



Università
Ca'Foscari
Venezia

Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali

Curriculum: Controllo e risanamento dell'ambiente

Tesi di laurea

**Caratterizzazione *target* e *untarget* dei lipidi e
ricerca di inquinanti organici in tracce nelle
secrezioni dell'uropigio dell'alzavola (*Anas crecca*)**

Relatori

Prof. Marco Picone

Prof. Rossano Piazza

Correlatrice

Dott.ssa Elena Argiriadis

Laureando

Andrei Munteanu

Matricola 858102

Anno accademico

2021/2022

Indice

Scopo e struttura del lavoro	4
1 Introduzione	5
1.1 Alzavola (<i>Anas crecca</i> Linnaeus, 1758).....	5
1.1.1 Areale di distribuzione.....	5
1.1.2 Habitat.....	6
1.1.3 Dieta.....	6
1.1.4 Stato di conservazione.....	7
1.2 Secrezioni dell'uropigio.....	8
1.2.1 Ghiandola uropigiale.....	8
1.2.2 Biochimica e biosintesi delle secrezioni dell'uropigio.....	9
1.2.2.1 Lipidi: definizione e classificazione adottata.....	9
1.2.2.1.1 Classi di grassi acilici nelle secrezioni dell'uropigio: acidi grassi, alcoli grassi e cere....	11
1.2.2.1.2 Classe degli steroli e loro derivati nelle secrezioni dell'uropigio.....	15
1.2.3 Fisiologia delle secrezioni dell'uropigio.....	15
1.2.3.1 Mantenimento del piumaggio.....	16
1.2.3.2 Protezione da microrganismi.....	16
1.2.3.3 Impermeabilizzazione.....	16
1.2.3.4 Comunicazione intraspecifica.....	17
1.3 Inquinanti organici persistenti (POPs).....	17
1.3.1 Policloro bifenili (PCB).....	20
1.3.2 Idrocarburi policiclici aromatici (IPA).....	25
1.4 Biomonitoraggio dei POPs con gli uccelli.....	28
1.5 Secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne come matrice di indagine per l'analisi dei lipidi e dei POPs.....	31
1.6 Obiettivi della tesi.....	33
2 Materiali e metodi	35
2.1 Campionamento.....	35
2.2 Solventi, reagenti e standard.....	35
2.3 Strumentazione e materiali.....	36
2.3.1 Sonicatore.....	36
2.3.2 Evaporatore ad aghi.....	37
2.3.3 Gascromatografo accoppiato ad un analizzatore di massa a singolo quadrupolo (GC-MS) ...	37
2.3.4 Gascromatografo accoppiato ad un analizzatore di massa a triplo quadrupolo (GC-MS/MS)	38
2.4 Quantificazione.....	38
2.5 Ottimizzazione del metodo analitico.....	39
2.5.1 Metodo #1.....	39
2.5.1.1 Fase preanalitica.....	40

2.5.1.2	Analisi strumentale.....	42
2.5.1.3	Discussione del metodo #1.....	43
2.5.2	Metodo #2	44
2.5.2.1	Fase preanalitica.....	44
2.5.2.2	Analisi strumentale.....	45
2.5.2.3	Discussione del metodo #2.....	45
3	Risultati.....	46
3.1	Caratterizzazione <i>untarget</i>	46
3.1.1	Cere.....	47
3.1.2	Acidi grassi e alcoli.....	51
3.2	Caratterizzazione <i>target</i>	53
3.2.1	Acidi grassi	54
3.2.2	Steroli.....	60
3.2.3	PCB.....	63
3.2.4	IPA.....	69
4	Discussione.....	72
5	Conclusioni.....	76
	Bibliografia	77
	Appendice.....	89

Scopo e struttura del lavoro

Lo scopo principale del presente lavoro di tesi è la caratterizzazione *target* e *untarget* dei lipidi, in particolare cere, acidi grassi e steroli, e la determinazione di inquinanti organici persistenti (POPs), nello specifico policloro bifenili (PCB) e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola (*Anas crecca* Linnaeus, 1758).

Il capitolo introduttivo fornisce una panoramica su: l'ecologia dell'alzavola; l'origine, la biosintesi, la biochimica e la fisiologia delle secrezioni dell'uropigio; le sorgenti, le caratteristiche chimico-fisiche, le dinamiche ambientali e gli effetti tossici dei POPs, con particolare riferimento ai PCB e agli IPA; l'interesse e l'applicabilità degli uccelli nel biomonitoraggio dei POPs; e infine, le motivazioni e giustificazioni per l'utilizzo delle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne come matrice di indagine per l'analisi dei lipidi e dei POPs.

Nel capitolo successivo, dopo la descrizione dell'approccio adottato per il campionamento e degli strumenti utilizzati, vengono esposte le fasi di ottimizzazione del metodo analitico che hanno consentito la determinazione di tutte le classi di composti organici di interesse.

Nel terzo capitolo, vengono riportati i risultati ottenuti dall'analisi delle secrezioni dell'uropigio da campioni di penne prelevate da esemplari di alzavola nella Laguna di Venezia.

Il quarto capitolo è dedicato alla discussione e interpretazione dei risultati in relazione alla posizione delle penne prelevate, l'habitat, la dieta, il periodo migratorio, il genere e l'età degli individui di alzavola.

Il capitolo finale riassume in breve i punti salienti da trarre dal presente lavoro di tesi.

1 Introduzione

1.1 Alzavola (*Anas crecca* Linnaeus, 1758)

L'alzavola (*Anas crecca* Linnaeus, 1758) (**Figura 1.1**) è un uccello (*Aves* Linnaeus, 1758), appartenente alla famiglia *Anatidae*, di minute dimensioni e dalla forma compatta. Gli esemplari adulti raggiungono una lunghezza di circa 34-43 cm, e un peso medio di 360 g per i maschi e di 340 g per le femmine [1,2].



Figura 1.1 Esemplari di femmina (sinistra) e maschio (destra) di alzavola in livrea riproduttiva

1.1.1 Areale di distribuzione

L'areale di distribuzione dell'alzavola è l'ecozone paleartica nella quale manifesta il suo carattere migratorio. In particolare, l'areale si estende dalla Russia e Finlandia, fino alla Spagna meridionale, all'Italia, al confine settentrionale del Mar Nero e all'Africa. L'alzavola si riproduce intorno alle medie latitudini del Paleartico e per lo più sverna molto a sud del suo areale di riproduzione. Tuttavia, nei climi più miti dell'Europa temperata, gli areali estivi e invernali si sovrappongono. Ad esempio, nel Regno Unito e in Irlanda si osserva una piccola popolazione durante tutto l'anno, che in inverno cresce con l'arrivo di uccelli provenienti dalle zone siberiane [1,3,4]. In inverno, si registrano alte densità intorno al Mediterraneo, compresa l'Italia e l'alto Adriatico che accolgono esemplari svernanti provenienti principalmente dalla Siberia, dalla Russia occidentale e dalla Fennoscandia [5]. Nella Laguna di Venezia gli svernanti si aggirano in media attorno ai 190000 individui negli ultimi anni, raggiungendo regolarmente almeno l'1% della popolazione del Paleartico [6], mentre i nidificanti sono rappresentati al massimo da una decina di coppie [7]. La migrazione primaverile degli individui svernanti nella Laguna di Venezia inizia a febbraio protraendosi fino ad aprile, e si conclude con il raggiungimento delle zone di riproduzione in Russia e Fennoscandia entro maggio e giugno. La migrazione autunnale post-riproduttiva decorre da agosto agli inizi di novembre per

quanto riguarda il periodo di partenza dalle zone di riproduzione, con arrivo e permanenza nelle zone di svernamento da ottobre a febbraio [1,5,8–10].

1.1.2 Habitat

L'alzavola occupa una vasta gamma di habitat acquatici durante l'anno, in gran parte determinati dalla disponibilità di cibo. Si adatta a qualunque tipo di habitat acquatico, tranne le acque profonde, prive di vita o con correnti troppo forti e agitate. Durante la stagione riproduttiva tende a scegliere acque eutrofiche che garantiscono un ottimo apporto di cibo e nutrienti. Esemplari di alzavola si ritrovano dai laghi delle foreste boreali, agli stagni delle praterie e ai delta della tundra. Predilige distribuirsi nelle zone umide d'acqua dolce riparate con vegetazione ad alto fusto, come le torbiere della taiga o i piccoli laghi e stagni con estesi canneti. La maggior parte degli esemplari si riproduce in stagni di boschi con una fitta copertura circostante. L'alta vegetazione fornisce una protezione eccezionale per la zona di nidificazione: il nido è una profonda cavità rivestita di foglie secche e piume, costruita in una fitta vegetazione vicino all'acqua. Durante la migrazione, si ferma vicino a tutti i tipi di corpi idrici, tra cui paludi, stagni, laghi, campi coltivati allagati e fiumi. In inverno, è spesso presente in acque salmastre e persino in insenature e lagune riparate lungo la costa. Nelle aree di svernamento, si trovano tipicamente presso le coste, in acque salmastre piuttosto che in acque salate profonde e aperte. In particolare, i delta dei fiumi forniscono una notevole quantità di nutrienti agli uccelli, rendendoli un habitat ideale [1,4,8,11]

1.1.3 Dieta

Le alzavole, durante il giorno, trascorrono la maggior parte del tempo nei luoghi di alimentazione fino al tramonto, quando tornano al nido. Durante la stagione riproduttiva sono tendenzialmente diurne, mentre in inverno, nelle zone di svernamento meridionali, le alzavole si nutrono talvolta nelle ore crepuscolari o addirittura di notte per evitare la competizione tra le specie più grandi che utilizzano le stesse fonti di cibo. Viste le loro dimensioni ridotte e le loro tendenze migratorie, devono foraggiare molto, per cui è probabile che scelgano il momento più vantaggioso per farlo. L'alzavola si procura l'alimento perlustrando tra la vegetazione dove l'acqua è profonda pochi centimetri, immergendo la testa e a volte anche tuffandosi per raggiungere il cibo più in profondità. Sfiando la superficie dell'acqua con il becco e facendo scorrere l'acqua attraverso il becco,

intrappola il cibo con le sporgenze a pettine finemente distanziate, chiamate lamelle, poste sui bordi del becco [1,4,12].

L'alzavola è una specie essenzialmente onnivora, con notevole variabilità nella dieta dipendente da tipo di habitat, ora del giorno, stagione, clima e sesso. La richiesta giornaliera di cibo è di circa 20-30 g in peso fresco, che corrisponde a più o meno 7-8% del peso corporeo. Si nutrono di insetti, larve, crostacei, molluschi, vermi, semi, vegetazione acquatica sia sopra che sotto la superficie dell'acqua. In inverno, le alzavole sono prevalentemente granivore, nutrendosi di semi di piante acquatiche ed erbe che costituiscono quasi il 95% della loro dieta in alcune popolazioni. I semi di cui si nutre hanno dimensioni comprese tra 1 e 2.6 mm e possono appartenere anche a più di 30 specie diverse in relazione all'habitat di residenza. Nella stagione riproduttiva si nutre principalmente di invertebrati acquatici, come crostacei, insetti e loro larve, molluschi e vermi. La dieta dei giovani è composta per il 90% da larve di insetti fino a 14 giorni di età. [1,4,11,12].

1.1.4 Stato di conservazione

L'alzavola risulta tra gli anatidi più abbondanti in Europa, con un numero di coppie riproduttive che si aggira tra le 560000 e le 920000 [13]. In relazione allo stato di conservazione, l'IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) classifica infatti l'alzavola come una specie di minima preoccupazione [14]. Tuttavia, una regolamentazione in un'ottica conservazionistica e gestionale della specie è prevista vista la sua menzione nelle Convenzioni di Berna e di Bonn [15,16]. L'alzavola è inoltre una delle specie a cui si applica l'Accordo sulla conservazione degli uccelli acquatici migratori afro-euroasiatici (*African-Eurasian Migratory Waterbird Agreement-AEWA*) che ha lo scopo di conservare e proteggere gli uccelli acquatici migratori che sono ecologicamente dipendenti dalle zone umide lungo le loro rotte migratorie per almeno una parte del loro ciclo annuale [17]. Il lento declino registrato per alcune popolazioni europee e la mancanza di informazioni sulle tendenze generali, tuttavia non giustificano interventi diversi dal monitoraggio e da una migliore protezione dell'habitat nelle zone di distribuzione. L'alzavola è infatti inserita nell'allegato II parte A e nell'allegato III della "Direttiva 2009/147/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 concernente la conservazione degli uccelli selvatici" che ne consente la caccia, sotto regolamentazione dagli Stati Membri, purché non se ne pregiudichi la conservazione. Nell'allegato III della suddetta direttiva viene specificato che gli Stati Membri possono inoltre autorizzare (prevedendo eventualmente alcune restrizioni) il trasporto e la detenzione di uccelli vivi o morti e/o

di parti riconoscibili per la successiva vendita, purché siano stati cacciati, catturati o acquistati legalmente [18].

1.2 Secrezioni dell'uropigio

Il tegumento degli uccelli presenta caratteristiche strutturali e funzionali uniche tra i vertebrati terrestri [19–21]. La funzione secretiva del tegumento aviario è espletata dall'epidermide e da ghiandole tegumentarie. Le capacità secretive dell'epidermide, attribuite a cellule cutanee che rilasciano secrezioni sebacee, sono note soltanto da un punto di vista funzionale [22–24]. La ghiandola uropigiale, insieme alle ghiandole del condotto uditivo e a quelle della regione dell'urodeo, rappresentano le unità secretorie discrete della cute con un profilo ghiandolare anatomicamente ed istologicamente accettato [19,22,25].

1.2.1 Ghiandola uropigiale

La ghiandola uropigiale è una ghiandola sebacea a secrezione olocrina [26], in cui l'intera cellula dopo aver accumulato il prodotto di sintesi è eliminata, costituendo essa stessa il secreto [27]. L'uropigio è presente nella maggior parte degli uccelli esaminati fino ad oggi, con alcune eccezioni riguardanti le famiglie *Struthionidae*, *Rheidae*, *Casuariidae*, *Dromaiidae*, *Mesoenatidae*, *Otidae*, *Columbidae*, *Psittacidae*, *Podargus* e *Picidae*, nelle quali sono riportate casi di assenza dell'uropigio in relazione ad alcuni *taxa* ed al ciclo vitale (fase embrionale e adulta) [28].

L'uropigio è accolto nel tegumento degli uccelli e posto dorsalmente alla base della coda, tra la quarta vertebra caudale e il pigostilo. La morfologia delle ghiandola uropigiale è contraddistinta da un'elevata variabilità interspecifica per quanto riguarda la grandezza, la forma, il numero e la presenza di alcune strutture [22,26,28]. Il complesso ghiandolare è generalmente composto da due lobi, più raramente da uno o tre [22,28], e da una papilla. I lobi sono rivestiti esternamente da un tessuto connettivo di fibre di collagene relativamente elastiche, noto come capsula. La parte interna dei lobi è formata dai tessuti epiteliali ghiandolari, costituiti dalle cellule sebacee responsabili della produzione delle secrezioni, disposti in modo tale da definire un sistema di cavità e condotti tubulari più o meno ramificato. Il sistema di condotti tubulari convoglia le secrezioni dalle zone periferiche più ramificate verso la papilla, all'estremità della quale raggiungono la superficie del corpo attraverso un numero variabile di orifizi spesso circondati da un ciuffo di penne (**Figura 1.2**) [22,26,28].

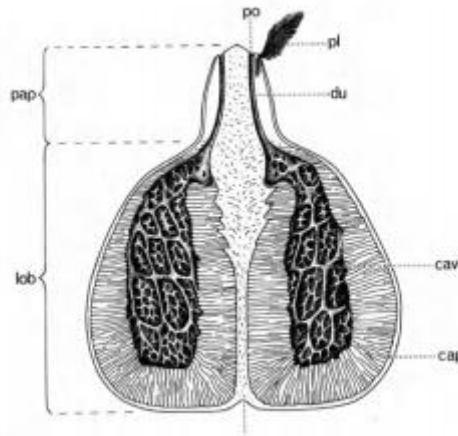


Figura 1.2 Generica rappresentazione della ghiandola uropigiale. lob=lobi, pap=papilla, cap=capsula, cav=cavità tubulari, du=condotti tubulari, pl=ciuffi di penne, po=orifici [26]

1.2.2 Biochimica e biosintesi delle secrezioni dell'uropigio

Le secrezioni dell'uropigio sono costituite da una miscela di composti organici, caratterizzata principalmente da una componente lipidica distintiva che in parte si contraddistingue per composizione e struttura dal resto dei lipidi presenti nel corpo [26]. Nei paragrafi seguenti, viene presentata una panoramica sulla biochimica dei lipidi presenti nelle secrezioni legati ad attività metaboliche e biosintetiche osservate nella ghiandola dell'uropigio, rimanendo comunque consci del fatto che sono necessarie ulteriori indagini per comprendere a pieno l'origine e le vie biologiche di tali costituenti.

1.2.2.1 Lipidi: definizione e classificazione adottata

Il termine "lipidi" è generalmente definito e associato in modo generico ad un gruppo di composti organici tendenzialmente idrofobici e in molti casi solubili in solventi organici [29]. Un'ampia gamma di molecole come acidi grassi, fosfolipidi, steroli, sfingolipidi, terpeni e altri, posseggono queste caratteristiche chimiche. In considerazione del fatto che i lipidi costituiscono un insieme estremamente eterogeneo di molecole dal punto di vista strutturale e funzionale, gli scopi e l'organizzazione degli schemi di classificazione sviluppati differiscono in maniera significativa [30]. *The Lipid Library* [31], una delle principali fonti online di informazioni relative alla scienza e alla tecnologia dei lipidi, e *Cyberlipids* [32], un'organizzazione scientifica online, senza scopo di lucro, il cui obiettivo è raccogliere, studiare e diffondere informazioni su tutti gli aspetti della lipidologia, suddividono i lipidi in gruppi di composti "semplici" e "complessi". I lipidi "semplici" producono al massimo due tipi di entità distinte dall'idrolisi, ad esempio la formazione di acidi grassi e glicerolo

dai gliceridi, mentre i lipidi “complessi” come i fosfogliceridi si idrolizzano in tre o più prodotti: acidi grassi, glicerolo e gruppo fosfato di testa. Il database *LipidBank* [33] definisce inoltre un terzo gruppo principale chiamato lipidi “derivati”, che comprende alcoli e acidi grassi derivati dall'idrolisi dei lipidi “semplici”, e include 26 categorie di primo livello nello schema di classificazione. Nel 2005, il Comitato internazionale per la classificazione e la nomenclatura dei lipidi, su iniziativa del Consorzio *LIPID MAPS*, ha sviluppato e stabilito una classificazione sistematica completa per i lipidi basandosi su principi chimici e biochimici ben definiti. Il sistema di classificazione *LIPID MAPS* si fonda sul concetto dei due “mattoni” fondamentali, i gruppi chetoacilici e i gruppi isoprenici. Di conseguenza, i lipidi sono definiti come molecole idrofobe o anfipatiche che possono originare interamente o in parte da condensazione carbanionica di tioesteri e/o da condensazione carbocationica di unità isopreniche (**Figura 1.3**). Basandosi su questa definizione e considerando le differenze strutturali delle molecole, i lipidi sono stati classificati in otto categorie, ognuna delle quali prevede ulteriori suddivisioni in classi e sottoclassi: grassi acilici, gliceridi, fosfogliceridi, sfingolipidi, saccarolipidi e polichetidi (derivati dalla condensazione di subunità aciliche); lipidi sterolici e prenoli (derivati dalla condensazione di subunità isopreniche) [30,34,35].

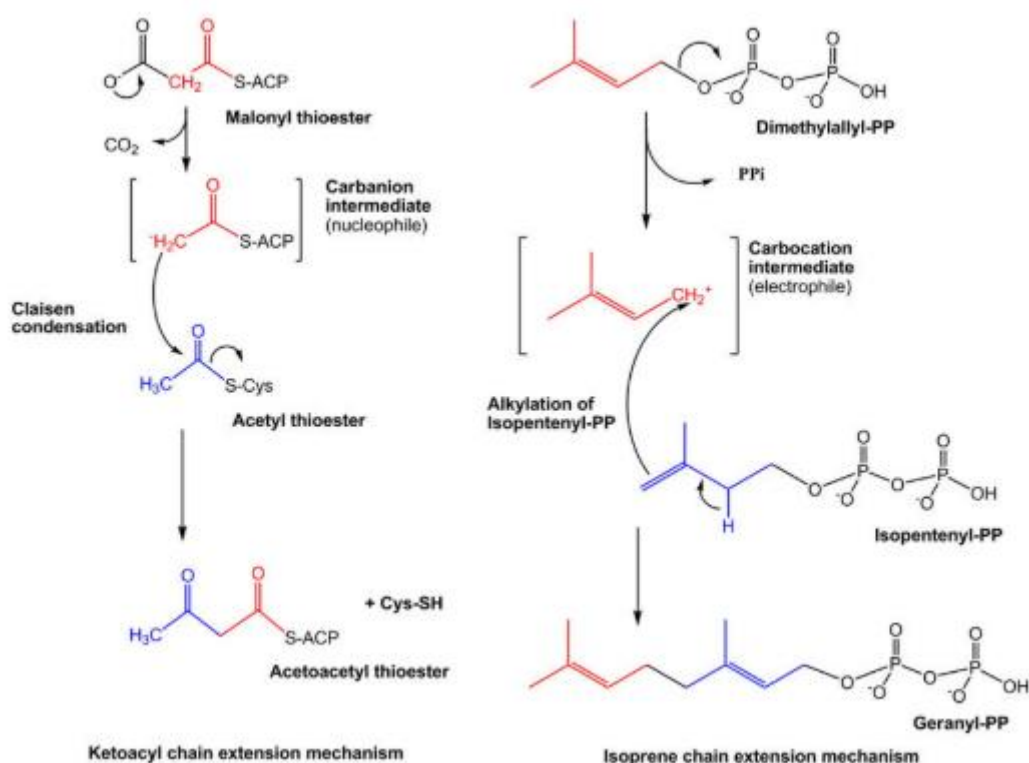


Figura 1.3 Biosintesi dei lipidi contenenti gruppi chetoacilici (in rosso a sinistra) e isoprenici (in rosso a destra) procede rispettivamente per estensione della catena mediata da carbanioni e carbocationi [36]

1.2.2.1.1 Classi di grassi acilici nelle secrezioni dell'uropigio: acidi grassi, alcoli grassi e cere

I grassi acilici, rappresentando il principale blocco strutturale di costruzione dei lipidi complessi, costituiscono una delle categorie fondamentali dei lipidi. Il gruppo acilico degli acidi grassi e delle classi coniugate è caratterizzato da una serie ripetuta di gruppi metilenici che conferiscono a questa categoria di lipidi un carattere idrofobico. I grassi acilici sono un gruppo eterogeneo di molecole sintetizzate dall'allungamento a catena dell'acetil coenzima A (CoA) con gruppi malonil-CoA (o metilmalonil-CoA), che possono contenere una funzionalità ciclica e/o essere sostituiti da eteroatomi (più comunemente da ossigeno) [34].

Acidi grassi

Gli acidi grassi sono una classe di composti organici che contengono uno o più gruppi funzionali carbossilici -COOH legati covalentemente ad una catena idrocarburica alifatica lineare o ramificata, con uno o più gruppi sostituenti, e in cui nella catena principale si possono instaurare doppi legami fra due atomi di carbonio definendo così gli acidi grassi insaturi (**Figura 1.4**) [37].

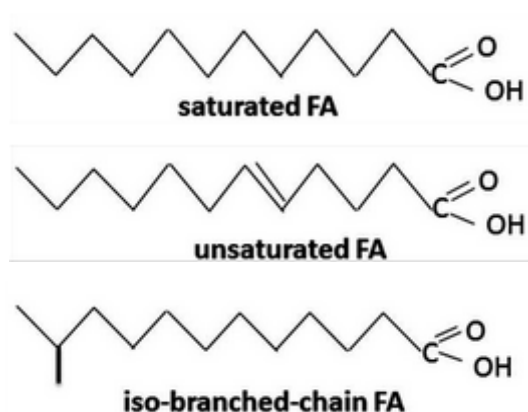


Figura 1.4 Generiche strutture molecolari di un acido grasso saturo lineare, un acido grasso monoinsaturo lineare e un acido grasso saturo ramificato (dall'alto verso il basso)

Nelle secrezioni dell'uropigio si riscontrano acidi grassi alifatici saturi, monoinsaturi come l'acido oleico e polinsaturi come l'acido linoleico e arachidonico, con una catena idrocarburica lineare o ramificata, prevalentemente sostituita da gruppi metilici in posizione 2, 3 o 4, e tendenzialmente costituita da un numero di carboni pari e dispari compresi tra 6 e 26 [38–46].

In diverse specie aviarie, variabilità nella composizione degli acidi grassi nelle secrezioni dell'uropigio sono state rilevate in relazione a sesso [39], periodo riproduttivo [41,42], età [41], popolazioni [41], dieta [45] ed attività microbica [38]. Nel periodo riproduttivo, si è osservata una diminuzione dei livelli di acidi grassi insaturi nei mimidi (*Dumetella carolinensis* Linnaeus, 1758) [41], mentre si è riscontrato un incremento di acidi grassi saturi lineari come l'acido dodecanoico e l'acido

esadecanoico nel giunco dagli occhi scuri (*Junco hyemalis* Linnaeus, 1758) durante la stagione degli accoppiamenti [42]. Per quanto riguarda ancora il giunco dagli occhi scuri è stato rivelato un “profilo femminile” distinguibile dai maschi, viste le maggiori proporzioni di acido dodecanoico, tetradecanoico ed esadecanoico presenti nelle secrezioni delle femmine [39]. Una dieta a base di grassi ha dimostrato di influenzare nei polli la composizione degli acidi grassi saturi, stimolando la comparsa di una maggiore quantità di acidi grassi saturi ramificati [45]. Batteri simbiotici presenti nelle secrezioni dell’uropigio delle specie *Upupa epops* e *Phoeniculus purpureus* (Linnaeus, 1758) sembrano contribuire alla formazione di acidi grassi saturi lineari e ramificati a catena corta (da 4 a 6 carboni) con potenziali proprietà antimicrobiche [38]. Infine, in giovani esemplari di uccello gatto, la produzione di quantità superiori di acidi grassi saturi lineari a corta (da 4 a 7 carboni) e lunga catena (da 20 a 26 carboni) rispetto agli adulti ha rivelato come l’età possa risultare un ulteriore parametro di variabilità legato alla composizione degli acidi grassi nelle secrezioni dell’uropigio.

Le vie biosintetiche osservate nella ghiandola dell’uropigio che portano alla formazione degli acidi grassi presenti nelle secrezioni prevedono il coinvolgimento di diversi complessi enzimatici. Carbossilasi e malonil-CoA decarbossilasi regolano la sintesi dei substrati di partenza, ovvero le molecole sulle quali agiscono gli enzimi. L’acido grasso sintasi richiede l’adenosina trifosfato (ATP) e la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) come cosubstrati, ovvero le molecole che si associano all'enzima e ne rendono possibile l'attività catalitica. Il complesso enzimatico accetta l’acetil-CoA e il propionil-CoA come substrati primari, per formare rispettivamente acidi grassi a catena pari e dispari, e il malonil-CoA e il metilmalonil-CoA come substrati di allungamento della catena per ottenere acidi grassi lineari e ramificati (**Figura 1.5**) [47,48]. La lunghezza della catena si suppone che sia controllata dall’acil-CoA tioesterasi [49].

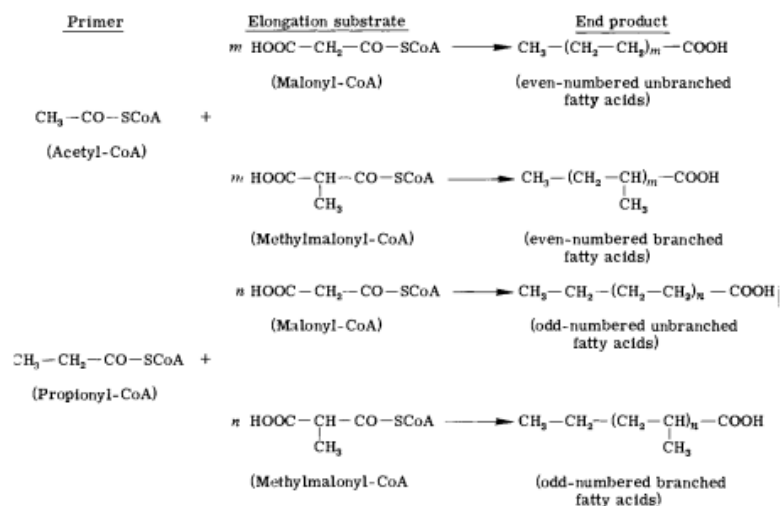


Figura 1.5 Reazioni che portano alla formazione di acidi grassi nella ghiandola uropigiale [26]

Alcoli grassi

Gli alcoli grassi sono composti organici di formula generale R-OH dove R è un residuo saturo o insaturo, con un numero di carboni superiore a 4, mentre il gruppo funzionale ossidrilico è necessariamente legato ad un atomo di carbonio saturo (**Figura 1.6**) [50].



Figura 1.6 Generica struttura molecolare di un alcol grasso saturo primario lineare

Tra gli alcoli grassi presenti nelle secrezioni dell'uropigio si rilevano alcoli alifatici saturi primari lineari [39-42,51,52] e ramificati, in particolare con metile ed etile come gruppi sostituenti [44].

La stagione riproduttiva [42] e il sesso [39,51] dimostrano di avere un potenziale legame con la variabilità della composizione chimica, soprattutto in termini quantitativi, degli alcoli nelle secrezioni dell'uropigio di alcune specie.

La biosintesi degli alcoli grassi nella ghiandola dell'uropigio si rileva da un'attività di reductasi, che richiede NADPH come cosubstrato, su catene di acidi grassi attivate dall'acil-CoA (**Figura 1.7**) [53]. Nelle stesse condizioni, ma operando su acidi grassi idrossilati, ovvero acidi grassi con uno o più gruppi ossidrilici situati lungo la catena idrocarburica, avviene anche la formazione dei dioli, riscontrati come costituenti dei diesteri di cere [54].

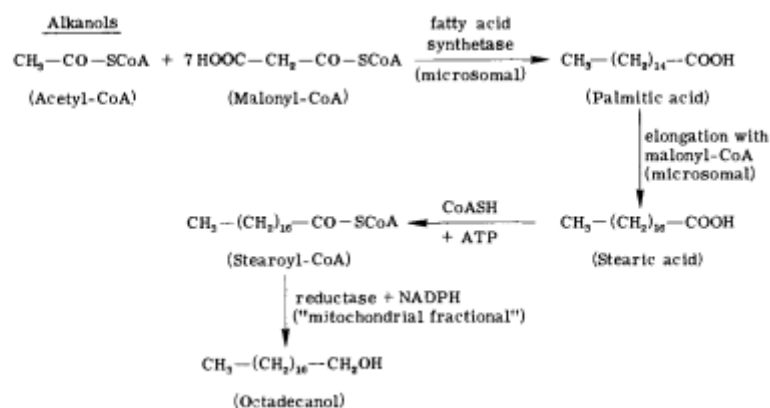


Figura 1.7 Reazioni che portano alla formazione di alcoli grassi saturi primari (nel caso specifico l'1-octadecanolo) nella ghiandola uropigiale [26]

Cere

Le cere alifatiche (**Figura 1.8**), costituite da acidi grassi esterificati con alcoli grassi, rappresentano la componente lipidica principale delle secrezioni dell'uropigio. I monoesteri di cere risultano predominanti rispetto ai diesteri e triesteri di cere, ottenuti rispettivamente dall'esterificazione tra

due e tre catene di acidi grassi (anche idrossilati) con un alcol, e più in particolare anche dioli. Le catene delle cere sono tendenzialmente costituite da un numero di carboni compresi tra 21 e 47. La struttura delle cere risulta particolarmente complessa data la variabilità del grado di ramificazione, soprattutto per quanto riguarda la catena relativa agli acidi grassi che possono contenere fino a 4 gruppi metilici come sostituenti, e della lunghezza delle catene, sature o insature, degli acidi grassi e degli alcoli [51,55–74].

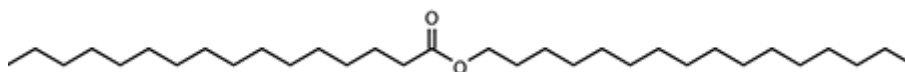


Figura 1.8 Generica struttura molecolare di un monoestere saturo di cera

L'analisi della composizione chimica delle cere è stata proposta come strumento per la verifica della classificazione tassonomica di alcune specie aviarie [57,68,71,74]. L'approccio chemiotassonomico va però applicato con cautela data l'influenza di fattori ambientali, ormonali e fisiologici [58]. Variabilità nella composizione chimica delle cere sono infatti state valutate ed evidenziate in relazione a diversi fattori: stagionalità e periodo riproduttivo [59–61,73], sesso [62,63], età [56,64], clima [72] e muta [65]. In specie della famiglia *Charadriidae*, *Scolopacidae* e *Haematopodidae*, la variabilità stagionale si manifesta tra la partenza dai luoghi di svernamento e l'arrivo nelle zone di riproduzione, passando da una composizione chimica delle secrezioni dominata da monoesteri di cere ad una in cui prevalgono i diesteri di cere [59–61,73]. Valutando sempre la relazione tra i monoesteri e i diesteri di cere, una variazione delle loro proporzioni durante l'anno è stata osservata nelle femmine di germano reale (*Anas platyrhynchos* Linnaeus, 1758) ma non nei maschi, che hanno mantenuto questo rapporto costante [63]. La lunghezza delle catene delle cere mostra variazioni legate ad età, periodo di muta delle penne e clima [64,65,72]. Haribal et al. (2008) [72] hanno rilevato, in specie tropicali, cere con un peso molecolare tendenzialmente più alto rispetto a quelle riscontrate in specie aviarie delle zone a clima temperato, proponendo quindi che la volatilità delle cere sia legata soprattutto alla temperatura ambientale. Cambiamenti nell'estensione delle catene sono inoltre stati osservati nei maschi di germano reale nella fase d'eclissi, ovvero nello stato ecofisiologico successivo alla muta post-riproduttiva in cui il piumaggio maschile diventa praticamente indistinguibile da quello della femmina. Nella fase d'eclissi si è verificato un incremento nel contenuto di acidi grassi con catene superiori a 12 carboni, costituenti delle cere. Gli acidi grassi con catene più corte di 12 carboni, presenti al 70% come componenti delle cere durante il periodo riproduttivo, rappresentavano meno dell'1% degli acidi grassi dopo la muta [65].

La sintesi delle cere presenti nelle secrezioni avviene tramite una reazione di esterificazione tra acidi grassi e alcoli catalizzata da una potenziale serie di enzimi individuati nella ghiandola dell'uropigio [75].

