gli ioni frammento ottenuti dalla cella di collisione, invece, possono essere rilevati solamente dall'orbitrap ad alta risoluzione.

Nel presente lavoro di tesi si è lavorato unicamente ad alta risoluzione.

La trappola ionica è un analizzatore di massa che usualmente lavora variando i voltaggi di corrente continua e a radiofrequenza al fine di far uscire sequenzialmente gli ioni in base al loro rapporto m/z , dal più leggero al più pesante.

Tuttavia, la trappola ionica può anche essere fatta lavorare variando solamente il voltaggio a radiofrequenza; in questo modo l'analizzatore può espellere tutti gli ioni, eccetto alcuni ioni precursori, che, sfruttando le collisioni con le molecole di gas neutro in essa contenuto, possono essere frammentati ed espulsi sequenzialmente in base al loro rapporto m/z .

Al fine di massimizzare l'accuratezza di massa, è necessario che gli ioni entrino nell'orbitrap il più compatti possibile, e qui gioca un ruolo fondamentale la C-trap.

La C-trap non è altro che un quadrupolo a trasmissione totale sagomato, contenente gas. Il gas ha la funzione di dissipare l'energia cinetica degli ioni, focalizzandoli lungo l'asse curvo della trappola. Successivamente con un gioco di voltaggi applicati, tali ioni vengono schiacciati in pacchetti e spinti verso l'orbitrap (Thermo Fisher Scientific, 2008).

Il cuore dello strumento LTQ Orbitrap XL è l'analizzatore di massa orbitrap.

Quando gli ioni arrivano all'orbitrap, vengono catturati al suo interno grazie all'applicazione di potenziali adeguati sui due elettrodi che lo costituiscono, uno esterno a forma di campana e uno interno a forma di fuso, coassiali tra loro (Thermo Fisher Scientific, 2008).

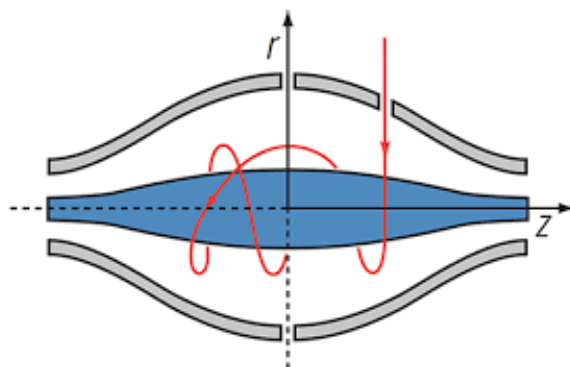


Figura 1.11: Rappresentazione della traiettoria stabile degli ioni all'interno dell'orbitrap.

Una volta all'interno, gli ioni risentono del forte campo elettrico applicato e iniziano a ruotare attorno all'elettrodo distribuendosi in anelli concentrici in base al rapporto m/z .

Il moto rotatorio attorno all'elettrodo è accompagnato da un moto oscillatorio lungo l'asse z (Figura 1.11).

La frequenza ω delle oscillazioni armoniche è proporzionale al rapporto m/z e ad una costante strumentale k .

La frequenza di oscillazione assiale lungo l'elettrodo centrale è perciò indipendente dalle velocità iniziali degli ioni ed è proprio questa indipendenza che porta l'orbitrap ad avere un'alta risoluzione.

Per trasformare i tracciati delle frequenze in spettri di massa viene utilizzata la trasformata di Fourier.

Lo strumento è fornito anche, dopo la C-trap, di una cella di collisione HCD che consente di acquisire spettri MS/MS ad alta risoluzione, molto utili per integrare le informazioni ottenute dagli spettri full scan dell'orbitrap e dagli spettri in MS/MS della trappola ionica.

1.6.4. Lo spettrometro di massa API 4000

Lo spettrometro di massa API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada) presenta un analizzatore a triplo quadrupolo (QQQ).

Gli ioni entranti nello spettrometro di massa vengono indirizzati verso l'analizzatore attraverso un ulteriore quadrupolo (Q0) che lavora a trasmissione totale e ha lo scopo di focalizzare gli ioni verso l'analizzatore stesso. Il triplo quadrupolo è composto dal primo analizzatore a quadrupolo (Q1) e il terzo (Q3) che lavorano come filtri di massa e dal secondo (Q2) che lavora come cella di collisione (Figura 1.12) (AB SCIEX, 2010).

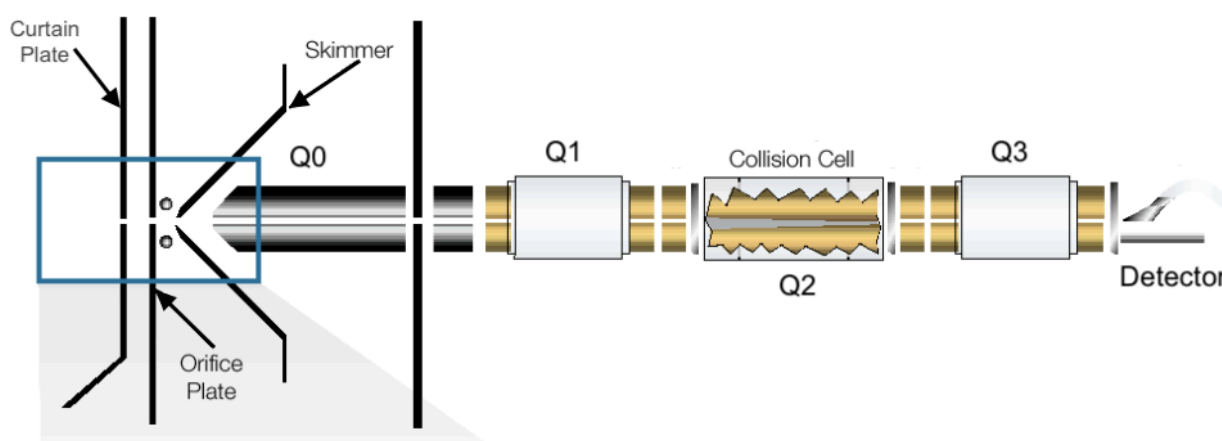


Figura 1.12: Rappresentazione schematica a blocchi di uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo.

Le modalità di utilizzo di un triplo quadrupolo sono molteplici, tuttavia nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata solamente la modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), in quanto garantisce la miglior sensibilità.

Il primo quadrupolo, Q1, lavora in SIM, andando a selezionare i singoli ioni precursori; la cella di collisione, Q2, è attiva e frammenta lo ione selezionato; e il terzo quadrupolo, Q3, lavora in SIM, selezionando gli ioni prodotti nella cella di collisione.

Il detector dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo è costituito da un elettromoltiplicatore CEM (*Channel Electron Multiplier*), formato da un dispositivo a dinodo continuo (Figura 1.13). Questa tipologia di rivelatore ha una struttura cilindrica a forma di cono e opera utilizzando il processo fisico dell'emissione secondaria di elettroni.

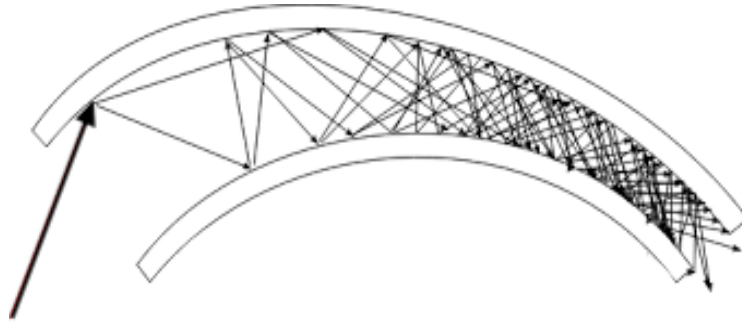


Figura 1.13: Schema di un rivelatore CEM.

Nel momento in cui uno ione in arrivo dal terzo quadrupolo (Q3) collide contro la superficie metallica emissiva del CEM, vengono rilasciati numerosi elettroni secondari dagli atomi della superficie stessa. Gli elettroni prodotti dalla collisione dello ione con la superficie verranno poi moltiplicati nei successivi urti con le pareti interne del cono.

Il numero di elettroni secondari dipende dalla particella incidente, dalla sua energia e dalle caratteristiche della superficie.

Gli elettroni così prodotti vengono accelerati verso l'uscita del cono grazie all'effetto del gradiente di potenziale presente, dove il segnale elettrico viene acquisito e convertito in un segnale digitale che fornisce il conteggio degli ioni in relazione alla loro massa.

2. Materiali e metodi

2.1. Standard

- Acetamiprid (ACE) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Acetamiprid-d3 (ACE*) (98%) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Clothianidin (CLO) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Clothianidin-d3 (CLO*) ($\geq 97\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Imidacloprid (IMI) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Imidacloprid-d4 (IMI*) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Thiacloprid (TCLO) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Thiamethoxam (TMX) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Thiamethoxam-d3 (TMX*) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Bisfenolo A (ring- $^{13}\text{C}12$, 99%) 100 ug uL^{-1} in ACN (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA)
- Bisfenolo A solido (Dr Eherenstorfer, Augsburg, Germany)
- Sodium perfluorooctanesulfonate (PFOS) ($^{13}\text{C}8$, 99%) $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in metanolo (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA)
- Perfluorooctanoic acid (PFOA) ($^{13}\text{C}8$, 99%) $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in metanolo (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA)
- 1H,1H,2H,2H-perfluorooctane sulfonate (6:2 FTS), sodium salt ($^{13}\text{C}2$, 99%; D4, 98%) $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in metanolo (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA)
- 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3-heptafluoropropoxy) (GenX) ($^{13}\text{C}3$ -propanoic acid) $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in metanolo (Wellington Laboratories Inc., Ontario, Canada)

2.2. Solventi

- Acetonitrile (ACN), Ultragradient (Romil Ltd, Cambridge, UK)
- Acido formico Fluka 98% (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Idrossido di ammonio Fluka 25% (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)
- Acqua ultrapura (M Ω cm, 0.01 TOC) prodotta dall' impianto di purificazione Purelab Flex II (ELGA, High Wycombe, UK), perfezionata con un sistema LC-PAK (Merck Millipore, Burlington, USA)
- Metanolo, Ultragradient (Romil Ltd, Cambridge, UK)

2.3. Attrezzatura di laboratorio

- Test Tube, 5ml, 75x13, round base, PS (SARSTEDT, Nümbrecht, Germania)
- Filtri in acetato di cellulosa, \emptyset 33 mm, 45 μ m (STARLAB)
- Filtri in PTFE, \emptyset 25 mm, 45 μ m (National Scientific Company, Rockwood, Tennessee, USA)
- Micropipette 10, 20, 50 μ L con capillari in vetro per trasferimento solventi organici Transferpettor Brand (Rudolf Brand GMBH+CO, Wertheim-Gloshütte, Germania)
- Micropipette 10, 20, 100, 200, 1000 μ L con puntali sterili in PET (Eppendorf AG, Hamburg, Germania)
- Vetreria da laboratorio: becher, matracci, pipette pasteur...
- Oasis HLB, 6 mL, 200 mg cartucce (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- VisiprepTM SPE Vacuum Manifold, 12-port model (Supelco, Bellefonte, USA)
- Vials ambrate in vetro da 20 mL da stoccaggio (Supelco, Bellefonte, USA)
- Turbovap[®] II (Caliper Life Science Inc., Hopkinton, MA, USA)
- Vials ambrate in vetro da 2 mL per auto campionatore Agilent G1329A (Agilent, Waldbronn, Germania)

2.4. Strumenti analitici

- Cromatografo UHPLCTM (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Thermo Fisher ScientificTM, Germania)
- Spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap® XL (Thermo Fisher ScientificTM, Germania)
- Cromatografo HPLC Agilent Serie 1100
- Spettrometro di massa a triplo quadrupolo (API 4000, Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada)

2.5. colonne cromatografiche

- C18 Synergy Hydro RP (50 mm x 4.6 mm, 4 µm) (Phenomenex, Torrance, USA)
- C18 Poroshell 120 SB (150 mm x 2.1 mm, 2.7 µm) (Agilent Technologies, PaloAlto, USA)
- C18 Zorbax-SB-Aq (150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm) (Agilent Technologies, PaloAlto, USA)

2.6. Trattamento preliminare del campione

Nella metodologia analitica la fase chiamata “preanalitica” corrisponde alle fasi di preparazione del campione da sottoporre all’analisi strumentale ed è la fase in cui è maggiore il pericolo di contaminazione.

Essa comprende diversi passaggi procedurali mirati all’estrazione, alla purificazione e alla riduzione del volume del campione.

L’estrazione è la fase finalizzata alla separazione dell’analita dal campione e al cambio matrice.

Ha infatti tre scopi:

- Effettuare un cambio di matrice, al fine di ottenere quella appropriata alla tecnica strumentale scelta per l’analisi;
- Aumentare la concentrazione di analita, riducendo il volume del campione;
- Effettuare una prima purificazione del campione, estraendo l’analita ed eliminando parte dei possibili interferenti.

Fare un’estrazione significa mettere a contatto l’analita con un solvente che ha il compito di estrarlo dalla matrice del campione e portarlo nel solvente stesso.

L’estrazione su fase solida (SPE) è utilizzata per bassissime concentrazioni previste di analita.

Il volume del campione viene fatto passare attraverso un materiale adsorbente (cartuccia solida), che trattiene l’analita. L’analita successivamente viene estratto dal supporto solido grazie al passaggio di un solvente affine all’analita stesso.

Il vantaggio di questa tipologia di estrazione consiste nell’elevata capacità di estrazione di basse concentrazioni di analita da volumi anche molto importanti, mentre lo svantaggio risiede nell’elevata possibilità di contaminazione.

La purificazione è la fase mirata all’eliminazione degli interferenti dagli estratti.

Per ridurre le possibilità di contaminazione si può operare anche senza purificazione, in quanto una purificazione di base è già stata fatta con l’estrazione.

La riduzione del volume è mirata all’aumento della concentrazione di analita al fine di aumentarne il segnale analitico rispetto al rumore di fondo e quindi abbassarne il limite di rilevabilità.

Per poter ridurre il volume si deve eliminare il solvente.

In generale, poiché il solvente è più volatile dell'analita, è sufficiente scaldare per farlo evaporare. Per poter accelerare questo processo si può operare sfruttando un flusso di gas inerte, generalmente azoto, che sposta l'equilibrio verso la fase gassosa, consentendo così di rimuovere più velocemente il solvente. Il sistema automatizzato che permette di fare ciò è chiamato Turbovap®.

2.6.1. La scelta dei campioni

Per le analisi sono stati utilizzati campioni di urina e di plasma umani, forniti dal laboratorio analisi dell'Ospedale Civile di Venezia.

Il criterio utilizzato per la scelta dei campioni si è basato sulle probabilità di esposizione dei soggetti alle varie classi di contaminanti.

Si è pensato di scegliere soggetti tutti appartenenti allo stesso sesso, al fine di avere la stessa risposta ai contaminanti; in particolare di sesso maschile per aumentare le probabilità di incorrere in un'esposizione occupazionale a determinati contaminanti, ed è stata scelta la fascia d'età compresa tra 40 e 65 anni, in quanto è stato supposto che dai 40 anni in su risulta frequente un incremento nell'uso di sostanze farmaceutiche.

Inoltre, al fine di comprendere la distribuzione degli inquinanti tra la popolazione, sono stati scelti soggetti residenti nel centro storico di Venezia e soggetti residenti nella zona limitrofa e rurale di Mestre.

Per ogni soggetto sono stati forniti due campioni, uno di urina (8 mL circa) e uno di plasma (1 mL circa).

Come mostra la Tabella 2.1, il laboratorio dell'ospedale ha predisposto in totale campioni appartenenti a 14 soggetti (7 per la zona di Mestre e 7 per quella di Venezia), di questi sono stati scelti i migliori 10 (5 e 5). La scelta si è basata sull'aspetto dei campioni e sulla quantità di fluidi presenti.

Per motivi di privacy d'ora in poi identificheremo i soggetti solamente con una sigla e un numero progressivo, dove "P" indica campioni di plasma e "U" campioni di urina; "M" soggetti residenti nell'area di Mestre e "Ve" soggetti residenti a Venezia.

