



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

“Assorbimento e Traslocazione di ritardanti di fiamma bromurati classici (PBDE) ed emergenti (NBFR) da parte di piante di pomodoro esposte a suoli contaminati: applicazione di RHIZOtest™ modificato”

Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
Venezia 30123

Relatore

Prof. Rossano Piazza

Correlatori

Dott. Tiziano Bonato

Dott. Giovanni Beggio

Laureando

Luca Laudati

859700

Anno Accademico

2021/2022

Curiosità e Passione

Indice

PREMESSA ED OBIETTIVI	- 1 -
1. INTRODUZIONE	- 3 -
1.1 Inquinanti organici persistenti (POPs).....	- 3 -
1.2 Ritardanti di Fiamma: i Polibromodifenileteri (PBDE)	- 5 -
1.2.1 Funzione e Struttura.....	- 5 -
1.2.2 Produzione ed Usi.....	- 7 -
1.2.3 Politica Regolamentare Europea	- 11 -
1.3 Inquinanti Emergenti	- 11 -
1.4 Ritardanti di Fiamma Nuovi o Emergenti (NBFR o EBFR).....	- 12 -
1.5 Origine e Destino Ambientale.....	- 14 -
1.5.1 Produzione.....	- 14 -
1.5.2 Destino Ambientale	- 15 -
1.5.3 Aria.....	- 18 -
1.5.4 Acqua	- 20 -
1.5.5 Suolo	- 22 -
1.6 Tossicità	- 25 -
1.6.1 Fattore di Bioconcentrazione (BCF).....	- 27 -
1.7 Degradazione dei Ritardanti di Fiamma Bromurati	- 29 -
1.7.1 Fotodegradazione.....	- 29 -
1.7.2 Degradazione Termica	- 31 -
1.7.3 Biodegradazione e Biotrasformazione	- 32 -
1.7.3.1 Microorganismi.....	- 33 -
1.7.3.2 Piante.....	- 34 -
1.7.3.3 Pesci.....	- 36 -
1.7.3.4 Uccelli	- 37 -
1.7.3.5 Mammiferi.....	- 38 -
1.8 Assorbimento Vegetale.....	- 40 -
1.8.1 Stato dell'arte della Ricerca.....	- 46 -
1.9 RHIZOtest™ e ISO 16198:2015	- 53 -
1.10 Scopo della Tesi	- 56 -
2. MATERIALI E METODI	- 57 -
2.1 Pianificazione Sperimentale	- 58 -
2.2 Strumentazione utilizzata nel Metodo ISO16198:2015	- 62 -
2.3 Descrizione del procedimento secondo ISO 16198:2015 modificato	- 63 -

2.3.1 Preparazione dei terreni.....	- 63 -
2.3.2 Contaminazione dei suoli con i ritardanti di fiamma bromurati	- 67 -
2.3.3 Fase di Germinazione	- 68 -
2.3.4 Fase di Crescita idroponica.....	- 70 -
2.3.5 Fase di Pre-esposizione: caricamento dei terreni.	- 72 -
2.3.6 Fase di Esposizione e Raccolta dei bianchi di pre-esposizione.....	- 73 -
2.3.7 Fase di Raccolta e Conservazione dei campioni	- 76 -
2.4 Metodologia Analitica: Trattamento del campione	- 77 -
2.4.1. Omogeneizzazione del Campione	- 77 -
2.4.2 Estrazione in bagno ad ultrasuoni	- 78 -
2.4.3 Purificazione	- 79 -
2.4.3.1 Purificazione liquido-liquido: trattamento acido con imbuto separatore	- 79 -
2.4.3.2 Colonna Cromatografica Impaccata	- 79 -
2.4.3.3 Cromatografia ad esclusione dimensionale (GPC)	- 80 -
2.4.4 Riduzione del Volume e concentrazione finale	- 81 -
2.4.4.1 Rotavapor	- 81 -
2.4.4.2 Riduttore ad Azoto	- 82 -
2.4.5 Procedura analitica per la determinazione di PBDEs e NBFRs	- 83 -
2.5 Analisi Strumentale	- 86 -
2.5.1 GC-MS singolo quadrupolo.....	- 87 -
2.5.2. GC-MS/MS a triplo quadrupolo	- 89 -
2.5.3 Condizioni operative di analisi.....	- 91 -
2.6 Quantificazione	- 92 -
2.6.1 MDL e MQL.....	- 94 -
2.6.2 Qualità del Dato.....	- 95 -
3. RISULTATI e DISCUSSIONE	- 98 -
3.1 Pesetti secchi delle piante	- 98 -
3.2 Assorbimento di PBDE e NBFR nelle piante di Pomodoro esposte	- 99 -
3.2.1 Concentrazioni nei Suoli	- 100 -
3.2.2 Concentrazioni nella Pianta	- 102 -
3.2.3 Concentrazioni nelle Radici	- 104 -
3.3 Fattore di Bioconcentrazione (BCF) e di Traslocazione (TF).	- 107 -
3.3.1 Fattore di Bioconcentrazione	- 108 -
3.3.2 Traslocazione dei ritardanti di fiamma dalle radici ai germogli e fattore di traslocazione (TF) .	- 111 -
4. CONCLUSIONI	- 117 -
5. BIBLIOGRAFIA	- 118 -

6. INDICI	- 132 -
6.1 Indice delle figure	- 132 -
6.2 indice delle tabelle	- 134 -
Ringraziamenti	- 136 -

PREMESSA ED OBIETTIVI

I ritardanti di fiamma bromurati (BFR) sono stati prodotti e(d) utilizzati a partire dagli anni '60; grazie a essi si è attuato un avanzamento sul fronte della sicurezza, ad esempio per ridurre il rischio di incendio e l'infiammabilità dei prodotti di consumo e industriali (Van Der Veen, 2012).

Questi composti sono stati sintetizzati su larga scala e ampiamente sfruttati in tutto il mondo, tanto che sono stati rinvenuti in diverse matrici ambientali (acqua, aria, terra), accumulati negli organismi vegetali, nella fauna selvatica e nell'uomo. Alla fine degli anni '90, a causa delle forti preoccupazioni dovute alla vasta diffusione di composti chimici pericolosi in ambiente, la comunità scientifica iniziò ad approfondire lo studio e la comprensione delle dinamiche legate al rilascio e propagazione di tali sostanze alogenate. Grazie ai risultati di queste ricerche e in seguito alla firma della Convenzione Internazionale di Stoccolma (2004), i BFRs furono inseriti nella lista degli "Inquinanti Organici Persistenti" (POPs). In questa lista, in particolare, nel 2009 sono stati introdotti i ritardanti di fiamma bromurati appartenenti alla classe dei Polibromo Difenileteri (PBDE), considerata la loro grande diffusione ambientale, l'accertata persistenza, la capacità di bioaccumulo e le potenziali capacità neurotossiche (Jones, 2021).

Nonostante la messa al bando della produzione e dell'utilizzo di questa classe di composti, essi si presentano tutt'ora in ambiente. Ciò avviene a causa del rilascio costante dovuto allo smaltimento di vecchie apparecchiature elettriche, elettrodomestici e alla degradazione di materiali plastici, da cui si disperdono a lungo raggio in atmosfera (Gascon *et al.*, 2012).

Per questi motivi i PBDE rappresentano una concreta minaccia per la salute umana e per gli ecosistemi. Negli ultimi decenni, dopo che sono stati banditi dal commercio europeo e statunitense, la ricerca si è concentrata nella produzione di nuove molecole che potessero sostituire i polibromo difenileteri. Nel 2011 sono così stati definiti come "Nuovi Ritardanti di Fiamma Bromurati (NBFR) o Emergenti (EBFR), tutti i ritardanti di fiamma diversi da PBDE e/o nuovamente ritrovati in ambiente, laddove prima non ve ne era traccia" (Covaci *et al.*, 2011).

Vista la recente introduzione dei NBFRs in sostituzione dei ritardanti di fiamma bromurati "classici", l'attuale conoscenza relativa al destino ambientale, ai possibili effetti negativi, ai rischi per il regno vegetale, animale e per la salute umana non è del tutto esaustiva. Infatti, ci sono molte lacune nella

nostra comprensione sull'impatto di questi composti sull'ambiente e di come valutare, prevedere e gestire con precisione i rischi associati.

Da questo presupposto lo studio di Tesi vuole proporre una ricerca basata sull'applicazione di un nuovo metodo per la valutazione della bioconcentrazione di PBDE e ritardanti di fiamma emergenti (NBFR) nella pianta di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) esposta a un suolo contaminato (*uptake*).

L'obiettivo, è quello di studiare l'*uptake* di BFRs da parte di una pianta molto diffusa in orticoltura, seguendo quanto indicato dalla norma standard internazionale ISO 16198:2015. La metodologia, che prevede l'impiego di RHIZOtest™, è stata modificata per estendere l'applicabilità del metodo allo studio di assorbimento di microinquinanti organici.

Quindi, lo scopo finale è quello di analizzare la distribuzione interna di BFRs nella pianta di pomodoro applicando un metodo standard modificato appositamente per questo tipo di indagini, fornendo risultati riproducibili, ripetibili e confrontabili tra diversi laboratori e tipologia di ortaggi ad interesse alimentare, laddove studi di *uptake* vegetale di questo genere ancora non presentano condizioni standardizzate.

1. INTRODUZIONE

1.1 Inquinanti organici persistenti (POPs)

Le sostanze chimiche definite come Inquinanti Organici Persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, *POPs*) sono delle classi di composti che, a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche, sono in grado di avere importanti effetti tossici e di persistere fortemente in ambiente, mostrandosi resistenti alla degradazione. Queste caratteristiche, unite all'evidente dispersione a lungo raggio, li ha resi composti inquinanti ubiquitari, distribuiti in tutto il globo, rappresentando una vera e propria minaccia per la salute umana e l'ambiente (WHO, 2003). La caratteristica chimica principale, motivo della loro pericolosità, è la spiccata lipofilità, indicata dalla costante di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}). Questo parametro è indice della capacità di legarsi ed essere trattenuti nei lipidi. In particolare si riscontrano fenomeni di bioaccumulo nei tessuti grassi vegetali e animali, cosicché dai primi livelli della catena trofica si assiste a fenomeni di biomagnificazione, fino all'uomo. Infatti, dalla dispersione in ambiente e dall'accumulo negli organismi viventi, sono state trovate tracce anche nel sangue umano e nel latte materno. Questi composti nell'uomo possono causare gravi danni come sterilità, insorgenza di tumori e di disturbi a livello endocrino (McComb *et al.*, 2019).

La produzione di queste molecole è iniziata con lo sviluppo del settore chimico-industriale a partire dagli anni '20 del XX secolo. Esse sono state impiegate largamente fino agli anni '70. Dal punto di vista legislativo i primi provvedimenti risalgono al 1979 con la Convenzione Nazionale di Ginevra sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero (*CLRTAP*) della Commissione per l'Europa delle Nazioni Unite (*UNECE*). I paesi partecipanti concordarono che l'inquinamento transfrontaliero a lunga distanza avesse ripercussioni negative sull'ambiente; si impegnarono quindi alla lotta contro le emissioni in atmosfera, alla costruzione di una rete di osservazione europea e all'implementazione dei temi sugli inquinanti persistenti. A partire dalla Convenzione furono redatti diversi protocolli. Il più importante è quello del 1998 relativo ai metalli pesanti e ai POPs; in esso viene redatta una lista con 16 sostanze prioritarie pericolose, al fine di eliminarne il rilascio in ambiente. Vengono banditi la produzione e l'impiego di alcuni composti come esabromobifenile, aldrin, dieldrin e toxafene. Viene stabilita la riduzione delle emissioni di diossine, furani, IPA e cloro-benzoni ed infine sono state definite le linee guida sulla gestione e lo smaltimento di rifiuti contaminati da sostanze pericolose (UNECE, 1998). Nel 1995, però, il consiglio direttivo dell'UNEP aveva già identificato una lista specifica

di dodici POPs prioritari che più di tutti destavano preoccupazioni per ambiente e uomo, mostrata in figura 1. Si tratta di pesticidi, prodotti chimici industriali e sottoprodotti (UNEP, 1999).

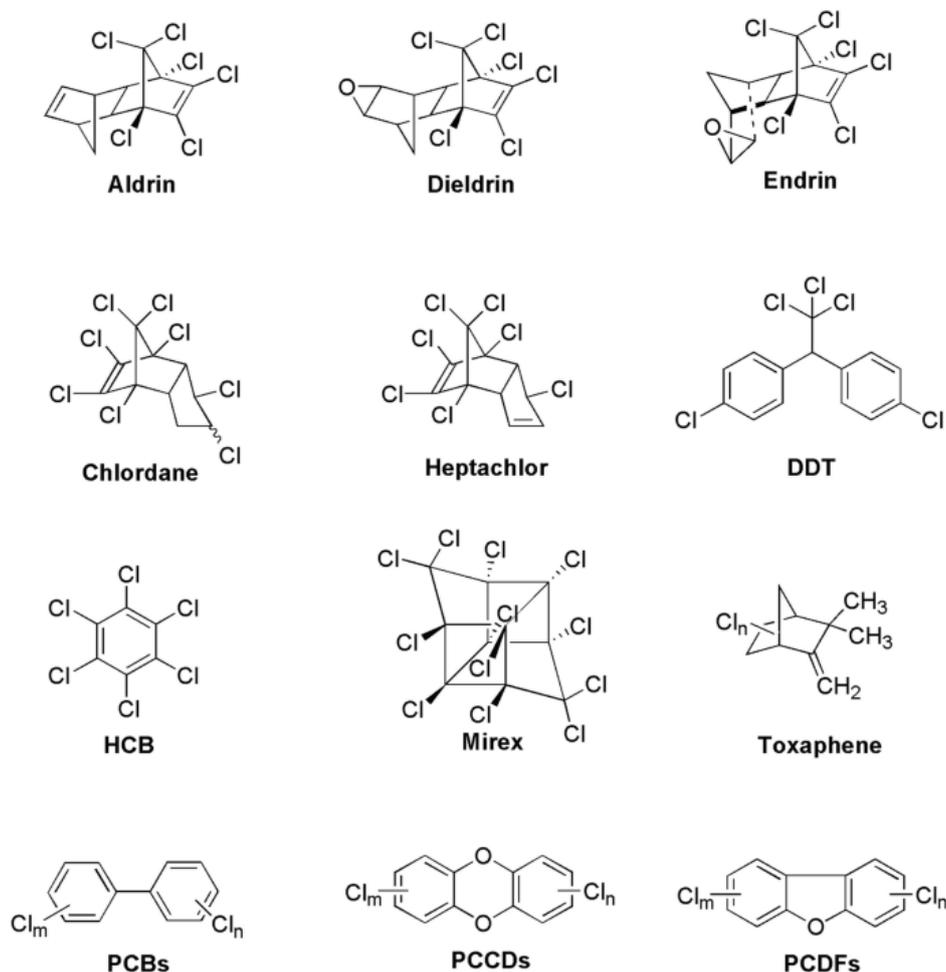


Figura 1: 12 POPs identificati nel 1995

Successivamente, nel 2001, con la Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti persistenti, vengono introdotti 9 nuovi composti prioritari tra cui i PBDE. La Convenzione determina anche alcune caratteristiche che servono all'identificazione e l'aggiunta di nuove sostanze alla categoria dei POPs, ovvero: forte persistenza in ambiente, spiccata capacità di bioaccumulo e tossicità provata (SSDAE, 2021). In questo studio di Tesi saranno quindi analizzati inquinanti organici persistenti della famiglia dei ritardanti di fiamma, quali Polibromo Difenil eteri (PBDE) e molecole appartenenti ai nuovi ritardanti di fiamma bromurati (NBFR), che dal 2011, sono stati riconosciuti anch'essi come composti nocivi e pericolosi per la salute umana e per l'ambiente.

1.2 Ritardanti di Fiamma: i Polibromodifenileteri (PBDE)

1.2.1 Funzione e Struttura

I Polibromodifenileteri (PBDE) sono una categoria di composti antropogenici appartenenti alla classe dei ritardanti di fiamma bromurati (BFR). Sono impiegati per ridurre l'infiammabilità e inibire la combustione di una vasta gamma di materiali. Si trovano infatti incorporati come additivi chimici all'interno di componenti elettrici, nei materiali plastici, schiume poliuretaniche, polimeri industriali, articoli tessili, nelle automobili, televisori, computer e altri dispositivi elettronici (Bemporad *et al.*, 2020). L'attività dei ritardanti di fiamma in fase gassosa comporta interferenze con il processo di combustione, con conseguente riduzione della propagazione della fiamma e della quantità di calore restituita ai materiali. Il principale meccanismo che porta all'inibizione della propagazione della fiamma è conosciuto come "gas phase". Questo prevede la formazione di un gas acido per riscaldamento del materiale contenente i ritardanti di fiamma. Tale gas diluisce i vapori generati dal fuoco e provoca l'estinzione chimica dei radicali attivi. L'effetto diluizione quindi si riferisce al rilascio di vapori non combustibili, che diminuiscono la quantità di ossigeno alla fiamma e la concentrazione di carburante sotto il limite di infiammabilità. La reazione radicalica innescata dalla combustione provoca la decomposizione del ritardante di fiamma in specie che intrappolano ed estinguono il più dei radicali $\bullet\text{OH}$ e $\text{H}\bullet$ attivi nella propagazione della catena della combustione, come mostrato nella seguente figura (Salmeia *et al.*, 2015)

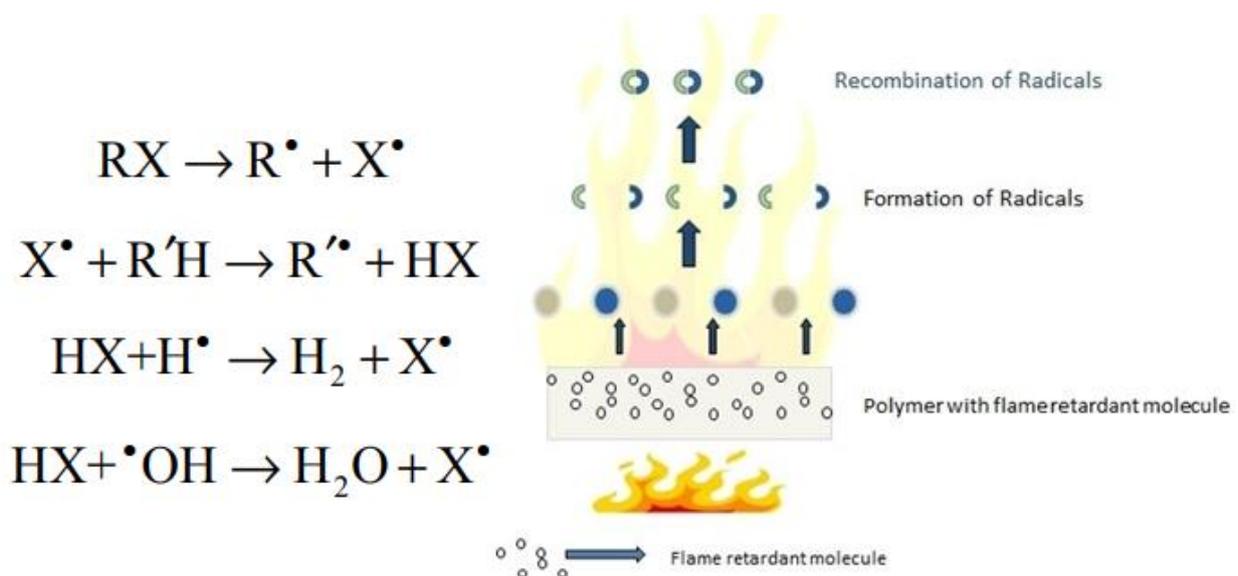


Figura 2: Equazione e Meccanismo di inibizione della combustione (Salmeia *et al.*, 2015)

Dal punto di vista chimico i Polibromo Difenileteri sono idrocarburi aromatici bromurati, caratterizzati dalla presenza di atomi di bromo legati a un doppio anello aromatico (difenile), collegati a loro volta da un ponte etereo, come mostrato in figura 3. Hanno formula chimica generale $C_{12}H_{(10-x)}Br_xO$. Sono composti termicamente stabili, con alte temperature di ebollizione, basse tensioni di vapore, scarsa solubilità in acqua ed elevata affinità con i lipidi.

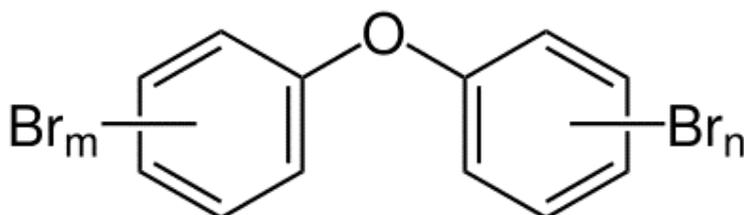


Figura 3: Struttura molecolare generale dei PBDEs

Questi composti possono avere fino a dieci atomi di Bromo (Br), in sostituzione agli atomi di Idrogeno (H). Questo fa sì che tale famiglia sia composta da 209 congeneri, riportati in tabella 1. La nomenclatura riprende quella proposta da Ballschmiter e Zell (1980), successivamente adottata da IUPAC, per i PCB, identificando i congeneri con un numero progressivo da 1 a 209, dai mono-bromurati fino al deca-bromurato. Quindi più semplicemente la nomenclatura IUPAC li riporta utilizzando un numero che serve ad identificarli, in base agli atomi di Br legati al difeniletere. La produzione più massiccia è associata ai congeneri con tre gradi di bromurazione, ovvero i Penta-BDE, Octa- e DecaBDE.

Tabella 1: i 209 congeneri della famiglia dei PBDE (INAIL, 2020)

Formula Bruta	Nome	Numero di Isomeri	Numero IUPAC	MM (g mol ⁻¹)	% di Bromo
C ₁₂ H ₉ BrO	<i>mono</i> -BDE	3	1-3	249.0	32.1
C ₁₂ H ₈ Br ₂ O	<i>di</i> - BDE	12	4-15	327.8	48.7
C ₁₂ H ₇ Br ₃ O	<i>tri</i> - BDE	24	16-39	406.8	58.9
C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	<i>tetra</i> - BDE	42	40-81	485.7	65.8
C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	<i>penta</i> - BDE	46	82-127	564.6	70.8
C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	<i>esa</i> - BDE	42	128-169	643.5	74.5
C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	<i>epta</i> - BDE	24	170-193	722.4	77.4
C ₁₂ H ₂ Br ₈ O	<i>octa</i> - BDE	12	194-205	801.3	79.8
C ₁₂ HBr ₉ O	<i>nona</i> - BDE	3	206-208	880.1	81.7
C ₁₂ Br ₁₀ O	<i>deca</i> - BDE	1	209	959.0	83.3

I PBDE presentano un'alta resistenza alla degradazione fisica, chimica, termica e biologica. Hanno punti di ebollizione compresi tra 300 e 425 °C e la pressione di vapore molto bassa a temperatura ambiente. La solubilità in acqua è molto limitata e hanno uno spiccato carattere lipofilo, infatti assumono valori del logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (log *K_{ow}*) compresi tra 4.5 e 10. Le caratteristiche chimico-fisiche di queste molecole le rendono fortemente adatte al bioaccumulo e all'amplificazione lungo tutta la catena trofica, specialmente in quella acquatica (ATSDR, 2004).

1.2.2 Produzione ed Usi

La produzione commerciale dei Polibromo Difenileteri risale al 1976. La sintesi industriale si basa sulla reazione chimica tra il bromo e il difeniletere (o difenilossido) con la presenza di un catalizzatore inorganico di Friedel-Crafts, come AlCl₃. La quantità di bromo aggiunta e il tempo di reazione controllano il grado di bromurazione che possono raggiungere le molecole di difeniletere (ATSDR, 2004). Le formulazioni commerciali sono miscele di congeneri di PBDE conosciute come penta-, octa- e decaBDE e hanno un contenuto di bromo crescente rispettivamente pari al 71%, 79% e 83% (EU, 2003). Le composizioni delle tre miscele commerciali sono le seguenti:

- PentaBDE: BDE-99 (35-50%), BDE-47 (25-37%), BDE-100 (6-10%), BDE-153 (3-5%) e BDE-154 (2-4%). La formulazione pentaBDE è dominata da penta-BDE (50-62%) e tetra-BDE (24-38%), con esa-BDE pari solo al 4-12% della massa totale.
- OctaBDE: BDE-183 (40%), BDE-197 (21%), BDE-203 (5-35%), BDE-196 (8%), BDE-208 (10%), BDE-207 (7%), BDE-153 (5-10%), BDE-154 (1-5%), BDE-209 (non rilevato fino al 3%) e BDE-190 (1%). I diversi omologhi esa-, epta-, octa- e nona-BDE dominano le formulazioni commerciali di octa-BDE, rispettivamente per il 10-12%, 43-58%, 26-35% e 8-14% del contenuto totale di BDE
- DecaBDE: il 97,5% della formulazione è composto da BDE-209, mentre il resto è BDE-206 (2,2%), BDE-207 (0,24%) e BDE-208 (0,06%). BDE-209 è quindi il congenere dominante della formulazione.

Di seguito, in tabella 2, è mostrato uno schema della composizione delle tre miscele di PBDE più largamente diffuse in tutto il mondo.

Tabella 2: Composizione percentuale delle miscele commerciali PBDE (INAIL, 2020)

Miscele commerciali	% in peso dei gruppi di congeneri PBDE						
	tetraBDE	pentaBDE	esaBDE	eptaBDE	octaBDE	nonaBDE	decaBDE
c-pentaBDE	24-38	50-62	4-12	tracce			
c-octaBDE		0,5	12	45	33	10	0,7
c-decaBDE					tracce	0,3-3	97-98

Le principali compagnie che si occupavano della produzione e vendita delle miscele di PBDE erano la *Dead Sea Bromine Group (DSBG)*, in Israele, acquistata dalla *ICL Industrial Product*, compagnia americana, nel 2005 e la *Great Lakes Chemical Corporation*, compagnia statunitense che vendeva i prodotti commerciali sotto il nome di *Firemaster* (Birnbaum, 2006). Non ci sono dati diretti sulla quantità prodotta di PBDE, ma l'industria riporta i dati relativi alla domanda di mercato per le formulazioni commerciali, che possono essere tradotte in volumi di quantità prodotta. Nel 1999 la domanda di mercato mondiale per le formulazioni deca-, octa- e pentaBDE era rispettivamente di 54'800, 3'825 e 8'500 tonnellate (BSEF, 2000).

Nel 2001, la domanda di mercato della formulazione decaBDE era pari a 24'500 tonnellate, solo in America, la ripartizione della domanda del mercato di deca-, penta- e octaBDE è stata rispettivamente del 74%, 21,5% e 4,5%. I due terzi di tutte le miscele decaBDE prodotte a livello

globale sono stati consumati in Nord America e in Asia (Hites, 2004). La seguente tabella mostra la produzione mondiale di BFRs, espressa in migliaia di tonnellate, negli anni 1989, 1994 e 1999 (Alaee et al., 2003)

Tabella 3: Produzione mondiale di BFRs espressa in migliaia di tonnellate (Alaee et al., 2003)

	1989	1994	1999
Europa	28.0	32.5	30.9
Asia	28.7	38.5	113.9
Stati Uniti	50	65	58.7
Totale	106.7	136	203.5

La miscela pentaBDE era impiegata nel 95% dei casi nel trattamento di schiume poliuretaniche, funzionali alla costruzione di materassi e sedili d'automobili. Approssimativamente, il 7.5% delle circa 950'000 tonnellate di schiume poliuretaniche prodotte annualmente negli Stati Uniti veniva trattato con la miscela pentaBDE. Spesso la miscela pentaBDE era usata accoppiata a fosfati aromatici in proporzione 3:1. Ulteriori usi del pentaBDE come additivo sono associati all'industria tessile per forniture automobilistiche, ai poliesteri insaturi (*UPEs*), polivinilcloruro (PVC) flessibile per ricoprire i cavi elettrici, gomme, pitture e lacche, mentre non se ne riconosce un uso diretto per le apparecchiature elettrodomestiche (EU, 2001)

La miscela octaBDE venne utilizzata come additivo nelle plastiche a base di acetonitrile-butadiene-stirene (*ABS-plastics*), una piccola parte in polistirene ad alto impatto (*HIPS*) e polimeri poliammidici. Nelle plastiche *ABS* l'octaBDE era aggiunto in quantità pari a circa il 12-15% in peso. I materiali plastici contenenti la miscela octaBDE erano destinati ad essere impiegati soprattutto come involucri protettivi rigidi per elettrodomestici e macchinari casalinghi, PC e automobili (EU, 2003).

La miscela decaBDE è stata largamente impiegata come additivo ritardante di fiamma in una vasta gamma di prodotti plastici componenti di innumerevoli manufatti. Tra queste plastiche troviamo l'*HIPS*, polietilene (PE), Polibutilene tereftalato (*PBT*) e *UPEs*. Le plastiche trattate con decaBDE erano impiegate nella produzione di custodie e pannelli posteriori di televisori, custodie per apparecchiature video, telefoni cellulari, monitor per PC e PC, nei cavi per la comunicazione, tubi, sedili degli stadi, supporti e pannelli in plastica dura, dispositivi elettrodomestici, bobine, connettori elettrici ed anche nei rivestimenti posteriori dei tessuti per tappezzeria. Solitamente era aggiunto in proporzione pari al 10-15% del peso in combinazione con il triossido di ammonio. Il *Lowell Center* per

la produzione sostenibile dell'università del Massachusetts ha stimato che circa 17'200 tonnellate di decaBDE sono state usate in 28 milioni di televisori venduti negli stati uniti nel 2003 (Pure Strategies, Inc., 2005).

Nella seguente tabella sono mostrati i diversi congeneri della famiglia dei PBDE e relativi dati di concentrazione (mg kg^{-1}) presenti in campioni di rifiuti elettronici raccolti in un'industria di smaltimento e riciclaggio di elettrodomestici, nel 2002.

Tabella 4: Concentrazioni di congeneri di BDE (mg kg^{-1}) presenti nei componenti di rifiuti elettronici in impianto di riciclaggio nel 2002.

Congeneri BDE	Involucri per schermi PC	Coperchi posteriori della televisione	Particolato fine (polvere)	Materiali plastici a grana fine (5mm)	Circuiti per stampanti
	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})	(mg kg^{-1})
BDE 28	0.32	0.32	6.5	0.47	1.3
BDE 47	3.0	2.2	39	5.1	9.6
BDE 99	6.5	3.8	52	7.5	12
BDE 100	0.65	0.28	4.4	0.78	0.72
BDE 152	598	450	31	110	4.0
BDE 154	66	38	6.9	12	1.1
BDE 183	3800	3900	150	690	12
BDE 209	7300	13000	760	25000	89
PentaBDE*	13	7.9	120	17	28
OctaBDE*	11000	11000	420	2000	34
DecaBDE*	7300	13000	760	2500	89

*Le concentrazioni delle miscele tecniche di BDE sono state calcolate da Morf *et al.* 2005 come segue= pentaBDE: Σ (BDE 47 + BDE 99 + BDE 100) \times 1.26; octaBDE: BDE 183 \times 2.87; decaBDE = BDE 209.)

Le preoccupazioni per la persistenza ambientale, il potenziale di bioaccumulo nelle catene alimentari ecologiche e umane e la diffusa presenza di PBDE nell'ambiente hanno accelerato azioni normative e volontarie per ridurre ulteriormente l'uso di questa classe di congeneri bromurati. I produttori statunitensi di penta- e octaBDE hanno gradualmente eliminato la produzione di questi prodotti alla fine del 2004. Inoltre, diversi Stati americani hanno emanato una legislazione individuale che vieta l'uso di formulazioni penta, octa e decaBDE.

1.2.3 Politica Regolamentare Europea

Nell'Unione Europea fu eseguita una valutazione approfondita di penta-, octa- e decaBDE sulla base della direttiva 793/93/CEE che riguarda la valutazione del rischio di sostanze chimiche persistenti.

All'inizio degli anni Duemila cominciano a porsi questioni legislative, mano a mano che numerosi studi riportano la presenza di questi composti in diverse matrici, quali: fanghi e sedimenti (Zegers, 2000), materiale particolato, polveri, solidi sospesi (De Boer, 2000), in acqua, nel biota (Luross, 2002) e nel sangue umano (Sjödin 1999,2001) e in varie parti del mondo.

In Europa con la direttiva 2003/11/CE in materia di immissione sul mercato e uso di sostanze pericolose, viene vietata la vendita di due miscele commerciali di PBDE, note come pentaBDE e octaBDE, in concentrazioni superiori allo 0,1 % di massa. Dal luglio 2006, ai sensi della direttiva 2002/95/CE, ne è stata vietata la vendita.

I PBDE sono stati introdotti nel 2004 come composti POPs nell'allegato A, della Convenzione di Stoccolma.

Nello specifico i composti Tetra-, Penta-, Esa-, Epta- e OctaBDE, sono stati indicati come Sostanze Pericolose Prioritarie e Composti Ubiquitari Persistenti, bioaccumulabili e tossici (*uPBT*), ai sensi della Direttiva Quadro delle Acque (WFD 2000/60/CE), nella relativa direttiva degli Standard di Qualità Ambientale (2008/105/CE), modificata dalla Direttiva sulle Sostanze Prioritarie (2013/39/UE). Quest'ultima introduce come standard biotico un valore di 0.0085 microgrammi per kilogrammi di peso umido, per i PBDE, nei pesci. La miscela DecaBDE fu inserita nei POPs nel 2017. (EA, 2019).

1.3 Inquinanti Emergenti

Vengono definiti come Inquinanti Emergenti tutti i composti chimici e i materiali che rappresentano una minaccia, reale o percepita, per la salute umana e per l'ambiente, per le quali non sono ancora standardizzati programmi europei in materia di monitoraggio, in materia sanitaria, ambientale e che possono essere in futuro regolamentati in base alla loro tossicità, potenziali effetti negativi, dispersione e persistenza nei compartimenti ambientali. Sono definiti Emergenti anche quella categoria di inquinanti identificati in seguito alla scoperta di nuove fonti di emissione, nuove vie di esposizione all'uomo o nuove metodologie per l'identificazione (Haddaoui & Mateo-Sagasta, 2021).

Si tratta per cui di una definizione dinamica che porta all'attenzione degli organi di controllo della comunità scientifica una vasta gamma di nuove sostanze o classi di sostanze. In questa categoria rientrano una moltitudine di composti chimici di sintesi, come additivi per carburanti, microplastiche, prodotti farmaceutici, sostanze alogenate e nano materiali. Comunque il processo di identificazione è un processo in continuo che vede lo sviluppo di nuove tecniche di monitoraggio e di analisi per l'identificazione di nuovi composti. Infatti attualmente per molti composti emergenti mancano ancora studi e informazioni sul loro comportamento nell'ottica del destino ambientale e del potenziale rischio per la salute umana (LE2C, 2020).

1.4 Ritardanti di Fiamma Nuovi o Emergenti (NBFR o EBFR)

A partire dall'introduzione dei PBDE come POPs nella Convenzione di Stoccolma, la ricerca si è concentrata su nuove molecole, definite come NBFR, o EBFR, ovvero Nuovi Ritardanti di Fiamma Bromurati, o Emergenti.

Questi composti sono definiti appunto NBFR, nome attribuito ai BFR che sono nuovi sul mercato o recentemente osservati nell'ambiente. Ci sono altri termini utilizzati, ad esempio "alternativo", "nuovo", "emergente", "uso corrente" o "non-PBDE" in riferimento ad altri BFR diversi da PBDEs e altre categorie di ritardanti di fiamma come Ritardanti di fiamma alogenati organici (HFRs).

Importanti rappresentanti di questo gruppo sono: esabromo benzene (HBB), 1,2-bis(pentabromodifenil)etano (DBDPE), 1,2-bis (2,4,6-tribromo fenossi)-etano (BTBPE), 2-etilesil-2,3,4,5-tetrabromo benzoato (TBB), bis(2-etilesil)-3,4,5,6-tetrabromo ftalato (TBPH), tetrabromobisfenol-A-bis (2,3-dibromopropil etere) (TBBPA-DBPE), esacloro-ciclopentadienil-dibromo ciclo ottano (HCDBCO) e pentabromo etilbenzene (PBEB) (Covaci *et al.*, 2011).

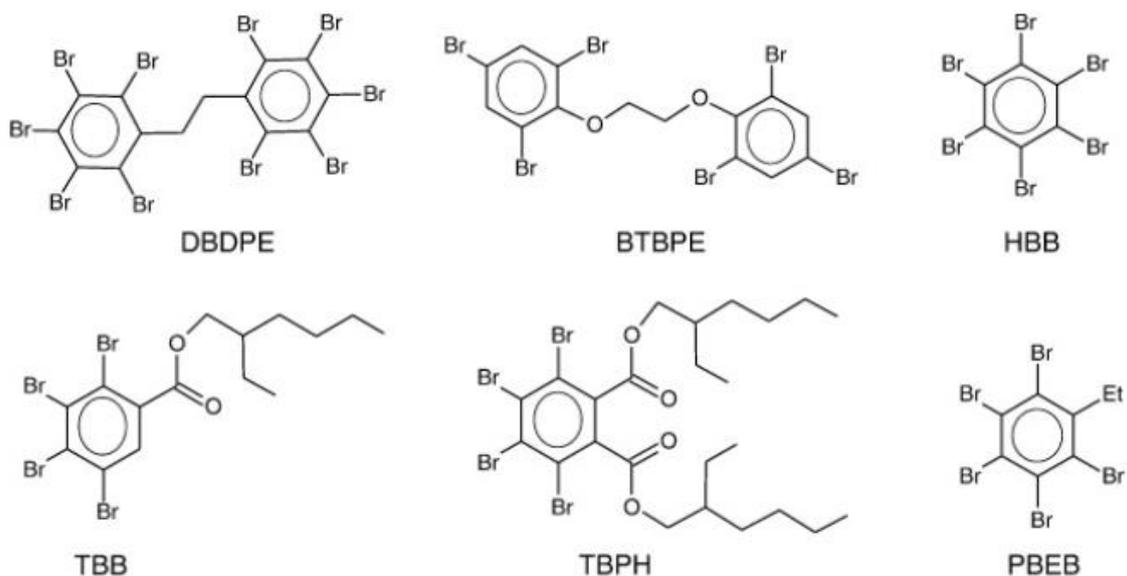


Figura 4: Alcuni tra i più diffusi NBFR (Covaci et al., 2011)

Di seguito è mostrata la somiglianza tra due BFR appartenenti alle due classi di composti citati, NBFR e PBDE. In questo caso è rappresentato il DBDPE, utilizzato in sostituzione al DecaBDE (o BDE-209). Le due molecole sono strutturalmente simili, come mostrato in figura 5.

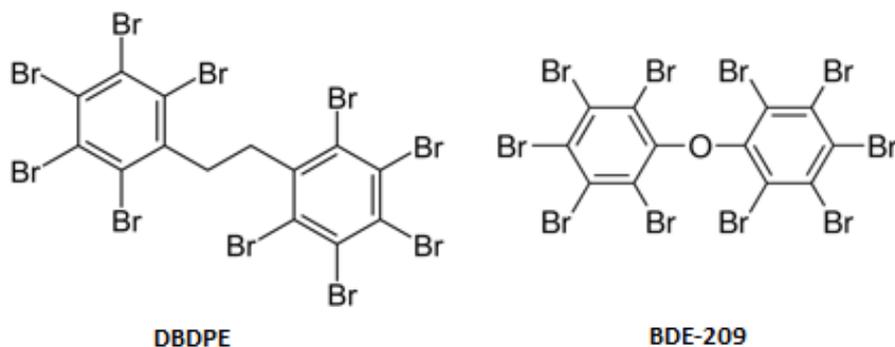


Figura 5: : DBDPE e BDE-209 a confronto

Il DBDPE presenta un ponte etano tra i due anelli aromatici, mentre il decaBDE è caratterizzato da un ponte etero. Le proprietà chimico-fisiche delle due molecole sono simili, ovvero bassa volatilità, bassa solubilità in acqua, bassa pressione di vapore, alta stabilità termica ed elevata Kow. La presenza del ponte alchilico posto tra i due anelli di benzene sostituiti, rende la molecola DBDPE più idrofobica del BDE-209. Conferisce inoltre una maggior flessibilità conformazionale, tale da ridurre il potenziale di formazione di diossine e furani durante la pirolisi (Dungey, 2007). Un altro esempio è dato dalla sostituzione dell'octaBDE con il BTBPE e l'utilizzo di miscele di TBB con TBPH per sostituire il pentaBDE

(Tao *et al.*, 2016). Annualmente sono prodotti dalle 100 alle 180 migliaia di tonnellate di NBFR (Zuiderveen *et al.*, 2020).

Gli NBFR possono essere divisi principalmente in tre classi: mono-aromatici, che comprendono PBEB e HBB, tutti polibromo benzeni; multi-aromatici, come il DBDPE e BTBPE ed altri derivati del tetrabromobisfenolo-A; e infine i ciclo-alifatici, che includono tutti gli analoghi del polibromo cicloesano ed isomeri del 1,2-dibromo-4-(1,2-dibromoetil)-cicloesano (TBECH). Queste sostanze chimiche condividono una struttura simile con diverso grado di sostituzione alogena negli idrocarburi ciclici, facendo sì che le loro proprietà chimico-fisiche siano generalmente analoghe a quelle di PBDE e HBCDs. La maggior parte di NBFR ha proprietà idrofobiche, caratteristiche semivolatili (pressione di vapore comprese da $6,35 \text{ E-}15$ a $1,46 \text{ E-}3 \text{ mmHg}$ a 25°C). coefficienti di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) maggiori di 4 e bassa solubilità in acqua, minore di 1 mg L^{-1} . Gli NBFR, come i PBDE, sono incorporati fisicamente come additivi nei materiali polimerici, il che porta a una lisciviazione del materiale e conseguente dispersione in varie matrici ambientali, in seguito ai processi di produzione industriale, uso e smaltimento (Covaci *et al.*, 2011).

1.5 Origine e Destino Ambientale

1.5.1 Produzione

Cina e Stati Uniti sono i maggiori produttori globali di DBDPE, o *Firemaster-2100*, che è stato prodotto dal 2006 al 2016 in quantità pari a 230 mila tonnellate. In Arkansas, USA, si è registrata una concentrazione fino a 870 ng g^{-1} in peso secco (*dry weight, dw*) nei sedimenti del lago vicino al più grande stabilimento del mondo dedicato alla produzione di DBDPE. In Cina invece, nel suolo circostante gli stabilimenti manifatturieri di Shouguang City si sono trovate concentrazioni fino a $34'000 \text{ ng g}^{-1} dw$. Anche in Italia, nei sedimenti del Lago Maggiore sono state rinvenute concentrazioni maggiori a $100 \text{ ng g}^{-1} dw$ (Poma, 2014). Generalmente il DBDPE tende a diffondersi con un gradiente negativo rispetto alla distanza, dal punto dove esso viene immesso in ambiente. I più alti livelli di emissione sono stati trovati nei pressi di impianti di trattamento delle acque, nei fanghi in uscita, nelle aree di smaltimento e riciclaggio di rifiuti elettronici ed elettrodomestici, nelle discariche ed inceneritori. Il DBDPE è il composto più presente della categoria degli NBFR, in quanto il più largamente prodotto ed utilizzato. Questo composto è stato trovato anche nel Po, dove ammontava al 70% della quantità totale di ritardanti di fiamma emergenti (Viganò *et al.*, 2015).

Il BTBPE viene principalmente prodotto sotto il nome di *Firemaster-680* da *Great Lake Chemical (Chemtura Corp, Arkansas)* in America, ma non sono stati rinvenuti punti di emissione nell'intorno dell'area manifatturiera, mentre nei sedimenti locali nell'intorno di industrie tessili sono state trovate alte concentrazioni di BTBPE. Anche in questo caso, però, le concentrazioni più alte sono state rilevate nei pressi di impianti di riciclaggio e smaltimento di rifiuti elettronici ed elettrodomestici. La più alta concentrazione è stata rilevata nei sedimenti vicino al sito di smaltimento a Guangdong, in Cina, dove raggiungeva valori compresi da 3'900 a 4'550 ng g⁻¹ dw (Wu *et al*, 2010). Il BTBPE si rivela essere largamente diffuso in tutto il mondo, tanto che è stato ritrovato in Nord America, Europa, Cina e Corea in suoli, sedimenti, acque marine, fluviali ed oceaniche (Yang *et al.*, 2012). Altri NBFR bromurati a singolo anello aromatico come HBB e PBEB sono stati iniziati ad essere prodotti già nel 1980 e sono riemersi negli ultimi anni sul mercato. Il PBEB e HBB, prodotti maggiormente da *Albemarle Corp*, Stati Uniti, sono largamente utilizzati in Cina e Giappone. Vi sono comunque poche informazioni sull'uso e sulla produzione attuale, si rimanda quindi la loro presenza da processi di smaltimento e inquinamento diffuso di aria e acqua. Infatti il PBEB è stato trovato come maggior congenere nell'area industriale dei Grandi Laghi, USA, mentre l'HBB è stato rinvenuto largamente in fiumi e sedimenti nei pressi di siti di riciclaggio di materiali elettronici in Cina, con concentrazioni fino a 8'000 ng g⁻¹. Al pari degli altri, anche questi NBFR si concentrano nei fanghi in uscita dagli impianti di depurazione delle acque reflue urbane, tanto che l'HBB in 24 province Cinesi era il maggior congenere ad essere presente (Hou *et al.*, 2021). È stata stimata una produzione mondiale di NBFR che varia dalle 100'000 alle 180'000 tonnellate annue (Covaci *et al.*, 2011).