1.2.2.1.2 Classe degli steroli e loro derivati nelle secrezioni dell'uropigio

La categoria dei lipidi sterolici comprende tutte le molecole basate sullo scheletro del ciclopentanoperidrofenantrene, composto da diciassette atomi di carbonio, legati in quattro anelli condensati: tre anelli di cicloesano e un anello di ciclopentano. Questa categoria include la classe degli steroli, caratterizzati dalla presenza di un gruppo ossidrilico in posizione 3, un gruppo sostituito in posizione 17 e un doppio legame all'interno di uno degli anelli (**Figura 1.9**). Nella suddetta classe sono inoltre compresi anche derivati degli steroli, come gli stanoni e gli stanoli, detti anche steroli saturi vista l'assenza del doppio legame C-C nell'anello [76].

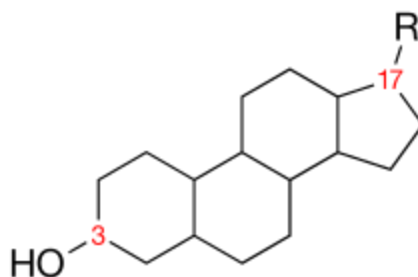


Figura 1.9 Struttura molecolare generale degli steroli

Nella componente lipidica delle secrezioni dell'uropigio sono stati identificati steroli di origine animale (zoosteroli) come colesterolo [46,72,77], colestano [78] e 7-deidrocolesterolo [77], e di origine vegetale (fitosteroli) come stigmasterolo e sitosterolo [72].

Gli steroli presenti nelle secrezioni è plausibile che derivino principalmente da assunzione tramite la dieta e/o da attività biosintetica non legata alla ghiandola dell'uropigio. Si sono comunque osservate attività metaboliche nella ghiandola dell'uropigio in cui gli steroli si sono rivelati dei precursori per la formazione di steroidi [79] e vitamina D₃ [77].

1.2.3 Fisiologia delle secrezioni dell'uropigio

La cura del piumaggio negli uccelli è un'attività dispendiosa in termini temporali ed energetici [80,81], che comprende, tra gli altri comportamenti, la distribuzione delle secrezioni dell'uropigio sul piumaggio con il becco (*preening*). Gli uccelli ottengono le secrezioni tramite un meccanismo di

estrazione che prevede la stimolazione diretta della papilla e/o la raccolta del fluido dal ciuffo di penne che la circonda [26]. Le dibattute ipotesi sulle possibili funzioni apparentemente non mutuamente esclusive delle secrezioni dell'uropigio [26,28,82–84] vengono presentate in seguito.

1.2.3.1 Mantenimento del piumaggio

L'ipotesi sul mantenimento del piumaggio sostiene che le secrezioni dell'uropigio proteggano la struttura cheratinica delle penne, mantenendole flessibili e prevenendo l'abrasione meccanica [20]. Deterioramenti del piumaggio nell'arco di alcuni mesi sono stati evidenziati da esperimenti di ablazione della ghiandola dell'uropigio [82,85] o di blocco nell'utilizzo delle secrezioni [86]. Risultati contrastanti provengono da una revisione di Elder (1954) [82] e da Montalti et al. (2000) [87], in cui non si rilevano peggioramenti nella struttura delle penne in uccelli che non hanno accesso alle secrezioni uropigiali, mettendo in dubbio l'ipotesi del mantenimento del piumaggio. Un ulteriore punto di dibattito su quest'ipotesi risiede nell'assenza di evidenze sperimentali che distinguano l'abrasione meccanica e la degradazione batterica come cause del deterioramento della struttura cheratinica delle penne [84].

1.2.3.2 Protezione da microrganismi

Diversi batteri presenti nel piumaggio degli uccelli producono la cheratinasi, un enzima capace di decomporre la cheratina [88]. Vari esperimenti *in vitro* supportano la capacità antimicrobica delle secrezioni dell'uropigio, dimostrando un'attività inibitoria sulla crescita di molti batteri responsabili della degradazione della struttura cheratinica delle penne [38,60,89–94]. Nonostante questi risultati a sostegno della funzione antimicrobica, l'ipotesi rimane dibattuta dato che gli unici studi *in vivo* non hanno mostrato differenze nel carico di tali batteri tra esemplari con accesso alle secrezioni e quelli privati [95,96].

1.2.3.3 Impermeabilizzazione

Studi comparativi mostrano che gli uccelli acquatici possiedono ghiandole dell'uropigio più grandi [28,97–99], con però alcune eccezioni [87,100] da cui si potrebbe evincere che la grandezza della ghiandola non sia un parametro da solo sufficiente a validare la funzione di impermeabilizzazione delle secrezioni dell'uropigio. La potenziale funzione di impermeabilizzazione sembra comunque ben supportata da ulteriori esperimenti in cui gli uccelli privati delle secrezioni dell'uropigio

esibiscono un piumaggio più umido e penne con una ritenzione idrica maggiore rispetto alla condizione di controllo, ovvero uccelli con accesso alle secrezioni uropigiali [82,86,101]. Tuttavia, dato che l'impermeabilizzazione è peggiorata anche in relazione al deterioramento del piumaggio, i risultati ottenuti non sono in grado di spiegare se le secrezioni dell'uropigio migliorino direttamente l'impermeabilità fornendo al piumaggio uno strato di copertura lipidica, o agiscano in maniera indiretta sull'impermeabilità mantenendo integra la struttura delle penne [84,101].

1.2.3.4 Comunicazione intraspecifica

Il colore del piumaggio può cambiare in relazione all'applicazione e alla composizione chimica delle secrezioni dell'uropigio [102–105]. L'osservazione di una variazione nella composizione chimica delle cere è stato proposto come segnale comunicativo mediato dalle secrezioni durante la stagione riproduttiva [106], anche se il concomitante cambiamento della colorazione del piumaggio non altera la sua riflettanza [105].

Il ruolo delle secrezioni dell'uropigio nella comunicazione olfattiva è stato investigato da un punto di vista chimico, associando la funzione di chemosegnali alla componente lipidica più volatile delle secrezioni e tentando di valutarne le potenziali implicazioni ecologiche, soprattutto nell'ambito della regolazione dei comportamenti sessuali [39,51,52,78,107–109].

1.3 Inquinanti organici persistenti (POPs)

Gli inquinanti organici persistenti (in inglese *Persistent Organic Pollutants* da cui l'acronimo POPs) sono composti chimici organici, quasi esclusivamente di origine antropica, che possiedono una combinazione di caratteristiche chimiche e fisiche tali da determinarne la persistenza, l'ubiquitarietà, la capacità di bioaccumulare e di provocare effetti tossici [110–117].

L'origine dei POPs è attribuita principalmente allo sviluppo del settore chimico-industriale avvenuto a partire dagli anni '20 del XX secolo, e soltanto in minima parte a processi naturali come incendi ed eruzioni vulcaniche. I POPs di origine antropica appartengono ad un gruppo di sostanze intenzionalmente prodotte per assolvere uno specifico scopo, come nel caso dei pesticidi e dei prodotti chimici industriali, oppure ad una categoria di composti, definiti prodotti secondari, formati accidentalmente da processi chimici e di combustione [111,112]. Una volta immessi nell'ambiente, i POPs si distribuiscono tra aria, acqua, suolo, ma vanno considerati anche il particolato atmosferico, la neve, il ghiaccio, il particolato sospeso in acqua o le sostanze colloidali,

oltre al comparto biotico animale e vegetale. La ripartizione tra due mezzi viene generalmente stimata da: solubilità in acqua, pressione di vapore, coefficienti di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}), ottanolo-aria (K_{oa}) e aria-acqua (K_{aw}), legati al livello di solubilità in due fasi immiscibili [110,111]. Il comportamento e il destino dei POPs nell'ambiente dipendono dalle loro proprietà chimiche e fisiche, definite dalla struttura della molecola e dalla natura degli atomi in essa presenti, e dalle condizioni ambientali. La presenza di anelli aromatici e/o la sostituzione di uno o più atomi di idrogeno nella struttura molecolare con alogeni conferisce ai POPs quella resistenza alla degradazione chimica, biologica e fotolitica che ne determina la persistenza [115]. Una comune misura del grado di persistenza di una sostanza nell'ambiente è il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$), ovvero il tempo necessario affinché la concentrazione nel mezzo di riferimento si dimezzi rispetto al valore iniziale. Per un'accurata associazione di questa misura al concetto di persistenza bisogna inoltre specificare che sarebbe indispensabile distinguere tra il tempo che un composto chimico passa nell'ambiente e il tempo nel quale risiede in un mezzo specifico, in quanto la rimozione vera e propria avviene solamente tramite reazioni irreversibili di degradazione e non cambiamenti nella speciazione o trasferimento di fase tra mezzi diversi [116,118]. La persistenza, in combinazione con la propensione a passare in fase gassosa, rende i POPs soggetti al trasporto a lunga distanza determinandone così l'ubiquitarità. I POPs si volatilizzano in atmosfera da suoli, vegetazione e corpi d'acqua, e vista la loro resistenza alle reazioni di degradazione in aria, percorrono lunghe distanze prima di depositarsi. Il ciclo di volatilizzazione e deposizione può ripetersi più volte, risultando in un potenziale accumulo in aree lontane da quelle in cui gli inquinanti sono stati utilizzati o emessi [110]. Il trasporto atmosferico degli inquinanti fino alle regioni remote avviene se sussistono tre condizioni: (a) devono raggiungere l'atmosfera in quantità significative; (b) devono essere trasportati lungo una distanza considerevole, resistendo alla degradazione in atmosfera; (c) si devono depositare in quantità notevoli per avere un impatto sull'ecosistema delle regioni remote. Una via alternativa di distribuzione prevede il trasporto dei POPs con le correnti marine o i corsi d'acqua, per cui è richiesta una sufficiente solubilità in acqua e un'elevata persistenza in fase acquosa [119].

La combinazione tra persistenza, in particolare la resistenza alla degradazione biologica, e lipofilità definisce le capacità di bioaccumulare dei POPs [110]. La biodisponibilità, ovvero la proporzione della concentrazione totale di una sostanza chimica disponibile per l'assorbimento da parte di un particolare organismo, è controllata da una combinazione di proprietà chimiche e fisiche del composto, compreso l'ambiente circostante e le caratteristiche morfologiche, biochimiche e fisiologiche dell'organismo stesso. Per potersi successivamente concentrare negli organismi

presenti nell'ambiente, i POPs devono quindi possedere una proprietà che ne determini una certa affinità per gli organismi. Questa proprietà è la lipofilicità, ovvero la tendenza a dissolversi preferenzialmente nei grassi e nei lipidi, che viene normalmente stimata con il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}). I POPs possono dunque entrare nella catena trofica, dando luogo al fenomeno della biomagnificazione, e potenzialmente raggiungere l'uomo in notevoli concentrazioni [110,115,116]. La persistenza ambientale, la resistenza alla degradazione metabolica e la lipofilicità dei POPs sono associati ad un'ampia gamma di effetti tossici esibiti ai danni di molte specie animali e degli esseri umani [113,115]. I potenziali effetti negativi sull'ambiente e sulla salute umana dovuti all'esposizione ai POPs sono fonte di notevole preoccupazione per i governi, le organizzazioni non governative e la comunità scientifica. I due strumenti internazionali, giuridicamente vincolanti, adottati per ridurre ed eliminare la produzione, l'uso e le emissioni di queste sostanze chimiche sono il Protocollo di Aarhus sui POPs nell'ambito della Convenzione regionale UNECE sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero a lunga distanza, aperto alle firme nel giugno 1998 ed entrato in vigore il 23 ottobre 2003 [120], e la Convenzione globale di Stoccolma sui POPs, aperta alle firme nel maggio 2001 ed entrata in vigore il 17 maggio 2004 [121]. Questi strumenti stabiliscono regimi internazionali rigorosi per gli elenchi iniziali dei POPs (16 nel Protocollo UNECE e 12 nella Convenzione di Stoccolma) e contengono disposizioni per l'aggiunta di ulteriori sostanze chimiche. Il Protocollo di Aarhus bandisce la produzione e l'utilizzo di *aldrin*, *clordano*, *clordecone*, *dieldrin*, *endrin*, *esabromobifenile*, *mirex* e *toxafene*, prevede l'eliminazione successiva del diclorodifeniltricloroetano (DDT), *eptacloro*, *esaclorobenzene* (HCB) e *policloro bifenili* (PCB) e restringe l'uso del DDT, *esaclorocicloesano* e PCB. I Paesi firmatari sono inoltre obbligati a ridurre le emissioni di *policlorodibenzo-p-diossine* e *policloro dibenzofurani*, *idrocarburi policiclici aromatici* (IPA) ed HCB al di sotto i limiti che li caratterizzavano nel 1990. Nel 2009 sono state incluse sette nuove sostanze nel Protocollo: *esaclorobutadiene*, *ottabromo difeniletere*, *pentaclorobenzene*, *pentabromo difeniletere*, *perfluoroottano sulfonato*, *policloro naftaleni* e *paraffine clorurate a corta catena*. I POPs individuati nella Convenzione di Stoccolma sono inseriti nei primi 3 allegati. Gli allegati A e B elencano le sostanze prodotte intenzionalmente, come pesticidi e prodotti chimici, di cui eliminare (allegato A) o restringere (allegato B) la produzione e l'utilizzo, mentre l'allegato C include le sostanze prodotte accidentalmente di cui ridurre il rilascio. Ad oggi, i POPs identificati sono:

- Allegato A: *aldrin*, *clordano*, *clordecone*, α *esaclorocicloesano*, β *esaclorocicloesano*, *decabromo difeniletere*, *dicofol*, *dieldrin*, *endrin*, *eptacloro*, *esabromo bifenile*,

esabromo ciclododecano, esabromo difenilietere, eptabromo difenilietere, esaclorobenzene, esaclorobutadiene, *mirex*, lindano, pentaclorobenzene, pentaclorofenolo con i suoi sali ed esteri, PCB, policloronaftaleni, acido perfluoroottanoicosulfonico e acido perfluoresanoicosulfonico, con i loro sali e composti correlati, paraffineclorurate a corta catena, *endosulfan*, tetra e pentabromo difenilieteri e *toxafene*

- Allegato B: acido perfluoroottansulfonico con i suoi sali e fluoruro di perfluoroottano e sulfonile, e DDT
- Allegato C: PCB, policloronaftaleni, pentaclorobenzene, HCB, esaclorobutadiene, policloro dibenzo-*p*-diossine e policloro dibenzofurani

1.3.1 Policloro bifenili (PCB)

I policloro bifenili (PCB) (**Figura 1.10**) sono una classe di composti organici aromatici in cui alcuni o tutti gli atomi di idrogeno legati all'anello bifenilico sono sostituiti da atomi di cloro. La formula chimica generale è $C_{12}H_{(10-m-n)}Cl_{(m+n)}$, dove $(m + n)$ varia tra 1 e 10 e corrisponde al numero di atomi di cloro sui due anelli. A seconda della posizione e del numero degli atomi di cloro, esistono teoricamente 209 singoli composti (congeneri) che possono essere classificati in base al grado di clorurazione (numero di atomi di cloro) in 10 gruppi di omologhi, dai monocloro bifenili ai decacloro bifenili. Le posizioni del carbonio sono numerate da 1 a 6 su un anello e da 1' a 6' sull'altro. Le posizioni 2,2',6 e 6' sono chiamate *orto*, le posizioni 3,3',5 e 5' *meta*, mentre le posizioni 4 e 4' *para* [122]. In un'ulteriore nomenclatura proposta da Ballschmiter e Zell (1980) [123], ad ogni singolo congenere viene attribuito un numero correlato alla disposizione strutturale del congenere di PCB e all'ordine crescente del numero di sostituzioni di cloro all'interno di ciascun omologo sequenziale, ottenendo così una numerazione dei congeneri che va da PCB-1 a PCB-209.

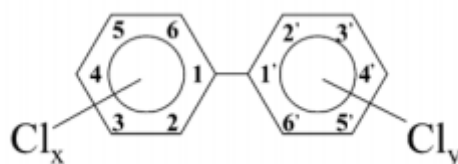


Figura 1.10 Struttura molecolare generale e nomenclatura dei PCB [123]

I PCB sono stati prodotti industrialmente come miscele commerciali, composte da molteplici congeneri, per una varietà di applicazioni e utilizzi: fluidi dielettrici in condensatori e trasformatori,

fluidi scambiatori di calore e idraulici, oli lubrificanti e da taglio e come additivi in pesticidi, vernici, carta, adesivi, sigillanti e plastiche. La produzione totale di PCB in tutto il mondo dal 1930 fino al 1993 viene stimata in oltre un milione di tonnellate. La *Monsanto Industrial Chemicals Company* negli Stati Uniti è stata la maggiore produttrice di PCB a livello mondiale, commercializzando dal 1929 al 1977 diverse miscele complesse sotto il nome di *Aroclor*[®]. Anche altri Paesi commercializzarono i PCB attribuendo alle miscele nomi differenti come *Clophen*[®] (*Bayer*, Germania Occidentale), *Phenoclor*[®] e *Pyrалene*[®] (*Caffaro*, Italia), *Kanechlor*[®] (*Kanegafuchi Chemical Industries*, Giappone), *Fenclor*[®] (*Prodelec*, Francia) [124,125].

I PCB sono stati comunemente sintetizzati tramite clorurazione catalitica del bifenile. In base alle condizioni di reazione, il grado di clorurazione può variare tra il 21% ed il 68% in peso [126]. Breivik et al. (2007) [125], tentando di quantificare la produzione di PCB per omologhi e per 7 congeneri, hanno evidenziato che più dell' 80% del totale è costituito da tri-, tetra-, penta- ed esacloro bifenili, mentre i 7 congeneri considerati (PCB-28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) contribuiscono per il 17.8%. Lo studio di questi congeneri come traccianti della contaminazione globale causata dall'uomo è riconosciuto dalla Convenzione di Stoccolma che infatti raccomanda il monitoraggio dei sette indicatori per caratterizzare la contaminazione da PCB di origine antropica [121].

La formazione di PCB può avvenire anche in modo accidentale o non intenzionale da reazioni secondarie in un'ampia varietà di processi chimici che coinvolgono fonti di cloro ed idrocarburi, come nel caso della produzione di clorobenzene, cloruro di vinile, solventi clorurati e alcani clorurati. Dato che tali processi industriali differiscono dalla classica sintesi delle miscele commerciali, la composizione dei prodotti secondari contenenti PCB non riproduce quella degli *Aroclor*[®], risultando perciò distinguibile e riconoscibile [124].

I singoli congeneri puri di PCB sono per lo più composti cristallini incolori o leggermente giallastri, spesso inodori. I prodotti commerciali, tuttavia, sono miscele liquide e viscosi di questi composti, la cui viscosità aumenta con il grado di clorurazione e il cui colore varia dal giallo chiaro al colore scuro. I PCB sono composti chimicamente stabili, sono solubili in un'ampia varietà di solventi organici e hanno una bassa conducibilità elettrica. I punti di fusione variano da 25 °C (PCB-2, 7 e 9) a 306 °C (PCB-209), mentre i punti di ebollizione aumentano dai congeneri a bassa (monocloro bifenili, 285 °C) ai congeneri ad alta clorurazione (decacloro bifenile, 456 °C). La solubilità e la pressione di vapore, utilizzata come misura della tendenza a diffondere in atmosfera, diminuiscono notevolmente con l'aumentare del peso molecolare, mentre cresce il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, che indica la propensione all'accumulo nella fase lipofila. In particolare, alla

temperatura di 25 °C, i PCB sono caratterizzati da una pressione di vapore che varia da 1.2 Pa per i congeneri mono-clorurati a $7 \cdot 10^{-6}$ Pa per il decacloro bifenile, mentre la solubilità in acqua risulta molto bassa con valori compresi tra $2 \cdot 10^{-6}$ mol·m⁻³ per il congenero deca-clorurato e 29 mol·m⁻³ per i mono-clorurati. Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) varia tra 4.2 per i mono-clorurati a 8.3 per i deca-clorurato, mostrandosi correlato al numero di clori [122].

La conoscenza delle proprietà chimico-fisiche risulta rilevante per comprendere il destino ambientale dei PCB. I PCB sono inquinanti ubiquitari dato che vengono rinvenuti nelle principali matrici ambientali (aria, acqua e suolo) e nel comparto biologico a livello globale, interessando anche le regioni più remote come i poli della Terra. Il suolo e il sedimento, accogliendone il 99% in massa, agiscono da “pozzo” naturale per i composti lipofili come i PCB che vengono assorbiti dal carbonio organico e una volta in esso si dimostrano relativamente persistenti, con tempi di dimezzamento stimati di 3 anni per i tri-CB e 38 anni per gli epta-CB. I *pattern* dei congeneri nei suoli e sedimenti possono cambiare nel tempo in relazione alla degradazione biologica associata all'attività di batteri aerobici, che degradano i congeneri meno clorurati, e dei batteri anaerobici, che possono causare una parziale dechlorurazione dei congeneri più altamente clorurati. La cinetica di degradazione dipende principalmente dalla concentrazione dei PCB, oltre che dal tipo e dalla popolazione di microbi, dalla temperatura e dai nutrienti, ma è generalmente lenta. L'acqua è una potenziale via di migrazione dei PCB dai suoli e sedimenti, sia in soluzione che legati al particolato. Vista la bassa solubilità in acqua dei PCB, e con il legame colloidale che risulta predominante rispetto ai PCB realmente disciolti nelle acque interstiziali, si presume infatti che il trasporto colloidale contribuisca significativamente sulla migrazione sub-superficiale dei PCB. Tuttavia, il trasporto dei PCB facilitato dall'acqua nella zona vadosa (insatura) dei suoli si è dimostrato molto meno rilevante rispetto al trasporto in fase vapore all'interno dei pori insaturi. I PCB, essendo composti semivolatili, tendono a volatilizzarsi producendo emissioni misurabili in atmosfera. Il trasporto aereo dei PCB può avvenire sia in fase di vapore che di particolato, contribuendo così all'inquinamento globale e alla contaminazione da PCB di regioni remote della Terra. I PCB tendono a migrare dalle basse latitudini, dove prevale l'evaporazione, alle regioni polari, dove si verifica la condensazione e prevale la deposizione. In atmosfera i tempi di dimezzamento teorici, stimati in base alla velocità di reazione con il radicale ossidrilico ($\cdot\text{OH}$), sono di 3 giorni per i tri-CB e di 500 giorni per gli epta-CB, mentre nella pratica possono essere anche di 10-20 anni. La fotolisi può essere una delle vie di degradazione dei PCB in atmosfera: esperimenti fotochimici condotti in condizioni naturali simulate su diversi congeneri e su prodotti commerciali a base di PCB hanno identificato diverse reazioni degradative,

come dechlorurazione, polimerizzazione e solvolisi. I PCB provenienti dal suolo, dai sedimenti, dall'aria e dall'acqua entrano nella catena alimentare attraverso l'*uptake* da parte di organismi autotrofi e consumatori, tendendo a bioaccumularsi nella fase lipofila in virtù dell'alto coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua e manifestando la propria tossicità [122,124].

Nei vertebrati come uccelli, mammiferi e rettili, gli effetti tossicologici dei PCB sono legati alla loro capacità, che varia a seconda del grado di clorurazione e della disposizione degli atomi di cloro sulla molecola di bifenile, di indurre le monoossigenasi a funzione mista (MFO) tra cui la superfamiglia del citocromo P450. La trasformazione dei PCB in metaboliti idrossilati da parte del sistema associato al citocromo P450 è la via principale del metabolismo dei PCB. Il tasso di idrossilazione catalizzata dal citocromo P450 dei PCB diminuisce con l'aumento del numero di clori e con la diminuzione del numero di atomi di carbonio adiacenti non sostituiti. Alcuni animali metabolizzano i PCB a ritmi diversi e ciò è in parte legato alle differenze nel livello basale di particolari isoenzimi del citocromo P450. Ad esempio, il cane elimina i PCB più rapidamente di altre specie perché ha livelli più elevati di un isoenzima costitutivo del citocromo P450 con attività verso il 2,2',4,4',5,5'-esacloro bifenile. La biotrasformazione dei PCB da parte del citocromo P450 non è sempre vantaggiosa per l'organismo, perché i metaboliti possono essere più tossici o biologicamente attivi del composto di partenza. Una parte significativa della tossicità associata alle miscele commerciali di PCB è legata alla presenza di 12 congeneri (PCB-77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189), strutturalmente simili alla 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina (2,3,7,8-TCDD), che esibiscono un'attività tossica detta *dioxin-like*. L'attività tossica cosiddetta *dioxin-like* è manifestata in massimo grado dai PCB sostituiti in entrambe le posizioni *para* (4 e 4'), in due o più *meta* (3, 3', 5 e 5') e non sostituiti in posizione *orto* (2, 2', 6, 6') e in misura minore dai congeneri che da questi derivano per aggiunta di un atomo di cloro in una sola posizione *orto*, cioè i mono-*orto* PCB. I PCB *dioxin-like* possiedono un'alta affinità di legame con il recettore degli idrocarburi aromatici (AhR, *Aryl hydrocarbon Receptor*). Verificatasi l'interazione, il recettore AhR induce la produzione di citocromo P450, generando le attività metaboliche di biotrasformazione dei PCB precedentemente descritte [127,128].

Esistono prove sufficienti della cancerogenicità dei PCB nell'uomo. I PCB causano il melanoma maligno. Sono state inoltre osservate associazioni positive per il linfoma non-Hodgkin ed il cancro al seno [122]. Negli organismi animali testati fino ad oggi (uccelli, rettili e mammiferi), i PCB, soprattutto quelli con attività *dioxin-like*, hanno influenzato negativamente i modelli di sopravvivenza, riproduzione, crescita, metabolismo e accumulo. Le manifestazioni comuni

dell'esposizione ai PCB negli animali includono: epatotossicità, immunotossicità, neurotossicità, aumento dell'abortività, basso peso alla nascita, embriotossicità, teratogenicità, ulcerazione e necrosi gastrointestinale, bronchite, tossicità cutanea, alterazioni preneoplastiche ed infine mutagenicità. Gli effetti tossici indotti dai PCB sono caratterizzati da una variabilità che in parte è attribuita alle differenze tra le specie e i ceppi nella capacità di metabolizzare i PCB e nei siti d'azione primari; all'età, al tasso di crescita, alla biomassa e al contenuto lipidico delle specie; alla dose, alla durata dell'esposizione, alla via di somministrazione e ai congeneri testati; alle caratteristiche fisico-chimiche dell'habitat durante l'esposizione; alle interazioni tra i vari congeneri di PCB, e con altri composti organoclorurati e metalli pesanti. Gli uccelli e i mammiferi esposti ai PCB reagiscono spesso in modo diverso. Gli uccelli marini che si nutrono di pesce, come la gazza marina (*Alca torda* Linnaeus, 1758), possono metabolizzare rapidamente i congeneri di PCB che hanno almeno una coppia di combinazioni *meta-para* adiacenti non sostituite. Le gazze marine metabolizzano il 4-clorobifenile a 4-cloro-4' idrossibifenile, tuttavia, i topi metabolizzano lo stesso composto 15 volte più velocemente. Le gazze e i piccioni selvatici (*Columba livia* Gmelin, 1789) esposti a PCB presentavano concentrazioni simili di enzimi dipendenti dal citocromo P450, ma le concentrazioni erano significativamente più elevate nei ratti rispetto alle specie aviarie. Gli effetti avversi dei PCB negli uccelli variano notevolmente tra le specie e i tessuti. I PCB 128 e 169 provocano un accumulo di porfirine epatiche maggiore rispetto ai PCB 138, 155 e 156. I PCB 77, 136, 153 e 159 hanno prodotto alterazioni istopatologiche acute nel fegato di embrioni di pulcino. Il muscolo delle quaglie trattate con PCB presentava residui maggiori di congeneri clorurati in posizione 2,4,5 (come i PCB 138, 153, 170 e 180), che sono relativamente tossici e resistenti alla degradazione metabolica. Gli embrioni del pollo domestico (*Gallus sp.*) sono particolarmente sensibili al PCB 77. La mortalità e un'alta incidenza di anomalie dello sviluppo, tra cui microftalmia, deformità del becco, edema e ritardo nella crescita, sono state registrate nei pulcini. Morti o anomalie negli embrioni di anatre, fagiani e gabbiani si sono riscontrate solo a concentrazioni maggiori rispetto a quelle somministrate ai pulcini di pollo. Gli embrioni di pollo erano da 20 a 100 volte più suscettibili al PCB 77 rispetto agli embrioni di tacchino selvatico (*Meleagris gallopavo* Linnaeus, 1758) e questa sensibilità sottolinea le incertezze nell'applicare i dati di tossicità di una specie di uccelli per prevedere gli effetti tossici in altre. Le differenze di sensibilità degli uccelli al PCB 77 possono essere legate a differenze nel metabolismo e alla maggiore disponibilità di recettori AhR nei pulcini. Ad esempio, i recettori AhR sono stati rilevati nel fegato di embrioni di pollo di 7 giorni ma non in quello di embrioni di tacchino di 9 giorni [127].

1.3.2 Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono una classe di composti organici costituiti da idrogeno e carbonio organizzati in modo tale da formare una struttura fondamentale a due o più anelli fusi contenente almeno due anelli benzenici. Esistono migliaia di IPA, ognuno dei quali si differenzia per il numero e la posizione degli anelli aromatici e per la collocazione di eventuali sostituenti [129,130]. Gli IPA sono ubiquitari in ambiente, vista la loro presenza nei sedimenti, nel suolo, nell'aria, nelle acque e nei tessuti di piante e animali, come risultato di processi naturali quali la combustione incompleta di biomassa (ad es. incendi boschivi), la sintesi microbica, la petrogenesi (diagenesi di materiale organico in sedimenti anossici) e le attività vulcaniche. Tuttavia, il contributo più significativo nella formazione degli IPA deriva dalle attività antropiche associate a: la produzione di *coke* nell'industria siderurgica; il *cracking* catalitico nell'industria petrolifera; la produzione di nerofumo, pece di catrame e asfalto; il riscaldamento e la produzione di energia elettrica; l'incenerimento controllato dei rifiuti; la combustione a cielo aperto; le emissioni dei motori a combustione interna. Prima del 1900, esisteva un equilibrio naturale tra la produzione e la degradazione degli IPA. La sintesi degli IPA da parte dei microrganismi e dell'attività vulcanica e la produzione da parte dell'uomo sembravano essere bilanciate dalla distruzione degli IPA attraverso la fotodegradazione e la trasformazione microbica. Con l'aumento dello sviluppo industriale e la maggiore enfasi sui combustibili fossili come fonti di energia, l'equilibrio è stato alterato al punto che la produzione e l'introduzione di IPA nell'ambiente supera di gran lunga i processi di rimozione [131].

La formazione degli IPA può avvenire a partire da idrocarburi saturi in condizioni di carenza di ossigeno. La pirosintesi e la pirolisi sono i due meccanismi principali che possono spiegare la loro sintesi. Nella pirosintesi, quando la temperatura supera i 500 °C i legami C-C e C-H di idrocarburi a corta catena si rompono a formare radicali liberi, in grado poi di ricombinarsi e condensare velocemente formando strutture aromatiche, resistenti alla degradazione termica. L'ulteriore addizione di composti organici a catena corta, come l'acetilene, porta alla formazione di IPA a più alto peso molecolare. La pirosintesi risulta il processo più rilevante nella formazione di IPA derivanti dalla combustione di carbone e dall'usura degli pneumatici, mentre gli alcani più pesanti presenti nei combustibili e nel materiale vegetale tendono a formare IPA per pirolisi, come nel caso del *cracking* termico [129].

Gli IPA sono resi molto stabili dal basso rapporto idrogeno/carbonio e si ritrovano solitamente in miscele complesse piuttosto che come singoli composti. Le caratteristiche fisiche e chimiche degli

IPA variano generalmente con il peso molecolare. Con l'aumento del peso molecolare, la solubilità acquosa diminuisce, mentre il punto di fusione, il punto di ebollizione e il log K_{ow} (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua) aumentano, suggerendo una maggiore solubilità nei grassi, una diminuzione della resistenza all'ossidazione e alla riduzione e una diminuzione della pressione di vapore. Di conseguenza, gli IPA di diverso peso molecolare variano sostanzialmente nel loro comportamento e distribuzione nell'ambiente e nei loro effetti biologici [130,131].

In atmosfera, gli IPA con una più alta pressione di vapore si disperdono principalmente in fase gassosa, mentre gli IPA con una bassa pressione di vapore tendono prevalentemente ad associarsi al materiale particolare. Il tempo di permanenza nell'atmosfera e il trasporto in diverse località geografiche sono regolati dalle dimensioni delle particelle, dalle condizioni meteorologiche e dalla fisica atmosferica. Gli IPA altamente reattivi subiscono foto-ossidazione nell'atmosfera per reazione con l'ozono e vari ossidanti, in tempi che variano da alcuni giorni a sei settimane per gli IPA adsorbiti su particolato di diametro minore di 1 μm (in assenza di precipitazioni), e da meno di 1 giorno a diversi giorni per quelli adsorbiti su particelle più grandi. Vari parametri possono modificare la trasformazione chimica e fotochimica degli IPA nell'atmosfera, tra cui l'intensità della luce, la concentrazione di inquinanti gassosi (O_3 , NO_x , SO_x) e le caratteristiche chimico-fisiche del particolato o dei substrati in cui gli IPA sono adsorbiti. Gran parte degli IPA rilasciati nell'atmosfera raggiunge il suolo per deposizione diretta o tramite la vegetazione. Gli IPA possono essere adsorbiti o assimilati dalle foglie delle piante prima di entrare nella catena alimentare animale, oppure essere dilavati dalla pioggia, ossidati chimicamente in altri prodotti e restituiti al suolo con la decomposizione delle piante. Gli IPA assimilati dalla vegetazione possono essere traslocati, metabolizzati ed eventualmente fotodegradati all'interno della pianta. In alcune piante che crescono in aree altamente contaminate, l'assimilazione può superare il metabolismo e la degradazione, con conseguente accumulo nei tessuti vegetali. In acqua, gli IPA possono evaporare, disperdersi nella colonna d'acqua, essere incorporati nei sedimenti di fondo, concentrarsi nel biota acquatico o subire ossidazione chimica e biodegradazione. I processi degradativi più importanti per gli IPA nei sistemi acquatici sono la foto-ossidazione, l'ossidazione chimica e la trasformazione biologica da parte di batteri e animali. La maggior parte degli IPA negli ambienti acquatici è associata a sostanze colloidali, mentre si stima che circa il 33% sia presente in forma disciolta. Gli IPA disciolti nella colonna d'acqua si degradano più rapidamente a concentrazioni più elevate, a temperature alte, a livelli elevati di ossigeno e a maggiori incidenze di radiazioni. Si ritiene che il destino finale degli IPA che si accumulano nei sedimenti sia il bioaccumulo, la biotrasformazione e la biodegradazione da parte

degli organismi bentonici. Tuttavia, gli IPA nei sedimenti acquatici, degradandosi molto lentamente in assenza di radiazioni penetranti e ossigeno, possono persistere a lungo in bacini poveri di ossigeno o in sedimenti anossici [130–132].