Tabella 2.1: Campioni raccolti e scartati.

Mestre			Venezia		
Plasma	Urina		Plasma	Urina	
PM1	UM1	✓	PVe1	Uve1	✓
PM2	UM2	✓	PVe2	Uve2	✓
PM3	UM3	Scarsa urina	PVe3	Uve3	Coagulzioni rosse nelle urine
PM4	UM4	✓	PVe4	Uve4	
PM5	UM5	Scarsa urina	PVe5	Uve5	✓
PM6	UM6	✓	PVe6	Uve6	✓
PM7	UM7	✓	PVe7	Uve7	✓

La figura 2.1. sottostante mostra le aree di Mestre e di Venezia interessate dalla nostra analisi.



Figura 2.1: Area di interesse dell'analisi.

I campioni selezionati sono stati conservati a -20°C fino all'analisi.

2.6.2. Estrazione e purificazione

Dal momento che le matrici oggetto dello studio sono matrici biologiche, la fase di estrazione si è svolta presso il laboratorio analisi dell'Ospedale Civile di Venezia.

Prima di procedere con l'estrazione sono stati aggiunti, a tutte le vials contenenti i campioni, le soluzioni di standard interni.

Sono stati aggiunti:

- 20 µL della soluzione di neonicotinoidi marcati (1 ng µL⁻¹)
- 10 µL della soluzione di bisfenolo A marcato (10 ng µL⁻¹)
- 20 µL della soluzione di PFAS marcati (1 ng µL⁻¹)

Poiché i volumi dei campioni di plasma e di urina risultavano diversi, sono state utilizzate due procedure di preparazione simili ma diverse, una per i campioni di urina e una per quelli di plasma.

La procedura di estrazione utilizzata in questo lavoro fa riferimento a Taira K., et al, 2013.

2.6.2.1. Preparazione dei campioni di urina

I campioni di urina, una volta scongelati, sono stati centrifugati a 2500 rpm per 10 minuti al fine di far precipitare il sedimento urinario composto da batteri, globuli rossi e cristalli di sali insolubili.

Successivamente il surnatante è stato filtrato con filtri in acetato di cellulosa (0.45 µm) con lo scopo di trattenere il sedimento urinario più sottile.

I campioni di urina sono stati preparati attraverso un'estrazione su fase solida (Oasis HLB, 6cc, Waters) neutra, acida e basica in successione, al fine di estrarre il maggior numero possibile di analiti.

Per l'estrazione neutra, 2 mL di urina sono stati caricati su una cartuccia condizionata con acetonitrile e acqua. La cartuccia è stata lavata con acqua e gli analiti sono stati estratti con acetonitrile.

Le estrazioni acida e basica seguenti sono state eseguite con la stessa modalità ad eccezione dell'aggiunta di 5 µL di acido formico e dell'utilizzo di acqua acidificata (1% HCOOH), per l'estrazione acida, e dell'aggiunta di 40 µL di idrossido d'ammonio e dell'utilizzo di acqua basificata (1% NH₄OH), per l'estrazione basica (Figura 2.2).

	SPE neutra	SPE acida	SPE basica
Condizionamento	4 mL ACN 4 mL H ₂ O	ACN 4 mL H ₂ O acidif. (1% HCOOH)	ACN 4 mL H ₂ O basif. (1% NH ₄ OH)
Caricamento	2 mL urina	2 mL urina + 5 µL HCOOH	2 mL urina + 40 µL NH ₄ OH al 25%
Lavaggio	5 mL H ₂ O (asciugatura 10 min)	5 mL H ₂ O acidif. (asciugatura 10 min)	5 mL H ₂ O basif. (asciugatura 10 min)
Eluizione	5 mL ACN	5 mL ACN	5 mL ACN

Figura 2.2: Schema della procedura di estrazione SPE per l'urina.

2.6.2.1. Preparazione dei campioni di plasma

I campioni di plasma, una volta scongelati, sono stati agitati velocemente al vortex per 1 minuto. Non è stato necessario centrifugare i campioni poiché, al momento dell'arrivo in laboratorio il sangue intero viene centrifugato a 3500 rpm per 15 minuti al fine di ottenere il plasma.

Inoltre, non è stata seguita nessuna procedura di filtrazione in quanto il volume a disposizione era troppo esiguo e si sarebbe rischiato di perdere troppo materiale.

I campioni di plasma sono stati anch'essi preparati con un'estrazione su fase solida (Oasis HLB, 6cc, Waters) neutra.

Per l'estrazione, 1 mL di plasma è stato caricato su una cartuccia condizionata con acetonitrile e acqua. La cartuccia è stata lavata con acqua e gli analiti sono stati estratti con acetonitrile (Figura 2.3). Vista l'esiguità del campione non è stato possibile eseguire l'estrazione acida e basica.

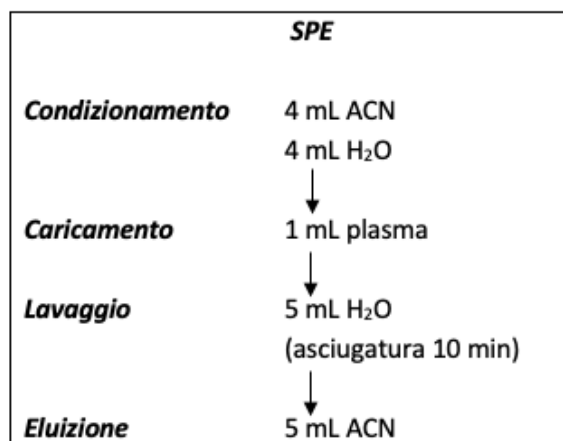


Figura 2.3: Schema della procedura di estrazione SPE per il plasma.

I bianchi procedurali, 3 repliche per le urine e 3 repliche per il plasma, sono stati ottenuti impiegando le rispettive procedure di estrazione.

Per ciascuno dei tre bianchi delle urine sono stati utilizzati 6 mL di acqua ultrapura, prodotta dall'impianto di purificazione Purelab Flex II (ELGA, High Wycombe, UK) e perfezionata con un sistema LC-PAK (Merck Millipore, Burlington, USA); mentre per i tre bianchi del plasma è stato utilizzato 1 mL di acqua ultrapura ciascuno.

Gli eluiti dei campioni e dei bianchi sono quindi stati portati nei laboratori del campus universitario per procedere con la riduzione del volume e l'analisi strumentale.

2.6.3. Riduzione del volume e concentrazione

Per concentrare i campioni è stato utilizzato un sistema automatizzato chiamato Turbovap® II (Caliper Life Science Inc., Hopkinton, MA, USA) che sfrutta un flusso di azoto per ridurre il volume.

Il flusso di azoto percorre gli appositi ditali in vetro contenenti i campioni con un movimento elicoidale, in modo tale da "spazzolare" continuamente le pareti e non disperdere gli analiti.

La concentrazione dei campioni è avvenuta nel bagno termostato a 40°C alla pressione del flusso di azoto di 20 bar.

Ciascun campione è stato concentrato ad un volume finale di 500 µL circa e ricostituiti con 500 µL di acqua ultrapura.

Gli estratti così ottenuti sono stati filtrati con filtri in PTFE (0.45µm), a causa della presenza di microcristalli formati durante la concentrazione che avrebbero potuto danneggiare la colonna cromatografica.

Tali filtri in PTFE possono causare contaminazione da PFAS, per questo motivo sono stati condizionati molto attentamente prima del loro utilizzo: sono stati lavati con metanolo prima, con acqua ultrapura e con acetonitrile poi, facendo seguire più passaggi di asciugatura.

I volumi finali sono stati raccolti in vials ambrate da autocampionatore da 2 mL.

2.7. Metodo analitico in HPLC-HRMS

I campioni di plasma e urina e i bianchi di procedura sono stati analizzati impiegando la tecnica HPLC-ESI-HRMS. Lo strumento impiegato è costituito dall'accoppiamento di un cromatografo liquido HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Germania) con uno spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Germania). Come interfaccia e sorgente di ionizzazione è stata utilizzata una sorgente ESI (Thermo Fisher Scientific, Germania).

La separazione cromatografica avviene utilizzando una colonna C18 Zorbax-SB-Aq (150 mm x 2.1 mm, 3.5 μ m).

L'eluizione binaria impiega i solventi A e B dove: la fase eluente A è composta dallo 0.01% di acido formico in H₂O ultrapura e la B dallo 0.01% di acido formico in acetonitrile.

Le condizioni cromatografiche di eluizione sono le seguenti: eluizione isocratica da 0 a 5 minuti al 100% di A, da 5 a 20 minuti gradiente al 100% di B, da 20 a 34 minuti eluizione isocratica al 100% di B, da 34 a 35 minuti gradiente a 100% di A, da 35 a 45 minuti equilibratura della colonna.

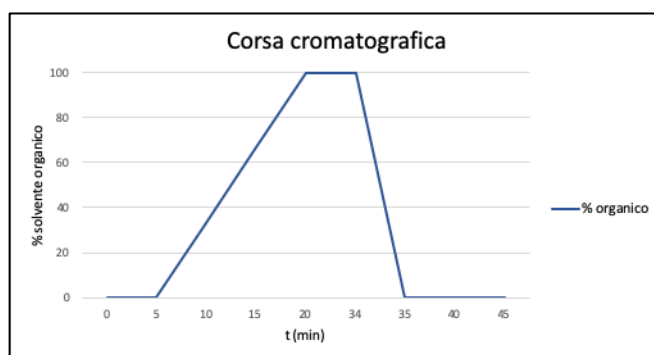


Figura 2.4: Corsa cromatografica per il suspect screening.

L'eluizione è stata eseguita ad un flusso di 200 μ L min⁻¹.

La corsa cromatografica dura 45 min.

Il volume di iniezione del campione è di 19 μ L e ogni campione è stato iniettato tre volte per motivi di riproducibilità e statistici.

La ionizzazione del campione nella sorgente ESI è stata eseguita sia in modalità positiva, che negativa.

I parametri relativi alla sorgente di ionizzazione sono: Source Temperature 300°C, Sheath gas 35 psi, Auxiliary gas 5 psi, Sweep gas 0 psi, Ionisation voltage 4 kV per la modalità positiva e -4 kV per la modalità negativa, Capillary Temperature 275°C, Capillary voltage 43 V, Tube lens 70 V.

L'acquisizione HRMS è stata effettuata in modalità full scan in un range di massa da 70 a 800 m/z, ad una risoluzione di 100000 a m/z 400.

I campioni sono stati analizzati anche usando acquisizioni “*data dependent*”, che consistono nella frammentazione degli ioni più intensi dello spettro di massa acquisito in modalità full scan.

In questa modalità di analisi vengono eseguiti quattro “*scan event*”: nel primo viene isolato e frammentato lo ione più intenso acquisito nella modalità full scan; nel secondo scan event, dallo spettro di frammentazione del primo ione più intenso, viene nuovamente isolato e frammentato lo ione più intenso; nel terzo e nel quarto vengono rispettivamente isolati e frammentati il secondo e il terzo ione più intenso acquisiti nella modalità full scan.

Le frammentazioni avvengono utilizzando un valore di collision energy (CE) di 35 V.

La calibrazione dello spettrometro di massa è stata condotta regolarmente ogni 48 ore, con lo scopo di mantenere l’accuratezza dell’analizzatore orbitrap entro un intervallo di ± 5 ppm.

La calibrazione è stata effettuata iniettando in sorgente, mediante infusione diretta, delle apposite soluzioni standard di calibrante. Tali miscele comprendono una serie di composti a massa esatta nota che coprono un vasto range di massa, in modo tale da consentire una calibrazione ottimale sia per rapporti m/z bassi che alti.

Poiché le analisi dei campioni sono state condotte sia in polarità positiva che negativa, sono state usate due soluzioni standard di calibrante, fornite dalla ditta produttrice dello strumento (Pierce LTQ ESI Negative/Positive Ion Calibration Solution, Thermo Fisher Scientific).

Al fine di assicurare un’accuratezza di massa inferiore ai 2 ppm, sono state utilizzate delle *locks mass* durante l’acquisizione dei dati. In polarità positiva gli ioni a m/z 112.9856, 281.2486 e 283.2642 (acido formico, acido stearico e acido oleico), in negativo gli ioni a m/z 83.0603 e 158.9640 (acetonitrile e sodio trifluoroacetato). Il costante monitoraggio di queste masse, corrispondenti ad impurezze presenti nell’ambiente di laboratorio o nei solventi utilizzati, consente una continua calibrazione interna nel corso dell’analisi.

2.8. Metodi analitici in HPLC-MS/MS

I metodi analitici utilizzati in HPLC-MS/MS per l'analisi degli insetticidi neonicotinoidi, del bisfenolo A e dei PFAS erano già presenti in laboratorio.

Due di questi, il metodo analitico strumentale per l'analisi degli insetticidi neonicotinoidi e quello per l'analisi del bisfenolo A, sono stati sviluppati e validati per un precedente elaborato di tesi (Dalla Barba, Anno Accademico 2019/2020).

Il metodo analitico strumentale per l'analisi dei PFAS, invece, è tuttora in corso di validazione per le matrici ambientali.

2.8.1. Metodo analitico per gli insetticidi neonicotinoidi

Per la determinazione degli insetticidi neonicotinoidi viene utilizzato il sistema costituito dall'accoppiamento di un cromatografo liquido HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania) con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Ontario, Canada).

La ionizzazione degli analiti, condotta attraverso la tecnica ESI (ElectroSpray Ionisation) in una sorgente Turbo V, avviene in modalità di ionizzazione positiva.

La separazione cromatografica degli analiti avviene utilizzando una colonna C18 Synergy Hydro RP (50 mm x 4.6 mm, 4 µm).

È stata utilizzata un'eluizione a gradiente, in cui la composizione della fase mobile varia nel corso dell'analisi. A tal proposito sono state utilizzate due fasi mobili: la fase eluente A, composta da H₂O ultrapura acidificata con 0.1% di acido formico e la fase eluente B, composta da metanolo acidificato con 0.1% di acido formico.

Le condizioni cromatografiche di eluizione sono le seguenti: da 0 ad 1 minuto eluizione isocratica al 100% di A, da 1 a 15 minuti gradiente al 30% di A e 70% di B, da 5 a 16 minuti gradiente al 100% di B, da 16 a 21 minuti lavaggio colonna ed eluizione isocratica

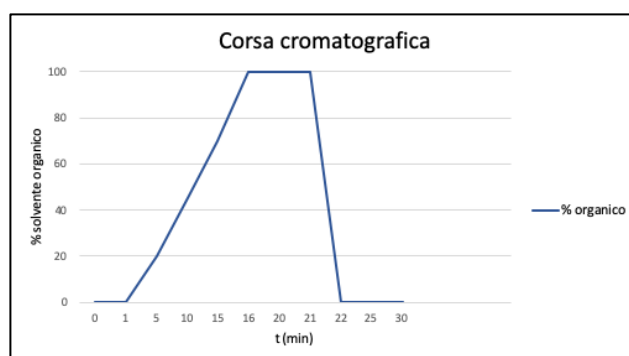


Figura 2.5: Corsa cromatografica per l'analisi dei neonicotinoidi.

di B, da 21 a 22 minuti gradiente al 100% di A, da 22 a 30 minuti equilibratura della colonna.

L'eluizione è stata eseguita ad un flusso di 500 $\mu\text{L min}^{-1}$.

La corsa cromatografica dura 30 min.

Il volume di iniezione del campione è di 20 μL .

I parametri relativi alla sorgente di ionizzazione sono: Source Temperature 600°C, Nebulizer gas 40 psi, Auxiliary gas 60 psi, Curtain gas 20 psi, Collision gas 6 psi, Ionisation voltage 5500 V.

Il triplo quadrupolo lavora in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring): lo ione precursore isolato nel primo quadrupolo (Q1), viene frammentato all'interno della cella di collisione (Q2) e gli ioni frammento così prodotti vengono rilevati all'interno del terzo quadrupolo (Q3).

Le coppie composte da ione precursore e ione frammento vengono dette transizioni e sono specifiche per ciascun composto analizzato (Tabella 2.2).

Il dwell time per ogni transizione è di 50 ms.