1.5.2 Destino Ambientale

Si può ben notare come i ritardanti di fiamma bromurati siano largamente diffusi in tutto il mondo. Questa classe di composti è stata identificata in diverse e numerose matrici biotiche ed abiotiche, destando attenzione per quanto riguarda la salute umana e l'ambiente. Prima di analizzare questo aspetto, è utile capire le sorgenti e i percorsi degli inquinanti. Non è stata identificata nessuna sorgente naturale per PBDE e NBFR. La produzione di PBDE in Europa è stata vietata, quindi la principale fonte di inquinamento riguarda lo smaltimento di vecchie forniture e prodotti contenenti tali molecole.

Di seguito, nello scenario mostrato in figura 6, sono schematizzate le modalità di dispersione dei ritardanti di fiamma bromurati, tali da renderli inquinanti ubiquitari.

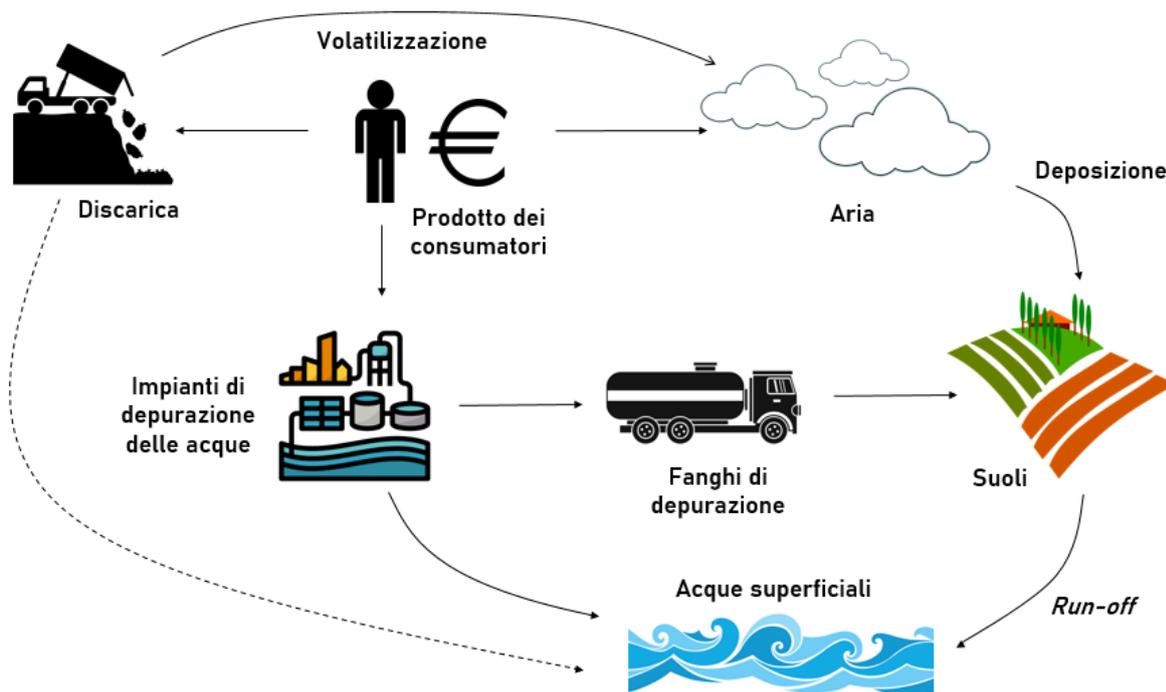


Figura 6: Scenario ricostruito di Sorgenti e Percorsi per i BFRs in ambiente, secondo quanto riportato dall' Environmental agency (E.A., 2019)

Nello specifico, i PBDE e NBFR entrano in ambiente attraverso emissioni atmosferiche da una varietà di materiali plastici o schiume poliuretaniche nelle quali sono incorporati, e non legati chimicamente. Si può perciò associare la loro presenza in ambiente al rilascio da parte di materiali combinati fisicamente con i ritardanti di fiamma. Tali oggetti depauperandosi, venendo lisciviati o subendo trattamenti e pre-trattamenti fisici di smaltimento, rilasciano in ambiente i BFRs (Britis, 2019). I processi coinvolti sono la produzione, l'incenerimento dei rifiuti, il riciclaggio di WEEE e altri processi industriali generali. Il riciclaggio dei rifiuti elettronici, in particolare, si è dimostrato tra le maggiori fonti di rilascio nell'atmosfera, a causa delle concentrazioni tipicamente elevate all'interno dei prodotti e delle tecniche di lavorazione che ne provocano la dispersione (Britis, 2019).

La volatilizzazione di PBDE e NBFR, seguito dal partizionamento in particelle di polvere, porta all'emissione di queste molecole nell'aria e l'accumulo di esse nel particolato, le quali possono entrare in dinamiche di trasporto a lungo raggio nell'aria atmosferica e subire infine una deposizione a terra. Una volta depositatesi nel terreno, i suoli contaminati possono trasferire i BFRs nei solidi sospesi e nei sedimenti degli ambienti acquatici attraverso il deflusso superficiale delle precipitazioni

(*run-off*) (Iqbal *et al.*, 2017). Visto il loro forte carattere lipofilo e bassa solubilità, saranno facilmente inglobati nei sedimenti dove entreranno nella catena trofica bentonica, del detrito e nella catena trofica acquatica, in quanto tenderanno ad accumularsi nei tessuti grassi dei pesci. Infatti, il bioaccumulo e il trasferimento trofico di PBDE e NBFR sono stati osservati negli ecosistemi di acqua dolce (Iqbal *et al.*, 2017) e organismi marini (Hou *et al.*, 2022).

Un'altra fonte importante è stata identificata nelle acque reflue urbane. Infatti tutte le plastiche contenenti queste molecole, le perdono per lisciviazione a contatto con l'acqua. Anche se la presenza in concentrazione di BFRs in uscita dagli impianti di trattamento può essere bassa, il grande ammontare di acqua trattata diventa un importante fonte di NBFR e PBDE per i corpi ricettori (Environmental Agency, 2019). Data la loro bassa solubilità, dalle acque tenderanno ad accumularsi e concentrarsi nei fanghi e nei sedimenti, che se non trattati appositamente, costituiranno una fonte di inquinamento per i terreni agricoli dove i fanghi sono utilizzati come ammendanti, rappresentando un percorso significativo di carico di BFRs. Le proprietà lipofile di PBDE e NBFR fanno sì che si leghino strettamente alla materia organica e persistano nei suoli in cui sono state stimate emivite fino a circa 28 anni (Andrade *et al.*, 2010). I BFRs possono inquinare il terreno anche tramite trasferimento diretto da prodotti contenenti ritardanti di fiamma presenti nelle discariche e tramite percolati di discarica (Ping *et al.*, 2019). È stato poi dimostrato che PBDE e NBFR si bioaccumulano negli invertebrati che vivono nel suolo come i lombrichi, consentendo la propagazione e la biomagnificazione dei contaminanti nelle catene alimentari terrestri (EPA, 2010).

I terreni contaminati dai BFRs in questione formano potenziali percorsi di esposizione anche per l'uomo. L'inalazione di frammenti di suolo sospesi nell'aria esterna o l'assorbimento per contatto dermico di particelle depositate possono contribuire all'assunzione di questi ritardanti di fiamma bromurati. Anche l'ingestione di terreni aderiti a ortaggi coltivati su terreni contaminati e l'assunzione orale diretta di terreno da parte dei bambini sono potenziali vie di esposizione. La capacità di molte colture vegetali di traslocare i PBDE e NBFR dal suolo alle strutture vegetative può comportare un'esposizione costante attraverso la dieta (McGrath *et al.*, 2017).

1.5.3 Aria

I PBDE in aria si comportano come composti semivolatili, partizionandosi tra fase vapore e fase particolata, in base alle rispettive tensioni di vapore. Un altro valore da tenere in considerazione è quello della costante di ripartizione ottanolo-aria (il log K_{oa}) che indica il partizionamento tra fase particolata e fase gassosa. L'affinità al particolato aumenta all'aumentare del valore del coefficiente ottanolo-aria (Zhao *et al.*, 2020). A pressione e temperatura standard (1 ATM, 25 °C), al crescere degli atomi di bromo nella molecola, quindi al diminuire della pressione di vapore, cresce il grado di frazionamento verso il particolato atmosferico. Quindi i BDEs più leggeri (mono-, bi- e tri-BDE) si ripartiscono prevalentemente in fase vapore e vanno incontro a degradazione in atmosfera. Mentre i più pesanti (esa-, octa-, deca-BDE) sono esclusivamente legati al particolato atmosferico e alle polveri. Gli intermedi (tetra-, penta-BDE) si ripartiscono tra le due fasi, vapore e particolato, ma prevalentemente sono stati rinvenuti nella fase vapore.

Inoltre si è visto che i PBDE più pesanti tendono poi a depositarsi al suolo, mentre i più leggeri vengono degradati in atmosfera. Invece i BDEs di peso intermedio vengono trasportati per maggiori distanze in aria rispetto agli altri due sottogruppi (Waina & Dugani, 2003). È stato dimostrato che oltre ai processi di smaltimento e riciclaggio di materiali plastici ed elettronici, le aree urbane densamente popolate sono la fonte principale di PBDE, contribuendo all'inquinamento diffuso dell'aria (Gouin *et al.*, 2005).

Si è anche notato che le superfici frondose dei boschi di latifoglie possono esaurire significativamente i PBDE nell'atmosfera e il loro trasporto, tramite il trasferimento aria-foglia. L'assorbimento delle foglie trasferisce i BDEs dall'aria all'ecosistema terrestre, quando le foglie cadono al suolo (Su *et al.*, 2007). Il processo di assorbimento avviene per intercettazione da parte della foglia delle molecole adsorbite al particolato e soprattutto attraverso la traspirazione, più elevata durante la stagione di crescita. Questo giustifica il fatto che siano state trovate più alte concentrazioni di PBDE in aria nel periodo invernale, rispetto a quello primaverile-estivo (Gouin *et al.*, 2005).

I PBDE e NFBR sono stati trovati nell'aria di ambienti interni domestici e non, adsorbiti a particelle di polvere sospese. Infatti all'interno di case e uffici vi sono molti oggetti, elettrodomestici, computer e apparecchi elettronici contenenti i ritardanti di fiamma. Questi, volatilizzandosi da tali prodotti, inquinano l'aria interna degli spazi dove sono contenuti. Negli ambienti chiusi c'è una distribuzione più o meno omogenea di PBDE. Un'altra fonte di inquinamento interno, meno influente, deriva

dall'arrivo di BFRs dall'aria dell'ambiente esterno. Dopodiché, dalla pulizia di questi ambienti e l'accumulo di polveri come rifiuto, i BFRs dagli ambienti interni si trasferiscono alla discarica o vanno ad incenerimento, diffondendosi altrove (Kemmelein *et al.*, 2003).

Un recente studio ha analizzato la concentrazione e i profili di distribuzione di NBFR e PBDE nella polvere domestica di trentaquattro case in Lettonia. Per via delle loro caratteristiche chimico-fisiche sono state ritrovate entrambe le classi, nonostante i PBDE siano stati banditi dall'UE, la presenza è dovuta a vecchie utenze. Tra i PBDE, il BDE-209 era quello più abbondante, con concentrazione media di 4'200 ng g⁻¹ di polvere. I congeneri con basso grado di bromurazione quali BDE-47,-99,-100 e -183 sono stati trovati in concentrazione nettamente minore. Tra questi valori il più alto è associato al BDE-99, pari a 49.4 ng g⁻¹ (Pasecnaja *et al.*, 2021).

Le concentrazioni di NBFR sono fortemente minori, a causa del diverso campo di applicazione di queste molecole. La specie più presente è il DBDPE, con concentrazione media pari a 391 ng g⁻¹. Infatti il DBDPE è il più abbondante riportato in letteratura, indipendentemente dalla località analizzata, a causa del suo largo impiego (Dirtu *et al.*, 2012). Oltre a questo, i più presenti, in concentrazioni nettamente più basse, sono il BTBPE (16.1 ng n⁻¹) e HBB (6.2 ng n⁻¹). Questi profili, con la differenza per valori di concentrazione riportati, sono in accordo con altri studi.

PBDE e NBFR sono soggetti a quello che è definito come trasporto atmosferico a lungo raggio (LRAT), tanto che la loro presenza è stata registrata in King George Island, a sud delle isole di Shetland, nell'Antartide occidentale. Uno studio ha raccolto campioni di aria dal 2011 al 2018 mostrando la presenza di diversi composti come il PBEB, BTBPE, HBB e DPDBE trovati nel 95% dei campioni. Le concentrazioni ritrovate, date dalla somma delle concentrazioni nel particolato e nella fase gassosa, variavano dai 0.3 ai 3 pg m⁻³, aumentando nel corso degli anni, mostrando un trend temporale che segue la crescita della produzione e degli utilizzi (Zhao *et al.*, 2020). Un'altra prova della loro ubiquità è fornita da uno studio che ha indagato la presenza di PBDE e NBFR a Longyearbyen, in Svalbard, Artico, in una campagna di campionamento da settembre 2012 a maggio 2013. I risultati hanno mostrato la presenza di 35 congeneri BDEs e alcuni NBFR con concentrazioni da 3 a 77 pg m⁻³. Tra i NBFR i principali HBB, PBEB, DBDPE e BTBPE, in particolare il DBDPE e BTBPE avevano concentrazioni fino a 3 pg m⁻³ mentre HBB e PBEB arrivavano ad un massimo di 1.7 pg m⁻³. Mentre il BDE-47, BDE-99 e BDE-209 sono i maggiori congeneri trovati, in particolare il BDE-209 rappresentava il 24% del contenuto totale di PBDE, con concentrazioni fino a 31 pg m⁻³ (Salamova *et al.*, 2014).

1.5.4 Acqua

In acqua i PBDE e NBFR sono presenti principalmente per deposizione atmosferica sulla superficie del corpo d'acqua, o a causa di scarichi diretti derivanti da attività industriale. Una volta in acqua si ripartiscono tra di essa nella fase disciolta, tra il particolato e quindi i sedimenti, in proporzione alle loro caratteristiche chimico-fisiche. Solitamente tendono ad accumularsi nel particolato organico sospeso e poi depositarsi nel sedimento, tanto che in ambiente acquatico quest'ultimo diventa la matrice che funge da magazzino e fonte di BFRs. Infatti è noto il bioaccumulo e la biomagnificazione nella catena trofica acquatica, a partire da organismi planctonici e bentonici, finendo con i predatori al vertice, quindi pesci, uccelli e mammiferi. I più alti livelli di concentrazione sono stati trovati nei campioni di sedimenti a valle di corsi d'acqua vicino ad aree urbane, aree fortemente industrializzate e vicino a scarichi di impianti di depurazione (EPA,2010).

Uno studio ha messo in luce la presenza di PBDE quali BDE-28, -47, -99, -100, -152, -156, -183 e BDE-209 nell'acqua di mare nella costa di Hong Kong, sia nel microlayer superficiale (100µm di profondità all'interfaccia aria - acqua), che nell'acqua sub-superficiale (primo metro di profondità). Le concentrazioni totali variavano dai 11.3 ai 62.3 pg L⁻¹ nella fase disciolta e dai 26.2 ai 32.5 pg L⁻¹ nella fase particolata. Il BDE-99 è stato l'unico congenere trovato disciolto nello strato sub-superficiale (Wurl *et al*, 2006).

Il problema principale di queste classi di sostanze in acqua è dovuto alla loro capacità di bioaccumulo e conseguente biomagnificazione nel biota, a causa dell'alto valore di *K_{ow}*, infatti sono molecole fortemente idrofobiche e lipofile. È stata studiata la capacità di metabolica di trasformare le molecole ad alto contenuto di Br, in BFRs a più basso contenuto, per esempio per i PBDE la debromurazione metabolica da parte di alcuni pesci porta a congeneri BDE-47 e BDE-99, che restano immagazzinati nel corpo dell'animale (Stapleton, 2004).

Organismi bentonici, molluschi e organismi filtratori sono i primi a diretto contatto con i BFRs che contaminano i sedimenti e l'acqua, tanto da assorbirli e immagazzinarli, per poi trasmetterli nei livelli superiori della catena alimentare. Infatti pesci e organismi superiori introducono PBDE e NBFR direttamente dalla loro dieta. Uno studio di un estuario in Francia ha evidenziato più bassi livelli di BDE nei vermi e bivalvi, alla base della catena, concentrazioni medie per i gamberi e alte per i predatori quali anguille e sogliole (Bragigand, 2006). I più alti livelli sono stati riscontrati nei predatori all'apice della catena alimentare come nei delfini della costa Dutch, dove la concentrazione data dalla

sommatoria dei PBDE era pari a 6'500 ng g⁻¹ di peso di lipide (*lw*) e 1600 ng g⁻¹ *lw* per lo squalo toro (EPA, 2010). È stato anche riscontrato che nei pesci di acqua dolce e d'acqua salata, il maggior congenere presente è il BDE-47, circa il 30% del totale di PBDE, seguito dal BDE-99.

I PBDE e NBFR dall'ambiente acquatico possono essere trasportati nell'ambiente terrestre a causa degli uccelli carnivori, tipicamente consumatori secondari e terziari nelle catene alimentari terrestri e acquatiche. Dal 1993 al 2002, fu condotto uno studio che prendeva come campione le uova da 13 nidi di Falchi Pellegrini (*Falco peregrinus*) in undici località della Baia di Chesapeake, U.S.A., per indagare la distribuzione dei PBDE. I risultati dell'analisi hanno mostrato che la concentrazione media totale di BDE (somma di BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-183, BDE-196, BDE-197, BDE-206, BDE-207, BDE-208 e BDE-209) era di 201 ng g⁻¹ di peso. BDE-209 è stato rilevato in tutti i campioni di uova a una concentrazione media di 6.35 ng g⁻¹. A differenza di prima, il BDE-153 era il congenere più presente (28% del totale) con concentrazione media pari a 26.1 ng g⁻¹ di peso (Potter et al., 2009). Comunque il fatto che in diverse parti del mondo siano state rinvenute concentrazioni di BFRs nei tessuti di organismi acquatici di acqua dolce e salata, rappresenta una prova di trasporto a lungo raggio di queste sostanze dalla sorgente di origine.

L'emergere di NBFR negli ambienti acquatici e i loro effetti negativi potrebbero rappresentare una minaccia per gli ecosistemi acquatici e la salute umana. Gli NBFR entrano negli ambienti acquatici attraverso sorgenti puntiformi e non, e sprofondano nei sedimenti dopo processi di trasporto, partizionamento e degradazione. Sebbene sia stata costantemente riscontrata un'efficace rimozione degli NBFR durante i processi di trattamento negli impianti di trattamento delle acque reflue, la maggior parte dei composti è stata preferibilmente eliminata nei fanghi. Questi comportamenti sono coerenti con quelli dei BFRs classici, a seconda delle loro proprietà fisico-chimiche e fonti simili. A causa del carattere lipofilo, gli NBFR possono accumularsi a livelli elevati in vari organismi acquatici e possibilmente diffondersi lungo la catena alimentare, ponendo così potenziali minacce agli ecosistemi acquatici e agli esseri umani. Inoltre, è stato determinato che gli NBFR hanno modelli di tossicità ecologica e sanitaria simili a quelli dei PBDE. Gli NBFR sono stati documentati come tossici per gli organismi viventi e le prove disponibili suggeriscono che diversi composti bromurati emergenti causano stress ossidativo, potenziale neurotossicità e interruzione del sistema endocrino negli animali acquatici e nell'uomo (Hou et al., 2021).

Un recente studio ha messo in evidenza la propagazione dei NBFR all'interno della catena trofica marina nel Mare del Sud della Cina, in corrispondenza della barriera corallina a Xisha Island. È stata

studiata la presenza di 11 NBFR rappresentativi di questa classe di composti, ovvero: DBDPE, BTBPE, TBBPA-DBPE, TBB, TBPH, HBB, PBEB, PBT, PBP, TBP e TBECH. Sono stati analizzati otto campioni di acqua marina, otto campioni di sedimenti marini, cinque specie di conchiglie erbivore, tre specie di cetriolo di mare, tre specie di granchi onnivori e diciotto specie di pesci, sia erbivori che predatori di basso ed alto livello trofico. Le frequenze di rilevamento dei singoli composti nei campioni di organismi marini variavano dal 45 al 93 %. I valori degli NBFR nell'acqua di mare variava da 0.011 a 0.182 ng g⁻¹. Con un valore in sommatoria pari a 1.078 ng g⁻¹. Il valore nei sedimenti, per i singoli composti, invece varia da 0.021 a 0.551 ng g⁻¹, con un valore della sommatoria pari a 1.804 ng g⁻¹. Il valore medio, in termini di Σ NBFR media, in ng g⁻¹ (*Iw*), riscontrato nei campioni, in ordine crescente, era: cetrioli di mare (0.330 ± 0.027) < granchi (0.380 ± 0.065) < conchiglie (2.100 ± 0,649) < pesci erbivori (2.300 ± 0.452) < pesci carnivori (4.130 ± 1.120). I congeneri più presenti nei campioni di organismi marini erano il DBDPE (34.3 ± 8.3%) e l'HBB (25.1 ± 5.9%). Questo studio ha messo in evidenza come gli NBFR sono soggetti al trasporto in acqua e si propagano all'interno della catena trofica acquatica dei mari tropicali (Hou *et al*, 2022).

1.5.5 Suolo

Il suolo è stato identificato come maggior "pozzo" e riserva per i BFRs. Infatti dall'atmosfera questi composti si partizionano tra l'aria e il particolato, andando poi a depositarsi al suolo. Come detto precedentemente, la presenza di boschi e aree vegetate può attenuare le concentrazioni in aria, ma una volta assorbiti dalle piante, comunque i ritardanti di fiamma verranno trasferiti al suolo. La concentrazione di BFRs, come BDE-209 o DBDPE nel suolo può essere abbattuta da reazioni di debromurazione riduttiva (Fang *et al.*, 2008).

Dal punto di vista spaziale, le concentrazioni di ritardanti di fiamma seguono un gradiente di concentrazione (da alta a bassa) dal centro città alle aree rurali più distanti. Infatti le aree urbane e industrializzate sono la fonte principale dei ritardanti di fiamma. Un importante esempio è fornito dallo studio di sedimenti di effluenti del fiume Lian, che passano attraverso la città di Guiyu, una tipica area di smaltimento di rifiuti elettrodomestici in Cina. Dati del 2017 indicano che nella città di Guiyu sono state smaltite 350'000 tonnellate di rifiuti elettronici. Questo studio ha messo in luce la presenza di PBDE e NBFR in cinquanta campioni di sedimenti superficiali sulle rive del fiume (20 cm di profondità). Il BDE-209 e il DBDPE sono stati trovati nel 95% dei campioni con concentrazioni medie

pari a $10'906 \text{ ng g}^{-1}$ e $2'009 \text{ ng g}^{-1}$, rispettivamente. Altri NBFR analizzati sono stati il BTBPE, HBB e PBEB con concentrazioni rispettive pari a 830 ng g^{-1} , 96 ng g^{-1} e 0.36 ng g^{-1} . Invece, la concentrazione totale di PBDE e NBFR variava da 0.345 a $401'000 \text{ ng g}^{-1} dw$ e da 0.581 a $73'100 \text{ ng g}^{-1}$, rispettivamente. In particolare il DBDPE è stato riscontrato essere il composto della famiglia dei NBFR più diffuso nei sedimenti in Cina, Corea, Vietnam, Italia e Sud Africa (Ling *et al.*, 2022). L'aria, comunque, resta il principale veicolo di tali sostanze, che poi si depositano al suolo, nei fiumi e quindi arrivano ai sedimenti. I BDEs che dominano nel suolo sono BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154 e BDE-209, quest'ultimo è il più abbondante (Cetin, 2007). Gli stessi congeneri sono stati ritrovati anche nei fanghi in uscita del trattamento terziario dagli impianti di depurazione, il BDE-209 rappresentava circa il 35% dei BDEs totali. È stato anche dimostrato che i fanghi assorbono il 96% dei PBDE totali, questo è dovuto all'elevato valore del log K_{ow} dei composti (North, 2004). Bisogna prestare attenzione a un trattamento specifico volto alla rimozione dei composti bromurati, in caso in cui i fanghi siano dediti al riuso come ammendanti agricoli, per evitare l'inquinamento diffuso. Per esempio, uno studio del 2015 condotto su campioni di fango primario e secondario in uscita da un impianto di trattamento di acque reflue e urbane ha mostrato la presenza di BDE-209, DBDPE e BEHTBP. In particolare sono state trovate concentrazioni variabili da 8 a $1'135 \text{ ng g}^{-1} (dw)$ nei fanghi primari e concentrazioni che oscillavano dai 10 ai $982 \text{ ng g}^{-1} (dw)$ nei fanghi biologici secondari. In questo caso la quantità di NBFR rappresentava il 66-97% dei Σ BFRs (Cristale & Lacorte, 2015).

La presenza di PBDE e NBFR si riscontra nei suoli di tutto il mondo, nelle aree rurali del Kenya, Africa, sono state trovate concentrazioni di BDE-47,-99,-153 e -183 che variavano da 0.93 a $6.60 \mu\text{g kg}^{-1} (dw)$ (Sun *et al.*, 2016). Nelle aree rurali del Nord Europa, le concentrazioni di PBDE variavano dai 0.065 ai $12 \text{ ng g}^{-1} (dw)$ (Hassanin, 2004). In Francia, Italia, Inghilterra, Norvegia, Svezia, Scozia e Slovacchia sono state trovate concentrazioni di PBDE variabili da 3.5 a 12 ng g^{-1} in suoli boschivi, valori compresi tra 0.1 e 43.9 ng g^{-1} in suoli rurali ed agricoli e valori compresi tra 0.02 e 13.2 ng g^{-1} in suoli di *background* (Macedo, 2019). In Cina, in aree rurali, di pascolo e suoli agricoli si sono riscontrate concentrazioni di DBDPE comprese tra 12 e 340 ng g^{-1} e BTBPE comprese tra $0,5$ e $5 \text{ ng g}^{-1} (dw)$ (Li *et al.*, 2017). Per cui anche l'esposizione di ortaggi in suoli agricoli contaminati rappresenta una possibile via per l'uomo di entrare a contatto con queste sostanze nocive.

Il principale problema di queste sostanze nell'ambiente terrestre riguarda il bioaccumulo e la biomagnificazione all'interno della catena trofica, infatti i mammiferi e predatori carnivori terrestri sono esposti alla stessa maniera degli organismi acquatici. Sono stati svolti diversi studi che hanno

messo in luce la presenza di PBDE accumulati nei tessuti adiposi di diversi predatori quali volpi, grizzly e orsi polari trovando il BDE-47 e BDE-209 come congeneri più presenti (EPA, 2010). Anche insetti quali tricotteri e ditteri sono stati utilizzati per indagare la presenza di PBDE nei tessuti animali, questi iniziano il loro ciclo di vita come nei sedimenti dei corsi d'acqua, e sono alla base della catena alimentare dell'ecosistema acquatico di fiume. Essi possono essere la fonte primaria di BDEs nella catena trofica, sia per pesci che uccelli, per poi trasferirsi a livelli superiori nei consumatori terziari. Uno studio ha indagato la presenza di questi composti nelle larve di tricotteri in laghi ad alta quota sui Pirenei, trovando concentrazioni pari a 0.65 – 1.68 ng g⁻¹ di stazza lorda (*dwt*) nelle larve e concentrazioni pari a 5.17 – 9.32 ng n⁻¹ *dwt* nelle pupe. Le pupe avevano concentrazioni nettamente più alte delle larve, e il BDE-209 era il più presente, con concentrazione media pari a 4.93 ng g⁻¹ *dtw* (Bartrons *et al.*, 2007).

Un altro importante studio ha analizzato la presenza di PBDE nel suolo e come questi si bioaccumulavano nei vermi. Sono stati analizzati tre siti in Svezia, dove veniva utilizzato fango di depurazione come ammendante. Rispettivamente i terreni utilizzati erano: un terreno sperimentale monitorato dal governo e trattato con gli ammendanti, un terreno agricolo privato trattato con gli ammendanti e un terreno privato non trattato. Questo fango ammendante era proveniente dai processi depurativi dell'acqua di scarto di un'industria tessile che utilizzava PBDE. I ricercatori hanno esaminato la relazione tra i tassi di applicazione dei fanghi di depurazione e i livelli risultanti di PBDE nei terreni trattati. In generale, hanno scoperto che maggiore era la quantità di fanghi contaminati da PBDE applicati al terreno, più aumentavano le concentrazioni di BDEs nei suoli, inclusi BDE-196, BDE-197, BDE-206, BDE-207 e BDE-209. Il BDE-209 nel terreno variava da 0.015 a 0.75 ng g⁻¹. I vermi entravano a contatto con i composti muovendosi attraverso il terreno contaminato e ingerendo il suolo, così facendo i composti venivano accumulati nei tessuti grassi. La concentrazione media totale di PBDE trovata nei vermi era pari a 38'000 ng g⁻¹ di peso su g di lipide (*lipid weight, lw*). Le concentrazioni più alte si sono riscontrate nei due terreni trattati con i fanghi di depurazione, per il BDE-209 nei vermi è stata trovata una concentrazione massima di 5.2 mg g⁻¹ (*lw*) (Sellstorm *et al.*, 2005). Questi studi mettono in evidenza come i PBDE entrino in catena trofica dai livelli più bassi, con organismi a diretto contatto con essi, per poi biomagnificarsi lungo tutta la catena.

1.6 Tossicità

I PBDE nei pesci causano una diminuzione della capacità riproduttiva, che si manifesta con diminuzione della deposizione delle uova e ritardo nella schiusa, danni neuronali e comportamentali. Negli organismi come *Daphnia magna*, si nota l'alterazione dell'attività endocrina, cardiaca, di quella riproduttiva, enzimatica, l'immobilizzazione ed infine la morte (Xiong, 2018).

In questi ultimi anni sono stati condotti numerosi studi che hanno evidenziato le caratteristiche tossiche dei NBFR, mostrando gli effetti a lungo termine su organismi acquatici. Nelle larve di *zebrafish* è stato individuato il cambiamento dell'espressione genica lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide causato dal DBDPE (Dong *et al*, 2021). Altri studi hanno messo in evidenza i possibili effetti ecotossicologici per organismi acquatici. Ad esempio nei pesci il DBDPE, BTBPE e TBB, causano stress ossidativo, disordini endocrini, anomalia nella crescita, disturbi comportamentali e neuronali, danni all'asse tiroideo e morte. Anche per *Daphnia magna* si sono riscontrati effetti tossici che hanno portato alla morte delle larve e individui adulti. (Rui, 2021).

Un recente studio ha messo in evidenza alcuni aspetti tossicologici relativi agli animali terrestri. È stato visto che su volatili e roditori i BFRs hanno effetti citotossici e epatotossici, causano danni al sistema riproduttore, cardiovascolare ed a quello endocrino. Sono stati esposti a DBDPE esemplari di polli, scoprendo che la molecola si accumulava nel tessuto cerebrale. Nei topi la stessa sostanza causava una disfunzione alla ghiandola tiroidea, in quanto causava l'inibizione della deionidasi, un enzima che si occupa della conversione degli ormoni tiroidei. Infatti negli individui a cui si è somministrata la sostanza si è sviluppato l'ipertiroidismo. Sempre nei topi sono state calcolate alcune dosi letali in riferimento ad alcuni composti, trovando che il DBDPE causava morte per ingestione a dosi maggiori di 5 g kg^{-1} di peso corporeo (*bw*), il BTBPE a dose 36.68 g m^{-3} per 4h di esposizione, in seguito ad inalazione, causava problemi comportamentali, respiratori e gastrointestinali. Invece nei conigli è stata testato l'effetto di DBDPE, BTBPE e PBEB trovando che le dosi letali siano rispettivamente 2 g kg^{-1} di peso corporeo (*bw*), 10 g kg^{-1} (*bw*) e 8 g kg^{-1} (*bw*) (Dong, 2021).

Anche per l'uomo PBDE e NBFR rappresentano una minaccia. Dato che la maggior concentrazione di queste molecole è stata trovata nelle polveri di ambienti chiusi come case ed uffici, dove l'uomo trascorre circa l'85% del tempo, è utile capire gli effetti di queste sostanze a livello tossicologico e il rischio associato per l'essere umano (Pasecnaja *et al.*, 2021). Il contatto con polveri contaminate in microambienti domestici chiusi è la via principale di esposizione per l'uomo. Essa può avvenire per

adsorbimento dermico da contatto diretto con materiali o per deposizione delle polveri sulla pelle. Ulteriori vie primarie di esposizione sono l'ingestione e l'inalazione (Ali *et al.*, 2011). È stato visto che i bambini sono più suscettibili all'esposizione, dato il loro continuo contatto con oggetti e superfici, oltre che il maggior tempo speso in casa (Kademoglou *et al.*, 2016).

Già da tempo è stato scoperto che i PBDE causano cancro, disturbi dell'ormone tiroideo, deficit dello sviluppo neurologico e riproduttivo. Alcuni NBFR sono strutturalmente simili ai PBDE, infatti mostrano potenziali effetti tossicologici causando disturbi al sistema neurale ed endocrino, oltre che essere persistenti e bioaccumulabili. È stata studiata la capacità di NBFR di superare la barriera emato-encefalica ed accumularsi nei tessuti cerebrali, causando problemi per le funzioni motorie e modificando i livelli di ormone tiroideo implicato nello sviluppo cerebrale. Soprattutto per DBDPE e BTBPE sono stati evidenziati possibili rischi per la salute legati a disturbi endocrini, effetti sullo sviluppo neurologico e comportamentale, epatotossicità e tossicità cardiovascolare, citotossicità, meccanismi molecolari specifici che causano cambiamenti dell'espressione genica, quindi proprietà genotossiche e cancerogene. Mentre tutti questi effetti son già stati ben evidenziati in uccelli, roditori e pesci (Dong, 2021).

Intorno all'inizio del XXI secolo, sono stati svolti numerosi studi di esposizione dell'uomo ai PBDE, mettendo in luce la loro tendenza a bioaccumularsi, tanto che queste sostanze sono state ritrovate nel sangue, nei tessuti adiposi e nel latte materno (EPA, 2010).

Anche NBFR quali HBB e TBP sono stati ritrovati nei tessuti adiposi umani, nel fegato, nel cervello, nel sangue e nel latte materno, in diverse parti del mondo. Per esempio in Giappone è stato trovato HBB nel tessuto adiposo a concentrazioni nell'intervallo 2.1 - 4.1 $\mu\text{g kg}^{-1}/w$. Lo stesso composto poi è stato trovato sia nel latte materno che nella placenta, in Danimarca e Finlandia, con intervallo di concentrazione che variavano da 0.008 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}/w$. Mentre nel nord della Cina nel 2009 è stato condotto uno studio che prendeva come campione di indagine centoventotto persone tra addetti alla pulizia, studenti e poliziotti. Su 26 campioni di siero si sangue umano è stato trovato HBB, con concentrazione media 0.27 $\mu\text{g kg}^{-1}/w$. In questo studio fu indagato anche il PBEB, ma le concentrazioni non superavano 0.01 ng in campioni da 5ml di sangue. Sono state condotte delle analisi simili per il TBP, ed esso è stato trovato in Norvegia a concentrazioni che variavano da 0.17 a 81 $\mu\text{g kg}^{-1}/w$ in diversi gruppi di lavoratori (produttori di oggetti elettronici, personale di laboratorio, smaltitori di elettrodomestici) (Covaci *et al.*, 2011).

Per cui, la qualità dell'aria degli ambienti chiusi è fondamentale per la salute umana, oltre alla ingestione di cibi di origine animale e vegetale non contaminati.

1.6.1 Fattore di Bioconcentrazione (BCF)

Riuscire a studiare le modalità attraverso il quale i microinquinanti organici entrano a fare parte della catena trofica e come si distribuiscono all'interno di essa è fondamentale e necessario per valutare concretamente il rischio che tali sostanze implicano per l'ambiente e per l'uomo. Le proprietà chimico-fisiche delle sostanze inquinanti ne determinano le capacità, e quindi le potenzialità grazie alle quali queste possono accumularsi internamente agli organismi e successivamente propagarsi all'interno di tutta la catena trofica. Tra queste proprietà le più significative sono: il carattere lipofilo e la stabilità chimica. Oltre alle proprietà intrinseche alle molecole devono essere considerate le caratteristiche abiotiche dell'ambiente dove esse si trovano disperse, in quanto ne determinano la mobilità e il rilascio. I parametri ambientali più importanti dunque sono la temperatura, salinità, gradienti di concentrazione, pH e potenziali redox. Un aspetto altrettanto importante sono i fattori biotici che riguardano le modalità di assunzione, il metabolismo, la concentrazione di lipidi e la posizione all'interno della catena trofica, nonché i parametri relativi alla biodisponibilità, intesa come quantità effettivamente disponibile per l'organismo vivente, rispetto alla quantità totale di sostanze presente. Quest'ultimo aspetto è influenzato sia da parametri biotici (modalità di assorbimento e trasporto) che abiotici (fattori ambientali e grado di contaminazione) (Hall, 2014).

Il meccanismo principale attraverso il quale un microinquinante organico è in grado di accumularsi internamente a un organismo è la *bioconcentrazione*. Questo fenomeno implica l'assorbimento di una sostanza chimica direttamente dall'ambiente in cui l'organismo si trova a contatto tramite semplici vie di *uptake* come la respirazione e il contatto dermico. La bioconcentrazione indica la tendenza di una sostanza ad accumularsi nel *biota* o nell'ambiente. La bioconcentrazione è il risultato del trattenimento di quella sostanza da parte dell'organismo che la assorbe, quindi inteso come assorbimento al netto delle escrezioni e trasformazioni metaboliche messe in atto dalla macchina biologica che ha inglobato la sostanza. Alcune sostanze tendono ad accumularsi preferenzialmente in siti o tessuti specifici all'interno dell'organismo, generando depositi di tossico. Nel caso di sostanze lipofile, per esempio, la ripartizione tra acqua e grasso del biota è riconosciuto come principale meccanismo di accumulo nel tessuto adiposo. Attraverso il processo di accumulo sito-specifico la

sostanza viene in parte sottratta alla distribuzione nel corpo, aumentando la concentrazione nell'organo bersaglio e quindi i potenziali effetti tossici e allo stesso tempo viene sottratta anche ai processi di eliminazione (Marchini, 2005).

Il grado di bioconcentrazione è stimato tramite un fattore adimensionale definito Fattore di Bioconcentrazione (*BCF*), calcolato secondo la formula:

$$BCF = \frac{C_a}{C_b}$$

Dove:

C_a = concentrazione della sostanza chimica all'*interno* dell'organismo considerato, espressa come massa su volume o massa su massa;

C_b = concentrazione *iniziale* della stessa sostanza chimica all'interno della matrice con cui l'organismo è a contatto, espressa come la precedente C_a ;

Il *bioaccumulo*, invece, è definito come il fenomeno per cui una sostanza chimica è assorbita da un organismo attraverso qualsiasi possibile via di esposizione, in un determinato ambiente. Per cui oltre al contatto dermico e la respirazione, si considera la assimilazione tramite la nutrizione. Questo parametro è molto simile a quello sopra descritto, ma prende in considerazione l'alimentazione come via di esposizione (Marchini, 2005).

Per i fini pratici di questo studio di tesi si prende in considerazione il BCF. Oltre a questo rapporto, saranno calcolati dei suoi derivati, ovvero:

-Il fattore di bioconcentrazione nelle radici, definito come RCF o RBCF, che corrisponde al rapporto tra la concentrazione della sostanza nelle radici e la concentrazione nel suolo, prima dell'esposizione.

-Il fattore di bioconcentrazione nei germogli definito come SCF o SBCF, che corrisponde al rapporto tra la concentrazione della sostanza nei germogli e la concentrazione della stessa nel suolo, prima dell'esposizione.

Un ulteriore parametro è stato preso in considerazione, ovvero il fattore di traslocazione (TF), definito come il rapporto tra le quantità di sostanza nei germogli rispetto a quella nelle radici. Questo è funzionale alla comprensione del movimento delle molecole internamente ai tessuti vegetali, dalle radici alle porzioni apicali (Coakley *et al.*, 2019).

Infine, per rendere più chiari questi aspetti di bioconcentrazione e di ripartizione interna alle piante, i diversi fattori sono confrontati con il coefficiente K_{ow} , indice del carattere lipofilo dei composti. Esso indica come una molecola si ripartisce tra la fase organica (del suolo e dei tessuti) e quella acquosa. Infatti questo valore è inversamente proporzionale alla solubilità in acqua, ed indica comportamenti fortemente idrofobici per valori del suo logaritmo ($\log K_{ow}$) maggiori di sei.

1.7 Degradazione dei Ritardanti di Fiamma Bromurati

I processi più importanti che interessano la degradazione di PBDE includono biodegradazione, biotrasformazione, degradazione termica e fotolisi. Biodegradazione e biotrasformazione possono avvenire in ambienti sia aerobici che anaerobici, sfruttando processi metabolici catalizzati da enzimi, per microrganismi, piante ed animali, volti a convertire e degradare le strutture molecolari di PBDE e NBFR. Il principio su cui si basano tali processi è quello di rimuovere gli atomi di bromo, riducendo il grado di bromurazione e quindi semplificando la struttura molecolare dei composti rendendoli più accessibili alla degradazione metabolica. Tuttavia se in letteratura si riscontrano molti studi e approfondimenti che rendano chiare le dinamiche di metabolismo e deterioramento di PBDE, lo stesso non si può dire per i ritardanti di fiamma emergenti, le quali rimangono in fase di studio ed approfondimento, rappresentando una sfida importante per la ricerca.

1.7.1 Fotodegradazione.

La fotolisi è un tipo di degradazione abiotica che avviene in atmosfera e nelle superfici del suolo e dell'acqua. Nello specifico è definita come la trasformazione fotochimica di una molecola in un suo derivato frammentato con un peso molecolare più piccolo, utilizzando come fonte di energia la radiazione solare (IUPAC, 1996). Tutti gli studi hanno mostrato che i PBDE con alto grado di bromurazione possono essere fotodegradati a congeneri con più basso contenuto di bromo, grazie all'assorbimento di fotoni presenti nella radiazione ultra violetta. Quindi si assiste alla rimozione di atomi di bromo per ottenere prodotti fotochimici a basso grado di bromurazione.

Uno studio ha sperimentato la fotodegradazione di BDE-28,-47,-99,-100,-153 e BDE-183, disciolti in esano. La concentrazione iniziale era pari a 150 ng mL^{-1} . La soluzione è stata sottoposta a esposizione

di luce UV, a una lunghezza d'onda pari a 290nm. Un controllo è stato tenuto in completa assenza di luce. Si è scoperto che tramite una reazione cinetica del primo ordine, i PBDE in questione sono stati degradati. In generale, i BDE con basso contenuto di bromo sono i primi a reagire e decomporsi, seguiti dalle molecole più sostituite. La reazione indotta dalla luce era una debromurazione riduttiva. Per esempio il BDE-28 (triBDE) è stato degradato a BDE-8 e BDE-15 (biBDE). Il BDE-99 (pentaBDE) è stato degradato nei congeneri BDE-66,-49 e 47 (tetraBDE). Il campione non trattato con luce UV, non ha subito alcuna alterazione, confermando il risultato (Fang *et al.*, 2008).

Un altro studio (Kajiwara *et al.*, 2007) ha preso in considerazione l'analisi di plastica trattata con BDE-209. Dopo una settimana di esposizione alla luce del sole, si è assistito alla diminuzione della concentrazione di decaBDE e la comparsa di congeneri quali epta-, octa- e nonaBDE come prodotti di fotolisi. In 112 giorni di esposizione si è assistito alla degradazione dell'80% di BDE-209, di cui il 5% in massa è stato convertito in congeneri a più basso grado di bromurazione e Dibenzofurani bromurati (PBDFs).