In generale, gli IPA mostrano una scarsa tendenza a biomagnificare lungo la catena alimentare, nonostante la loro elevata lipofilità. Gli uccelli adulti e gli embrioni, come anche altri vertebrati, come pesci e mammiferi, e molti invertebrati, hanno mostrato elevati tassi di metabolizzazione degli IPA [131–134]. Le principali vie di eliminazione degli IPA e dei loro metaboliti comprendono il sistema epatobiliare e il tratto gastrointestinale. Nei mammiferi, il principale sistema enzimatico che dà l'avvio al metabolismo degli IPA è il citocromo P450, che porta alla produzione di intermedi caratterizzati da maggiore idrofilicità e in alcuni casi alla bioattivazione di intermedi tossici. Anche gli uccelli e i pesci testati finora possiedono gli enzimi necessari per l'attivazione e la rapida metabolizzazione, mentre alcuni molluschi e altri invertebrati non sono in grado di metabolizzare efficacemente gli IPA [131,135]. I meccanismi di attivazione avvengono attraverso l'idrossilazione o la produzione di epossidi instabili di IPA che danneggiano il DNA, l'RNA e le proteine, inducendo nell'ospite effetti tossici, mutageni o cancerogeni. La formazione metabolica di epossidi di dioli avviene preferenzialmente sugli IPA che posseggono la cosiddetta "regione di recesso" (*bay region*), ovvero la struttura a sella che si individua ad esempio nel benzo[*a*]pirene [131,132]. I composti IPA non sostituiti a basso peso molecolare, contenenti 2 o 3 anelli, presentano una significativa tossicità acuta e altri effetti avversi per alcuni organismi, ma non sono cancerogeni; gli IPA a più alto peso molecolare, contenenti da 4 a 7 anelli, sono relativamente meno tossici, ma molti di questi risultano cancerogeni, mutageni o teratogeni per un'ampia varietà di organismi, compresi pesci e altre forme di vita acquatica, anfibi, uccelli e mammiferi, incluso l'uomo [131].

L'Agenzia del Registro delle Sostanze Tossiche e delle Malattie (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR*) degli Stati Uniti ha individuato 17 IPA prioritari, sulla base delle informazioni disponibili, del profilo tossicologico, della diffusione e concentrazione in ambiente e quindi del potenziale di esposizione. Ad eccezione del benzo[*j*]fluorantene, la lista degli IPA prioritari proposta nel 1970 coincide con l'elenco fornito dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (*United States Environmental Protection Agency-US EPA*) [132].

1.4 Biomonitoraggio dei POPs con gli uccelli

L'incremento della popolazione umana, la maggiore richiesta di risorse, gli sviluppi tecnologici e industriali e l'immissione nell'ambiente di notevoli quantità di varie sostanze xenobiotiche di origine antropica, rilasciate sia intenzionalmente che involontariamente, determinano gravi impatti sull'ambiente, con molteplici conseguenze e ripercussioni negative sugli ecosistemi, sulle specie e sull'uomo stesso. Gli uccelli hanno sofferto molto della pressione antropica sull'ambiente naturale [136]. In Europa centrale, le principali combinazioni di fattori che contribuiscono al declino delle popolazioni di uccelli sono: attività economiche (agricoltura, pesca e caccia), alterazione e frammentazione degli habitat, cambiamenti climatici e inquinamento [137]. In tema di inquinamento, gli uccelli hanno svolto spesso un ruolo rilevante come *biomonitor* di alterazioni e problemi ambientali, associati in particolare agli inquinanti organici persistenti (POPs) [138]. Uno degli esempi più emblematici legato all'esposizione degli uccelli ai POPs è il declino massiccio delle popolazioni americane e inglesi di rapaci negli anni '60 e '70 dovuto al bioaccumulo di *para*-diclorodifeniltricloroetano (DDT). Il diclorodifenildicloroetilene (DDE), principale metabolita del DDT, provocando l'assottigliamento del guscio delle uova, influisce negativamente sul successo riproduttivo. Gli effetti del DDE vengono inoltre amplificati dalla presenza di PCB [139]. Sulle coste olandesi del Mare dei *Wadden*, è stata osservata nel periodo 1964-1968 un'enorme mortalità tra specie di uccelli come sterne e gabbiani reali. Nei tessuti di questi uccelli sono state rinvenute considerevoli concentrazioni di pesticidi organoclorurati come *endrin*, *dieldrin* e *telodrin* [140]. La totale assenza di riproduzione delle aquile di mare dalla coda bianca nella zona costiera del Mar Baltico sud-occidentale negli anni '60 e '70 è stata in parte correlata alle notevoli concentrazioni di PCB coplanari (PCB-105, 118, 126 e 156) nei tessuti delle aquile adulte [141]. La diminuzione delle popolazioni di sterne caspiche, in particolare di quelle che nidificano a *Green Bay* e *Saginaw Bay* (USA) tra il 1986 e il 1990, è stata associata alle alte concentrazioni di PCB rilevate nel sangue. La frequenza di anomalie dello sviluppo e di deformità tra gli esemplari di *Saginaw Bay* era quasi cento volte superiore a quella registrata nella stessa area tra il 1962 e il 1972 [142]. L'elevata mortalità di diverse specie di rapaci e uccelli marini registrate nei paesi industrializzati, insieme ai fallimenti riproduttivi, con conseguente declino delle popolazioni, ha contribuito a portare alla luce i problemi ambientali associati ai POPs [136,138]. I cambiamenti nella dinamica delle popolazioni di uccelli furono riconosciuti come avvertimenti di contaminazione e inquinamento. In altre parole, gli uccelli hanno agito da organismi "sentinella" in grado di segnalare la presenza di tali livelli di inquinanti da

compromettere le funzioni vitali degli organismi viventi [138]. In questi e altri studi è stato ripetutamente comprovato ed evidenziato il valore degli uccelli nel monitoraggio di sostanze lipofile e persistenti come i POPs, sia per la loro funzione di accumulatori che di indicatori sensibili [136]. Il biomonitoraggio dei POPs con gli uccelli presenta potenzialità e limiti, sia dal punto di vista metodologico che interpretativo, da valutare e considerare nella pianificazione delle indagini e nella discussione dei risultati [136,138,143]. Gli uccelli sono organismi appariscenti che risultano relativamente semplici da osservare e identificare. La classificazione e la sistematica sono note e consolidate, di conseguenza, il rischio che il monitoraggio sia confuso da incertezze sull'identità o sulle relazioni tra le specie studiate è minimo. La facilità di cattura e censimento degli uccelli agevola anche la raccolta di campioni non distruttivi come sangue, penne, secrezioni dell'uropigio e gusci d'uova. La biologia e l'ecologia generale degli uccelli sono ben conosciute, riducendo perciò il rischio di interpretazioni errate [136,138]. Tra gli uccelli, i rapaci, i predatori e gli scavenger sono particolarmente adatti per il biomonitoraggio dei POPs, in quanto manifestano risposte evidenti e misurabili, che vanno dal notevole accumulo di residui al declino della popolazione [136]. Uccelli piscivori come gli svassi maggiori, gli aironi cenerini e i cormorani mostrano livelli di PCB più elevati in confronto alle anatre che si alimentano principalmente di mitili, e ciò può essere spiegato dal fatto che i pesci appartengono a un livello trofico superiore rispetto ai mitili [144]. Le specie aviarie sono in grado di integrare l'esposizione ai contaminanti sia nel tempo sia in aree spaziali relativamente ampie. Gli estesi areali di distribuzione di varie specie di uccelli consentono di effettuare valutazioni comparative tra popolazioni associate a diversi ecosistemi e habitat. La variazione spaziale della contaminazione dei rapaci è stata spesso oggetto di studio ed è stato possibile metterla in relazione con le differenze regionali nell'uso o nell'immissione di sostanze chimiche nell'ambiente [136]. Conrad (1977) [145] ha misurato livelli più elevati di esaclorobenzene (HCB) nelle uova di quattro specie di rapaci e gufi nelle aree agricole della Germania occidentale, il DDE è stato trovato in concentrazioni più alte nelle regioni in cui predomina la frutticoltura, mentre i PCB erano associati alle zone industriali. Ulteriori indicazioni sulle fonti di inquinamento possono essere ricavate dalle analisi dettagliate delle miscele di sostanze chimiche [136]. La composizione delle miscele di PCB negli uccelli dipende dalle capacità di metabolizzazione, che varia a seconda delle specie e dei siti [136,146,147]. Negli uccelli costieri del Mare dei *Wadden*, la percentuale di congeneri altamente clorurati è risultata superiore nelle aree inquinate da PCB, indicando una maggiore induzione degli enzimi di metabolizzazione nei confronti dei congeneri meno clorurati [136]. La mobilità degli uccelli, che in un primo momento potrebbe sembrare un limite, può invece

risultare un vantaggio se l'obiettivo è quello di monitorare su un'ampia scala, in cui si conoscono i tragitti di spostamento. Gli uccelli possono dunque integrare il segnale in uno spazio e/o in un tempo definiti, fornendo un costo analitico inferiore rispetto a quello che si avrebbe se fosse necessario un campionamento frequente o su scala spaziale più fine per calcolare la media delle variazioni locali nell'esposizione degli organismi sedentari [136,138,143]. Sfruttando proprio la mobilità e la conoscenza delle rotte migratorie, Botero et al. (1996) [148] hanno fornito indicazioni sui potenziali *pattern* stagionali di esposizione a DDE e PCB in relazione all'area geografica, esaminando due specie di anatre con diverse distribuzioni invernali ma che sovrappongono i propri areali durante la stagione riproduttiva. I lunghi spostamenti, come nel caso delle migrazioni, e il momento della deposizione delle uova sono associati ad un periodo di eccezionale richiesta energetica. I cambiamenti nelle riserve corporee possono avere importanti implicazioni per l'assorbimento, il metabolismo, la biotrasformazione e l'accumulo dei POPs [149,150]. Le femmine, utilizzando le riserve corporee immagazzinate per la formazione di uova, possono rimobilizzare e trasferire i PCB alle uova [151]. Oltre che sulla componente spaziale, ulteriori valutazioni possono essere fatte per la scala temporale. In passato, gli uccelli hanno rivelato cambiamenti temporali nell'inquinamento chimico delle aree marine. In Gran Bretagna, i livelli di contaminazione nei fegati di uccelli piscivori hanno confermato il declino nell'utilizzo di DDE e PCB dal 1963 al 1990 [152]. Le specie di uccelli acquatici dei Grandi Laghi (Canada) che si nutrono di pesce, come il gabbiano reale, il cormorano a due creste e la sterna comune, sono state studiate dal 1971 in relazione ai livelli di contaminanti. I risultati mostrano la diminuzione del carico di DDE e PCB in questi laghi fortemente inquinati [153,154]. La longevità degli uccelli rende difficile stabilire eventuali perturbazioni a breve termine; d'altro canto consente di integrare gli effetti degli stress ambientali nel tempo, permettendo per esempio, di misurare gli effetti a livello individuale e di popolazione a seguito di esposizioni prolungate nel tempo [136,138]. La dimensione della popolazione presenta una reazione ritardata agli effetti chimici, soprattutto nelle specie longeve come i predatori, ed insieme alla sopravvivenza individuale risulta un parametro demografico relativamente difficile da misurare. Ciononostante, i tratti riproduttivi, come il successo della schiusa delle uova, rispondono immediatamente alle influenze degli inquinanti, rivelandosi particolarmente adatti nel ruolo di "*early warnings*". Naturalmente, oltre ai contaminanti, esistono molti altri fattori ambientali (biotici e abiotici) che influenzano le popolazioni di uccelli e che possono mascherare il contributo dei composti indagati. Inoltre, gli effetti di una singola sostanza chimica possono essere oscurati dall'interazione positiva tra diversi inquinanti e da effetti sinergici o additivi. Tuttavia, la dinamica delle popolazioni e studi

dettagliati e accurati a diversi stadi vitali potrebbero consentire di isolare i fattori cruciali di uno specifico cambiamento e di fornire avvertimenti sui pericoli ambientali legati alle sostanze chimiche, come hanno dimostrato gli esempi storici sui POPs [136,138].

1.5 Secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne come matrice di indagine per l'analisi dei lipidi e dei POPs

L'approccio maggiormente applicato per l'analisi dei lipidi e dei POPs associati alle secrezioni dell'uropigio prevede la spremitura degli orifizi della ghiandola per favorire la fuoriuscita delle secrezioni che vengono raccolte con una bacchetta di vetro, una salvietta di carta, una garza chirurgica o un filtro in fibra di vetro [42,69,74,155]. Per quanto non si tratti di un approccio distruttivo, ovvero che non reca danni permanenti agli esemplari, risulta comunque relativamente invasivo e operativamente complicato da adottare. Per alcune specie, la raccolta delle secrezioni da uccelli giovani e adulti può rivelarsi problematica e una quantità sufficiente di campione può essere difficile da ottenere [156]. Da qui nasce quindi la necessità di impiegare un approccio non invasivo, che allo stesso tempo agevoli anche la fase di campionamento. Pur presentando notevoli potenzialità in questa direzione, solamente Briels et al. [157] e Thomas et al. [67] (al meglio delle nostre conoscenze) hanno adottato le secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne come matrice di indagine rispettivamente per l'analisi dei POPs e delle cere. Questo approccio permette la raccolta delle penne su individui vivi nel corso delle stagioni, consentendo così anche di seguire i cambiamenti temporali, senza compromissione della loro sopravvivenza e della loro fisiologia. Infatti, le penne prelevate possono essere prontamente rimpiazzate, così come sono sostituite le penne cadute, durante la muta, o perse durante l'anno, ad esempio in seguito all'attacco di un predatore oppure durante la competizione per le femmine nella stagione riproduttiva [156,158].

La relazione chimica tra i lipidi delle secrezioni dell'uropigio, prelevate direttamente dalla ghiandola, e i lipidi riscontrati dall'analisi di campioni di penne è stata presa in considerazione solo in pochi studi che hanno riportato grandi differenze qualitative [26,46,78,159,160]. Mardon et al. (2011) [78] hanno dimostrando che l'85% dei lipidi delle penne provenivano dalle secrezioni dell'uropigio, con una differenziazione chimica che comprende variazioni qualitative per gli acidi grassi e quantitative per gli alcoli. Questo risultato è sorprendente alla luce dei pochi precedenti confronti, che in genere riportavano importanti discordanze qualitative tra i due segnali. Ad esempio, l'esame di Bolliger e

Varga (1961) [160] di 14 specie di uccelli li ha portati a concludere che i lipidi delle penne hanno una composizione qualitativa diversa da quella delle secrezioni raccolte dalla ghiandola uropigiale. Analogamente, un'indagine chimica sui lipidi delle penne di marabù (*Leptoptilos crumenifer* Lesson, 1831) ha evidenziato una discrepanza significativa rispetto alle secrezioni dell'uropigio per la presenza di steroli e acidi grassi [159]. Diehl et al. (2020) [46] hanno rilevato colesterolo, acidi grassi insaturi e acidi grassi saturi dall'analisi delle penne di pulcini di polli che non hanno una ghiandola uropigiale funzionalmente attiva. Infine, il risultato più significativo proviene dai colombacci, dove solo il 6,7% dei lipidi delle penne è stato considerato proveniente dalla ghiandola uropigiale [26]. In tutti questi studi però l'intera penna ha preso parte all'analisi, compresa la sua struttura cheratinica, e non solo ciò che è depositato sulla sua superficie. Bolliger e Varga (1961) [160] e Diehl et al. (2020) [46] ipotizzano infatti che gran parte dei lipidi rinvenuti dallo studio delle penne possano essere sottoprodotti del processo di cheratinizzazione associato al loro sviluppo. In particolare, il fondamento logico di Diehl et al. (2020) [46] si basa sull'analogia morfogenetica tra le penne e l'epidermide degli uccelli. Meccanismi di morte cellulare programmata (apoptosi) durante la corneificazione modellano morfogeneticamente l'epidermide e le penne degli uccelli. Tuttavia, i lipidi dell'epidermide non solo sopravvivono a questi processi di morte cellulare, ma aumentano in contenuto. Poiché le strutture delle penne derivano dall'epidermide embrionale e subiscono la corneificazione in analogia con la morfogenesi epidermica, anche questi lipidi potrebbero sopravvivere alla morte cellulare specifica durante la corneificazione delle penne. Verrebbero così a definirsi i lipidi endogeni delle penne, distinti dai lipidi delle secrezioni dell'uropigio distribuiti sulla superficie delle penne durante il *preening* [46]. Vista la mancanza di ulteriori studi (al meglio delle nostre conoscenze) che forniscano una stima quantitativa su eventuali altri contributi (escludendo il contributo dell'ambiente esterno) lipidici associati alla superficie delle penne, le ipotesi di Bolliger e Varga (1961) [160] e Diehl et al. (2020) [46] dunque giustificherebbero l'attribuzione dei lipidi rinvenuti sulla superficie delle penne alle secrezioni dell'uropigio.

Il dibattito sulle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne si estende anche in relazione alle matrici utilizzate per il biomonitoraggio dei POPs. Le secrezioni, prelevate direttamente dalla ghiandola uropigiale, e le penne sono due matrici che forniscono informazioni diverse sull'esposizione ai POPs [156,161]. I POPs si depositano nelle penne durante la loro crescita, attraverso le connessioni sanguigne. Nelle penne completamente mature, le connessioni vascolari si atrofizzano e i composti non possono più raggiungere l'interno della piuma [162,163]. Pertanto, le penne forniscono informazioni sulla concentrazione di composti nel sangue durante il periodo di

sviluppo. Questo è rilevante perché le penne mature campionate in un luogo possono fornire informazioni sull'esposizione dell'uccello durante il suo soggiorno in un'area completamente diversa [156]. La discrepanza tra il momento della formazione e quello della raccolta spesso determina una mancanza di correlazione per i POPs tra plasma e penne [164] o tra tessuti interni e penne [165]. Dall'altra parte, l'elevato contenuto lipidico delle secrezioni dell'uropigio consente di agire da "serbatoio", permettendo la determinazione di un'ampia gamma di POPs in concentrazioni anche superiori rispetto a quelle rinvenute nel sangue o nel fegato [161,166]. I tempi di sequestro integrano un breve periodo di tempo e si avvicinano a quelli del sangue, vista la costante connessione con quest'ultimo. Le secrezioni dell'uropigio rispecchiano la contaminazione interna da POPs, dato che sia i suoi profili di accumulo che le correlazioni riflettono i modelli di accumulo nel plasma sanguigno [161]. Vista però la diversa natura e rilevanza biologica delle due matrici, non distinguere il contributo derivante da ognuna di esse rischia di portare ad interpretazioni errate sull'esposizione ai POPs nell'ambito delle indagini di biomonitoraggio [162]. Tuttavia, il lavaggio e la decontaminazione della superficie delle penne con solventi appropriati vengono raramente effettuati [156]. Eppure, i risultati di Jaspers et al. (2008) [162] rivelano un effetto significativo del lavaggio con acetone sulle concentrazioni misurate nelle penne, se paragonate con quelle di controllo non trattate. Inoltre, le correlazioni più elevate sono state riscontrate dal confronto dei livelli nelle penne di controllo con i valori delle secrezioni prelevate dalla ghiandola uropigiale. Perciò, la fonte principale di contaminazione esterna delle penne è stata attribuita alle secrezioni dell'uropigio, che hanno dimostrato di influenzare significativamente le concentrazioni dei POPs [162]. Alla luce di ciò, l'attribuzione dei POPs rinvenuti sulla superficie delle penne alle secrezioni dell'uropigio appare giustificata (escludendo il contributo dell'ambiente esterno).

1.6 Obiettivi della tesi

Come si evince dalla trattazione dell'ultimo paragrafo, una simultanea analisi ad ampio spettro dei lipidi e dei POPs presenti nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne non è mai stata eseguita. Dunque, il presente lavoro di tesi si distingue per essere il primo studio ad indagare le potenzialità e l'applicabilità delle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne per la simultanea analisi dei lipidi e dei POPs. L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è la caratterizzazione *target* e *untarget* dei lipidi, in particolare cere, acidi grassi e steroli, e la determinazione di inquinanti organici persistenti (POPs), nello specifico policloro bifenili (PCB) e idrocarburi policiclici aromatici

(IPA), nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola. Come si vedrà più nel dettaglio nel capitolo successivo, per raggiungere tale obiettivo si è dovuto compiere uno sforzo non indifferente dal punto di vista dello sviluppo di un metodo analitico che consentisse la determinazione di tutte le classi di composti organici di interesse. L'obiettivo secondario della tesi prevede la discussione e interpretazione dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione in relazione alla posizione delle penne prelevate, l'habitat, la dieta, il periodo migratorio, il genere e l'età degli individui di alzavola.

2 Materiali e metodi

In questo capitolo vengono descritte le fasi preanalitiche e analitiche adottate per la determinazione delle classi di composti organici di interesse, ovvero cere, acidi grassi, steroli, PCB e IPA, nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola.

2.1 Campionamento

Il campionamento degli individui di alzavola è avvenuto durante la migrazione post riproduttiva del 2021 (da settembre a novembre) in Valle Figheri (45°17'54.65"N, 12°08'08.10"E), localizzata nel bacino sud della Laguna di Venezia. I 39 esemplari in esame sono stati catturati utilizzando una trappola esca, nell'ambito di attività di monitoraggio istituzionale coordinate dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e condotte da inanellatori abilitati dal Centro Nazionale di Inanellamento di ISPRA in possesso di autorizzazione alla cattura per scopi scientifici rilasciata dalla Regione Veneto (Decreti n. 14/2018 e 214/2018). Gli individui catturati sono stati successivamente inanellati, misurati secondo le modalità standard previste dalle procedure di inanellamento [167] e suddivisi per genere e in classe di età (giovani e adulti) in base alle caratteristiche del piumaggio e delle parti nude [168].

Le secrezioni dell'uropigio sono state prelevate premendo delicatamente sulla ghiandola per favorire la fuoriuscita dell'olio, al fine di ottenere il maggiore quantitativo possibile di campione, e successivamente raccogliendo in una provetta sterile 39 campioni di penne poste immediatamente nelle vicinanze dell'uropigio. Da ogni individuo sono stati inoltre raccolti 39 campioni di penne del ventre (3/4 penne per individuo), conservati in provette sterili. Le provette contenenti i campioni sono state etichettate con data e codice identificativo dell'anello metallico corrispondente a ciascun individuo e conservate a -20 °C fino alle successive analisi.

2.2 Solventi, reagenti e standard

Solventi adoperati con grado di purezza pesticidi (*Romil Ltd.*, Cambridge, UK): *n*-esano (Hex), diclorometano (DCM) e metanolo (MeOH).

Reagenti impiegati:

- idrossido di potassio (KOH) 0.5 N (*Merck KGaA*, Darmstadt, Germania)
- acido cloridrico (HCl) 1.25 M in metanolo anidro (*Merck KGaA*, Darmstadt, Germania)
- acido cloridrico (HCl) 6 M preparato a partire da HCl SpA, 34-37% (*Romil Ltd.*, Cambridge, UK)
- N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetammide (BSTFA) con 1% di trimetilclorosilano (TMCS) (*Merck KGaA*, Darmstadt, Germania)
- solfato di sodio (Na₂SO₄) anidro (*Sigma Aldrich*, Saint Louis, USA)
- allumina (Al₂O₃) basica attivata (*Sigma Aldrich*, Saint Louis, USA)
- acqua ultrapura (PURELAB® Chorus, Elga Lab water, High Wycombe UK)

Soluzioni standard utilizzate:

- IPA nativi (*o2si*, Charleston, SC, USA) e marcati isotopicamente ¹³C₄-benzo(a)pirene, ¹³C₆-acenaftilene, ¹³C₆-fenantrene (*Chiron*, Trondheim, Norvegia)
- PCB nativi (*AccuStandard*, New Haven, CT, USA) e marcati isotopicamente ¹³C₁₂ (*Cambridge Isotope Laboratories Inc.*, Andover, MA, USA)
- steroli nativi e colesterolo marcato isotopicamente 25,26,27-¹³C₃ (*Merck KGaA*, Darmstadt, Germania)
- acidi grassi saturi e insaturi nativi ed acido ottadecanoico marcato isotopicamente ¹³C₁₈ (*Merck KGaA*, Darmstadt, Germania)

2.3 Strumentazione e materiali

La vetreria e il materiale in acciaio inossidabile (spatole e pinze) adoperati sono stati lavati con acqua e detergente *Contrad*® (2-5% in volume), asciugati e decontaminati tramite risciacqui con tre aliquote di diclorometano e tre aliquote di *n*-esano. Il materiale monouso in vetro (*vial*, pipette *Pasteur* e inserti) è stato decontaminato tramite lavaggi con tre aliquote di diclorometano e tre aliquote di *n*-esano oppure subendo un trattamento in muffola a 400 °C per circa 8 ore.

2.3.1 Sonicatore

Il sonicatore è un apparecchio che genera vibrazioni meccaniche amplificate ad elevata frequenza (ultrasuoni), sfruttando corrente elettrica prodotta da un generatore, nell'acqua contenuta nella

sua vasca. La sonicazione si basa sul fenomeno della cavitazione che prevede la formazione di piccole bolle nel mezzo liquido permettendo di velocizzare la dissoluzione dei soluti in determinati solventi.

2.3.2 Evaporatore ad aghi

Un evaporatore ad aghi a flusso di azoto consente la riduzione e concentrazione del campione nella *vial*. Questo strumento è dotato di un sistema che insuffla azoto, tramite degli aghi fissati su un supporto ad altezza regolabile, nella *vial* favorendo il passaggio in fase gassosa del solvente. Il flusso del gas viene regolato manualmente tramite appositi rubinetti e il piano di alloggiamento delle *vial* è fornito di blocco riscaldante a temperatura impostabile. In questo lavoro è stato utilizzato un sistema *FlexiVap™ WorkStation* (Glas-Col LLC, Terre Haute, IN, USA).

2.3.3 Gascromatografo accoppiato ad un analizzatore di massa a singolo quadrupolo (GC-MS)

Il sistema adoperato è composto da un gascromatografo *Agilent Technologies 7890A GC system* accoppiato ad un analizzatore a singolo quadrupolo *Agilent Technologies 5975C inert MSD*. Il campione vaporizzato nell'iniettore del gascromatografo percorre, trasportato da un flusso di elio che funge da fase mobile, una colonna capillare, alloggiata all'interno di un forno a temperatura programmabile, con una fase stazionaria solida. I composti separati in colonna grazie alla loro diversa affinità per la fase stazionaria giungono in tempi diversi alla sorgente ad impatto elettronico (EI) dell'analizzatore a singolo quadrupolo attraverso l'interfaccia (*transfer line*). A questo punto avviene una ionizzazione *hard*, dovuta all'interazione degli analiti con un fascio di elettroni generato dalla sorgente ad impatto elettronico (EI), che provoca una notevole frammentazione dei composti. Gli ioni carichi positivamente prodotti vengono respinti dal repeller e focalizzati da lenti verso il quadrupolo che, generando un campo elettrico, seleziona gli ioni con un determinato rapporto massa su carica da far arrivare al rivelatore. Il segnale elettrico viene amplificato da un elettromoltiplicatore a dinodi separati e successivamente processato per restituire un cromatogramma. L'acquisizione può avvenire in modalità *selected ion monitoring* (SIM), in cui si selezionano specifici rapporti m/z per ottenere una sensibilità analitica elevata in grado di garantire una corretta identificazione e analisi quantitativa sul campione (caratterizzazione *target*), oppure in

modalità *full scan*, finalizzata ad un'analisi principalmente qualitativa (caratterizzazione *untarget*), in quanto l'ampio intervallo di rapporti m/z impostato riduce la sensibilità strumentale.

2.3.4 Gascromatografo accoppiato ad un analizzatore di massa a triplo quadrupolo (GC-MS/MS)

Il sistema adottato è composto da un gascromatografo *Thermo Scientific Trace 1310 GC* accoppiato con un analizzatore a triplo quadrupolo *Thermo Scientific TSQ9000 TQMS*. Il campione viene vaporizzato, in un iniettore PTV (*Programmed Temperature Vaporization*), gradualmente in base ad un programma di temperatura. Il gascromatografo rispetta gli stessi principi analitici di separazione dei composti descritti in precedenza. I composti che giungono all'analizzatore di massa a triplo quadrupolo, tramite l'interfaccia, vengono frammentati in ioni carichi positivamente dal fascio di elettroni generato dalla sorgente ad impatto elettronico (EI). Gli ioni respinti dal repeller vengono focalizzati da lenti verso i tre quadrupoli disposti in successione. L'acquisizione del triplo quadrupolo è impostata in modalità *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*, in cui il primo e terzo quadrupolo fungono da filtro di massa mentre il quadrupolo centrale agisce da cella di collisione. Il primo quadrupolo seleziona uno ione "precursore" mentre il terzo quadrupolo seleziona degli ioni "prodotti", ottenuti dalla frammentazione dello ione "precursore" nella cella di collisione ad opera di gas inerte (Argon) mantenuto ad elevate velocità, che giungono al rivelatore. Il GC-MS/MS fornisce un'elevata selettività, ovvero una separazione cromatografica con minore interferenza data dai composti coeluiti, e sensibilità, in termini di rapporto segnale su rumore, consentendo un'accurata identificazione e quantificazione degli analiti (caratterizzazione *target* del campione).

2.4 Quantificazione

La quantificazione degli acidi grassi, steroli, IPA e PCB è stata eseguita mediante la tecnica della diluizione isotopica e impiegando standard interni. Gli standard interni, aggiunti in quantità e concentrazioni note a monte della fase preanalitica, sono composti chimici marcati isotopicamente ^{13}C il cui comportamento chimico-fisico si suppone analogo ai corrispondenti composti nativi nelle fasi di trattamento del campione. Data quest'assunzione, le perdite di analiti che possono avvenire durante la fase preparativa del campione si verificheranno in misura uguale anche sugli standard interni. La quantificazione degli analiti avviene quindi per confronto delle aree dei picchi

cromatografici degli analiti con le aree dei picchi degli standard interni, e corretti per un fattore di risposta che tiene conto della diversa sensibilità strumentale per i vari analiti. I fattori di risposta per ciascun analita si ricavano sottoponendo ad analisi strumentale, nelle stesse condizioni dei campioni, soluzioni che contengono in concentrazioni note i composti nativi e marcati ¹³C corrispondenti agli analiti da determinare. La variante nativa da quella marcata si distinguono per il diverso rapporto m/z di alcuni ioni, per cui dal confronto delle aree di questi sarà possibile calcolare i fattori di risposta.

Il limite di rivelabilità (LOD), ovvero il valore minimo al di sopra del quale un analita si considera effettivamente presente nel campione, è stato calcolato sommando la media con la tripla deviazione standard delle quantità assolute determinate nei bianchi, costituiti da *vial* vuote, sottoposti alla stessa procedura analitica dei campioni.

In Appendice sono riportate le concentrazioni e le aggiunte degli standard interni, le concentrazioni dei fattori di risposta e le masse degli ioni utilizzati per la determinazione degli analiti.

2.5 Ottimizzazione del metodo analitico

La mancanza di un metodo di riferimento in letteratura per l'analisi simultanea delle classi di composti organici di interesse, nello specifico cere, acidi grassi, steroli, IPA e PCB, in questa matrice, ovvero le secrezioni dell'uropiglio distribuite sulle penne, ha richiesto lo sviluppo di un metodo corale ottenuto dalla combinazione e adattamento di passaggi procedurali e analitici applicati per l'analisi di specifiche classi di composti. Il metodo definitivo applicato per la determinazione e/o quantificazione degli analiti è stato raggiunto attraverso una serie di test, riguardanti la fase preanalitica e/o strumentale, effettuati su dei campioni di prova rappresentativi.

2.5.1 Metodo #1

Il metodo #1, composto da una fase preanalitica seguita da un'analisi strumentale, si è posto i seguenti obiettivi:

1. rivelare la presenza della classe di composti (cere) per la quale non sono disponibili standard
2. verificare la presenza degli standard interni degli acidi grassi, steroli, IPA e PCB nelle rispettive frazioni ottenute dalla cromatografia preparativa

3. ottenere un segnale cromatografico e degli spettri di massa adeguati alla determinazione degli analiti

Il metodo è stato testato su tre campioni di prova di penne dell'uropigio dell'alzavola, ritenute rappresentative di una matrice particolarmente complessa, in grado di permettere la rivelazione delle varie classi di composti organici indagate.

2.5.1.1 Fase preanalitica

La fase preanalitica prevede un opportuno trattamento del campione con l'obiettivo di "semplificare" la matrice, estraendo e conservando però anche tutti gli analiti di interesse fino all'analisi strumentale, in modo tale da evitare interferenze nel segnale strumentale. Questa fase si articola negli *step* di seguito illustrati.

Estrazione degli analiti

L'estrazione degli analiti presenti nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne è avvenuta utilizzando la tecnica dell'estrazione in solvente assistita da un bagno ad ultrasuoni. Il campione di penne integre è stato inserito in una *vial* a cui si sono aggiunte quantità note di standard interni marcati isotopicamente, e 3.5 mL di diclorometano e metanolo in rapporto 2 a 1 (v/v) come solventi di estrazione. La *vial* chiusa, contenente il campione, è stata disposta nella vasca del sonicatore riempita con uno strato d'acqua. L'estrazione nel solvente è avvenuta in un unico ciclo impostando una sessione di sonicazione pari a 15 minuti.

Filtrazione ed anidificazione dell'estratto

Per rimuovere i residui grossolani di penne nel solvente di estrazione ed eliminare eventuale umidità, il campione è stato sottoposto ad una filtrazione facendolo passare attraverso una pipetta Pasteur contenente circa 1 g di solfato di sodio anidro, sostenuto alla base da lana di vetro.

Concentrazione del campione

Il campione è stato portato a secco in flusso di azoto impostando il termoblocco dell'evaporatore ad aghi ad una temperatura di 25 °C.

Purificazione e frazionamento del campione

La necessità di determinare cinque classi di composti organici e allo stesso tempo di evitare interferenze nel segnale strumentale ha richiesto l'impiego della cromatografia preparativa su colonna impaccata come tecnica di purificazione e frazionamento del campione. Il principio di tale tecnica si basa sulla diversa affinità delle componenti presenti nella miscela di estrazione per una fase stazionaria (solida). Il trasporto delle molecole attraverso la fase stazionaria è regolato dal flusso di una fase mobile (liquida).