I parametri relativi all'analizzatore per l'analisi degli insetticidi neonicotinoidi sono riassunti in Tabella 2.2.

Tabella 2.2: Transizioni analizzate per ciascun neonicotinoide e parametri ottimizzati dello spettrometro di massa. Le transizioni in grassetto sono le transizioni principali.

Ione precursore	Transizione Q1 (m/z)	Transizione Q3 (m/z)	Declustering Potential (V)	Entrance Potential (V)	Collision Energy (V)	Collision Cell Exit (V)
[ACE+H] ⁺	223.1	126.1 90.2	59 59	10 10	29 47	8 10
[ACE*+H] ⁺	226.0	126.0 90.0	68 68	11 11	27 46	8 6
[CLO*+H] ⁺	253.0	172.0 132.0	57 57	15 15	17 21	9 12
[TCLO+H] ⁺	253.1	126.1 90.0	70 70	9 9	31 50	8 6
[IMI+H] ⁺	256.1	209.2 175.1	56 56	12 12	21 23	5 18
[IMI*+H] ⁺	260.0	213.0 79.0	61 61	11 11	19 24	15 12
[TMX+H] ⁺	292.2	211.1 181.2	56 56	11 11	17 32	5 4
[TMX*+H] ⁺	295.0	214.0 184.0	61 61	11 11	16 30	15 13

2.8.2. Metodo analitico per il bisfenolo A

Per la determinazione del bisfenolo A viene utilizzato il medesimo sistema costituito dall'accoppiamento di un cromatografo liquido HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania) con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Ontario, Canada).

La ionizzazione degli analiti, condotta attraverso la tecnica ESI (ElectroSpray Ionisation) in una sorgente Turbo V, avviene in modalità di ionizzazione negativa.

La separazione cromatografica avviene utilizzando una colonna C18 Synergy Hydro RP (50 mm x 4.6 mm, 4 μ m).

È stata utilizzata un'eluizione a gradiente di una miscela binaria in cui la fase eluente A è composta da H₂O ultrapura e la fase eluente B da metanolo.

Le condizioni cromatografiche di eluizione sono le seguenti: a 0 minuti eluizione al 50% di A e 50% di B, da 0 a 2 minuti gradiente al 100% di B, da 2 a 7 minuti eluizione isocratica di B, da 7 a 9 minuti gradiente al 50% di A e 50% di B, da 9 a 15 minuti equilibratura della colonna.

L'eluizione è stata eseguita ad un flusso di 500 μ L min⁻¹.

La corsa cromatografica dura 15 min.

Il volume di iniezione del campione è di 20 μ L.

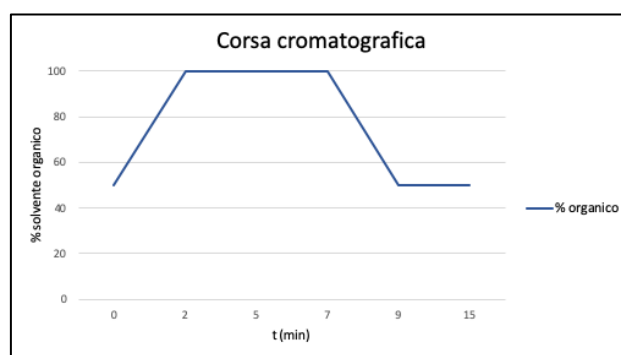


Figura 2.6: Corsa cromatografica per l'analisi del bisfenolo A.

I parametri relativi alla sorgente di ionizzazione sono: Source Temperature 550°C, Nebulizer gas 30 psi, Auxiliary gas 50 psi, Curtain gas 25 psi, Collision gas 4 psi, Ionisation voltage -4450 V.

L'acquisizione da parte del triplo quadrupolo è condotta in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), con un dwell time di 100 ms per ogni transizione.

I parametri relativi all'analizzatore per l'analisi sono riassunti in Tabella 2.3.

Tabella 2.3: Transizioni analizzate per il BPA e parametri ottimizzati dello spettrometro di massa.

Ione precursore	Transizione Q1 (m/z)	Transizione Q3 (m/z)	Declustering Potential (V)	Entrance Potential (V)	Collision Energy (V)	Collision Cell Exit (V)
[BPA-H]-	227.0	132.8	-71	-10	-36	-10
[BPA*-H]-	239.0	138.8	-74	-10	-35	-10

2.8.3. Metodo analitico per i PFAS

Anche per la determinazione dei PFAS viene utilizzato il sistema costituito dall'accoppiamento di un cromatografo liquido HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania) con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Ontario, Canada).

Il metodo analitico include 20 analiti e 4 relativi marcati:

- 9 acidi perfluoroalchil carbossilici: l'acido perfluorobutanoico (C4), l'acido perfluoropentanoico (C5), l'acido perfluoroesanoico (C6), l'acido perfluoroeptanoico (C7), l'acido perfluoroottanoico (C8) e il rispettivo marcato ^{13}C , l'acido perfluorononanoico (C9), l'acido perfluorodecanoico (C10), l'acido perfluoroundecanoico (C11) e l'acido perfluorododecanoico (C12);
- 3 acidi perfluoroalchil solfonici: l'acido perfluorobutansolfonico (C4S), l'acido perfluoroesansolfonico (C6S) e l'acido perfluoroottansolfonico (C8S) e il rispettivo marcato ^{13}C ;
- il perfluoroottano solfonamide (FOSA);
- l'N-metil-perfluoroottano-sulfonamide-acetato (MeFOSAA);
- l'N-etil-perfluoroottano-sulfonamide-acetato (EtFOSAA);
- il 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(eptaffluoropropossi)-propanoato di ammonio (GenX) e il rispettivo marcato ^{13}C ;
- 2 fluorotelomeri solfonati: sodio 1H,1H,2H,2H-perfluoroottan solfonato (6:2FTS) e sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorodecan solfonato (8:2FTS) e il rispettivo marcato ^{13}C ;
- 2 diesteri perfluoroalchil fosfati: sodio bis(1H,1H,2H,2H-perfluoroottil)fosfato (6:2diPAP) e sodio bis(1H,1H,2H,2H-perfluorodecil)fosfato (8:2diPAP).

La ionizzazione degli analiti, condotta attraverso la tecnica ESI (ElectroSpray Ionisation) in una sorgente Turbo V, avviene in modalità di ionizzazione negativa.

La separazione cromatografica avviene utilizzando una colonna C18 Poroshell 120 SB (150 mm x 2.1 mm, 2.7 μm).

È stata utilizzata un'eluizione a gradiente di una miscela binaria in cui la fase eluente A è composta da H₂O ultrapura acidificata con lo 0.1% di acido formico e la fase eluente B da metanolo acidificato con lo 0.1% di acido formico.

Le condizioni cromatografiche di eluizione sono le seguenti: da 0 a 1 minuti eluizione isocratica all'80% di A e 20% di B, da 1 a 3 minuti gradiente al 30% di A e 70% di B, da 3 a 6 minuti gradiente a 100% di B, da 6 a 32 minuti eluizione isocratica al 100% di B, da 32 a 32.5 minuti gradiente all'80% di A e 20% di B, da 32.5 a 42 minuti equilibratura della colonna.

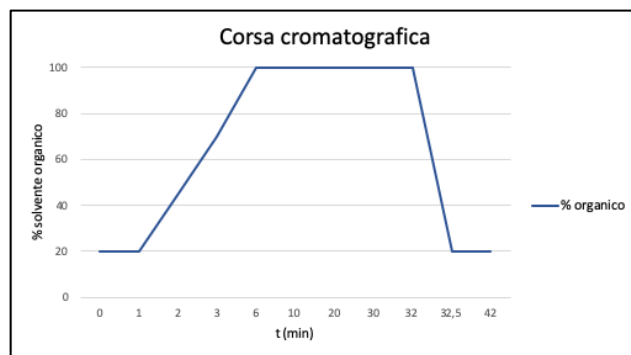


Figura 2.7: Crosa cromatografica per l'analisi dei PFAS.

L'eluizione è stata eseguita ad un flusso di 120 $\mu\text{L min}^{-1}$.

La corsa cromatografica dura 42 min.

Il volume di iniezione del campione è di 20 μL .

I parametri relativi alla sorgente di ionizzazione sono: Source Temperature 400°C, Nebulizer gas 40 psi, Auxiliary gas 60 psi, Curtain gas 25 psi, Collision gas 8 psi, Ionisation voltage -4500 V.

L'acquisizione da parte del triplo quadrupolo è condotta in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), con un dwell time di 50 ms per ogni transizione.

I parametri relativi all'analizzatore per l'analisi sono riassunti in tabella 2.4.

Tabella 2.4: Transizioni analizzate per ciascun PFAS e parametri ottimizzati dello spettrometro di massa. Le transizioni in grassetto sono le transizioni principali.

Ione precursore	Transizione Q1 (m/z)	Transizione Q3 (m/z)	Declustering Potential (V)	Entrance Potential (V)	Collision Energy (V)	Collision Cell Exit (V)
[C4-H] ⁻	213.0	168.9 92.8	-30 -30	-3 -3	-13 -37	-8 -7
[C5-H] ⁻	263.0	218.8	-35	-3	-13	-11
[C6-H] ⁻	313.0	268.7 118.7	-42 -42	-4 -4	-13 -30	-14 -19
[C7-H] ⁻	362.9	318.8 168.7	-40 -40	-7 -7	-12 -25	-12 -29
[C8-H] ⁻	412.7	368.8 218.8	-32 -32	-8 -8	-14 -24	-8 -10

[C8*-H] ⁻	420.9	375.9	-37	-10	-15	-9
		222.7	-37	-10	-24	-12
		171.9	-37	-10	-25	-8
[C9-H] ⁻	462.8	418.8	-36	-3	-14	-10
		218.8	-36	-3	-25	-11.5
[C10-H] ⁻	512.9	468.8	-45	-8	-16	-11.5
		218.8	-45	-8	-26	-10
[C11-H] ⁻	562.8	518.8	-46	-8	-15	-13
		168.8	-46	-8	-36	-14
[C12-H] ⁻	613.0	569.0	-45	-7	-14	-13
		168.7	-45	-7	-39	-13
[C4S-H] ⁻	299.0	79.9	-75	-12	-56	-5.5
		98.7	-75	-12	-43	-8
[C6S-H] ⁻	398.9	79.9	-83	-10	-77	-6
		98.7	-83	-10	-55	-7
[C8S-H] ⁻	498.9	79.9	-90	-12	-89	-6
		98.6	-90	-12	-66	-5
[C8S*-H] ⁻	507.0	99.0	-100	-11	-67	-8
		80.0	-100	-11	-95	-7
[FOSA-H] ⁻	498.0	169.0	-96	-12	-42	-9
		78.0	-96	-12	-80	-6
[MeFOSAA-H] ⁻	570.0	512.0	-74	-9	-30	-25
		419.0	-74	-9	-30	-22
		219.0	-74	-9	-40	-10
[EtFOSAA-H] ⁻	584.0	526.0	-80	-13	-25	-12
		419.0	-80	-13	-32	-23
		169.0	-80	-13	-45	-9
[GenX-H] ⁻	329.0	285.0	-25	-4	-7	-10
		237.0	-25	-4	-9	-8
		169.0	-25	-4	-19	-7
[GenX*-H] ⁻	332.0	287.0	-28	-4	-9	-5
		185.0	-28	-4	-25	-8
		169.0	-28	-4	-18	-12
[6:2FTS-H] ⁻	427.0	407.0	-86	-8	-35	-21
		387.0	-86	-8	-42	-16
		81.0	-86	-8	-72	-6
[6:2FTS*-H] ⁻	433.0	412.0	-86	-6	-36	-21
		391.0	-86	-6	-43	-17
		82.0	-86	-6	-68	-6
[8:2FTS-H] ⁻	527.0	507.0	-99	-8	-40	-27
		487.0	-99	-8	-48	-25
		81.0	-99	-8	-86	-6
[6:2diPAP-H] ⁻	789.0	443.0	-94	-10	-33	-21
		423.0	-94	-10	-39	-25
		97.0	-94	-10	-70	-17
[8:2diPAP-H] ⁻	989.0	543.0	-118	-8	-36	-13
		523.0	-118	-8	-48	-8
		97.0	-118	-8	-90	-8

2.9. Elaborazione dati

I dati grezzi acquisiti dallo strumento analitico sono stati elaborati utilizzando dei software specifici al fine di estrapolare ed individuare una lista di ioni e le loro corrispondenti formule brute.

2.9.1. SIEVE

Il primo software impiegato per l'elaborazione dei dati è stato SIEVE 2.0, un software progettato e distribuito dalla Thermo Scientific che consente, mediante l'analisi differenziale, di valutare contemporaneamente una grande quantità di dati provenienti da diversi raw files, compararli tra loro e rilevarne le differenze statistiche (Thermo Fisher Scientific, 2014).

Tale software è stato utilizzato al fine di individuare per ogni campione gli ioni significativi rispetto al bianco.

Per poter lavorare con SIEVE è necessario creare un nuovo esperimento (Figura 2.8) seguendo una serie di passaggi guidati in sequenza:

1. Definizione della tipologia di esperimento
2. Selezione dei raw data files
3. Caratterizzazione dei raw data files
4. Impostazione dei parametri di analisi
5. Salvataggio dell'esperimento



Figura 2.8: Creazione nuovo esperimento SIEVE.

Per definire la tipologia di esperimento che si vuole condurre è necessario impostare un nome e, a seconda della tipologia di analiti che si vogliono studiare, scegliere tra una serie di opzioni (Figura 2.9).

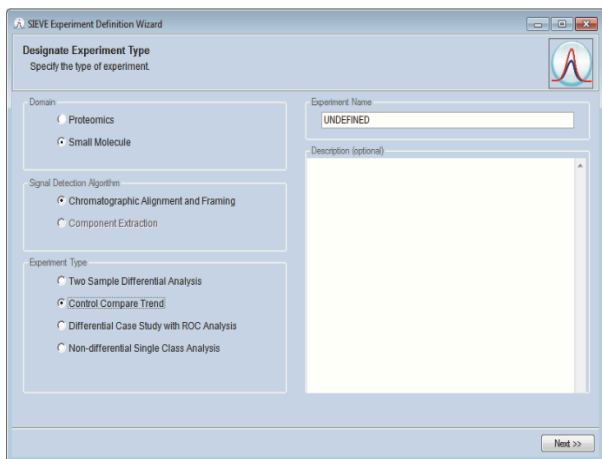


Figura 2.9: Definizione della tipologia di esperimento.

Come dominio per l'esperimento è stata scelta la voce "Small Molecule".

Come algoritmo di rilevamento del segnale è stata scelta l'opzione "Chromatographic Alignment and Framing". Tale operazione consente di mitigare le differenze tra le corse cromatografiche dei diversi campioni, allineandole tra loro.

Infine, come tipologia di esperimento è stata scelta l'opzione "Control Compare Trend", che consente di confrontare più gruppi, ossia più campioni, con un gruppo di riferimento, il bianco.

Nella maschera successiva vengono inseriti e quindi selezionati i files che si desidera analizzare (Figura 2.10).

Nel nostro caso, in un esperimento, sono stati caricati i 10 campioni di urina, ognuno composto da tre repliche, con i corrispondenti 3 bianchi e, in un altro esperimento, i 10 campioni di plasma, ognuno composto da tre repliche, con i corrispondenti 3 bianchi.

È importante, prima di selezionare i files che si desidera analizzare, farne una scansione al fine di individuare possibili files corrotti e nel caso eliminarli per non andare ad inficiare l'analisi.

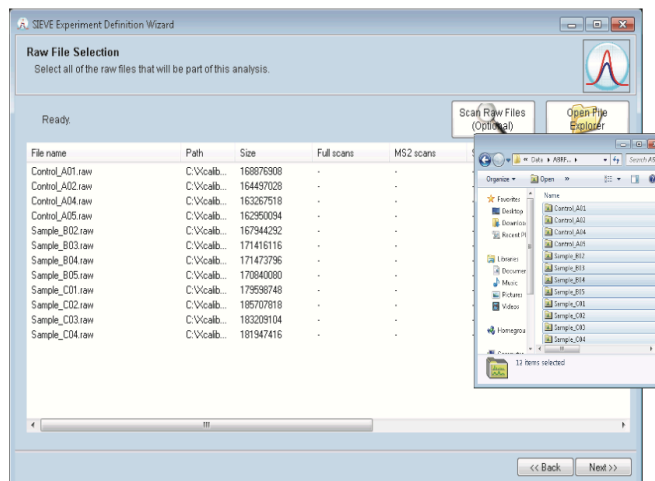


Figura 2.10: Selezione dei raw data files.