Per quanto riguarda la classe dei NBFR, la fotodegradazione comporta alla formazione di successivi prodotti debromurati. Si è notata l'importanza della matrice nella reazione di fotolisi mediata da luce UV. Per il DBDPE, quando sciolto in *n*-esano, il tempo di degradazione era pari a 16 giorni, per lo stesso incorporato in polistirene ad alto impatto, invece non si è assistito a nessuna rimozione in assenza di solvente (Kajiwara *et al.*, 2008). Per il BTBPE è stata notata la scissione del legame etero, oltre che la rimozione di atomi di bromo, nella reazione di fotodegradazione. Inoltre è favorita la debromurazione in posizione orto ai legami con l'ossigeno dell'etere, rispetto alla posizione para. Tra i prodotti di degradazione sono stati identificati composti tossici quali 2,4,6-tribromofenolo e il 2,4-dibromofenolo, questo aumenta il potenziale di rischio legato al rilascio di BTBPE in ambiente (Zhang, 2016). Un altro studio ha evidenziato che il PBEB può essere rimosso dall'acqua irradiata con luce UV, per il 15,9% in soli 45min. In generale la reazione di fotodegradazione provoca la scissione del legame etero, l'estrazione di bromo e la scissione del legame C-C, portando a composti con una minor concentrazione di bromo (Khaled, 2018).

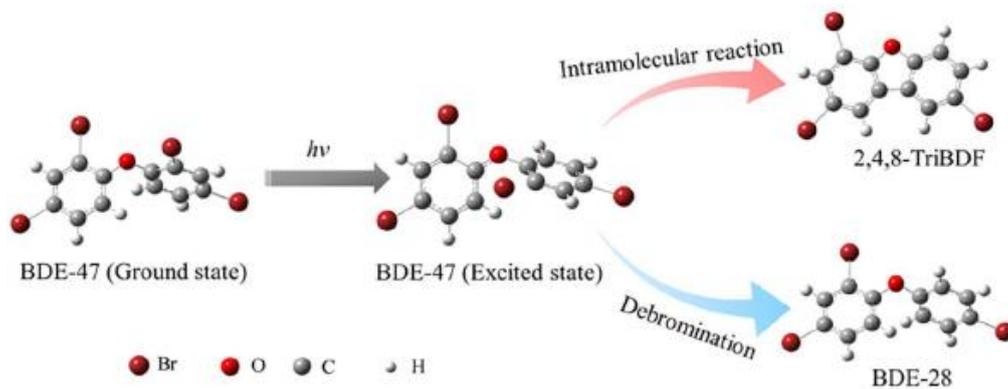


Figura 7: Schema di Fotodegradazione del BDE-47 (Wang et al., 2018)

1.7.2 Degradazione Termica

I PBDE e NBFR sono aggiunti come additivi alle plastiche per ritardare la propagazione del fuoco e inibire il processo di combustione. Questi interferiscono formando un gas di bromo, che toglie ossigeno necessario per l'ossidazione, mentre la formazione di radicali di bromo ostacolano le reazioni a catena dell'idrogeno e dei radicali ossidrilici. Inevitabilmente la combustione di materiali trattati, porta all'emissione di prodotti di combustione quali PBDFs. Il BDE-209 scaldato a 500°C forma bifenili bromurati con minor atomi di bromo, i quali se sottoposti ad ulteriore combustione, provocano la formazione di furani bromurati e dibenzo-p-diossine polibromurate, PBDD (Rupp, 2005). È stato studiato che anche durante i cicli di estrusione della plastica trattata con PBDE, a 275°C, dal BDE-209 si possono formare ed emettere congeneri octaBDF, benzeni e fenoli polibromurati, per debromurazione seguita dalla sostituzione con un atomo di H. Anche per NBFR sono stati scoperti prodotti tossici derivanti dalla degradazione per combustione. Per esempio per il BTBPE a 340°C avviene la scissione del legame alifatico C-O con conseguente formazione di tribromofenolo, viniltribromofenil etere e dibenzodiossine (Ping, 2019). In uno studio per la determinazione di DBDPE nei pesci del sistema fluviale di un'area fortemente industrializzata, in sud della Cina, sono stati scoperti prodotti degradazione termica altamente tossici, associati all'analisi strumentale e non direttamente presenti in ambiente. Questo pone ancora di più l'attenzione sulla potenziale tossicità e il potenziale rischio ambientale associato ai NBFR e i loro prodotti di degradazione (He, 2012).

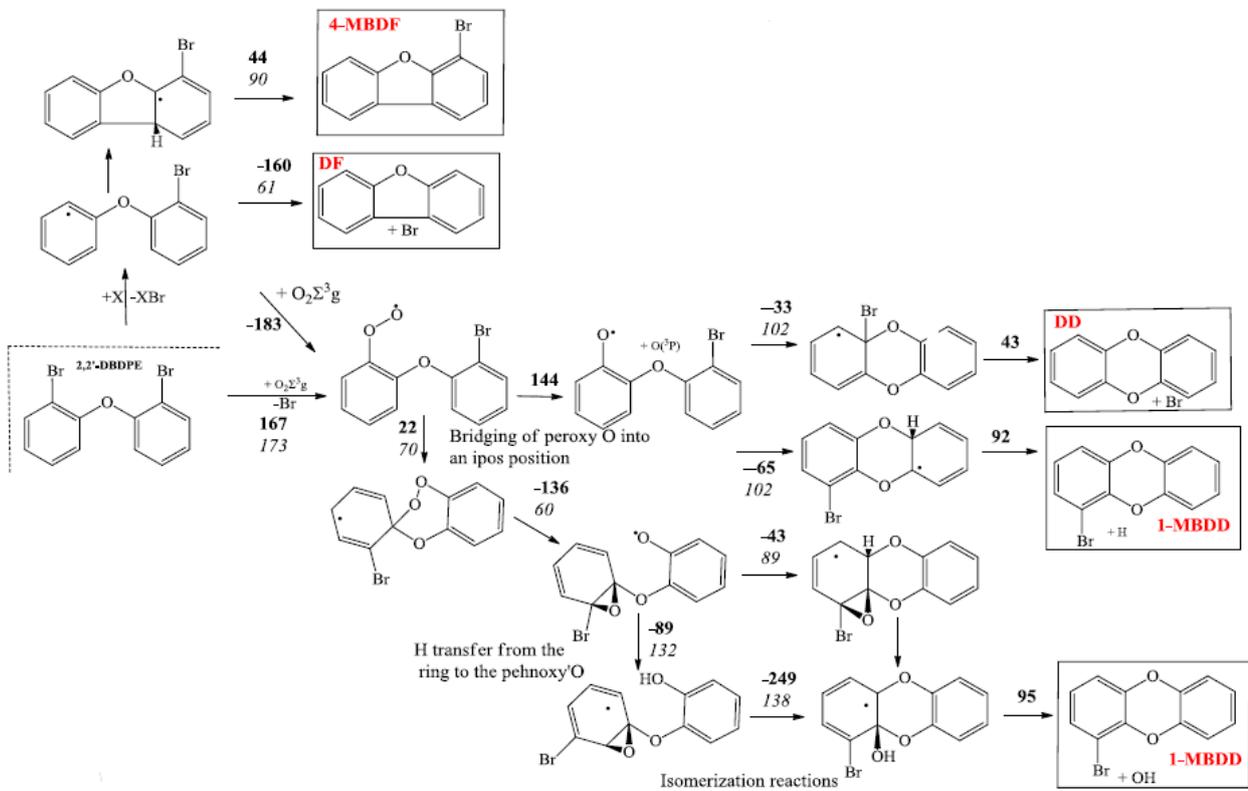


Figura 8: Schema di degradazione termica e formazione di Diossine (Altarawneh et al., 2019)

1.7.3 Biodegradazione e Biotrasformazione

Il comportamento di trasformazione dei PBDE nel suolo e nei sedimenti dipende fortemente dal grado di bromurazione e dalla concentrazione di ossigeno, materia organica e microrganismi in questi compartimenti. In generale, i composti a bassa bromurazione tendono a degradarsi in condizioni aerobiche, mentre i composti ad alta bromurazione si degradano principalmente in condizioni anaerobiche (Zhu et al. 2014).

1.7.3.1 Microorganismi.

I microorganismi sono in grado di usare i contaminanti come fonte di carbonio per lo sviluppo cellulare e la crescita, nonché estrarre elettroni, provocando la rottura dei legami, per ottenere energia chimica. Un tipo di reazione che interessa la degradazione dei composti bromurati da parte dei batteri è la dealogenazione riduttiva, dove è promossa la rimozione di un atomo di bromo in sostituzione ad un atomo di idrogeno. Questo solitamente è il primo *step* del metabolismo batterico per i PBDE ad alto peso molecolare. Per esempio il *Sulfurospirillum multivorans* è stato in grado di debromurare il decaBDE, portando alla formazione di composti bromurati a più basso peso molecolare come octaBDE e eptaBDE. Il batterio *Dehalococcoides ethenogenes*, isolato da un digestore anaerobico di impianto di trattamento delle acque reflue contenente fanghi di depurazione, è stato in grado di ridurre l'octaBDE disciolto in TCE (tricloroetilene) portando alla formazione di penta-, esa-, e eptaBDE. Da questi studi è emerso che i bromi nelle posizioni 2 (orto) e 4 (para) sulla molecola PBDE erano i più resistenti alla debromurazione riduttiva microbica (He *et al.*, 2006). Un altro studio ha dimostrato l'importanza di batteri anaerobici, isolati da fanghi di depurazione, nella potenziale rimozione di BDE-209. Un campione di sedimento è stato trattato con BDE-209, BDE-99 e BDE-47, messo a contatto con tali microorganismi, simulando l'ambiente dei digestori anaerobici, aggiungendo 5 m moli di titanio citrato (usato come agente riducente donatore di elettroni). In 24 ore il BDE-209 è stato completamente debromurato formando congeneri quali BDE-47, -66 e -119 (Tokarz *et al.*, 2008).

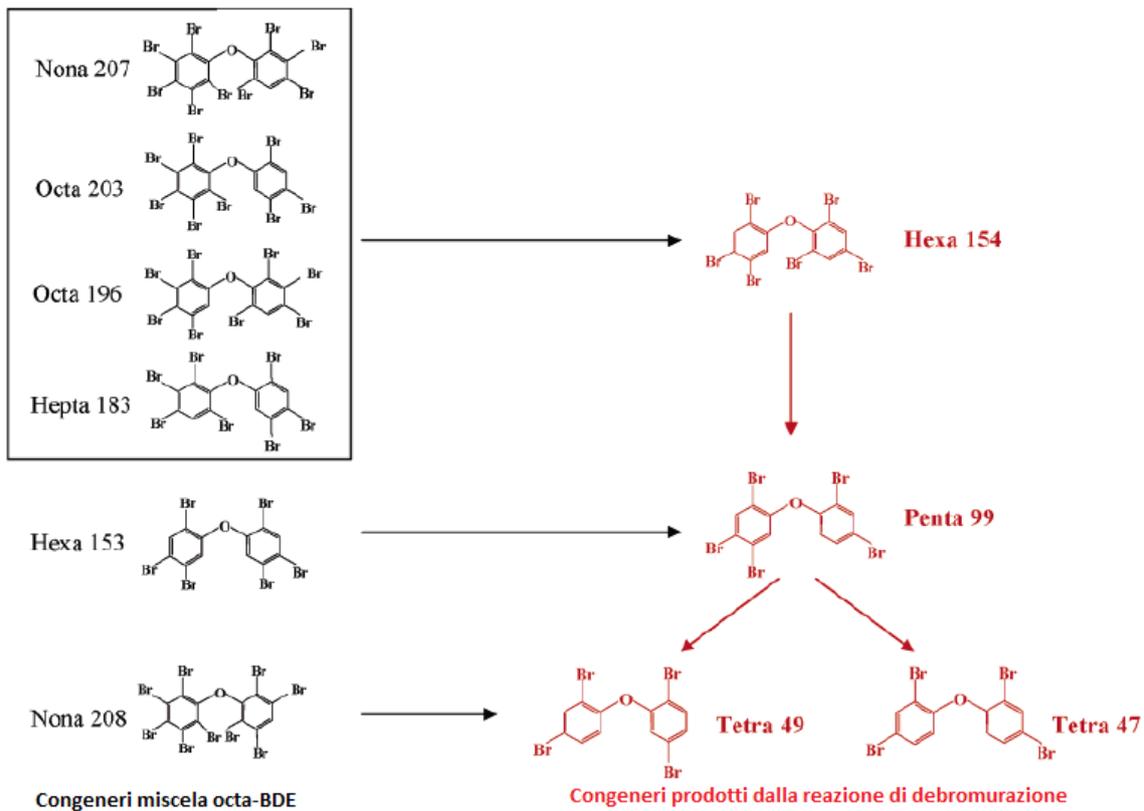


Figura 9: Congeneri prodotti dalla debromurazione riduttiva di ANAS195 a partire della miscela octa-BDE (He et al.,2006)

Non esistono ancora studi diretti sulla degradazione microbica di NFBR da parte di funghi o batteri specifici, ma sono stati condotti studi sulla degradazione nel suolo, attribuendo i risultati al processo microbico. Si è scoperto che l'attività degradativa microbica di NFBR è legata alla presenza di ossigeno nel suolo. Per esempio per HBB in un terreno aerobico l'emivita era di 22 giorni, nettamente inferiore rispetto ad un terreno anaerobico dove essa era di 120 giorni. Anche per il TBECH è stato notato lo stesso comportamento (Nyholm *et al*, 2010).

1.7.3.2 Piante.

I PBDE vengono mineralizzati mediante debromurazione graduale o trasformati mediante reazioni di idrossilazione e metossilazione nella rizosfera, portando alla formazione di prodotti di trasformazione idrossilati (OH-PBDE) e metossilati (MeOPBDE), in condizioni aerobiche, nel suolo (Dobslaw, 2021). Uno studio basato sulla contaminazione del suolo da BDE-209 ha evidenziato queste trasformazioni

caratteristiche proprie delle piante. Infatti nel tessuto vegetale sono stati rilevati BDE con grado di bromurazione inferiore (da Br2 a Br9) e cinque diversi OH-BDE/MeO-BDE. Il rapporto tra Br2-BDE e Br5-BDE nel tessuto vegetale era maggiore che nel suolo, e i prodotti di idrossilazione e metossilazione sono stati trovati esclusivamente nei tessuti vegetali, escludendo questi composti come prodotti del metabolismo dei batteri presenti nel suolo (Huang *et al*, 2010). Un approfondito studio condotto sul mais, in condizioni di crescita idroponica, ha evidenziato la sua capacità di degradazione di PBDE. In particolare si è assistito alla trasformazione nella radice di BDE-47, molecola a quattro atomi di bromo, in 6-MeO-BDE-47, seguito da 5-MeO-BDE-47 e due composti a più basso grado di bromurazione (BDE contenenti due e tre atomi di Br). Le concentrazioni di BDE-47 sono diminuite progressivamente nel tempo, facendo intuire che quest'ultimo fosse stato mineralizzato e assorbito dalla pianta. Pertanto, è stata dimostrata la presenza parallela di reazioni di debromurazione, idrossilazione e metossilazione come meccanismi di trasformazione per gli organismi vegetali. Tuttavia, il comportamento di assorbimento e trasformazione delle piante dipende fortemente dalle specie vegetali, dal consorzio microbico stabilito nella rizosfera e dalle condizioni climatiche (Wang *et al.*, 2012).

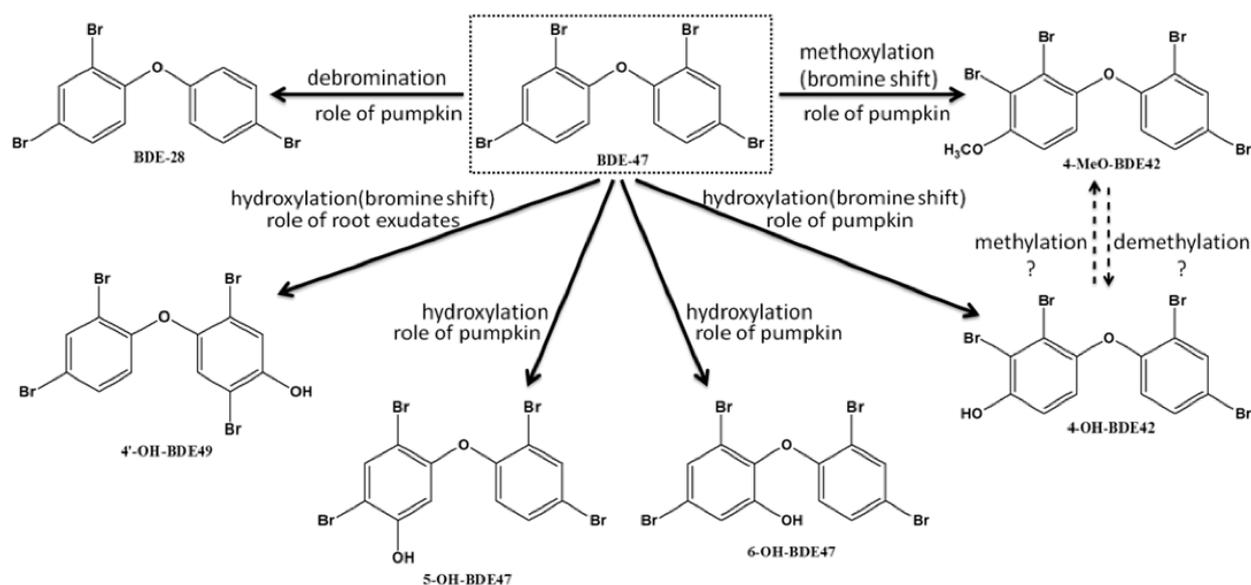


Figura 10: Reazioni metaboliche di trasformazione del BDE-47 da parte della zucca (Zhang *et al.*, 2021)

1.7.3.3 Pesci.

Alcuni pesci sono in grado di rimuovere atomi di bromo, in posizione para e meta da PBDE ad alto peso molecolare, per formare congeneri a minor grado di bromurazione. Questo avviene principalmente nel tratto gastrointestinale e nel fegato tramite tre possibili percorsi: enzimi di regolazione dell'ormone tiroideo deiodinasi, l'attività microbica endogena nell'intestino o gli enzimi di il sistema microsomiale mono-ossigenasi (Stapleton *et al.*, 2006). Non è noto se tutti i pesci abbiano la capacità metabolica di *biotrasformare* i PBDE, né il tasso di debromurazione dei PBDE vari tra le specie ittiche. Un'importante conferma sulla capacità di metabolizzare il BDE-209 è stata fornita tramite uno studio che coinvolgeva la trota iridea. Dopo cinque mesi di esposizione a una dose pari a 9.4µg di BDE-209 per chilogrammo di peso per giorno, sono stati analizzati i tessuti dei pesci evidenziando che il fegato fosse il maggiore tessuto di accumulo. La debromurazione è stata confermata dalla comparsa di congeneri bromurati inferiori durante il periodo di esposizione. Sono stati trovati congeneri BDE-188, BDE-201, BDE-202, BDE-207 e BDE-208 nei tessuti dei pesci esposti, che non erano presenti nella dieta. Un risultato molto simile è stato raggiunto studiando le carpe esposte a una miscela contenente BDE-99 e BDE-183. In questo caso sono stati trovati nel tratto intestinale BDE a più basso grado di bromurazione quali BDE-47, BDE-28 e BDE-153. Questi studi confermano che i PBDE più sostituiti sono stati debromurati con successo attraverso una via metabolica nei pesci. Il meccanismo esatto rimane sconosciuto. La teoria attuale suggerisce che gli enzimi coinvolti nel catabolismo dell'ormone tiroideo, così come gli enzimi epatici, possono svolgere un ruolo nella biotrasformazione delle specie bromurate superiori in congeneri bromurati inferiori (Stapleton, 2004).

Non si conoscono ancora i percorsi metabolici per NBFR. Per esempio Il BTBPE non ha mostrato alcun metabolismo significativo nei microsomi di fegato di carpa e pesce gatto catturati dal lago Taihu in Cina (Zheng *et al.*, 2018). Invece, la deplezione di BTBPE, HBB, PBEB e EH-TBB è stata osservata in vitro in tutte le frazioni del fegato di diverse specie di pesci marini quali *Epinephelus septemfasciatus*, *Konosirus punctatus*, *Mugli cephalus* e *Sebastes schlegelii*, acquistati da un mercato ittico locale a Seoul, Corea del Sud. Tutti i BFRs testati hanno mostrato una cinetica di deplezione del primo ordine sebbene i metaboliti non siano stati identificati (Lee *et al.*, 2019).

1.7.3.4 Uccelli

Evidenze sulla capacità di degradazione di PBDE tramite debromurazione per via metabolica sono state riscontrate anche negli uccelli. Per quattordici settimane un campione di polli è stato esposto a una formulazione di BDE. Gli autori hanno studiato le percentuali di assorbimento/ escrezione dei congeneri del BDE. Sono state trovate porzioni più elevate di composti bromurati inferiori quali BDE-47, BDE-100 e BDE-99 negli escrementi, rispetto agli esa- ed epta-BDE. Da qui gli studiosi hanno dedotto che l'eccesso di BDE-47 nelle escrezioni non era legato al suo mancato assorbimento nel tratto intestinale, ma evidenziava la presenza di una via metabolica in grado di promuovere una reazione di debromurazione. Lo stesso risultato è stato ottenuto per il BDE-153 e BDE-154, degradati rispettivamente a BDE-99 e BDE-100 (Pirard, 2007). A conferma di questa capacità metabolica si aggiunge un studio sulla distribuzione di BDE-209 nei tessuti dello Storno comune. In particolare quattro storni adulti sono stati esposti per 76 giorni a una dose pari a 23.4 µg di decaBDE al giorno. Alla fine del periodo di esposizione sono stati analizzati i muscoli pettorali e il fegato. Venne quindi scoperto che il BDE-209 si accumula nei muscoli a una velocità doppia che nel fegato, a causa della maggior attività metabolica di quest'ultimo. Oltre a BDE-209 sono stati rilevati congeneri a più basso grado di sostituzione di atomi di bromo, quali BDE-197, BDE-196 e BDE-183, sia nel fegato che nei muscoli, a prova della debromurazione metabolica del decaBDE (Van den Steen *et al.*, 2007).

Sono state indagate le capacità metaboliche di degradazione di NBFRs quali BEH-TEBP e EH-TBB. Lo studio era basato sulla quantificazione dei due ritardanti di fiamma emergenti nelle uova di *Haliaeetus leucocephalus*, tra il 2000 e il 2012. Sono stati rilevati livelli misurabili di metaboliti quali TBBA e EH-TBP, mentre nessuno dei composti di partenza è stato trovato. L'assenza dei due NBFRs conferma la capacità di trasformazione metabolica dell'aquila calva (Stubbings *et al.*, 2018). Un altro recente studio ha messo in evidenza la presenza di TBP-AE e TBP-BAE, due metaboliti del TBP-DBPE (noto anche come DPTE) nelle uova di falco pellegrino, raccolte in Germania meridionale. Le concentrazioni di questi, rispetto al composto di partenza, erano di un ordine di grandezza inferiore. Tuttavia gli autori non hanno discusso la possibilità di formazione di TBP-AE da fonti alternative (Vetter *et al.*, 2017).

1.7.3.5 Mammiferi

I mammiferi sono consumatori secondari e come tali si trovano più esposti all'accumulazione di molecole persistenti, le quali derivano dagli organismi che occupano livelli più bassi della catena trofica. Vista la spiccata tendenza di bioaccumulazione, quindi la possibilità di biomagnificazione di PBDE e NBFR, è utile indagare sulla capacità di questi organismi per quanto riguarda la degradazione metabolica dei composti in questione. La letteratura scientifica ha messo in luce questa capacità in diversi mammiferi. È stata infatti dimostrata la capacità di debromurazione dei PBDE da parte dei gatti. Lo studio investigava la correlazione tra l'insorgenza di ipertiroidismo nei gatti e l'ingestione di cibo e polveri contaminati da PBDEs. I BDE-47, -99, -207 e BDE-209 sono stati ritrovati in 23 campioni di siero di sangue di gatti posti sotto esposizione. La prova del fatto che avviene un effettivo metabolismo è data dalla comparsa di congeneri non presenti nell'alimentazione e nelle polveri, e che il BDE-209, il quale rappresentava l'83-93% del peso totale dei PBDEs nelle due matrici, sia stato rinvenuto nel siero per solo il 21-30%, mentre la concentrazione di BDE-207 è complessivamente aumentata (Dye, 2007).

La debromurazione in vivo è stata testata ulteriormente per i PBDE in uno studio condotto sui topi. Venne messa in luce la capacità metabolica di degradazione di tali molecole da parte di esemplari maschi di *Sprague-Dawley* (specie *Mus musculus*) sottoposti ad alimentazione contaminata da decaBDE (98,5 % BDE-209). Diciotto ratti sono stati alimentati con una dose orale giornaliera pari a $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ ogni giorno, per 21 giorni. Ogni tre giorni vennero raccolti campioni di urina e feci, prima di prelevare sangue (plasma), fegato e tratto gastrointestinale. L'evidenza della debromurazione metabolica del BDE-209 ai congeneri inferiori è stata osservata da un apparente aumento del 160% della concentrazione tissutale di BDE-197, BDE-201 e BDE-207 rispetto ai livelli nel mangime. I ricercatori hanno ipotizzato che la possibile presenza di BDE-197 e BDE-207 risultasse dalla rimozione di atomi di bromo dalle posizioni meta sulla molecola BDE-209. Diversamente, la formazione di BDE-201 avveniva dalla debromurazione lungo le posizioni para e meta della stessa (Huwe, 2007). Il ratto potrebbe servire come indicatore dell'eventuale possibilità che la trasformazione metabolica dei congeneri BDE avvenga generalmente nei mammiferi, compreso l'uomo.

Una recente *review* sulla degradazione metabolica di ritardanti di fiamma emergenti ha evidenziato come alcuni organismi appartenenti al *phylum* mammalia siano in grado di trasformare queste nuove molecole. Per il BTBPE sono stati identificati più metaboliti nei prodotti di escrezione di topi

sottoposti a esposizione tramite dieta. Questi erano il risultato di reazioni di debromurazione, ossidazione e/o scissione del legame etereo. Sono stati quindi rinvenuti nelle feci e nelle urine prodotti di scarto quali OH-BTBPE, due isomeri OH-pentabromo-bisfenossi etano, OH-tetrabromo-bisfenossi etano, 2,4,6-TBP e 2,4,6-tribromo-bisfenossi etano. Sempre nei ratti sono stati trovati prodotti di degradazione per il DBDPE, in particolare sono stati isolati ed identificati solo due metaboliti, corrispondenti ai coniugati metil- ed etilsulfonil nona-BDPE. La riduzione significativa di DBDPE è stata osservata ulteriormente nei microsomi di fegato di orso polare, beluga e foca ad anelli, nello specifico per quanto concerne gli orsi polari sono stati recuperati due metaboliti fenolici del DBDPE non presenti nei controlli. Anche per quanto riguarda l’HBB, nelle feci di ratti esposti ad esso, si è potuto appurare la presenza di metaboliti derivanti dalla sua degradazione nel fegato. Questi composti debromurati contenevano ossigeno e zolfo, nonché tiolo e metilmercaptano. Gli autori hanno constatato che il risultato derivasse dall’idrolisi dei coniugati di glutazione o per reazione con la metionina (Smythe, 2022).

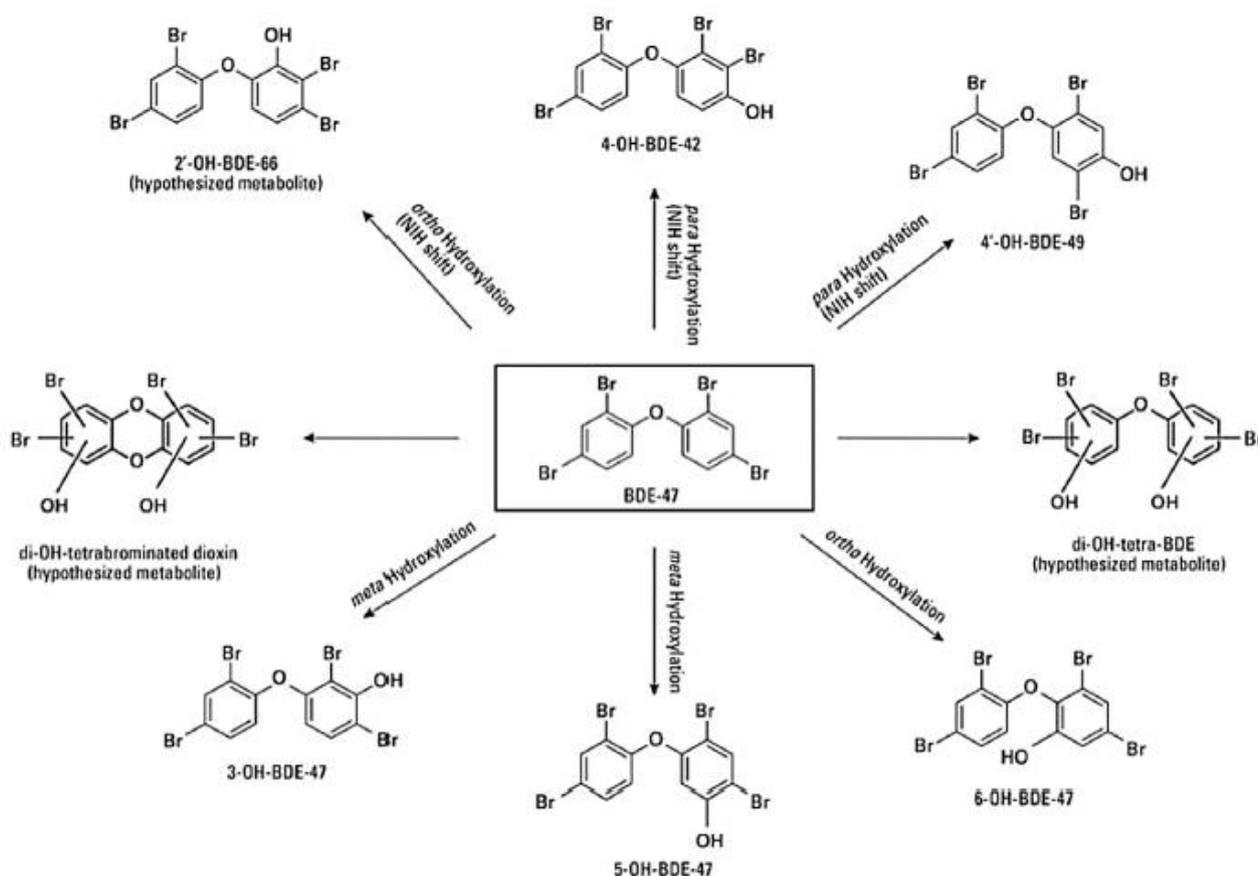


Figura 11: Metabolismo ossidativo del BDE-47 da parte del gene umano CYP2B6 (Costa et al., 2014)

Nonostante vi siano delle informazioni valide sul metabolismo dei ritardanti di fiamma emergenti, per comprendere meglio il loro bioaccumulo e il loro destino negli organismi ad essi esposti, è necessaria una futura ed approfondita ricerca in vitro e in vivo sul metabolismo e sulla biotrasformazione degli E/NBFRs.

1.8 Assorbimento Vegetale

A causa dell'alto volume di impiego in svariati campi di applicazione e data la possibilità di trasporto atmosferico, i ritardanti di fiamma bromurati sono composti tossici ubiquitari riconosciuti. La contaminazione del suolo, il maggior "pozzo" di BFR, è dovuta principalmente a due fenomeni:

- la deposizione atmosferica, la cui fonte principale sono i processi di smaltimento, riciclo ed incenerimento di rifiuti elettronici nella quale i composti bromurati: si volatilizzano, si legano al particolato atmosferico entrando in fase gassosa dove sono soggetti al trasporto atmosferico a lungo raggio ed infine si depositano sul suolo (Britis, 2019);
- i fanghi inquinati in uscita da impianti di depurazione di acque reflue urbane impiegati come ammendanti e fertilizzanti agricoli, dove i PBDE e NBFR si concentrano (Ping *et al.*, 2019).

Di conseguenza, la presenza di questi composti nei suoli impiegati in agricoltura è un dato di fatto, il che implica l'accumulo di PBDE e NBFR in tessuti vegetali e ortaggi, che successivamente possono essere trasferiti all'uomo tramite dieta.

I ritardanti di fiamma bromurati sono una categoria molto ampia che comprende una vasta gamma di molecole con pesi molecolari variabili da 300 a 1000 g mol⁻¹, lipofilità e volatilità variabile (log *K_{ow}* compresa tra 6 e 10, log *K_{oa}* compresa tra 9 e 16) e diverse solubilità (compresa tra 1E-3 e 1E-7 mg L⁻¹) per cui i meccanismi di assorbimento e trasporto da parte delle piante sono diversi a seconda del congenere presente nel suolo e dipendono fortemente dalle caratteristiche chimico-fisiche dei composti stessi. Oltre al composto in sé, la quantità e le modalità di assorbimento dipendono dalla specie di pianta che si trova a contatto con il composto. I parametri identificati che più influenzano questo aspetto sono: contenuto di lipidi in foglie e radici, contenuto di carboidrati, contenuto di fibre, morfologia delle foglie e delle radici. Per esempio, la presenza di ampie foglie ed un abbondante contenuto di cere nella cuticola e negli stomi, aumentano l'assorbimento potenziale dalla fase gassosa e l'adsorbimento fogliare (Zhao *et al.*, 2009). Anche la grandezza e l'estensione delle radici

che penetrano nel suolo hanno un ruolo importante, in quanto aumentando la superficie di contatto suolo-radice è possibile avere un maggiore adsorbimento dei composti sulla parete esterna, prima che questi siano assorbiti internamente, in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche dei composti. Il contenuto lipidico delle radici ha un importante ruolo nell'*uptake* di composti organici, in particolare è stata trovata una correlazione positiva tra il contenuto di lipidi e il contenuto di ritardanti di fiamma nelle radici, questo però avviene a discapito della successiva traslocazione, in quanto i composti fortemente lipofili tenderanno ad immobilizzarsi nell'apparato radicale (Jian *et al.*, 2020).

In generale, ritardanti di fiamma bromurati con masse molari più basse e minor carattere lipofilo (grado di bromurazione tra Br2 - Br6) come BDE-47, BDE-99, HBB, PBEB sono più facilmente assorbiti per via suolo-radici e trasferiti ai germogli. I PBDE e NBFR con masse molari e valori di log *K_{ow}* più elevati (con grado di bromurazione tra Br7 - Br10) vengono assorbiti dalle piante non direttamente dall'apparato radicale, ma preferibilmente attraverso il percorso atmosferico dopo essersi depositati ed adsorbiti sulle foglie. Tuttavia, è stato visto che la presenza di congeneri ad alto grado di bromurazione si accumulano nel suolo e vengono rinvenuti nelle radici delle piante, dove si trovano adsorbiti sulle pareti esterne a diretto contatto con essi.

Per cui i principali meccanismi di *uptake* da parte delle piante sono:

- l'assorbimento radicale attivo e passivo dal suolo e dall'acqua;
- la deposizione atmosferica fogliare con conseguente assorbimento (Dobslow *et al.*, 2021).

I BFRs aerodispersi da fonti di inquinamento o volatilizzati dal suolo, possono raggiungere le parti aeree delle piante sotto forma di gas e legati al particolato attraverso deposizione umida o secca. La superficie delle foglie, come già accennato precedentemente, contiene cuticole e stomi cerosi che consentono ai composti idrofobici di legarsi e penetrare all'interno delle foglie. Lo scambio all'interfaccia aria-foglia è un processo chiave per i tessuti aerei per assorbire e accumulare BFR. Gli studi hanno evidenziato che sia deposizioni gassose che quelle legate a particelle, in atmosfere molto inquinate, contribuiscono per oltre l'80% dell'assorbimento di ritardanti di fiamma bromurati. Il contributo dell'assorbimento stomatico e della penetrazione della cuticola cerosa rimane sconosciuto. Si ritiene generalmente che la penetrazione attraverso lo strato ceroso della cuticola possa essere la via principale per l'assorbimento fogliare di inquinanti organici idrofobici, mentre l'assorbimento stomatico diretto può essere trascurato. Però, quest'ultimo è promosso in piante ad

alta densità stomatica. Per avere una maggiore conoscenza su questi aspetti sono necessari studi più approfonditi con l'impiego di microscopi sofisticati in grado di rivelare in modo più chiaro e accurato i percorsi di assorbimento fogliare e di traslocazione degli inquinanti internamente alla foglia, nonché il luogo di stoccaggio finale (Zhang *et al*, 2021).

L'assorbimento radicale è la principale modalità di *uptake* e accumulazione di BFR, specialmente nei primi stadi di vita della pianta. Nei sistemi suolo-radice, i BFR vengono desorbiti dalla componente organica del suolo e adsorbiti sulle pareti esterne delle radici, e in base alla lipofilità e la grandezza delle molecole, possono penetrare o meno l'epidermide. Una volta superata l'epidermide esterna migrano radialmente all'interno della radice attraverso via *simplastica* (internamente alla membrana cellulare tramite i plasmodesmi, sottili canali setosi che attraversano le pareti esterne delle cellule vegetali collegano i citoplasmi in un continuum) o via *apoplastica* (attraverso lo spazio intercellulare tra la parete cellulare e la membrana, senza penetrare internamente nel citoplasma). I composti che si trasferiscono per via apoplastica attraversano una membrana lipidica (plasmalemma) per entrare nel fascio vascolare in quanto non sono in grado di attraversare la banda di Caspary, una stratificazione continua di materiale idrofobo che riveste le pareti cellulari longitudinali e trasversali delle cellule che costituiscono l'endoderma, con ruolo di barriera idrofobica tra corteccia e fascio vascolare (Miller *et al*, 2006). Si può affermare che la capacità di un inquinante di entrare nella radice e raggiungere il fascio vascolare dipende dalla permeabilità della membrana cellulare alla sostanza, che potrà diffondere attivamente o passivamente.

Per i BFR è stata indicata la capacità di entrare nel fascio vascolare attraverso vie passive dipendenti dalle concentrazioni esterne, tanto che si sono trovate concentrazioni di BDE-209 simili tra radici vive e morte, suggerendo la penetrazione attraverso via apoplastica per diffusione passiva secondo gradiente di concentrazione (Chow *et al*, 2015). È stato studiato che l'idrofobicità è indice della capacità di un inquinante organico di penetrare nel fascio vascolare per via apoplastica, in particolare sono favoriti i composti con valori di $\log K_{ow}$ compreso tra 1 e 5. Anche le crepe che emergono durante lo sviluppo delle radici laterali possono fornire un percorso di entrata diretta per gli inquinanti bromurati (Li *et al*, 2020).

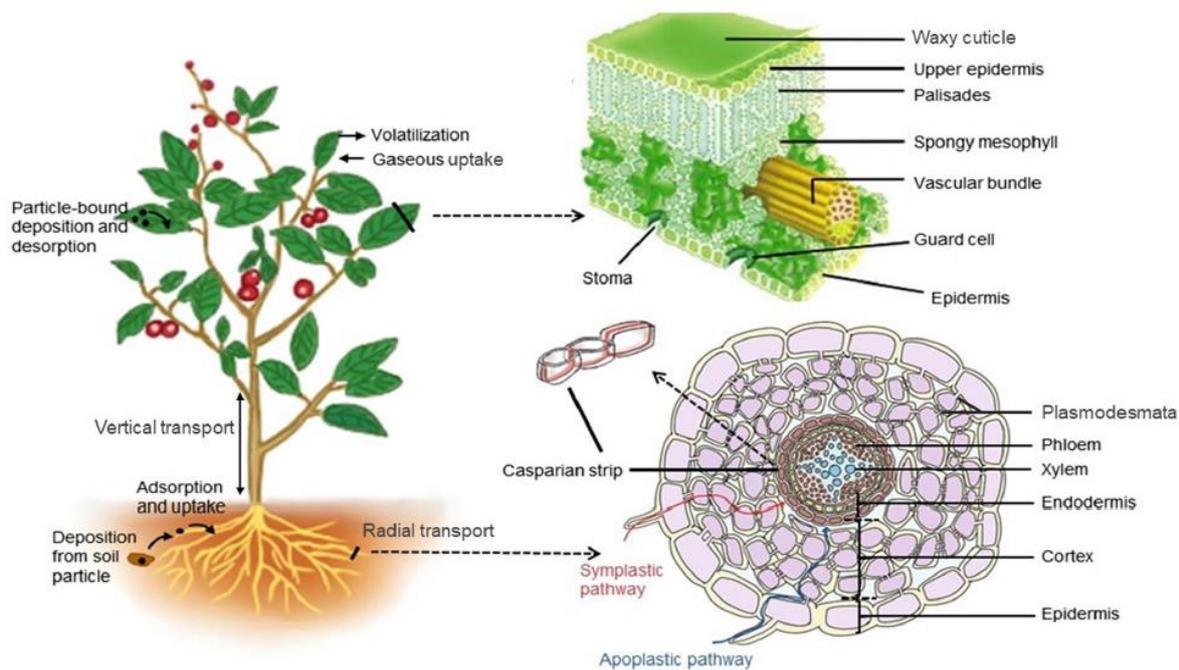


Figura 12: Meccanismi di uptake per i BFRs (Zhang et al, 2021)

L'aspetto più importante che influenza l'assorbimento e il trasporto interno di PBDE e NBFR da parte delle piante riguarda le caratteristiche chimico-fisiche dei composti. In particolare è il valore $\log K_{ow}$, indice della lipofilità strettamente correlato al grado di bromurazione, il principale fattore di riferimento. I congeneri come DBDPE e BDE-209 hanno bassa mobilità nell'*uptake* radicale a causa dell'elevato carattere lipofilo. La mobilità si vede essere un aspetto principale dell'assorbimento vegetale, tanto che congeneri a più alto grado di bromurazione si trovano adsorbiti nelle particelle di suolo e nelle pareti esterne delle radici. Il processo di assorbimento radicale e di traslocazione è anche influenzato dalla traspirazione, che provoca il flusso di trasporto di acqua e sostanze attraverso lo xilema della pianta, dalle radici fino alle foglie. Ad alti livelli di traspirazione si sono registrati alti livelli di *uptake* radicale e traslocazione interna dei congeneri bromurati (Zhao et al, 2012). Per studiare al meglio queste dinamiche i valori di $\log K_{ow}$ vengono rapportati al fattore di concentrazione nelle radici (RCF) e il fattore di traslocazione nei germogli (TF). In particolare è stata trovata una correlazione negativa tra il valore di $\log K_{ow}$ e i valori di RCF, nei sistemi radice-suolo. Questo effetto può essere spiegato sia dalla scarsa solubilità in acqua e, quindi, dal limitato assorbimento delle radici con la fase di umidità del suolo, sia dal forte adsorbimento di PBDE e NBFR nella materia organica del suolo (SOM) che può limitare il trasferimento di composti idrofobici alle radici. Infatti valori più elevati di RCF sono stati registrati per ritardanti di fiamma bromurati con valori di $\log K_{ow}$ minori.

Un'affermazione generale sulla correlazione dei valori log K_{ow} e TF non è appropriata, poiché non è stata trovata una chiara correlazione positiva o negativa. Il valore di TF dipende dalle capacità della specie, dal contenuto lipidico dei germogli, dall'età della pianta, dalla distanza del tessuto vegetale aereo dal plesso radicale, nonché da numerosi altri parametri, in parte non sufficientemente determinati. Per esempio tramite lo studio di piante di riso, è stata trovata una correlazione negativa tra log K_{ow} e TF, a bassi livelli di concentrazione di PBDE, al contrario una correlazione positiva a livelli di contaminazione maggiori. Nel pomodoro invece è stata trovata una correlazione positiva tra TF e log K_{ow} , in questo caso si pensa che i composti idrofobici si leghino alle principali proteine nello xilema (Zhang *et al.*, 2021).

Affinché la traslocazione avvenga i composti devono raggiungere lo xilema e quindi oltrepassare diversi strati quali epidermide, la corteccia, l'endoderma, il periciclo e superare le membrane cellulari. È la combinazione di solubilità in acque e solubilità attraverso le membrane cellulari che determina il passaggio iniziale all'interno delle radici e la conseguente traslocazione verso i germogli. Solitamente composti più polari e lipofili sono meno in grado di attraversare le membrane fosfolipidiche dell'endoderma e possono però rimanere ritenute internamente alla pianta (Collins *et al.*, 2006). Composti con log K_{ow} compresa tra 2 e 4 hanno maggior potenzialità di essere assorbiti e trasferiti all'interno della pianta. Il trasferimento e l'accumulo nei germogli è principalmente influenzato: dal raggiungimento dell'equilibrio tra la fase acquosa nei germogli e i *chemicals* nello xilema e dall'assorbimento dei *chemicals* dalla componente lipidica dei germogli. In particolare è stata osservata una maggior traslocazione e presenza di POPs in germogli per molecole con valori di log K_{ow} più bassi, in grado di raggiungere l'equilibrio più facilmente e di legarsi con i lipidi.