Operativamente, in una pipetta *Pasteur* è stata inserita lana di vetro in quantità sufficiente da garantire un supporto allo strato di 0.5 g di alluminia attivata che funge da fase stazionaria. Il campione a secco nella *vial*, inizialmente ripreso con 0.5 mL di *n*-esano e diclorometano in rapporto 9 a 1, è stato caricato in testa alla pipetta con l'alluminia basica attivata, preconditionata con *n*-esano, ed eluito con 3.5 mL di *n*-esano:diclorometano=9:1. Nel volume raccolto in una *vial*, che costituisce la frazione neutra del campione (frazione 1), ci si attende di rivelare dall'analisi strumentale gli analiti apolari: IPA, PCB e cere. Una seconda frazione (frazione 2), che dovrebbe contenere gli steroli come analiti di interesse, è stata fatta eluire con 3 mL di diclorometano. Infine, con 4 mL di metanolo, è stata eluita la frazione polare del campione (frazione 3) in cui ci si aspetta di ritrovare gli acidi grassi.

Concentrazione

La frazione 1 è stata concentrata fino a circa 100-200 μL e trasferita in una *vial* da gascromatografo, mentre le frazioni 2 e 3 sono state portate a secco per i successivi passaggi preanalitici.

Derivatizzazione

La derivatizzazione consiste in una reazione chimica nella quale avviene una sostituzione dei gruppi funzionali delle molecole. La derivatizzazione viene impiegata per ridurre la polarità ed aumentare la volatilità delle molecole, consentendo la separazione gascromatografica.

La frazione 2 è stata ripresa con 100 μL di diclorometano e 100 μL di BSTFA+1% TMCS, che funge da agente derivatizzante, sostituendo l'idrogeno di un gruppo ossidrilico con un gruppo trimetilsilile ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). Dopo essere stata trasferita in *vial* idonee all'analisi gascromatografica e riscaldata a 70 °C per un'ora nel termoblocco, questa frazione è stata lasciata a temperatura ambiente per circa 20 ore prima di effettuare l'analisi strumentale.

La frazione 3 è stata derivatizzata con 1 mL di acido cloridrico (HCl) 1.25 M in metanolo anidro riscaldato in un termoblocco a 80 °C per 2 ore, ottenendo gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME).

Estrazione dei FAME

Gli esteri metilici degli acidi grassi contenuti nella frazione 3 sono stati trasferiti in *n*-esano operando un'estrazione liquido-liquido. Dopo l'aggiunta di 1 mL di acqua ultrapura, è stata effettuata un'estrazione con 1 mL di *n*-esano ripetuta in triplo. L'agitazione meccanica fornita da un *vortex* ha permesso di agevolare il trasferimento e la concentrazione dei FAME in *n*-esano. L'*n*-esano, separato dalla fase acquosa, è stato raccolto in una nuova *vial* dopo una filtrazione attraverso una pipetta Pasteur riempita di solfato di sodio, preconditionato con *n*-esano e sostenuto da uno strato di lana di vetro. Infine, la frazione 3 è stata portata a secco sotto flusso di azoto, ripresa con 100 µL di *n*-esano e trasferita in una *vial* da gascromatografo per l'analisi strumentale.

2.5.1.2 Analisi strumentale

Le cere, gli acidi grassi e gli steroli sono stati analizzati con il GC-MS, mentre gli IPA e i PCB con il GC-MS/MS.

La configurazione e i parametri fissi ed invariati per entrambi gli strumenti sono:

- colonna capillare *Agilent Technologies HP5-MS* (60 m, 0.25 mm di diametro interno, 0.25 µm di spessore del film) con una fase stazionaria solida costituita da (5%-fenil)-metilpolisilossano
- interfaccia (*transfer line*) mantenuta a 300 °C
- sorgente ad impatto elettronico (EI) impostata a 70 eV

La temperatura della sorgente del GC-MS è fissata a 230 °C per tutti gli analiti in esame, mentre la configurazione e i parametri variabili che definiscono i metodi strumentali a seconda degli analiti analizzati sono:

- cere e acidi grassi: l'iniezione è avvenuta in modalità *splitless* a 300 °C. Il flusso di elio è impostato a 1 mL min⁻¹. La temperatura iniziale del forno impostata a 100 °C e mantenuta per 1 minuto è seguita da una prima rampa di incremento della temperatura a 8 °C min⁻¹ fino a raggiungere i 250 °C; la seconda rampa a 2 °C min⁻¹ raggiunge i 300 °C con una statica di 10 minuti; la fase di *post run* dura 5 minuti a 315 °C. Le acquisizioni vengono eseguite in

modalità SIM e *full scan* per gli acidi grassi, e soltanto in *full scan* per le cere. L'intervallo m/z dei *full scan* è compreso tra 50 e 500

- steroli: l'iniezione è avvenuta in modalità *splitless* a 290 °C. Il flusso di elio è impostato a 1 mL min⁻¹. La temperatura iniziale del forno impostata a 150 °C viene portata a 30 °C min⁻¹ fino a 220 °C; una seconda rampa a 0.7 °C min⁻¹ fino a 275 °C è seguita dall'ultima rampa a 10 °C min⁻¹ fino a 300 °C che vengono mantenuti per 6 minuti; la fase di *post run* è di 10 minuti a 315 °C. L'acquisizione avviene in modalità SIM

I metodi strumentali per gli analiti analizzati al GC-MS/MS prevedono:

- IPA: l'iniezione è avvenuta in modalità *splitless* con PTV da 70 °C a 300 °C a 14.5 °C s⁻¹. Il flusso di elio è impostato a 1 mL min⁻¹. Temperatura iniziale: 70 °C (2 min), 10 °C min⁻¹ fino a 200 °C (5 min); 8 °C min⁻¹ fino a 280 °C (5 min); 5 °C min⁻¹ fino a 310 °C (9 min). La temperatura della sorgente è impostata a 300 °C
- PCB: l'iniezione è avvenuta in modalità *splitless* con PTV da 75 °C a 350 °C a 14.5 °C s⁻¹. Il flusso di elio è impostato a 1 mL min⁻¹. Temperatura iniziale: 90 °C (1 min), 20 °C min⁻¹ fino a 150 °C (0 min), 4 °C min⁻¹ fino a 300 °C (15 min). La temperatura della sorgente è impostata a 350 °C

2.5.1.3 Discussione del metodo #1

Considerazioni, suddivise per classi di analiti, sui risultati ottenuti con il metodo #1 in relazione agli obiettivi stabiliti inizialmente:

- Lo standard degli acidi grassi è stato rilevato nella frazione 3, come previsto. I segnali cromatografici ottenuti dalle acquisizioni in *full scan* e SIM si sono rivelati adatti per l'identificazione e quantificazione degli analiti
- Lo standard per gli steroli è stato rilevato nella frazione 2, come atteso, osservando un segnale cromatografico adeguato alla determinazione degli analiti
- Le cere sono state rivelate nella frazione 1, come supposto, ma il segnale cromatografico e gli spettri di massa ricavati dall'acquisizione in *full scan* non consentivano l'identificazione degli analiti nel campione, viste le eccessive intensità del segnale accompagnate da un'insufficiente risoluzione dei picchi cromatografici
- Gli standard per gli IPA sono stati rilevati nella frazione 1, come previsto, ma il segnale cromatografico osservato non avrebbe permesso una quantificazione degli analiti sui

campioni, date le interferenze cromatografiche attribuite alla presenza delle cere nella stessa frazione

- Gli standard dei PCB sono stati rilevati nella frazione 1, come atteso, ma valgono le stesse considerazioni fatte per gli IPA riguardo al segnale cromatografico interferito

2.5.2 Metodo #2

Il metodo #2 si prefigge di raggiungere gli stessi obiettivi iniziali del metodo #1. Alla luce delle problematiche riscontrate nell'analisi strumentale degli analiti contenuti nella frazione 1 (cere, IPA e PCB) sono state apportate delle modifiche sia alla fase preanalitica che all'analisi strumentale. Il metodo #2 è stato testato su un campione di penne dell'uropigio dell'alzavola.

2.5.2.1 Fase preanalitica

La fase preanalitica, oltre agli stessi trattamenti sul campione effettuati con il metodo #1, prevede in aggiunta:

- prelievo di un'aliquota (200 μ L, diluiti poi in 2 mL) dai 3.5 mL di diclorometano:metanolo =2:1 dopo l'estrazione in bagno ad ultrasuoni, per la diretta analisi strumentale sulle cere
- saponificazione, finalizzata a rimuovere la presenza delle cere nella frazione 1, sul resto dell'estratto (3.3 mL di diclorometano:metanolo=2:1) prima della purificazione e frazionamento del campione

Saponificazione ed estrazione

La saponificazione è un processo irreversibile di idrolisi di un estere, trattato con una base forte e successivamente con un acido, che porta alla formazione di un alcol e un acido carbossilico. L'estratto, portato a secco, è stato lasciato saponificare per una notte a temperatura ambiente aggiungendo 3.5 mL di KOH 0.5 N in metanolo anidro. La soluzione è stata acidificata con HCl 6 M fino a pH<2 dopo l'aggiunta di 10 mL di acqua ultrapura. Il saponificato è stato trasferito in *vial* da 60 mL effettuando un'estrazione liquido-liquido con 12 mL di diclorometano:*n*-esano=5:7 ripetuta in triplo e una filtrazione attraverso una pipetta *Pasteur* riempita di solfato di sodio, preconditionato con *n*-esano e sostenuto da uno strato di lana di vetro.

Il campione saponificato, e portato a secco, ha subito in seguito gli stessi trattamenti previsti dal metodo #1 a partire dalla fase di purificazione e frazionamento.

2.5.2.2 Analisi strumentale

Le cere, gli acidi grassi e gli steroli sono stati analizzati con il GC-MS, mentre gli IPA e i PCB con il GC-MS/MS.

I metodi strumentali per l'analisi degli IPA, PCB e steroli sono rimasti invariati rispetto al metodo #1.

I nuovi metodi strumentali per gli acidi grassi e le cere prevedono:

- acidi grassi: l'iniezione è avvenuta in modalità *splitless* a 300 °C. Il flusso di elio è impostato a 1 mL min⁻¹. Temperatura iniziale: 50 °C (1 min); 8 °C min⁻¹ fino a 250 °C; 1 °C min⁻¹ fino a 285 °C con un *post run* di 10 min a 315 °C. Le acquisizioni vengono eseguite in modalità SIM e *full scan*
- cere: l'iniezione è avvenuta in modalità *splitless* a 300 °C. Il flusso di elio è impostato a 1 mL min⁻¹. Temperatura iniziale: 70 °C (1min); 50 °C min⁻¹ fino a 240 °C; 0.3 °C min⁻¹ fino a 257 °C con un *post run* di 10 min a 315 °C. L'acquisizione avviene in modalità *full scan*

Le modifiche più rilevanti apportate al metodo strumentale per gli acidi grassi consistono nell'impostazione di una temperatura iniziale del forno più bassa e una rampa di temperatura centrale più lenta. Avendo saponificato ci si attende di rivelare un maggior numero di composti (rampa di temperatura rallentata per agevolare la separazione cromatografica), e più volatili (temperatura iniziale abbassata).

Il metodo strumentale per le cere ha lo scopo di ottimizzare la separazione cromatografica impostando una rampa di temperatura centrale molto lenta.

2.5.2.3 Discussione del metodo #2

Il metodo #2 testato sul campione di prova ha permesso di conseguire tutti gli obiettivi preposti, per cui è stato adottato come metodo definitivo da applicare ai campioni in esame.

3 Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati della caratterizzazione *target* e *untarget* delle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola per le classi di composti organici di interesse: cere, acidi grassi, steroli, PCB e IPA. I 78 campioni di penne provengono da 39 esemplari di alzavola (due campioni per esemplare). I campioni sono identificati da un codice, composto da lettere e cifre, corrispondente a ciascuno degli individui. L'aggiunta del suffisso "U" a tale codice distingue le penne dell'uropigio, ovvero le penne raccolte in prossimità della ghiandola uropigiale, (esempio: HT69U) da quelle campionate dal ventre (esempio: HT69). Tenendo quindi in considerazione il diverso punto di prelievo delle penne, i risultati, soprattutto della caratterizzazione *target*, sono esposti separatamente. Le rappresentazioni grafiche raggruppano i campioni in base alle informazioni sul genere e l'età degli individui di alzavola. Nello specifico, le lettere "M", "F" e "I" corrispondono rispettivamente a maschio, femmina e indifferenziato (individuo di cui non si è riusciti a determinare il genere), mentre le cifre 3 e 4 sono associate all'età degli esemplari. Infine, a causa di problemi occorsi durante la fase preanalitica di laboratorio, il campione HT62 fornisce dati solo per le cere, mentre per il campione HT560 non si hanno risultati relativi agli acidi grassi.

3.1 Caratterizzazione *untarget*

I risultati della caratterizzazione *untarget* sono stati ottenuti dall'identificazione dei composti tramite gli spettri di massa, associati ai rispettivi picchi cromatografici, acquisiti dall'analisi con il GC-MS in modalità *full scan*. Questo metodo consente di identificare i composti organici tramite il tempo di ritenzione risultante dalla separazione gascromatografica, il riconoscimento di determinati *pattern* di frammentazione tipici per alcune classi di composti e l'individuazione di specifici ioni diagnostici che forniscono ulteriori indicazioni sulla massa e struttura molecolare. L'applicazione di questo metodo si è avvalsa del supporto della letteratura e della separazione dei composti in classi di polarità permessa dal metodo analitico applicato. In un'analisi a così ampio spettro, la letteratura, fornendo sia gli strumenti utili ai fini interpretativi dello spettro di massa che le conoscenze pregresse sulla matrice di analisi, risulta indispensabile nel restringere il campo delle potenziali classi di composti rivelate. In questo senso, il metodo analitico applicato ha agito da ulteriore filtro di selezione ed esclusione. Infatti, alcune classi di composti presentano dei *pattern* di frammentazione

così simili tra loro da rendere il solo studio dello spettro di massa insufficiente all'identificazione del composto. Come si vedrà in seguito, il trattamento del campione nella fase preanalitica, svolgendo un ruolo predittivo riguardo ai possibili composti rivelabili, ha influenzato in maniera determinante l'interpretazione degli spettri di massa.

3.1.1 Cere

La letteratura consultata ai fini dell'interpretazione degli spettri di massa delle cere comprende gli studi di Urbanová et al. [169], Aasen et al. [170], Dekker et al. [69] e Damsté et al. [70]. Le cere identificate nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola appartengono alla classe dei monoesteri saturi di cere, costituite dalla condensazione di un acido grasso e un alcol primario che non presentano doppi legami C-C lungo la loro catena idrocarburica. Questa classe presenta un *pattern* di frammentazione caratteristico, in cui risultano riconoscibili tre ioni diagnostici che forniscono ulteriori indicazioni sulla massa e struttura molecolare delle cere: ione molecolare, ione protonato dell'acido grasso e ione alchilico. Il frammento con il rapporto m/z più grande nello spettro di massa corrisponde allo ione molecolare che permette di attribuire alla cera una massa molecolare e un numero di atomi di carbonio. Lo ione protonato dell'acido grasso restituisce generalmente il segnale più intenso nello spettro di massa e consente di risalire alla massa e al numero di carboni dell'acido grasso. Infine, lo ione alchilico, prodotto dall'eliminazione dell'acido grasso da parte dello ione molecolare, è associato alla catena idrocarburica derivante dall'alcol primario. Variazioni nell'intensità del segnale di questi due ultimi ioni diagnostici consentirebbero inoltre di ricavare informazioni sulla posizione e sul numero di eventuali ramificazioni. Tale interpretazione risulta particolarmente ardua in assenza di standard analitici da utilizzare per il confronto dei tempi di ritenzione e dunque non è stato possibile assegnare ad ogni picco cromatografico il nome IUPAC della cera. Tuttavia, i risultati illustrano i blocchi fondamentali, in termini di massa e numero di carboni, associati all'acido grasso e all'alcol che formano ogni cera. Inoltre, si rimanda al paragrafo **3.1.2** per un aggiuntivo approfondimento sugli acidi grassi identificati come potenziali componenti delle cere.

Nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola sono stati identificati 53 monoesteri saturi di cere (**Tabella 3.1**). Le masse molecolari delle cere variano tra 368 e 452 Da (Dalton), e il numero di carboni è compreso tra 24 e 30. Le masse degli ioni protonati dell'acido grasso sono incluse nell'intervallo tra 117 e 201 Da, con però una evidente prevalenza delle masse 145 e 159 Da attribuibili ad acidi grassi a 8 e 9 atomi di carbonio. Le masse degli ioni alchilici, che

variano tra 224 e 280 Da, sono ascrivibili ad alcoli primari con catene idrocarburiche composte da un minimo di 16 ad un massimo di 20 atomi di carbonio. Il numero di cere, oltre che essere determinato da una variabilità nella ricombinazione di diverse masse, risulta essere influenzato dalla presenza di isomeri strutturali, come dimostrato dall'individuazione degli stessi ioni diagnostici in diversi picchi cromatografici. Le secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne del ventre differiscono da quelle nelle vicinanze della ghiandola uropigiale principalmente per il numero di osservazioni delle cere, ma concordano in buona parte per lo spettro qualitativo ricoperto, tranne per le cere di massa 452 Da che compaiono solamente in tre campioni di penne dell'uropigio. Non sono evidenti differenze nella composizione delle cere legate a genere ed età dell'individuo. L'analisi ha invece consentito di identificare un *pattern* distintivo per quanto riguarda le cere relative ai picchi 2, 5, 8, 11, 12, e da 26 a 31, con massa molecolare di 382, 396 e 410 Da e rispettivamente a 25, 26 e 27 carboni, che ricorrono in tutti i campioni (tranne il campione HT35 per i picchi 11 e 12) (**Figure 3.1 e 3.2**).

Tabella 3.1 Cere (ordinate secondo i tempi di ritenzione) complessivamente identificate nei campioni analizzati

N° del picco	N° atomi carbonio cera	lone molecolare (Da)	N° atomi carbonio acido grasso	N° atomi carbonio alcol	lone protonato acido grasso (Da)	lone alchilico (Da)
1	24	368	8	16	145	224
2	25	382	8	17	145	238
3	25	382	8	17	145	238
4	25	382	8	17	145	238
5	25	382	8	17	145	238
6	25	382	8	17	145	238
7	24	368	6	18	117	252
8	25	382	8	17	145	238
9	25	382	9	16	159	224
10	26	396	8	18	145	252
11	25	382	8	17	145	238
12	26	396	8	18	145	252
13	26	396	9	17	159	238
14	26	396	9	17	159	238
15	26	396	8	18	145	252
16	26	396	8	18	145	252
17	26	396	8	18	145	252
18	26	396	8	18	145	252
19	26	396	9	17	159	238
20	25	382	7	18	131	252
21	26	396	7	19	131	266
22	26	396	8	18	145	252
23	26	396	9	17	159	238
24	27	410	9	18	159	252

25	26	396	9	17	159	238
26	26	396	8	18	145	252
27	27	410	8	19	145	266
28	27	410	8	19	145	266
29	27	410	8	19	145	266
30	27	410	8	19	145	266
31	27	410	8	19	145	266
32	27	410	8	19	145	266
33	27	410	9	18	159	252
34	28	424	8	20	145	280
35	28	424	10	18	187	252
36	27	410	8	19	145	266
37	28	424	9	19	159	266
38	28	424	9	19	159	266
39	28	424	9	19	159	266
40	28	424	9	19	159	266
41	28	424	9	19	159	266
42	28	424	9	19	159	266
43	28	424	8	20	145	280
44	28	424	10	18	173	252
45	28	424	8	20	145	280
46	29	438	11	18	187	252
47	30	452	11	19	187	266
48	30	452	11	19	187	266
49	30	452	11	19	187	266
50	30	452	11	19	187	266
51	30	452	11	19	187	266
52	29	438	11	18	187	252
53	30	452	12	18	201	252

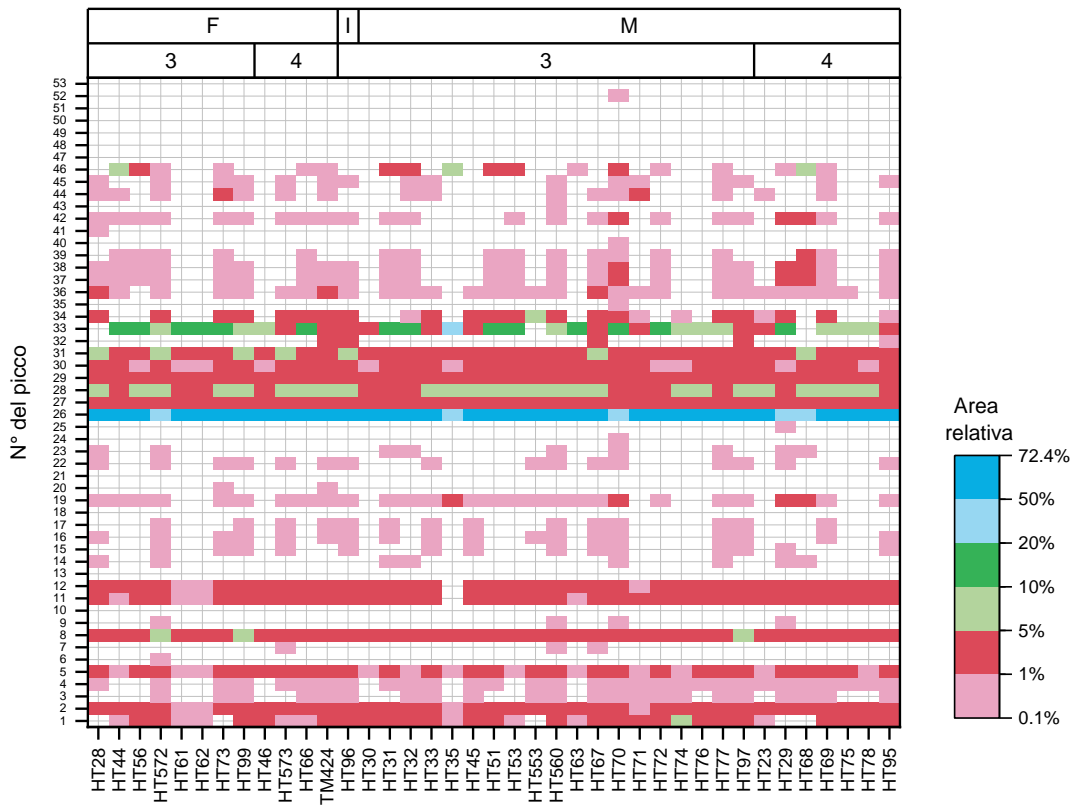
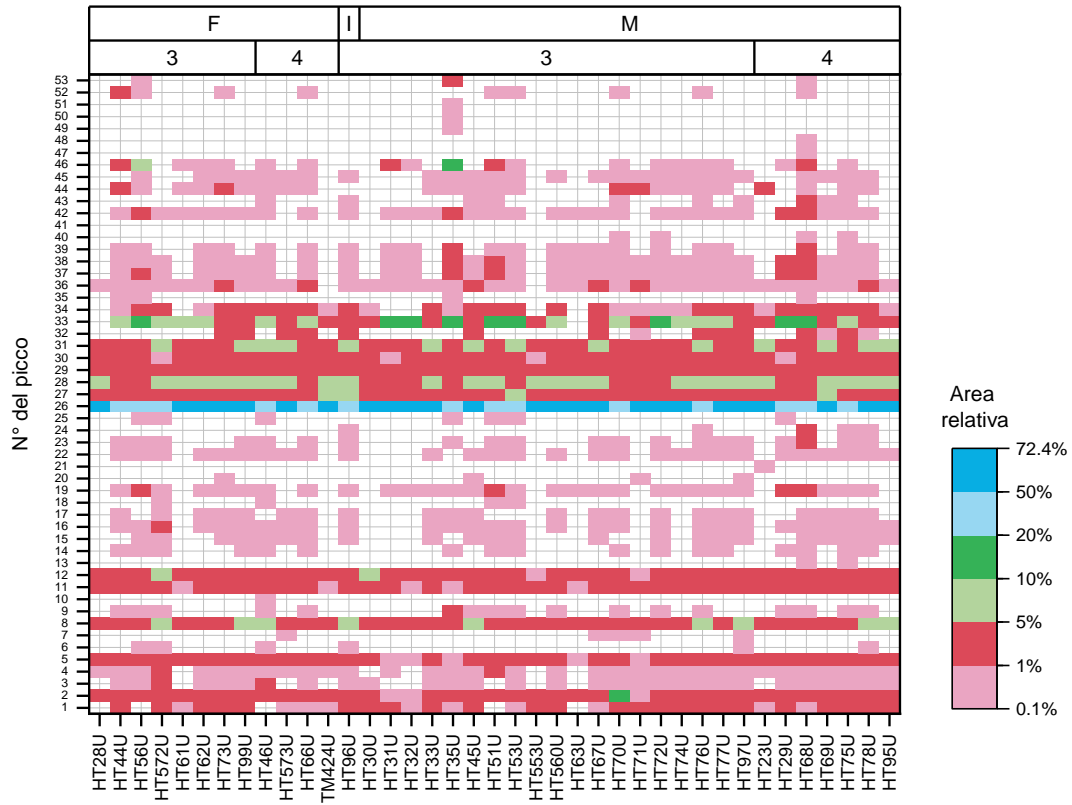


Figure 3.1 e 3.2 Copertura cromatografica delle cere espressa come area percentuale di ogni picco sull'area totale del cromatogramma (TIC)

3.1.2 Acidi grassi e alcoli

L'analisi della frazione 3 ha portato all'identificazione degli acidi grassi e alcoli elencati nella **Tabella 3.2**. L'individuazione degli acidi grassi saturi lineari (eccetto l'acido esacosanoico) è confermata dal confronto dei loro tempi di ritenzione con gli standard a disposizione. Di conseguenza, a questi acidi grassi è stato possibile assegnare un nome IUPAC, mentre per gli altri composti sono riportate le informazioni sulla struttura molecolare ricavate dall'interpretazione degli spettri di massa degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME), esaminando gli studi di Douglas et al. (1971) [171], Lough (1972) [172], Apon e Nicolaides (1975) [173] e Ran-Ressler et al. (2012) [174]. Gli acidi grassi identificati nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola sono costituiti da catene idrocarburiche sature, con un numero di carboni compreso tra 8 e 17, mono-, di- o tri-sostituite in posizioni pari (2, 4, 6, 8, 10 e 12) da gruppi metilici. La presenza di un gruppo metilico come primo sostituito in posizione 2 o 4 è indicata rispettivamente dagli ioni diagnostici a 88 e 87 con 74 Da, prodotti dal riarrangiamento di McLafferty, che esibiscono i segnali più intensi nello spettro di massa. Il numero e la posizione di ulteriori sostituenti metilici sono rivelati da ioni diagnostici (129, 157, 171, 185, 213, 227 e 255) che presentano un segnale ben distinguibile rispetto ai frammenti con un rapporto m/z simile al loro. Avendo effettuato una saponificazione sui campioni, non è possibile stabilire se si tratti di acidi grassi liberi o complessati, ad eccezione di quelli con un numero di carboni compreso tra 8 e 12, che derivano presumibilmente dall'idrolisi delle cere. L'identificazione tra questi acidi grassi di isomeri strutturali (e forse anche spaziali nel caso del 2,4-dimetil C6) risulterebbe anche in accordo con l'osservazione già fatta in precedenza sul fatto che il numero delle cere, oltre che essere determinato dalla ricombinazione di diverse masse, sia dovuto alla presenza di vari isomeri. L'aspetto della saponificazione, oltre al frazionamento eseguito sui campioni, è legato inoltre all'identificazione degli alcoli primari saturi rinvenuti nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola. La valutazione di questi due passaggi preanalitici ha svolto un ruolo determinante nell'interpretazione degli spettri di massa, consentendo di escludere classi di composti organici, come alcani e alcheni, che presentano nella maggior parte dei casi un *pattern* di frammentazione praticamente indistinguibile da quello degli alcoli. In una frazione polare, infatti, ci si attende di trovare alcoli, piuttosto che alcani o alcheni, visto anche il trattamento di saponificazione a cui sono stati sottoposti i campioni. L'individuazione nello spettro di massa dello ione alchilico derivante dalla disidratazione dell'alcol ha permesso solamente di attribuire la massa molecolare e il numero di carboni caratteristici dell'alcol primario saturo, viste le difficoltà interpretative nell'avanzare ipotesi sulla struttura molecolare [175]. Gli alcoli primari saturi

identificati come una serie di isomeri strutturali possiedono una massa molecolare che varia tra 242 a 298 Da e un numero di carboni compreso tra 16 e 20. Confrontando questi risultati con la caratterizzazione delle cere, pur consapevoli del fatto che non tutti gli alcoli derivano dalle cere, si evidenzia comunque una coerenza interpretativa sia per aver identificato alcoli primari saturi, piuttosto che insaturi, che per aver individuato le stesse masse molecolari e numero di carboni, come dimostrato dalla corrispondenza degli ioni alchilici.

Tabella 3.2 Acidi grassi (FA) e alcoli (OH) (ordinati secondo i tempi di ritenzione) identificati. Per gli acidi grassi: il carbonio del gruppo metilico esterificato è escluso dal conteggio del numero di carboni, la massa molecolare e gli ioni diagnostici si riferiscono ai FAME, la sigla C seguita da un numero individua il numero di carboni della catena principale dell'acido grasso, mentre la "x" esprime la presenza di un gruppo metilico sostituito a cui non si è riusciti ad attribuire la posizione

N° atomi carbonio	Massa molecolare (Da)	Ioni diagnostici (Da)	Composto
8	158	88,129	2,4-dimetil-C6 FA
8	158	88,129	2,4-dimetil-C6 FA
8	158	88	2-metil-C7 FA
9	172	88,129	2,4-dimetil-C7 FA
9	172	88,157	2,6-dimetil-C7 FA
8	158	74	Acido ottanoico
9	172	88	2-metil-C8 FA
10	186	88,157	2,6-dimetil-C8 FA
11	200	88,129	2,4-dimetil-C9 FA
11	200	88,157	2,6-dimetil-C9 FA
11	214	88,129,157	2,4,6-trimetil-C9 FA
10	186	74	Acido decanoico
12	214	88	2,6-C10 FA
11	200	74	Acido undecanoico
13	228	88,129,157	2,4,6-trimetil-C10 FA
13	228	88,157	2,6-dimetil-C11 FA
12	214	74	Acido dodecanoico
14	242	88,129,171	2,4,8-trimetil-C11 FA
13	228	88	2-metil-C12 FA
13	228	87/74	4-metil-C12 FA
14	242	88,157,x	2,6,x-trimetil-C11 FA
14	242	87/74,157/185	4,8-dimetil-C12 FA
14	242	87/74,185	4,10-dimetil-C12 FA
15	256	88,157	2,6-dimetil-C13 FA
14	242	74	Acido tetradecanoico
15	256	88	2-metil-C14 FA
15	256	87/74	4-metil-C14 FA
16	270	88,129	2,4-dimetil-C14 FA

16	270	88,157,x	2,6,x-trimetil-C13 FA
16	270	88,157	2,6-dimetil-C14 FA
16	270	88,185	2,8-dimetil-C14 FA
16	270	87/74,157,227/255	4,8,12-trimetil-C13 FA
16	270	87/74,213	4,10-dimetil-C14 FA
16	270	88,213	2,10-dimetil-C14 FA
17	284	88,157	2,6-dimetil-C15 FA
17	284	87/74,157,227/255	4,8,12-dimetil-C14 FA
16	242	224	C16 OH
16	270	74	Acido esadecanoico
17	256	238	C17 OH
17	256	238	C17 OH
17	256	238	C17 OH
17	256	238	C17 OH
17	256	238	C17 OH
18	270	252	C18 OH
18	270	252	C18 OH
18	270	252	C18 OH
18	270	252	C18 OH
18	298	74	Acido ottadecanoico
19	284	266	C19 OH
19	284	266	C19 OH
19	284	266	C19 OH
19	284	266	C19 OH
19	284	266	C19 OH
20	298	280	C20 OH
20	326	74	Acido icosanoico
22	354	74	Acido docosanoico
24	382	74	Acido tetracosanoico
26	410	74	C26 FA

3.2 Caratterizzazione *target*

Le quantità assolute determinate nei campioni sono state corrette sottraendo il limite di rivelabilità (LOD) ricavato dall'analisi dei bianchi. Le quantità assolute trovate per gli acidi grassi e gli steroli in ciascun campione sono state rapportate al volume di estrazione (al netto dell'aliquota prelevata), dunque i dati sono espressi come microgrammi (μg) o nanogrammi (ng) su millilitro (mL). Le quantità assolute ottenute per i PCB e gli IPA in ogni campione sono state divise per le quantità assolute dei lipidi determinati, date dalla somma degli acidi grassi e degli steroli, rinvenute nel rispettivo campione; perciò, i risultati sono esposti come nanogrammi (ng) su grammi di lipidi quantificati (g).

3.2.1 Acidi grassi

I risultati per gli acidi grassi sono illustrati distinguendo il contributo derivante da acidi grassi saturi ramificati, acidi grassi saturi lineari medi (da 6 a 15 carboni), acidi grassi saturi lineari lunghi (da 16 a 24 carboni) e acidi grassi insaturi.

Gli acidi grassi saturi ramificati includono tre acidi grassi a 8 e 9 atomi di carbonio identificati dalla caratterizzazione *untarget* come: due isomeri spaziali del 2,4-dimetil-C6 (uno dei due coeluisce con l'acido eptanoico e perciò viene riportata la somma dei contributi) e il 2,4-dimetil-C7. Pur non disponendo degli standard per questi composti, si è ritenuto comunque interessante ottenere delle informazioni sul potenziale contributo delle cere, vista la presenza di questi acidi grassi saturi ramificati, sebbene attraverso una stima non rigorosa dal punto di vista analitico. La quantificazione è stata effettuata utilizzando la media dei fattori di risposta dei due standard tra i quali questi composti eluiscono, che nel caso specifico corrispondono agli acidi esanoico ed eptanoico per i 2,4-dimetil-C6, e agli acidi eptanoico e ottanoico per il 2,4-dimetil-C7.