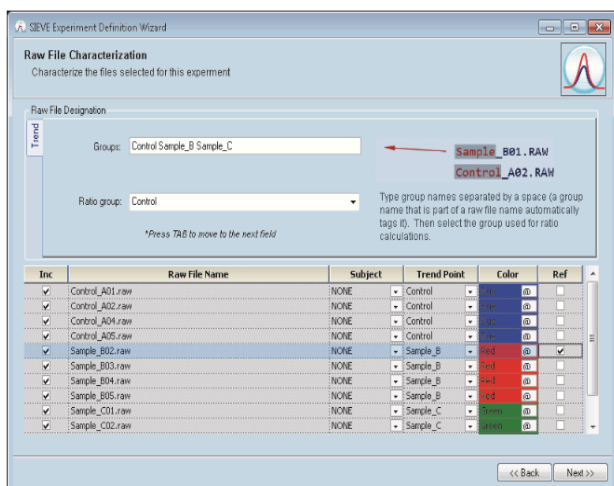


Figura 2.11: Caratterizzazione dei raw data files.

Per caratterizzare i raw data files è necessario assegnare loro una sigla, in modo tale che le repliche dello stesso campione compongano un unico gruppo. Per una facile identificazione inoltre ciascun gruppo viene contraddistinto da un colore (Figura 2.11).

È necessario anche definire un gruppo di controllo rispetto al quale SIEVE eseguirà l'analisi: ciascun gruppo di campioni verrà confrontato con tale gruppo e verranno individuate le masse di ioni che sono statisticamente rilevanti rispetto ad esso. Pertanto, il gruppo di controllo è costituito dai bianchi.

Per ultimo deve essere scelto un riferimento per l'allineamento. Per questo punto è consigliabile scegliere come riferimento il campione più complesso.

Nelle schermate successive vengono definiti i parametri operativi necessari per l'analisi: range m/z, intervallo cromatografico, larghezza del picco cromatografico, accuratezza di massa, intensità minima di segnale affinché un picco venga ritenuto tale e massimo numero di ioni da considerare (Figura 2.12).

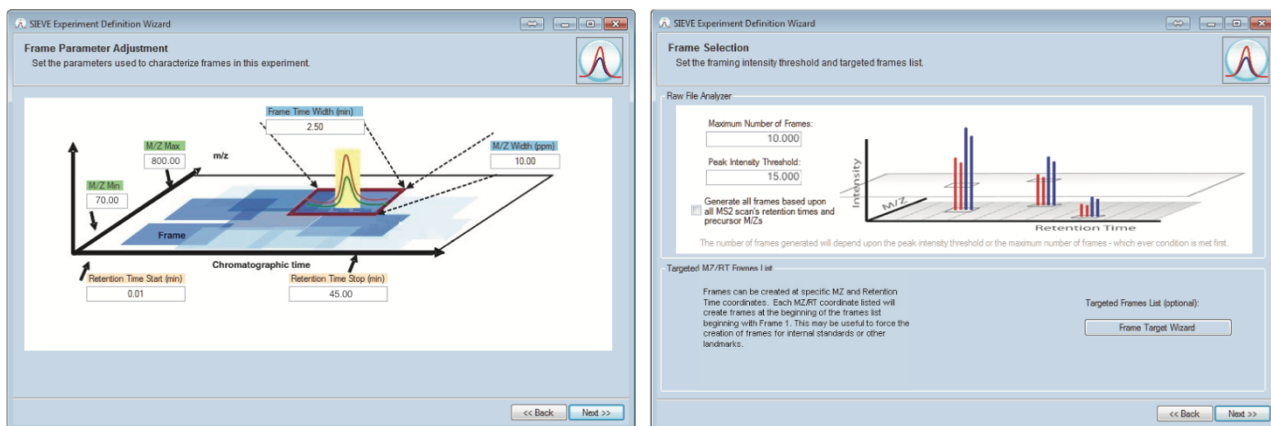


Figura 2.12: Parametri operativi.

A questo punto è possibile salvare l'esperimento e avviare l'analisi.

L'analisi effettuata da SIEVE si articola in tre fasi distinte: alignment, frame e identify.

L'alignment permette l'allineamento di campioni aventi corse cromatografiche differenti, in altre parole calcola la correlazione tra gli spettri dei diversi campioni per allinearne i cromatogrammi.

L'analisi di frame individua gli ioni che risultano essere statisticamente rilevanti rispetto al gruppo di controllo.

L'identify consente, come dice la parola stessa, di identificare le possibili molecole corrispondenti agli ioni individuati mediante l'uso di librerie apposite collegate con il software, come ChemSpider, utilizzato per le piccole molecole, e SEQUEST, utile nel caso di analisi di proteomica.

Quest'ultima fase di analisi svolta da SIEVE non è stata sfruttata per il presente lavoro di tesi, in quanto si è preferito optare per l'individuazione di formule brute per il suspect screening con il software Xcalibur.

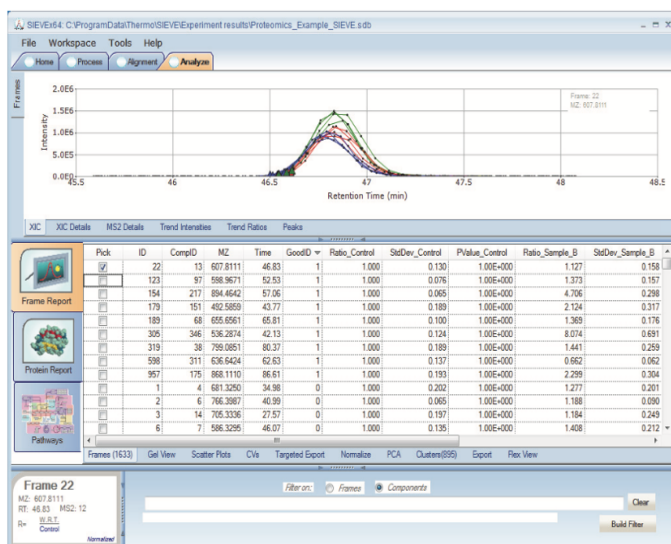


Figura 2.13: Risultati dell'analisi di frame.

Il risultato dell'analisi di frame viene riassunto in un'interfaccia interattiva (Figura 2.13) in cui sono presenti, in alto, il cromatogramma ricostruito dello ione selezionato per tutti i campioni in cui è presente e, in basso, una tabella che riporta tutti i rapporti m/z individuati con i rispettivi tempi di ritenzione, intensità di segnale e parametri statistici (p-value, rapporto rispetto al controllo, deviazione standard per tale rapporto, ...).

Al fine di ottimizzare e migliorare l'analisi, in questa schermata, è possibile filtrare i risultati, per esempio, imponendo di visualizzare solamente i rapporti m/z che hanno intensità di segnale maggiore di una certa soglia rispetto al gruppo di controllo nel nostro caso di 5 volte.

2.9.2. Xcalibur

Il secondo software utilizzato per l'elaborazione dei dati è stato Xcalibur 2.1.0 (Thermo Scientific), caratterizzato da molteplici funzionalità, infatti consente l'interfaccia diretta con lo spettrometro di massa e la visualizzazione dei dati da esso acquisiti, ma anche la loro elaborazione qualitativa e quantitativa.

L'uso che ne è stato fatto in questa sede, tuttavia, ha riguardato il solo riconoscimento degli ioni ottenuti da SIEVE.

Prima di procedere con l'utilizzo di Xcalibur, gli ioni significativi rispetto al bianco individuati da SIEVE sono stati confrontati con la libreria di molecole creata appositamente e comprendente tutti i composti di interesse. Gli ioni corrispondenti a composti sospetti sono stati valutati utilizzando Xcalibur.

Una volta aperto Qual Browser dalla schermata principale di Xcalibur e aperto il file contenente i dati acquisiti dallo strumento, si apre una finestra che consente di visualizzare il cromatogramma e il relativo spettro di massa del campione in esame (Figura 2.14).

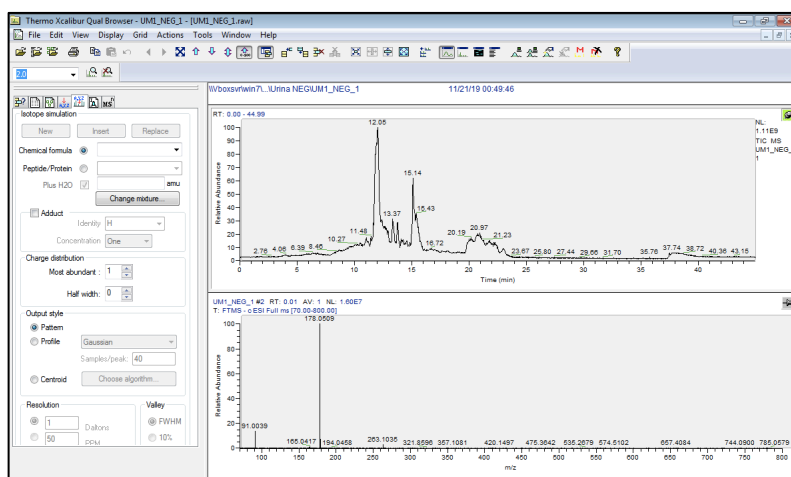


Figura 2.14: Finestra di visualizzazione del cromatogramma e dello spettro di massa.

In alto sulla finestra di visualizzazione del cromatogramma è possibile introdurre la massa esatta dello ione di interesse e il range di accuratezza di massa, così da visualizzare, quando presente, il picco dato da tale ione. Selezionando a questo punto l'area del picco cromatografico dove il segnale è più intenso si può visualizzare lo spettro di massa sperimentale relativo.

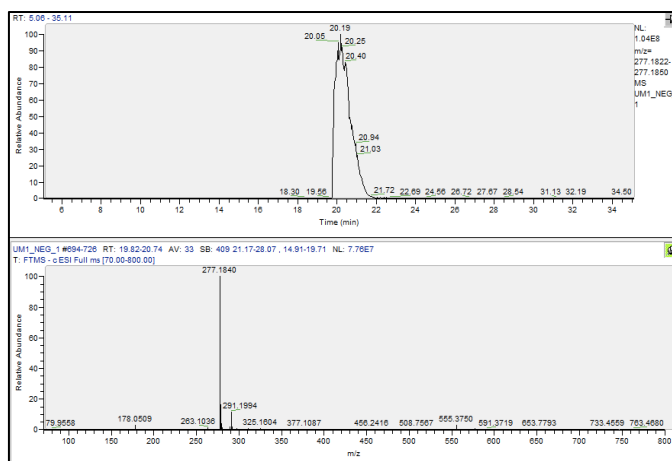


Figura 2.15: Picco cromatografico e relativo spettro di massa.

Per accertarsi di aver identificato uno ione con Xcalibur si procede nel seguente modo:

A partire dalla massa esatta dello ione monoisotopico sperimentale, Xcalibur è in grado di calcolare e offrire all'utente una serie di formule brute ordinate in base all'accuratezza di massa.

Per poter accedere a questa funzione è sufficiente impostare alcuni parametri: carica, tolleranza dell'errore di massa, numero di atomi degli elementi da considerare e numero massimo di formule che si desidera visualizzare.

Nel caso fortunato qui riportato (Figura 2.16) il programma propone un'unica formula, ma solitamente ne vengono presentate diverse con un errore sull'accuratezza di massa crescente.

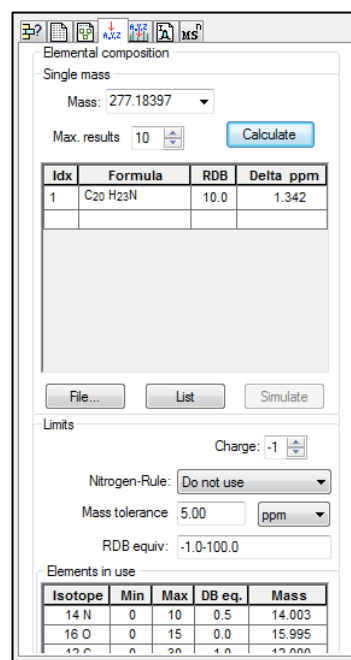


Figura 2.16: Parametri di XCalibur per l'individuazione delle formule brute.

La formula bruta suggerita permette il calcolo del cluster isotopico teorico.

Si può a questo punto confrontare lo spettro di massa sperimentale con quello teorico andando a valutare l'accuratezza di massa del cluster isotopico e i rapporti isotopici degli ioni del cluster.

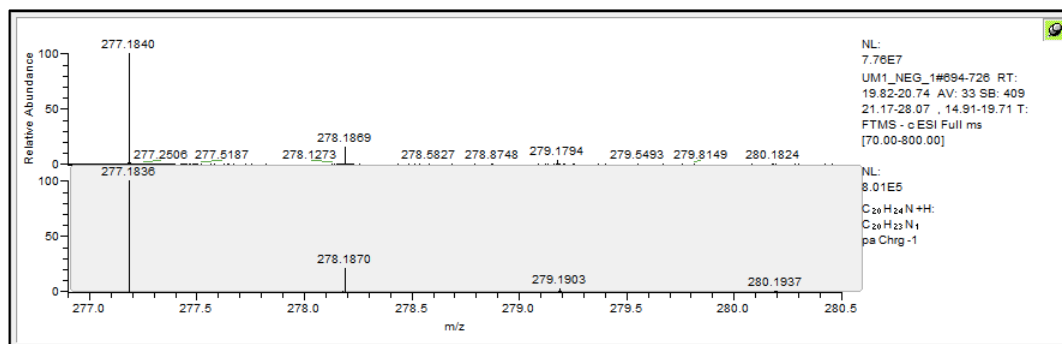


Figura 2.17: Confronto tra lo spettro sperimentale (in alto) e quello teorico (in basso).

Per calcolare l'accuratezza di massa degli ioni si utilizza l'equazione:

$$E = \frac{(m/z \text{ sperimentale}) - (m/z \text{ teorico})}{(m/z \text{ teorico})} \times 10^6$$

Perché uno ione venga identificato, l'accuratezza di massa dello ione monoisotopico deve mantenersi al di sotto dei 5 ppm di errore.

In generale l'errore di massa è inferiore al valore di 2 ppm, in quanto durante l'analisi sono state utilizzate delle lock mass.

Inoltre, si può controllare che i diversi ioni del cluster isotopico si presentino allo stesso tempo di ritenzione (RT).

Per fare ciò è sufficiente inserire, nella finestra del cromatogramma, le masse esatte degli ioni del cluster e il range di accuratezza con il quale si vuole lavorare.

Si potranno così visualizzare i picchi e confrontarli tra loro (Figura 2.18).

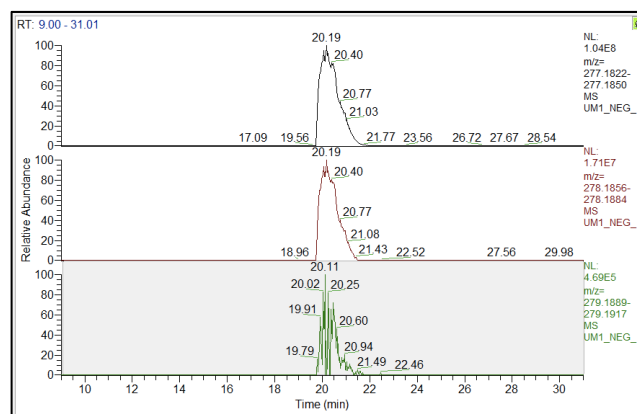


Figura 2.18: Controllo del RT degli ioni del cluster isotopico.

Con Xcalibur è possibile elaborare anche i dati relativi agli spettri di frammentazione.

Importando le acquisizioni relative agli esperimenti di frammentazione registrati durante le analisi in data dependent scan, si possono andare ad analizzare gli spettri di frammentazione degli ioni per studiare e riconoscere i vari frammenti e, attraverso l'indagine strutturale della specie ionica, identificare i composti con una confidenza maggiore.