È comunque difficile stabilire quale sia il valore effettivo di TF, in quanto i ritardanti di fiamma, invece che essere traslocati nelle foglie, potrebbero trovarsi direttamente nel particolato atmosferico e depositarsi rimanendo adsorbiti sulla superficie fogliare. In generale, i BFR adsorbiti sulla superficie esterna della radice, quindi, possono migrare radialmente all'interno della pianta per via apoplastica o via simplastica per raggiungere il fascio vascolare e trasferirsi verso i tessuti aerei. È stato proposto che l'accumulo degli inquinanti nelle parti inferiori dei germogli fosse dovuta ad una partizione passiva tra il germoglio e il flusso di traspirazione e si è notato che le concentrazioni tendono a diminuire gradualmente dalla radice allo stelo. Nella maggior parte dei casi infatti a causa della partizione tra inquinanti e lipidi radicali, insieme al blocco delle strisce caspariane, si hanno bassi valori di traslocazione verso l'alto. L'effetto dell'assorbimento o della traslocazione dei PBDE e NBFR

non è ancora del tutto compreso, ovvero il comportamento di bioaccumulo e traslocazione nelle piante non è chiarito in modo definitivo e necessita di ulteriori indagini. Nonostante questo si conoscono differenti parametri che possono condizionare questi aspetti, come il contenuto organico e l'umidità del suolo.

Il contenuto di sostanza organica nel suolo, al pari del contenuto di lipidi nelle piante, gioca un ruolo fondamentale nell'assorbimento dei BFRs. Incrementando il contenuto di carbonio organico nel suolo i ritardanti di fiamma bromurati tenderanno a rimanere adsorbiti ad esso. È stata anche studiata la differenza tra il contenuto di carbonio organico totale (TOC) e carbonio organico disciolto (DOC) dimostrando che aumentando il livello di TOC i PBDE si adsorbivano maggiormente alla matrice suolo, mentre non è stato individuato nessun chiaro effetto con l'incremento della DOM (Cheng *et al*, 2014). Questo influenza comunque congeneri più lipofili in quanto i più solubili come BDE-47 e BDE-99 vengono comunque degradati ed assorbiti dalle radici.

Un'altra caratteristica importante è l'umidità del suolo. Infatti visto il carattere lipofilo e la bassa solubilità dei PBDE e NBFR, l'umidità del suolo influenza l'*uptake* vegetale a discapito della perdita per volatilizzazione. Infatti un suolo umido previene l'evaporazione e le perdite di BFRs dal suolo all'atmosfera, favorendo la permanenza nella matrice dove si trovano legati i composti, così dato il maggior tempo di residenza, si avrà un maggiore *uptake*.

Infine, una volta penetrati nelle piante, le modalità attraverso il quale parte dei ritardanti di fiamma vengono trasformati sono fortemente dipendenti dal grado di bromurazione. PBDE e NBFR sono mineralizzati tramite debromurazione o detossificati tramite idrossilazione o metilazione nella rizosfera e nei compartimenti aerei. È stata dimostrata l'evidenza della capacità di trasformazione di BDE-47 (Br4) in composti metilati come 6-MeO-BDE-47 e 5-MeO-BDE-47 e in quantità minori composti non identificati idrossilati x-HO-BDE-47 da parte delle piante di mais nell'intorno della rizosfera (Wang *et al*, 2012). È stata studiata anche la trasformazione di BDE-99 nelle piante di riso, grano e soia, in coltivazioni idroponiche. In questo caso si è evidenziata la trasformazione di BDE-99 in composti metilati 5- e 6-MeO-BDE-99 e successiva idrossilazione in 5- e 6-HO-BDE-99 (Pan *et al*, 2016). Sembrerebbe che queste trasformazioni, che avvengono principalmente per congeneri a basso grado di bromurazione, aumentino la solubilizzazione delle molecole. Alcune piante sono in grado di espellere nella rizosfera intermedi facilmente metabolizzabili che fungono da solubilizzanti e facilitano la trasformazione di PBDE. Tra questi si sono evidenziati amminoacidi, acidi organici, zuccheri ed eso-enzimi in grado di metabolizzare e aumentare la biodisponibilità dei composti

bromurati. La prova è stata data in seguito ad uno studio che ha aggiunto al suolo una soluzione zuccherina di zuccheri esosi in concentrazione 620 mg L^{-1} ha migliorato l'assorbimento di BDE-99 e BDE-47 (Farzana *et al*, 2019). C'è da tenere in considerazione che i composti metilati e idrossilati potrebbero avere effetti tossici e quindi rappresentare un ulteriore rischio associato all'assorbimento di PBDE e NBFR da parte delle piante.

1.8.1 Stato dell'arte della Ricerca

L'ubiquitarità dei ritardanti di fiamma bromurati è ormai riconosciuta dalla comunità scientifica e la letteratura degli ultimi anni riporta molti casi di studio riguardanti la loro presenza diffusa in tutte le matrici ambientali. Dagli studi sono emersi e sono stati evidenziati i caratteri tossicologici e potenzialmente dannosi di queste molecole, oltre che quelli relativi alla persistenza in ambiente, tanto da destare preoccupazioni per quanto riguarda gli scenari di esposizione per l'essere umano. Tra le possibili vie espositive, le più importanti evidenziate dalla comunità scientifica sono: il contatto dermico, l'inalazione e l'ingestione. Da questo punto di vista le piante commestibili come ortaggi e frumento, data la loro capacità di *uptake* di molecole bromurate da terreni e acque inquinate, rappresentano un vero e proprio cammino attraverso il quale l'uomo può trovarsi a contatto con i BFRs. Di conseguenza, negli ultimi vent'anni questi aspetti sono stati ampiamente studiati e sono stati condotti molti studi nell'ottica dell'assorbimento vegetale di PBDE e NBFR in piante impiegate in agricoltura e appartenenti alla dieta dell'essere umano.

Un recente studio ha analizzato l'assorbimento di nuovi e vecchi ritardanti di fiamma da parte di ortaggi coltivati in un suolo agricolo che si trova ubicato vicino ad un sito di riciclaggio e smaltimento di rifiuti elettronici a Guiyu, nella provincia di Guangdong, nel sud della Cina. Le specie di pianta prese in considerazione erano: due specie di cavolo cappuccio cinese (*Brassica pekinensis* e *Brassica alboglabra* L), sedano (*Apium graveolens*), broccoli (*Brassica oleracea* L.), scalogno (*Allium fistulosum*), cavolo cappuccio comune (*Brassica oleracea* L.), ravanello (*Raphanus sativus* L.), taro (*Colocasia esculenta* L.), margherita corona (*Chrysanthemum coronarium* L.), pakchoi (*Brassica campestris* L.), taccole (*Pisum sativum*), patata dolce (*Ipomoea batatas* L.) e lattuga (*Lactuca sativa* L.). In questo studio è stata fatta una particolare analisi relativa alla differenziazione tra suolo rizosferico, raccolto nei 2 mm in prossimità delle radici, e suolo non-rizosferico, corrispondente all'intorno compreso tra i 10 e 20mm. È stato evidenziato un importante aspetto legato alla

concentrazione di PBDE e NBRF in queste specifiche porzioni. Infatti, la differenza tra la concentrazione nel suolo rizosferico e quella nel suolo non-rizosferico dipende da specie a specie, dal modo in cui le radici si sviluppano nel suolo, dalla grandezza degli apparati radicali, dall'area che essi occupano all'interno del suolo, dal funzionamento delle fibrille per la secrezione di essudati radicali che aumentano la biodisponibilità dei composti e dai microorganismi che colonizzano l'intorno delle radici. Gli autori evidenziano un "effetto rizosferico" per il quale i BFRs si trovano più concentrati nell'intorno subito vicino all'apparato radicale, definito precedentemente come suolo rizosferico. Un altro aspetto evidenziato è l'effetto legato al tempo di residenza delle molecole bromurate nel terreno. In particolare quest'ultimo influenza la biodisponibilità rendendo più o meno accessibili le sostanze alla pianta. Maggiore è il tempo di residenza, maggiore è il legame che si instaura con il carbonio organico del suolo, per cui minore sarà la capacità della pianta di desorbire e successivamente assorbire la molecola, mentre in generale gli NBRF sembrano più facilmente accessibili alle piante (Wang *et al.*, 2016a). I valori relativi alle concentrazioni trovate nel suolo erano: per la sommatoria Σ_7 PBDEs che comprende BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-154, BDE-183 e BDE-209: suolo rizosferico = 13.9 - 351 ng g⁻¹dw; suolo non-rizosferico = 7.56 - 127 ng g⁻¹dw; con il BDE-209 come congenere più abbondante contribuendo alla sommatoria per più del 50%. Per la sommatoria Σ_6 NBRFs che comprende HBB, PBEB, TBE, TBB, TBPH e DBDPE: suolo rizosferico = 11.6 - 70 ng g⁻¹dw; suolo non-rizosferico = 8.98 - 144 ng g⁻¹dw; con il DBDPE come molecola più abbondante contribuendo alla sommatoria per più del 50%. Dopodiché sono state calcolate le concentrazioni relative all'*uptake* delle diverse piante esposte ai terreni fortemente inquinati, trovando delle significative differenze specie-specifiche. Per i Polibromo Difenietteri le concentrazioni trovate sono: Σ_7 PBDEs germogli = 10.3- 164 ng g⁻¹dw (media=37.5 ng g⁻¹dw); radici = 1.16- 107 ng g⁻¹dw (media=21.2 ng g⁻¹dw). Nel cavolo cappuccio si sono riscontrate le più alte concentrazioni fino a 164 ng g⁻¹dw nei germogli e 107 ng g⁻¹dw nelle radici.

Per quanto riguarda i ritardanti di fiamma emergenti le concentrazioni trovate sono: Σ_6 NBRFs germogli = 8.41-69.5 ng g⁻¹dw (media=28.8 ng g⁻¹dw); radici = 7.08-82.0 ng g⁻¹dw (media=30.0 ng g⁻¹). Nel cavolo cappuccio sono state riscontrate le più alte concentrazioni e il maggior composto trovato era il DBDPE con valori: nei germogli = 17.0 ng g⁻¹dw; nelle radici = 18.4 ng g⁻¹dw. In questo studio sono stati forniti dei valori di log RCF, di cui i più alti in riferimento ai congeneri con valori di log K_{ow} più bassi ovvero: BDE-47, BDE-99, HBB e PBEB. Anche in questo studio è stata evidenziata la correlazione negativa tra valori di log RCF e valori di log K_{ow}, a conferma del fatto che le molecole più bromurate

e con carattere lipofilo più spiccato sono più difficili da assorbire per le piante rispetto ai congeneri meno sostituiti (Wang *et al.*, 2016b).

Questo studio, di conseguenza, ha messo in evidenza il modo in cui si distribuiscono i ritardanti di fiamma nella rizosfera e nell'intorno del suolo rizosferico, nonché le diverse capacità di *uptake* delle piante osservate. Potrebbero, però, essere considerate alcune caratteristiche che rendono difficile l'interpretazione dei dati. Per esempio, il fattore di trasferimento delle molecole dalle radici ai germogli è stato calcolato per piante esposte in condizioni di *open field*, ove i ritardanti di fiamma possono volatilizzarsi dal terreno ed essere adsorbiti superficialmente nei lipidi fogliari prima di penetrare internamente alle strutture epigee. Questo aspetto cruciale non rende del tutto possibile la comprensione di quale sia il reale contributo del processo di traslocazione radice-germoglio rispetto a quello dell'assorbimento fogliare. Inoltre, non sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche del suolo, che hanno un ruolo chiave nei processi di assorbimento radicale. In ultima analisi, considerando le condizioni sperimentali del progetto, queste non rispondono a nessuno standard internazionale.

Un'altra recente ricerca ha messo in evidenza la capacità di *uptake* e la distribuzione interna di NBFR da parte di piante di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* L.) e cetrioli (*Cucumis sativus* L.) coltivate per sei mesi in condizioni diverse tra loro, in serra e in campo aperto, in una azienda agricola nella provincia cinese di Zhejiang. Le più alte concentrazioni sono riferite al BTBPE, 2.4 ng g⁻¹dw nel suolo in serra e 2.75 ng g⁻¹dw nel suolo in campo aperto e al DBDPE, le cui concentrazioni erano di 2.75 ng g⁻¹dw nel suolo in serra e 3.8 ng g⁻¹dw in quello di campo aperto. I ritardanti di fiamma emergenti studiati sono EHTBB, BTBPE, DBDPE, HCDBCO, HBCD, ATE e HBBZ. I valori di concentrazione, espressi in ng g⁻¹dw, trovati in riferimento alla sommatoria Σ₇ NBFRs per le piante di pomodoro sono: radici=29 ± 3.2, steli= 13 ± 4.5, foglie= 4.4 ± 0.9 e frutti 31 ± 3.7 in serra e radici= 9.2 ± 0.39, steli= 7.7 ± 0.95, foglie= 3.5 ± 0.29 e frutti= 9.7 ± 1.1 in campo aperto. Per i cetrioli invece: radici= 32 ± 2.5, steli= 25 ± 2.1, foglie=13 ± 2.3 e frutti= 36 ± 3.5 in serra, radici= 13 ± 1.0, steli= 11 ± 0.76, foglie= 5.7 ± 0.84 e frutti= 18 ± 0.64 in campo aperto. I fattori di bioaccumulo nelle radici (RBCF), calcolato come rapporto tra la concentrazione nelle radici rispetto a quella del suolo, e nei frutti (FBCF), calcolato come il rapporto di concentrazione tra la concentrazione nel frutto e quella nel suolo risospeso, sono: 3.0 ± 0.1 e 3.0 ± 0.21 per il BTBPE, 2.7 ± 0.28 e 2.8 ± 0.22 per il DBDPE e 26 ± 1.8 e 27 ± 2.5 in riferimento alla sommatoria Σ₇ NBFRs nei pomodori in serra, mentre i valori trovati nei pomodori cresciuti in

campo aperto sono nettamente minori, ovvero: 0.7 ± 0.07 e 0.7 ± 0.14 per il BTBPE, 0.6 ± 0.17 e 0.3 ± 0.08 per il DBDPE e 6.1 ± 0.81 e 7.5 ± 0.79 in riferimento alla sommatoria Σ_7 NBFRs. Per quanto riguarda i cetrioli cresciuti in serra i valori di RBCF e FBCF sono: 3.2 ± 0.10 e 3.3 ± 0.13 per il BTBPE, 2.9 ± 0.19 e 3.0 ± 0.33 per il DBDPE e 28 ± 1.9 e 32 ± 3.2 in riferimento alla sommatoria Σ_7 NBFRs. I valori riferiti ai cetrioli cresciuti in campo aperto invece sono: 1.0 ± 0.04 e 1.2 ± 0.13 per il BTBPE, 0.8 ± 0.13 e 0.57 ± 0.14 per il DBDPE e 8.3 ± 0.9 e 14 ± 2.1 in riferimento alla sommatoria Σ_7 NBFRs. Da questo studio è emerso che le concentrazioni di NBFR sono nettamente maggiori negli ortaggi cresciuti in serra rispetto a quelli in campo aperto. Questo risultato, visibile dai più alti valori di BCF nelle piante in serra, suggerisce che in serra c'è un maggiore potenziale di accumulo nel lungo periodo e le condizioni climatiche (piogge, vento, insolazione) diminuiscono l'influenza che possono avere nell'assorbimento di composti bromurati. Un altro aspetto è legato alla specie di pianta, tanto che dalle prove sperimentali si evince che i cetrioli sono in grado di accumulare maggiormente i ritardanti di fiamma, rispetto alla pianta di pomodoro. Si pensa che questo dipenda dalle aree superficiali delle foglie e dei frutti, le quali risultano maggiori nel cetriolo. Le concentrazioni sono risultate molto simili e non significativamente differenti nelle piante in campo aperto mentre le molecole maggiormente assorbite in entrambe le piante risultano essere il BTBPE e il DBDPE, le cui concentrazioni sono molto simili in tutti e due gli scenari. Gli autori dunque affermano che l'ambiente della serra costituisca un luogo in cui i ritardanti di fiamma sono facilmente assorbibili dalle piante tramite assorbimento fogliare a partire dalle particelle di suolo sospeso a cui i BFRs sono adsorbiti e che permangono nell'ambiente chiuso, tanto che in campo aperto, a causa della presenza di piogge e vento, queste particelle vengono dilavate e le concentrazioni trovate erano più basse. Da qui si spiega come i valori di FBCF siano maggiori in serra piuttosto che in campo aperto. Anche in questo caso è stata studiata la correlazione tra $\log K_{ow}$ e $\log BCF$. In particolare, una correlazione positiva è stata trovata tra $\log K_{ow}$ e $\log BCF$ tra valori di $\log K_{ow}$ 5-7.6, una correlazione negativa invece per valori $\log K_{ow}$ da 7.6 a 14. Infatti, molecole con alti valori di K_{ow} tendono a rimanere adsorbite nel suolo, rendendosi difficili da desorbire per la pianta. Oltre a questo aspetto, l'alta lipofilità e l'ingombro sterico fanno sì che il passaggio attraverso lo strato fosfolipidico della membrana cellulare della pianta sia ostacolato (Sun *et al*, 2019). Questo studio ha evidenziato come la crescita delle piante in serra possa aumentare drasticamente il potenziale accumulo di NBFRs da parte degli organismi vegetali, aumentando conseguentemente il rischio di esposizione per l'essere umano. Ancora una volta però non è proposta una metodologia che permetta degli studi comparativi e il calcolo di un fattore di traslocazione netto, non influenzato dal deposito di particelle sospese di suolo a cui si legano i ritardanti di fiamma.

Una metodica a livello laboratoriale è stata proposta da Zhu *et al.* (2020) in un contemporaneo studio di uptake di dieci congeneri della famiglia dei PBDE da parte della pianta di grano comune (*Triticum aestivum* L.) in scenari di esposizione multipli. In particolare la metodologia utilizzata prevedeva lo studio di assorbimento vegetale in laboratorio ubicando le piante per otto settimane all'interno di camere di esposizione chiuse, ovvero box in vetro sintetico con un volume totale pari a 98 dm³. Le camere di esposizione sono collegate ad un sistema di tubi, a loro volta collegate ad una pompa, per permettere l'insufflazione di aria contaminata all'interno delle camere stesse. Lo studio prendeva in considerazione quattro scenari di esposizione differenti con diverse sorgenti di PBDE. Il primo (A) fungeva da controllo nella quale le piante crescevano in un ambiente pulito e non erano a contatto né con suolo né con aria contaminata; il secondo box (B) era adibito all'esposizione delle piante ad aria contaminata, generata dalla pompa collegata ad un serbatoio di solvente in cui erano disciolti i composti bromurati; il terzo (C) invece esponeva le piante ad aria contaminata e ad un suolo contaminato coperto con uno strato di 2mm di sabbia silicea per limitare la volatilizzazione delle sostanze, infine nel quarto box (D) è stata impiegata la stessa modalità del terzo, con l'aggiunta di polvere (< 100 µm) contaminata sulle foglie di grano per simulare un processo di deposizione fogliare di particelle sospese e studiarne l'assorbimento. Le camere di esposizione chiuse sono state poste in condizioni controllate di temperatura (25°C) e di umidità (65%). Le concentrazioni di PBDE nel suolo, nella polvere e nell'aria erano comprese tra 1.9 e 212 ng g⁻¹ di peso secco (*dw*), 47.4 - 21'619 ng g⁻¹ *dw* e 0.012 - 5.78 ng m⁻³, rispettivamente.

I PBDE hanno mostrato caratteristiche di distribuzione distintive nei tessuti, nelle diverse camere. Nello specifico, nel test B, è stato osservato un gradiente di concentrazione significativo, le concentrazioni più elevate sono state trovate nella cera fogliare (7.95 – 1'149 ng g⁻¹) seguita dalla porzione interna alla foglia (1.28 - 375 ng g⁻¹ *dw*), gambo (nd - 3.31 ng g⁻¹ *dw*) e nessun rilevamento nella radice. Nel test C, è stata trovata una distribuzione della concentrazione differente dalla prima, con concentrazioni più elevate in entrambe le estremità della pianta (radice= 25.6 – 1'035 ng g⁻¹ *dw*; cera: 23,1 – 1'437 ng g⁻¹) e concentrazioni più basse nelle parti centrali (stelo= 2.35 - 65.1 ng g⁻¹ *dw*; foglia interna: 2,05 - 393 ng g⁻¹ *dw*). Nel test D, le concentrazioni di PBDE nella cera fogliare (49–86'194 ng g⁻¹) erano di 1 - 2 ordini di grandezza superiori a quelle riscontrate in altre parti della pianta (4,2–1'727 ng g⁻¹ *dw*).

Sono stati calcolati i contributi dei tre percorsi di assorbimento, ovvero l'assorbimento radicale (*Rsoil*), quello gassoso (*Rair*) e quello dovuto alla deposizione delle particelle di polvere contaminate

(*Rparticle*). I contributi di ciascuno di questi tre percorsi di assorbimento per l'accumulo di PBDE nelle foglie di grano sono: 0.343–18.7% (*Rsoil*), 0.747–56.6% (*Rair*) e 37.3–98.9% (*Rparticle*). Ciò ha suggerito che il percorso di assorbimento correlato al suolo non ha influenzato in modo misurabile i livelli di contaminazione da PBDE nelle foglie di grano e che la maggior parte dei PBDE nelle foglie provenivano dall'atmosfera. Tuttavia, va notato che questi contributi calcolati erano specifici per gli scenari d'esposizione che sono stati costruiti e la capacità di assorbimento radicale, in generale, non dovrebbe essere ignorata, in quanto è una via principale di *uptake*. È stato quindi messo in luce l'importante ruolo svolto dalla deposizione atmosferica per il ciclo biogeochimico dei PBDE nel sistema suolo-pianta-atmosfera. Questo porta inevitabilmente ad alcune implicazioni ambientali per quanto riguarda l'esposizione umana. Infatti, la deposizione atmosferica è in grado di causare contaminazioni pesanti soprattutto per verdure a foglia larga (come il cavolo cappuccio) ed insieme all'assorbimento radicale, possono presentarsi gravi rischi per la salute umana attraverso il trasferimento dalla catena alimentare (Zhu *et al.*, 2020).

Un ulteriore importante progetto di ricerca, a livello di studio in ambiente di laboratorio, che prevede l'utilizzo di una metodologia replicabile per l'indagine di *uptake* di ritardanti di fiamma organofosfati (OPFRs) e bromurati (NBFR), è stato proposto del gruppo di ricerca di Bonato *et al.* (2022). In questo progetto è stata utilizzata la pianta di mais (*Zea mays*) per studiare l'assorbimento radicale e la traslocazione radice-germoglio di sette OPFRs e quattro NBFRs (PBEB, HBB, BTBPE e DBDPE). Le piante di mais sono state mantenute in condizioni idroponiche in vasche da 40 litri in camera termostatica con intensità luminosa di $450 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con ciclo di luce: buio di 16:8 h, con temperatura pari a 18-25 °C (notte- giorno), umidità relativa del 50% e pH della soluzione neutro. Dopo il periodo di germinazione al buio e crescita in regime luce: buio, sono state aggiunte alle vasche dove crescevano le piante delle aliquote di metanolo in cui erano disciolti i ritardanti di fiamma. Le concentrazioni testate per valutare l'assorbimento radicale in condizioni idroponiche erano: $0 \mu\text{g L}^{-1}$ come controllo, $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$, $3 \mu\text{g L}^{-1}$ e $30 \mu\text{g L}^{-1}$. La concentrazione di $3 \mu\text{g L}^{-1}$ rappresentava il valore che si può riscontrare nelle acque di irrigazione ed è rappresentativo di condizioni ambientali reali. Mentre gli altri due livelli di concentrazione sono stati considerati per valutare la possibile relazione tra la concentrazione iniziale in fase idroponica e il processo di assorbimento. Per ogni concentrazione sono stati fatti due replicati, in ogni vasca, per ogni replicato, sono state esposte dieci piante ed alla fine del periodo di esposizione in maniera casuale ne sono state selezionate cinque, secondo quanto previsto dal metodo. I risultati mostrano che le piante esposte alla concentrazione

di $30 \mu\text{g L}^{-1}$ avevano risentito di un effetto fitotossico che aveva provocato un'inibizione della crescita, tanto che il peso medio dei germogli (in peso secco) era significativamente più basso del 34%, rispetto al controllo e gli altri campioni testati. Dopo i cinque giorni di esposizione le concentrazioni di NBFRs nelle soluzioni erano diminuite confermando la capacità di *uptake* delle piante di mais. In particolare tassi di rimozione pari al 42%, 18% e 10% sono stati calcolati per le piante esposte alle concentrazioni di $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$, $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $30 \mu\text{g L}^{-1}$, rispettivamente. Tutti gli NBFRs sono stati trovati nei campioni di radici e nei germogli. Il BTBPE e DPDPE sono stati i composti con maggior tasso di assorbimento radicale, tanto che si sono registrati i più alti valori di concentrazione ($3.0 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1} (dw)$ e $6.1 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1} (dw)$, rispettivamente, nelle radici), più del doppio dei valori riferiti a PBEB e HBB ($1.9 \pm 0.07 \mu\text{g g}^{-1} (dw)$ e $1.8 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1} (dw)$, rispettivamente, nelle radici), in riferimento alle piante esposte alla soluzione idroponica con concentrazione di BFRs pari a $30 \mu\text{g L}^{-1}$. Infatti è stata trovata una correlazione positiva significativa tra le concentrazioni nei tessuti delle piante e le concentrazioni nelle soluzioni. Infine sono stati riportati i valori del coefficiente di bioconcentrazione delle radici (RCF) e confrontati con il $\log K_{ow}$ dei composti, trovando una correlazione positiva statisticamente significativa, a prova del fatto che in ambiente idroponico i composti organici non ionici lipofili, come i ritardanti di fiamma, tendono ad accumularsi nelle radici piuttosto che rimanere disciolti in soluzione (Bonato *et al.*, 2022).

Sebbene questi studi prendano in considerazione l'assorbimento radicale e la traslocazione interna di contaminanti organici persistenti, si nota come è presente una certa variabilità nelle condizioni sperimentali proposte a livello di laboratorio e soprattutto in campo aperto, dove la componente climatica instabile ha un ruolo decisivo sulle dinamiche di *uptake*. Essendo ogni studio adattato caso per caso dagli autori, si possono notare alcune particolari caratteristiche variabili:

- scelta della tipologia di specie vegetali coinvolte;
- condizioni sperimentali (temperatura, umidità, caratteristiche chimico-fisiche del suolo, caratteristiche abiotiche in generale)
- scelta del mezzo di esposizione (suoli, particolato, soluzioni idroponiche);
- modalità attraverso il quale la matrice è contaminata, quindi per studi in campo aperto si considerano terreni reali con concentrazioni variabili in funzione della posizione dove essi si trovano (isolati, vicino a siti di smaltimento di rifiuti, vicino ad un sito industriale, ecc.) oppure nei test in laboratorio, i terreni, o le soluzioni idroponiche, sono contaminati tramite una

“contaminazione artificiale” che può avvenire in svariate modalità ed a svariate concentrazioni;

- condizioni del disegno sperimentale proposto (numero di repliche, dosaggi testati, numero di individui per specie testata, ecc.).

Al netto del rigore scientifico delle pubblicazioni analizzate, in letteratura esistono molti studi in campo aperto e limitati studi a livello laboratoriale riguardanti l'*uptake* di ritardanti di fiamma bromurati, emergenti e non, da parte di organismi vegetali impiegati in agricoltura. Però, la variabilità delle condizioni sperimentali attuate determina una conseguente difficoltà nel comparare in maniera rigorosa i risultati pubblicati. Si evince dunque il bisogno stringente di fare ricorso a delle metodiche di studio condivise e validate a livello internazionale che possano garantire la generazione di dati confrontabili e interpretabili in maniera univoca, derivati quindi da condizioni sperimentali standardizzate.

Attualmente non è ancora presente in letteratura scientifica uno studio che preveda l'applicazione di un metodo standard come RHIZOtest™ ISO 16198:2015 per indagare le capacità di *uptake* di POPs, tra cui i BFRs, da suoli contaminati, per comprendere al meglio e poter confrontare le dinamiche legate all'assorbimento radicale e la traslocazione di questi composti persistenti e dannosi per l'ambiente e l'uomo.

1.9 RHIZOtest™ e ISO 16198:2015

RHIZOtest™ è una metodologia sviluppata in Francia nel 2003 (Chaignon & Hinsinger, 2003) frutto di oltre vent'anni di ricerca da parte del gruppo MetRHIZLab nato dall'INRAE (Istituto Nazionale di ricerca per l'Agricoltura, l'Alimentazione e l'Ambiente) in collaborazione con Cirad, organizzazione francese per la ricerca agricola, la biodiversità, i cambiamenti climatici e la cooperazione internazionale per lo sviluppo sostenibile.

Questo è un metodo standardizzato presso l'ISO (*International Standard Organization*) per valutare la fitodisponibilità di oligonutrienti in suoli contaminati. Il RHIZOtest™ misura concretamente il trasferimento di contaminanti del suolo alla pianta, limitando le interazioni specifiche tra il suolo e la pianta, riproducendo i naturali processi di *uptake*. Permette quindi di riprodurre in poco tempo in

ambienti controllati di laboratorio, dei processi e studi difficilmente realizzabili e controllabili sul campo aperto. RHIZOtest™ nasce con lo scopo di offrire nuove prospettive per lo studio, la valutazione e la gestione del rischio di siti e suoli contaminati offrendo la possibilità di valutare il rischio di trasferimento di metalli in tracce, dimostrare la possibilità di bonifica tramite specie vegetali, curare la rivegetazione e caratterizzare lo stato di un suolo contaminato. Quindi si rivela essere uno strumento innovativo di supporto alle decisioni che dovrebbe consentire di valutare i rischi e ottimizzare la gestione dei siti e dei suoli inquinati (<https://rhizotest.cirad.fr/en>).

RHIZOtest™ è stato principalmente utilizzato come strumento per la valutazione delle capacità di specie vegetali coltivate di bioconcentrare oligoelementi come i metalli in tracce potenzialmente tossici per l'uomo, ovvero il piombo, l'arsenico, il mercurio, il rame e il nichel. Dal 2009, grazie alle sue caratteristiche tecniche, metodologiche e la sua applicazione concreta in ambito di ricerca, è stato avviato un programma di certificazione internazionale. La metodologia è stata certificata e standardizzata nel 2014. Oggi RHIZOtest™ si trova così inserito all'interno di ISO 16198:2015 "Qualità del suolo - Analisi vegetale per valutare la biodisponibilità ambientale di elementi in tracce nelle piante" come metodologia su base biologica standardizzata per la crescita e l'esposizione di piante a suoli contaminati (<https://rhizotest.cirad.fr/en/applied-research/standardization>).

Il metodo ha una grande particolarità tale da renderlo unico ed innovativo. Infatti, quando si applica un *biotest* su base vegetale questo deve fornire un facile accesso all'operatore, non solo ai germogli ma anche alle radici, per valutare al meglio la contaminazione e l'assorbimento radicale. Quando le piante sono coltivate in un terreno, in particolare piante con radici fini, al momento della raccolta piccole porzioni di suolo possono aderire ed essere adsorbite dall'apparato radicale con conseguente sovrastima dei contenuti. Il metodo, quindi, per ovviare a questo problema non banale, permette la crescita della pianta e la successiva esposizione dividendo fisicamente le radici dal suolo, evitandone il contatto tramite una rete in poliammide con *mesh size* di 30 µm, permettendo comunque di simulare i processi biochimici che avvengono nella rizosfera. Questo aspetto è fondamentale per evitare errori di sovrastima di bioaccumulo da parte delle piante, eliminando la componente di suolo adsorbita o inglobata dalle radici ed aumentando l'affidabilità del dato analitico ottenuto (Chaignon & Hinsinger, 2003).

La metodica ISO 16198:2015 è attuabile in due fasi principali:

1. Una prima fase idroponica che prende il nome di “*pre-culture period*” o fase di pre-esposizione, suddivisibile a sua volta in una fase di germinazione al buio, di durata pari a 7 giorni ed una seconda fase di crescita (7 giorni) in regime di luce: buio di 16:8 ore, ad una lunghezza d’onda pari a $\lambda=400-700$ nm ed intensità luminosa pari a $450 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La durata prevista dal periodo di pre-esposizione è in totale pari a 14 giorni.
2. Fase di esposizione al terreno in regime di luce: buio di 16:8 ore, dove le piante si trovano a contatto, separate dalla rete porosa, con il suolo contaminato per 8 giorni.

Per tutto il tempo, il metodo prevede che le piante siano mantenute in camera climatica in condizioni di temperatura pari a 25°C e umidità relativa pari al 75%.

È importante sottolineare come la configurazione sperimentale in cui avviene la germinazione e la crescita permette lo sviluppo di un tessuto radicale planare denso ed omogeneo, ottimizzato per il contatto mediato dalla rete con la porzione di suolo da testare.

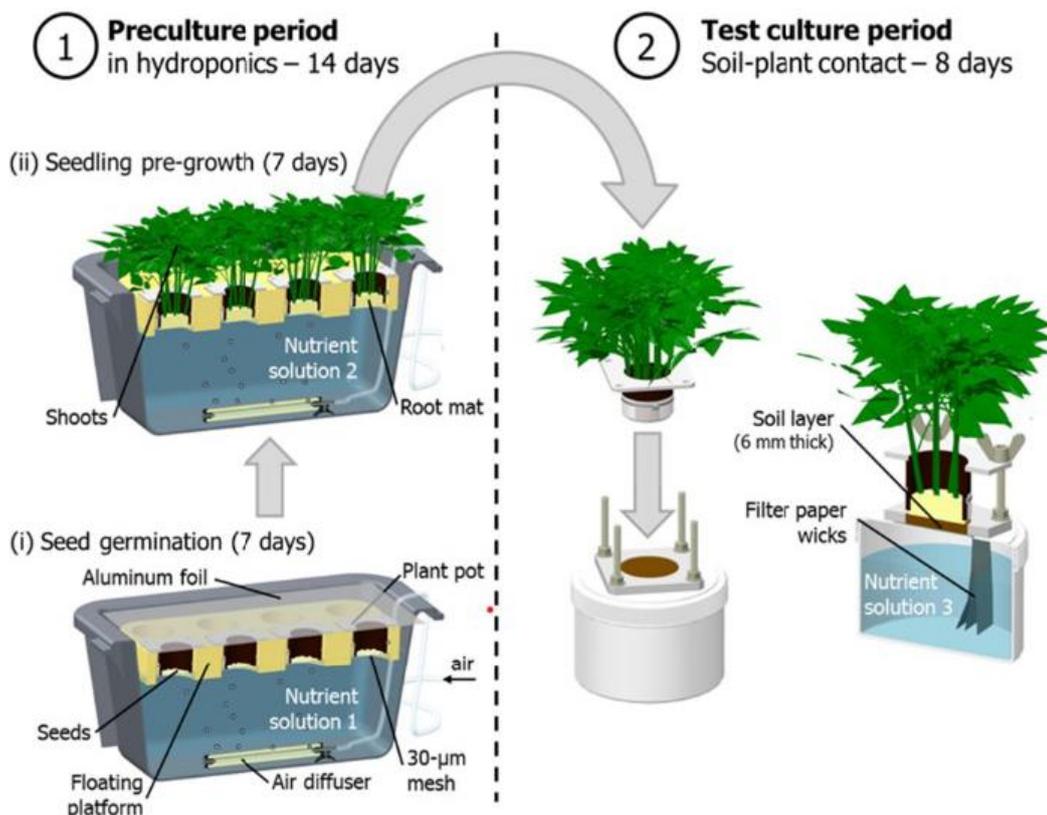


Figura 13: Schematizzazione della procedura per la valutazione dell’uptake secondo la procedura ISO 16198:2015

È importante segnalare che nel metodo ISO viene discussa la possibilità di applicare la procedura per lo studio dell'*uptake* di sostanze organiche, previa indicazione di alcuni accorgimenti al fine di evitare l'adsorbimento dei contaminanti stessi nella rete di poliammide utilizzata per la separazione dell'apparato radicale dal suolo sotto indagine.

Ad oggi, però, in letteratura non esistono ancora studi che abbiano impiegato questa metodologia per valutare la bioconcentrazione di inquinanti organici persistenti (*POPs*) presenti in suoli contaminati. Per cui con questo studio di tesi si vuole verificare l'eventuale *uptake* di PBDE e NBFR di piante di pomodoro *Solanum lycopersicum L.* impiegando RHIZOtest™, nell'ottica della possibile esposizione all'uomo di ritardanti di fiamma bromurati presenti in ortaggi cresciuti in suoli contaminati. Per fare questo è stata applicata una variazione in termini strumentali che consiste nella sostituzione della rete poliammide con una rete in acciaio inox, è stato aumentato il tempo di crescita idroponica per ottenere una biomassa radicale più sviluppata ed omogenea per l'esposizione ai suoli ed è stata introdotta una modalità di contaminazione dei terreni, non trattata dal metodo.

L'avvio di questi studi impiegando una metodologia standardizzata potrebbe permettere il confronto tra diversi inquinanti organici emergenti, tra diverse specie vegetali e diversi terreni, rendendo i dati confrontabili e riproducibili in diversi laboratori del mondo, nell'ottica di una migliore comprensione per quanto riguarda l'esposizione umana a ritardanti di fiamma inglobati nelle matrici vegetali.

1.10 Scopo della Tesi

Come si evince dallo stato dell'arte riguardante lo studio di assorbimento di PBDE e NBFR da parte di organismi vegetali, non esiste ancora un metodo standardizzato per indagare le dinamiche di *uptake* e di traslocazione interna alla pianta, esposta a suoli contaminati da *POPs*.

L'obiettivo del progetto di tesi, quindi la novità introdotta a livello di ricerca, è quello di indagare l'applicabilità della metodologia standard RHIZOtest™ prevista da ISO 16198:2015 "Qualità del suolo - Prova su base vegetale per valutare la biodisponibilità ambientale di elementi in tracce per le piante" per studiare l'*uptake*, calcolare la biodisponibilità ambientale di inquinanti organici persistenti quali ritardanti di fiamma bromurati (espressa come concentrazione nelle radici e nei germogli) e fornire una stima legata alla traslocazione dei composti, dalla rizosfera alle parti aeree,

da parte di una pianta impiegata in ambito agricolo: il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.), nell'ottica del rischio associato all'esposizione per l'essere umano.

La novità introdotta riguarda lo studio di assorbimento di composti organici emergenti, gli NBFR, di cui ancora non si conosce a pieno il destino ambientale e di inquinanti persistenti già noti alla comunità scientifica, i PBDE, da suoli contaminati, attraverso l'adattamento e l'impiego di un metodo standard modificato, fino ad oggi utilizzato solamente per l'analisi di bioconcentrazione di elementi metallici. Questo lavoro rappresenta quindi il primo studio di assorbimento vegetale di POPs impiegando una metodologia standardizzata ISO su base biologica.

2. MATERIALI E METODI

I solventi utilizzati (*n*-esano, diclorometano, cicloesano, acetone) hanno grado di purezza pesticidi (CHROMSOLV™, purezza ≥ 99,95 %) per analisi gas-cromatografiche e sono stati acquistati da *Honeywell Riedel-de Haën™* (Wabash, ID, USA). I reagenti utilizzati per le analisi chimiche (Acido Solforico 95%, H₂SO₄, Idrossido di Potassio, KOH e Solfato di Sodio anidro, Na₂SO₄) e per la crescita delle piante sono stati acquistati da *Sigma-Aldrich Co.* (Saint Luis, MO, USA). Le soluzioni standard marcate isotopicamente ¹³C per analisi di PBDE e NBFR (EO-5277), le soluzioni standard native dei PBDE (BDE-183-CS e BDE-99-CS) e la soluzione usata come standard di siringa per l'analisi in GC/MS PCB-209 (EC-1410-3) sono state acquistate da *CIL Inc. (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, USA)*. Le soluzioni standard native PBDE (RPE-080-S-1 e RPE-083-S-1) sono state acquistate da *Agilent (North Kingstown, RI)*. Le soluzioni standard native dei NBFR (FRS-036S, FRS-048S, FRS-037S e FRS-013S) provengono da *Accustandard Inc. (New Haven, CT, USA)*. Il gel di silice neutro, che compone la fase stazionaria della colonna cromatografica impaccata usata per la purificazione dell'estratto, è ad alto grado di purezza (*Davisil Grade 923*) con grandezza dei pori pari a 30 Å, 100-200 mesh è stata acquistata da *Sigma-Aldrich Co.* (Saint Luis, MO, USA). La colonna di purificazione ad esclusione dimensionale della GPC-Azura (modello DSCSVI, KNAUER) è stata acquistata da *LabService Analytica S.r.l.* (Bologna, Italia). Per concentrare gli estratti è stato usato *azoto 5.0* con grado di purezza pari a 99.999% (SIAD, Bergamo).

Per il lavaggio della vetreria e dei materiali in acciaio utilizzati per il trattamento dei campioni, è stata utilizzata una soluzione di acqua milliQ e detergente *Ausilab 140* (5% in volume). Prima e dopo

l'utilizzo dei materiali, questi sono stati sciacquati con acetone e messi ad asciugare in stufa a 70 °C. Per il lavaggio delle componenti plastiche di RHIZOtest™ (*pot, upper-plate, soil-receiving plate*, i vasi in plastica e le vasche) è stato utilizzato acido nitrico al 10% e successivamente risciacquati con acqua demineralizzata.

La crescita delle piante secondo il metodo standard ISO16198:2015 modificato e le analisi chimiche dei campioni sono state condotte nel laboratorio accreditato della ditta S.E.S.A Spa (Monselice, Veneto, Italia). Tutte le analisi statistiche in riferimento ai dati ottenuti sono state condotte con il software Minitab 18[®].

2.1 Pianificazione Sperimentale

La metodologia RHIZOtest™ presente nel documento ISO 16198:2015 è stata modificata ed impiegata per studiare l'assorbimento e la bioconcentrazione di ritardanti di fiamma bromurati in suoli contaminati artificialmente da parte della pianta di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.). I ritardanti di fiamma bromurati indagati nello studio sono:

- quattro BFRs appartenenti alla classe degli NBFR, ovvero HBB, PBEB, BTBPE e DBDPE;
- quattro congeneri bromurati appartenenti alla famiglia dei Polibromo Difenileteri (PBDE), ovvero BDE-47, BDE-99, BDE-153 e BDE-183.

Per ogni composto sono state analizzate le capacità di *uptake* a partire da un suolo contaminato tramite aggiunta di una soluzione in acetone di una miscela a concentrazione nota di NBFR e PBDE. Il test è stato condotto su un livello di concentrazione:

- 0 ng g⁻¹ *dw*. Questa concentrazione funge da controllo, il suolo non è contaminato;
- 5 ng g⁻¹ *dw*. Questa concentrazione rappresenta la concentrazione media trovata nei suoli agricoli europei (Macedo, 2019).

Per questo studio sono stati preparati diciotto replicati da 40 semi per *pot*, di cui:

- 5 replicati sono stati utilizzati come *bianchi di pre-esposizione*, le piante sono state raccolte alla fine della fase di crescita idroponica, di conseguenza non impiegate per l'esposizione ai terreni;

- 5 replicati sono stati impiegati per essere esposti al suolo di controllo, ovvero il terreno non contaminato dai ritardanti di fiamma;
- 5 replicati sono stati impiegati per studiare l'assorbimento radicale esponendoli al suolo contaminato con concentrazione pari a $5 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$.

Di seguito è fornito uno schema dell'impostazione sperimentale.

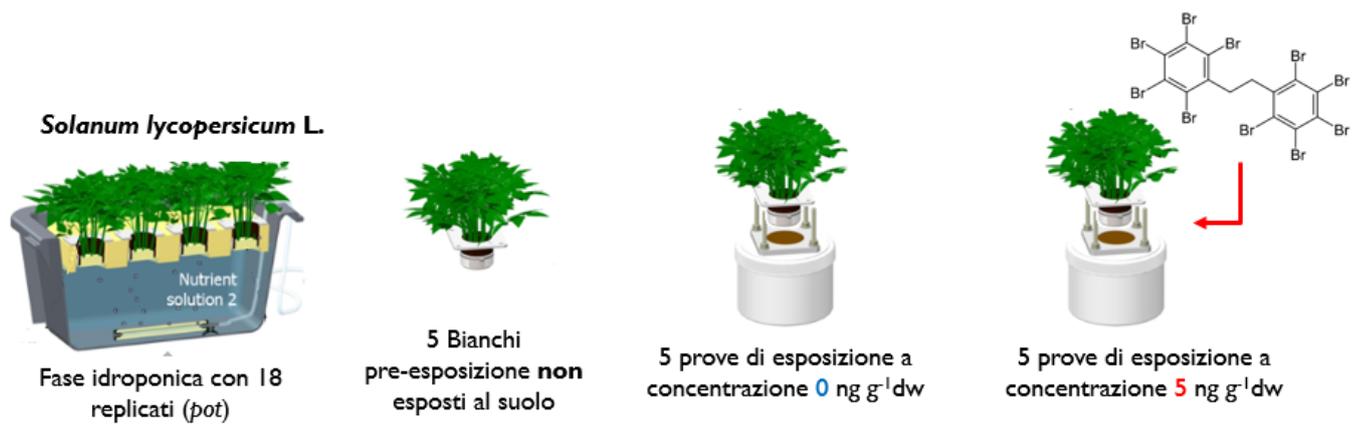
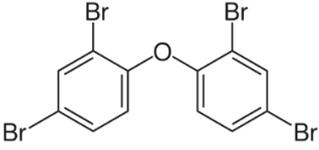
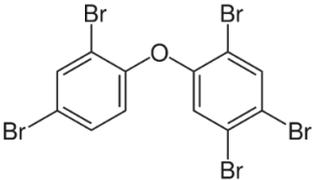
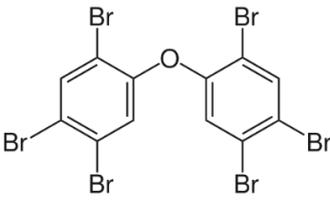
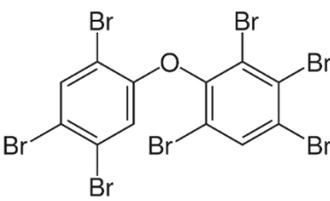


Figura 14: Progetto sperimentale per lo studio di uptake secondo quanto previsto dalla metodologia standard RHIZOtest™

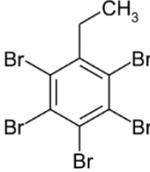
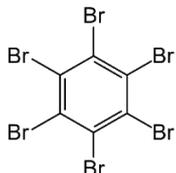
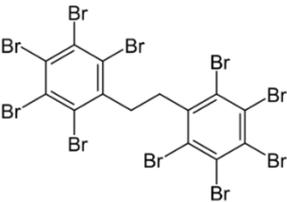
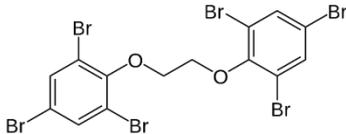
Nelle seguenti tabelle sono riportate le strutture molecolari dei BFRs *target* dello studio con alcune caratteristiche chimico-fisico.