Le penne del ventre mostrano concentrazioni degli acidi grassi totali (**Figura 3.3**) variabili tra 0.8 e 273 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Gli acidi grassi saturi lineari lunghi, seguiti dagli insaturi, offrono in 29 campioni un contributo superiore al 70% sulle concentrazioni totali. Gli acidi grassi saturi lineari medi (**Figura 3.5**) raggiungono una concentrazione massima di 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mentre 3 campioni risultano al di sotto del LOD. La composizione è dominata dagli acidi nonanoico e decanoico, con un contributo relativamente più importante derivante da quest'ultimo. Gli acidi esanoico e tridecanoico sono sempre al di sotto del LOD, mentre in 7 e 10 campioni si rilevano rispettivamente gli acidi dodecanoico e pentadecanoico, e solamente in 2 campioni gli acidi ottanoico e undecanoico. Le concentrazioni degli acidi grassi saturi lunghi (**Figura 3.7**) variano tra 0.7 e 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La composizione risulta particolarmente eterogenea: in 16 campioni si rilevano tutti gli acidi grassi indagati. Gli acidi grassi con un numero pari di atomi di carbonio (catena pari), tra i quali si distingue soprattutto l'acido eicosanoico che da solo costituisce più del 50% della concentrazione totale in tutti i campioni, contribuiscono sempre per almeno l'80% sul totale. Gli acidi grassi insaturi (**Figura 3.9**) mostrano valori che tendenzialmente coprono l'intervallo tra sotto il LOD (solo per il campione HT35) e 29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, raggiungendo in tre campioni punte massime di 57, 80 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Gli acidi linolenico e nervonico compaiono rispettivamente in 2 e 6 campioni, mentre si presentano come minimo in 13 campioni tutti gli altri acidi grassi insaturi, tra i quali l'acido erucico contribuisce in maniera significativa sulle concentrazioni totali: in 32 campioni costituisce almeno il 55% del totale.

Le secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne nelle vicinanze della ghiandola uropigiale presentano valori degli acidi grassi totali (**Figura 3.4**) che si aggirano tendenzialmente tra 40 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con una concentrazione minima di 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rinvenuta nel campione HT63U e dei massimi compresi tra 2400 e 23000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ associati a 6 campioni. Gli apporti derivanti degli acidi grassi saturi ramificati, seguiti dagli acidi grassi saturi lunghi, sulle concentrazioni totali risultano preponderanti: oltre il 90% sul totale in 33 campioni. Gli acidi grassi saturi lineari medi (**Figura 3.6**) mostrano valori che generalmente si distribuiscono tra sotto il LOD, solo per il campione HT63U, e 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con tre picchi massimi a 25, 67 e 78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ad eccezione dell'acido esanoico, sempre inferiore al LOD, e degli acidi tridecanoico e ottanoico presenti solamente in 5 e 3 campioni, tutti gli altri acidi grassi sono frequentemente rilevati determinando una composizione in cui i contributi degli acidi grassi a catena pari e dispari, in particolare l'acido nonanoico, tendono ad eguagliarsi. Le concentrazioni degli acidi grassi saturi lunghi (**Figura 3.8**) sono comprese tra 0.1 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In 24 campioni sono stati determinati tutti gli acidi grassi, esibendo quindi una composizione notevolmente variegata. La distribuzione dei contributi relativi ai vari acidi grassi appare simile a quella riscontrata sulle penne del ventre, ma si contraddistingue per il maggior apporto dell'acido tetradecanoico sulle concentrazioni totali: in 32 campioni costituisce almeno il 40% del totale. Gli acidi grassi insaturi (**Figura 3.10**) raggiungono concentrazioni massime di 76 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 2 campioni, mentre 6 campioni risultano al di sotto del LOD. Gli acidi linoleico, elaidico e petroselinico (dato che coeluiscono non è possibile distinguere i contributi e quindi viene riportata la somma dei due), oleico ed erucico sono stati determinati come minimo in 13 campioni; invece, i restanti acidi grassi insaturi superano il LOD al massimo in 3 campioni.

In base all'età e al genere degli esemplari di alzavola non si riconoscono evidenti relazioni con le concentrazioni e la composizione degli acidi grassi.

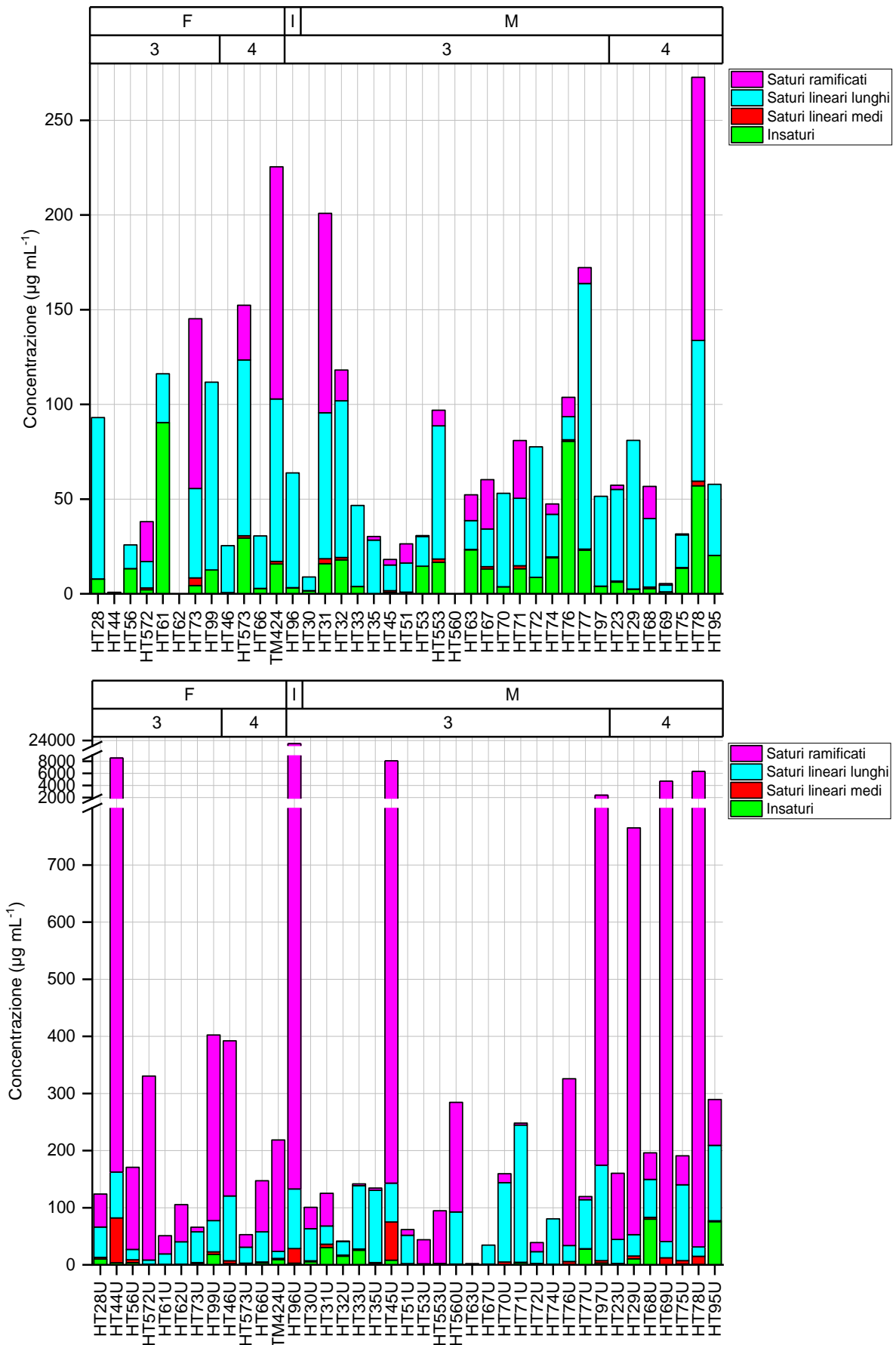


Figure 3.3 e 3.4 Concentrazioni ($\mu\text{g mL}^{-1}$) degli acidi grassi totali

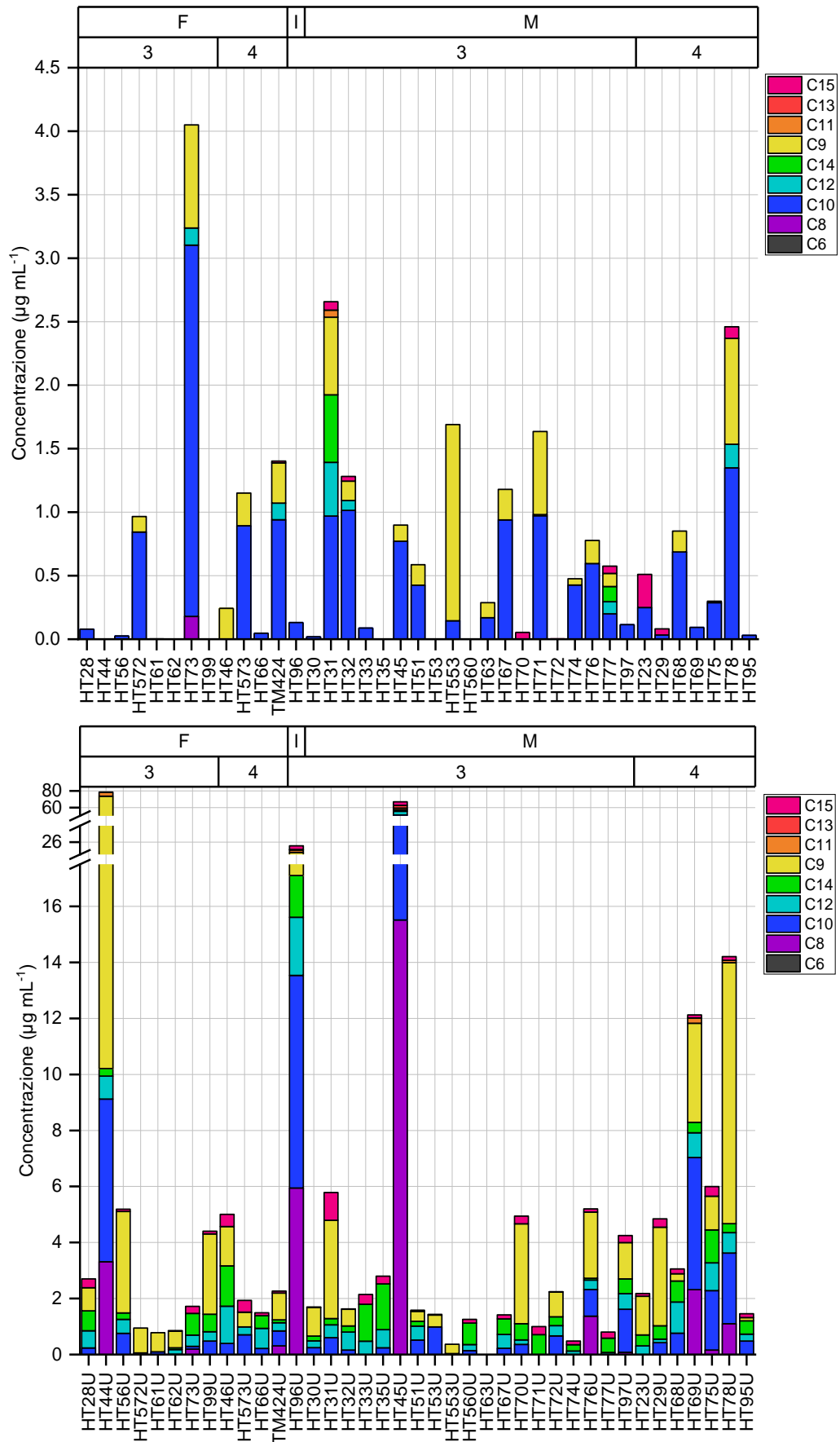


Figure 3.5 e 3.6 Concentrazioni (µg mL⁻¹) degli acidi grassi saturi lineari medi

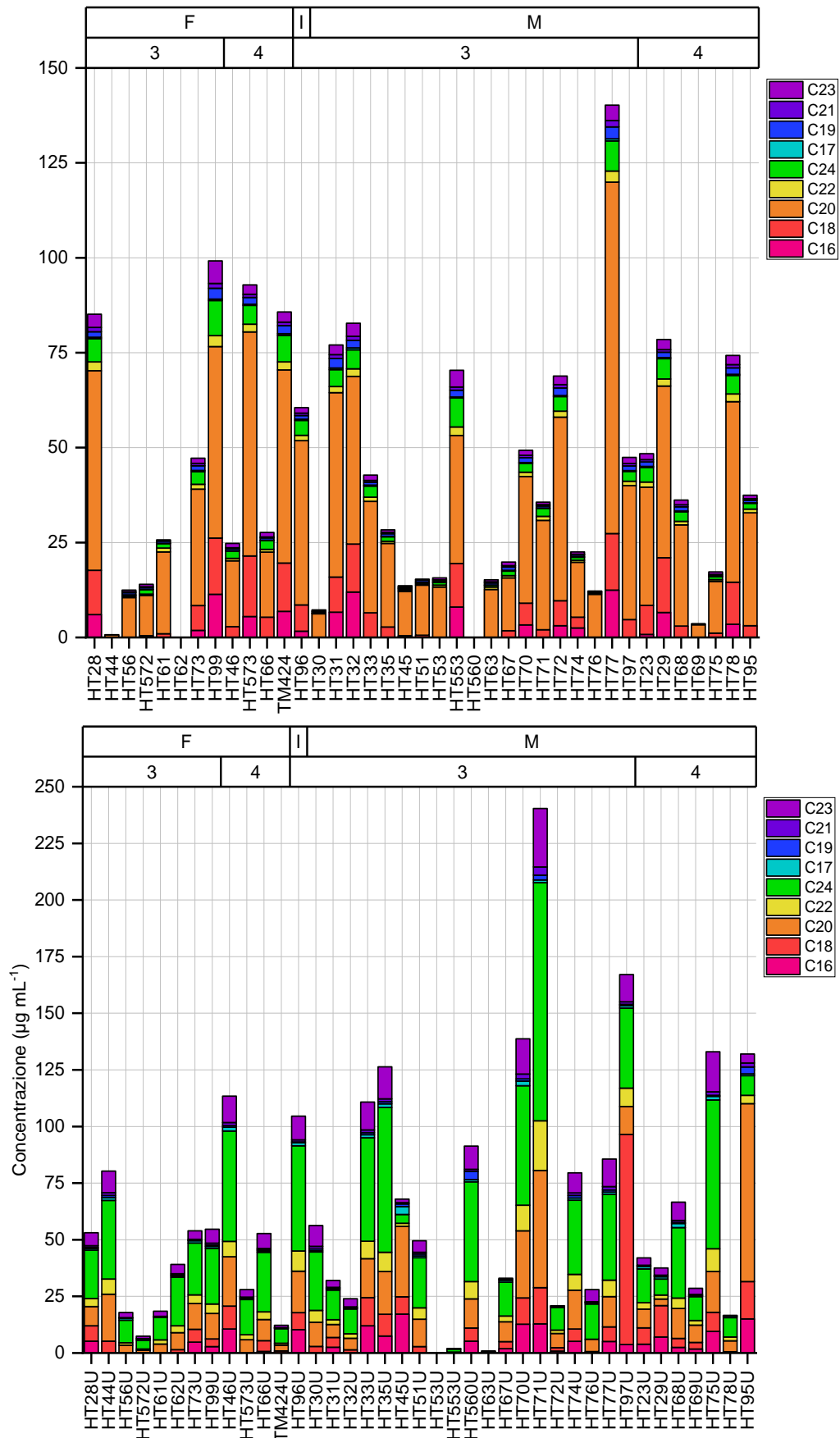


Figure 3.7 e 3.8 Concentrazioni ($\mu\text{g mL}^{-1}$) degli acidi grassi saturi lineari lunghi

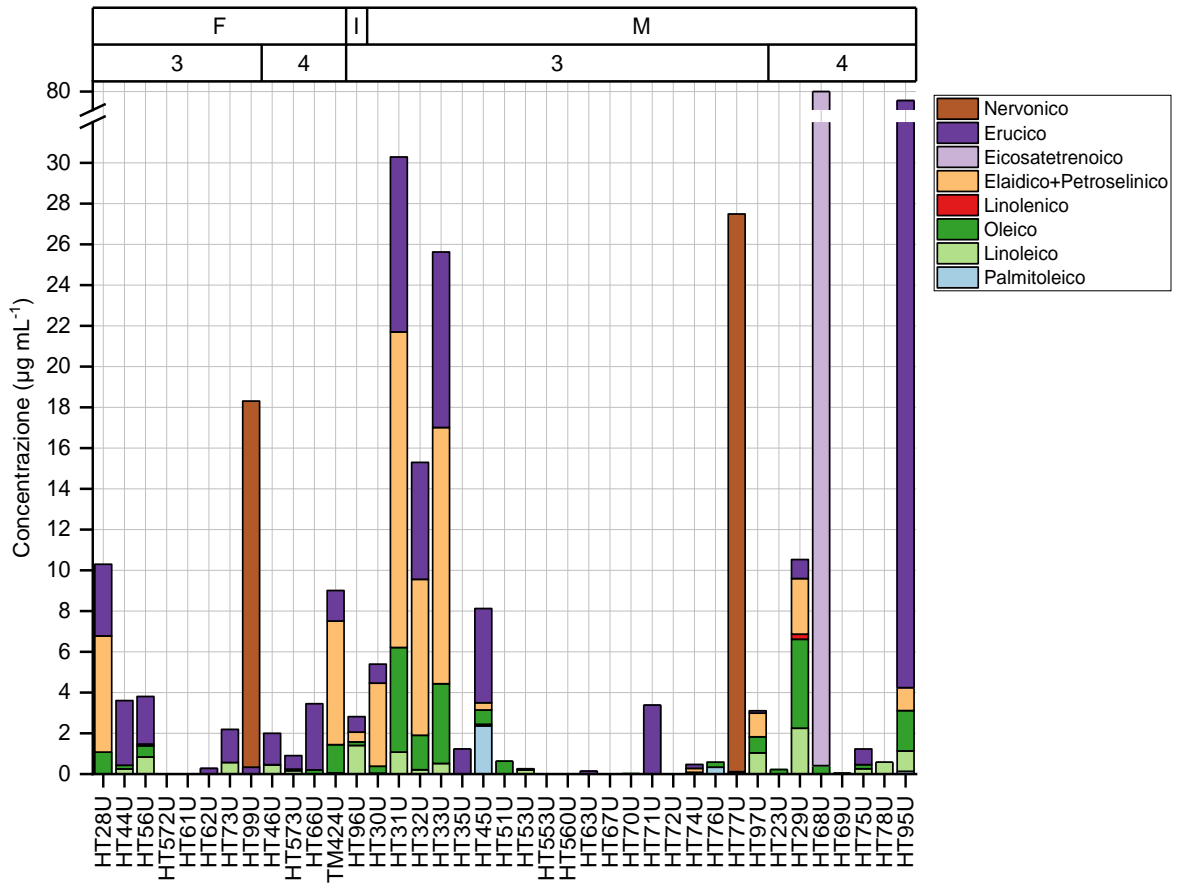
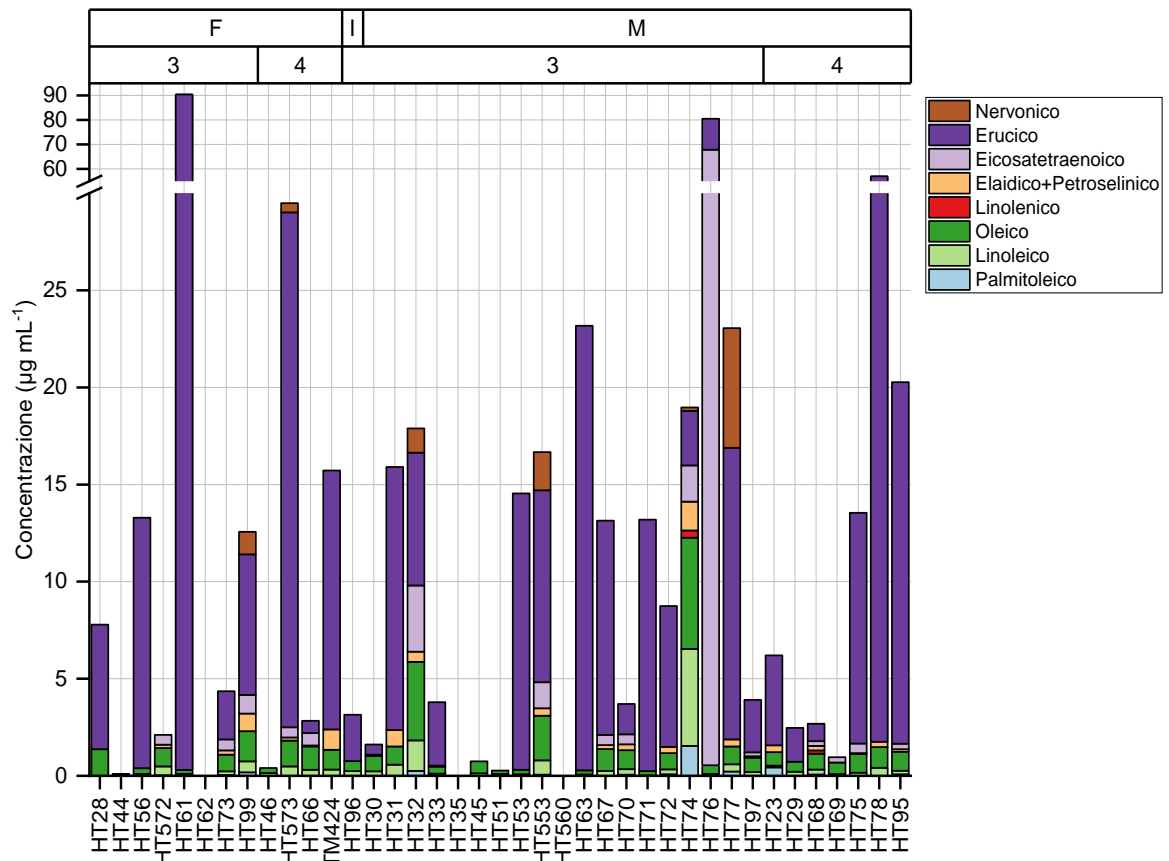


Figure 3.9 e 3.10 Concentrazioni ($\mu\text{g mL}^{-1}$) degli acidi grassi insaturi

3.2.2 Steroli

I risultati per gli steroli sono esposti distinguendo gli zoosteroli dai fitosteroli.

Sulle penne del ventre, gli zoosteroli (**Figura 3.11**) sono stati rilevati in concentrazioni variabili tra 777 e 5498 ng mL⁻¹. La composizione è costituita dal colesterolo e colestano che contribuiscono equamente al valore complessivo, mentre tutti gli altri zoosteroli risultano inferiori al LOD. I fitosteroli (**Figura 3.13**) esibiscono valori inclusi tra 5 e 126 ng mL⁻¹. I 4 fitosteroli indagati compaiono in tutti i campioni. La somma di campesterolo e β -sitosterolo, con un contributo leggermente maggiore da parte di quest'ultimo, corrisponde ad almeno il 75 % dei fitosteroli totali.

Nelle secrezioni dell'uropigio presenti sulle penne in prossimità della ghiandola uropigiale, come zoosteroli (**Figura 3.12**), si rilevano solo colesterolo e colestano, con distribuzione simile, in un intervallo di concentrazioni totali compreso tra 174 e 1678 ng mL⁻¹. I fitosteroli (**Figura 3.14**) raggiungono una concentrazione massima di 4 ng mL⁻¹. Valori al di sotto del LOD sono riscontrabili in 9 campioni. Lo stigmasterolo si rileva solo nel campione HT74U, mentre gli altri fitosteroli mostrano una distribuzione dei contributi comparabile a quella individuata dai campioni di penne del ventre.

Il genere e l'età degli esemplari di alzavola non manifestano evidenti rapporti con le concentrazioni e la composizione degli steroli.

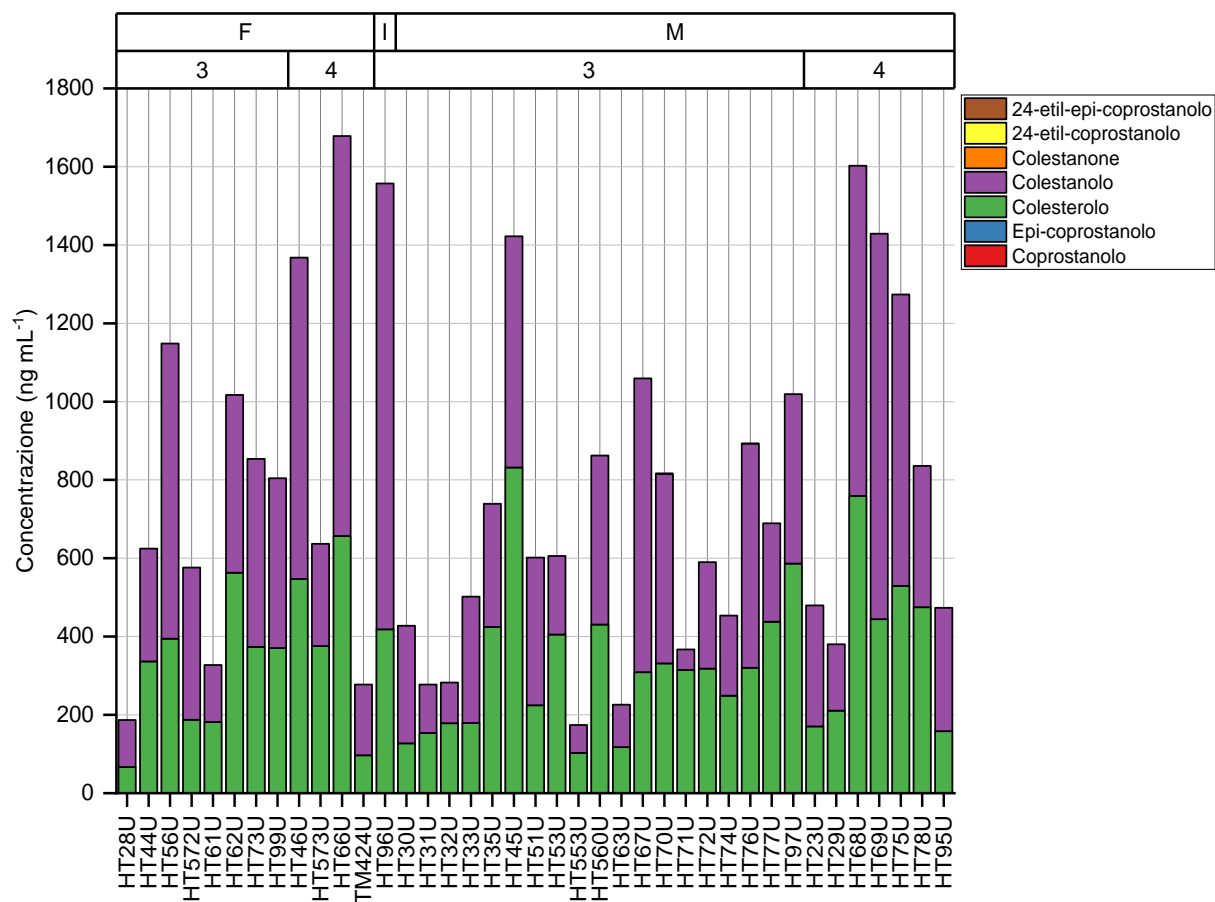
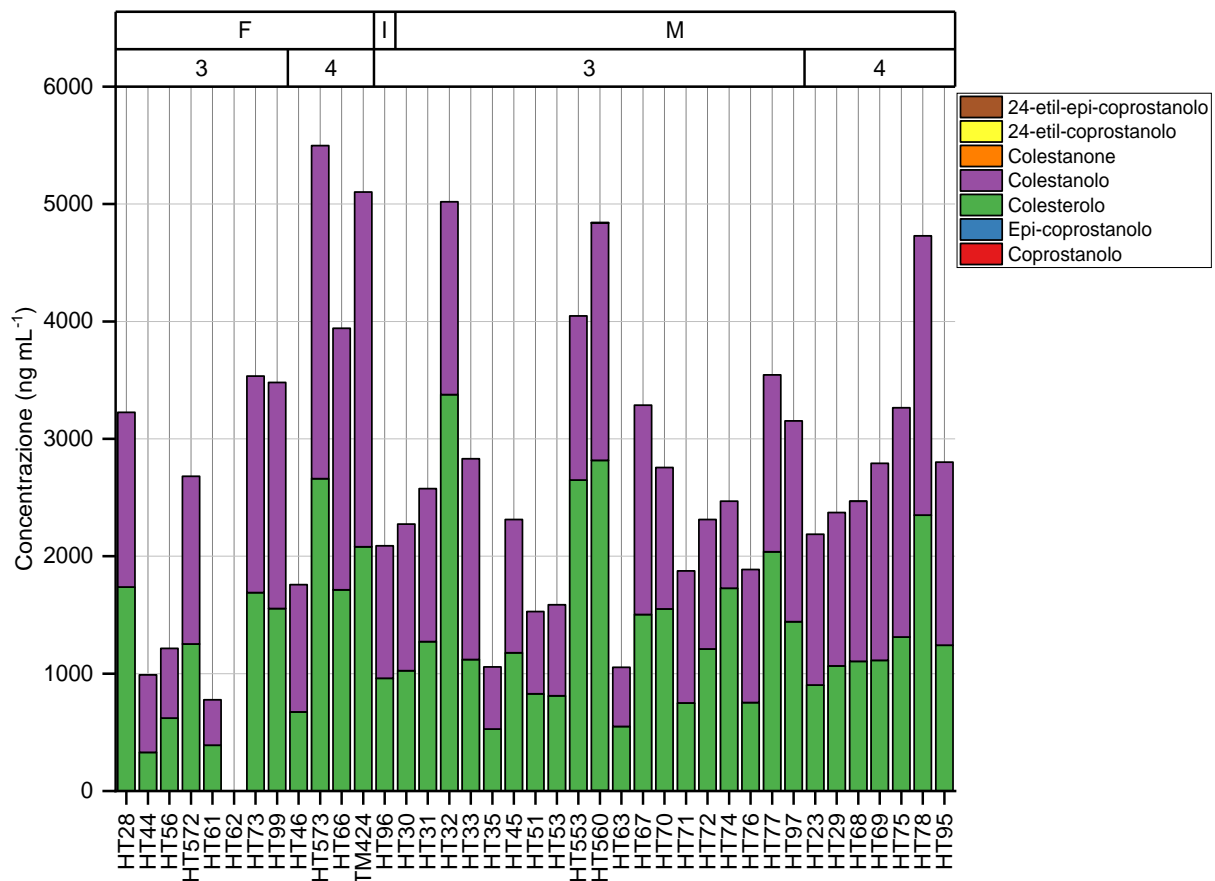


Figure 3.11 e 3.12 Concentrazioni (ng mL⁻¹) degli zoosteroli

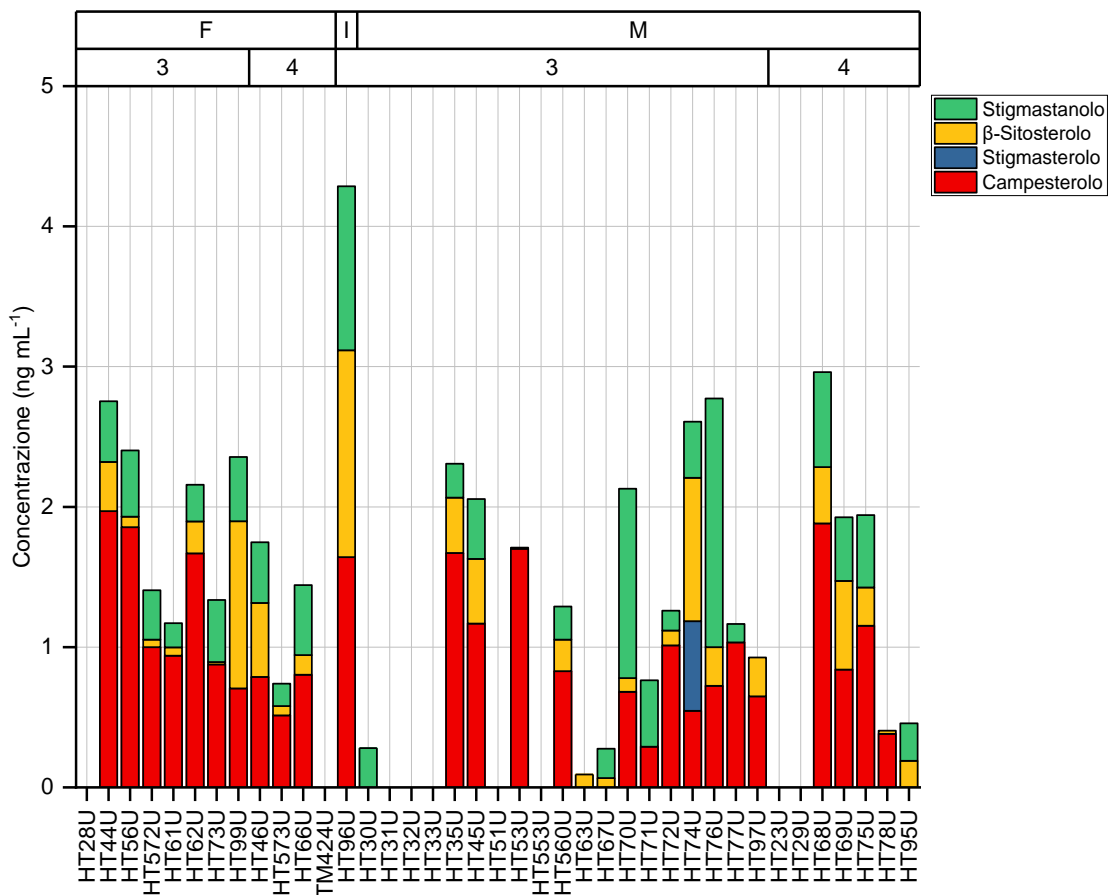
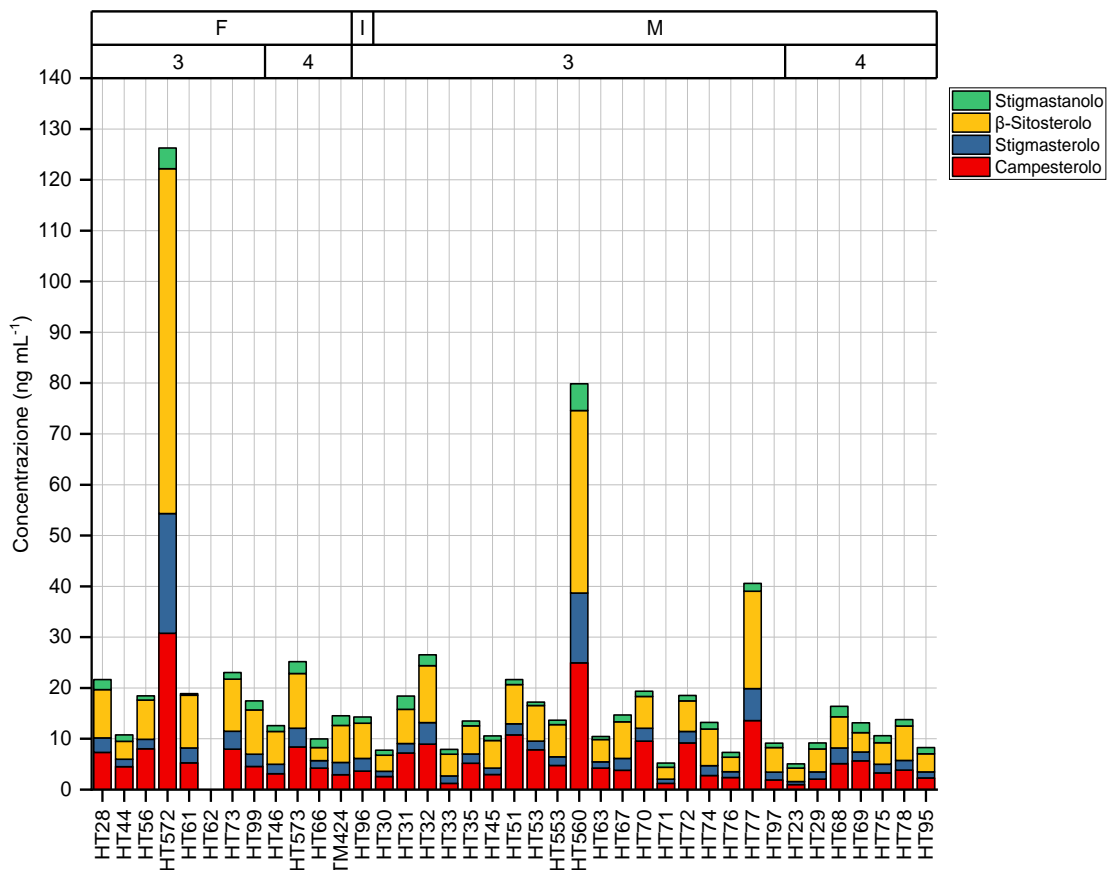


Figure 3.13 e 3.14 Concentrazioni (ng mL⁻¹) dei fitosteroli

3.2.3 PCB

I risultati per i 54 congeneri di PCB indagati vengono esposti come PCB totali, PCB suddivisi per le 10 classi di omologhi, PCB *indicators* e PCB *dioxin-like*.