Tuttavia, assicurarsi un'identificazione definitiva e sicura è molto difficile, infatti ottenere assegnazioni inequivocabili non sempre è possibile (Dunn, et al., 2013).

Il gruppo di lavoro sull'analisi chimica della Metabolomics Standard Initiative (MSI) ha definito 4 diversi livelli di confidenza nell'identificazione dei metaboliti:

Tabella 2: I quattro livelli di confidenza nell'identificazione dei metaboliti definiti dalla MSI (Dunn, et al., 2013).

LIVELLO	CONFIDENZA NELL'ASSEGNAZIONE DEL LIVELLO	EVIDENZA
1	Identificazione definitiva	Basata sul confronto tra 2 o più proprietà ortogonali (RT, m/z, spettro di massa di frammentazione) di uno standard chimico autentico con le stesse proprietà osservate per il metabolita di interesse analizzato in identiche condizioni analitiche.
2	Identificazione putativa	Basata in generale solo su una o 2 proprietà e sul confronto con i dati raccolti in diversi laboratori operanti con diverse condizioni analitiche o con i dati immagazzinati in banche dati. In LC/MS la prima proprietà utilizzata per identificare i metaboliti è la m/z misurata con precisione e solitamente è combinata con il confronto con database degli spettri di massa di frammentazione o del RT.
3	Identificazione putativa di classi di composti	Basata su proprietà fisico-chimiche caratteristiche di una classe di composti o sulla loro somiglianza spettrale.
4	Composti sconosciuti	Sebbene non identificati e non classificati, questi metaboliti possono ancora essere differenziati e quantificati sulla base di dati spettrali.

Al fine di ottenere un livello più alto nell'identificazione dei composti, i pattern di frammentazione sono stati confrontati con quelli di database come Pubchem (Pubchem, 2020), MassBank (MassBank, 2020), Human Metabolome Database (HMDB, 2020) e DrugBank (Drugbank, 2020).

3. Risultati e discussione

3.1. Suspect screening: elaborazione dei dati e individuazione putativa dei composti

I campioni sono stati sottoposti ad analisi HPLC-HRMS sia in polarità positiva che negativa ricercando gli ioni protonati ($[M+H]^+$) e deprotonati ($[M-H]^-$). Dall'elaborazione dei dati condotta utilizzando SIEVE, ottenuta dal confronto tra i campioni e i bianchi, emergono migliaia di specie ioniche. Dal confronto con il database creato in laboratorio sono state individuate circa 300 specie ioniche. Le specie individuate come possibili sospetti sono quindi state verificate utilizzando Xcalibur.

Nella Tabella 3.1 sono riepilogate le masse protonate ($[M+H]^+$), corrispondenti a 56 specie sospette identificate con Xcalibur.

Sono stati riportati i seguenti parametri: la formula bruta, il tempo di ritenzione (RT), la massa dello ione monoisotopico, le masse del primo e del secondo ione del cluster isotopico, gli errori di massa rispettivi, la differenza nel tempo di ritenzione dei vari ioni appartenenti al cluster (ΔRT), la matrice in cui sono stati trovati, il livello di identificazione e quando disponibile la frammentazione, ottenuta mediante confronto dello spettro di frammentazione nel database.

Tabella 3.1: Masse protonate identificate con XCalibur.

Formula bruta	RT	$[M + H]^+$	I°	II°	Errore $[M + H]^+$	Errore I°	Errore II°	ΔRT	Matrice	Livello identif.	Rif.
C9H11NO2	2,36	166,0862	167,0895	/	-0,6021	-0,5985	/	0	P	2	MassBank Record: CE000277
C9H11NO2	3,93	166,086	167,0892	/	-1,8063	-2,3939	/	0	P,U	2	MassBank Record: CE000277
C9H11NO3	2,04	182,0809	183,0842	/	-1,6476	-1,6386	/	0	P	2	MassBank Record: PB000412
C9H11NO3	2,3	182,0809	183,0843	/	-1,6476	-1,0924	/	0	P, U	2	MassBank Record: PB000412
C2H4N4	1,73	85,0509	86,054	/	0,0000	-2,3241	/	0	U	3	
C8H11N	37,46	122,0965	123,0997	124,1029	0,8190	-0,8123	-1,6116	0	U	3	
C6H10N6	9,25	167,1037	168,1071	/	-1,7953	-1,1897	/	0	U	3	
C11H11NO	11,08	174,0913	175,0954	/	0,0000	3,9978	/	0	U	3	
C9H20N2O2	1,44	189,16	190,1632	/	0,5287	0,5259	/	0	P, U	3	
C11H16N2O2	11,64	209,1286	210,132	/	0,4782	0,9518	/	0	U	3	
C11H15NO3	11,51	210,1125	211,1159	/	0,0000	0,4737	/	0	U	3	
C12H15NO3	13,43	222,1126	223,1159	/	0,4502	0,4482	/	0	U	3	
C2H7N3	1,69	74,0711	/	/	-2,7001	/	/	/	U	3	
CH4N4O2	11,9	105,0406	106,038	/	-0,9520	2,8292	/	0	U	3	
C7H11N3O	2,07	154,0974	155,1007	/	-0,6489	-0,6447	/	0	U	3	

C6H9N3O2	1,47	156,0769	157,0802	158,0811	0,6407	0,6366	0,6326	0	P,U	3	
C10H12O2	11,7	165,091	166,0943	/	0,0000	-0,6021	/	0	U	3	
C8H13N3O	2,21	168,1129	169,1163	/	-1,1897	-1,1826	/	0	U	3	
C8H12N2O2	10,53	169,0972	170,1004	171,1015	0,0000	-0,5879	0,5844	0	U	3	
C6H10CIN5	8,43	188,0696	189,0729	/	-0,5317	-1,0578	/	0	P, U	3	
C11H14NO2	9,38	193,1103	/	/	3,1070	/	/	0	U	3	
C11H15NO2	9,48	194,1175	195,1207	/	-0,5152	-1,0250	/	0	U	3	
C11H13NO3	13,21	208,097	209,1003	/	0,9611	0,4782	/	0	U	3	
C5H6F3N5O	2,2	210,0606	211,0639	/	4,2845	3,7903	/	0	U	3	
C9H14N4O2	2,07	211,1186	212,1217	/	-1,8947	-2,8286	/	0	U	3	
C4H11N5	1,73	130,1086	131,1118	132,1085	-0,7686	-2,2881	-4,5417	0	U	2	MassBank Record: EA255010
C10H15N	37,45	150,1276	151,1312	/	-0,6661	0,6617	/	0	U	3	
C10H15NO	11,88	166,1226	167,1259	/	0,0000	-0,5984	/	0	U	3	
C6H6N4O2	10,69	167,0565	168,0596	169,0605	0,5986	-0,5950	-0,5915	0	U	2	MassBank Record: PR100415
C6H6N4O2	11,06	167,0564	168,0595	169,0604	0,0000	-1,1901	-1,1830	0	U	2	MassBank Record: PR100415
C9H13NO2	10,32	168,1018	169,1049	/	-0,5949	-2,3654	/	0	U	3	
C8H10O4	11,23	171,065	172,0682	/	-1,1691	-1,7435	/	0	U	3	
C10H13NO2	9,65	180,1018	181,1054	/	-0,5552	0,5522	/	0	U	3	
C6H9N3O4	3,8	188,0673	189,0708	/	3,7221	4,7601	/	0	P, U	3	
C13H18O2	12,38	207,1379	208,1413	/	-0,4828	0,0000	/	0	U	3	
C21H37N	16,72	304,2997	305,3033	/	-0,6572	0,3275	/	0	P	3	
C13H16O	12,41	189,1273	190,131	/	-0,5287	1,5779	/	0	U	3	
C13H20O	12,86	193,1587	194,1622	/	0,0000	1,0301	/	0	U	3	
C12H16O3	17,75	209,1173	210,1207	/	0,4782	0,4759	/	0	U	3	
C12H14O4	15,81	223,0966	224,0995	/	0,4482	-1,3387	/	0	P, U	3	
C6H7N	2,05	94,065	95,0684	/	-1,0631	-1,0519	/	0	U	3	
C5H9NO	9,5	100,0756	101,0788	102,0795	-0,9992	-1,9787	-3,9185	0	P, U	3	
C6H5NO2	11,56	124,0392	125,0425	/	-0,8062	-1,5995	/	0	U	3	
C6H14N2O	1,79	131,1178	132,1212	/	-0,7627	0,0000	/	0	U	3	
C10H14	11,49	135,1168	136,1203	/	0,0000	0,7346	/	0	U	3	
C10H14	13,36	135,1168	136,1202	/	0,0000	0,0000	/	0	U	3	
C9H13N	37,48	136,112	137,1153	/	-0,7347	-0,7293	/	0	U	3	
C7H8O	12,72	109,0647	110,068	/	-0,9169	-0,9085	/	0	U	3	
C8H8O3	11,75	153,0547	154,0579	/	0,6534	-0,6491	/	0	U	3	
C8H8O3	13,68	153,0546	154,0581	/	0,0000	0,6491	/	0	U	3	
C9H10O3	13,91	167,0702	168,0735	169,0744	-0,5986	-0,5950	-0,5915	0	U	3	
C10H12O3	13,74	181,0857	182,0889	/	-1,1044	-2,1967	/	0	U	3	
C11H16O2	17,77	181,122	182,1253	/	-1,6563	-2,1963	/	0	U	3	
C14H19NO	17,02	218,154	219,1574	/	0,4584	0,4563	/	0	U	3	
C9H7N	12,63	130,0651	131,0684	/	0,0000	-0,7630	/	0	U	3	
C9H7N	14,61	130,065	131,0683	/	-0,7688	-1,5259	/	0	U	3	
C9H7N	16,21	130,0651	131,0684	/	0,0000	-0,7630	/	0	U	3	
C5H10N2O	1,61	115,0865	116,09	/	-0,8689	0,8614	/	0	U	3	
C8H10N4O2	12,66	195,0876	196,0909	197,0917	-0,5126	-0,5100	-1,0148	0	P, U	2	Mass BankRecord: UF408903
C10H12N2O	10,53	177,1021	178,1052	179,1088	-0,5646	-2,2459	-0,5583	0	P	2	MassBank Record: UF413004
C7H8N4O2	11,57	181,0714	182,0751	183,0758	-3,3136	-1,6477	-2,1849	0	U	3	
C17H19NO3	17,86	286,1437	287,1471	288,1501	-0,3495	0,0000	-1,3882	0	P	3	MassBank Record: NA000155
C6H15O4P	11,83	183,0778	/	/	-1,6386	/	/	0	U	3	

Nella Tabella 3.2 sono riepilogate le masse deprotonate ($[M-H]^-$), corrispondenti a 75 specie sospette identificate con Xcalibur. Sono stati riportati gli stessi parametri impiegati per lo studio degli ioni protonati.

Tabella 3.2: Masse deprotonate identificate con XCalibur.

Formula bruta	RT	$[M-H]^-$	I°	II°	Errore $[M-H]^-$	Errore I°	Errore II°	ΔRT	Matrice	Livello identif.	Rif.
C9H11NO2	3,98	164,0716	165,075	/	-0,6095	-0,6058	/	0	P, U	2	MassBank Record: RP000411
C9H11NO3	2,37	180,0664	/	/	-1,1107	/	/	0	P, U	2	MassBank Record: RP000312
C9H11NO3	12,24	180,0664	181,0697	/	-1,1107	-1,6568	/	0	U	2	MassBank Record: RP000312
C18H30O2	20,41	277,2168	278,2202	/	-1,8036	-1,7971	/	0	P, U	2	MassBank Record: PR100632
C5H12NO4PS	7,52	212,0152	213,0182	214,0102	0,0000	-1,4083	-3,7381	0	U	3	
C10H12CINO2	8,07	212,0493	213,0511	/	4,2443	-2,8162	/	0	U	3	
C12H15NO3	14,14	220,0975	221,1012	/	-1,8174	-0,4523	/	0	U	3	
C10H13CIN2O2	2,31	227,059	228,0624	/	-1,3212	-0,8770	/	0	U	3	
C5H12NO3PS2	10,05	227,9927	228,996	/	1,7544	1,3101	/	0	U	3	
C6H15O3PS2	15,81	229,0136	230,0168	/	3,9299	3,0433	/	0	U	3	
C6H15O4PS2	11,6	245,008	246,0115	/	1,2245	2,0324	/	0	U	3	
C13H16O5	14,91	251,0916	252,0955	/	-3,5843	-1,5867	/	0	U	3	
C4H8Cl3O4P	1,21	254,9163	255,9177	/	3,9229	-3,9075	/	0	U	3	
C9H13BrN2O2	15,46	259,0095	260,0119	261,0071	2,7026	-0,7692	1,5325	0	U	3	
C6H15O5PS2	11,31	261,0027	262,0061	/	0,3831	0,7633	/	0	U	3	
C12H9CIN2O3	13,08	263,0227	264,0259	265,0186	-0,7604	-1,1363	-4,9053	0	U	3	
C14H21NO4	16,3	266,1392	267,1426	/	-2,2545	-1,8717	/	0	U	3	
C14H15N3O5	13,33	276,0906	277,0938	278,0868	-1,0866	-1,8044	-4,3152	0	U	3	
C14H18N2O4	12,76	277,1192	/	/	-0,7217	/	/	0	U	3	
C14H16CIN3O2	11,28	292,0853	/	/	-1,7118	/	/	0	U	3	
C12H15N2O3PS	21,21	297,0474	/	/	2,0199	/	/	0	P	3	
C14H17CIN2O2	13,55	300,0571	301,0594	/	2,3329	-0,9965	/	0	U	3	
C13H22NO3PS	1,84	302,0986	303,102	/	0,3310	0,3299	/	0	P, U	3	
C19H21CIN2O	20,31	327,1262	328,1293	/	-2,4455	-3,0476	/	0	P	3	
C14H17N2O4PS	8,34	339,0568	340,06	/	-1,7696	-2,0585	/	0	P	3	
C22H28N2O3	18,1	367,202	/	/	-1,9063	/	/	0	P	3	
C6H9N3O2	1,43	154,062	155,0658	/	-1,2982	1,2898	/	0	P, U	3	
C10H12O2	15,52	163,0762	164,0799	/	-1,8396	0,6095	/	0	U	3	
C6H9NO3S	3,81	174,023	/	/	0,0000	/	/	0	U	3	
C6H10CIN5	11,64	186,056	/	/	4,2998	/	/	0	P	3	
C6H7CIN2OS	5,03	188,9887	189,9918	190,9857	-4,2330	-5,2634	-4,1888	0	U	3	
C5H7CIN4S	3,95	189,0008	/	190,9978	0,5291	/	0,0000	0	U	3	
C5H5F3N4O	12,45	193,0349	/	/	3,1083	/	/	0	U	3	
C7H10N4O3	2,31	197,0676	198,071	/	-2,0298	-2,0195	/	0	P, U	3	
C7H10N4O3	10,31	197,0676	198,0711	/	-2,0298	-1,5146	/	0	U	3	
C11H13NO3	13,24	206,082	207,0854	/	-1,4557	-0,9658	/	0	U	3	
C9H11CIN4	10,6	209,0601	/	/	0,9567	/	/	0	U	3	
C9H11NO4S	11,05	228,0332	229,0367	230,0288	-1,7541	-1,3098	-2,6084	0	U	3	
C7H8N2O3S2	13,47	230,9902	/	232,9852	-0,8658	/	-4,2921	0	U	3	
C6H8CIN5OS	8,4	232,0075	233,0093	/	4,3102	-2,5750	/	0	U	3	
C12H13NO4	14,1	234,077	235,08	236,0811	-0,8544	-2,1269	-1,2707	0	U	3	
C12H15NO4	12,66	236,0926	237,0958	/	-0,8471	-1,6871	/	0	U	3	
C12H15NO4	13,21	236,0926	237,0959	/	-0,8471	-1,2653	/	0	U	3	
C10H13NO4S	11,05	242,0489	243,0522	244,0453	-1,6526	-1,6457	1,2293	0	U	3	
C13H17NO4	12,94	250,1081	251,1115	/	-1,5993	-1,1947	/	0	U	3	
C13H17NO4	14,01	250,1081	251,1122	252,1156	-1,5993	1,5929	1,5866	0	U	3	
C14H19NO4	14,89	264,1236	265,1266	/	-1,8930	-3,3946	/	0	U	3	
C13H17NO5	13,19	266,1031	267,1062	/	-1,1274	-2,2463	/	0	U	3	
C11H13CIN4O2	10,03	267,0646	/	/	-2,9955	/	/	0	U	3	
C14H15N3O3	10,69	272,1036	273,108	/	-1,8375	2,1969	/	0	U	3	
C13H17NO4S	12,29	282,0801	283,0829	/	-1,7725	-3,5325	/	0	U	3	
C13H19NO5S	14,1	300,0909	/	/	-0,6665	/	/	0	U	3	
C18H24N2O3	21,93	315,17	/	/	-4,4420	/	/	0	P	3	
C7H6O3	12,34	137,0244	138,0279	/	0,0000	0,7245	/	0	U	2	MassBank Record: EQ369653