Tabella 5: Caratteristiche chimico-fisiche dei congeneri della famiglia dei Polibromo DifenilEteri (PBDE)

Nome Comune Nome IUPAC N°CAS Peso Molecolare	Struttura Chimica Formula Molecolare	Solubilità in acqua a 25°C ^a (mg L ⁻¹)	Log Kow ^a	Pressione di Vapore a 25°C ^a (Pa)	EC50 ^b (mg L ⁻¹)
BDE 47 2,2',4,4'- TetraBromoDifenilEtere 5436-43-1 485.79	 C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	0.002	6.81	5.52 E-5	1.25 E-2
BDE 99 2,2',4,4',5- PentaBromoDifenilEtere 60348-60-9 564.69	 C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	0.009	7.32	7.94 E-6	4.20 E-3
BDE 153 2,2',4,4',5,5'- EsaBromoDifenilEtere 68631-49-2 643.58	 C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	0.001	7.91	5.8 E-6	2.1 E-3
BDE 183 2,2',3,4,4',5',6- EptaBromoDifenilEtere 207122-16-5 722.48	 C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	0.002	8.27	8.51 E-6	2.0 E-4

^a (Al-Omran, 2016); ^b <https://cfpub.epa.gov/ecotox/explore.cfm?sub=Chemicals>

Tabella 6: Caratteristiche chimico-fisiche dei Nuovi Ritardanti di Fiamma Bromurati (NBFR)

Nome Comune Nome IUPAC N°CAS Peso Molecolare	Struttura Chimica Formula Molecolare	Solubilità in acqua a 25 °C ^a (mg L ⁻¹)	Log Kow ^b	Pressione di Vapore a 25°C ^a (Pa)	EC50 ^c (mg L ⁻¹)
PBEB PentaBromoEtilBenzene 85-22-3 500.64	 C ₈ H ₅ Br ₅	0.10	6.48	6.19 E-4	0.50
HBB EsaBromoBenzene 87-82-1 551.49	 C ₆ Br ₆	0.23	7.56	2.24 E-6	5.00
DBDPE Firemaster2100 1,2-bis(2,3,4,5,6- PentaBromoFenil)-Etano 84852-53-9 971.22	 C ₁₄ H ₄ Br ₁₀	9.71 E-7	11.1	2.53 E-11	0.019
BTBPE Firemaster680 1,2-bis(2,4,6- TriBromoFenossi)-Etano 37853-59-1 687.64	 C ₁₄ H ₈ Br ₆ O ₂	2.23 E-4	8.74	3.17 E-8	4.64 E+2

^a (Hou et al, 2021); ^b (Covaci et al, 2011); ^c <https://cfpub.epa.gov/ecotox/explore.cfm?sub=Chemicals>

2.2 Strumentazione utilizzata nel Metodo ISO16198:2015

Le strumentazioni utilizzate previste dal metodo per la crescita idroponica e l'esposizione al suolo delle piante sono:

- *i pot*: contenitori cilindrici cavi in HDPVC (*High Density PVC*). Presentano due estremità, una dove viene legata la rete in acciaio inox, l'altra presenta una scanalatura dove è alloggiato l'*upper plate*. All'interno dei *pot* sono allocati i 40 semi e vengono fatte crescere le piante.

- *Upper plate*: un disco cavo in HDPE che si incastra sulla scanalatura del *pot*, dalla parte opposta rispetto a dove si trova la rete. La prima funzione è quella di sostenere il *pot* al di sopra della tavola fluttuante in polistirolo (che permette l'alloggiamento del campione e il contatto con la soluzione nutritiva durante la fase di crescita idroponica), la seconda funzione è quella che permette l'ancoraggio del *pot* al *soil-receiving plate* (in quanto l'*upper plate* presenta dei fori che consentono il passaggio delle viti).

- *Soil-receiving plate*: disco cavo in HDPE di spessore pari a 6mm. Questo piatto è utilizzato per alloggiarvi il suolo e mantenerlo a contatto con i filtri assorbenti, cosicché sia sempre al 100% di umidità. Il *soil-receiving plate* presenta due fori che permettono il passaggio di due viti. Questo è funzionale per l'ancoraggio al tappo del vaso, dove è contenuta la soluzione nutritiva durante la fase di esposizione. Le stesse viti passano per i fori dell'*upper plate* permettendo di fissare il *pot*.

- *Vasche*: in HDPE di dimensioni 400mm x 294mm x 165mm, con volume di 12 dm³ sono state impiegate per la fase di crescita idroponica.

- *Una sagoma di polistirolo* forata è utilizzata come sostegno per i *pot* e permette il galleggiamento delle piante mentre sono a contatto con la soluzione nutritiva durante la fase di crescita idroponica.

- *Un vaso cilindrico con tappo avvitabile*: vaso in PP che viene impiegato per la fase di esposizione. Il tappo presenta un foro rettangolare dove è possibile far passare dei filtri assorbenti in cellulosa. Questo fa sì che per una metà il filtro sia a contatto con la soluzione nutritiva dentro al vaso e per metà sia al di fuori del vaso, sotto al *soil-receiving plate*, a contatto con il terreno.

- Una pompa: collegata con dei tubi a dei diffusori d'aria in ceramica è utilizzata per garantire la saturazione di ossigeno disciolto e il mescolamento dei nutrienti nella soluzione acquosa durante la crescita idroponica.

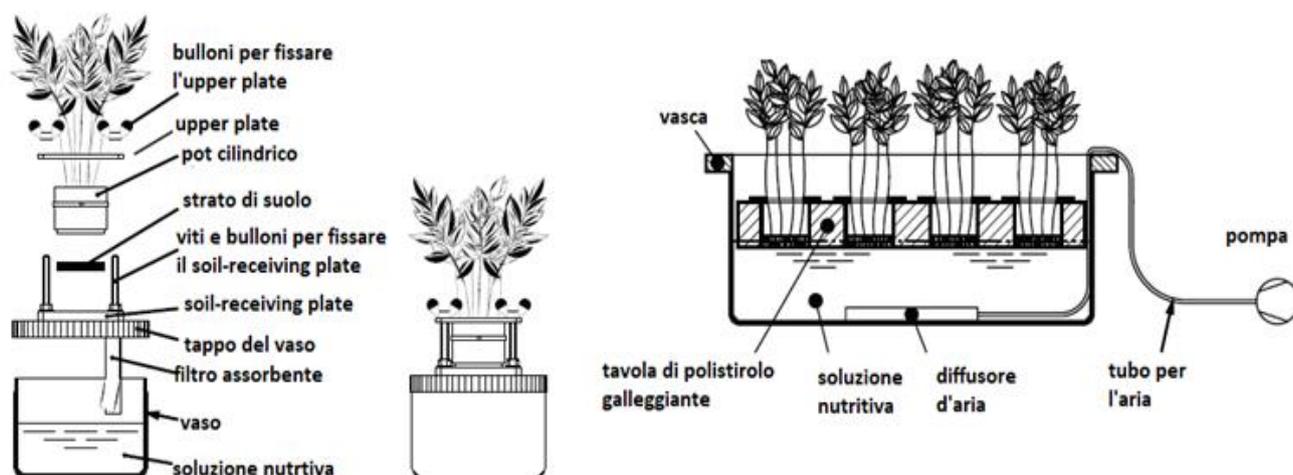


Figura 15: Componenti per la crescita e l'esposizione delle piante secondo RHIZOtest™ (ISO 16198:2015)

2.3 Descrizione del procedimento secondo ISO 16198:2015 modificato

Prima del loro utilizzo i materiali plastici quali *pot*, *upper plate*, *soil-receiving plate*, vasche, viti e bulloni sono stati lavati con HNO_3 al 10% e risciacquati 3 volte con acqua demineralizzata. La rete di acciaio inossidabile *Aisi 316 L* con *mesh* 28 μm , utilizzata in alternativa alla rete di poliammide, è stata pulita tramite sonicazione in H_2O *milliQ* per un'ora e poi lavata con acetone ed asciugata in stufa a 40 °C per 30min. La rete metallica poi è stata legata alla base del *pot* per separare i semi, e quindi le piante, dalla matrice acquosa durante la fase idroponica e dal terreno, durante la fase di esposizione.

2.3.1 Preparazione dei terreni

Prima dell'avviamento della fase di germinazione è stato preparato il terreno standard secondo quanto previsto dal metodo standard ISO 11269:2:2013 "Qualità del suolo – Determinazione degli effetti degli inquinanti su flora del suolo". La composizione prevede, in peso secco, i seguenti componenti:

- Torba di sfagno: 10% in peso. Questa è stata essiccata per 24 ore a 60 gradi in stufa, successivamente setacciata con un setaccio in acciaio con porosità di 2mm;
- Argilla caolinitica contenente non meno del 30 % di caolinite: 20% in peso;
- Sabbia di quarzo industriale (sabbia fine dominante con oltre il 50 % di granulometria da 0.05 mm a 0.2 mm): 69 % in peso;
- Una quantità compresa tra 0.3% - 1.0% di carbonato di calcio (CaCO₃, polverizzato, grado analitico), necessario per avere un pH di 6.0 ± 0.5.

Il terreno così preparato è stato miscelato, omogenizzato ed incubato in camera climatica a 25°C al buio, per 2 giorni, in modo che raggiungesse l'equilibrio e il valore di pH desiderato. Di seguito sono elencate: la composizione (tabella 7), le caratteristiche chimico fisiche (tabella 8) e le concentrazioni dei metalli in tracce del terreno (tabella 9) come richiesto dalla norma.

Tabella 7: Composizione del terreno standard

Materiale	Composizione (%)
Torba di Sfagno	10
Sabbia di Quarzo industriale	69
Argilla Kaolinitica	20
Carbonato di Calcio	1

Tabella 8: Caratteristiche chimico-fisiche del terreno standard e relativi metodi impiegati per l'analisi

Parametro	Valore	Metodo
pH	7.00	DM 13/09/99 Met III.1
Carbonio Organico Totale	4.78%	DM 13/09/99 Met VII.1
Conducibilità Elettrica	0.997 mS cm ⁻¹	DM 13/09/99 Met IV.1
Salinità	12.46 mS cm ⁻¹	DM 13/09/99 Met IV.1
Contenuto di Acqua	0.68 %	DM 13/09/99 Met II.2
Water Holding Capacity	63%	BS EN ISO 11269-2:2013 Met C
TKN	636 mg kg ⁻¹ s.s.	DM 13/09/99 Met XIV.2

Tabella 9: Concentrazione di metalli in tracce nel suolo standard e relativi metodi per l'analisi

Parametro	Valore (mg kg ⁻¹ s.s.)	Metodo
Antimonio (Sb)	<1	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Arsenico (As)	<5	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Berillio (Be)	<0.2	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Cadmio (Cd)	<0.2	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2
Cobalto (Co)	4,4	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2
Cromo Totale (Cr)	26	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2

Mercurio (Hg)	<0.05	EPA 3050B:1996 + UNI EN 16175-2:2016
Nichel (Ni)	23	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2
Piombo (Pb)	<5	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2
Rame (Cu)	20	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2
Selenio (Se)	<0.05	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Tallio (Tl)	<0.2	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Vanadio (V)	12	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Zinco (Zn)	19	DM 13/09/99 SO n°185 GU n°248 21/10/99 Met XI.2
Calcio (Ca)	44925	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Magnesio (Mg)	36369	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Potassio (K)	1429	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Sodio (Na)	41	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016
Fosforo (P)	635	UNI EN 16174:2012 Met.A + UNI EN 16170:2016

Le porzioni di terreno, ciascuna pari a 9 grammi (in peso secco, dw), sono state preparate e disposte in contenitori cilindrici di alluminio inerti, allocati in due vaschette di alluminio. Queste porzioni di suolo serviranno successivamente per la fase di esposizione.



Figura 16: Vasca di alluminio contenente sei terreni standard condizionati al 70% della $W.H.C.$

Durante l'intero periodo di coltura idroponica (21 giorni) lo standard prevede il condizionamento del suolo. Questo avviene dosando una quantità di soluzione nutritiva (la stessa che sarà usata per imbibire il suolo nella fase di esposizione) per raggiungere il 70% della *Water Holding Capacity* ($W.H.C.$) del terreno. Sapendo dunque che la $W.H.C.$ del suolo standard è pari a 63% (w/w), calcolata secondo quanto riportato nell'allegato C della norma stessa (ISO 16198:2015), il calcolo per determinare la quantità di soluzione da dosare per arrivare a $W.H.C.=70\%$ sarà:

$$V = m_{soil} \cdot WHC_{soil} \cdot WHC_i$$

Dove:

V: volume di soluzione, espressa in millilitri (mL), da aggiungere al suolo standard per raggiungere il valore di *water holding capacity* scelto (WHC_i);

m_{soil} : massa di suolo secco utilizzato, espressa in grammi (g);

WHC_{soil} : valore di *water holding capacity* del suolo utilizzato, calcolata secondo quanto descritto nell'appendice C del metodo ISO 16195:2015, in questo caso $WHC_{soil}=0.63$;

WHC_i : valore di *water holding capacity* che si vuole ottenere per il suolo scelto, in questo caso pari a 0.70;

Ad ogni porzione di terreno sono stati quindi aggiunti $V=4$ mL di soluzione, la cui composizione è riportata in tabella 10. I pesi complessivi per ogni terreno sono stati registrati in modo tale che ogni giorno sia possibile condizionare il suolo durante le fasi di germinazione e crescita delle piante, per un periodo complessivo di 20 giorni. La norma prevede che il suolo sia riportato al 70% di *W.H.C.* tutti i giorni ad esclusione del giorno prima dell'esposizione.

Tabella 10: Componenti e concentrazioni della soluzione nutritiva 3 per la fase di esposizione e per il condizionamento dei terreni al buio.

Reagente	Peso Molecolare ($g\ mol^{-1}$)	Concentrazione ($\mu mol\ L^{-1}$)
KH_2PO_4	136.09	50
KNO_3	101.10	2000
$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	236.15	2000
$MgSO_4$	120.37	1000

Infine, il suolo così condizionato è conservato al buio in camera climatica alle stesse condizioni operative nella quali si trovano le piante, ovvero a temperatura pari a 25 °C e umidità relativa pari al 75%. Per cui il condizionamento dei terreni è previsto a partire dal giorno stesso in cui inizia la germinazione.

2.3.2 Contaminazione dei suoli con i ritardanti di fiamma bromurati

In questo progetto di ricerca viene proposta una modalità di contaminazione artificiale dei terreni non trattata direttamente dal metodo. In particolare, al primo giorno di incubazione del terreno al suolo standard condizionato al 70% di *W.H.C.* è stata aggiunta una quantità nota di soluzione standard in acetone contenente i ritardanti di bromurati.

A partire dalle soluzioni degli standard di prima linea (elencate in tabella 14) di PBDE (BDE-47, BDE-99, BDE-153, BDE-183) e NBFR (PBEB, HBB, BTBPE, DBDPE), con l'impiego di una micropipetta tarata da 200 μL tramite diluizione, è stata preparata una soluzione da 10 mL di acetone, con concentrazione per ogni analita pari a 50 ng mL^{-1} .

Da questa soluzione contenente tutti e otto i BFRs, utilizzando una micropipetta tarata da 1000 μL , è stata prelevata una quantità pari a 900 μL ed è stata aggiunta ai 9 g (*dw*) di terreno standard in modo tale da ottenere la concentrazione desiderata di 5 ng g^{-1} *dw*.

Prima dell'aggiunta dei BFRs il suolo è stato condizionato al *W.H.C.*=70 %. Sono stati preparati otto terreni per ogni livello di concentrazione. Di questi, 5 sono utilizzati per l'esposizione e 3 come *bianco di esposizione*, ovvero il suolo non è stato messo a contatto con le piante. Questo successivamente è stato analizzato per determinare la concentrazione iniziale dei congeneri prima dell'esposizione.

La contaminazione artificiale del suolo è stata eseguita una volta, il giorno stesso in cui è iniziata la germinazione, dopo la preparazione dei suoli. L'inoculo dei composti è stato eseguito nella seguente modalità: sono state prelevate con micropipetta tarata 1000 μL due aliquote pari a 450 μL , la cui somma risulta 900 μL , aggiunte successivamente una all'altra al terreno formando un asterisco. Successivamente il terreno è stato omogenizzato con una spatola in acciaio inox precedentemente lavata con acetone e posta in stufa a 70°C per 30 min.

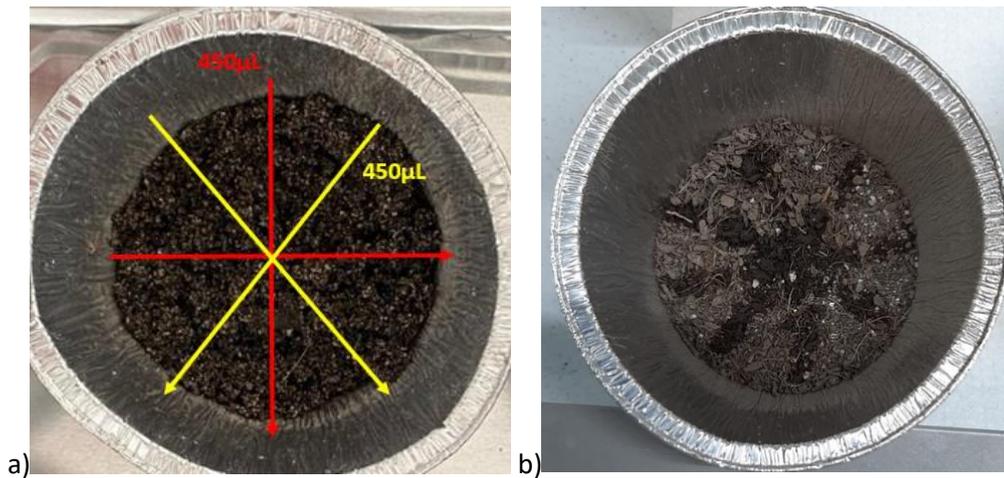


Figura 17: a) Descrizione schematica delle modalità di aggiunta della soluzione contenente i BFRs; b) Suolo dove è stata effettuata l'aggiunta dei contaminanti

Una volta effettuata l'aggiunta in acetone, il terreno è stato posto in camera climatica al buio. Per 20 giorni è stato riportato alla $W.H.C.=70\%$ ed omogenizzato, così da garantire il raggiungimento dell'equilibrio prima dell'esposizione e assicurare una distribuzione omogenea ed uniforme dei contaminanti bromurati.

2.3.3 Fase di Germinazione

La prima importante modifica alla norma ISO riguarda la sostituzione della rete di poliammide con una rete metallica in acciaio inox *Aisi 316 L* con *mesh* 28 µm, legata alla base del *pot*. Come indicato dal metodo, per un'eventuale analisi di assorbimento di composti organici è fondamentale sostituire la rete di poliammide con una rete costituita da materiale inerte in modo da prevenire fenomeni di adsorbimento delle molecole organiche su di essa.

In ogni *pot* sono stati aggiunti 40 semi di pomodoro *Solanum lycopersicum* L., per un totale di 720 semi in 18 *pot*. I semi sono stati precedentemente lavati con H_2O_2 al 6% per 10 min e risciacquati con acqua milliQ.

I 18 *pot* sono stati suddivisi in due gruppi da nove, adagiati su due basi di polistirolo con 12 fori ognuna, in modo da consentire il contatto con la soluzione nutritiva durante le fasi di germinazione e crescita.



Figura 18: a) Pot con rete contenente i semi lavati; b) Pot assemblati con rete e upper plate disposti sulla tavola galleggiante di polistirolo.

Ogni vasca è stata riempita con 6 L di soluzione nutritiva, adatta al periodo di germinazione, mostrata in tabella 11. In ogni vasca sono posti due insufflatori di ossigeno collegati ad una pompa, in modo da garantire la miscelazione costante dell'acqua, dei sali e la saturazione di O₂ disciolto. La durata della fase di germinazione è pari a sette giorni, in questo lasso di tempo le piante sono state mantenute in camera climatica a temperatura di 25°C e 75% di umidità relativa, al buio.



Figura 19: Germogli di *Solanum lycopersicum L.* al termine della fase di germinazione. Si nota la struttura del pot con la rete metallica alla base e l'upper-plate bianco.

Tabella 11: Componenti e concentrazioni della soluzione nutritiva 1 per la fase di germinazione al buio.

Reagente	Peso Molecolare (g mol ⁻¹)	Concentrazione (μmol L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	61.83	2
CaCl ₂	110.98	600

2.3.4 Fase di Crescita idroponica

Al termine dei 7 giorni previsti per la germinazione al buio, dove i *pot* con la rete metallica contenenti le piante sono a contatto con la soluzione nutritiva adatta, inizia la fase di crescita idroponica di durata pari a 14 giorni, dove si utilizza la soluzione nutritiva mostrata in tabella 12 e si espongono le piante ad una fase di luce: buio di 16:8 ore, una lunghezza d'onda $\lambda = 400-700$ nm ed intensità luminosa pari a $450 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La soluzione nutritiva, 6L per vasca, per la fase di crescita è stata cambiata ogni tre giorni, in seguito al primo rinnovo. Ad ogni cambio di soluzione previsto, le vasche sono lavate con acido nitrico al 10% e risciacquate tre volte con acqua demineralizzata. Questo passaggio serve per prevenire le eventuali contaminazioni da alghe. Ad ogni cambio di soluzione, la posizione delle piante nella tavola fluttuante di polistirolo è stata *randomizzata*, in modo da non avere delle crescite preferenziali legate alla posizione del *pot* in vasca.

Anche in questa fase è stata applicata una variazione, essa riguarda i tempi di crescita delle piante. In particolare la norma prevede un periodo di crescita idroponica in regime luce: buio di giorni pari a sette, mentre in questo progetto tale intervallo di tempo è stato aumentato a quattordici. L'incremento a 14 giorni per la crescita idroponica garantisce un maggiore e più omogeneo sviluppo di biomassa radicale e apicale. Di fatto questa modifica garantisce il confronto e la validità delle porzioni di prova sottoposte alla successiva fase di esposizione. Una problematica simile è stata riscontrata in una pubblicazione precedente sullo studio di assorbimento di residui di bauxite con impiego di RHIZOtest™ e gli autori hanno risolto in maniera equivalente a quanto fatto nel presente progetto di tesi (Di Carlo *et al.*, 2020).

Tabella 12: Reagenti e concentrazioni della soluzione nutritiva 2 per la fase di crescita idroponica in regime di luce:buio

Reagente	Peso Molecolare (g mol ⁻¹)	Concentrazione (μmol L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	136.09	500
KNO ₃	101.10	2000
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	236.15	2000
MgSO ₄	120.37	1000
CuCl ₂	134.45	0,2
H ₃ BO ₃	61.83	10
MnCl ₂	125.84	2
ZnSO ₄ x H ₂ O	179.47	1
Na ₂ MoO ₄	205.92	0,05
NaFe(III)EDTA	367.05	100

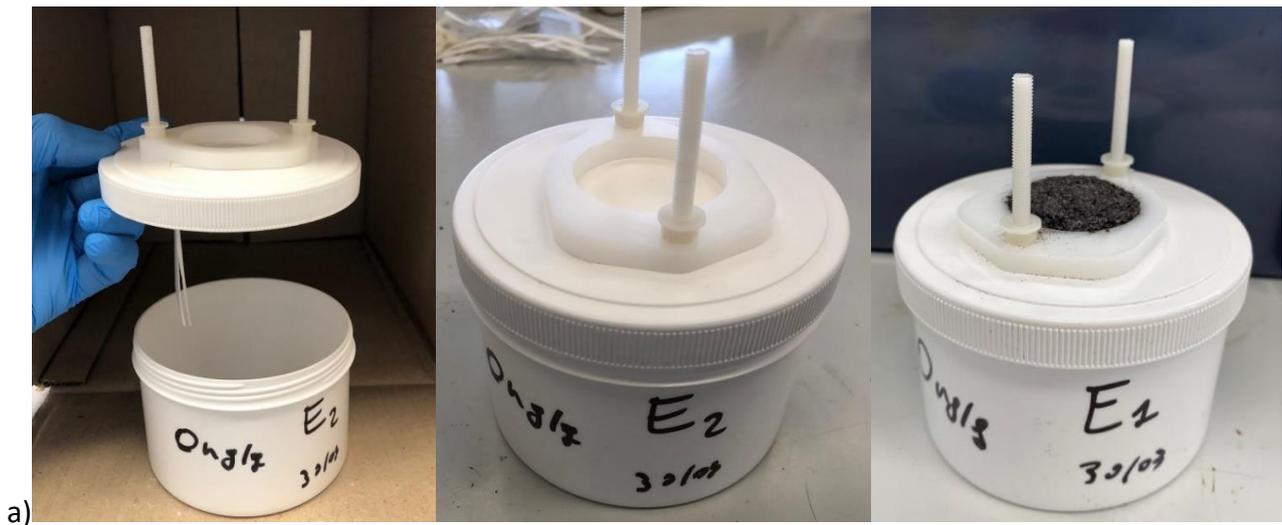


Figura 20: Fase di crescita idroponica: piante di *Solanum lycopersicum* al 20° giorno

2.3.5 Fase di Pre-esposizione: caricamento dei terreni.

Il giorno prima che avvenga l'esposizione delle piante al suolo contaminato, vengono assemblati i vasi e caricati con il terreno. Questi sono barattoli avvitabili che presentano due fori sul tappo dove far passare delle viti per fissare il *soil-receiving plate* (in HDPE) che ospiterà il terreno. Prima di avvitare il *soil-receiving plate* al tappo, vengono fatti passare tramite una fessura sul tappo del barattolo tre filtri in carta bibula. Questi si troveranno in parte immersi nella soluzione nutritiva, di volume pari a 0.5 L per barattolo. L'altra porzione è posata sulla parte alta del tappo, sotto al *soil-receiving plate* che ospita il terreno. La porzione immersa assorbe per capillarità la soluzione nutritiva, fino ad imbibire la parte di filtro fuori dal barattolo. Così facendo il terreno, una volta posto al di sopra del *soil-receiving plate* che lo contiene, sarà a diretto contatto con i filtri umidi, e si condiziona sino a $WHC = 100\%$. Questo viene fatto per 10 barattoli e 10 terreni, con lo scopo di esporre le piante contenute nei 10 *pot* scelti (5 replicati per il controllo e 5 replicati per l'assorbimento dal suolo contaminato).

I criteri per la scelta delle piante nei *pot* adatti indicati nella norma sono: l'assenza di piante malate, o presenza di piante morte, e l'omogeneità tra i campioni da esporre ad una determinata concentrazione, così da garantire un confronto.



a)



b)

Figura 21: a) Preparazione dei vasi ed aggiunta del terreno nel soil-receiving plate; b) vasi per l'esposizione con suolo condizionato al 100% di W.H.C. in camera climatica

Dopodiché, i vasi con i terreni condizionati sono mantenuti in camera climatica alle stesse condizioni di crescita delle piante, come mostrato in figura 21. Il giorno successivo alla preparazione, i vasi contenenti i suoli sono stati impiegati nella fase di esposizione.

2.3.6 Fase di Esposizione e Raccolta dei bianchi di pre-esposizione

La fase di esposizione inizia quindi dopo il 21° giorno dall'inizio della crescita idroponica, ovvero dopo i 7 giorni di germinazione al buio e i 14 giorni idroponica di crescita attraverso il ciclo luce:buio.

Degli iniziali 18 *pot* con la rete metallica contenenti le piante, ne sono stati selezionati 10 da esporre ai suoli, ovvero quelli che rispondono positivamente alle caratteristiche indicate dalla norma. Dei restanti 8 *pot* non impiegati per l'esposizione, 5 sono stati impiegati come *bianchi di pre-esposizione*, con lo scopo di indagare l'eventuale presenza di contaminazione da ritardanti di fiamma nella biomassa vegetale, prima che le piante siano messe a contatto con i terreni contaminati.

Questo passaggio è fondamentale per prevenire eventuali sovrastime, dando un'indicazione della presenza o meno dei BFRs indagati nello studio che potrebbero desorbirsi dalle componenti plastiche del sistema idroponico dove crescono le piante, prima che esse siano sottoposte all'esposizione.

Le piante presenti nei 5 *pot* definiti come *bianchi pre-esposizione*, sono state sciacquate con acqua *milliQ*, divise tramite taglio netto al fittone in radici e germogli. Una volta pesate le parti aeree e le radici, si procede all'essiccamento del campione per 72 ore in stufa a 40°C, prima di essere conservato in freezer a -15°C in vista delle analisi.



Figura 22: *Bianchi di pre-esposizione divisi in radici e germogli.*

Per procedere alla fase di esposizione i *pot* sono montati sopra al terreno. Infatti, questi presentano dei buchi negli *upper plate*. Questi servono per fissare l'*upper plate* con dei bulloni alle viti che passano attraverso i fori dei *soil-receiving plate*. Quindi il *pot* così montato, si trova a diretto contatto con il terreno, separato dalla rete metallica di *mesh size* pari a 28 μm . La soluzione nutritiva contenuta all'interno del barattolo, 0.5 L per barattolo, è stata cambiata ogni 2° giorno, a partire dal primo di

esposizione. La durata della fase di esposizione al terreno prevista dal metodo è di 8 giorni. La soluzione non deve essere cambiata il giorno prima della fine della fase espositiva.

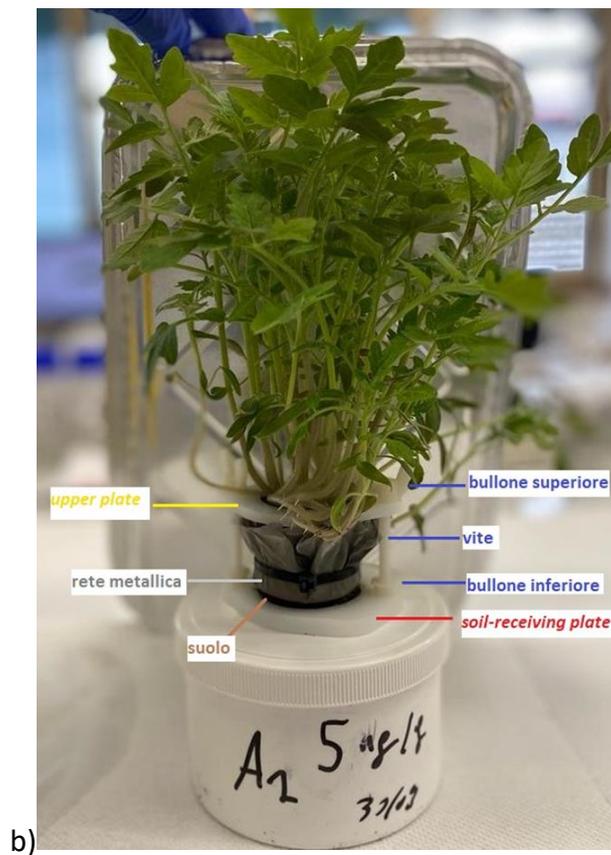


Figura 23: a) esposizione al terreno di 5 replicati con 40 piante di *Solanum lycopersicum* L. b) Pianta di pomodoro esposta al suolo contaminato, con relativi componenti strutturali indicati

2.3.7 Fase di Raccolta e Conservazione dei campioni

Una volta conclusa la fase espositiva, i *pot* vengono smontati dall'impalcatura che li sostiene. Successivamente, sono stati raccolti: i terreni contenuti nel *soil-receiving plate*, la porzione di terra rimasta legata per contatto con la rete metallica e la porzione legata al filtro assorbente in cellulosa usato per imbibire il suolo stesso.

I terreni *post-esposizione* sono stati conservati in contenitori di alluminio inerti. Le piante sono state delicatamente rimosse dai *pot*, lavate con acqua demineralizzata ed asciugate. Dopodiché è stato diviso l'apparato radicale da quello aereo, tramite taglio netto al fittone. Questo è riconoscibile dalla presenza di peli radicali, dal restringimento della sezione dello stelo e dal colore più chiaro. Le parti così separate sono state pesate tal quali, poi poste in contenitori di alluminio. I contenitori di alluminio contenenti rispettivamente suolo, germogli e radici, sono stati posti a seccare in camera climatica a 40 °C per 72 ore. Infine, terminata la fase di essiccazione, i campioni sono trasferiti in provette *falcon* e conservate a -15°C, fino al momento dell'analisi.

Dopo essiccazione, si procede alla fase di analisi chimica dei campioni per la determinazione quantitativa dei ritardanti di fiamma nelle tre componenti del sistema considerato (radici, germogli e suolo). In figura 24 è mostrato uno schema riassuntivo dei passaggi svolti per la crescita idroponica e l'esposizione al suolo dei replicati di piante.

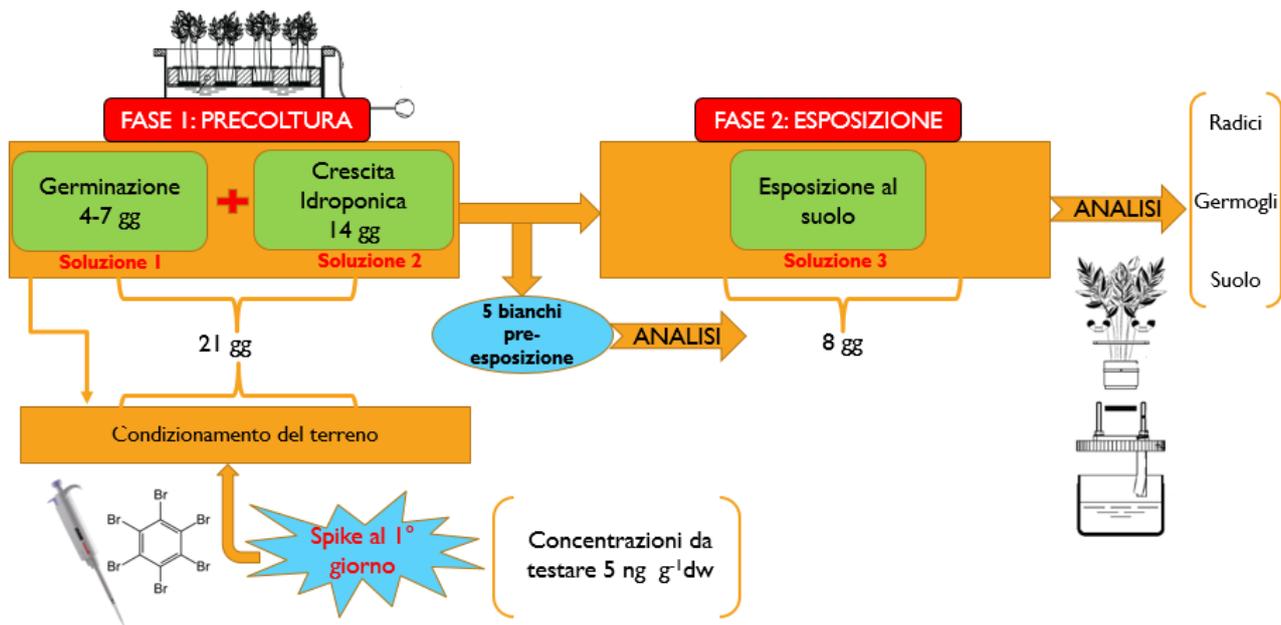


Figura 24: Schema esplicativo di tutte le fasi RHIZOtest™ secondo quanto previsto dal metodo ISO 16198:2015 adattata all'analisi di POPs

2.4 Metodologia Analitica: Trattamento del campione

Il trattamento del campione viene effettuato per estrarre e concentrare gli analiti di interesse, rimuovendo le componenti chimiche interferenti. Devono essere eliminati i composti che non sono di interesse e che possono interferire con la *performance* della colonna cromatografica o alterare il segnale strumentale. Lo scopo principale è quindi quello di semplificare la matrice contenete le molecole ricercate e rimuovere gli interferenti, per renderla adatta all'analisi strumentale. In questo caso, sono necessarie procedure di estrazione e di purificazione in colonna cromatografica in quanto le matrici biologiche studiate (radici, germogli) sono ricche di molecole ad alto peso molecolare (lipidi, clorofille, pigmenti, cere) che causerebbero una diminuzione della funzionalità della colonna cromatografica e disturbo del segnale analitico in GC-MS.

2.4.1. Omogeneizzazione del Campione

L'omogeneizzazione del campione è un passaggio che viene eseguito prima dell'estrazione. Questo è importante per aumentare la superficie di contatto della matrice e renderla più accessibile al solvente di estrazione, facilitando il rilascio degli analiti. L'omogeneizzazione del campione è stata eseguita con lo strumento *Turrax Homogenizer OV5* (Velp Scientifica) adatto allo sminuzzamento di tessuti biologici. Il dispositivo consta di un tubo di acciaio inox cavo con un corpo cilindrico interno collegato

direttamente al motore, fungendo da albero rotore. Il braccio rotore finisce con una vite dove viene avvitato l'utensile di dispersione VSS2CMR2, costituito da quattro lame poste in un diametro circolare di 20 mm. Lo strumento consente di raggiungere delle velocità di rotazione delle lame dell'utensile di dispersione che variano dai 10 ai 30 mila giri al minuto. L'impatto diretto della matrice con le lame e l'alta velocità di rotazione fanno sì che i tessuti vegetali siano finemente sminuzzati fino ad ottenere una sottile polvere. L'applicazione di questo metodo di omogeneizzazione si vede fondamentale per facilitare la successiva fase di estrazione, in quanto lo strumento è in grado di frantumare i tessuti vegetali e rompere le pareti e le membrane delle cellule vegetali, facilitando lo scambio dei composti bromurati con il solvente di estrazione.

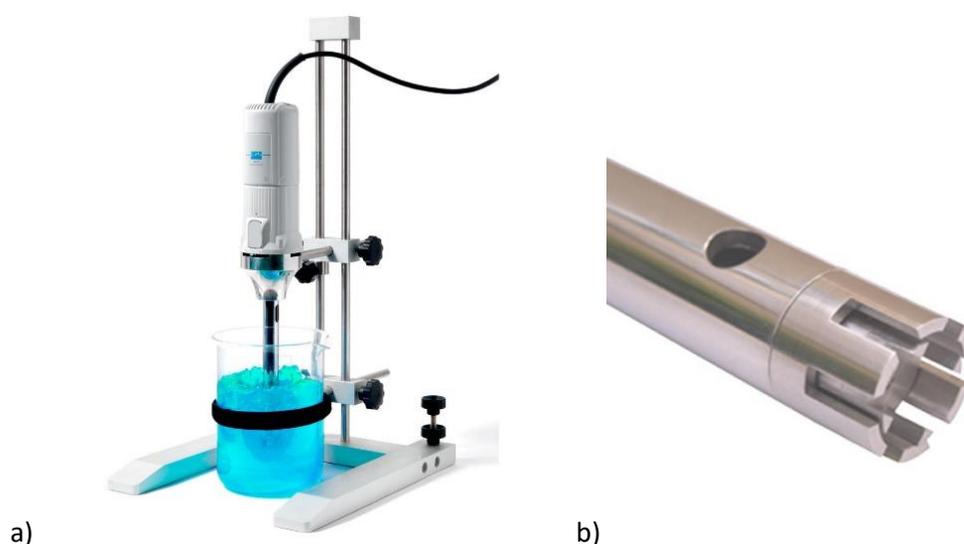


Figura 25: a) Omogeneizzatore OV5; b) utensile di dispersione a quattro lame VSS2CMR2

2.4.2 Estrazione in bagno ad ultrasuoni

Per l'estrazione si utilizza un bagno ad ultrasuoni costituito da una vasca per l'allocazione di più campioni. Tale tecnica impiega gli ultrasuoni garantendo alcuni importanti vantaggi: veloce ricambio del solvente intorno al materiale solido, rottura di eventuali pareti e membrane cellulari con conseguente aumento della superficie di contatto con il solvente, aumento della penetrazione del solvente e quindi un maggior trasferimento di massa dal solido al solvente (Chemat *et al*, 2016). Lo strumento impiegato è un bagno ad ultrasuoni *BANDELIN SONOREX DIGITEC* (ProfiLab GmbH, Berlino, Germania) che opera a frequenza di 50 KHz.



Figura 26: Bagno ad ultrasuoni termostatico

2.4.3 Purificazione

2.4.3.1 Purificazione liquido-liquido: trattamento acido con imbuto separatore

Il trattamento acido, per una prima purificazione, viene eseguito con l'utilizzo dell'imbuto separatore. Questa tecnica è molto utile per la rimozione di interferenti e può essere applicata in seguito ad una prima estrazione. Infatti ha lo scopo di concentrare le molecole target in un'unica fase liquida e di svolgere una funzione di *cleanup*. In questo studio la fase liquida usata per concentrare gli analiti è rappresentata dall' *n*-esano, mentre per la purificazione è stato impiegato 'acido solforico (puro al 95%). In particolare viene utilizzato per ossidare a CO₂ e rimuovere la sostanza organica interferente, come lipidi e pigmenti, presente nel liquido di estrazione dopo la prima fase di sonicazione (EPA, 2010). Questo renderà più efficienti le successive fasi di purificazione.

2.4.3.2 Colonna Cromatografica Impaccata

La cromatografia su colonna impaccata è una tecnica di purificazione solido-liquido che implica l'utilizzo di una fase stazionaria (solida) ed una fase mobile (liquida). I componenti della miscela di estrazione sono trasportati attraverso la fase stazionaria dal flusso della fase mobile, la separazione

dei componenti si basa sulle differenti velocità di migrazione tra i componenti della fase mobile e l'affinità con la fase stazionaria. In questa tecnica cromatografica la colonna è costituita da un tubo di vetro avente piccolo diametro. Sulla parte finale, dove si trova il rubinetto di scarico, presenta un solido inerte (lana di vetro) che sostiene la fase stazionaria (gel di silice neutro, attivata a 180 °C per un'ora) impaccata. La fase mobile occupa gli spazi vuoti tra le particelle del materiale impaccato. La soluzione di estrazione del campione viene introdotta in testa alla colonna. Dopodiché essa verrà eluita dalla fase mobile attraverso la fase stazionaria, dove interagendo con la fase stazionaria, avverrà la ripartizione. Ulteriori aggiunte di solvente fresco (fase mobile) trascinano le molecole del soluto lungo la colonna facendo avvenire una serie continua di trasferimenti tra le due fasi. Facendo passare in colonna la giusta quantità di fase mobile, si ha l'eluizione delle molecole di interesse, che possono essere raccolte, mentre gli interferenti rimangono legati alla fase stazionaria. Infatti, poiché gli interferenti sono maggiormente trattenuti dalla fase stazionaria, ritarderanno ad eluire durante la migrazione delle molecole, permettendo la raccolta degli analiti *target* che eluiscono per primi (Skoog, 2005).