Per le secrezioni dell'uropigio presenti sulle penne del ventre, l'intervallo di concentrazioni dei PCB totali (**Figura 3.15**) varia tendenzialmente tra 7 e 4207 ng g⁻¹, raggiungendo un picco massimo a 146 µg g⁻¹. I PCB generalmente più rilevati appartengono alle classi di omologhi comprese tra i tri-CB e gli octa-CB, con un minimo di sei rilevamenti per questi ultimi (**Figura 3.17**). Il contributo dei penta-CB e degli esa-CB appare dominante, tranne che nel campione HT96, costituendo sempre almeno il 60% del dato totale. I mono-CB sono sempre al di sotto del LOD, mentre i di-CB, nona-CB e deca-CB compaiono al massimo in due campioni. Tra i 7 PCB *indicators* (**Figura 3.19**), i PCB-28, 118, 138, 153 e 180 sono stati determinati da un minimo di 12 campioni, per il PCB-28, fino ad un massimo che include tutti i campioni, per il PCB-153. Il PCB-52 mostra valori superiori al LOD solamente in 2 campioni, mentre PCB-90, PCB-101 e PCB-113 risultano superiori ai rispettivi LOD in 5 campioni. I PCB-118 e 153 prevalgono nella distribuzione dei PCB *indicators*, contribuendo in tutti i campioni (eccetto per l'HT424) con una percentuale superiore al 60% sul valore complessivo. Tutti gli 11 PCB *dioxin-like* (**Figura 3.21**) sono stati rilevati, tra cui però si conta una sola osservazione per il PCB-126 e due per i PCB-77 e 81. Tra i PCB *dioxin-like* prevale il PCB-118, seguito dal PCB-156 che compare al massimo in 12 campioni e offre esigui contributi sul totale.

Le secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne in prossimità della ghiandola uropigiale presentano valori di PCB totali (**Figura 3.16**) distribuiti prevalentemente tra 5 e 12500 ng g⁻¹, esibendo un massimo di 86500 ng g⁻¹. L'intervallo delle classi di omologhi (**Figura 3.18**) più ricorrenti si espande rispetto ai campioni di penne del ventre, includendo anche i di-CB. I deca-CB risultano sempre al di sotto del LOD, mentre i mono-CB e nona-CB si rilevano rispettivamente in 1 e 2 campioni. I penta-CB e gli esa-CB si osservano ancora ricorrentemente, anche se il loro apporto tende a essere inferiore rispetto alle penne del ventre, con un contributo che non supera il 60% del totale in una decina di campioni. I 7 PCB *indicators* (**Figura 3.20**) si rilevano da un minimo di 13 campioni, per il PCB-52, fino ad un massimo che include tutti i campioni, per il PCB-153. La composizione dei PCB *indicators* appare relativamente più eterogenea rispetto a quella delle penne del ventre, dato che gli apporti dei PCB-118 e 153, attenuati soprattutto da dei picchi di PCB-28, risultano inferiori al 60% del totale in 10 campioni. Tra gli 11 PCB *dioxin-like* (**Figura 3.22**) spicca ancora il PCB-118, seguito dal PCB-156 che compare in 26 campioni. La composizione leggermente più variegata rispetto alle secrezioni dell'uropigio presenti sulle penne del ventre è determinata da

dei picchi di PCB-77, 81 e 156 e anche dai contributi ridotti ma frequenti di tutti gli altri PCB *dioxin-like*.

In base all'età e al genere degli esemplari di alzavola non si riconoscono evidenti relazioni con le concentrazioni e la composizione dei PCB.

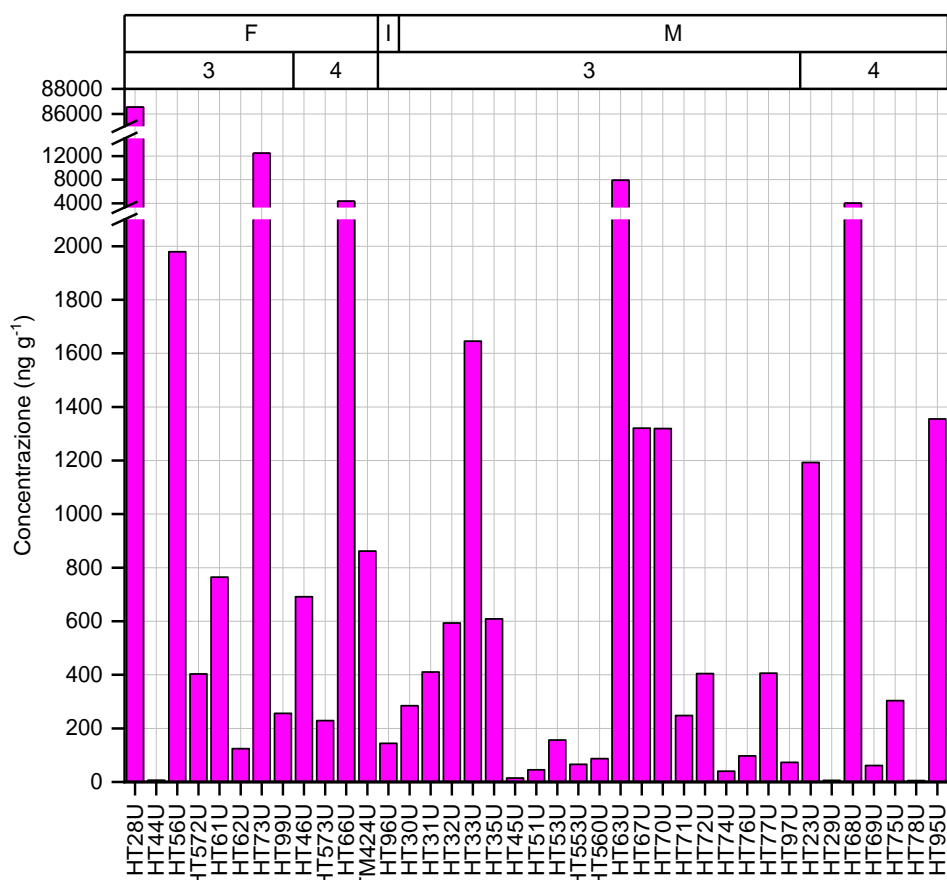
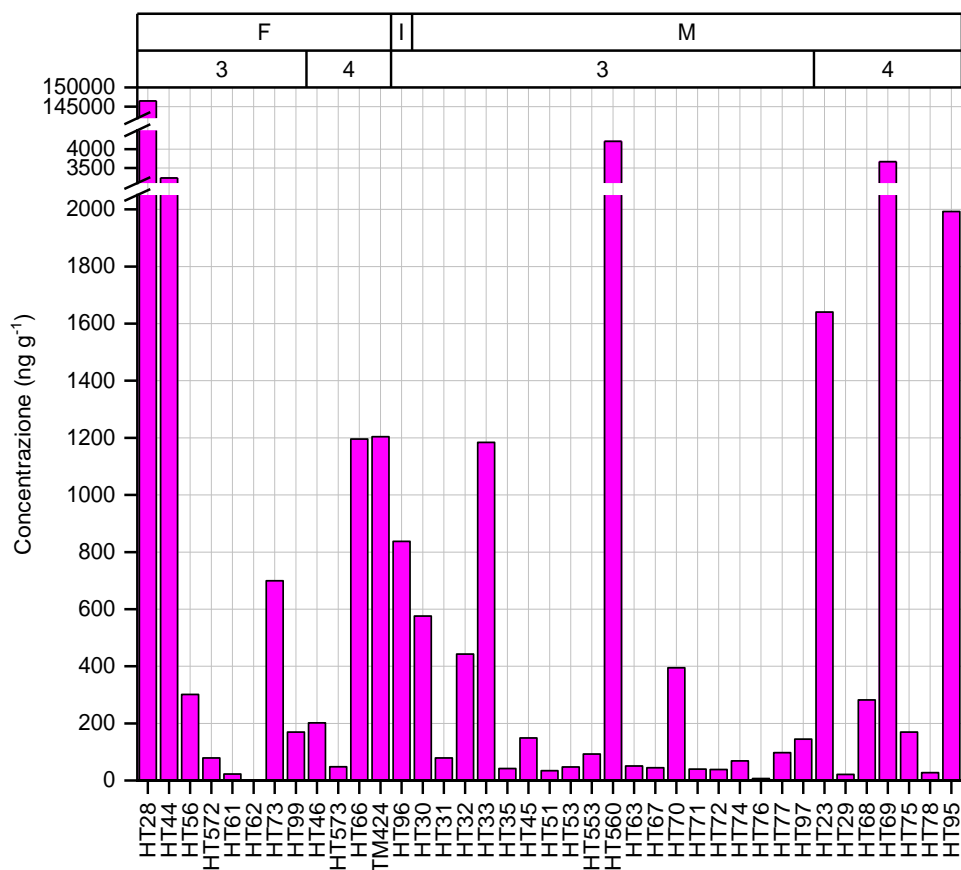


Figure 3.15 e 3.16 Concentrazioni (ng g⁻¹) dei PCB

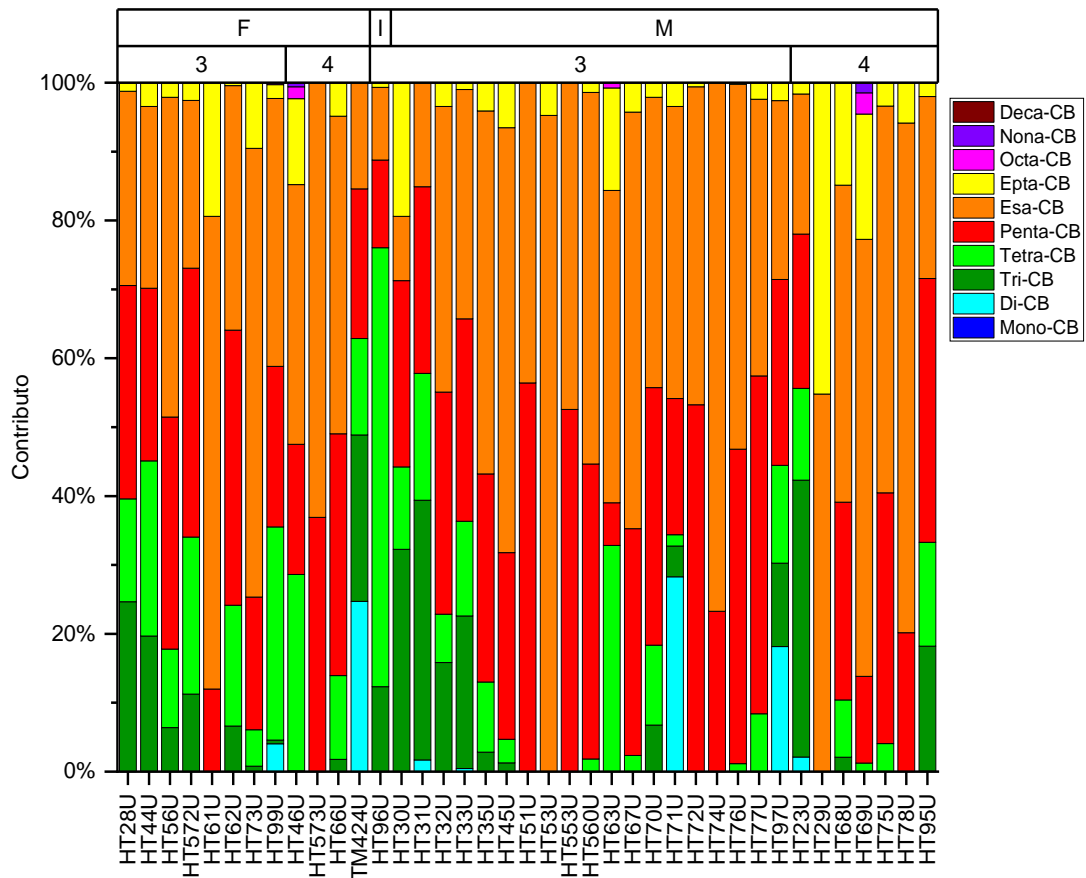
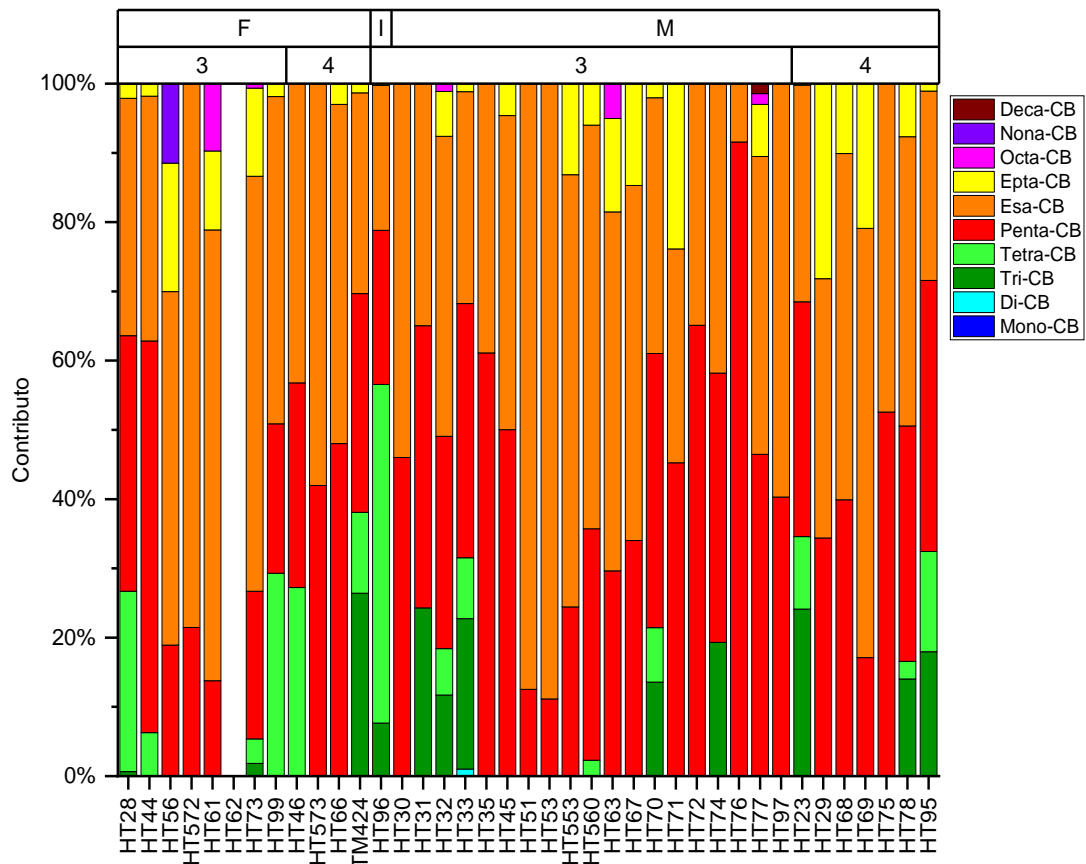


Figure 3.17 e 3.18 Contributi percentuali delle classi di omologhi di PCB

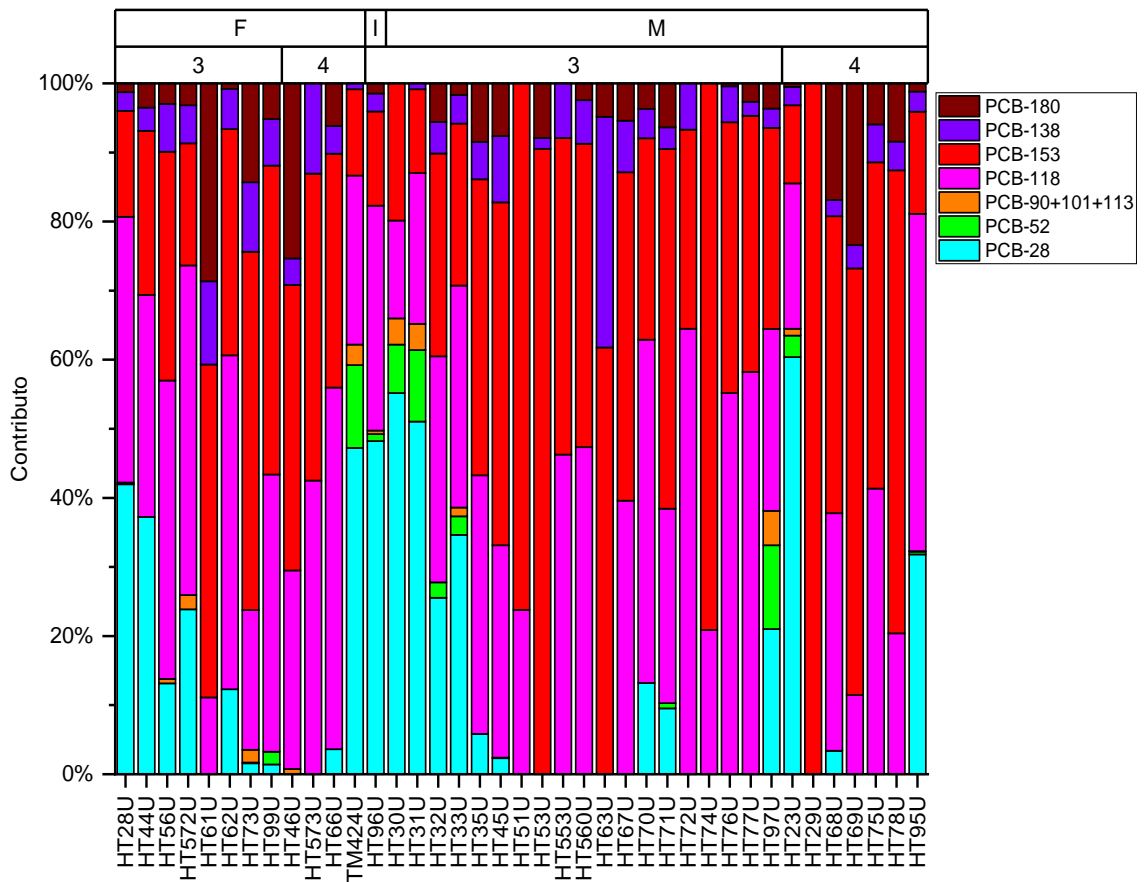
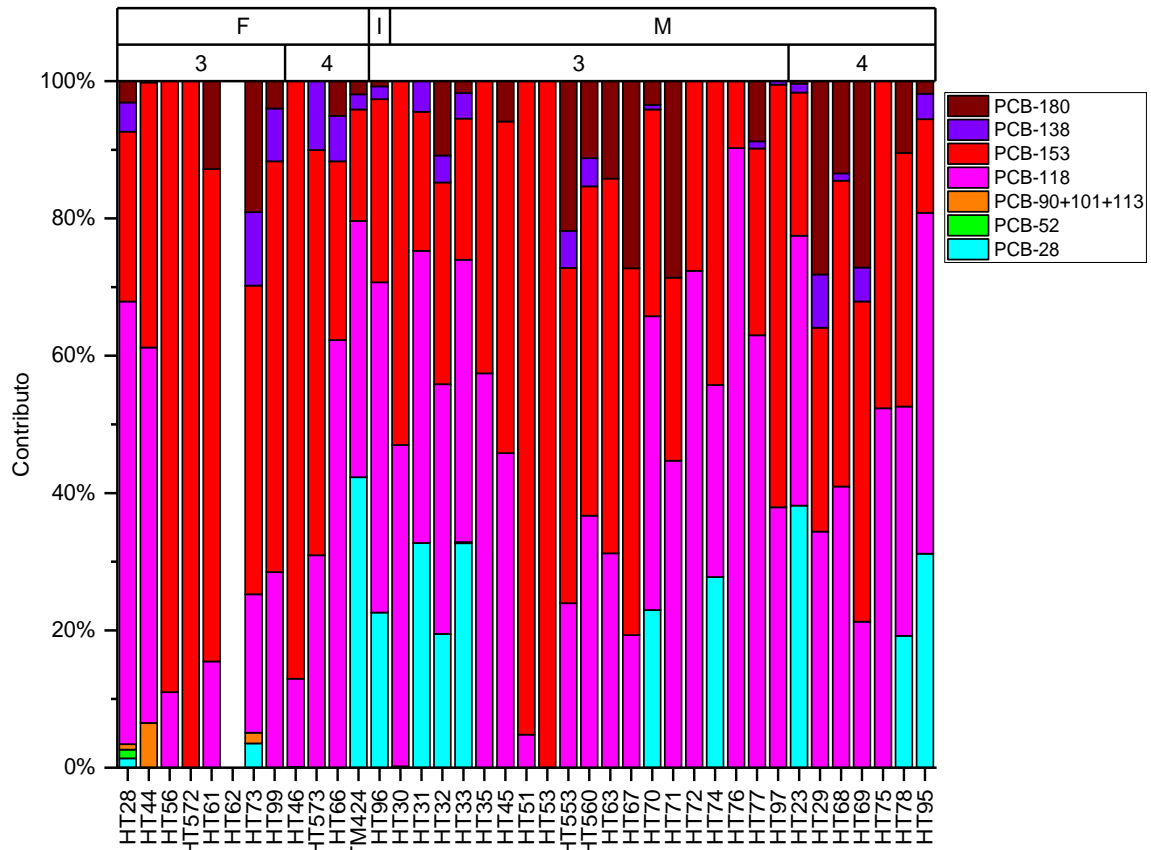


Figure 3.19 e 3.20 Contributi percentuali dei PCB indicators

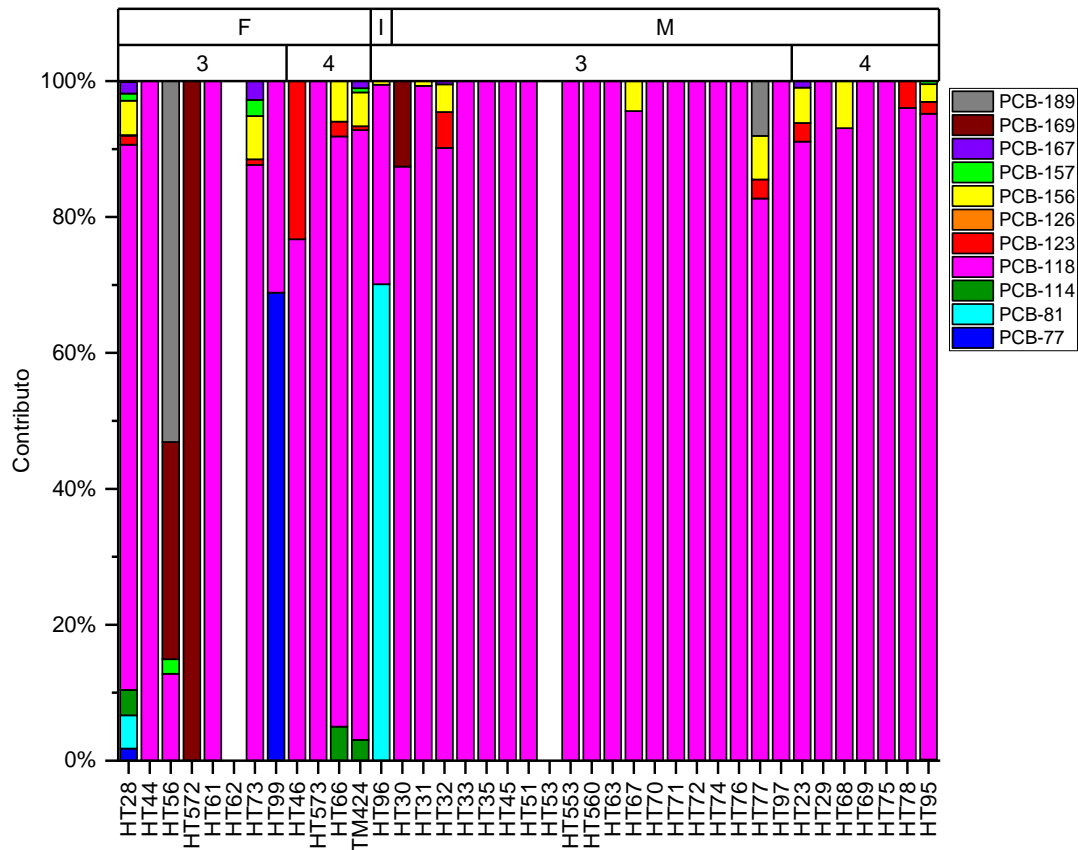


Figure 3.21 e 3.22 Contributi percentuali dei PCB *dioxin-like*

3.2.4 IPA

I risultati sono riportati come IPA totali suddivisi per composti a basso, medio e alto peso molecolare, e come singoli contributi dei 16 IPA prioritari, individuati dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (*United States Environmental Protection Agency-US EPA*) [132].

Nelle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne del ventre, le concentrazioni degli IPA totali (**Figura 3.23**) variano tendenzialmente tra valori inferiori al LOD (8 campioni) e 3655 ng g⁻¹, raggiungendo dei picchi massimi a 28, 39 e 57 µg g⁻¹. Gli IPA leggeri e medi compaiono rispettivamente solo in 1 e 2 campioni, mostrando contributi dall'acenaftene, tra gli IPA leggeri, e di fenantrene, antracene, fluorantene, pirene benzo[a]antracene e crisene, tra gli IPA medi. Tra gli IPA pesanti risalta il benzo[a]pirene, riscontrabile in 25 campioni, con un contributo superiore al 70% sul totale in 23 campioni. Altri IPA pesanti si rilevano tra un minimo di 3 campioni, per il benzo[b]fluorantene, e un massimo di 15 campioni, per il benzo[k]fluorantene (**Figura 3.25**).

Per le secrezioni dell'uropigio presenti sulle penne in corrispondenza della ghiandola uropigiale, i valori degli IPA totali (**Figura 3.24**) coprono l'intervallo tra sotto il LOD (3 campioni) e 4388 ng g⁻¹. Gli IPA medi risultano sempre inferiori al LOD, mentre gli IPA leggeri e pesanti si rilevano rispettivamente in 12 e 37 campioni. La composizione degli IPA leggeri è caratterizzata principalmente dall'acenaftilene, mentre fluorene e acenaftene, presenti rispettivamente in 1 e 5 campioni, contribuiscono in minima parte. La distribuzione degli IPA è dominata dall'apporto del benzo[a]pirene, che viene attenuato in alcuni campioni solo dall'acenaftilene (**Figura 3.26**).

In base all'età e al genere degli esemplari di alzavola non si riconoscono evidenti relazioni con le concentrazioni e la composizione degli IPA.

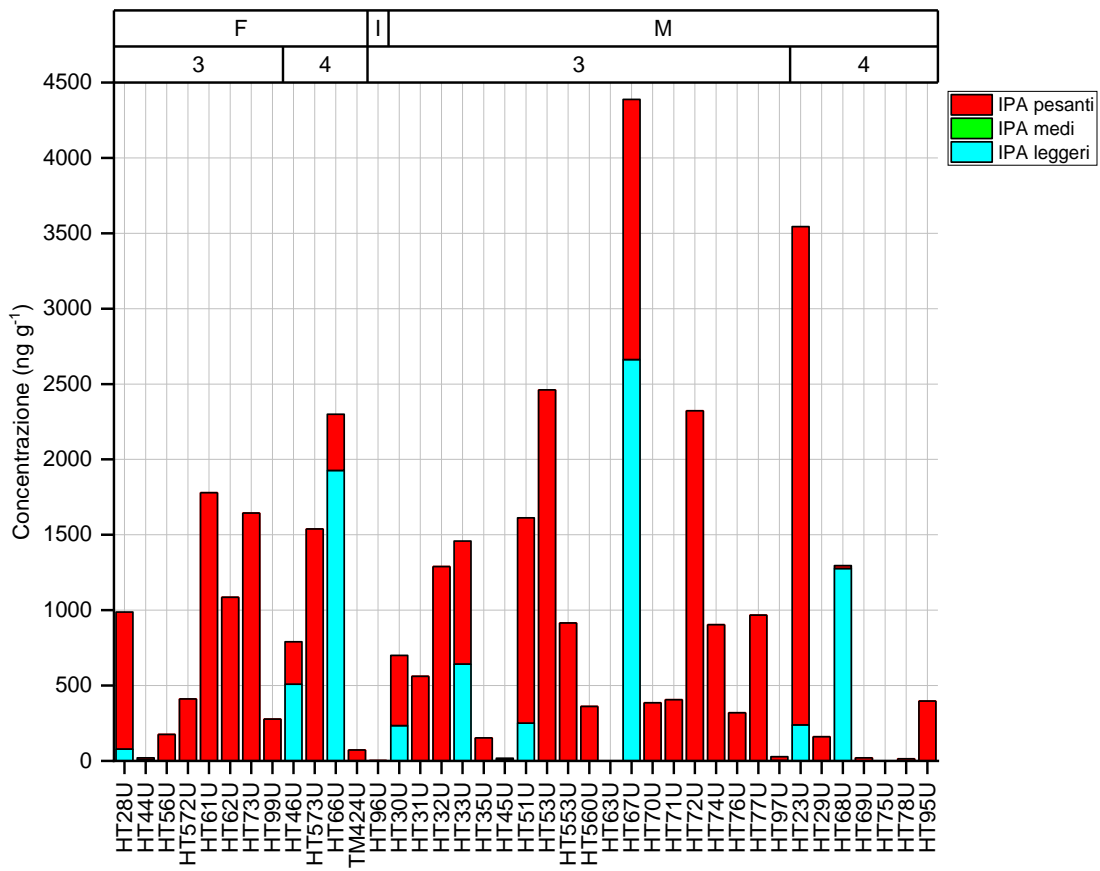
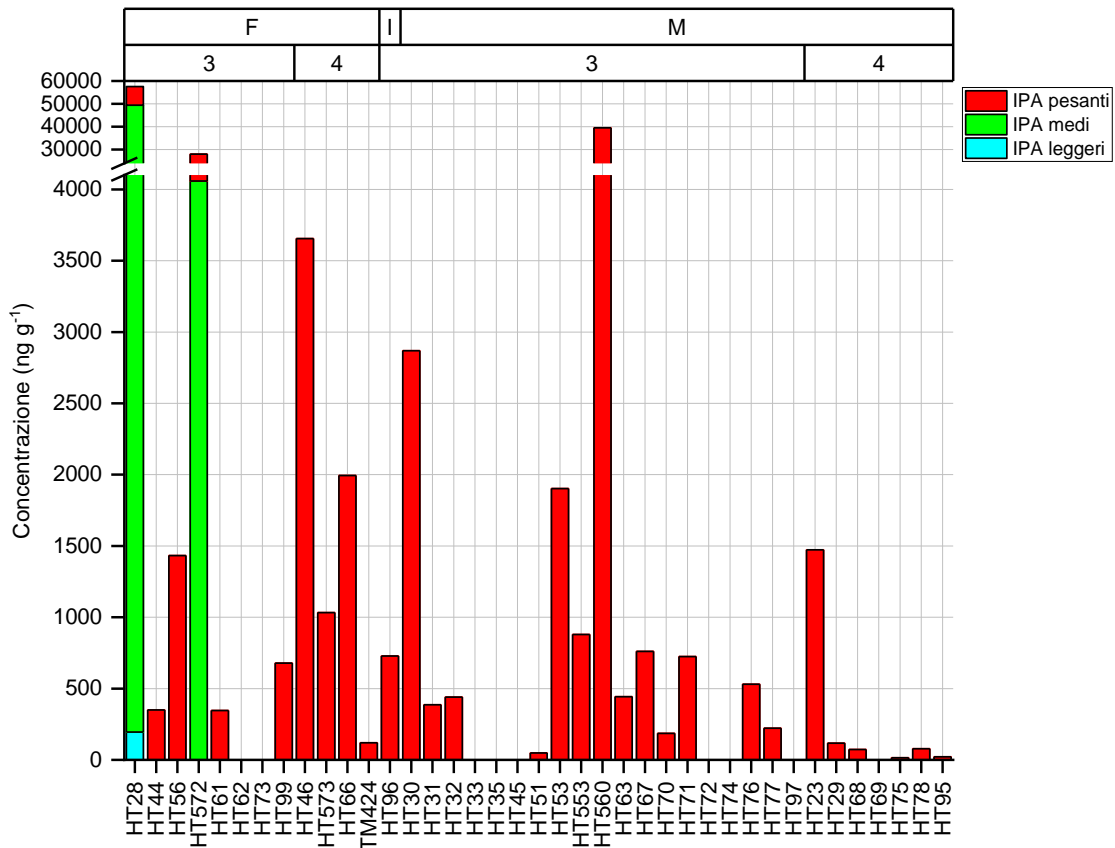