C7H6O3	13,85	137,0243	138,0277	/	-0,7298	-0,7245	/	0	U	2	MassBank Record: EQ369653
C8H9NO2	13,12	150,056	151,0594	/	-0,6664	0,0000	/	0	U	2	
C6H6N4O2	10,9	165,0417	166,0451	167,0459	-0,6059	-0,6022	-0,5986	0	U	2	MassBank Record: PT210310
C6H6N4O2	11,04	165,0418	166,045	167,0461	0,0000	-1,2045	0,5986	0	U	3	MassBank Record: PT210310
C12H12N2O3	13,5	231,0774	232,0808	/	-0,4328	-0,4309	/	0	P	3	
C11H12N4O2S	12,07	263,0609	263,0655	/	0,3801	4,9418	/	0	U	3	
C12H9N3O5	14,81	274,0465	275,0501	/	-1,4596	-0,7271	/	0	U	3	
C14H17N5O3	12,58	302,1248	/	/	-3,6409	/	/	0	U	3	
C22H26N2O4S	14,83	413,1539	414,1568	/	-0,4841	-1,4487	/	0	P	3	
C16H16F3NO	13,41	294,1116	295,1142	/	1,7000	1,0166	/	0	U	3	
C4H8O2	4,45	87,0453	88,0486	/	1,1488	1,1357	/	0	U	3	
C4H8O2	6,24	87,0453	88,0486	/	1,1488	1,1357	/	0	U	3	
C2H4Cl2	1,26	96,9617	/	98,959	0,0000	/	2,0210	0	U	3	
C14H12O4	15,14	243,0661	244,0687	/	-0,8228	-3,6874	/	0	U	3	
C7H8O	13,89	107,0503	108,0536	109,0572	0,9341	0,0000	2,7509	0	P, U	3	
C8HF15O2	20,24	412,9651	/	/	-3,1480	/	/	0	P	3	
C9HF17O2S	21,04	462,9621	/	/	-2,3760	/	/	0	P	3	
C8HF17O3S	21,75	498,9296	499,9325	500,9255	-1,2026	-2,2003	-0,9982	0	P	2	MassBank Record: AU240562
C11HF21O2	22,56	562,9556	/	/	-2,1316	/	/	0	P	3	
C6H5F9O	11,45	263,0126	264,0154	265,0171	0,7604	-1,1363	1,8867	0	U	3	
C8H8O3	12,41	151,04	152,0434	/	-0,6621	0,0000	/	0	U	2	MassBank Record: AU237158
C9H10O3	13,39	165,0555	166,059	/	-1,2117	-0,6022	/	0	U	3	
C10H12O3	13,93	179,0711	/	/	-1,6753	/	/	0	U	3	
C7H5NO3S	10,54	181,9916	182,995	183,9872	-0,5495	-0,5465	-1,6305	0	U	3	
C14H18N2O5	10,92	293,1137	294,1168	/	-2,0470	-2,7200	/	0	U	3	
C7H8N4O2	11,98	179,0573	180,0607	/	0,0000	-0,5554	/	0	P	3	
C3HF7	18,62	168,9891	/	/	-1,7753	/	/	0	P, U	3	
C20H22O	20,04	277,1595	278,1635	/	-1,0824	1,4380	/	0	U	3	

Gli errori sulla massa dello ione monoisotopico generalmente sono inferiori a 3 ppm.

La differenza nel tempo di ritenzione dei diversi ioni del cluster isotopico è sempre irrilevante.

Come si può vedere già da queste prime due tabelle le osservazioni disponibili per i campioni di plasma sono ridotte, ciò può essere spiegato dal fatto che, mentre per le urine disponevamo di ben 6 mL, per il plasma tale quantità era ridotta ad 1 mL e probabilmente gran parte degli analiti presenti erano al di sotto del limite di rilevabilità strumentale.

Gli spettri di frammentazione non erano disponibili per ogni ione rilevato, ma quando disponibili sono stati utilizzati per incrementare la confidenza nell'identificazione. Nel momento in cui il confronto degli spettri di frammentazione con quelli presenti in un database come HMDB (Human Metabolome Database) o MassBank produceva un risultato congruente con la molecola proposta, il livello di identificazione è stato aumentato a 2.

3.2. HPLC-MS/MS

I risultati ottenuti mediante l'analisi HPLC-MS/MS non possono essere utilizzati per valutazioni quantitative, ciò è dovuto al fatto che i metodi analitici strumentali utilizzati erano già presenti in laboratorio per l'applicazione in matrici ambientali ma non validati per l'analisi degli analiti in plasma e urine.

Vista la loro disponibilità sono stati impiegati per incrementare le informazioni disponibili riguardo questi campioni e ci hanno permesso di fare alcune interessanti valutazioni di tipo qualitativo.

3.1.1. Insetticidi neonicotinoidi

La Tabella 3.3 riepiloga le osservazioni qualitative riscontrabili dalle analisi HPLC-MS/MS degli insetticidi neonicotinoidi.

Tabella 3.3: Risultati relativi agli insetticidi neonicotinoidi. BP1, BP2, BP3, BU1, BU2 e BU3 sono i bianchi procedurali di plasma e urina.

	Acetamiprid (ACE)	Imidacloprid (IMI)	Thiacloprid (TCLO)	Clothianidin (CLO)	Thiamethoxam (TMX)
BP1					
BP2					
BP3					
BU1					
BU2					
BU3					
PM1					
UM1			✓		
PM2					✓
UM2			✓	✓	✓
PM4					
UM4			✓	✓	
PM6			✓		
UM6			✓		
PM7					
UM7			✓	✓	
PVe1					
UVe1			✓		
PVe2					
UVe2			✓		
PVe5					
UVe5			✓	✓	
PVe6					
UVe6			✓	✓	
PVe7					
UVe7			✓		

Dalle analisi relative alla presenza dei neonicotinoidi risulta che solo tre dei 5 analiti target sono stati rilevati all'interno dei campioni: Thiacloprid (TCLO), Clothianidin (CLO) e Thiametoxam (TMX).

Nei bianchi procedurali sia del plasma che delle urine gli inquinanti neonicotinoidi risultano assenti.

Per la maggior parte dei soggetti in esame gli analiti sono stati trovati solamente nei campioni di urina. A sostegno di tale osservazione, Hernández et al. (2005), affermano che i pesticidi attualmente usati non sono persistenti e tendono a non bioaccumularsi, quindi tipicamente vengono metabolizzati ed escreti dal corpo in pochi giorni. Pertanto, sono usualmente monitorati nelle urine e meno frequentemente nel sangue (Hernández, et al., 2005). In particolare, gli insetticidi neonicotinoidi vengono metabolizzati e rimossi dal plasma entro poche ore, mentre nelle urine possono essere riscontrati sia i composti originali sia i loro metaboliti (Ford & Casida, 2006).

Un solo soggetto, residente nella zona di Mestre, (M2) presenta tutti e tre gli analiti nei campioni di urina. Due soggetti di Mestre (M4 e M7) e due di Venezia (Ve5 e Ve6) presentano due (TCLO e CLO) dei tre analiti. Infine, due soggetti di Mestre (M1 e M6) e tre di Venezia (Ve1, Ve2 e Ve7) presentano un solo analita (TCLO), che risulta essere il composto maggiormente trovato nei soggetti analizzati.

Gli unici due soggetti che invece presentano insetticidi neonicotinoidi sia nei campioni di plasma che in quelli di urina sono M2 e M6, indicando una probabile recente esposizione.

Molto interessante è osservare come i due soggetti M2 e M6 risultino risiedere relativamente vicini geograficamente.



Figura 3.1: Vicinanza geografica dei soggetti M2 e M6.

In generale, si può osservare come gli individui della zona di Mestre risultino presentare un maggior numero di insetticidi neonicotinoidi rispetto agli individui della zona di Venezia.

Sebbene non sia stata fatta un'analisi quantitativa, è stata comunque controllata l'area dei picchi cromatografici. Da un confronto tra le aree dei picchi dei campioni di plasma e quelle dei campioni di urina risulta che le aree dei campioni di urina sono circa 3-5 volte più grandi dell'area osservata nei campioni di plasma.

Questo potrebbe essere parzialmente spiegato dal fatto che il volume a disposizione dei campioni di urina (6 mL) era maggiore di quello dei campioni di plasma (1 mL).

3.1.2. Bisfenolo-a

Le analisi HPLC-MS/MS del bisfenolo A, purtroppo, non hanno portato a nessuna osservazione. Una possibile spiegazione risiede nel metodo di preparazione del campione utilizzato. Tale procedura di preanalitica infatti non in grado di eliminare le specie interferenti nel plasma e nell'urina, due matrici molto complesse, portando ad un'analisi caratterizzata da un elevato rumore di fondo che nasconde completamente il picco dell'analita.

3.1.3. PFAS

La Tabella 3.4 riassume le osservazioni qualitative riscontrabili dalle analisi HPLC-MS/MS dei PFAS.

Tabella 3.4: Risultati relativi ai PFAS. Per i soggetti UM4 e Uve1, l'analisi non è stata possibile a causa dell'esaurimento del campione.

	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C6S	C8S	6:2FTS	8:2FTS	6:2diPAP
BP1				✓	tracce						tracce			
BP2				✓	tracce						tracce	tracce	✓	
BP3				✓	tracce	✓					tracce	tracce	tracce	
BU1				✓	tracce						tracce	tracce	tracce	
BU2				✓	tracce						tracce	tracce	tracce	
BU3				✓	tracce					tracce		tracce	tracce	
PM1				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓
UM1	✓	✓	✓	✓	✓					✓	tracce	✓	✓	
PM2				✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	
UM2	✓		✓	✓	✓					✓	tracce	✓	✓	
PM4				✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓
UM4														
PM6				✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	tracce	✓	
UM6	✓		✓	✓	✓	tracce				✓	tracce	✓	tracce	
PM7					✓	✓	✓	✓		✓	✓	tracce	✓	
UM7	✓		✓	✓	✓					✓	tracce	✓	tracce	
PVe1				✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓
Uve1														
PVe2					✓	✓	✓	✓		✓	✓	tracce	✓	
Uve2	✓		✓	✓	✓					✓		✓	✓	
PVe5				✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	tracce	✓	
Uve5	✓		✓	✓	✓	tracce				✓	tracce	✓	✓	
PVe6					✓	✓	✓	✓		✓	✓	tracce	✓	
Uve6	✓		✓	✓	✓	tracce				✓		✓	✓	
PVe7					✓	✓	✓	✓		✓	✓	tracce	✓	
Uve7	✓		✓	✓	✓					✓		✓	✓	

Dalle analisi dei PFAS risulta che gli analiti C4S, FOSA, MeFOSAA, EtFOSAA, GenX e 8:2diPAP non sono stati rilevati all'interno di nessun campione.

I volumi dei campioni di urina dei soggetti M4 e Ve1 sono risultati insufficienti per l'iniezione del campione nello strumento e ciò ha inficiato la loro analisi, non producendo alcun risultato.

Tra i soggetti residenti a Mestre e quelli residenti a Venezia, in questo caso, non si notano grandi differenze e questo dimostra come le persone siano esposte allo stesso modo a questo tipo di contaminante. L'unico soggetto che mostra un'esposizione maggiore rispetto agli altri è M1, che risulta essere il solo a presentare gli acidi perfluoroalchil carbossilici C5 e C12.

I bianchi non sono del tutto esenti da contaminazione e presentano alcuni analiti: C7 e tracce di C8, C8S, 6:2FTS, 8:2FTS.

Per il gruppo di PFAS a catena corta (C4, C5 e C6) i bianchi risultano completamente esenti da tracce.

Risulta interessante notare che tale gruppo di PFAS a catena corta è presente unicamente nei campioni di urina. Gli analiti C4 e C6 sono presenti ubiquitariamente in tutti i soggetti, mentre l'analita C5 è stato riscontrato solamente nel soggetto M1.

L'analita C7 è rilevato sia nei bianchi che nei campioni, sia nella matrice plasma che urina.

Dal confronto tra le aree dei picchi dei campioni e quelle dei bianchi risulta che i campioni di plasma e urina in media presentano un'area doppia rispetto ai bianchi. Pertanto, nonostante sia presente una possibile contaminazione del bianco, il segnale analitico nei campioni risulta significativo.

L'analita C8 (PFOA) è stato riscontrato in tutti i campioni di plasma e urina e in tracce nei bianchi. Dal confronto tra le aree dei picchi dei campioni e quelle dei bianchi risulta che i campioni di plasma sono dalle 40 alle 500 volte superiori ai bianchi mentre i campioni di urina sono solamente dalle 3 alle 8 volte i bianchi.

Per il gruppo di PFAS a catena lunga (C9, C10, C11 e C12) i bianchi sono puliti, eccetto un unico caso di contaminazione da C9 in BP3.

Risulta interessante notare che tale gruppo a catena lunga è presente unicamente nei campioni di plasma, con tracce nelle urine per il solo C9. Gli analiti C9, C10 e C11 sono presenti ubiquitariamente in tutti i soggetti, mentre l'analita C12 è stato riscontrato solamente nel soggetto M1.

Per l'analita C6S i bianchi sono puliti, eccetto un unico caso di contaminazione: BU3.

I livelli di questo analita risultano leggermente più alti nelle urine.

L'analita C8S (PFOS) è stato riscontrato in tutti i campioni di plasma e in tracce in alcuni campioni di urina e nei bianchi.

Dal confronto tra le aree dei picchi dei campioni e quelle dei bianchi risulta che le aree dei campioni di plasma sono circa 90 volte maggiori alle aree osservate nei bianchi mentre i campioni di urina sono solamente circa 3 volte superiori ai bianchi, indicando un probabile maggior accumulo di questo composto nel sangue.

L'analita 6:2FTS è presente in tutti i campioni di urina e in alcuni campioni di plasma, tuttavia il livello è paragonabile a quello dei bianchi, risultando pertanto non significativo.

L'analita 8:2FTS è stato riscontrato in tutti i campioni di plasma e urina e in tracce nei bianchi. Dal confronto tra le aree dei picchi dei campioni di plasma e quelle dei campioni di urina risulta che i campioni di plasma sono circa 3 volte superiori ai campioni di urina.

L'analita 6:2diPAP è stato riscontrato unicamente in tre campioni di plasma: PM1, PM4 e PVe1.

Pertanto, risulta evidente, che, il gruppo di PFAS a catena corta (C4, C5 e C6) vengono escreti molto facilmente nell'urina, in accordo con quanto riportato in letteratura (Worley, et al., 2017), mentre il gruppo a catena lunga (C9, C10, C11 e C12) tende ad accumularsi preferenzialmente nel plasma (Lau, 2012). Si può osservare che, sebbene il volume disponibile per i campioni di plasma sia esiguo (1 mL), gli analiti sono identificabili.

Finora, i principali elementi strutturali perfluorurati utilizzati per la produzione di materiali di consumo si sono basati su una lunghezza di catena superiore a sei atomi di carbonio. Ciò ha portato ad un'abbondanza di acidi perfluoroalchilici con una catena alchilica pari a 8 atomi di carbonio, in particolare ad un'abbondanza di composti PFOA e PFOS (Kotthoff, et al., 2018).