2.4.3.3 Cromatografia ad esclusione dimensionale (GPC)

La cromatografia ad esclusione dimensionale, o gel cromatografia, è una tecnica di purificazione volta alla separazione dei componenti di una soluzione eterogenea, in base alla diversa dimensione delle molecole. È molto utile per la separazione di molecole ad alto peso molecolare, come i lipidi. Rientra nelle tecniche cromatografiche solido-liquido. Vede l'utilizzo di una fase stazionaria impaccata di particelle di silice molto piccole (circa 10 µm) oppure è costituita da una resina polimerica con una rete di pori uniformi. In entrambe i casi attraverso la fase stazionaria diffondono le molecole del soluto e del solvente. Mentre le molecole eluiscono con la fase mobile attraverso la fase stazionaria, esse sono trattenute all'interno dei pori di quest'ultima. Il tempo di ritenzione delle molecole è proporzionale alla loro dimensione. Il frazionamento avviene esclusivamente in funzione dell'ingombro sterico delle molecole: le molecole di dimensioni maggiori, non riuscendo ad entrare nella rete di pori, vengono direttamente eluite senza subire nessuna ritenzione. Le più piccole invece, avranno una dimensione adatta per la quale entrando nei pori, saranno ritenute, così da essere eluite successivamente alle prime, con volumi molecolari maggiori. A differenza di altre tecniche cromatografiche, questa non vede la presenza di nessuna interazione chimica o fisica tra i soluti e la fase stazionaria (Skoog, 2009). Lo strumento utilizzato è il modello *GPC-Azura DSCSVI* (Knauer,

Germania). La fase mobile utilizzata è una miscela 70-30 (v:v) di cicloesano:diclorometano, la fase stazionaria è una costituita da resina polimerica SX3 stirene-(divinilbenzene-3%), 40-80 μm mesh.



Figura 27: Cromatografo ad esclusione dimensionale AZURA DSCSVI

2.4.4 Riduzione del Volume e concentrazione finale

2.4.4.1 Rotavapor

Un *Rotavapor G3 Heidolph* (Heidolph, Germania) è stato utilizzato per la riduzione dei volumi dei campioni raccolti nei palloni. Una prima riduzione del volume del campione è stata eseguita dopo la fase di estrazione con l'imbuto separatore per ottenere un volume di 1mL da introdurre nella colonna cromatografica impaccata. Questo serve per concentrare gli analiti in testa alla colonna prima dell'eluizione, cosicché si aumenti in recupero. Una seconda riduzione di volume è invece svolta successivamente alla raccolta del campione eluito dalla colonna impaccata. In questo caso il volume ridotto era pari a 200 μL circa, in quanto il campione ridotto deve essere iniettato in GPC, dove il volume massimo di iniezione è pari a 500 μL . L'evaporatore rotante è uno strumento costituito da un braccio rotante che presenta nell'estremità un porta palloni con guarnizione di tenuta del vuoto, una vasca termostata dove il pallone è in parte immerso, un condensatore, un pallone di raccolta, una valvola di sfiato e una pompa a vuoto collegata al sistema. La pompa a vuoto opera una depressione volta a diminuire il punto di ebollizione dei solventi da evaporare. Infatti la combinazione dell'effetto della temperatura, della pressione del vuoto e dello scorrimento del liquido lungo le pareti del pallone mentre ruota, aumenta notevolmente l'evaporazione del solvente.



Figura 28: Rotavapor modello G3 Heidolph

2.4.4.2 Riduttore ad Azoto

La concentrazione finale del campione in *vial* avviene con l'utilizzo di un macchinario che opera tramite flusso di *azoto 5.0* inerte. Il campione trasferito in *glass screw neck vial* è posto su un piano riscaldato. Al di sopra di essa, dei piccoli tubi in acciaio presentano dei fori da cui fuoriesce il flusso di azoto. L'effetto combinato del flusso di azoto, a contatto diretto con la superficie del campione, e la temperatura diminuiscono la pressione parziale di vapore del solvente favorendo il passaggio in fase gassosa, allontanando il solvente mentre evapora. La bassa temperatura dell'azoto evita fenomeni di volatilizzazione degli analiti. Lo strumento utilizzato è un Evaporatore ad Azoto *M515-IA* (*MPM Instruments s.r.l.*, Bernareggio, Italia). Questo permette la riduzione del campione fino a 1 μL prima dell'aggiunta dello standard di siringa, in vista dell'analisi in GC-MS.



Figura 29: Evaporatore ad Azoto M515-IA

2.4.5 Procedura analitica per la determinazione di PBDEs e NBRs

Per la determinazione dei ritardanti di fiamma bromurati PBDE e NBR è stata applicata la metodologia EPA 1614A del 2010 per la “Determinazione di PBDE in acqua, suolo, sedimenti e tessuti per HRGC/HRMS (*High Resolution Gas Chromatography / High Resolution Mass Spectroscopy*)”, con delle variazioni metodologiche nella fase di estrazione, purificazione in colonna impaccata e analisi in GC-MS. I campioni analizzati, per ogni *pot*, sono composti da: radici, germogli e suolo *post-esposizione*. Sono stati analizzati anche tre campioni di suolo non esposti dove era stato eseguito lo *slope* e tre campioni di suolo non esposti dove non sono stati aggiunti i ritardanti di fiamma (*bianchi del suolo*). Infine sono stati analizzati i cinque replicati (germogli e radici) dei *bianchi di pre-esposizione*.

Tutti i materiali e la vetreria prima dell’utilizzo sono stati lavati con acetone e posti in stufa a 70°C per rimuovere eventuali contaminanti. Tutti i campioni sono stati trattati allo stesso modo, ad eccezione dello *step* di omogeneizzazione meccanica, applicato solamente a radici e germogli.

I campioni sono stati prelevati dal freezer dove erano mantenuti a -15°C. 1g di campione, pesata analitica (sia per radici, che germogli e suolo), è stato pesato con bilancia analitica *Sartorius Praxum 124-1S* e adagiato in un porta campioni Pyrex® in vetro boro silicato da 100mL. Al campione sono stati aggiunti 30 mL di soluzione estraente diclorometano:*n*-esano in proporzione 1:1 (v:v). Germogli

e radici sono stati omogeneizzati e finemente sminuzzati grazie all'impiego dell'omogeneizzatore *Turrax OV5 Homogenizer*, a 15mila rpm, necessario a frantumare le pareti e le membrane cellulari dei tessuti vegetali per facilitare il contatto e il trasferimento degli analiti verso la soluzione estraente. Tra l'omogeneizzazione delle radici e quella dei germogli, il puntale dello strumento è stato prima lavato con *n*-esano per rimuovere residui del campione dopodiché è stato smontato e lavato con acetone, posto in stufa a 70°C e poi riutilizzato per l'omogeneizzazione della matrice successiva. Il suolo era già finemente suddiviso per cui la omogeneizzazione è avvenuta solo tramite un rimescolamento con una spatola in acciaio inox prima della pesata. La spatola è stata lavata così da rimuovere eventuali residui. Ai campioni sono stati aggiunti 2.5 g di sodio solfato anidro per rimuovere l'eventuale presenza di acqua ed è stato aggiunto con una micropipetta tarata, 1000µL di standard di estrazione PBDE marcato ¹³C, EO-5277 a 50µg L⁻¹. Le Pyrex[®] sono state poi adagiate nella vasca termostatica del bagno ad ultrasuoni per procedere con l'estrazione. L'estrazione è avvenuta con un ciclo unico dalla durata di un'ora. L'estrazione eseguita in questo modo segue quanto riportato da *R. Hou et al.*, (2022) dove il metodo con l'impiego di diclorometano:*n*-esano 1:1 (v/v) è applicato per estrarre NBR da biomassa animale. I campioni estratti sono stati trasferiti mediante pipette Pasteur in vetro sodo-calcico dal diametro di 7mm e lunghezza 250mm, all'interno di imbuti separatori da 250mL di volume. Per ogni campione dopo il trasferimento sono stati eseguiti 3 lavaggi con *n*-esano, di circa 5mL ognuno, trasferendo nuovamente il contenuto all'interno dell'imbuti separatore. In ciascuno degli imbuti separatori contenenti i campioni estratti sono stati aggiunti 50mL di acido solforico puro al 95%, sono stati miscelati tramite agitazione e lasciati riposare durante la notte (15 ore). Questo passaggio serve rimuovere interferenti organici presenti nell'estratto tramite una forte ossidazione con conseguente eliminazione del materiale organico lipidico vegetale e formazione di CO₂. Il risultato di questa operazione è la concentrazione degli analiti nella fase organica costituita da diclorometano:*n*-esano e la rimozione degli interferenti da parte dell'acido, il quale verrà scaricato dal rubinetto dell'imbuti separatore e allontanato dall'estratto. Per questo motivo oltre all'estrazione, l'impiego dell'acido permette un primo *clean-up* dell'estratto ottenuto per sonicazione. Dopo la digestione acida, l'H₂SO₄ residuo è stato scaricato attraverso il rubinetto dell'imbuti separatore e sono stati eseguiti ulteriori 3 lavaggi acidi da 30 mL ciascuno. In seguito è stato eseguito un lavaggio con 50mL di acqua *milliQ*, per rimuovere l'acido in eccesso, un lavaggio con 30mL di KOH al 20% per riportare a neutralità il pH, ed infine, per la rimozione della base in eccesso, si è eseguito un lavaggio con ulteriori 50mL di acqua *milliQ*. L'estratto così ottenuto, di colore

trasparente, è stato trasferito in un pallone di vetro da 250mL con l'utilizzo di un imbuto di vetro da 45mm di diametro, riempito con 4g di sodio solfato anidro, sorretto da lana di vetro. L'imbuto contenente il sodio solfato, prima di essere usato per il trasferimento dell'estratto, è stato avvinato con 10mL di *n*-esano. Dopo il primo trasferimento, sono poi stati eseguiti 3 risciacqui con esano, da circa 5mL ciascuno, per rimuovere eventuali residui dalle pareti dell'imbuto separatore. L'estratto, prima di essere inserito nella colonna cromatografica impaccata, è stato ridotto a volume pari a 1mL circa, con l'ausilio dell'Evaporatore Rotante. La colonna cromatografica è stata impaccata nella seguente maniera: una piccola quantità di lana di vetro inerte è stata adagiata sul fondo della colonna dove si stringe la sezione prima del rubinetto, questa funge da supporto strutturale per la fase stazionaria; la fase stazionaria è costituita da 5g di gel di silice neutra attivata in stufa a 180°C per un'ora. La *silica gel* neutra serve a rimuovere i grassi apolari contenuti nell'estratto. Sopra e sotto lo strato di gel di silice neutra è stato posizionato uno strato di 2g di sodio solfato anidro. La colonna è stata condizionata con 50mL di esano e impaccata manualmente togliendo le bolle e garantendo l'assenza di corsie preferenziali. Quindi 1mL circa di campione prelevato dal pallone è stato introdotto in testa alla colonna con una pipetta Pasteur. Quando questo supera il primo strato di sodio solfato e permea la silice gel, inizia l'eluizione aggiungendo 50mL di *n*-esano fresco. L'eluato viene raccolto in un pallone da 250mL. Una volta raccolto, viene ridotto di volume. L'impiego del rotavapor consente una riduzione 'a goccia', corrispondente a circa 200 µL, volume utile all'iniezione in GPC attraverso la valvola di *load/inject*, in modalità manuale. Prima di iniettare il campione lo strumento viene condizionato. Le pompe lavorano a circa 30 *psi* per tutto il procedimento. Il condizionamento avviene aprendo la valvola di *purge*, impostando il flusso a 5mL min⁻¹ e facendo smuovere il pescante all'interno del solvente (fase mobile). Questo serve per rimuovere eventuali bolle d'aria dalla linea di caricamento della fase mobile, che potrebbero spaccare la fase stazionaria della colonna ad esclusione dimensionale e/o creare delle corsie preferenziali di scorrimento in essa, diminuendone la *performance*. Il solvente di scarto fuoriesce dalla valvola di *purge* e viene raccolto in un beker prima di essere scartato. Una volta eseguito questo primo condizionamento della linea, la valvola viene chiusa e il flusso è reimpostato a 1mL min⁻¹. Per completare il condizionamento la fase mobile costituita da cicloesano:diclorometano - 70:30 (v/v) viene fatta scorrere lungo la colonna ad esclusione dimensionale per circa 20min prima dell'iniezione del campione. Il campione viene prelevato con l'utilizzo di una siringa in borosilicato *Hamilton* da 1000µL. Vengono eseguiti più risciacqui possibili nel pallone con la fase mobile della GPC fino a raccogliere un volume massimo di 500µL. Prima di iniettare il campione, si utilizza una seconda siringa in borosilicato *Hamilton* da 2500

μL . Questa viene riempita per circa 2000 μL di fase mobile e iniettata nella linea di iniezione manuale con la valvola in posizione *load*, per avvinare la linea del campione e rimuovere le bolle di aria. Dopodiché, sempre con la valvola alzata in posizione *load*, viene iniettato il campione e abbassando successivamente la leva in posizione *inject*, viene avviata la corsa cromatografica. Questa operazione di iniezione è svolta molto lentamente per evitare che la pressione esercitata dal pistone della siringa sia tale che sul fronte di iniezione dello strumento si crei un flusso preferenziale, il quale se propagatosi all'interno della colonna, ne diminuisce le prestazioni. La *GPC*, impostata su programma manuale, opera una corsa di un'ora, dove vengono raccolti come volume finale 45mL di eluito, in un pallone di vetro da 100mL. Dopo l'utilizzo, la siringa impiegata per il campione è stata lavata per 15 volte con 1ml di fase mobile della *GPC* per evitare fenomeni di *cross-contamination* tra l'iniezione di un campione e il successivo. Il campione raccolto viene successivamente ridotto *a goccia* con l'impiego del rotavapor. L'ultimo passaggio prevede il trasferimento mediante pipetta Pasteur sterile della soluzione ridotta all'interno di una *vial glass screw neck*, 12x32mm. Dopo un primo trasferimento sono eseguiti vari lavaggi del pallone con *n*-esano, per trasferire in *vial* possibili residui adesi alle pareti del pallone, fino a riempimento della *vial*. Infine si utilizza il riduttore ad azoto con la piastra riscaldata a 50°C, per ottenere un volume pari a circa 1 μL , riconoscibile dalla posizione del liquido nel menisco della *vial*. Prima dell'analisi strumentale, con l'utilizzo di una micropipetta tarata, si aggiungono 50 μL di standard di siringa PCB-209 EC-1410-3, concentrato a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.5 Analisi Strumentale

Le impostazioni strumentali per l'analisi in GC-MS con analizzatore a singolo quadrupolo seguono quanto riportate da *Vrkoslavová et al.*, per l'analisi di PBDE in matrici vegetali (*Vrkoslavová et al.*, 2010).

Le impostazioni strumentali per l'analisi in GC-MS/MS seguono quanto riportato da *Bonato et al.*, per l'analisi di NBR in matrici vegetali (*Bonato et al.*, 2022).

2.5.1 GC-MS singolo quadrupolo

La determinazione di PBDEs è stata condotta in un'unica corsa analitica con un gas cromatografo *Agilent 6890 – GC System* equipaggiato con colonna capillare ad alta risoluzione in silice fusa *DB-XLB* con fase stazionaria in polisilossano; (30m lunghezza, 0.25 mm diametro interno, 0.10 µm di spessore del film; *Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, USA). Il sistema GC lavora accoppiato ad uno spettrometro di massa con analizzatore a singolo quadrupolo (MS-SQ) *Agilent 5975C* a Ionizzazione Chimica Negativa (GC-MS-NCI). Il sistema lavora introducendo il campione con modalità *splitless*, questo poi viene vaporizzato nel *liner* e trasportato dalla fase mobile costituita da *Elio 5.0* puro al 99.999% (*SIAD*, Italia) nella testa della colonna dove ricondensa. La separazione cromatografica avviene grazie ad un programma di temperatura per la quale si vede un aumento graduale e progressivo che permette l'ebollizione selettiva dei composti presenti nel campione. Il campione in fase gas separato dal cromatografo entra nello spettrometro di massa dove avviene la Ionizzazione Chimica Negativa con Metano come gas reagente a pressione 2×10^{-4} mbar, puro al 99.995% (*SIAD*, Italia). Le molecole del campione in fase gassosa vengono ionizzate in seguito a collisioni con gli ioni del gas reagente prodotti per bombardamento con elettroni. La quantità di gas reagente introdotta nella zona di ionizzazione è tale da avere un rapporto di concentrazione reagente/campione di 10^3 - 10^4 così da garantire che il fascio di elettroni colpisca solo il gas reagente. La ionizzazione chimica negativa è utile per ionizzare molecole alogenate ed elettronegative. Le molecole così ionizzate vengono dapprima accelerate grazie ad una differenza di potenziale (70 eV) e dirette verso l'analizzatore di massa a singolo quadrupolo tramite lenti focalizzatrici. Il quadrupolo è un analizzatore di massa costituito da quattro barre cilindriche parallele che fungono da elettrodi. Le barre opposte sono elettricamente collegate tra di loro, una coppia al polo positivo di un generatore in corrente continua e l'altra coppia al polo negativo. In entrambe le coppie di elettrodi è applicato un potenziale variabile in corrente alternata a radiofrequenza. Gli ioni vengono accelerati applicando una differenza di potenziale, mentre i potenziali sulle barre a corrente continua ed alternata sono aumentati simultaneamente e mantenendo il loro rapporto costante. Gli ioni che attraversano il quadrupolo sono soggetti ad un moto a spirale dato dalla somma del moto circolare sul piano verticale e del moto rettilineo uniforme sul piano orizzontale. In un certo istante, tutti gli ioni tranne quelli di un determinato valore di massa su carica (m/z) colpiranno le barre e diventeranno molecole neutre. Solo li ioni aventi uno specifico rapporto m/z manterranno una traiettoria stabile e raggiungeranno il trasduttore.

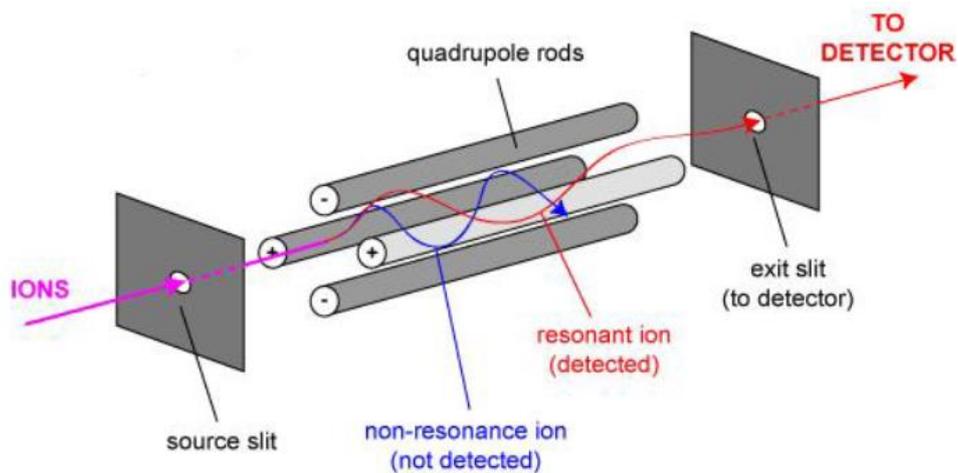


Figura 30: Schema di funzionamento di un quadrupolo (Gates, 2014).

Quest'ultimo è un moltiplicatore di elettroni, costituito da una serie di dinodi che raccolgono li ioni positivi da cui inizia una cascata di elettroni, amplificando il segnale ionico e restituendo proporzionalmente un segnale elettrico. Le analisi sono state condotte in modalità di acquisizione SIM (*Selected Ion Monitoring*). La calibrazione dello strumento viene eseguita con materiale di riferimento perfluorotributilammina (PFTBA) FC43 (Agilent).



Figura 31: Agilent 6890 – GC System accoppiato ad uno spettrometro di massa con analizzatore a singolo quadrupolo Agilent 5975C.

2.5.2. GC-MS/MS a triplo quadrupolo

La quantificazione dei NBFR è stata eseguita utilizzando un Gas Cromatografo *Agilent 7890B* equipaggiato con colonna capillare ad alta risoluzione in silice fusa *HP-5ms ultra-inert*, con fase stazionaria in (5%-fenil)-metilpolisilossano; (15m lunghezza, 0,25mm diametro interno e 0,25 μm di spessore del film, *Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, USA). Il sistema cromatografico è accoppiato ad uno spettrometro di massa *tandem* con analizzatore a triplo quadrupolo (MS/MS o MS-QqQ) *7000D* che opera una ionizzazione ad Impatto Elettronico (EI). Questo filtro di massa è costituito da tre quadrupoli posti in serie, di cui quello centrale viene nominato cella di collisione. Il gas carrier utilizzato è Elio puro al 99.999% (*SIAD*, Italia). Gli analiti una volta risolti dal gas cromatografo sono ionizzati tramite impatto elettronico. Il campione volatilizzato è quindi immesso in una fenditura dove incontra perpendicolarmente un fascio di elettroni. Questi provengono da un filamento di Tungsteno riscaldato. Sono poi accelerati da una differenza di potenziale (70 eV) tra il filamento e l'anodo. La ionizzazione del campione avviene per perdita di elettroni per repulsione dovuta agli scontri con il fascio derivante dal tungsteno. Gli ioni positivi del campione sono poi accelerati e convogliati verso il primo analizzatore (Q1), che agisce come un semplice filtro di massa rendendo possibile il passaggio a molecole con rapporto m/z specifico, che raggiungeranno la cella di collisione (Q2 o q). In questa regione dello spazio avviene la dissociazione degli ioni selezionati da Q1. Questo quadrupolo funziona solo in modalità radiofrequenza senza applicare nessun potenziale continuo lungo le barre. Questa funzione rende possibile l'intrappolamento degli ioni (detti *ioni-precursori*) e permette la formazione di ioni frammento (o *ioni-prodotto*), generati dalla collisione ad alta velocità con il gas inerte. Infine il terzo quadrupolo (Q3) agisce di nuovo da filtro di massa selezionando gli ioni prodotto della collisione che hanno uno specifico rapporto m/z . Questo MS-QqQ aumenta molto la specificità e sensibilità dell'analisi. I diversi analiti sono stati determinati in base a due transizioni ioniche e al tempo di ritenzione. Le analisi sono state condotte in modalità di acquisizione SIM (*Selected Ion Monitoring*).

Lo strumento è ad alta risoluzione. Il potere risolutivo (R) è indice della qualità dello strumento ed è definita dal rapporto:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Dove:

Δm : rappresenta la differenza tra le masse di due ioni i cui picchi si sovrappongono al massimo per il 10%;

m : indica la massa minore tra le due considerate.

Questa definizione si traduce nella capacità dello strumento di risolvere due picchi che risultano molto vicini tra di loro e di distinguere due ioni aventi masse simili. La calibrazione dello strumento viene eseguita con materiale di riferimento perfluorotributilammina (PFTBA) FC43 (Agilent).



Figura 32: Agilent 7890B GC System accoppiato a spettrometro di massa tandem con analizzatore a triplo quadrupolo Agilent 7000D.

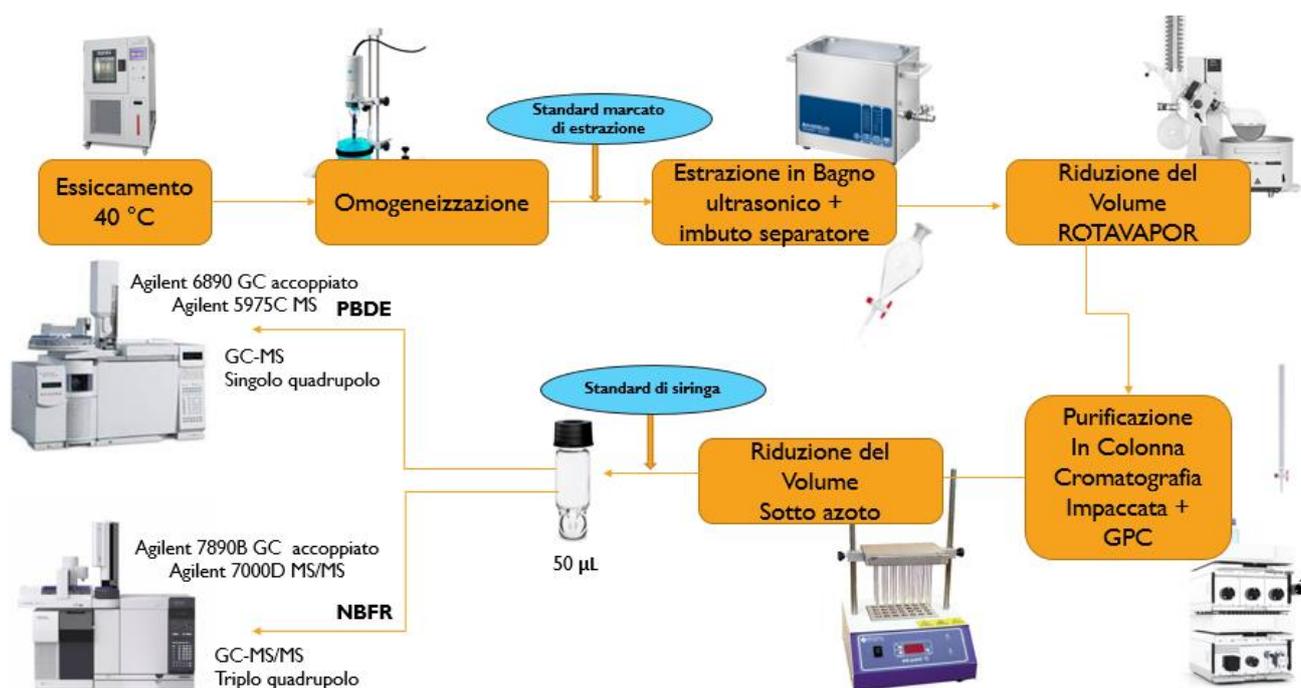


Figura 33: Schema esplicativo della metodologia analitica applicata per analisi di PBDE e NBFR.

2.5.3 Condizioni operative di analisi

Analisi PBDEs

Analiti: BDE-47, BDE-99, BDE-153, BDE-183

Gasromatografo

Modalità iniettore: *Splitless*

Temperatura iniettore: 275 °C

Flusso *gas-carrier*: 1.5 mL min⁻¹

Rampa di temperatura: da 105°C (per 2 min), innalzamento di 20 °C min⁻¹, fino a 300 °C (per 5 min).

Spettrometro di massa singolo quadrupolo

Temperatura Sorgente: 150°C

Sorgente: 280 °C

Temperatura *Transferline*: 325 °C

Temperatura Quadrupolo: 105°C

Calibrante: PFTBA FC43

Analisi NBFRs

Analiti: HBB, PBEB, BTBPE, DBDPE

Gasromatografo

Modalità iniettore: *Splitless*

Temperatura iniettore: 100°C per 0.2 min, aumenta a 300°C con ratio di 900°C min⁻¹

Flusso *gas-carrier*: 1.8 mL min⁻¹ per 8.25 min , aumenta a 100 mL min⁻¹ , poi diminuisce a 4mL min⁻¹

Rampa di temperatura: da 80°C (per 1 min), innalzamento di 37°C min⁻¹, fino a 230 °C ,
innalzamento di 30°C min⁻¹, fino a 325°C .

Spettrometro di massa in tandem:

Sorgente EI: 70eV

Temperatura Sorgente: 280°C

Temperatura Quadrupoli: tutti e tre a 150°C

Temperatura *transferline*: 325°C

Calibrante: PFTBA FC43

2.6 Quantificazione

Per la quantificazione degli analiti si usano standard interni (o di estrazione) marcati isotopicamente e la tecnica della diluizione isotopica, sfruttando la transizione ionica più abbondante. Questa tecnica si basa sulla misura del rapporto di variazione dell'intensità del segnale di due isotopi di un elemento dopo l'aggiunta di una quantità nota di una soluzione standard arricchita con uno degli isotopi. Il vantaggio offerto dalla tecnica è una maggiore accuratezza e la minimizzazione di interferenze chimico-fisiche. Gli standard interni sono costituiti da composti marcati ¹³C, isotopi delle molecole *target*, il cui comportamento è analogo ai corrispondenti composti nativi durante l'intero

trattamento del campione. Di conseguenza le perdite di analita e di standard marcato saranno proporzionali.

In fase preparativa, vengono aggiunte quantità note di standard interno marcato isotopicamente, cosicché possano essere tracciate le perdite di analita durante tutto il processo preparativo. Questi standard interni permettono infatti la quantificazione in base al confronto delle aree dei picchi cromatografici. Inoltre, lo spettrometro di massa sarà in grado di distinguere i composti nativi da quelli marcati isotopicamente, grazie alla differenza del rapporto massa/carica (m/z).

La sensibilità dello strumento mostra delle variazioni rispetto ai singoli congeneri, da cui è necessario correggere la risposta dello strumento con soluzioni standard a concentrazione nota, contenenti tutti i composti sia nativi che marcati. Questo permetterà di ottenere il fattore di risposta strumentale (FR) per ogni singolo analita. Una volta preparate, queste soluzioni sono iniettate alle stesse condizioni operative impiegate per analizzare i campioni. Infine, confrontando le aree dei picchi, si ottengono i valori di concentrazione.

Il fattore di risposta strumentale i -esimo $FR_{(i)}$ è calcolato tramite la seguente formula:

$$FR_{(i)} = \frac{A_i}{A_m} * \frac{C_m}{C_i}$$

Dove:

A_i : area del picco del composto nativo i -esimo;

A_m : area del picco del corrispondente composto marcato isotopicamente;

C_m : concentrazione nota del composto marcato isotopicamente;

C_i : concentrazione nota del composto nativo i -esimo.

Il segnale analitico è tanto più corretto quanto più i diversi FR congeneri-specifici tendono ad 1. Invece, la concentrazione degli analiti si ottiene tramite il rapporto delle aree dei picchi rispetto ai fattori di risposta e il peso del campione. La formula per il calcolo della concentrazione i -esima $C_{(i)}$ segue l'equazione:

$$C_{(i)} = \frac{A_i}{A_m} * \frac{Q_m}{FR_{(i)}} * \frac{1}{P_c}$$

Dove:

A_i : area del picco del composto nativo i-esimo;

A_m : area del picco del corrispondente composto marcato isotopicamente;

Q_m : quantità assoluta del composto marcato isotopicamente;

$FR_{(i)}$: fattore di risposta del composto i-esimo;

P_c : peso del campione.

Per una stima delle perdite di analita durante le fasi di trattamento del campione, sono aggiunte quantità note di standard interno a monte e a valle del processo. Lo standard a valle è detto *di recupero* (o di siringa), attraverso il quale è possibile calcolare la resa percentuale di tutto il metodo: R (%).

$$R(\%) = \frac{A_m}{A_r} * \frac{Q_r}{Q_m} * \frac{1}{FR} * 100$$

Dove:

A_m : area del picco dello standard interno marcato isotopicamente;

A_r : area del picco dello standard interno di recupero;

Q_r : quantità assoluta dello standard interno di recupero;

Q_m : quantità assoluta dello standard interno marcato isotopicamente; FR : fattore di risposta.

2.6.1 MDL e MQL

I metodi analitici applicati in laboratorio prevedono diversi passaggi e l'utilizzo di diverse strumentazioni tecniche, richiedono una preparazione ed un pretrattamento del campione prima dell'analisi effettiva per quantificare le molecole ricercate. Più passaggi prevede il metodo, più possibilità di errore possono presentarsi. In questi casi è necessario definire un limite di rilevamento "globale" che includa tutti i passaggi del metodo di analisi applicato, questo è conosciuto come "Limite di rivelabilità del metodo" abbreviato in MDL. Esso è definito dall'EPA (*Environmental Protection Agency*) come "la concentrazione minima di una sostanza che può essere misurata e segnalata, con una accuratezza statistica del 99% che la concentrazione dell'analita è maggiore di zero ed è determinata dall'analisi di un campione in una data matrice contenente l'analita" (EPA,

2016). Il Limite di rivelabilità del Metodo è calcolato a partire dall'analisi di n=10 bianchi procedurali sottoposti all'intera procedura analitica, secondo la formula:

$$MDL = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} * S_b$$

Dove:

$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$: indica il valore *t di Student* appropriato per una statistica t-test a coda singola del 99° percentile e una stima della deviazione standard con *n-1* gradi di libertà;

S_b : la deviazione standard dei replicati dei bianchi procedurali considerati.

Ad esso è associato il “Limite di Quantificazione del metodo”, o MQL, definito come il valore di concentrazione più bassa alla quale i dati possono essere riportati. A differenza del MDL, il Limite di Quantificazione del Metodo (MQL) non è stato stimato ma verificato sperimentalmente. Secondo quanto stabilito dalle procedure del sistema qualità del laboratorio, è stato applicato il metodo analitico su 10 campioni della matrice di interesse, ai quali sono stati aggiunti gli FRs a concentrazioni tali da garantire recuperi superiori all'85%.

2.6.2 Qualità del Dato

Tutti gli *step* analitici sono stati condotti nell'ottica di minimizzare le possibilità di *cross-contamination* e la degradazione dei BFRs indagati. La vetreria è stata lavata, risciacquata con acetone e trattata termicamente per eliminare eventuali residui organici. Tutte le strumentazioni sono state condizionate prima del loro utilizzo. Prima delle analisi in GC-MS i campioni sono stati conservati in frigo al buio a temperatura pari a 5°C.

Per ciascuno dei gruppi bromurati di ritardanti di fiamma, si presume che un composto fosse identificato positivamente quando:

- il relativo tempo di ritenzione non differiva di oltre il 5% da quello degli standard analitici;
- il rapporto segnale-rumore (*S/N*) di entrambe le transizioni hanno superato 3:1;
- l'abbondanza relativa tra le transizioni rientrava nel $\pm 20\%$ delle misurazioni.

La curva di calibrazione di ciascun PBDE e NBFR è composta da 5 punti; le soluzioni per la taratura vengono preparate con l'utilizzo degli standard nativi PBDE, NBFR e lo standard marcato ^{13}C (tabella

13 e tabella 14). Tutte le funzioni di calibrazione sono caratterizzate da un valore del coefficiente di correlazione r^2 maggiore di 0.9965.

Tabella 13: Soluzione di standard marcati di estrazione EO-5277

BDE marcato	BDE *	Concentrazione ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
2,4,4'-TriBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	28 L	1
2,2',4,4'-TetraBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	47 L	1
2,2',4,4',5-PentaBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	99 L	1
2,2',4,4',6-PentaBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	100 L	1
2,2',4,4',5,5'-HexaBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	153 L	1
2,2',4,4',5,6'-HexaBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	154 L	1
2,2',3,4,4',5',6-HeptaBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	183 L	1
DecaBDE ($^{13}\text{C}_{12}$, 99%)	209 L	10

Tabella 14: Standard nativi

Nome comune	Nome IUPAC	Nome Standard
BDE-47	2,2',4,4'-Tetrabromodifenil-etere	RPE-080S-1
BDE-99	2,2',4,4',5-Pentabromodifenil-etere	BDE-99-CS
BDE-153	2,2',4,4',5,5'-Esabromodifenil-etere	RPE-083S-1
BDE-183	2,2',3,4,4',5',6-Eptabromodifenil-etere	BDE-183-CS
PBEB	Pentabromo-etilbenzene	FRS-048S
HBB	Esabromobenzene	FRS-013S
BTBPE	1,2-bis(2,4,6-tribromofenossi)-etano	FRS-037S
DBDPE	1,2-bis(2,3,4,5,6-pentabromofenil)-etano	FRS-036S

I valori di recupero sono stati calcolati a partire dallo standard di siringa PCB-209 (EC-1410) e dagli standard interni marcati EO-5277 (*Method 1614 Labeled Surrogate Stock Solution*) e risultano tutti accettabili e compresi tra 87.4 ± 1.5 e 102.1 ± 1.0 %.

In particolare, il valore percentuale di recupero (R%) per la classe dei PBDE varia da 92.7 ± 0.7 a 102.1 ± 1.0 per i campioni di pianta (radici e germogli) e da 101.4 ± 1.6 a 89.7 ± 1.5 per i campioni di suolo analizzati. Il valore percentuale di recupero (R%) per la classe degli NBFR varia da 87.4 ± 1.5 a 92.8 ± 1.8 per i campioni di pianta (radici e germogli) e da 87.8 ± 1.3 a 96.5 ± 0.8 per i campioni di suolo analizzati.

Per la famiglia dei PBDE, i valori di MQL (ng g^{-1}) determinati variano da 0.05 a 0.09 per i campioni di pianta (radici e germogli) e da 0.08 a 0.14 per i campioni di suolo analizzati. I valori di MDL (ng g^{-1}) determinati variano da 0.03 a 0.06 per i campioni di pianta (radici e germogli) e da 0.04 a 0.09 per i campioni di suolo analizzati.

Per la famiglia degli NBFR, i valori di MQL (ng g^{-1}) determinati variano da 0.08 a 0.1 per i campioni di pianta (radici e germogli) e da 0.09 a 0.15 per i campioni di suolo analizzati. I valori di MDL (ng g^{-1}) determinati variano da 0.05 a 0.07 per i campioni di pianta (radici e germogli) e da 0.06 a 0.08 per i campioni di suolo analizzati

Maggiori informazioni su tutti i valori di recupero, r^2 della curva di calibrazione per ogni molecola e relativo standard interno marcato per la quantificazione sono riportati in tabella 15.

Tabella 15: Limite di rilevabilità del metodo (MDL) e limite di quantificazione del metodo (MQL) nella pianta (radici e germogli) e nel suolo per ciascun composto testato.

Composto	SI	CC r^2	Pianta (radice e germoglio)			Suolo		
			MQL (ng g^{-1})	MDL (ng g^{-1})	Recupero (%)	MQL (ng g^{-1})	MDL (ng g^{-1})	Recupero (%)
PBEB	^{13}C -BDE-47	0.99965	0.08	0.05	87.4 ± 1.5	0.11	0.08	89.6 ± 1.1
HBB	^{13}C -BDE-47	0.99924	0.06	0.03	91.3 ± 0.9	0.09	0.06	94.5 ± 1.0
BTBPE	^{13}C -BTBPE	0.99987	0.08	0.06	89.5 ± 1.1	0.12	0.06	87.8 ± 1.3
DBDPE	^{13}C -BDE-209	0.99654	0.10	0.07	92.8 ± 1.8	0.15	0.08	96.5 ± 0.8
BDE 47	^{13}C -BDE-47	0.99942	0.05	0.03	102.1 ± 1.0	0.08	0.04	101.4 ± 1.6
BDE 99	^{13}C -BDE-99	0.99945	0.08	0.05	97.3 ± 0.8	0.09	0.06	100.7 ± 0.7
BDE 153	^{13}C -BDE-153	0.99978	0.07	0.04	98.5 ± 0.6	0.08	0.05	95.4 ± 0.9
BDE 183	^{13}C -BDE-183	0.99921	0.09	0.06	92.7 ± 0.7	0.14	0.09	89.7 ± 1.5

SI= Standard interno per la quantificazione. CC= curva di calibrazione. MQL= limite di quantificazione del metodo. MDL= limite di rilevamento del metodo.

3. RISULTATI e DISCUSSIONE

3.1 Pesi secchi delle piante

L'aumento di tempo del periodo di *pre-coltura* idroponica, da 14 (previsti dal metodo) a 21 giorni, ha portato ad un maggior sviluppo vegetale ed un incremento significativo in termini di peso secco. In particolare, da un confronto tra due gruppi di repliche (n=5), le piante cresciute per un periodo di tre settimane hanno riscontrato un aumento di peso pari al +77% per le radici e +41% per i germogli.

Nella tabella 16 sono mostrati i dati relativi al peso medio in grammi di sostanza secca (*dw*) dei campioni di radici, germogli e dell'intera pianta, in riferimento alla specie *Solanum lycopersicum* L. (pomodoro) esposta al suolo standard non contaminato (tesi T0) e al suolo contaminato (tesi T5). I dati sono espressi come valore medio \pm deviazione standard (n=5).

Tabella 16: Dati relativi ai valori medi \pm deviazione standard dei pesi (g) delle radici, germogli ed intera pianta espressi in grammi di sostanza secca (dw), determinati con n=5 repliche. I valori medi accomunati dalla stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

Tesi	Peso radici	Peso germogli	Peso piante
T0	1.01 ^a \pm 0.10	2.71 ^c \pm 0.30	3.72 ^d \pm 0.3
T5	0.85 ^b \pm 0.03	2.38 ^c \pm 0.24	3.23 ^e \pm 0.3

T0= repliche di controllo esposte al suolo non contaminato; T5= repliche esposte al suolo contaminato a 5ng g⁻¹ dw.

Il peso secco (*dw*) medio misurato per radici e germogli al termine degli 8 giorni di esposizione era di 1.01 \pm 0.1 g e 2.71 \pm 0.3 g per le piante esposte al suolo non contaminato e 0.85 \pm 0.03 g e 2.38 \pm 0.24 g per le piante esposte al suolo contaminato a concentrazione pari a 5 ng g⁻¹ dw.

Dall'analisi statistica mediante t-test per il confronto dei pesi tra i due campioni di piante, con intervallo di confidenza pari a 95%, è stata denotata una differenza significativa per il peso medio delle radici e nei pesi medi relativi all'intera pianta. La riduzione di peso per le radici relative alle piante esposte al suolo inquinato, in particolare, è pari al 15.8 % e rappresenta un possibile effetto di inibizione da parte dei BFRs sullo sviluppo radicale.

Tuttavia, nonostante i test statistici confermino la non significatività nella differenza di valore dei pesi secchi per i germogli, si riscontra comunque un minor peso dei campioni nelle piante esposte al suolo contenente i ritardanti di fiamma (2.38 g per i germogli) rispetto ai campioni relativi alle piante esposte al suolo di controllo non contaminato (2.71 g per i germogli). Questo potrebbe essere causato

dal diverso sviluppo radicale, inibito nel suolo contaminato, il quale implica un minor sviluppo della pianta nelle sue porzioni aeree e di conseguenza un minor peso nel suo insieme. In letteratura, infatti, sono riportati studi dove la biomassa totale delle piante testate diminuiva con l'aumento delle concentrazioni di BFRs nella matrice, in particolare l'inibizione della crescita degli apparati aerei è stata indicata come conseguenza della ridotta crescita dell'apparato radicale nel mezzo contaminato (Meng *et al*, 2018; Bonato *et al*, 2022; Li *et al*, 2018).

In seguito a queste considerazioni si può ipotizzare un possibile effetto inibitorio sulla crescita radicale che implica un conseguente ridotto sviluppo fogliare per le piante esposte al suolo contaminato con le due classi di ritardanti di fiamma bromurati. Infine, questo effetto inibitorio sullo sviluppo radicale si riscontra nei pesi medi dell'intera pianta, che differiscono significativamente (3.72 ± 0.3 g *dw* per le piante esposte al suolo di controllo rispetto ai 3.23 ± 0.3 g *dw* per le piante esposte al suolo contaminato, $p \leq 0.05$).

3.2 Assorbimento di PBDE e NBFR nelle piante di Pomodoro esposte

Nessuno tra gli otto analiti indagati è stato trovato nelle piante impiegate come bianchi di *pre-esposizione*, indice del fatto che il sistema impiegato per la crescita idroponica non rilascia i ritardanti di fiamma testati. Inoltre, nessuno degli otto BFRs *target* è stato trovato nei campioni di piante impiegati come controllo nella fase espositiva (T0), confermando che i materiali plastici utilizzati e la strumentazione impiegata non influiscono sulle concentrazioni finali nel suolo e nelle piante, durante la fase di esposizione.

In tabella 17 sono mostrate le concentrazioni determinate analiticamente per gli otto analiti studiati, nelle diverse matrici considerate.

Tabella 17: : Dati relativi alla concentrazione di ritardanti di fiamma nelle piante e nel suolo. I risultati sono espressi come media e deviazione standard (n=5) in ng g⁻¹ dw. **C_{soil-Pr}**: concentrazione del suolo pre-esposizione, **C_{soil-Po}**: concentrazione del suolo post-esposizione; **C_R**: concentrazione nelle radici; **C_S**: concentrazione nei germogli; **C_P**: concentrazione nella pianta.

	C_{soil-Pr}	C_{soil-Po}	C_R	C_S	C_P
BDE 47	4.99 ± 0.04	4.65 ± 0.08	1.04 ± 0.16	0.72 ± 0.15	0.81 ± 0.14
BDE 99	4.97 ± 0.05	4.71 ± 0.09	0.83 ± 0.20	0.44 ± 0.10	0.54 ± 0.12
BDE 153	4.96 ± 0.05	4.76 ± 0.06	0.55 ± 0.17	0.28 ± 0.08	0.35 ± 0.10
BDE 183	4.97 ± 0.04	4.86 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.09 ± 0.03	0.13 ± 0.05
PBEB	4.95 ± 0.05	4.54 ± 0.04	1.30 ± 0.19	0.92 ± 0.15	1.02 ± 0.16
HBB	4.95 ± 0.05	4.55 ± 0.09	1.25 ± 0.28	0.79 ± 0.15	0.91 ± 0.19
BTBPE	4.99 ± 0.03	4.41 ± 0.07	3.40 ± 0.55	0.79 ± 0.11	1.48 ± 0.21
DBDPE	4.97 ± 0.06	4.62 ± 0.09	1.90 ± 0.49	0.47 ± 0.14	0.85 ± 0.23

Dai valori medi e di deviazione standard (n=5) di concentrazione di BFRs determinati nel suolo di *pre-esposizione* (C_{soil-Pr}), per ogni analita, si può affermare che il metodo di aggiunta degli analiti nel terreno, i metodi di conservazione e condizionamento del suolo per tutta la durata della crescita idroponica (21 giorni), hanno permesso di ottenere valori ripetibili ed accurati. In particolare, la concentrazione media *reale* determinata analiticamente per gli otto analiti (4.97 ± 0.05 ng g⁻¹ dw) si discosta dello 0.6% rispetto a quella attesa (5 ng g⁻¹ dw). Inoltre, non è stata riscontrata una diminuzione significativa delle concentrazioni di BFRs nel suolo *pre-esposizione* alla fine del periodo di incubazione dei terreni e la perdita dei composti per volatilizzazione può ritenersi trascurabile. Pertanto, il metodo di trattamento dei terreni impiegato è da ritenersi applicabile a questo tipo di indagine.