Figure 3.23 e 3.24 Concentrazioni (ng g⁻¹) degli IPA totali

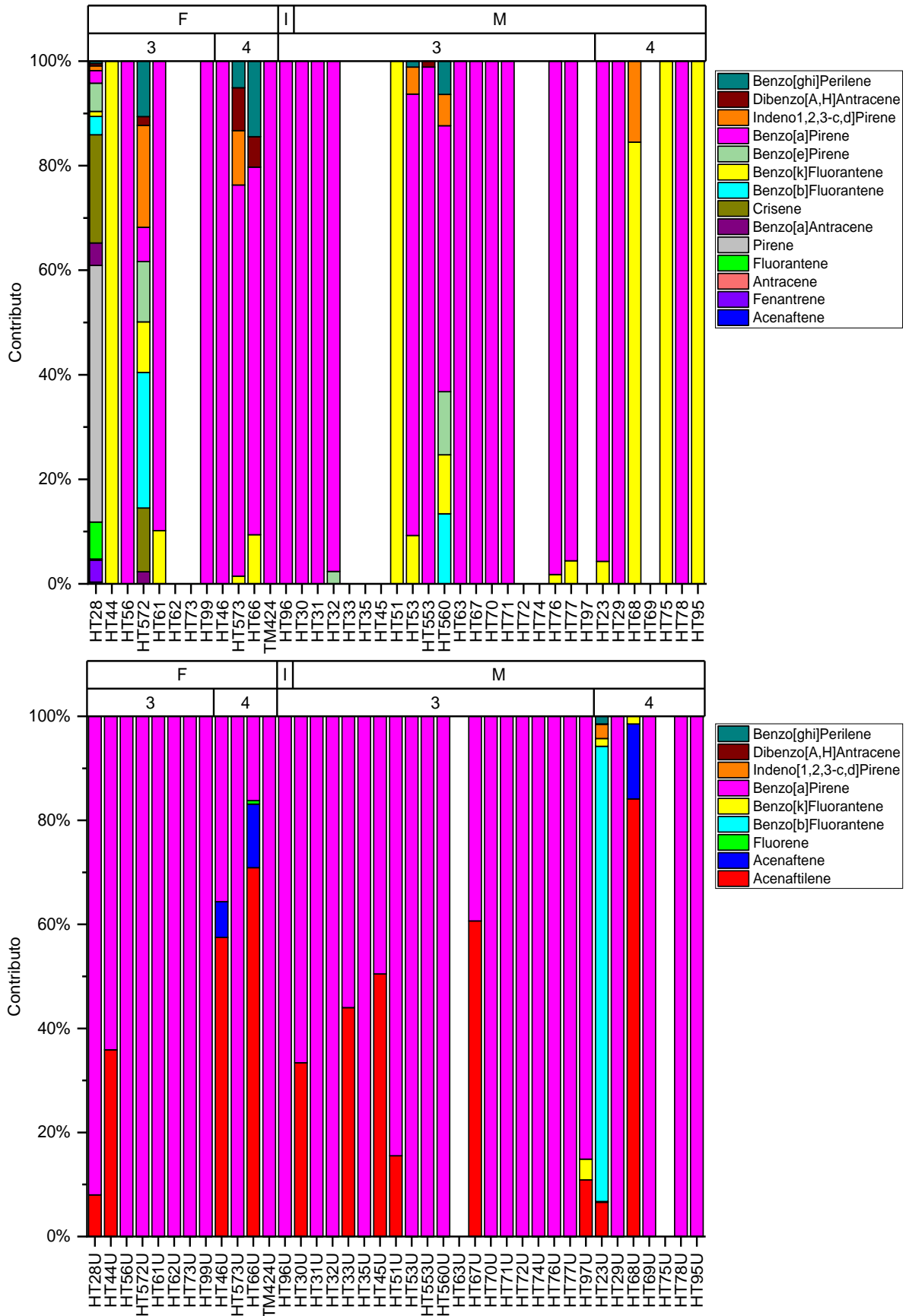


Figure 3.25 e 3.26 Contributi percentuali dei 16 IPA indagati

4 Discussione

La caratterizzazione *untarget* delle secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola ha rivelato la presenza di cere appartenenti alla classe dei monoesteri saturi di cere. La maggior parte degli studi (raccolti in Jacob e Ziswiler (1982) [26]) effettuati sulle secrezioni dell'uropigio di altri uccelli riportano l'identificazione di acidi grassi e alcoli primari, in seguito all'idrolisi delle cere, con catene sature. L'assenza di cere costituite da catene insature nelle secrezioni dell'uropigio dell'alzavola, così come in altri uccelli, potrebbe essere giustificata dalle proprietà fisiche e dalla stabilità chimica possedute dai lipidi insaturi. Questi, infatti, risulterebbero svantaggiosi per gli uccelli vista la loro tendenza ad essere ossidati dall'ossigeno atmosferico in composti che andrebbero ad alterare la tipica consistenza oleosa delle secrezioni [26]. L'analisi delle cere "integre" (ossia non idrolizzate) che consente di ricostruire i blocchi fondamentali, intesi come acido grasso e alcol costituenti di ogni cera, è stata condotta solo in altri pochi studi. Le cere "integre" rilevate in altre specie possiedono tendenzialmente un maggior numero di atomi di carbonio e coprono un intervallo di massa molecolare più ampio rispetto a quelle identificate nell'alzavola (da 24 a 30 atomi di carbonio). Dekker et al. (2000) [69] riportano per il piovanello maggiore *Calidris canutus* (Linnaeus, 1758) la presenza di monoesteri di cere con un numero di atomi di carbonio compresi tra 21 e 32; Thomas et al. (2010) [67] indicano per il passero golabianca *Zonotrichia albicollis* (J.R.Forster, 1772) un intervallo tra 23 e 38 atomi di carbonio; mentre Haribal et al. (2009) [72] hanno determinato in varie specie aviarie tropicali cere con catene che raggiungono addirittura 47 atomi di carbonio.

L'ulteriore caratterizzazione *untarget*, eseguita sulla frazione saponificata delle secrezioni dell'uropigio dell'alzavola, ha fornito indicazioni più dettagliate sulla struttura molecolare delle cere, in relazione soprattutto agli acidi grassi che le costituiscono. Per una parte degli acidi grassi determinati non è stato possibile stabilire se si trattasse di acidi grassi liberi o complessati, mentre il confronto dei risultati di questa frazione con quelli ottenuti per le cere ha permesso di riconoscere alcuni degli acidi grassi saturi ramificati, nello specifico i composti con un numero di atomi di carbonio compreso tra 8 e 12, come componenti delle cere. La struttura, caratterizzata da catene idrocarburiche mono-, di- e tri-metil sostituite in posizione pari, degli acidi grassi saturi ramificati identificati risulta inoltre in accordo con quanto riportato dall'analisi delle cere idrolizzate per vari ordini di uccelli, tra i quali gli *Anseriformes*, a cui l'alzavola appartiene (studi raccolti in Jacob e Ziswiler (1982) [26]). Una stima quantitativa, ottenuta dalla caratterizzazione *target*, di tre acidi

grassi saturi ramificati a 8 e 9 atomi di carbonio, attribuiti alle cere, ha evidenziato il loro significativo apporto sulle concentrazioni degli acidi grassi totali. L'acido nonanoico, un altro potenziale costituente delle cere, ha mostrato anch'esso risultati interessanti, soprattutto se confrontati con quelli degli acidi grassi lineari lunghi in cui le catene pari prevalgono nettamente sulle dispari, visto che ha dimostrato di poter eguagliare il contributo derivante dagli acidi grassi lineari medi a catene pari. Comunque, sia per gli acidi grassi lineari medi che lunghi, la composizione mostra differenze in relazione al punto di prelievo delle penne. Sulle penne del ventre, se paragonate con i campioni di penne dell'uropigio, si rilevano oltre che minori concentrazioni degli acidi tricosanoico e tetracosanoico, a dispetto di un incremento dell'acido eicosanoico, anche un maggior numero di acidi grassi saturi lineari medi con valori inferiori al limite di rivelabilità. Il substrato lipidico garantito dalle secrezioni dell'uropigio appare particolarmente favorevole alla proliferazione di batteri e altri microrganismi, in particolare sulle penne del ventre che potrebbero essere interessate da una più intensa attività microbica [88] che provoca quindi la trasformazione e/o degradazione di questi acidi grassi. Rispetto alle classi di lipidi finora discusse, vie biosintetiche associate all'attività della ghiandola uropigiale che possano giustificare la presenza di acidi grassi insaturi nelle secrezioni dell'uropigio non sono state individuate (al meglio delle nostre conoscenze). Gli uccelli sono in grado di sintetizzare acidi grassi monoinsaturi, mentre gli acidi grassi polinsaturi vengono tendenzialmente assunti tramite la dieta [176]. Durante la migrazione, alcuni uccelli mostrano inoltre una particolare preferenza verso alimenti con un elevato contenuto di acidi grassi insaturi [177]. Perciò, vista la dieta prevalentemente granivora dell'alzavola nel periodo invernale e il campionamento avvenuto durante la migrazione post riproduttiva, la possibilità che gli acidi grassi insaturi accumulati siano stati mobilizzati a causa dello sforzo migratorio [178] anche verso la ghiandola uropigiale risulterebbe fondata. I semi di varie specie di piante possiedono un alto contenuto di fitosteroli [179]; quindi, la presenza di questi ultimi nelle secrezioni dell'uropigio potrebbe essere sempre legata alla dieta granivora dell'alzavola. Un ulteriore aspetto da prendere in considerazione, in relazione agli acidi grassi insaturi e ai fitosteroli, riguarda la modalità di alimentazione dell'alzavola in acqua. Fitoplancton [180], alghe [181] e residui di piante vascolari [182] sono tutte potenziali fonti di acidi grassi polinsaturi e fitosteroli che possono essere assunti proprio mentre l'alzavola intrappola il cibo facendo scorrere l'acqua attraverso il becco [1]. Avendo però analizzato le secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne, e non quelle prelevate direttamente dall'interno della ghiandola uropigiale, va considerato un potenziale apporto dell'ambiente esterno. Tuttavia, bisogna anche sottolineare il fatto che le secrezioni dell'uropigio analizzate dai campioni di penne

dell'uropigio derivano dalla stimolazione della ghiandola uropigiale, con conseguente estrazione delle secrezioni dall'interno dell'organo. Dunque, la raccolta delle penne dell'uropigio è stata eseguita appurandosi di aver prelevato le secrezioni provenienti dall'interno della ghiandola uropigiale. Alcune indicazioni sulla minima e quasi trascurabile contaminazione in questa matrice, infatti, si possono ottenere dal confronto tra i campioni di penne del ventre e dell'uropigio. La composizione degli acidi grassi insaturi e dei fitosteroli per le penne dell'uropigio sembra dettata più da una variabilità individuale, con anche diversi valori inferiori al limite di rivelabilità, mentre i risultati per le penne del ventre tendono ad uniformarsi, quasi come a segnalare l'intervento di un contributo che sarebbe ragionevole associare all'ambiente esterno. Questa osservazione suggerisce quindi che il contributo ambientale sulle penne dell'uropigio sia decisamente minoritario. Su questo fronte, gli zoosteroli non hanno fornito informazioni aggiuntive, oltre a confermare il colestano e il colesterolo tra gli steroli più comuni e ad avvalorare, con buona probabilità, l'incapacità da parte degli uccelli di ridurre il colesterolo in coprostanolo ed epi-coprostanolo [183].

I risultati sui PCB e gli IPA suggeriscono sia un potenziale segnale di accumulo che un apporto dell'ambiente esterno. I residui di PCB e IPA rinvenuti nelle secrezioni dell'uropigio potrebbero derivare sia da contributi legati all'*uptake* e alla metabolizzazione da parte dell'organismo che dalla deposizione dall'ambiente esterno. I PCB meno clorurati e gli IPA più leggeri sono stati trovati principalmente nelle secrezioni dell'uropigio prelevate in prossimità della ghiandola. Le penne del ventre, invece, hanno mostrato la presenza di PCB altamente clorurati e una prevalenza di IPA pesanti. Yamashita et al. (2007) [184] hanno rilevato nelle secrezioni dell'uropigio di varie specie aviarie PCB a basso grado di clorurazione, evidenziando inoltre una maggiore proporzione di questi congeneri nelle secrezioni dell'uropigio rispetto ai tessuti adiposi. Questa differenza è stata associata alla minore trasformazione metabolica dei PCB nelle secrezioni dell'uropigio a causa del loro più breve tempo di permanenza nell'organismo [184]. Una maggiore quantità di PCB a basso grado di clorurazione può essere dovuta a vie metaboliche che portano allo stoccaggio senza passare per organi attivi dal punto di vista della biostrasformazione, come ad esempio il fegato. Assunta quindi questa ridotta incidenza metabolica, il rilevamento di IPA leggeri dalle penne dell'uropigio dell'alzavola risulta ragionevole nonostante vengano tendenzialmente riportate per i vertebrati elevate velocità di metabolizzazione degli IPA [131–134]. Ipotizzando che i tempi di emivita, ossia i tempi di dimezzamento, dei PCB e degli IPA nelle secrezioni dell'uropigio siano più ridotti rispetto a quelli degli altri organi, si potrebbe ricondurre l'esposizione a questi inquinanti ad una fase relativamente vicina al momento del campionamento, associabile perciò più al periodo

dello spostamento verso le zone di svernamento piuttosto che a quello precedente alla migrazione. Alla luce quindi di queste osservazioni, i PCB e gli IPA determinati nelle secrezioni dell'uropigio presenti sulle penne in prossimità dell'uropigio indicano un potenziale segnale di accumulo. Infatti, la loro rilevazione suggerisce che l'*uptake* avvenga ad un tasso superiore rispetto al tasso di biotrasformazione ed eliminazione. Oltre a potenziali fenomeni di bioaccumulo, anche l'insorgenza di effetti tossici appare un rischio concreto per le alzavole, visto il ricorrente rilevamento del benzo[a]pirene, noto per le sue capacità mutagene e cancerogene [132], e dei PCB con attività *dioxin-like* [127]. I PCB altamente clorurati e gli IPA pesanti presenti principalmente sulle penne del ventre, suggeriscono invece un contributo maggiore da parte dell'ambiente esterno, con deposizioni sulla superficie delle penne attribuibili anche al semplice contatto con suolo, sedimento, acqua e aria. Considerando poi la tendenza a volatilizzarsi dei PCB e degli IPA più leggeri e la più elevata affinità lipidica dei composti con una maggior massa molecolare [122,130,131], risulta ragionevole trovare una proporzione maggiore di questi ultimi nelle secrezioni dell'uropigio sulle penne del ventre. Viste le differenze nei profili dei PCB e degli IPA tra le penne dell'uropigio e quelle del ventre, l'apporto delle deposizioni esterne su queste ultime appare preponderante. Le penne del ventre potrebbero dunque svolgere un ruolo come indicatore di esposizione ai contaminanti, piuttosto che di bioaccumulo.

In base al genere e all'età degli esemplari di alzavola, non si sono riconosciute evidenti relazioni con le concentrazioni e le composizioni per nessuna delle classi di composti organici indagate. Per quanto riguarda la componente lipidica, relazioni con il genere sono state generalmente individuate rilevando un cambiamento delle proporzioni dei monoesteri di cere rispetto ai diesteri di cere [63], che però non sono stati trovati nelle secrezioni dell'uropigio dell'alzavola. Per i PCB e gli IPA, differenze tra i generi si potrebbero rivelare durante la stagione riproduttiva. Le femmine, ad esempio, utilizzando le riserve corporee immagazzinate per la formazione di uova, possono rimobilizzare e trasferire PCB alle uova [151]. Tuttavia, nel presente studio, gli esemplari di alzavola non fanno riferimento a questo periodo. Infine, nel tentativo di rilevare altre eventuali differenze fisiologiche, il confronto tra i più giovani e gli adulti (nonostante alcune incertezze sull'esatta determinazione dell'età degli esemplari di alzavola adulti che potrebbero essere rappresentati anche da un gruppo di individui di età più eterogenea) non ha mostrato evidenti relazioni con la composizione dei lipidi e dei residui di PCB e IPA nelle secrezioni dell'uropigio dell'alzavola.

5 Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi, le secrezioni dell'uropigio distribuite sulle penne dell'alzavola hanno consentito la simultanea analisi dei lipidi, in particolare cere, acidi grassi e steroli, e degli inquinanti organici persistenti, nello specifico PCB e IPA.

L'analisi *target* e *untarget* dei lipidi ha permesso di identificare sia classi di composti organici caratteristici delle secrezioni dell'uropigio, come cere e acidi grassi saturi, che un gruppo di composti, come acidi grassi insaturi e fitosteroli, presumibilmente derivanti dalla dieta generale ma anche legata al particolare periodo migratorio.

I PCB e gli IPA determinati nelle secrezioni dell'uropigio dell'alzavola suggeriscono, oltre che un'esposizione, avvenuta probabilmente anche in concomitanza della migrazione, a questi inquinanti organici persistenti, l'insorgenza di potenziali fenomeni di bioaccumulo.

Il confronto tra le secrezioni dell'uropigio presenti sulle penne in prossimità della ghiandola uropigiale e quelle distribuite sulle penne del ventre rivela differenze, attribuibili ad un maggior contributo dell'ambiente esterno su queste ultime, sia nei profili dei lipidi che dei PCB e degli IPA.

Infine, nel tentativo di rilevare eventuali differenze fisiologiche, il genere o l'età degli esemplari di alzavola non hanno mostrato evidenti relazioni con la composizione dei lipidi e dei residui di PCB e IPA nelle secrezioni dell'uropigio.

Bibliografia

- [1] S. Cramp and K. E. L. Simmons, *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa; the Birds of the Western Palearctic*, vol. 3, no. 3. 1983. doi: 10.2307/3691.
- [2] P. Bricchetti, P. De Franceschi, and N. Baccetti, *Fauna d'Italia. XXIX. Aves. I, Gaviidae-Phasianidae*, Edizioni C. 1992.
- [3] S. Madge and H. Burn, *Wildfowl: An Identification to the Ducks, Geese and Swans of the World*. 1988.
- [4] A. Tamisier, "The functional units of wintering ducks: A spatial integration of their comfort and feeding requirements," 1978.
- [5] D. Giunchi *et al.*, "Spring migratory routes and stopover duration of satellite-tracked Eurasian Teals *Anas crecca* wintering in Italy," *Ibis (Lond. 1859)*, vol. 161, no. 1, pp. 117–130, 2019, doi: 10.1111/ibi.12602.
- [6] Associazione Faunisti Veneti, "Censimento degli uccelli acquatici svernanti in provincia di Venezia," 2018.
- [7] M. Bon, F. Scarton, E. Stival, L. Sattin, and G. Sgorlon, *Nuovo Atlante degli Uccelli nidificanti e svernanti*. 2014.
- [8] M. Guillemain and J. Elmberg, *The Teal*, 1st ed. in Poyser Monographs. London: Poyser, 2014. [Online]. Available: <http://www.bloomsburycollections.com/book///>
- [9] M. Guillemain, S. L. Van Wilgenburg, P. Legagneux, and K. A. Hobson, "Assessing geographic origins of Teal (*Anas crecca*) through stable-hydrogen ($\delta^2\text{H}$) isotope analyses of feathers and ring-recoveries," *J. Ornithol.*, vol. 155, no. 1, pp. 165–172, 2014, doi: 10.1007/s10336-013-0998-4.
- [10] M. Guillemain, R. Hearn, R. King, M. Gauthier-Clerc, G. Simon, and A. Caizergues, "Comparing the migration of Eurasian Teal *Anas crecca* from two main wintering areas of Western Europe: A long-term study from Essex, England, and the Camargue, France," *Ringing Migr.*, vol. 24, no. 4, pp. 273–276, 2009, doi: 10.1080/03078698.2009.9674402.
- [11] L. Dessborn, A.-L. Brochet, J. Elmberg, P. Legagneux, M. Gauthier-Clerc, and M. Guillemain, "Geographical and temporal patterns in the diet of pintail *Anas acuta*, wigeon *Anas penelope*, mallard *Anas platyrhynchos* and teal *Anas crecca* in the Western Palearctic," *Eur. J. Wildl. Res.*, vol. 57, 2011, doi: 10.1007/s10344-011-0577-z.
- [12] P. J. S. OLNEY, "THE FOOD AND FEEDING HABITS OF TEAL *ANAS CRECCA*," *Proc. Zool. Soc. London*, vol. 140, no. 2, pp. 169–210, 1963, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01860.x>.
- [13] A. Staneva and I. Burfield, *European Birds of Conservation Concern: populations, trends and national responsibilities*. 2017.
- [14] The IUCN Red List of Threatened Species, "Anas crecca," 2021.
- [15] Council of Europe, "Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats- Annex III: protected fauna species," 1993. <https://eunis.eea.europa.eu/references/1567/species> (accessed Apr. 06, 2023).
- [16] CMS, "Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals- Annex II: migratory species which have an unfavourable conservation status and which require international agreements for their conservation and management, as well as those which have a," 1983. <https://eunis.eea.europa.eu/references/1800/species> (accessed Apr. 06, 2023).

- [17] AEWA, "Agreement on the Conservation of African-Eurasian Migratory Waterbirds. Convention on Migratory Species of Wild Animals- Annex II: Waterbird species to which the Agreement applies," 2012. <https://eunis.eea.europa.eu/references/2447/species> (accessed Apr. 06, 2023).
- [18] European Parliament, "Directive 2009/147/EC of the European Parliament and of the Council, of 30 November 2009, on the conservation of wild birds - Annex II: Species that may be hunted under national legislation in the geographical sea and land area where this Directive applies," 2009. <https://eunis.eea.europa.eu/references/2456/species> (accessed Apr. 06, 2023).
- [19] P. R. Stettenheim, "Chapter 1 – THE INTEGUMENT OF BIRDS," 1972.
- [20] P. R. Stettenheim, "The integumentary morphology of modern birds-an overview," *Am. Zool.*, vol. 40, no. 4, pp. 461–477, 2000, doi: 10.1093/icb/40.4.461.
- [21] Gopinathan K. Menon and Jaishri Menon, "Avian Epidermal Lipids : Functional Considerations and Relationship to Feathering," vol. 40, no. 4, pp. 540–552, 2000.
- [22] A. M. Lucas and P. R. Stettenheim, *Avian anatomy. Integument. Agriculture Handbook 362*. 1972.
- [23] G. K. Menon, S. K. Aggarwal, and A. M. Lucas, "Evidence for the holocrine nature of lipid secretion by avian epidermal cells: A histochemical and fine structural study of rictus and the uropygial gland," *J. Morphol.*, vol. 167, no. 2, pp. 185–199, 1981, doi: 10.1002/jmor.1051670204.
- [24] G. K. Menon, "Glandular function of avian integument: an overview," *J. Yamashina Inst. Ornith.*, vol. 16, pp. 1–12, 1984.
- [25] W. B. Quay, "Comparative Survey of the Anal Glands of Birds," *Oxford Univ. Press*, vol. 84, no. 3, pp. 379–389, 1967.
- [26] V. Jacob, J. and Ziswiler, "The uropygial gland," in *Avian biology*, K. FARNER, DS., KING, JR. and PARKES, Ed., New York: Academic Press, 1982, pp. 199–324. doi: 10.2307/4511988.
- [27] A. J. Thody and S. Shuster, "Control and function of sebaceous glands," *Physiol. Rev.*, vol. 69, no. 2, pp. 383–416, 1989, doi: 10.1152/physrev.1989.69.2.383.
- [28] D. W. Johnston, "A morphological atlas of the avian uropygial gland," vol. 1, no. 2. pp. 199–255, 1988.
- [29] R. Cammack *et al.*, *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, 2008. doi: 10.1093/acref/9780198529170.001.0001.
- [30] E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, and S. Subramaniam, "Lipidomics NIH Public Access," *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1811, no. 11, pp. 637–647, 2012, doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.009.Lipid.
- [31] "Lipid Library." <https://lipidlibrary.aocs.org/> (accessed Apr. 03, 2023).
- [32] "Cyberlipid Center." <https://cyberlipid.gerli.com/> (accessed Apr. 03, 2023).
- [33] K. Watanabe, E. Yasugi, and M. Oshima, "How to Search the Glycolipid data in 'LIPID BANK for Web', the Newly Developed Lipid Database in Japan," *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, vol. 12, no. 65, pp. 175–184, 2000, doi: 10.4052/tigg.12.175.
- [34] E. Fahy *et al.*, "A comprehensive classification system for lipids," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 839–861, 2005, doi: 10.1194/jlr.E400004-JLR200.
- [35] E. Fahy *et al.*, "Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids1," *J. Lipid Res.*, vol. 50, pp. S9–S14, 2009, doi: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>.
- [36] E. Fahy *et al.*, "A comprehensive classification system for lipids1," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 839–861,

2005, doi: <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>.

- [37] G. P. Moss, P. A. S. Smith, and D. Tavernier, "Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure," *Pure Appl. Chem.*, vol. 67, no. 8–9, pp. 1307–1375, 1995, doi: [doi:10.1351/pac199567081307](https://doi.org/10.1351/pac199567081307).
- [38] M. Martín-Vivaldi *et al.*, "Antimicrobial chemicals in hoopoe preen secretions are produced by symbiotic bacteria," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 277, no. 1678, pp. 123–130, 2010, doi: [10.1098/rspb.2009.1377](https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1377).
- [39] D. J. Whittaker, H. A. Soini, J. W. Atwell, C. Hollars, M. V. Novotny, and E. D. Ketterson, "Songbird chemosignals: Volatile compounds in preen gland secretions vary among individuals, sexes, and populations," *Behav. Ecol.*, vol. 21, no. 3, pp. 608–614, 2010, doi: [10.1093/beheco/arq033](https://doi.org/10.1093/beheco/arq033).
- [40] R. J. Whelan, T. C. Levin, J. C. Owen, and M. C. Garvin, "Short-chain carboxylic acids from gray catbird (*Dumetella carolinensis*) uropygial secretions vary with testosterone levels and photoperiod," *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 156, no. 3, pp. 183–188, 2010, doi: [10.1016/j.cbpb.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.03.005).
- [41] C. L. Shaw, J. E. Rutter, A. L. Austin, M. C. Garvin, and R. J. Whelan, "Volatile and Semivolatile Compounds in Gray Catbird Uropygial Secretions Vary with Age and Between Breeding and Wintering Grounds," *J. Chem. Ecol.*, vol. 37, no. 4, pp. 329–339, 2011, doi: [10.1007/s10886-011-9931-6](https://doi.org/10.1007/s10886-011-9931-6).
- [42] H. A. Soini, S. E. Schrock, K. E. Bruce, D. Wiesler, E. D. Ketterson, and M. V. Novotny, "Seasonal variation in volatile compound profiles of preen gland secretions of the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*)," *J. Chem. Ecol.*, vol. 33, no. 1, pp. 183–198, 2007, doi: [10.1007/s10886-006-9210-0](https://doi.org/10.1007/s10886-006-9210-0).
- [43] D. Montalti, A. M. Gutiérrez, G. Reboledo, and A. Salibián, "The chemical composition of the uropygial gland secretion of rock dove *Columba livia*," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 140, no. 3, pp. 275–279, 2005, doi: [10.1016/j.cbpb.2004.10.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.10.008).
- [44] B. V. Burger, B. Reiter, O. Borzyk, and M. A. Du Plessis, "Avian Exocrine Secretions. I. Chemical Characterization of the Volatile Fraction of the Uropygial Secretion of the Green Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*," *J. Chem. Ecol.*, vol. 34, no. October 2004, 2004, doi: [10.1023/B](https://doi.org/10.1023/B).
- [45] M. Apandi and H. M. Edwards, "Studies on the Composition of the Secretions of the Uropygial Gland of Some Avian Species," *Poult. Sci.*, vol. 43, no. 6, pp. 1445–1462, 1964, doi: [10.3382/ps.0431445](https://doi.org/10.3382/ps.0431445).
- [46] V. Zeisler-Diehl, E. A. A. Al-Khutabi, G. Kirfel, L. Schreiber, G. van Echten-Deckert, and V. Herzog, "Detection of endogenous lipids in chicken feathers distinct from preen gland constituents," *Protoplasma*, vol. 257, no. 6, pp. 1709–1724, 2020, doi: [10.1007/s00709-020-01544-7](https://doi.org/10.1007/s00709-020-01544-7).
- [47] B. Y. Tang and I. A. Hansen, "Lipogenesis in Chicken Uropygial Glands," *Eur. J. Biochem.*, vol. 31, no. 2, pp. 372–377, 1972, doi: [10.1111/j.1432-1033.1972.tb02543.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb02543.x).
- [48] J. S. Buckner and P. E. Kolattukudy, "Lipid Biosynthesis in the Sebaceous Glands: Synthesis of Multibranch Fatty Acids from Methylmalonyl-Coenzyme A in Cell-Free Preparations from the Uropygial Gland of Goose," *Biochemistry*, vol. 14, no. 8, pp. 1774–1782, 1975, doi: [10.1021/bi00679a033](https://doi.org/10.1021/bi00679a033).
- [49] C. J. Bedord, P. E. Kolattukudy, and L. Rogers, "Isolation and characterization of a tryptic fragment containing the thioesterase segment of fatty acid synthetase from the uropygial gland of goose," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 186, no. 1, pp. 139–151, 1978, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90473-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90473-3).
- [50] G. R. Wilson, "Fatty alcohols," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 31, no. 11, pp. 564–568, 1954, doi: [10.1007/BF02638573](https://doi.org/10.1007/BF02638573).

- [51] J. X. Zhang, L. Sun, and M. X. Zuo, "Uropygial gland volatiles may code for olfactory information about sex, individual, and species in Bengalese finches *Lonchura striata*," *Curr. Zool.*, vol. 55, no. 5, pp. 357–365, 2009, doi: 10.1093/czoolo/55.5.357.
- [52] J. X. Zhang, W. Wei, J. H. Zhang, and W. H. Yang, "Uropygial gland-secreted alkanols contribute to olfactory sex signals in Budgerigars," *Chem. Senses*, vol. 35, no. 5, pp. 375–382, 2010, doi: 10.1093/chemse/bjq025.
- [53] J. Hellenbrand, E. M. Biester, J. Gruber, M. Hamberg, and M. Frentzen, "Fatty acyl-CoA reductases of birds," *BMC Biochem.*, vol. 12, no. 1, 2011, doi: 10.1186/1471-2091-12-64.
- [54] P. E. Kolattukudy and R. G. Riley, "Biosynthesis Enzymatic Reduction of 3- by a NADPH (B-Side) Specific Microsomal Reductase from the Uropygial Glands of Ring- Necked Pheasants (*Phasianus colchicus*)' Alkane diols are widely distributed in crowned sparrow showed that fatty acids duction ," vol. 189, no. 2, pp. 433–440, 1978.
- [55] B. C. Livezey, J. Jacob, and P. S. Humphrey, "Biochemical composition of secretions from uropygial glands of steamer-ducks," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 14, no. 4, pp. 445–450, 1986, doi: 10.1016/0305-1978(86)90032-3.
- [56] P. E. Kolattukudy and W. N. Sawaya, "Age dependent structural changes in the diol esters of uropygial glands of chicken," *Lipids*, vol. 9, no. 4, pp. 290–292, 1974, doi: 10.1007/BF02532208.
- [57] J. Poltz and J. Jacob, "The uropygial gland secretions of birds of the family sylviiidae," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 3, no. 1, pp. 57–62, 1975, doi: 10.1016/0305-1978(75)90042-3.
- [58] E. M. Levy and P. M. Strain, "The composition of the preen gland waxes of some marine birds: A word of caution for chemotaxonomists," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, vol. 72, no. 2, pp. 255–260, Jan. 1982, doi: 10.1016/0305-0491(82)90043-8.
- [59] J. Reneerkens, T. Piersma, and J. S. S. Damsté, "Discerning adaptive value of seasonal variation in preen waxes," *Acta Zool. Sin.*, vol. 52, no. 2000, pp. 272–275, 2006.
- [60] J. Reneerkens, M. A. Versteegh, A. M. Schneider, T. Piersma, and E. H. Burttt, "Seasonally changing preen-wax composition: Red knots' (*Calidris canutus*) flexible defense against feather-degrading bacteria?," *Auk*, vol. 125, no. 2, pp. 285–290, 2008, doi: 10.1525/auk.2008.06217.
- [61] J. Reneerkens, T. Piersma, and J. S. Sinninghe Damsté, "Sandpipers (*Scolopacidae*) switch from monoester to diester preen waxes during courtship and incubation, but why?," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 269, no. 1505, pp. 2135–2139, 2002, doi: 10.1098/rspb.2002.2132.
- [62] B. A. Caspers, R. Marfull, T. Dannenhaus, J. Komdeur, and P. Korsten, "Chemical analysis reveals sex differences in the preen gland secretion of breeding Blue Tits," *J. Ornithol.*, vol. 163, no. 1, pp. 191–198, 2022, doi: 10.1007/s10336-021-01921-w.
- [63] J. Jacob, J. Balthazart, and E. Schoffeniels, "Sex differences in the chemical composition of uropygial gland waxes in domestic ducks," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 7, no. 2, pp. 149–153, 1979, doi: 10.1016/0305-1978(79)90024-3.
- [64] L. A. Grieves, M. A. Bernards, and E. A. MacDougall-Shackleton, "Wax Ester Composition of Songbird Preen Oil Varies Seasonally and Differs between Sexes, Ages, and Populations," *J. Chem. Ecol.*, vol. 45, no. 1, pp. 37–45, 2019, doi: 10.1007/s10886-018-1033-2.
- [65] P. E. Kolattukudy, S. Bohnet, and L. Rogers, "Disappearance of short chain acids from the preen gland wax of male mallard ducks during eclipse," *J. Lipid Res.*, vol. 26, no. 8, pp. 989–994, 1985, doi: 10.1016/s0022-

2275(20)34303-0.