Gli analiti a catena intermedia, C8 e C8S, che risultano quindi essere i PFAS più utilizzati, sono ubiquitari, infatti sono osservati sia nel plasma che nelle urine. Il confronto delle aree osservate mostra che tendono ad accumularsi in quantità maggiori all'interno del plasma, mentre i livelli urinari sono inferiori.

Alcuni studi hanno dimostrato che i composti perfluoroalchilici a catena lunga (maggiore di C6) hanno un'emivita di eliminazione molto più lunga nell'uomo (mesi o addirittura anni) rispetto ai loro omologhi a catena corta (Lau, 2012), e ciò può giustificare la loro predominante presenza nel plasma rispetto alle urine.

Un'ulteriore importante osservazione che può essere fatta riguarda l'aumento del numero e della diversità strutturale dei PFAS prodotti e commercializzati e in parallelo l'aumento della quantità di composti che non vengono individuati e rilevati con i tradizionali metodi analitici. Tuttavia, per effetto della naturale defluorurazione parziale della catena alchilica o a causa dell'attacco microbico, si sviluppano prodotti di degradazione che risultano in PFAS (acidi perfluoroalchil carbossilici e in modo minore acidi perfluoroalchil solfonici) che possono essersi accorciati di uno o due atomi di carbonio e possono riflettere in parte la composizione strutturale dei precursori (Kotthoff, et al., 2018). Poiché i PFAS a catena corta sono generalmente meno bioaccumulabili, possono essere escreti più rapidamente rispetto a quelli a catena lunga (Kotthoff, et al., 2018).

3.2. HPLC-HRMS

La Tabella 3.5 sottostante mostra i risultati relativi alla presenza dei 117 composti putativamente identificati con Xcalibur all'interno dei campioni di plasma e urina.

I composti individuati sono stati raggruppati nelle famiglie di appartenenza: composti naturali, pesticidi, farmaci, fragranze, composti industriali, PFAS, conservanti e antiossidanti, dolcificanti, composti d'uso comune e i rispettivi metaboliti.

Come si può vedere le osservazioni disponibili per i campioni di plasma sono ridotte. A nostro avviso ciò è giustificabile dal fatto che, mentre per le urine disponevamo di 6 mL, per il plasma tale quantità era ridotta ad 1 mL. In aggiunta, solo i composti più idrofobici e persistenti vengono immagazzinati nel sangue e nei tessuti adiposi, mentre i composti relativamente polari e non persistenti vengono escreti con le urine (Plassmann, et al., 2015).

Interessante è sottolineare che non si nota una netta differenza tra i campioni dei soggetti residenti a Mestre e quelli residenti a Venezia e ciò è indice di una contaminazione ubiquitaria.

I composti putativamente attribuiti verranno di seguito discussi per famiglia di appartenenza.

Tabella 3.5: Risultati relativi alle analisi HPLC-HRMS dei campioni di plasma e urina.

Famiglia	Composto	Formula bruta	PM1	PM2	PM4	PM6	PM7	Pve1	Pve2	Pve5	Pve6	Pve7	UM1	UM2	UM4	UM6	UM7	Uve1	Uve2	Uve5	Uve6	Uve7			
Composti naturali	Phenylalanine	C9H11NO2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	Tyrosine	C9H11NO3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Linoleic acid	C18H30O2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Pesticidi	Amitrol	C2H4N4																					✓		
	2,6-dimethylaniline	C8H11N											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Cyromazine	C6H10N6												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Pyroquilon	C11H11NO											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Propamocarb	C9H20N2O2			✓											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Aminocarb	C11H16N2O2												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Propoxur	C11H15NO3												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Omethoate	C5H12NO4PS															✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Chlorpropham	C10H12ClNO2												✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Carbofuran	C12H15NO3												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Metoxuron	C10H13ClN2O2																	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Dimethoate	C5H12NO3PS2												✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Demeton-S-methyl	C6H15O3PS2															✓				✓	✓	✓	✓	
	Oxydemeton-methyl	C6H15O4PS2													✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Trinexapac-ethyl	C13H16O5																	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Trichlorfon	C4H8Cl3O4P																		✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Bromacil	C9H13BrN2O2												✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	
	Demeton-S-methylsulfon	C6H15O5PS2																		✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Aclonifen	C12H9ClN2O3													✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Diethofencarb	C14H21NO4																			✓	✓	✓	✓	✓
	Metazachlor	C14H15N3O5												✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Oxadixyl	C14H18N2O4												✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Triadimefon	C14H16ClN3O2												✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Quinalphos	C12H15N2O3PS			✓																				
	Fenhexamid	C14H17Cl2NO2																						✓	✓
	Fenamiphos	C13H22NO3PS	✓					✓						✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
	Pencycuron	C19H21ClN2O	✓	✓		✓	✓																		
Pyridaphenthion	C14H17N2O4PS	✓	✓		✓	✓																			
Methoxyfenozide	C22H28N2O3			✓																					
Metab. pesticidi	2-methylguanidine	C2H7N3												✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	2-nitroguanidine	CH4N4O2															✓								
	Pirimicarb R34865	C7H11N3O											✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Bensulfuronmethyl IN-J0290	C6H9N3O2			✓								✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Carbofuran phenol	C10H12O2											✓			✓					✓	✓	✓	✓	
	Pirimicarb R31805	C8H13N3O											✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Diazinon GS 31144	C8H12N2O2											✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	P/V-54 carboxin	C6H9NO3S																							
	Atrazine-desethyl	C6H10ClN5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	N-[(2-chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]acetamide	C6H7ClN2OS												✓						✓	✓	✓	✓	✓	✓

	1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-guanidine	C5H7ClN4S																✓			
	Propachlor alcohol	C11H14NO2											✓								
	Tritosulfuron BH 635-5	C5H5F3N4O								✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Metolachlor CGA 37735	C11H15NO2																✓			
	Bensulfuronmethyl IN-T5831	C7H10N4O3			✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Metolachlor CGA 50720	C11H13NO3								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Triflusulfuron IN-M7222	C5H6F3N5O																	✓	✓	✓
	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)imidazolidin-2-ylideneamine	C9H11ClN4												✓							
	Pirimicarb R35140	C9H14N4O2								✓	✓	✓	✓								
	Bensulfuronmethyl IN-N5297	C9H11NO4S								✓	✓	✓	✓	✓	✓					✓	
	2-[(2-methylsulfanyl-1,3-thiazole-5-carbonyl)amino]acetic acid	C7H8N2O3S2											✓	✓						✓	✓
	(E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitrosoguanidine	C6H8ClN5OS																	✓		
	3-ketocarbofuran	C12H13NO4																		✓	
	3-hydroxycarbofuran	C12H15NO4								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Dimethachlor CGA 369873	C10H13NO4S								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Dimethachlor CGA 50266	C13H17NO4																		✓	✓
	Acetochlor oxanilic acid	C14H19NO4								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Dimethachlor SYN 530561	C13H17NO5												✓	✓				✓	✓	✓
	(E)-N1-[(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N2-(acetyl carbamoyl)-acetamide	C11H13ClN4O2																			
	Metazachlor BH 479-4	C14H15N3O3								✓								✓	✓	✓	✓
	Propachlor CP147935	C13H17NO4S								✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Dimethachlor CGA 354742	C13H19NO5S																		✓	
	Pinoxaden NOA 407854	C18H24N2O3			✓																
<i>Farmaci</i>	Metformin	C4H11N5										✓									✓
	Salicylic acid	C7H6O3										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Paracetamol	C8H9NO2										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Phentermine	C10H15N										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Ephedrine	C10H15NO												✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	3-methylxanthine	C6H6N4O2										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Phenylephrine	C9H13NO2										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Penicillin acid	C8H10O4										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Phenacetin	C10H13NO2																		✓	✓
	Metronidazole-OH	C6H9N3O4																		✓	✓
	Ibuprofen	C13H18O2										✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Nalidixic acid	C12H12N2O3	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓									
	Sulfamerazine	C11H12N4O2S													✓	✓					
	Nifuroxazide	C12H9N3O5													✓	✓				✓	✓
Pipemidic acid	C14H17N5O3												✓								
Diltiazem	C22H26N2O4S				✓																
<i>Metab. farmaci</i>	Norfluoxetine	C16H16F3NO												✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓

<i>Fragranze</i>	Pelargene	C13H16O				✓											✓				
	Myraldene	C13H20O															✓	✓			✓
	Amyl salicylate	C12H16O3											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Isobutavan	C12H14O4			✓	✓			✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Composti industriali</i>	Dioxane	C4H8O2											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Aniline	C6H7N											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	1,1-dichloethane	C2H4Cl2											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	N-methyl-2-pyrrolidone	C5H9NO	✓	✓	✓	✓			✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Nitrobenzene	C6H5NO2											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	N-nitrosodipropylamine	C6H14N2O											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Sec-butylbenzene	C10H14											✓		✓		✓		✓		✓
	Dimethyl-p-toluidine	C9H13N											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone	C14H12O4												✓					✓			
<i>Metab. composti industriali</i>	2-methyl-phenol	C7H8O	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>PFAS</i>	PFOA	C8HF15O2										✓	✓								
	PFNA	C9HF17O2S																			
	PFOS	C8HF17O3S	✓	✓			✓	✓	✓			✓	✓	✓							
	C11-PFA	C11HF21O2																			
<i>telomeri</i>	4:2 FTOH	C6H5F9O																			
<i>Conservanti, antiossidanti e aromi</i>	Methylparaben	C8H8O3											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Ethylparaben	C9H10O3											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Propylparaben	C10H12O3											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	3-tert-butyl-4-hydroxyanisole	C11H16O2											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Ethoxyquin	C14H19NO											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Quinoline	C9H7N											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Metab. conservanti</i>	N-nitrosopiperidine	C5H10N2O											✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Dolcificanti</i>	Saccharin	C7H5NO3S												✓	✓	✓			✓	✓	✓
	Aspartame	C14H18N2O5												✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
<i>Sostanze di uso comune</i>	Caffeine	C8H10N4O2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Metab. nicotina</i>	Cotinine	C10H12N2O	✓				✓														
<i>Metab. caffeina</i>	Theophylline	C7H8N4O2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Metab. pepe</i>	Piperine	C17H19NO3				✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Flame retardant</i>	TEP	C6H15O4P											✓					✓			✓
<i>Refrigerante</i>	Heptafluoropropane	C3HF7				✓												✓			✓
<i>Filtro UV</i>	Butyl-methoxydibenzoylmethane	C20H22O													✓	✓		✓		✓	✓

Poiché stiamo analizzando due matrici biologiche, plasma e urina, risulta normale trovare al loro interno dei composti naturali quali amminoacidi e acidi grassi. Proprio perché presenti naturalmente nel corpo umano, li possiamo riscontrare ubiquitariamente sia nel plasma che nelle urine. L'acido linoleico è un acido grasso essenziale per l'uomo, tuttavia il nostro organismo non è in grado di produrlo e pertanto viene assunto attraverso l'alimentazione. Ciò potrebbe spiegare l'assenza di tale composto in alcuni campioni.

Sebbene non sia stata fatta un'analisi quantitativa, è stata comunque controllata l'intensità di segnale dei picchi appartenenti al cluster. Da un confronto tra le intensità dei picchi cromatografici dei campioni di plasma e quelle dei campioni di urina risulta che le intensità dei campioni di urina sono circa 100 volte più grandi dell'intensità osservata nei campioni di plasma. Tutti i composti naturali sono stati identificati ad un livello 2, grazie alle alte intensità di segnale e alle frammentazioni disponibili.

Per quanto riguarda la famiglia dei pesticidi e dei loro metaboliti, ci soffermiamo sugli insetticidi neonicotinoidi: dall'analisi mediante HPLC-HRMS non è stato possibile rilevare questi composti in nessun campione, probabilmente a causa della minor sensibilità dello strumento. Infatti, l'LTQ Orbitrap XL, grazie all'elevata risoluzione (fino a 100000) e all'elevata accuratezza di massa (<2 ppm), permette di rilevare un ampio range di analiti, al contrario invece l'API 4000, grazie all'elevata sensibilità ottenuta in MRM, permette di rilevare selettivamente gli analiti target. Tuttavia, è stato possibile rilevare alcuni metaboliti degli insetticidi neonicotinoidi nei campioni di urine. Sono stati individuati 6 metaboliti del clothianidin: 2-methylguanidine (in M2, M6, Ve1, Ve2, Ve5, Ve6 e Ve7), 2-nitroguanidine (in M6), N-[(2-chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]acetamide (in M2, Ve2, Ve5, Ve6 e Ve7), 1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-guanidine (in Ve2), 2-[(2-methylsulfonyl-1,3-thiazole-5-carbonyl)amino] acetic acid (in M6, M7, Ve6 e Ve7), (E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitrosoguanidine (in Ve2); 1 metabolita dell'imidacloprid: 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)imidazolidin-2-ylideneamine (in M6); e 1 metabolita dell'acetamiprid: (E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2-(acetylcarbamoil)-acetamidine (in M7).

Tutti i pesticidi e i metaboliti sono stati putativamente identificati al livello 3, in quanto, vista la bassa intensità del segnale, lo strumento non è stato in grado di isolare e frammentare lo ione, oppure pur avendo la frammentazione del composto ricercato non è stato trovato nei database online il corrispondente spettro di frammentazione.

La maggior parte dei pesticidi individuati sono stati riscontrati nelle urine, in accordo con quanto riportato da Hernández et al. (2005), i pesticidi attualmente in uso non sono persistenti e tendono a non bioaccumulare e quindi ad essere escreti dal corpo in pochi giorni dall'assunzione tramite le urine. Alcuni pesticidi, formati per esempio da composti organoclorurati persistenti, sono stati riscontrati nel plasma, in accordo con il fatto che sono composti lipofili e tendono a bioaccumulare nel sangue e nei tessuti adiposi dell'organismo (Hernández, et al., 2005).

Tutti i metaboliti dei pesticidi sono stati riscontrati in campioni di urina, con l'unica eccezione dell'atrazine desethyl, che è presente sia nell'urina che nel plasma. Non sono stati trovati riferimenti in letteratura, ma la sua derivazione dall'atrazine, un pesticida molto persistente appartenente alla classe delle clorotriazine, potrebbe spiegare la sua ubiquitarietà.

Solitamente sono stati riscontrati o i pesticidi o i relativi metaboliti, l'unica eccezione è rappresentata dal pesticida carbofuran, presente in tutti i campioni di urina, e dai suoi tre metaboliti rilevati (carbofuran phenol, 3-ketocarbofuran e 3-hydroxycarbofuran).

Tutti i composti appartenenti alla famiglia dei farmaci e dei loro metaboliti generalmente vengono rapidamente assorbiti e distribuiti nel corpo dopo la somministrazione orale e sono facilmente escreti nelle urine (Atta, et al., 2011), come mostrano appunto le osservazioni in Tabella 3.5.

Le uniche eccezioni in tabella sono rappresentate dal nalidixic acid (un antibatterico microbicide) e dal diltiazem (un farmaco utilizzato nel trattamento dell'ipertensione). Il loro comportamento non ha trovato giustificazione nella letteratura in quanto molto scarsa.

Due farmaci, salicylic acid (un ormone vegetale utilizzato per la cura di diversi problemi della pelle) e 3-methylxanthine (un farmaco utilizzato per combattere i sintomi dell'asma), sono stati identificati al livello 2, grazie alle alte intensità di segnale e alle frammentazioni disponibili.

Relativamente alla famiglia delle fragranze, i composti che ne fanno parte una volta assorbiti si distribuiscono nel sangue (Wang, 2013) per poi essere escreti con le urine.

Anche i composti appartenenti alla famiglia dei composti industriali sono stati riscontrati prevalentemente nella matrice urina, con l'eccezione di un unico composto (N-methyl-2-pyrrolidone).

Per quanto riguarda la famiglia dei PFAS, confrontiamo i risultati ottenuti con la tecnica analitica HPLC-HRMS con quelli relativi alla tecnica analitica HPLC-MS/MS. Dall'analisi mediante HPLC-HRMS non è stato possibile rilevare i PFAS in nessun campione di urina, invece sono stati individuati all'interno dei campioni di plasma solamente i PFAS a catena medio-lunga. Come visto in precedenza il gruppo a catena lunga tende ad accumularsi preferenzialmente nel plasma in quanto formato da composti idrofobici e persistenti che presentano un'emivita di eliminazione molto lunga nell'uomo (mesi/anni) (Lau, 2012).