3.2.1 Concentrazioni nei Suoli

In prima analisi sono stati considerati i valori di concentrazione nel terreno, prima e dopo l'esposizione, per comprendere se vi fosse una differenza significativa nella rimozione degli analiti dal suolo.

In figura 34 è mostrato l'istogramma dei valori medi (e relativa barra di errore) delle concentrazioni (espressa in $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$) degli otto analiti nel suolo post-esposizione. I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (test Tukey HSD, $p \leq 0.05$).

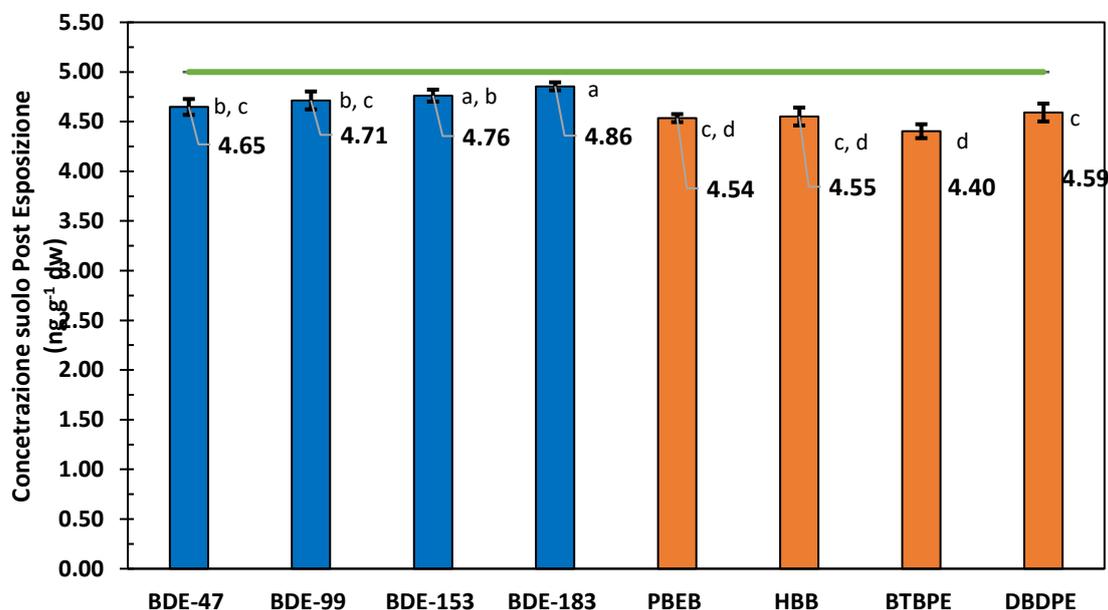


Figura 34: Istogramma con i dati di valore medio e barra di errore ($n=5$) relativi alla concentrazione (espressa in $\text{ng g}^{-1} \text{dw}$) degli otto analiti nel suolo post-esposizione, alla fine del periodo di esposizione. La linea continua (in verde) rappresenta il valore medio di concentrazione ($n=5$) per gli otto analiti nel suolo pre-esposizione. I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

Dal test Tukey HSD, con intervallo di confidenza pari al 95%, in riferimento ai valori di concentrazione nel suolo post esposizione $C_{\text{soil-Po}}$ ($n=5$), per ogni analita, si può notare la presenza di raggruppamenti indice di similarità in termini di rimozione dei singoli BFRs dal suolo.

Data la complessità del sistema analizzato, per ottenere un'ulteriore indicazione sulla rimozione delle due classi di molecole dal terreno sono stati confrontati i valori medi di sommatoria ($n=5$) per le concentrazioni date da $\Sigma_4\text{NBFR}$ e $\Sigma_4\text{PBDE}$ nel suolo post esposizione (figura 35).

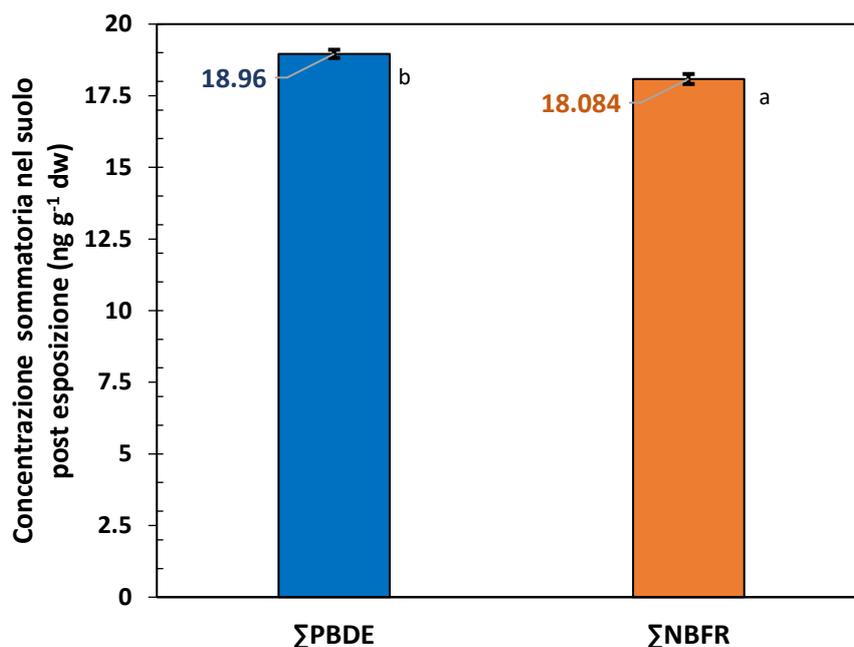


Figura 35: : Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatoria dei Σ₄NBFR e Σ₄PBDE nel suolo post esposizione ($C_{soil-post}$). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

Sempre dall'analisi ANOVA, sui valori di sommatoria (n=5) per Σ₄NBFR e Σ₄PBDE si riscontra una differenza significativa in termini di rimozione dal suolo. In particolare, si può affermare che la classe degli NBFR è stata maggiormente rimossa ($\overline{C_{soil} - P_0} = 18.06 \pm 0.17$, rispetto a quella Σ₄PBDE, dove $\overline{C_{soil} - P_0} = 18.96 \pm 0.14$). Infine, considerando la concentrazione media nel terreno iniziale ($\overline{C_{soil} - Pr}$) e la concentrazione media nel suolo post esposizione ($\overline{C_{soil} - P_0}$) la percentuale di rimozione dalla matrice, in media, per classe degli NBFR (8.73 %) è maggiore rispetto ai PBDE (4.57 %).

3.2.2 Concentrazioni nella Pianta

Dopo otto giorni di esposizione per tutti i composti bromurati indagati, sia PBDE che NBFR, si è riscontrata una diminuzione di concentrazione nel terreno. Questa evidenza analitica può essere spiegata con il fatto che gli BFRs sono stati rimossi tramite assorbimento radicale. Infatti, un importante aspetto legato al metodo utilizzato riguarda la copertura totale del terreno durante l'esposizione. In particolare, il suolo si trova del tutto contenuto all'interno del *soil-receiving plate*, coperto interamente dalla rete metallica alla base del *pot* soprastante ed è mantenuto ad umidità

pari a 100%, evitando così fenomeni di volatilizzazione durante l'intera fase espositiva. Per le stesse motivazioni si possono considerare trascurabili possibili fenomeni di fotodegradazione, in quanto il terreno, essendo totalmente coperto, non si trova a diretto contatto con la luce.

La concentrazione totale nella pianta è determinata a partire dalle concentrazioni nelle radici e quelle nei germogli. In figura 36 sono riportati i valori medi e le relative barre di errore delle concentrazioni dei singoli ritardanti di fiamma dell'intera pianta di pomodoro.

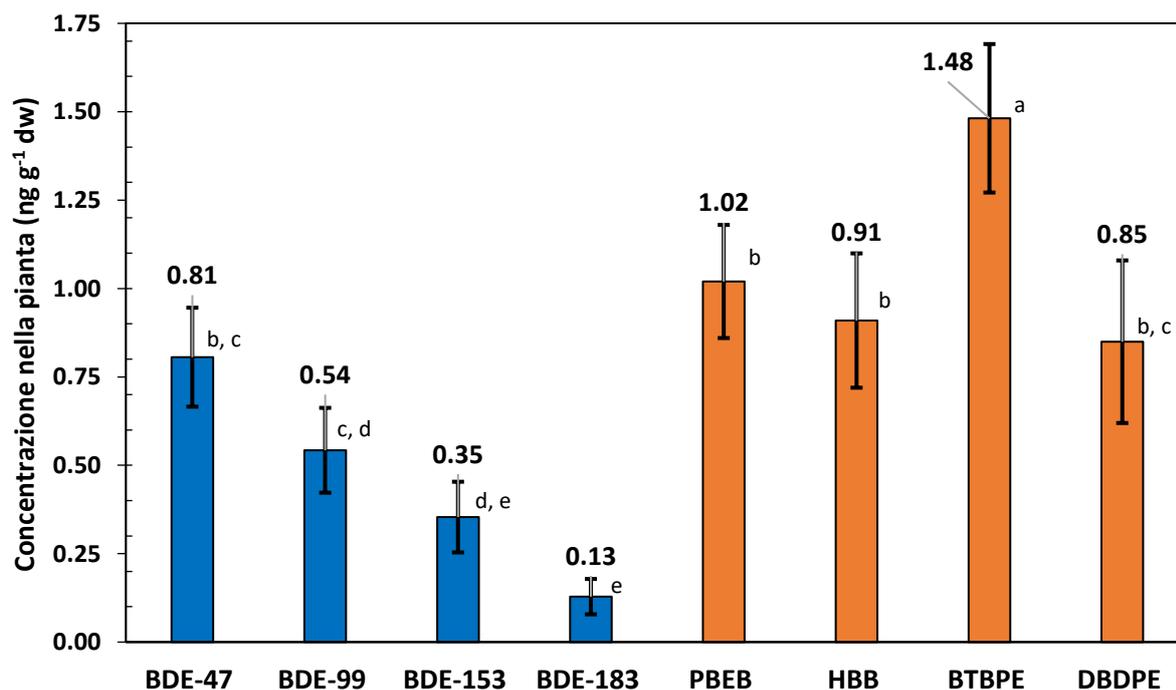


Figura 36: Istogramma con i dati di valore medio e barre di errore (n=5) relativi alle concentrazioni (espressa in ng g⁻¹ dw) degli otto analiti nella pianta considerata nel suo insieme (C_p). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).

Considerando i valori di concentrazione di BFRs in termini di massa assoluta (ng), intesi come risultato del prodotto tra la concentrazione media nell'intera pianta ($\overline{C_p}$) ed il peso medio delle piante esposte, si può notare come nelle piante si sia riscontrato un maggior contenuto di NBFR (3.44 ng) rispetto ai PBDE (1.48 ng). Tra gli NBFR, il BTBPE ha la concentrazione più alta (1.48 ± 0.21 ng g⁻¹ dw).

I dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatoria dei Σ₄NBFR e Σ₄PBDE nella pianta nel suo intero (sommatoria dai valori di C_p) sono rappresentati in figura 37.

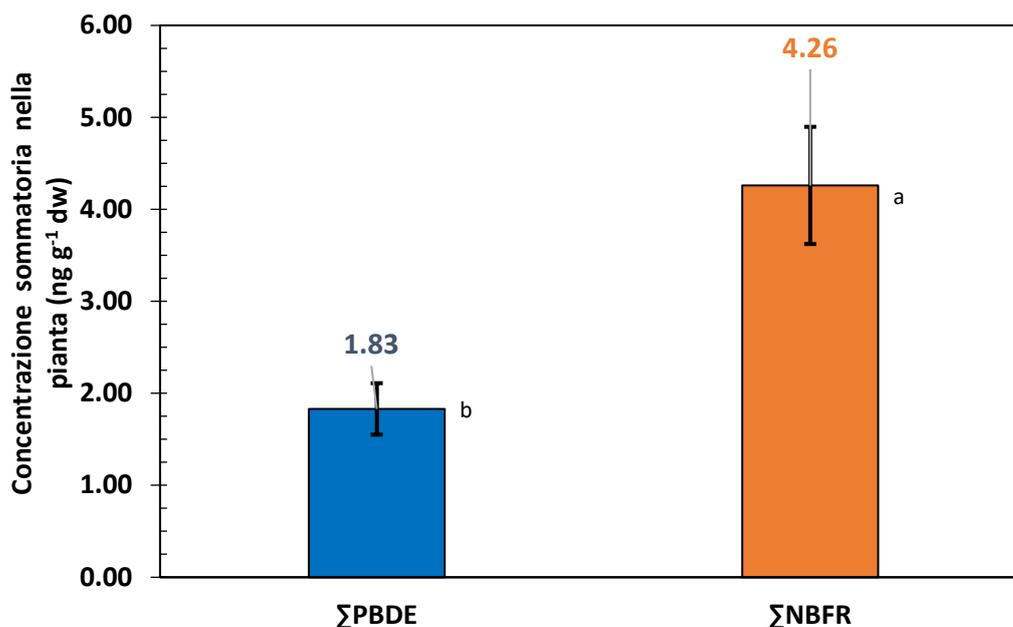


Figura 37: Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) e barre di errore ($n=5$) relativi alla sommatoria dei $\Sigma_4\text{NBFR}$ e $\Sigma_4\text{PBDE}$ nella pianta nel suo intero (sommatoria da C_p). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

Comunque, un'ulteriore indagine è stata eseguita prendendo in considerazione i valori medi ($n=5$) di concentrazione in termini di sommatoria per $\Sigma_4\text{NBFR}$ e per $\Sigma_4\text{PBDE}$. Considerando l'intera pianta, si riscontra una differenza significativa ($p \leq 0.05$) tra i valori di concentrazione in riferimento alle due classi di BFRs tanto che, in media, le molecole della famiglia degli NBFR ($4.26 \pm 0.63 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) hanno le sommatorie delle concentrazioni maggiori per più del doppio rispetto a quelle date dalla somma dei PBDE ($1.83 \pm 0.28 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$).

3.2.3 Concentrazioni nelle Radici

Focalizzandoci ora sull'assorbimento dei BFRs nelle radici di pomodoro, in figura 38, vengono confrontati i valori medi e barre di errore delle loro concentrazioni (C_R). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

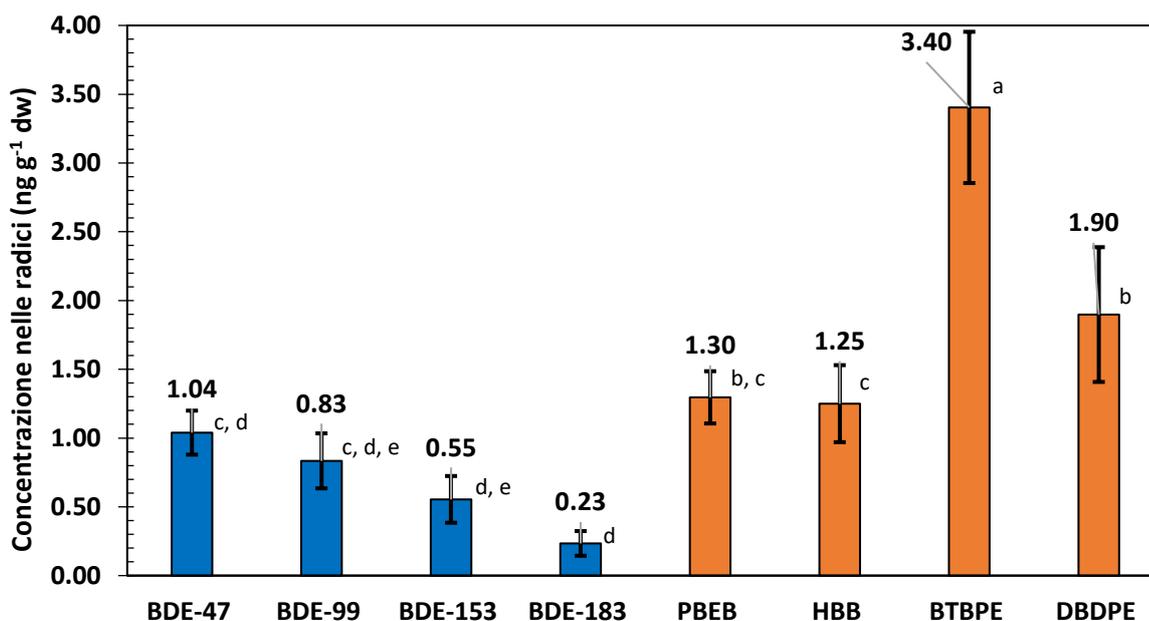


Figura 38: Istogramma con i dati di valore medio e barre di errore ($n=5$) relativi alle concentrazioni (espressa in $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) degli analiti nelle radici della pianta di pomodoro (C_R).

I risultati ottenuti indicano una maggior accessibilità all'assorbimento radicale degli NBFR; in particolare il più alto valore di concentrazione si è riscontrato per il BTBPE nelle radici ($3.40 \pm 0.55 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), seguito dal DBDPE ($1.90 \pm 0.49 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). Il valore relativo al BTBPE corrisponde a circa il doppio rispetto alle concentrazioni degli altri NBFR. Il BDE-47 rappresenta l'FR maggiormente assorbito nelle radici per quanto riguarda i congeneri PBDE analizzati, la sua concentrazione radicale (C_R) è pari a $1.04 \pm 0.16 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, questa risulta comunque più bassa rispetto alle concentrazioni radicali trovate per gli NBFR (1.30 ± 0.19 per il PBEB e 1.25 ± 0.28 per l'HBB) ed è minore, per più di tre volte, rispetto a quella del BTBPE. Confrontando i valori di concentrazione in relazione all'assorbimento radicale (C_R) si può affermare che tra gli NBFR le molecole aventi un doppio anello aromatico (BFR bi-aromatici, DBDPE e BTBPE) sono state maggiormente assorbite rispetto a quelle mono aromatiche (PBEB e HBB).

Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Sun et al. (2019), dove dallo studio di assorbimento di sette NBFR da parte della pianta di pomodoro esposta ad un suolo inquinato, BTBPE e DPDPE erano le molecole con i più alti valori di concentrazione nelle radici.

Per quanto riguarda la classe di PBDE, essendo stato riscontrato che le molecole meno sostituite sono maggiormente assorbite, si deduce che questo fenomeno sia dovuto al fatto che un più alto grado di sostituzione in atomi di Br nell'anello aromatico abbia comportato un maggior ingombro sterico e

più alti valori di log K_{ow} , confermando per altro le conclusioni degli studi di altri autori (Dobslow *et al.*, 2021). Infatti, le più alte concentrazioni, nelle radici, nei germogli e nell'intera pianta, sono state trovate per il BDE-47 (tetra-BDE), seguito dagli altri congeneri BDE-99 (penta-BDE), BDE-153 (esa-BDE), BDE-183 (epta-BDE).

Dinamiche di assorbimento simili a quelle trovate per il pomodoro, in relazione all'*uptake* di PBDE, sono state riscontrate in diverse specie vegetali: nella pianta di tabacco (*Nicotiana tabacum*) e morella comune (*Solanum nigrum*) in uno studio di assorbimento da fanghi in uscita da un impianto di depurazione (Vrkoslavová *et al.*, 2010), per il loietto italiano (*Lolium multiflorum* L.) e mais (*Zea mays* L.) in uno studio di assorbimento in serra da un terreno in prossimità di un impianto di smaltimento di rifiuti elettronici (Huang *et al.*, 2011). Infine, anche nel ravanello (*Raphanus sativus* L.) e nella zucca (*Cucurbita pepo* L.) in un'indagine di assorbimento da terreni inquinati con una miscela penta-BDE, composta da BDE-47, BDE-99 e BDE-100 (Muller *et al.*, 2006).

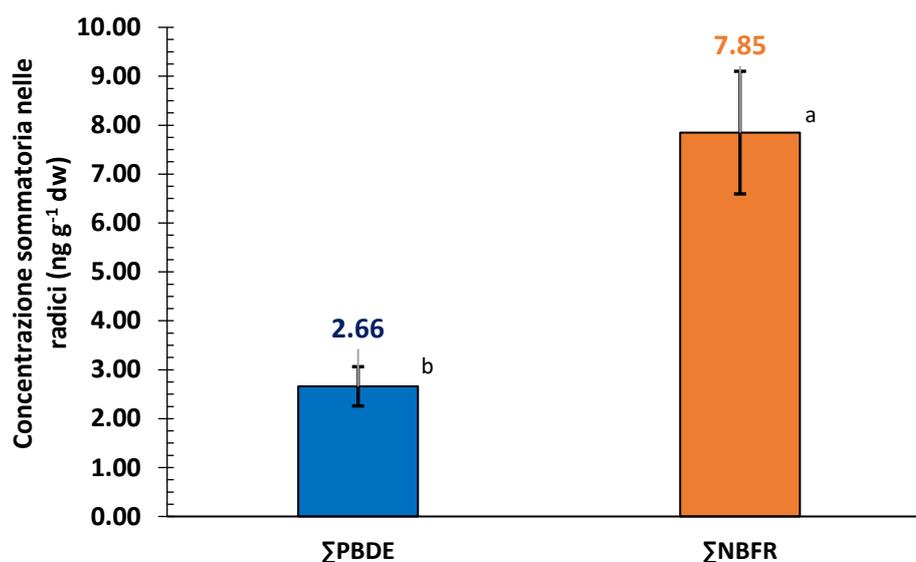


Figura 39: Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) e barre di errore ($n=5$) relativi alla sommatoria dei $\Sigma_4\text{NBFR}$ e $\Sigma_4\text{PBDE}$ nelle radici della pianta di pomodoro (sommatoria da C_R). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

Dal confronto dei valori medi di concentrazione della sommatoria $\Sigma_4\text{NBFR}$ e $\Sigma_4\text{PBDE}$ per le due famiglie di ritardanti di fiamma nelle radici ($p \leq 0.05$), anche in questo caso è possibile affermare che le molecole appartenenti agli NBFR sono state assorbite preferenzialmente rispetto ai PBDE. In particolare, la sommatoria delle concentrazioni degli NBFR ($\Sigma_4\text{NBFR} = 7.85 \pm 1.25 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) sono

maggiori per il triplo rispetto a quelle determinate per la sommatoria dei PBDE ($\Sigma_4\text{PBDE} = 2.66 \pm 0.44$ ng g⁻¹ dw), come è possibile osservare in figura 39.

A questo punto è doveroso sottolineare il fatto che non è stato possibile, nel presente lavoro, stabilire quanto le concentrazioni delle molecole assorbite e traslocate internamente all'apparato ipogeo contribuiscano al valore totale di concentrazione trovato nelle radici, rispetto alla componente di ritardanti di fiamma solamente adsorbita sulla superficie radicale esterna.

3.3 Fattore di Bioconcentrazione (BCF) e di Traslocazione (TF).

Per stabilire l'entità della biodisponibilità di BFRs per la pianta di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) e la loro suddivisione tra i tessuti delle radici e dei germogli, sono stati calcolati i fattori di bioconcentrazione e traslocazione. I valori medi delle 5 prove eseguite (\pm deviazione standard) di RBCF, SBCF, BCF e TF sono riportati nella tabella 19.

Tabella 18: Dati relativi ai fattori di bioconcentrazione **RBCF**: fattore di concentrazione nelle radici; **SBCF**: fattore di concentrazione nei germogli; **BCF**: fattore di concentrazione nella pianta; **TF**: fattore di traslocazione. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n=5).

	RBCF	SBCF	BCF	TF
BDE 47	0.21 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.16 \pm 0.03	0.69 \pm 0.05
BDE 99	0.17 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	0.53 \pm 0.03
BDE 153	0.11 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.51 \pm 0.03
BDE 183	0.05 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.39 \pm 0.04
PBEB	0.26 \pm 0.04	0.19 \pm 0.03	0.21 \pm 0.03	0.71 \pm 0.03
HBB	0.25 \pm 0.06	0.16 \pm 0.03	0.18 \pm 0.04	0.63 \pm 0.05
BTBPE	0.68 \pm 0.11	0.16 \pm 0.02	0.30 \pm 0.04	0.23 \pm 0.03
DBDPE	0.38 \pm 0.10	0.09 \pm 0.03	0.17 \pm 0.04	0.25 \pm 0.03

3.3.1 Fattore di Bioconcentrazione

Come precedentemente descritto, il BCF indica la capacità di bioconcentrare le molecole da parte della pianta di pomodoro, in particolare rappresenta il grado di rimozione delle stesse rispetto alla quantità presente nel suolo con cui gli organismi vegetali sono a contatto.

I valori medi del fattore di Bioconcentrazione (BCF), per ogni BFR, sono stati calcolati secondo l'equazione:

$$BCF = \frac{C_{Pi}}{C_{soil-Pr_i}}$$

Dove:

C_{Pi} : valore medio di concentrazione del singolo analita i nel campione in riferimento all'intera pianta, espressa in $ng\ g^{-1}\ dw$;

$C_{soil-Pr_i}$: valore medio di concentrazione dello stesso analita i nel terreno prima del periodo di esposizione, espressa in $ng\ g^{-1}\ dw$.

In figura 40 sono mostrati i valori medi di BCF per ogni singolo BFR indagato rispetto al corrispettivo valore di $\log K_{ow}$. Tali valori sono ricompresi tra 0.02 e 0.30, mostrando un'ampia variabilità in termini di assorbimento e bioconcentrazione interna alla pianta per i differenti composti. In media, i valori di BCF degli NBFR sono maggiori rispetto a quelli della classe dei PBDE, ciò ad ulteriore prova del fatto che la pianta di pomodoro mostra un maggior assorbimento di tali molecole emergenti, rispetto ai classici ritardanti di fiamma bromurati. In particolare, in ordine decrescente, si evidenzia questa successione per i BCF: BTBPE (0.30 ± 0.04) > PBEB (0.21 ± 0.03) > HBB (0.18 ± 0.04) > DBDPE (0.17 ± 0.04) > BDE-47 (0.16 ± 0.03) > BDE-99 (0.11 ± 0.03) > BDE-153 (0.07 ± 0.02) > BDE-183 (0.03 ± 0.01).

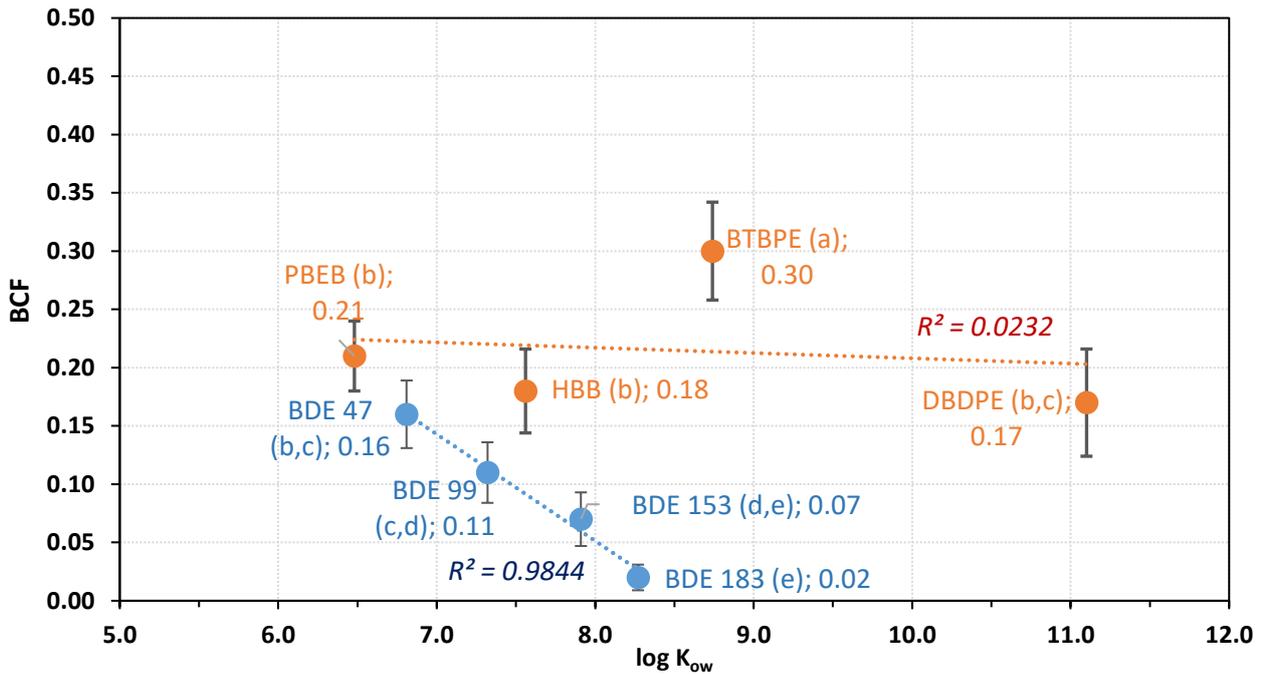


Figura 40: Fattori di Bioconcentrazione (BCF) per i Ritardanti di Fiamma (FRs) calcolati per le piante a fine esposizione a confronto con il log K_{ow} dei BFRs. I risultati sono espressi come media e relativa barra di errore (n=5). I valori medi di BCF contrassegnati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti tra loro ($p \leq 0.05$)

Dai valori dei coefficienti di correlazione lineare (R^2) ottenuti per le due distribuzioni di dati (PBDE e NBFR), si nota una certa tendenza per la classe dei PBDE, dove la bioconcentrazione dei composti, indice della bioaccessibilità degli stessi per la pianta, diminuisce in modo lineare all'aumentare del valore di log K_{ow}. In questo caso la proporzionalità inversa tra BCF e log K_{ow} è fortemente marcata ($R^2=0.984$) e può essere spiegata prendendo in considerazione le strutture molecolari dei BDE indagati. Quanto osservato può essere spiegato considerando che ad un aumento del valore di K_{ow} corrisponde un maggior grado di bromurazione e quindi di ingombro sterico, caratteristiche molecolari chimico-fisiche che è risaputo svolgere un ruolo decisivo in merito all'accessibilità da parte della pianta (Dobslaw *et al.*, 2021). Tanto che il BDE-47 (tetraBDE), il cui log K_{ow} è pari a 6.81, ha un valore medio di BCF di 0.16, il quale risulta otto volte maggiore al valore medio calcolato per il BDE-183 (eptabDE), BCF=0.02, il cui log K_{ow} risulta essere pari a 8.27.

Per i PBDE la stessa correlazione negativa tra BCF e log K_{ow} è stata evidenziata da Vrakoslavova *et al.* (2010) per lo studio di assorbimento del BDE-47, BDE-99, BDE-100 e BDE-209 e She *et al.* (2013) dove sono stati indagati diversi congeneri quali BDE-28, 47, 66, 99, 100, 153, 154, 183, 196, 203, 206 e BDE-209. Nonostante il *trend* evidenziato sia risultato comune a più studi, i valori BCF per il

pomodoro, in riferimento a questo progetto di ricerca, differiscono rispetto ad altri valori riportati in studi di assorbimento di FRs bromurati da parte di altre specie vegetali. Questo conferma il fatto che la capacità di *uptake* di singole molecole, per quanto rispetti delle evidenze comuni come la dipendenza dal valore di $\log K_{ow}$, sia fortemente specie-specifica. Un'ulteriore conferma di questo comportamento è fornita dai risultati di uno studio di assorbimento di PBDE da parte di dieci differenti specie di piante, dove i valori di BCF differivano da specie a specie (Wang *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda i ritardanti di fiamma emergenti, non si osserva una significativa correlazione tra il valore di BCF e il $\log K_{ow}$ ($R^2=0.023$). In particolare il BTBPE ha un valore di BCF nettamente superiore agli altri ed è la molecola maggiormente assorbita in assoluto, in termini di concentrazione nelle radici, germogli ed intera pianta. Si può comunque evidenziare un *trend* prendendo in considerazione le molecole di NBFR in funzione alle loro caratteristiche strutturali e chimico-fisiche. In particolare considerando gli FRs emergenti a singolo anello aromatico, il BCF calcolato per il PBEB (0.21 ± 0.03) è maggiore rispetto a quello dell'HBB (0.18 ± 0.04) e confrontando i valori di $\log K_{ow}$ delle due molecole (PBEB=6.48 e HBB=7.56), si ha lo stesso comportamento evidenziato precedentemente per i PBDE. Lo stesso si può affermare per gli NBFR con struttura molecolare bi-fenilica, i quali mostrano la stessa tendenza, ovvero il BTBPE ($\log K_{ow}=8.74$) presenta un valore di BCF quasi doppio rispetto al DBDPE ($\log K_{ow}=11.1$).

Risultati comparabili sono stati ottenuti per la pianta di riso (*Oryza sativa*) dove i valori di BCF seguono una stessa tendenza, ovvero in ordine decrescente BTBPE (0.7) > HBB (0.27) > DBDPE (0.20) (She *et al.*, 2013). In egual maniera, un coefficiente di bioconcentrazione maggiore si è ottenuto per il BTBPE rispetto al DBDPE in uno studio di assorbimento di NBFR da parte del pomodoro esposto a suoli contaminati (Sun *et al.*, 2019).

Se per i PBDE le modalità di *uptake* sono state maggiormente studiate e la letteratura scientifica ha evidenziato e confermato i parametri da cui esse dipendono, risulta ancora difficile spiegare le dinamiche di assorbimento per i ritardanti di fiamma emergenti. I pochi studi a riguardo evidenziano comportamenti concordi tra loro, ma nonostante questo sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere al meglio gli scenari di *uptake* per le piante in relazione alle caratteristiche chimiche e strutturali di queste nuove molecole bromurate, nonché l'influenza legata alle peculiari capacità di assorbimento dipendenti dalla specie di pianta considerata. In quest'ottica si può comprendere meglio come uno studio che vede l'applicazione di una metodologia standard su base vegetale possa diminuire la variabilità dei parametri in gioco e facilitare la comprensione relativa a tali dinamiche.

3.3.2 Traslocazione dei ritardanti di fiamma dalle radici ai germogli e fattore di traslocazione (TF)

Tutti i BFRs oggetto dello studio sono stati determinati nei campioni dei germogli della pianta di pomodoro esposta al suolo contaminato, indice questo del fatto che è avvenuto un trasferimento interno dalle radici alle porzioni aeree. Infatti le concentrazioni riscontrate nei germogli, le quali risultano minori rispetto a quelle trovate nelle radici, indicano che la modalità di *uptake* radicale è predominante in questo studio. Come precedentemente discusso, si possono escludere fenomeni di volatilizzazione dei BFRs e successiva deposizione fogliare, in quanto per tutta la durata dell'esposizione (otto giorni) il suolo è stato mantenuto al 100% della sua *water holding capacity* e risultava interamente coperto dalla rete metallica alla base del *pot*. Conseguentemente, si può considerare trascurabile il contributo legato all'assorbimento per deposizione fogliare e successiva assimilazione dei composti per via stomatica. Inoltre, dato che tutte le repliche di piante esposte (sia al suolo contaminato che a quello di controllo) condividevano lo stesso spazio chiuso durante la prova, l'assenza di questo fenomeno di volatilizzazione e deposizione fogliare è ulteriormente confermata dalla non presenza di BFRs nei campioni di germogli relativi alle piante esposte al suolo di controllo (T0, 0 ng g⁻¹). In questo caso, quindi, si considerano le concentrazioni trovate nelle porzioni aeree come risultato del processo di traslocazione radice-germoglio.

Prima di esaminare i valori di TF, è utile soffermarci sui valori di concentrazione determinati analiticamente per PBDE e NBFR nei campioni di germogli delle piante di pomodoro esposte al suolo.

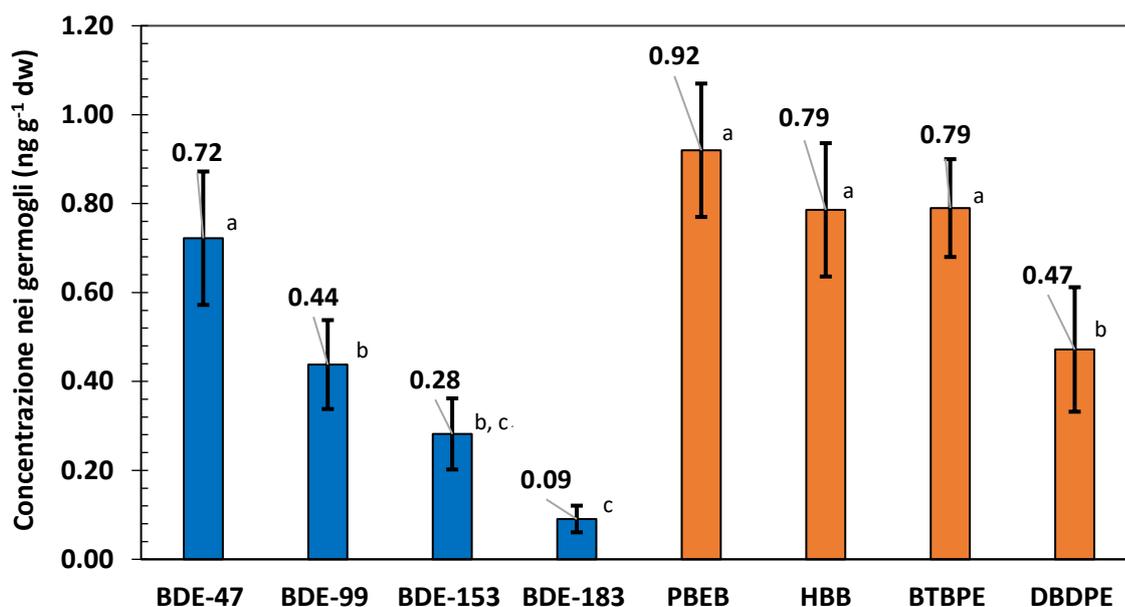


Figura 41: Istogramma con i dati di valore medio e barre di errore ($n=5$) relativi alle concentrazioni (espressa in $\text{ng g}^{-1} \text{ dw}$) degli analiti nei germogli della pianta di pomodoro (C_s). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$).

Dalla figura 41 si evince che le più alte concentrazioni nei germogli si registrano per la famiglia degli NBFR. In particolare, considerando il valore medio di concentrazione per le quattro molecole appartenenti a questo gruppo, esso risulta essere $0.74 \pm 0.14 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, quasi il doppio rispetto a quello dei PBDE, pari a $0.38 \pm 0.09 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$. Le concentrazioni più elevate sono relative al PBEB (0.92 ± 0.15), seguito dal HBB=BTBPE (0.79 ± 0.15 e $0.79 \pm 0.11 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, rispettivamente), BDE-47 ($0.72 \pm 0.15 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), DBDPE ($0.47 \pm 0.14 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), BDE-99 ($0.44 \pm 0.1 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$), BDE-153 ($0.28 \pm 0.08 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) e BDE-183 ($0.09 \pm 0.03 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). Di conseguenza, anche in questo caso, si può affermare che le molecole della famiglia degli NBFR tendono ad essere accumulate maggiormente rispetto a quelle dei PBDE.

In particolare, la sommatoria degli NBFR nei germogli ($\Sigma_4\text{NBFR} = 2.97 \pm 0.38 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) è circa il doppio di quella dei PBDE ($\Sigma_4\text{PBDE} = 1.53 \pm 0.25 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$). Queste sono più basse dei valori di sommatoria trovate nelle radici, sia per $\Sigma_4\text{NBFR}$ ($7.85 \pm 1.25 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) che per $\Sigma_4\text{PBDE}$ ($2.66 \pm 0.44 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$).

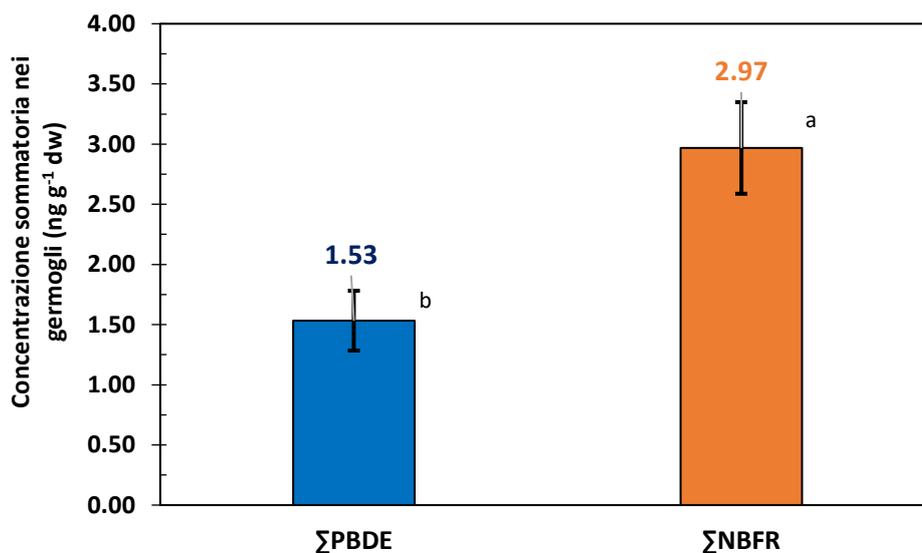


Figura 42: Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatória dei Σ₄NBFR e Σ₄PBDE nei germogli della pianta di pomodoro (sommatória da Cs). I valori medi contrassegnati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).

Le concentrazioni ritrovate nei germogli risultano quindi minori rispetto a quelle nelle radici, suggerendo che la conformazione strutturale specifica delle molecole e l'abbondanza dei gruppi funzionali Br hanno influenzato in modo diverso i processi di *uptake* radicale e di traslocazione, oltre ai parametri chimico-fisici che possono avere un ruolo importante (idrofobicità espressa come valore del log *K_{ow}* e la solubilità in acqua). Infatti, per gli NBFR nelle radici la concentrazione più alta era riferita al BTBPE (3.40 ± 0.55 ng g⁻¹ dw), mentre la concentrazione più alta nei germogli si è riscontrata per il PBEB. Questo potrebbe essere dovuto alla minor solubilità (2.23 E-04 mg L⁻¹, a 25 °C) e maggior log *K_{ow}* (8.74) del BTBPE, il quale è stato maggiormente concentrato nelle radici, ma più difficilmente trasportato internamente verso i germogli. Seppur in minore quantità in termini di concentrazione, il BDE-47 rimane il congenere della famiglia PBDE con le più alte concentrazioni sia nelle radici (1.04 ± 0.16 ng g⁻¹ dw) che nei germogli (0.72 ± 0.15 ng g⁻¹ dw).

Per studiare al meglio questa ripartizione radice-germoglio sono stati calcolati i valori del fattore di traslocazione (TF). Il TF indica la capacità della pianta nel traslocare le molecole verso le porzioni aeree e quindi è un parametro importante nell'ottica della valutazione del rischio per la salute umana collegata all'ingestione di tali porzioni vegetali tramite la dieta. Di conseguenza, risulta utile comprendere il modo in cui i diversi composti si distribuiscono all'interno della struttura vegetale.

I valori medi del fattore di traslocazione (TF) riportati in figura 43, per ogni FRs, sono calcolati secondo l'equazione:

$$TF = \frac{C_{Si}}{C_{Ri}}$$

Dove:

- C_{Si} = valore medio (n=5) di concentrazione del singolo analita i nei germogli, espressa in $ng\ g^{-1}\ dw$.
- C_{Ri} = valore medio (n=5) di concentrazione dello stesso analita i nelle radici, espressa in $ng\ g^{-1}\ dw$.