- [66] J. Jacob, "Chemical composition of the preen gland secretions from some ciconiiform birds," *Lipids*, vol. 13, no. 4, pp. 274–282, 1978, doi: 10.1007/BF02533670.
- [67] R. H. Thomas, E. R. Price, C. L. Seewagen, S. A. Mackenzie, M. A. Bernards, and C. G. Guglielmo, "Use of TLC-FID and GC-MS/FID to examine the effects of migratory state, diet and captivity on preen wax composition in White-throated Sparrows *Zonotrichia albicollis*," *Ibis (Lond. 1859)*, vol. 152, no. 4, pp. 782–792, 2010, doi: 10.1111/j.1474-919X.2010.01050.x.
- [68] J. Jacob and G. Grimmer, "Composition of uropygial gland waxes in relation to the classification of some passerine birds," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 3, no. 4, pp. 267–271, 1975, doi: 10.1016/0305-1978(75)90013-7.
- [69] M. H. A. Dekker, T. Piersma, and J. S. Sinninghe Damsté, "Molecular analysis of intact preen waxes of *Calidris canutus* (Aves: Scolopacidae) by gas chromatography/mass spectrometry," *Lipids*, vol. 35, no. 5, pp. 533–541, 2000, doi: 10.1007/s11745-000-553-7.
- [70] J. S. Sinninghe Damsté, M. Dekker, B. E. Van Dongen, S. Schouten, and T. Piersma, "Structural identification of the diester preen-gland waxes of the red knot (*Calidris canutus*)," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 3, pp. 381–384, 2000, doi: 10.1021/np990377m.
- [71] J. Jacob and J. Poltz, "Composition of uropygial gland secretions of birds of prey," *Lipids*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 1975, doi: 10.1007/BF02532185.
- [72] M. Haribal, A. Dhondt, and E. Rodriguez, "Diversity in chemical compositions of preen gland secretions of tropical birds," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 37, no. 2, pp. 80–90, 2009, doi: 10.1016/j.bse.2008.12.005.
- [73] M. Haribal, A. A. Dhondt, D. Rosane, and E. Rodriguez, "Chemistry of preen gland secretions of passerines: Different pathways to same goal? why?," *Chemoecology*, vol. 15, no. 4, pp. 251–260, 2005, doi: 10.1007/s00049-005-0318-4.
- [74] I. Fischer, W. Meissner, Ł. P. Haliński, and P. Stepnowski, "Preen oil chemical composition in herring gull *Larus argentatus*, common gull *Larus canus* and black-headed gull *Chroicocephalus ridibundus* confirms their status as two separate genera," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 89, no. August 2019, p. 103987, 2020, doi: 10.1016/j.bse.2019.103987.
- [75] E. M. Biester, J. Hellenbrand, J. Gruber, M. Hamberg, and M. Frentzen, "Identification of avian wax synthases," *BMC Biochem.*, vol. 13, no. 1, 2012, doi: 10.1186/1471-2091-13-4.
- [76] "LIPID MAPS." <https://www.lipidmaps.org/> (accessed Apr. 03, 2023).
- [77] B. M. Uva, P. Ghiani, S. Deplano, A. Mandich, L. Vaccari, and M. Vallarino, "Occurrence of 7-dehydrocholesterol in the uropygial gland of domestic fowls," *Acta Histochem.*, vol. 62, no. 2, pp. 237–243, 1978, doi: 10.1016/S0065-1281(78)80089-0.
- [78] J. Mardon, S. M. Saunders, and F. Bonadonna, "From preen secretions to plumage: The chemical trajectory of blue petrels' *Halobaena caerulea* social scent," *J. Avian Biol.*, vol. 42, no. 1, pp. 29–38, 2011, doi: 10.1111/j.1600-048X.2010.05113.x.
- [79] A. H. Baillie, M. M. Ferguson, and D. M. Hart, "Developments in steroid histochemistry [by] A.H. Baillie and M.M. Ferguson and D. McK. Hart." Academic Press, London, New York, 1966.
- [80] B. A. Walther and D. H. Clayton, "Elaborate ornaments are costly to maintain: Evidence for high maintenance handicaps," *Behav. Ecol.*, vol. 16, no. 1, pp. 89–95, 2005, doi: 10.1093/beheco/arl135.

- [81] L. Fauchet, T. Cansse, and J. Arnould, "The importance of preening behaviour in the at-sea time budget of Australasian gannets," *Emu - Austral Ornithol.*, vol. 121, pp. 1–6, 2021, doi: 10.1080/01584197.2021.1961590.
- [82] W. Elder, "The oil gland of birds," *Wilson Bull.*, vol. 66, no. 1, pp. 6–31, 1954, [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/4158258>
- [83] A. Salibian and D. Montalti, "Physiological and biochemical aspects of the avian uropygial gland," *Brazilian J. Biol.*, vol. 69, no. 2, pp. 437–446, 2009, doi: 10.1590/s1519-69842009000200029.
- [84] G. Moreno-Rueda, "Preen oil and bird fitness: a critical review of the evidence," *Biol. Rev.*, vol. 92, no. 4, pp. 2131–2143, 2017, doi: 10.1111/brv.12324.
- [85] B. R. Moyer, A. N. Rock, and D. H. Clayton, "Experimental test of the importance of preen oil in Rock Doves (*Columba livia*)," *Auk*, vol. 120, no. 2, pp. 490–496, 2003, doi: 10.1093/auk/120.2.490.
- [86] M. Giraudeau, C. Duval, N. Guillon, V. Bretagnolle, C. Gutierrez, and P. Heeb, "Effects of access to preen gland secretions on mallard plumage," *Naturwissenschaften*, vol. 97, no. 6, pp. 577–581, 2010, doi: 10.1007/s00114-010-0673-z.
- [87] D. Montalti and A. Salibián, "Uropygial gland size and avian habitat," *Ornitol. Neotrop.*, vol. 11, no. January 2000, pp. 297–306, 2000.
- [88] A. R. Gunderson, "Feather-derading bacteria: A new frontier in avian and host-parasite research?," *Auk*, vol. 125, no. 4, pp. 972–979, 2008, doi: 10.1525/auk.2008.91008.
- [89] M. D. Shawkey, S. R. Pillai, and G. E. Hill, "Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria," *J. Avian Biol.*, vol. 34, no. 4, pp. 345–349, 2003, doi: 10.1111/j.0908-8857.2003.03193.x.
- [90] J. J. Soler *et al.*, "Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland," *Funct. Ecol.*, vol. 22, pp. 864–871, 2008.
- [91] M. Ruiz-Rodríguez, E. Valdivia, J. J. Soler, M. Martín-Vivaldi, A. M. Martín-Platero, and M. Martínez-Bueno, "Symbiotic bacteria living in the hoopoe's uropygial gland prevent feather degradation.," *J. Exp. Biol.*, vol. 212, no. Pt 22, pp. 3621–3626, Nov. 2009, doi: 10.1242/jeb.031336.
- [92] M. Ruiz-Rodríguez *et al.*, "Antimicrobial Activity and Genetic Profile of Enterococci Isolated from Hoopoes Uropygial Gland," *PLoS One*, vol. 7, p. e41843, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0041843.
- [93] M. Ruiz-Rodríguez, M. Martínez-Bueno, M. Martín-Vivaldi, E. Valdivia, and J. J. Soler, "Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland.," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 85, no. 3, pp. 495–502, Sep. 2013, doi: 10.1111/1574-6941.12138.
- [94] M. Ruiz-Rodríguez, G. Tomás, D. Martín-Gálvez, C. Ruiz-Castellano, and J. J. Soler, "Bacteria and the evolution of honest signals. The case of ornamental throat feathers in spotless starlings," *Funct. Ecol.*, vol. 29, pp. 701–709, 2015.
- [95] G. Á. Czirják *et al.*, "Preen gland removal increases plumage bacterial load but not that of feather-degrading bacteria," *Naturwissenschaften*, vol. 100, no. 2, pp. 145–151, 2013, doi: 10.1007/s00114-012-1005-2.
- [96] M. Giraudeau *et al.*, "Effect of preen oil on plumage bacteria: An experimental test with the mallard," *Behav. Processes*, vol. 92, pp. 1–5, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.08.001>.
- [97] O. Vincze, C. I. Vágási, I. Kovács, I. Galván, and P. L. Pap, "Sources of variation in uropygial gland size in european birds," *Biol. J. Linn. Soc.*, vol. 110, no. 3, pp. 543–563, 2013, doi: 10.1111/bij.12139.
- [98] A. P. Møller, J. Erritzøe, and L. Rózsa, "Ectoparasites, uropygial glands and hatching success in birds,"

Oecologia, vol. 163, no. 2, pp. 303–311, 2010, doi: 10.1007/s00442-009-1548-x.

- [99] I. Galván *et al.*, “Feather mites and birds: An interaction mediated by uropygial gland size?,” *J. Evol. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 133–144, 2008, doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01459.x.
- [100] J. J. Soler, J. M. Peralta-Sánchez, A. M. Martín-Platero, M. Martín-Vivaldi, M. Martínez-Bueno, and A. P. Møller, “The evolution of size of the uropygial gland: mutualistic feather mites and uropygial secretion reduce bacterial loads of eggshells and hatching failures of European birds,” *J. Evol. Biol.*, vol. 25, no. 9, pp. 1779–1791, Sep. 2012, doi: 10.1111/j.1420-9101.2012.02561.x.
- [101] G. S. Bakken, M. R. Banta, C. M. Higginbotham, A. J. Lynott, and A. J. It, “It ’ s Just Ducky to Be Clean : The Water Repellency and Water Penetration Resistance of Swimming Mallard *Anas platyrhynchos* Ducklings,” vol. 37, no. 6, pp. 561–571, 2006.
- [102] A. Surmacki and J. K. Nowakowski, “Soil and preen waxes influence the expression of carotenoid-based plumage coloration,” *Naturwissenschaften*, vol. 94, no. 10, pp. 829–835, 2007, doi: 10.1007/s00114-007-0263-x.
- [103] L. Pérez-Rodríguez, F. Mougeot, and G. Bortolotti, “The effect of preen oils and soiling on the UV-visible reflectance of carotenoid-pigmented feathers,” *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 65, pp. 1425–1435, 2011, doi: 10.1007/s00265-011-1153-y.
- [104] J. A. Amat, M. A. Rendón, J. Garrido-Fernández, A. Garrido, M. Rendón-Martos, and A. Pérez-Gálvez, “Greater flamingos *Phoenicopterus roseus* use uropygial secretions as make-up,” *Behav. Ecol. Sociobiol.*, vol. 65, no. 4, pp. 665–673, 2011, doi: 10.1007/s00265-010-1068-z.
- [105] J. Reneerkens and P. Korsten, “Plumage reflectance is not affected by preen wax composition in red knots *Calidris canutus*,” *J. Avian Biol.*, vol. 35, no. 5, pp. 405–409, 2004, doi: 10.1111/j.0908-8857.2004.03317.x.
- [106] T. Piersma, M. Dekker, and J. S. Sinninghe Damsté, “An avian equivalent of make-up?,” *Ecol. Lett.*, vol. 2, no. 4, pp. 201–203, 1999, doi: 10.1046/j.1461-0248.1999.00078.x.
- [107] J. Mardon, S. M. Saunders, M. J. Anderson, C. Couchoux, and F. Bonadonna, “Species, gender, and identity: Cracking petrels’ sociochemical code,” *Chem. Senses*, vol. 35, no. 4, pp. 309–321, 2010, doi: 10.1093/chemse/bjq021.
- [108] H. Liu *et al.*, “Metabolic Profiling Reveals That the Olfactory Cues in the Duck Uropygial Gland Potentially Act as Sex Pheromones,” *Animals*, vol. 12, no. 4, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3390/ani12040413.
- [109] F. Bonadonna, E. Miguel, V. Grosbois, P. Jouventin, and J. M. Bessiere, “Individual odor recognition in birds: An endogenous olfactory signature on petrels’ feathers?,” *J. Chem. Ecol.*, vol. 33, no. 9, pp. 1819–1829, 2007, doi: 10.1007/s10886-007-9345-7.
- [110] K. C. Jones and P. De Voogt, “Persistent organic pollutants (POPs): state of the science,” *Environ. Pollut.*, vol. 100, no. 1, pp. 209–221, 1999.
- [111] K. Breivik, R. Alcock, Y. F. Li, R. E. Bailey, H. Fiedler, and J. M. Pacyna, “Primary sources of selected POPs: Regional and global scale emission inventories,” *Environ. Pollut.*, vol. 128, no. 1–2, pp. 3–16, 2004, doi: 10.1016/j.envpol.2003.08.031.
- [112] M. S. El-Shahawi, A. Hamza, A. S. Bashammakh, and W. T. Al-Saggaf, “An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants,” *Talanta*, vol. 80, no. 5, pp. 1587–1597, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2009.09.055.

- [113] O. M. L. Alharbi, A. A. Basheer, R. A. Khattab, and I. Ali, "Health and environmental effects of persistent organic pollutants," *J. Mol. Liq.*, vol. 263, pp. 442–453, 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.05.029.
- [114] L. Fitzgerald and D. S. Wikoff, "Persistent Organic Pollutants," in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, Third Edit.Elsevier, 2014, pp. 820–825. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00211-6.
- [115] R. Miniero and A. L. Iamiceli, "Persistent Organic Pollutants," in *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 2008, pp. 2672–2682. doi: 10.1016/B978-008045405-4.00421-3.
- [116] L. Ritter, K. . Solomon, and J. Forget, "Persistent Organic Pollutants - An Assessment Report on: DDT-Aldrin-Dieldrin-Endrin-Chlordane-Heptachlor-Heptachlorobenzene-Mirex-Tozapene-Polychlorinated Biphenyls-Dioxins and Furans," *Chemosphere*, p. 43 pp., 2011, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018961>
- [117] J. Jacob and J. Cherian, "Review of environmental and human exposure to persistent organic pollutants," *Asian Soc. Sci.*, vol. 9, no. 11, pp. 107–120, 2013, doi: 10.5539/ass.v9n11p107.
- [118] E. Webster, D. Mackay, and F. Wania, "Evaluating environmental persistence," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 17, 1998.
- [119] F. Wania, "Assessing the Potential of Persistent Organic Chemicals for Long-Range Transport and Accumulation in Polar Regions," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, no. 7, pp. 1344–1351, Apr. 2003, doi: 10.1021/es026019e.
- [120] "Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs) | UNECE." <https://unece.org/environment-policy/air/protocol-persistent-organic-pollutants-pops> (accessed Apr. 12, 2023).
- [121] "Stockholm Convention - Home page." <http://www.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx> (accessed Apr. 12, 2023).
- [122] IARC, "Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Biphenyls - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans," *POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND POLYBROMINATED BIPHENYLS - IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, vol. 107. pp. 9–500, 2016. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK361696/pdf/Bookshelf_NBK361696.pdf
- [123] K. Ballschmiter and M. Zell, "Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography," *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie*, vol. 302, no. 1, pp. 20–31, 1980, doi: 10.1007/BF00469758.
- [124] M. D. Erickson, *Analytical Chemistry of PCBs, Second Edition*. Taylor & Francis, 1997. [Online]. Available: https://books.google.it/books?id=xudEF%5C_ZYQ3kC
- [125] K. Breivik, A. Sweetman, J. M. Pacyna, and K. C. Jones, "Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners - A mass balance approach. 3. An update," *Sci. Total Environ.*, vol. 377, no. 2–3, pp. 296–307, 2007, doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.02.026.
- [126] K. Breivik, A. Sweetman, J. M. Pacyna, and K. C. Jones, "Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners--a mass balance approach. 2. Emissions.," *Sci. Total Environ.*, vol. 290, no. 1–3, pp. 199–224, May 2002, doi: 10.1016/S0048-9697(01)01076-2.
- [127] R. Eisler and A. A. Belisle, "Planar PCB hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review," 1996. doi: 10.1016/B978-0-12-398254-4.00001-7.
- [128] S. Safe, "Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of

- polychlorinated biphenyls: progress and problems.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 100, pp. 259–268, Apr. 1993, doi: 10.1289/ehp.93100259.
- [129] K. Ravindra, R. Sokhi, and R. Van Grieken, "Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation," *Atmos. Environ.*, vol. 42, no. 13, pp. 2895–2921, 2008, doi: 10.1016/j.atmosenv.2007.12.010.
- [130] H. I. Abdel-Shafy and M. S. M. Mansour, "A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation," *Egypt. J. Pet.*, vol. 25, no. 1, pp. 107–123, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- [131] R. Eisler, "Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review," 1987.
- [132] ATSDR, "Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS)," *ATSDR's Toxicological Profiles*, no. August. 2002. doi: 10.1201/9781420061888_ch127.
- [133] C. Näf, D. Broman, and B. Brunström, "Distribution and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) injected into eggs of chicken (*Gallus domesticus*) and common eider duck (*Somateria mollissima*)," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 11, no. 11, pp. 1653–1660, 1992, doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620111114>.
- [134] P. H. Albers, "Birds and polycyclic aromatic hydrocarbons," *Avian Poult. Biol. Rev.*, vol. 17, no. 4, pp. 125–140, 2006, [Online]. Available: <http://pubs.er.usgs.gov/publication/5224791>
- [135] L. A. Verbrugge, J. P. Giesy, D. A. Verbrugge, B. R. Woodin, and J. J. Stegeman, "Catalytic and immunochemical properties of hepatic cytochrome P450 1A in three avian species treated with beta-naphthoflavone or isosafrole.," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 130, no. 1, pp. 67–83, Sep. 2001, doi: 10.1016/s1532-0456(01)00221-6.
- [136] P. H. Becker, "Chapter 19 Biomonitoring with birds," in *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, 2003, pp. 677–736. doi: 10.1016/S0927-5215(03)80149-2.
- [137] H. G. Bauer and P. Berthold, *Die Brutvögel Mitteleuropas. Bestand und Gefährdung*. 1996.
- [138] R. W. Furness and J. J. D. Greenwood, *Birds as Monitors of Environmental Change*. 1993. doi: 10.2307/1521825.
- [139] I. Newton and J. Bogan, "Organochloride residues, eggshell thinning and hatching success in British sparrowhawks," 1974.
- [140] J. Koeman *et al.*, "Insecticides as a factor in the mortality of the sandwich tern (*Sterna sandvicensis*)," *Meded. Rijksfac. Landbouwwet. Gent.*, vol. 32, pp. 841–854, 1967.
- [141] J. Falandysz *et al.*, "Congener-specific analysis of polychlorinated biphenyls in white-tailed sea eagles *Haliaeetus albicilla* collected in Poland," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 26, no. 1, pp. 13–22, 1994, doi: 10.1007/BF00212788.
- [142] M. A. Mora, H. J. Auman, J. P. Ludwig, J. P. Giesy, D. A. Verbrugge, and M. E. Ludwig, "Polychlorinated biphenyls and chlorinated insecticides in plasma of Caspian terns: Relationships with age, productivity, and colony site tenacity in the great lakes," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 24, no. 3, pp. 320–331, 1993, doi: 10.1007/BF01128730.
- [143] R. W. Furness and K. Camphuysen, "Seabirds as monitors of the marine environment," *ICES J. Mar. Sci.*, vol. 54, no. 4, pp. 726–737, 1997, doi: 10.1006/jmsc.1997.0243.

- [144] G. Zimmermann, D. R. Dietrich, P. Schmid, and C. Schlatter, "Congener-specific bioaccumulation of PCBs in different water bird species," *Chemosphere*, vol. 34, no. 5–7, pp. 1379–1388, 1997, doi: 10.1016/S0045-6535(97)00435-9.
- [145] B. Conrad, "Zur Belastung der Vogelwelt der Bundesrepublik mit chlorierten Kohlenwasserstoffen und PCB," *Naturwissenschaften*, vol. 64, no. 1, pp. 43–44, 1977, doi: 10.1007/BF00439900.
- [146] S. Dietrich, A. Bütthe, E. Denker, and H. Hötter, "Organochlorines in Eggs and Food Organisms of Avocets (*Recurvirostra avosetta*)," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 58, no. 2, pp. 219–226, 1997, doi: 10.1007/s001289900323.
- [147] E. Denker, A. Bütthe, H. Knüwer, T. Langgemach, P. Lepom, and I. Rühling, "Vergleich der Schadstoffbelastung in Eiern des Sperbers (*Accipiter nisus*) aus Brandenburg und Nordrhein-Westfalen, Deutschland," *J. für Ornithol.*, vol. 142, no. 1, pp. 49–62, 2001, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0361.2000.00041.x>.
- [148] J. E. Botero, M. W. Meyer, S. S. Hurley, and D. H. Rusch, "Residues of organochlorines in mallards and blue-winged teal collected in Colombia and Wisconsin, 1984-1989," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 31, no. 2, pp. 225–231, 1996, doi: 10.1007/BF00212370.
- [149] D. T. F. Kuo *et al.*, "A Critical Review of Bioaccumulation and Biotransformation of Organic Chemicals in Birds," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 260, no. 1, pp. 1–55, 2022, doi: 10.1007/s44169-021-00007-1.
- [150] A. J. García-Fernández, "Ecotoxicology, Avian," in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 2014, pp. 289–294. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00496-6.
- [151] S. Winter and B. Streit, "Organochlorine compounds in a three-step terrestrial food chain," *Chemosphere*, vol. 24, no. 12, pp. 1765–1774, 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0045-6535(92)90231-F).
- [152] I. Newton, I. Wyllie, and A. Asher, "Long-term trends in organochlorine and mercury residues in some predatory birds in Britain," *Environ. Pollut.*, vol. 79, no. 2, pp. 143–151, 1993, doi: [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90064-U](https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90064-U).
- [153] D. P. Ryckman, D. V. Chip Weseloh, and C. A. Bishop, *Contaminants in Herring Gull Eggs from the Great Lakes: 25 Years of Monitoring Levels and Effects*. in Great Lakes fact sheet. Environment Canada, 1997. [Online]. Available: <https://books.google.it/books?id=iqxN3ohO4qkC>
- [154] D. P. Ryckman *et al.*, "Spatial and Temporal Trends in Organochlorine Contamination and Bill Deformities in Double-Crested Cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Canadian Great Lakes," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 53, no. 1, pp. 169–195, 1998, doi: 10.1023/A:1006088130262.
- [155] R. Yamashita *et al.*, "Global Monitoring of Persistent Organic Pollutants (POPs) Using Seabird Preen Gland Oil," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 75, no. 4, pp. 545–556, 2018, doi: 10.1007/s00244-018-0557-3.
- [156] A. D. Pacyna-Kuchta, "What should we know when choosing feather, blood, egg or preen oil as biological samples for contaminants detection? A non-lethal approach to bird sampling for PCBs, OCPs, PBDEs and PFASs," *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–25, 2022, doi: 10.1080/10643389.2022.2077077.
- [157] N. Briels *et al.*, "Integrated exposure assessment of northern goshawk (*Accipiter gentilis*) nestlings to legacy and emerging organic pollutants using non-destructive samples," *Environ. Res.*, vol. 178, no. August, p. 108678, 2019, doi: 10.1016/j.envres.2019.108678.
- [158] H. B. Ginn, D. S. Melville, and B. T. for Ornithology, *Moult in Birds*. in BTO guide. British Trust for Ornithology, 1983. [Online]. Available: <https://books.google.it/books?id=Sd9FAAAAYAAJ>

- [159] J. Jacob and D. E. Pomeroy, "The feather lipids of the marabou stork (*Leptoptilos crumeniferus*)," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*, vol. 64, no. 3, pp. 301–303, 1979, doi: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90148-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(79)90148-2).
- [160] A. BOLLIGER and D. VARGA, "Feather Lipids," *Nature*, vol. 190, no. 4781, p. 1125, 1961, doi: [10.1038/1901125a0](https://doi.org/10.1038/1901125a0).
- [161] I. Eulaers *et al.*, "A comparison of non-destructive sampling strategies to assess the exposure of white-tailed eagle nestlings (*Haliaeetus albicilla*) to persistent organic pollutants," *Sci. Total Environ.*, vol. 410–411, pp. 258–265, 2011, doi: [10.1016/j.scitotenv.2011.09.070](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.070).
- [162] V. L. B. Jaspers, A. Covaci, P. Deleu, H. Neels, and M. Eens, "Preen oil as the main source of external contamination with organic pollutants onto feathers of the common magpie (*Pica pica*)," *Environ. Int.*, vol. 34, no. 6, pp. 741–748, 2008, doi: [10.1016/j.envint.2007.12.002](https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.12.002).
- [163] E. Van den Steen *et al.*, "Experimental evaluation of the usefulness of feathers as a non-destructive biomonitor for polychlorinated biphenyls (PCBs) using silastic implants as a novel method of exposure," *Environ. Int.*, vol. 33, no. 2, pp. 257–264, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.09.018>.
- [164] N. B. Svendsen, D. Herzke, M. Harju, C. Bech, G. W. Gabrielsen, and V. L. B. Jaspers, "Persistent organic pollutants and organophosphate esters in feathers and blood plasma of adult kittiwakes (*Rissa tridactyla*) from Svalbard – associations with body condition and thyroid hormones," *Environ. Res.*, vol. 164, pp. 158–164, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.012>.
- [165] V. Jaspers, A. Covaci, D. Herzke, I. Eulaers, and M. Eens, "Bird feathers as a biomonitor for environmental pollutants: Prospects and pitfalls," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 118, 2019, doi: [10.1016/j.trac.2019.05.019](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.019).
- [166] S. A. Solheim, K. Sagerup, S. Huber, I. Byrkjedal, and G. W. Gabrielsen, "The black-legged kittiwake preen gland - An overlooked organ for depuration of fat-soluble contaminants?," *Polar Res.*, vol. 35, no. 2016, pp. 1–11, 2016, doi: [10.3402/polar.v35.29651](https://doi.org/10.3402/polar.v35.29651).
- [167] P. Busse and W. Meissner, *Bird Ringing Station Manual*. 2015. doi: [10.2478/9788376560533](https://doi.org/10.2478/9788376560533).
- [168] J. B. Mouronval, O. Thibault, and M. Guillemain, *Guide to the Age and Sex of European Ducks*. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, 2016. [Online]. Available: <https://books.google.it/books?id=4GfftwEACAAJ>
- [169] K. Urbanová, V. Vrkoslav, I. Valterová, M. Háková, and J. Cvačka, "Structural characterization of wax esters by electron ionization mass spectrometry," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 204–213, 2012, doi: [10.1194/jlr.D020834](https://doi.org/10.1194/jlr.D020834).
- [170] A. J. Aasen, H. H. Hofstetter, B. T. R. Iyengar, and R. T. Holman, "Identification and analysis of wax esters by mass spectrometry," *Lipids*, vol. 6, no. 7, pp. 502–507, 1971, doi: [10.1007/BF02531236](https://doi.org/10.1007/BF02531236).
- [171] A. G. Douglas, M. Blumer, G. Eglinton, and K. Douraghi-Zadeh, "Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of naturally-occurring acyclic isoprenoid carboxylic acids," *Tetrahedron*, vol. 27, no. 6, pp. 1071–1092, 1971, doi: [10.1016/S0040-4020\(01\)90855-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90855-5).
- [172] A. K. Lough, "The chemistry and biochemistry of phtanic, pristanic and related acids," 1972.
- [173] J. M. B. Apon and N. Nicolaidis, "Determination of the Position Isomers of the Methyl Branched Fatty Acid Methyl Esters By Capillary Gc/Ms.," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 13, no. 10, pp. 467–473, 1975, doi: [10.1093/chromsci/13.10.467](https://doi.org/10.1093/chromsci/13.10.467).

- [174] R. R. Ran-Ressler, P. Lawrence, and J. T. Brenna, "Structural characterization of saturated branched chain fatty acid methyl esters by collisional dissociation of molecular ions generated by electron ionization," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 195–203, 2012, doi: 10.1194/jlr.D020651.
- [175] R. A. Friedel, J. L. Shultz, and A. G. Sharkey, "Mass Spectra of Alcohols," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 6, pp. 926–934, 1956, doi: 10.1021/ac60114a002.
- [176] L. Stevens, *Avian Biochemistry*. 1996. doi: 10.1017/CBO9780511525773.
- [177] J. K. Jensen, C. Isaksson, C. Eikenaar, and M. N. Andersson, "Migrant blackbirds, *Turdus merula*, have higher plasma levels of polyunsaturated fatty acids compared to residents, but not enhanced fatty acid unsaturation index.," *Ecol. Evol.*, vol. 10, no. 18, pp. 10196–10206, Sep. 2020, doi: 10.1002/ece3.6681.
- [178] B. J. Pierce and S. R. McWilliams, "Seasonal Changes in Composition of Lipid Stores in Migratory Birds : Causes and Consequences," vol. 107, no. 2, pp. 269–279, 2005.
- [179] K. M. Phillips, D. M. Ruggio, and M. Ashraf-Khorassani, "Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 24, pp. 9436–9445, Nov. 2005, doi: 10.1021/jf051505h.
- [180] S. J. Taipale, M. Hiltunen, K. Vuorio, and E. Peltomaa, "Suitability of Phytosterols Alongside Fatty Acids as Chemotaxonomic Biomarkers for Phytoplankton.," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, p. 212, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00212.
- [181] G. Lopes, C. Sousa, P. Valentão, and P. B. Andrade, "Sterols in Algae and Health," *Bioact. Compd. from Mar. Foods Plant Anim. Sources*, pp. 173–191, 2013, doi: 10.1002/9781118412893.ch9.
- [182] L. Saavedra, R. A. Quiñones, and J. Becerra, "Distribution and sources of phytosterols in coastal and river sediments of south-central Chile," *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, vol. 42, no. 1, pp. 61–84, 2014, doi: 10.3856/vol42-issue1-fulltext-5.
- [183] I. D. Bull, M. J. Lockheart, M. M. Elhmmali, D. J. Roberts, and R. P. Evershed, "The origin of faeces by means of biomarker detection.," *Environ. Int.*, vol. 27, no. 8, pp. 647–654, Mar. 2002, doi: 10.1016/s0160-4120(01)00124-6.
- [184] R. Yamashita, H. Takada, M. Murakami, M. A. Fukuwaka, and Y. Watanuki, "Evaluation of noninvasive approach for monitoring PCB pollution of seabirds using preen gland oil," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 14, pp. 4901–4906, 2007, doi: 10.1021/es0701863.

Appendice

Tabella A1 Concentrazioni degli standard interni (con le aggiunte ai campioni) e dei fattori di risposta utilizzati

Tipo	Nome	Concentrazione	Aggiunta ai campioni (μL)
Standard interno	^{13}C -PAH mix	1 ng/ μL	50
Standard interno	^{13}C -PCB mix	50 pg/ μL	50
Standard interno	^{13}C -Chl 25-26-27	20 ng/ μL	20
Standard interno	^{13}C -C18	112 ng/ μL	50
Fattore di risposta	FR PAH	100 pg/ μL	
Fattore di risposta	FR PCB	5 pg/ μL	
Fattore di risposta	FR Chl 25-26-27	1 ng/ μL	
Fattore di risposta	FR FAME	50 ng/ μL (C6-C11) e 25 ng/ μL (<C12)	

Tabella A2 Masse utilizzate per la determinazione dei FAME

Composto	m/z (*=ione di quantificazione)
Acido esanoico (C6)	99*-130
2,4-dimetil C6	129*-158
Acido eptanoico+2-4-dimetil C6	101*-144
2,4-dimetil C7	129*-172
Acido ottanoico (C8)	129*-158
Acido nonanoico (C9)	129-172*
Acido decanoico (C10)	143*-186
Acido undecanoico (C11)	157*-200
Acido dodecanoico (C12)	171*-214
Acido tridecanoico (C13)	185-228*
Acido tetradecanoico (C14)	214-242*
Acido pentadecanoico (C15)	213-256*
Acido palmitoleico	236*-268
Acido esadecanoico (C16)	227*-270
Acido eptadecanoico (C17)	241*-284
Acido linoleico	263*-294
Acido oleico	264-296*
Acido linolenico	236-292*
Acido elaidico+petroselinico	264*-296
Acido ottadecanoico marcato (*C18)	270*-316
Acido ottadecanoico (C18)	255*-298
Acido nonadecanoico (C19)	269*-312
Acido eicosatetraenoico	203*-220-318
Acido eicosanoico (C20)	283*-326
Acido eneicosanoico (C21)	297*-340
Acido erucico	320*-352
Acido dodecosanoico (C22)	311*-354
Acido tricosanoico (C23)	325*-368

Acido nervonico	348*-380
Acido tetracosanoico (C24)	339*-382

Tabella A3 Masse utilizzate per la determinazione degli steroli. Lo ione di quantificazione varia tra i campioni, a seconda dell'intensità dell'interferenza, calcolata sulla base dei rapporti con lo standard interno e confrontati coi fattori di risposta

Composto	m/z
Coprostanolo	215-370
Epi-coprostanolo	215-370
Colesterolo	329-368
Colestanolo	215-445
Colestanone	316-386
24-etil-coprostanolo	215-398
24-etil-epi-coprostanolo	215-398
Campesterolo	343-382
Stigmasterolo	394-484
β -Sitosterolo	357-396
Stigmastanolo	215-473
¹³ C-Cholesterol	332-371

Tabella A4 Masse utilizzate per la determinazione degli IPA

Composto	m/z ione precursore	m/z ione prodotto
Naftalene	128	77.7, 102, 126.9
Acenaftilene	151.9	101.9, 125.8, 150
Acenaftene	152.8, 154.1	152.2, 152.4, 153.1
Fluorene	165, 166.1	163, 115, 165.1
Antracene	176, 178	149.9, 151, 151.7
Fenantrene	176, 178	149.9, 150.9, 151.6
¹³ C-Fenantrene	184	157, 158
Fluorantene	202, 203.2	152.1, 200, 201.1
Pirene	202.1, 203.3	198.6, 200, 201
Retene	234	202.9, 219.1
Benzo[a]antracene	225.9, 228, 229.2	224.1, 226, 227.1
Crisene	225.9, 229.2	200, 223.9, 227.1
Benzo[b]fluorantene	126.1, 250, 252.1	113, 248.3, 250.1
Benzo[k]fluorantene	252.1	248, 226.1, 250
Benzo[e]pirene	252.1, 253.3	250, 251.1
Benzo[a]pirene	250, 252.1, 253.3	248, 250, 251.1
¹³ C-Benzo[a]pirene	256, 257	254, 255
Perilene	252.1, 253.3	250, 251.1
Dibenzo[ah]antracene	276, 278.1	274, 275.1, 276
Indeno[1,2,3-cd]pirene	138.1, 274, 276.1	124.6, 272, 274
Benzo[ghi]perilene	137.7, 276.1	136.8, 274.1, 274.6

Tabella A5 Masse utilizzate per la determinazione dei PCB

Classe di omologhi	m/z ione precursore	m/z ione prodotto
Mono-CB	188.1	152.3, 153.1
Di-CB	222.1, 224.1	152
Tri-CB	256, 258	186
¹³ C-Tri-CB	268, 270	198
Tetra-CB	220, 255, 290	150, 220, 220
¹³ C-Tetra-CB	267, 302	232, 232
Penta-CB	323.9, 326	254, 256
¹³ C-Penta-CB	335.9, 338	266, 268
Hexa-CB	290, 292, 359.9	220, 289.9
¹³ C-Hexa-CB	302, 371.9	232, 301.9
Hepta-CB	393.9, 395.9	323.8, 323.8
¹³ C-Hepta-CB	405.9, 407.9	335.8, 335.8
Octa-CB	427.8, 429.8	357.7, 359.8
¹³ C-Octa-CB	439.8, 441.8	369.7, 371.7
Nona-CB	461.8, 463.8	391.7, 393.7
¹³ C-Nona-CB	473.8, 475.8	403.7, 405.7
Deca-CB	495.8, 497.8	425.7, 427.6
¹³ C-Deca-CB	507.8, 509.8	437.7, 439.6