Gli analiti a catena intermedia, C8 e C8S, che risultano essere i PFAS più utilizzati, sono ubiquitari, infatti sono stati osservati sia nel plasma che nelle urine (HPLC-MS/MS), tuttavia tendono ad accumularsi in quantità maggiori all'interno del plasma, mentre le concentrazioni urinarie sono ridotte. Probabilmente per questo motivo non sono rilevati mediante HPLC-HRMS. Risultato interessante è la specie a m/z 264,019669, associabile al telomero a catena corta, 4:2FTOH, che è stato rilevato all'interno di due campioni di urina UM2 e UM4.

I composti appartenenti alla famiglia dei conservanti, antiossidanti e aromi e ai loro metaboliti sono stati rilevati unicamente all'interno della matrice urina.

Poiché sono stati rilevati all'interno di tutti i campioni, possiamo supporre che tali composti siano ubiquitari. Infatti, al giorno d'oggi tutti noi siamo esposti a queste sostanze contenute in cibi, bevande e prodotti per la cura personale.

Anche per la famiglia dei dolcificanti i composti individuati sono stati riscontrati solamente all'interno della matrice urina.

La sostanza di uso comune individuata come caffeina è stata osservata in tutti i campioni di plasma e urina. Da un confronto tra le intensità dei picchi osservati nei campioni di plasma e quelle nei campioni di urina risulta che queste ultime sono equivalenti. La caffeina è stata identificata ad un livello 2, grazie alle alte intensità di segnale e alle frammentazioni disponibili. Fra i metaboliti dei composti comunemente utilizzati, il metabolita della caffeina, la theophylline, come il composto genitore, si presenta in tutti i campioni di plasma e urina. È stato identificato al livello 3 in quanto le intensità di segnale erano basse e non erano disponibili le frammentazioni. Invece i metaboliti della nicotina (cotinina) e del pepe (piperina) sono stati identificati ad un livello 2, grazie alle alte intensità di segnale e alle frammentazioni disponibili e sono stati riscontrati unicamente all'interno del plasma. La cotinina è stata osservata nel plasma dei soggetti M1 e M6 probabili fumatori.

4. Conclusioni

Il presente lavoro di tesi finalizzato all'individuazione di diversi microinquinanti emergenti nei liquidi biologici è stato realizzato grazie alla collaborazione tra l'Università Ca' Foscari Venezia, l'Istituto di Scienze Polari CNR e l'Ospedale Civile di Venezia.

Per le analisi sono stati utilizzati campioni di plasma e di urina umani, forniti dal laboratorio analisi dell'Ospedale Civile di Venezia. I soggetti sono stati selezionati in base alle probabilità di esposizione alle varie classi di contaminanti, scegliendo maschi di età compresa fra 40 e 65 anni. Al fine di studiare come la l'area geografica possa influire sulla distribuzione degli inquinanti tra la popolazione, sono stati scelti soggetti residenti nel centro storico di Venezia e soggetti residenti nella zona limitrofa e rurale di Mestre.

Nel corso del presente lavoro di tesi sono state utilizzate due diverse tecniche analitiche finalizzate: una (HPLC-HRMS) alla ricerca all'interno di campioni biologici di un ampio numero di contaminanti organici e l'altra (HPLC-MS/MS) alla ricerca target di tre classi di microinquinanti organici emergenti, quali insetticidi neonicotinoidi, bisfenolo A e PFAS.

La tecnica analitica HPLC-HRMS, grazie all'elevata risoluzione (fino a 100000) e all'elevata accuratezza di massa (<2 ppm), ha permesso di identificare putativamente un gran numero di contaminanti (livello di identificazione 3) e, grazie agli spettri di frammentazione, ha permesso per alcuni di questi di confermarne l'identità ad un maggior livello di confidenza (livello di identificazione 2). Il passo successivo per i composti con un'identità confermata a livello 2 sarà quello di renderli analiti target mediante l'utilizzo di standard interni in indagini future.

L'analisi effettuata impiegando la tecnica HPLC-MS/MS, nonostante fosse stata sviluppata per matrici ambientali, si è dimostrata efficiente nell'analisi degli insetticidi neonicotinoidi e dei PFAS, mentre la procedura preparativa si è dimostrata inadeguata per l'analisi del bisfenolo A, in quanto la complessità della matrice sia di plasma che di urina non ha permesso la rilevazione del picco cromatografico a causa dell'elevato rumore di fondo, inficiandone l'analisi.

I dati grezzi acquisiti mediante HPLC-HRMS sono stati elaborati e confrontati con il database di contaminanti costruito in laboratorio: sono state individuate circa 300 specie ioniche come possibili sospetti. Tali specie sono quindi state esaminate e valutate utilizzando Xcalibur.

I dati ottenuti sono stati, quando disponibili, confrontati con database online quali Pubchem, MassBank, Human Metabolome Database e DrugBank. Alle specie ioniche osservate sperimentalmente sono state putativamente assegnati complessivamente 117 composti.

Le osservazioni disponibili per i campioni di plasma sono ridotte per tutte le analisi condotte, una possibile parziale spiegazione risiede nella scarsa quantità di plasma (1 mL) disponibile rispetto a quella di urine di 6 mL.

Per la maggior parte dei soggetti in esame gli insetticidi neonicotinoidi sono stati rilevati solamente nei campioni di urina. Poiché, come riportato in letteratura, la maggior parte dei pesticidi attualmente utilizzati non sono persistenti e tendono a non bioaccumularsi, tipicamente vengono metabolizzati ed escreti dal corpo in pochi giorni. Perciò, solitamente sono monitorati nelle urine e meno frequentemente nel sangue. In particolare, gli insetticidi neonicotinoidi vengono metabolizzati e rimossi dal plasma entro poche ore, mentre nelle urine possono essere riscontrati sia i composti originali sia i metaboliti. Altri pesticidi, formati per esempio da composti organoclorurati persistenti, sono stati riscontrati nel plasma, in accordo con il fatto che sono composti lipofili e tendono a bioaccumulare nel sangue e nei tessuti adiposi dell'organismo. Un comportamento simile è stato osservato anche per le famiglie dei farmaci e delle fragranze.

Per quanto riguarda la famiglia dei conservanti, antiossidanti e aromi e dei loro metaboliti, i composti che ne fanno parte, poiché sono composti con i quali veniamo comunemente in contatto, sono stati osservati nelle urine di tutti i soggetti.

Per quanto riguarda la famiglia dei PFAS, il gruppo di composti a catena lunga tende ad accumularsi preferenzialmente nel plasma in quanto formato da composti idrofobici e persistenti che presentano un'emivita di eliminazione molto lunga nell'uomo (mesi/anni). È preoccupante come tale osservazione sia possibile nonostante il volume disponibile per i campioni di plasma sia esiguo (1 mL). Gli analiti a catena intermedia, C8 e C8S, che risultano essere i PFAS più utilizzati, sono ubiquitari, infatti sono stati osservati sia nel plasma che nelle urine, tuttavia tendono ad accumularsi principalmente nel plasma, e a livelli inferiori nelle urine. Il gruppo di PFAS a catena corta tende invece ad essere escretato molto facilmente attraverso l'urina.

Per concludere riguardo ai risultati ottenuti non si notano differenze significative nella presenza degli analiti nei campioni dei soggetti residenti a Mestre e in quelli dei residenti a Venezia e ciò porta a supporre una contaminazione ubiquitaria in quanto le persone sono esposte allo stesso modo a queste tipologie di contaminanti.

La tecnica analitica e l'approccio impiegato hanno grandi potenzialità: questo studio ha permesso un'individuazione putativa con diversi gradi di confidenza di una serie di analiti che possono essere i composti target e i loro metaboliti, oltre a metaboliti noti di altri composti non direttamente rilevati. Oltre a ciò, l'acquisizione in full scan in alta risoluzione permetterà in ogni momento la post elaborazione dei dati per ricercare nuovi composti non studiati in un primo momento. La sfida futura sarà, basandosi su altri farmaci e composti antropogenici noti, concentrare la ricerca, considerando i percorsi metabolici, su altri metaboliti incogniti che in questa fase non sono stati osservati e che possono essersi formati all'interno dell'organismo.

5. Bibliografia

- AB SCIEX. (2010). API 4000 LC/MS/MS System Hardware Manual.
- Atta, N. F., Galal, A., & Azab, S. M. (2011). Electrochemical Determination of Paracetamol Using Gold Nanoparticles - Application in Tablets and Human Fluids. *International Journal of Electrochemical Science*, 5082-5096.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78-87.
- Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., de Voogt, P., . . . van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*, pp. 513-541.
- Buscher, B., Van de Lagemaat, D., Gries, W., Beyer, D., Markham, D. A., Budinsky, R. A., . . . Hentges, S. G. (2015). Quantitative analysis of unconjugated and total bisphenol A in human urine using solid-phase extraction and UPLC-MS/MS: Method implementation, method qualification and troubleshooting. *Journal of Chromatography B*, pp. 30-38.
- Dalla Barba, S. (Anno Accademico 2019/2020). Analisi di Neonicotinoidi e Bisfenolo A in Acqua e Sedimento della Laguna di Venezia. *Tesi di Laurea*.
- Decisione di Esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione
- Decisione di Esecuzione (UE) 2018/840 della Commissione
- Dianin, A. P. (1891). Zhurnal russkogo fiziko-khimicheskogo obshchestva. p. 492.
- Direttiva 2008/105/CE
- Drugbank*. (2020, 01). Retrieved from <https://www.drugbank.ca>
- Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J., Creek, D. J., Brown, M., Breitling, R., . . . Viant, M. R. (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, pp. 44-66.
- EFSA. (2011). Results of the monitoring of perfluoroalkylated substances in food in the period 2000-2009. *EFSA Journal*.
- EFSA. (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal*.
- Fishel, F. M. (2019). Pesticide Toxicity Profile: Neonicotinoid Pesticides. UF/IFAS Extension.
- Ford, K. A., & Casida, J. E. (2006). Chloropyridinyl Neonicotinoid Insecticides: Diverse Molecular Substituents Contribute to Facile Metabolism in Mice. *Chem. Res. Toxicol.*, 944-951.

- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015, January). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, pp. 147-156.
- Han, W., Tian, Y., & Shen, X. (2018). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*, 59-65.
- Hernandez, F., Sancho, J. V., & Pozo, O. J. (2005). critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Anal Bioanal Chem*, p. 934:946.
- HMDB*. (2020, 01). Retrieved from <http://www.hmdb.ca>
- Industry Experts. (2016). *Bisphenol A- A Global Market Overview*.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 2897-2908.
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., & Kawano, H. (2012). Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats.
- Kotthoff, M., & Bucking, M. (2018). Four Chemical Trends Will Shape the Next Decade's Directions in Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances Research. *Frontiers in Chemistry*.
- Krauss, M., Singer, H., & Hollender, J. (2010). LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknown. *Anal Bioanal Chem*, 943-951.
- Lau, C. (2012). Perfluoroalkyl acids: Recent research highlights. *Reproductive Toxicology*, 405-409.
- Makarov, A., & Scigelova, M. (2010). Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, pp. 3938-3945.
- Manisali, I., Chen, D. D., & Schneider, B. B. (2006). Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 243-256.
- MassBank*. (2020, 01). Retrieved from <https://massbank.eu/MassBank/Search>
- Perry, R. H., Cooks, R. G., & Noll, R. J. (2008). Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion and Applications. *Mass Spectrometry Review*, 661-699.
- Plassmann, M. M., Brack, W., & Krauss, M. (2015). Extending analysis of environmental pollutants in human urine towards screening for suspected compounds. *Journal of Chromatography A*, 18-25.
- Pubchem*. (2020, 01). Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Rose, P. H. (2012). Nicotine and the Neonicotinoids. In *Mammalian Toxicology of Insecticides* (pp. 184-220). Marrs TC editor.

- Sánchez-Bayo, F. (2014). The trouble with neonicotinoids. *Science*, pp. 806-807.
- Schymanski, E. L., Singer, H. P., Slobodnik, J., Ipolyi, I. M., Oswald, P., Krauss, M., . . . Hollender, J. (2015). Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal Bioanal Chem*, pp. 6237-6255.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2016). *Identificazione spettrometrica di composti organici*. Casa Editrice Ambrosiana.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2009). *Chimica analitica strumentale*. Edises.
- Taira, K., Fujioka, K., & Aoyama, Y. (2013). Qualitative Profiling and Quantification of Neonicotinoid Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *PLOS one*.
- Thermo Fisher Scientific. (2008). LTQ Orbitrap XL - Hardware Manual.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). LTQ Orbitrap XL - Getting started Tune Plus 2.5.5.
- Thermo Fisher Scientific. (2014). SIEVE, User Guide Version 2.2.
- Thermo Scientific. (2012). Xcalibur- Qualitative Analysis User Guide.
- USEPA. (2016). *Drinking Water Health Advisory for Perfluorooctane Sulfonate (PFOS)*. Washington, DC 20460: U.S. Environmental Protection Agency .
- USEPA. (2016). *Drinking Water Health Advisory for Perfluorooctanoic Acid (PFOA)*. Washington, DC 20460: U.S. Environmental Protection Agency.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, pp. 139-177.
- Vogel, S. A. (2009). The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A "Safety". *American Journal of Public Health*, pp. 559-566.
- Wang, J., Shi, Y., Pan, Y. Y., & Cai, Y. (2010). Perfluorinated compounds in milk, milk powder and yoghurt purchased from markets in China. *Chinese Science Bulletin*, pp. 1020-1025.
- Wang, L. (2013). Fragrances: from essential oils to the human body and atmospheric aerosols. *Analytical Methods*, pp. 316-322.
- Worley, R. R., Moore, S. M., Tierney, B. C., Ye, X., Calafat, A. M., Campbell, S., . . . Fisher, J. (2017). Per- and polyfluoroalkyl substances in human serum and urine samples from a residentially exposed community. *Environment International*, 135-143.
- WWF, TOXIC CHEMICALS. http://wwf.panda.org/about_our_earth/teacher_resources/webfieldtrips/toxics/.
- Yamamoto, I. (1999). Nicotine to nicotinoids: 1962 to 1997. In *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* (pp. 3-27). Springer Japan.

Zhang, Q., Li, Z., Chang, C. H., Lou, J. L., Zhao, M. R., & Lu, C. (2018). Potential human exposures to neonicotinoid insecticides: A review. *Environmental Pollution*, pp. 71-81.

Zhang, Q., Wang, X., Li, Z., Jin, H., Lu, Z., Yu, C., . . . Zhao, M. (2018). Simultaneous determination of nine neonicotinoids in human urine using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*, pp. 647-652.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare infinitamente la Dottoressa Roberta Zangrando per la disponibilità, la pazienza, il sostegno e il tempo dedicatomi per il tirocinio e la realizzazione di questa tesi. Sempre pronta a rispondere a qualsiasi domanda, è stata per me un punto di riferimento durante tutto il lavoro.

Grazie alla Dottoressa Lucia Bartoloni per avermi seguita, supportata e per avermi aperto le porte del laboratorio analisi dell'Ospedale Civile di Venezia.

Desidero ringraziare il Professor Andrea Gambaro per aver reso possibile la realizzazione di questo progetto di tesi. Grazie per le spiegazioni e le delucidazioni che mi hanno aiutata a migliorare questo lavoro.

Un profondo e caloroso ringraziamento alla mia famiglia che in questi anni ha sempre creduto in me e mi ha permesso di arrivare fin qui.

Ai miei compagni di corso, con i quali ho trascorso giornate passate a studiare, ore di lezione e affrontato esami, perché in compagnia sembra tutto un po' più facile. Alle mie colleghe e amiche, che hanno reso moltissime giornate lavorative molto più che semplici giornate di lavoro, grazie di avermi dimostrato il vostro affetto ogni volta che abbiamo avuto occasione di vederci, sostenendomi sempre positivamente nel mio percorso di studi.

Ai miei amici, quelli di sempre, per l'affetto e per avermi "sopportato" anche nei momenti più impegnativi.