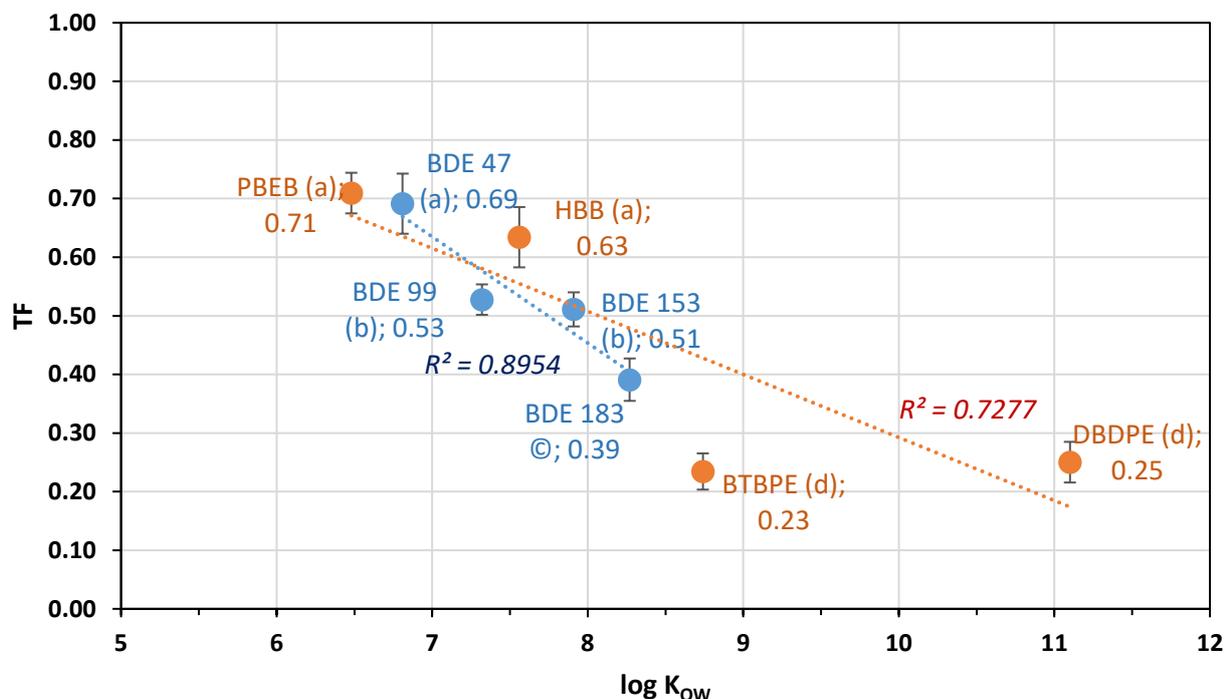


Figura 43: Fattori di Traslocazione (TF) per i Ritardanti di Fiamma (FRs) calcolati per le piante a fine esposizione a confronto con il log Kow dei BFRs. I risultati sono espressi come media e relativa barra di errore (n=5). I valori medi di TF contrassegnati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti tra loro ($p \leq 0.05$).

Il fattore di traslocazione radice-germoglio descrive quindi la distribuzione delle molecole internamente alla pianta, in particolare quando il valore è maggiore di 1, il contenuto di FR dei germogli supera quello delle radici, suggerendo un maggior potenziale di accumulo nelle porzioni

aeree della pianta. In questo caso di studio, per nessuno dei composti oggetto di indagine sono state superate le soglie dell'unità per il valore di TF, indicando un preferenziale accumulo nelle radici.

A questo punto è possibile ipotizzare che i PBDE e gli NBFR testati siano migrati dalla radice ai germogli attraverso i percorsi apoplastici o simplastici dalle radici al fascio vascolare, il tessuto che ha la funzione di collegare l'intera pianta dall'apparato radicale alle porzioni epigee. La capacità, in termini quantitativi, di traslocazione interna è fortemente influenzata dal tipo di percorso vascolare (xylematico o floematico). Inoltre, in letteratura è stato studiato che le concentrazioni relativamente inferiori nelle foglie, rispetto a quelle delle radici, dipendono dalla capacità dei BFRs di rimanere adsorbiti nei lipidi radicali oltre che subire un effetto bloccante da parte della barriera di Caspary, la quale trattenendo composti idrofobi, ne limita la traslocazione vascolare verso l'alto (Zhang *et al.*, 2021; Miller *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2006).

I valori medi di TF per ogni composto bromurato, in ordine decrescente, sono: PBEB (0.71 ± 0.03) > BDE-47 (0.69 ± 0.05) > HBB (0.63 ± 0.05) > BDE-99 (0.53 ± 0.03) > BDE-153 (0.51 ± 0.03) > BDE-183 (0.39 ± 0.04) > DBDPE (0.25 ± 0.03) > BTBPE (0.23 ± 0.03).

In generale è possibile affermare che il valore del fattore di traslocazione diminuisce con l'aumentare dell'idrofobicità del composto (Dobslaw *et al.*, 2021). Infatti, è stata riscontrata una correlazione lineare tra i valori di TF e i valori di log K_{ow} dei BFRs: per entrambe le famiglie di molecole si delinea una correlazione negativa dove all'aumentare del carattere lipofilo dei composti diminuisce il coefficiente di traslocazione ($R^2=0.895$ per i PBDE, $R^2=0.727$ per i NBFR). Si può tuttavia notare un comportamento contrastante nella traslocazione verso i germogli per il PBEB, HBB e BDE-47 (i composti sono quelli con i coefficienti TF più alti e un valore basso di log K_{ow} simile tra loro) in quanto il BDE-99 presenta un valore di log K_{ow} più basso di quello del HBB, il quale però è stato traslocato in minor quantità. Questo potrebbe essere dovuto alla struttura bi-fenilica del composto bromurato a 5 atomi di Br (BDE-99), quindi al più alto volume molecolare ed alla minor solubilità in acqua a 25 °C (0.009 mg L^{-1} per BDE-99 e 0.23 mg L^{-1} per l'HBB, a 25 °C). Per cui non solo il carattere lipofilo del composto determina la traslocazione, ma anche l'ingombro sterico e la solubilità hanno un ruolo importante per la traslocazione, rendendo il composto più o meno adatto al trasporto per via xilematica attraverso il processo di diffusione apoplastica passiva (Zhang *et al.*, 2021).

In seconda analisi per la famiglia degli NBFR, considerati i più alti valori di concentrazione nelle radici (C_R), i più bassi valori nei germogli (C_S) e dato il confronto dei valori di TF per le molecole di-feniliche

BTBPE e DBDPE, rispetto al PBEB e HBB, si può supporre che queste siano state maggiormente adsorbite sui lipidi radicali, a causa della maggior affinità dovuta al carattere lipofilo più spiccato. Tuttavia si assiste ad un minor grado di trasporto verso i germogli, probabilmente a causa del maggior ingombro sterico e di una più bassa solubilità nella soluzione dello xilema. Di conseguenza, in generale, le molecole meno sostituite in atomi di Br sono più facilmente traslocabili grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche e quindi rappresentano un maggior pericolo per l'uomo, nell'ottica del rischio associato all'esposizione verso le porzioni vegetali aeree.

Visti i pochi studi a riguardo e le diverse variabili in gioco che possono influenzare l'*uptake* e la successiva traslocazione dei BFRs dalle radici ai germogli (carattere idrofobo delle molecole, solubilità, ingombro sterico, contenuto di lipidi nelle radici, produzione di essudati radicali e trasformazioni enzimatiche dei POPs, superficie radicale, quantità di sostanza organica nel suolo, umidità del suolo)(Dobson *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Collins *et al.*, 2006) sono necessari ulteriori studi per comprendere al meglio il comportamento di queste molecole nelle dinamiche di assorbimento vegetale e di traslocazione interna.

Per concludere, è utile sottolineare nuovamente come l'impiego di un metodo standard che prevede delle condizioni sperimentali ben definite, e quindi ripetibili, possa essere utilmente impiegato per descrivere il funzionamento di queste dinamiche, al contempo garantendo la produzione di dati riproducibili e comparabili tra loro. In quest'ottica lo studio potrebbe essere esteso a più specie vegetali e più molecole di rilevanza ambientale.

4. CONCLUSIONI

Nel presente progetto di tesi, per la prima volta è stato effettuato uno studio di assorbimento e traslocazione di Inquinanti Organici Persistenti (POPs) Polibromodifenileteri (PBDE) ed Inquinanti Emergenti quali Nuovi Ritardanti di Fiamma Bromurati (NBFR) da un suolo standard contaminato, da parte di *Solanum lycopersicum* L. (pomodoro), impiegando un metodo standardizzato ISO modificato ed adattato appositamente per tale scopo.

Le novità più importanti introdotte, ovvero la variazione nel tempo di crescita delle piante prevista dal metodo ISO 16198:2015 e la modificazione della componente strutturale più importante di RHIZOtest™ (la rete porosa per separare suolo e radici), hanno permesso di ottenere un buon sviluppo apicale e radicale delle piante e un effettivo *uptake* di tutti ed otto i ritardanti di fiamma bromurati attraverso la rete metallica.

Con il presente studio di tesi si dimostra che l'applicabilità del Metodo ISO 16198:2015, fino ad oggi impiegato come biotest per l'analisi della biodisponibilità ambientale di metalli pesanti, con le dovute e appropriate modifiche può essere esteso alla valutazione del rischio incentrata sull'*uptake* e traslocazione di Inquinanti Organici Persistenti, rendendo possibile l'ottenimento di dati riproducibili e comparabili.

Dai valori di concentrazione determinati si nota che per la famiglia dei Ritardanti di Fiamma Nuovi o Emergenti, rispetto ai PBDE, vi sono stati una maggiore accessibilità e grado di assorbimento da parte del pomodoro. Infatti per il PBEB, HBB, BTBPE e DBDPE le concentrazioni misurate nelle radici e nell'intera pianta sono risultate sempre maggiori rispetto a quelle del BDE-47, BDE-99, BDE-153 e BDE-183. Si può così affermare che la pianta di pomodoro sia in grado di assorbire dalle radici e traslocare nelle sue porzioni epigee sia NBFR che PBDE, ma le molecole indagate appartenenti alla famiglia degli NBFR sono potenzialmente più pericolose per quanto concerne il rischio di esposizione per l'uomo, poiché assorbite in maggior quantità rispetto ai BFRs "classici".

Un altro studio di assorbimento tramite la metodologia standard modificata è stato avviato per il cavolo cappuccio (*Brassica oleracea* L.) nell'ottica di poter paragonare le diverse dinamiche di *uptake* e traslocazione dei ritardanti di fiamma classici (PBDE) ed emergenti (NBFR) legate alle diverse specie vegetali impiegate in ambito agricolo. Da qui, saranno indispensabili ulteriori ricerche per indagare e comprendere come i ritardanti di fiamma bromurati si comportano in ambiente nel sistema suolo-

radice-germoglio nei diversi organismi vegetali ad interesse alimentare, nell'ottica del rischio, per l'uomo, associato alla possibile esposizione attraverso la dieta.

5. BIBLIOGRAFIA

Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A., & Bergman, Å. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International*, 29(6), 683–689. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00121-1)

Ali N, Dirtu AC, Eede NV, Goosey E, Harrad S, Neels H, 'tMannetje A, Coakley J, Douwes J, Covaci A (2012) "Occurrence of alternative flame retardants in indoor dust from New Zealand: indoor sources and human exposure assessment". *Chemosphere* 88:1276–1282

Al-Omran, L. S. (2016). Physiochemical Properties and Environmental Levels of Legacy and Novel Brominated Flame Retardants. *Flame retardant Materild- Basic to polymer Nanocomposites* Web of Science. IntechOpen

Altarawneh, M., Saeed, A., Al-Harashsheh, M., & Dlugogorski, B. Z. (2019). Thermal decomposition of brominated flame retardants (BFRs): Products and mechanisms. In *Progress in Energy and Combustion Science* (Vol. 70, pp. 212–259). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2018.10.004>

Andrade, N.A., McConnell, L.L., Torrents, A., Ramirez, M., (2010). Persistence of polybrominated diphenyl ethers in agricultural soils after biosolids applications. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3077e3084

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2004) Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. Available online at <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.

Ballschmiter K., Zell M., (1980). Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCB) by Glass Capillary Gas Chromatography - Composition of Technical Aroclor- and Clophen-PCB Mixtures. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 302, 20-31.

Bartrons, M; Grimalt, JO; Catalan, J. (2007) "Concentration changes of organochlorine compounds and polybromodiphenyl ethers during metamorphosis of aquatic insects". *Environ Sci Technol* 41(17):6137-6141

Bemporad E., Berardi S., Campanari S., Ledda A., Napolitano P., (2020), "Polibromodifenileteri (PBDE) microinquinanti organici". Inail, Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici.

Birnbaum, LS; Cohen-Hubal, EA. (2006) Polybrominated diphenyl ethers: A case study for using biomonitoring data to address risk assessment questions. *Environ Health Perspect* 114 (11):1170–1175.

Bonato, T., Beggio, G., Pivato, A., & Piazza, R. (2022). Maize plant (*Zea mays*) uptake of organophosphorus and novel brominated flame retardants from hydroponic cultures. *Chemosphere*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132456>

Bragigand, V; Amiard-Triquet, C; Parlier, E; et al. (2006) "Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries". *Sci Total Environ* 368:615-626.

Brits M, Brandsma SH, Rohwer ER, De Vos J (2019) "Brominated and organophosphorus flame retardants in South African indoor dust and cat hair". *Environ Pollut* 253:120–129

BS Standard Publication, (2015), BS EN ISO 16198:2015, Soil quality — Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants. The British Standards Institution 2015. Published by BSI Standards 2015 ISBN 978 0 580 72769 6 ICS 13.080.30 .

BSEF. (2000) Bromine Science and Environmental Forum, Brussels, Belgium. Data reported at http://205.232.112.21/bsef/docs/Major_Brominated.doc;

Cetin, B; Odabasi, M. (2007) "Particle-phase dry deposition and air-soil gas-exchange of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Izmir, Turkey". *Environ Sci Technol* 41(14):4986-4992.

Chaignon, V., & Hinsinger, P. (2003). A Biotest for Evaluating Copper Bioavailability to Plants in a Contaminated Soil. *Journal of Environmental Quality*, 32(3), 824–833. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.8240>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 34, pp. 540–560). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Cheng Z, Wang Y, Wang S, Luo C, Li J, Chaemfa C, Jiang H, Zhang G (2014) The influence of land use on the concentration and vertical distribution of PBDEs in soils of an e-waste recycling region of South China. *Environ Pollut* 191:126–131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.025>

Chow, K.L., Man, Y.B., Tam, N.F.Y., Liang, Y., Wong, M.H., (2015). Uptake and transport mechanisms of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by rice (*Oryza sativa*). *Chemosphere* 119, 1262–1267.

Coakley, S., Cahill, G., Enright, A. M., O'Rourke, B., & Petti, C. (2019). Cadmium hyperaccumulation and translocation in *Impatiens glandulifera*: From foe to friend? *Sustainability (Switzerland)*, 11(18). <https://doi.org/10.3390/su11185018>

Collins, C., Fryer, M., & Grosso, A. (2006). Plant uptake of non-ionic organic chemicals. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 40, Issue 1, pp. 45–52). <https://doi.org/10.1021/es0508166>

Costa, L. G., de Laat, R., Tagliaferri, S., & Pellacani, C. (2014). A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. *Toxicology Letters*, 230(2), 282–294. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.11.011>

Covaci A, Harrad S, Abdallah MA, Ali N, Law RJ, Herzke D, de Wit CA (2011). " Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour". *Environ Int.*, Feb;37(2):532-56.

Cristale, J., & Lacorte, S. (2015). Pbdes versus nbfr in wastewater treatment plants: Occurrence and partitioning in water and sludge. *AIMS Environmental Science*, 2(3), 533–546. <https://doi.org/10.3934/ENVIRONSCI.2015.3.533>

De Boer et al., (2000). "PBDEs and PBBs in suspended particulate matter, suspended sediment, sewage treatment plant in- and effluents and biota from the Netherlands" J. de Boer, A. van der Horest and P. Wester *Organohalog. Compd.*, 47 , pp. 85-88

Di Carlo, E., Boullemant, A., & Courtney, R. (2020). Ecotoxicological risk assessment of revegetated bauxite residue: Implications for future rehabilitation programmes. *Science of the Total Environment*, 698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134344>

Dirtu AC, Ali N, van den Eede N, Neels H, Covaci A (2012) "Country specific comparison for profile of chlorinated, brominated and phos Phate organic contaminants in indoor dust. Case study for Eastern Romania", 2010. *Environ Int* 49:1–8

Dobslaw D., Woisk C., Kiel M., Kuch B., Breuer J.(2021) Plant uptake, translocation and metabolism of PBDEs in plants of food and feed industry: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2021) 20:75-142. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09557-7>

Dong L, Wang S, Qu J, You H, Liu D. (2021) "New understanding of novel brominated flame retardants (NBFRs): Neuro(endocrine) toxicity". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Jan;208:111570. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111570. PMID: 33396099.

Dungey S.M., Akintoye L. (2007) "Environmental risk evaluation report: 1, 1'- (Ethane-1, 2-diyl)bis[penta-bromobenzene]". Environment Agency, Bristol, UK.

Dye, JA; Venier, M; Zhu, L; et al. (2007) Elevated PBDE levels in pet cats: sentinels for humans? *Environmental Science & Technology* 2007 41 (18), 6350-6356 DOI: 10.1021/es0708159

Environment Agency E.A., (2019), "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): sources, pathways and environmental data", Horizon House, Deanery Road, Bristol BS1 5AH www.gov.uk/environment-agency

Environmental Protection Agency (EPA), (2010), Method 1614A Brominated Diphenyl Ethers in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS, Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division, EPA – 821-R-10-005,.

Environmental Protection Agency (EPA) , (2010), An Exposure Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers. <http://www.epa.gov/ncea>. National Center for Environmental Assessment, Office

of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DCEPA/600/R-08/086F

Epa, U., & of Science, O. (2016). Office of Water Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, Revision 2. www.epa.gov

EU (European Union). (2001) Risk assessment report: diphenyl ether, pentabromo derivative (pentabromodiphenyl ether). European Chemicals Bureau, Luxembourg. ISBN 92-894-0479-5.

EU (European Union). (2003) Risk assessment report: diphenyl ether, octabromo derivative (octabromodiphenyl ether). European Chemicals Bureau, Luxembourg.

European Environment Agency (2015).;"The European environment - State and outlook 2015: Synthesis report." Copenhagen, Denmark.

Fang, L; Huang, J; Yu, G; et al. (2008) Photochemical degradation of six polybrominated diphenyl ether congeners under ultraviolet irradiation in hexane. *Chemosphere* 71:258–267.

Farzana S, Cheung SG, Tam NFY (2019) Effects of aquaculture effluents on fate of 2,2,0,4,4,0,5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in contaminated mangrove sediment planted with *Kandelia obovata*. *Sci Total Environ* 691:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.057>

Gascon, M.; Fort, M.; Martinez, D.; Carsin, A.-E.; Forns, J.; Grimalt, J. O.; Santa Marina, L.; Lertxundi, N.; Sunyer, J.; Vrijheid, M. (2012). "Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk and neuropsychological development in infants." *Environ. Health Perspect.* , 120, 1760.

Gates P. (2014), Quadrupole Mass Analysis, School of Chemistry, Mass Spectrometry facility, University of Bristol Cantock's Close, Bristol BS8 1TS, United Kingdom, <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>

Gouin, T; Harner, T; Daly, GL; et al. (2005) "Variability of concentrations of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in air: implications for monitoring, modeling and control." *Atmos Environ* 39:151-166.

Haddaoui, I., & Mateo-Sagasta, J. (2021) A review on occurrence of emerging pollutants in waters of the MENA region. *Environmental Science and Pollution Research* 28:68090–68110 <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16558-8>/Published

Hassanin, K. Breivik, S.N. Meijer, E. Steinnes, G. O. Thomas, K. C. Jones , (2004) “PBDEs in European Background Soils: Levels and Factors Controlling Their Distribution “*Environmental Science & Technology* 2004 38 (3), 738-745 DOI: 10.1021/es035008y

He, J., Robrock, K. R., & Alvarez-Cohen, L. (2006). Microbial reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Environmental Science and Technology*, 40(14), 4429–4434. <https://doi.org/10.1021/es052508d>.

He, M. J.; Luo, X. J.; Chen, M. Y.; Sun, Y. X.; Chen, S. J.; Mai, B. X. (2012) Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane in fish from a river system in a highly industrialized area, South China. *Sci. Total Environ.* 2012, 419, 109– 115

Hites, RA. (2004) Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations. *Environ Sci Technol* 38(4):945–956

Hou, R., Huang, Q., Pan, Y., Lin, L., Liu, S., Li, H., & Xu, X. (2022). Novel Brominated Flame Retardants (NBFRs) in a Tropical Marine Food Web from the South China Sea: The Influence of Hydrophobicity and Biotransformation on Structure-Related Trophodynamics. *Environmental Science and Technology*, 56(5), 3147–3158. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08104>

Hou, R., Lin, L., Li, H., Liu, S., Xu, X., Xu, Y., Jin, X., Yuan, Y., & Wang, Z. (2021). Occurrence, bioaccumulation, fate, and risk assessment of novel brominated flame retardants (NBFRs) in aquatic environments — A critical review. In *Water Research* (Vol. 198). Elsevier Ltd117168, ISSN 0043-1354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117168>

Huang, H., Zhang, S., & Christie, P. (2011). Plant uptake and dissipation of PBDEs in the soils of electronic waste recycling sites. *Environmental Pollution*, 159(1), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.034>

Huang H, Zhang S, Christie P, Wang S, Xie M (2010) Behavior of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in the soil–plant system: uptake, translocation, and metabolism in plants and dissipation in soil. *Environ Sci Technol* 44:663–667.

Huwe, JK; Smith, DJ. (2007) Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male Sprague-Dawley rats following dietary exposure. *Environ Sci Technol* 41(7):2371–2377.

International Union of Pure And Applied Chemistry, IUPAC. (1996) Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996): pure and applied chemistry 68(12):2223–2286.

Iqbal, M., Syed, J. H., Katsoyiannis, A., Malik, R. N., Farooqi, A., Butt, A., Li, J., Zhang, G., Cincinelli, A., & Jones, K. C. (2017). Legacy and emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: A review. *Environmental Research*, 152, 26–42. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.024>

J. McComb, I.G. Mills, M. Muller, H.F. Berntsen, K.E. Zimmer, E. Ropstad, S. Verhaegen, L. Connolly, (2019) Human blood-based exposure levels of persistent organic pollutant (POP) mixtures antagonise androgen receptor transactivation and translocation, *Environment International*, Volume 132, 2019, 105083, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105083>.

Jian K, Zhao L, Ya M, Zhang Y, Su H, Meng W, Li J, Su G (2020) Dietary intake of legacy and emerging halogenated flame retardants using food market basket estimations in Nanjing, eastern China. *Environ Pollut* 258:113737. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113737>

Jones K.C. (2021), "Persisten Organic Pollutant (PoPs) an Related Chemicals in the global environment: Some personal Reflection". *Environ. Scien.* [Dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c08093](https://doi.org/10.1021/acs.est.0c08093), 2021.

Jones, R. P., and Clarke, J. U. (2005). "Analytical chemistry detection limits and the evaluation of dredged sediment," ERDC/TN EEDP-04-36, U.S. Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, MS

Kademoglou K et al (2016) "Legacy and alternative flame retardants in Norwegian and UK indoor environment: implications of human exposure via dust ingestion." *Environ Int* 102:48–56

Kajiwara, N.; Noma, Y.; Takigami, H. (2008) Photolysis Studies of Technical Decabromodiphenyl Ether (DecaBDE) and Ethane (DeBDethane) in Plastics under Natural Sunlight. *Environ. Sci. Technol.* (2008), 42 (12), 4404–4409.

Kajiwara, N; Noma, Y; Takigami, H. (2007) Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (decaBDE) and ethane (DBDPE) in flame-retarded plastics. Presented at Dioxin 2007 International

Symposium, Tokyo, Japan, September 2-7. Published in proceedings. *Organohalogen Compd* 69:924–927.

Kemmlin, S; Bergmann, M; Jann, O. (2003) "Emission of flame retardants from consumer products and building materials. "By the Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM) for the Federal Ministry of Environment, Berlin, Federal Republic of Germany. Report No. UBA-FB.

Khaled, A.; Richard, C.; Rivaton, A.; Jaber, F.; Sleiman, M. (2018) Photodegradation of brominated flame retardants in polystyrene: Quantum yields, products and influencing factors. *Chemosphere*, 211, 943–951.

LE2C, Lombardy Energy Cleantech Cluster, (2020), Rapporto del gruppo di lavoro-MIE, Inquinanti Emergenti: quadro delle conoscenze sulla presenza, le tecnologie di contenimento e lo stato della ricerca su microinquinanti e microplastiche nei comparti acquatici lombardi, ISBN:9788894555707

Lee, H.-J., Jung, J.-H., Kwon, J.-H., (2019). Evaluation of the bioaccumulation potential of selected alternative brominated flame retardants in marine fish using in vitro metabolic transformation rates. *Sci. Total Environ.* 653, 1333–1342.

Li, H., Huang, H., Lu, L., Guo, B., Wen, B., Ke, X., (2020). Plant uptake and translocation of DBDPE in soil and the micro-mechanisms. *Acta Sci. Circumstantiae* 40, 1848–1857. DOI: [10.5772/intechopen.95790](https://doi.org/10.5772/intechopen.95790)

Li, K., Chen, J., & Zhu, L. (2018). The phytotoxicities of decabromodiphenyl ether (BDE-209) to different rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Environmental Pollution*, 235, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.079>

Li W., Ma W., Zhang Z., Liu L., Song W., Jia H., Ding Y., Nakata H., Minh N., Sinha R., Kannan K., Sverko E., Yi-Li Y. (2017) Occurrence and Source Effect of Novel Brominated Flame Retardants (NBFRs) in Soils from Five Asian Countries and Their Relationship with PBDEs. 2017, *Environ. Sci. Technol.* , 51, 19, 11126–11135.

Ling, S., Zhou, S., Tan, J., Lu, C., Fu, M., Peng, C., Zhang, W., Hu, S., Lin, K., & Zhou, B. (2022). Brominated flame retardants (BFRs) in sediment from a typical e-waste dismantling region in Southern China: Occurrence, spatial distribution, composition profiles, and ecological risks. *Science of the Total Environment*, 824. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153813>

Luross et al., (2002) "Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls in lake trout from the Great lakes" J.M. Luross, M. Alaei, D.B. Sergeant, D.M. Whittle, K.R. Solomon and D.C.G. Muir *Chemosphere*, 45, pp. 665-672

Macedo C.F.C. (2019). Transfer and effects of brominated flame retardants (BFRs) on three plant species and one earthworm species in anthroposols. Soil study. Université de Lyon, 2019. English. ffNNT : 2019LYSET008ff. fftel-02420943f

Marchini S. (2005) , *Ecotossicologia e qualità delle acque: Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Ann Ist Super Sanità* 2005;41(3):371-379

McGrath, T. J., Ball, A. S., & Clarke, B. O. (2017). Critical review of soil contamination by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and novel brominated flame retardants (NBFRs); concentrations, sources and congener profiles. In *Environmental Pollution* (Vol. 230, pp. 741–757). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.009>

Meng, Y., Liu, B., Zhang, P., Cui, P., Song, Y., Qiu, N., Han, G., & Zhou, F. (2018). Toxic effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether on Chinese cabbage. *HortScience*, 53(12), 1930–1935. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13463-18>

Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G., & Pedersen, J. A. (2016). Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 50, Issue 2, pp. 525–541). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01546>

Morf, LS; Tremp, J; Gloor, R; et al. (2005) Brominated flame retardants in waste electrical and electronics equipment: substance flows in a recycling plant. *Environ Sci Technol* 39:8691–8699.

Mueller, K. E., Mueller-Spitz, S. R., Henry, H. F., Vonderheide, A. P., Soman, R. S., Kinkle, B. K., & Shann, J. R. (2006). Fate of pentabrominated diphenyl ethers in soil: Abiotic sorption, plant uptake, and the impact of interspecific plant interactions. *Environmental Science and Technology*, 40(21), 6662–6667. <https://doi.org/10.1021/es060776l>

North, KD. (2004) "Tracking polybrominated diphenyl ether releases in a wastewater treatment plant effluent, Palo Alto, California". *Environ Sci Technol* 38(17):4484-4488 01 Sep 2004, 38(17):4484-4488 DOI: 10.1021/es049627y PMID: 15461153

Nyholm, J. R.; Lundberg, C.; Andersson, P. L. (2010) Biodegradation kinetics of selected brominated flame retardants in aerobic and anaerobic soil. *Environ Pollut* .158(6):2235-40. doi: 10.1016/j.envpol.2010.02.010. Epub 2010 Mar 15.

Pan L, Sun J, Wu X, Wei Z, Zhu L (2016) Transformation of hydroxylated and methoxylated 2,20,4,40,5-brominated diphenyl ether (BDE-99) in plants. *J Environ Sci* 49:197–202. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.06.017>

Pasecnaja, E., Perkons, I., Bartkevics, V., & Zacs, D. (2021). Legacy and alternative brominated, chlorinated, and organophosphorus flame retardants in indoor dust-levels, composition profiles, and human exposure in Latvia. *Environ. Sci. and pollut. Res.* (2021) 28:25493–25502 <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12374-2/Published>

Ping X., Xueting Y., Qingqing Z., Guangbo Q., Jianbo S., Chunyang L., Guibin J.,(2019) “ A Review of Environmental Occurrence, Fate, and Toxicity of Novel Brominated Flame Retardants” *Environ. Sci. Technol.* 2019, 53, 13551–13569. DOI: 10.1021/acs.est.9b03159 PMID: 31682424

Pirard, C; Pauw, ED. (2007) Absorption, disposition and excretion of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in chicken. *Chemosphere* 66(2):320–325. PMID: 16774779 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.086

Poma, G. , Roscioli, C. , Guzzella, L. , (2014) . PBDE, HBCD, and novel brominated flame retardant contamination in sediments from Lake Maggiore (Northern Italy). *En- vironmental Monitoring and Assessment* 186 (11), 7683–7692 .

Potter, KE; Watts, BD; La Guardia, MJ; et al. (2009) “Polybrominated diphenyl ether flame retardants in Chesapeake Bay region, U.S.A., Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) eggs: urban/rural trends”. *Environ Toxicol Chem* 28:973-981.

Pure Strategies, Inc. (2005) Decabromodiphenylether: an investigation of non-halogen substitutes in electronic enclosure and textile applications. Prepared for the Lowell Center for Sustainable Production, University of Massachusetts, Lowell, MA.

Rupp, S; Metzger, JW. (2005) Brominated–chlorinated diphenyl ethers formed by thermolysis of polybrominated diphenyl ethers at low temperatures. *Chemosphere* 60:1644–1651.

Salamova, A., Hermanson, M. H., & Hites, R. A. (2014). Organophosphate and halogenated flame retardants in atmospheric particles from a European Arctic site. *Environmental Science and Technology*, 48(11), 6133–6140. <https://doi.org/10.1021/es500911d>

Salmeia, K. A., Fage, J., Liang, S., & Gaan, S. (2015). An overview of mode of action and analytical methods for evaluation of gas phase activities of flame retardants. *Polymers*, 7(3), 504–526. <https://doi.org/10.3390/polym7030504>

Sellström, U; de Wit, CA; Lundgren, N; et al (2005). “Effect of sewage-sludge application on concentrations of higher-brominated diphenyl ethers in soils and earthworms”. *Environ Sci Technol* 39:9064-9070.

Servizio Studi Dipartimento Affari Esteri ,(SSDAE), (2021), Ratifica ed Esecuzione della Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti, con allegati, del 22 maggio 2001, A.C. 2806, Dossier n°422 – schede di lettura III Affari Esteri.

She, Y. Z., Wu, J. P., Zhang, Y., Peng, Y., Mo, L., Luo, X. J., & Mai, B. X. (2013). Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers and several alternative halogenated flame retardants in a small herbivorous food chain. *Environmental Pollution*, 174, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.024>

Sjödin A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Kronholm-Diab K, Jakobsson E, Bergman A. (1999). Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environ Health Perspect.* 1999 Aug;107(8):643-8. doi: 10.1289/ehp.107-1566483. PMID: 10417362; PMCID: PMC1566483.

Sjödin A, Patterson DG Jr, Bergman A. (2001) Brominated flame retardants in serum from U.S. blood donors. *Environ Sci Technol.* 2001 Oct 1;35(19):3830-3. doi: 10.1021/es010815n. PMID: 11642440.

Skoog D. A; Holler F. J; Crouch S. R; 8 (2007) *Chimica analitica strumentale*, II edizione, 2007.

Skoog D. A; West D.M; Holler F. J; Crouch S. R; (2005) *Fondamenti di Chimica Analitica* , II edizione, 2005.

Smythe T.A, Su G., Bergman Å., Letcher R. J.,(2022) “Metabolic transformation of environmentally-relevant brominated flame retardants in Fauna: A review”, *Environ Int*, Volume 161, 2022, 107097, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107097>.

Stapleton, HM; Brazil, B; Holbrook, RD; et al. (2006) In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environ Sci Technol* 40(15):4653–4658.

Stapleton, HM; Letcher, RJ, Baker, JE. (2004) “Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 ,and BDE 183 in the intestinal tract of the common carp (*Cyprinus carpio*).” *Environ Sci Technol* 38:1054-1061.

Stubbings, W.A., Guo, J., Simon, K., Romanak, K., Bowerman, W., Venier, M., (2018). Flame Retardant Metabolites in Addled Bald Eagle Eggs from the Great Lakes Region. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5 (6), 354–359.

Su, Y; Wania, F; Harner, T; et al. (2007) “Deposition of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons to a boreal deciduous forest.” *Environ Sci Technol* 41(2):534-540.

Sun H., Yueling Q., Di Z., Qing X. Li, Jun W.(2016), Concentrations, distribution, sources and risk assessment of organohalogenated contaminants in soils from Kenya, Eastern Africa,*Environmental Pollution*, Volume 209, 2016, Pages 177-185, ISSN 0269-7491

Sun, J., Wu, Y., Jiang, P., Zheng, L., Zhang, A., & Qi, H. (2019). Concentration, uptake and human dietary intake of novel brominated flame retardants in greenhouse and conventional vegetables. *Environment International*, 123, 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.008>

Tao, F. , Abdallah, M.A.-E , Harrad, S , (2016). Emerging and Legacy Flame Retardants in UK Indoor Air and Dust: Evidence for Replacement of PBDEs by Emerging Flame Retardants? *Environmental Science & Technology* 50 (23), 13052–13061 .*Technol* 41(18):6350-6356.

UNECE, (1998). The 1998 Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs). Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants. United Nations Economic Commission for Europe.

UNEP, (1999) . INVENTORY OF INFORMATION SOURCES ON CHEMICALS PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS. Van den Steen, E; Covaci, A; Jaspers, VLB; et al. (2007) Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Environ Poll* 148(2):648–653.

Van der Veen I., De Boer J. (2012) "Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis". *Chemosphere* 88:1119–1153. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.067>, 2012.

Vetter, W., Gallistl, C., Schlien, A., Preston, T., Muller, J., von der Trenck, K.T., (2017). Brominated flame retardants (BFRs) in eggs from birds of prey from Southern Germany, 2014. *Environ. Pollut.* 231, 569–577

Viganò L., Mascolo G., Roscioli C., (2015). Emerging and priority contaminants with endocrine active potentials in sediments and fish from the River Po (Italy). *Environmental Science and Pollution Research* 22 (18), 14050–14066 .

Vrkoslavová, J., Demnerová, K., Macková, M., Zemanová, T., Macek, T., Hajšlová, J., Pulkrabová, J., Hrádková, P., & Stiborová, H. (2010). Absorption and translocation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by plants from contaminated sewage sludge. *Chemosphere*, 81(3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.010>.

Wang, Y., Luo, C., Li, J., Yin, H., Li, X., & Zhang, G. (2011). Characterization of PBDEs in soils and vegetations near an e-waste recycling site in South China. *Environmental Pollution*, 159(10), 2443–2448. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.030>.

Wang S, Zhang S, Huang H, Lu A, Ping H (2012) Debrominated, hydroxylated and methoxylated metabolism in maize (*Zea mays* L.) exposed to lesser polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Chemosphere* 85:379–385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.002>.

Wang, S., Wang, Y., Song, M., Luo, C., Li, J., & Zhang, G. (2016a). Distributions and compositions of old and emerging flame retardants in the rhizosphere and non-rhizosphere soil in an e-waste contaminated area of South China. *Environmental Pollution*, 208, 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.038>

Wang, S., Wang, Y., Luo, C., Li, J., Yin, H., & Zhang, G. (2016b). Plant selective uptake of halogenated flame retardants at an e-waste recycling site in southern China. *Environmental Pollution*, 214, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.071>

Wang, R., Tang, T., Lu, G., Huang, K., Chen, M., Tao, X., Yin, H., & Dang, Z. (2018). Formation and degradation of polybrominated dibenzofurans (PBDFs) in the UV photolysis of polybrominated

diphenyl ethers (PBDEs) in various solutions. *Chemical Engineering Journal*, 337, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.103>

Wania F, Dugani CB.(2003) Assessing the long-range transport potential of polybrominated diphenyl ethers: a comparison of four multimedia models. *Environ Toxicol Chem.* 2003 Jun;22(6):1252-61. PMID: 12785581.

WHO, World Health Organization, (2003). Health risk of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution.

Wu, J.P. , Guan, Y.T. , Zhang, Y. , Luo, X.J. , Zhi, H. , Chen, S.J. , Mai, B.X. , (2010). Trophodynamics of Hexabromocyclododecanes and Several Other Non-PBDE Brominated Flame Retardants in a Freshwater Food Web. *Environmental Science & Technology* 44 (14), 5490–5495.

Wurl, O; Potter, JR; Durville, C. (2006) “Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) over the open Indian Ocean”. *Atmos Environ* 40:5558-5565.

Xiong Q., Shi Y., Lu Y., Pan K., Dakhil M. A., Zhang L., and Xiao Y. (2018): "Sublethal or Not? Responses of Multiple Biomarkers in *Daphnia Magna* to Single and Joint Effects of BDE-47 and BDE-209." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164 164-71.

Yang, R. , Wei, H. , Guo, J. , Li, A. , (2012). Emerging Brominated Flame Retardants in the Sediment of the Great Lakes. *Environmental Science & Technology* 46 (6), 3119–3126.

Zegers et al., (2000). “Levels of some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in dated sediment cores” B.N. Zegers, W.E. Lewis and J.P. Boon *Organohalogen Compd.*, 47 (2000), pp. 229-232

Zhang, Q., Yao, Y., Wang, Y., Zhang, Q., Cheng, Z., Li, Y., Yang, X., Wang, L., & Sun, H. (2021). Plant accumulation and transformation of brominated and organophosphate flame retardants: A review. In *Environmental Pollution* (Vol. 288). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117742>

Zhang, Y. N.; Chen, J.; Xie, Q.; Li, Y.; Zhou, C. (2016) Photochemical transformation of five novel brominated flame retardants: Kinetics and photoproducts. *Chemosphere* 2016, 150, 453–460.

Zhao, J., Wang, P., Wang, C., Fu, M., Li, Y., Yang, R., Fu, J., Hao, Y., Matsiko, J., Zhang, Q., & Jiang, G. (2020). Novel brominated flame retardants in West Antarctic atmosphere (2011–2018): Temporal

trends, sources and chiral signature. *Science of the Total Environment*, 720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137557>

Zhao M, Zhang S, Wang S, Huang H (2012) Uptake, translocation, and debromination of polybrominated diphenyl ethers in maize. *J Environ Sci* 24:402–409. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60748-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60748-1)

Zhao Y-X, Qin X-F, Li Y, Liu P-Y, Tian M, Yan S-S, Qin Z-F, Xu X-B, Yang Y-J (2009) Diffusion of polybrominated diphenyl ether (PBDE) from an e-waste recycling area to the surrounding regions in Southeast China. *Chemosphere* 76:1470–1476. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.023>

Zheng, G., Wan, Y., Shi, S., Zhao, H., Gao, S., Zhang, S., An, L., Zhang, Z., (2018) . Trophodynamics of Emerging Brominated Flame Retardants in the Aquatic Food Web of Lake Taihu: Relationship with Organism Metabolism across Trophic Levels. *Environ. Sci. Technol.* 52 (8), 4632–4640.

Zhu H, Wang Y, Tam NFY (2014) Microcosm study on fate of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in contaminated mangrove sediment. *J Hazard Mater* 265:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.046>

Zhu, H., Wang, F., Li, B., Yao, Y., Wang, L., & Sun, H. (2020). Accumulation and translocation of polybrominated diphenyl ethers into plant under multiple exposure scenarios. *Environment International*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105947>

Zuiderveen, E.A.R. , Slootweg, J.C. , de Boer, J , (2020). Novel brominated flame retardants - A review of their occurrence in indoor air, dust, consumer goods and food. *Chemosphere* 255, 126816

6. INDICI

6.1 Indice delle figure

Figura 1: 12 POPs identificati nel 1995.....	- 4 -
Figura 2: Equazione e Meccanismo di inibizione della combustione (Salemia et al., 2015).....	- 5 -
Figura 3: Struttura molecolare generale dei PBDEs	- 6 -
Figura 4: Alcuni tra i più diffusi NBFR (Covaci et al., 2011)	- 13 -
Figura 5: : DBDPE e BDE-209 a confronto.....	- 13 -

Figura 6: Scenario ricostruito di Sorgenti e Percorsi per i BFRs in ambiente, secondo quanto riportato dall' Environmental agency (E.A., 2019)	- 16 -
Figura 7: Schema di Fotodegradazione del BDE-47 (Wang et al., 2018)	- 31 -
Figura 8: Schema di degradazione termica e formazione di Diossine (Altarawneh et al., 2019).....	- 32 -
Figura 9: Congeneri prodotti dalla debromurazione riduttiva di ANAS195 a partire della miscela octa-BDE (He et al.,2006)	- 34 -
Figura 10: Reazioni metaboliche di trasformazione del BDE-47 da parte della zucca (Zhang et al., 2021) ..	- 35 -
Figura 11: Metabolismo ossidativo del BDE-47 da parte del gene umano CYP2B6 (Costa et al., 2014).....	- 39 -
Figura 12: Meccanismi di uptake per i BFRs (Zhang et al, 2021).....	- 43 -
Figura 13: Schematizzazione della procedura per la valutazione dell'uptake secondo la procedura ISO 16198:2015.....	- 55 -
Figura 14: Disegno sperimentale per lo studio di uptake secondo quanto previsto dalla metodologia standard RHIZOtest™	- 59 -
Figura 15: Componenti per la crescita e l'esposizione delle piante secondo RHIZOtest™ (ISO 16198:2015). -	- 63 -
Figura 16: Vasca di alluminio contenente sei terreni standard condizionati al 70%	- 65 -
Figura 17: a) Descrizione schematica delle modalità di aggiunta della soluzione contenente i BFRs; b) Suolo dove è stata applicato l'inoculo dei contaminanti	- 68 -
Figura 18: a) Pot con rete contenente i semi lavati; b) Pot assemblati con rete e upper plate disposti sulla tavola galleggiante di polistirolo.	- 69 -
Figura 19: Germogli di Solanum lycopersicum L. al termine della fase di germinazione.....	- 70 -
Figura 20: Fase di crescita idroponica di Solanum lycopersicum al 20° giorno.....	- 72 -
Figura 21: a) Preparazione dei vasi ed aggiunta del terreno nel soil-receiving plate; b) vasi per l'esposizione con suolo condizionato al 100% di W.H.C. in camera climatica	- 73 -
Figura 22: Bianchi di pre-esposizione	- 74 -
Figura 23: a) esposizione al terreno con Solanum lycopersicum L. b) Pianta di pomodoro esposta al suolo contaminato, con relativi componenti strutturali.....	- 75 -
Figura 24: Schema esplicativo di tutte le fasi RHIZOtest™ secondo quanto previsto dal metodo ISO 16198:2015 adattata all'analisi di POPs	- 77 -
Figura 25: a) Omogeneizzatore OV5; b) utensile di dispersione a quattro lame VSS2CMR2.....	- 78 -
Figura 26: Bagno ad ultrasuoni termostatico	- 79 -
Figura 27: Cromatografo ad esclusione dimensionale AZURA DSCSVI.....	- 81 -
Figura 28: Rotavapor modello G3 Heidolph	- 82 -
Figura 29: Evaporatore ad Azoto M515-IA	- 83 -
Figura 30: Funzionamento di un quadrupolo	- 88 -
Figura 31: Agilent 6890 – GC System accoppiato ad uno spettrometro di massa con analizzatore a singolo quadrupolo Agilent 5975C.....	- 88 -
Figura 32: Agilent 7890B GC System accoppiato a spettrometro di massa tandem con analizzatore a triplo quadrupolo Agilent 7000D.	- 90 -
Figura 33: Schema esplicativo della metodologia analitica applicata per analisi di PBDE e NBFR.	- 91 -
Figura 34: Istogramma con i dati di valore medio e barra di errore (n=5) relativi alla concentrazione (espressa in ng g ⁻¹ dw) degli otto analiti nel suolo pre-esposizione (in blu) e post-esposizione (in arancione). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).....	- 101 -
Figura 35: : Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g ⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatoria dei Σ ₄ NBFR e Σ ₄ PBDE nel suolo post esposizione (C _{soil} -post). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).....	- 102 -

Figura 36: Istogramma con i dati di valore medio e barre di errore (n=5) relativi alle concentrazioni (espressa in ng g ⁻¹ dw) degli otto analiti nella pianta considerata nel suo insieme (C _P). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).	- 103 -
Figura 37: Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g ⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatoria dei Σ ₄ NBFR e Σ ₄ PBDE nella pianta nel suo intero (sommatoria da C _P). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).	- 104 -
Figura 38: Istogramma con i dati di valore medio e barre di errore (n=5) relativi alle concentrazioni (espressa in ng g ⁻¹ dw) degli analiti nelle radici della pianta di pomodoro (C _R).	- 105 -
Figura 39: Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g ⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatoria dei Σ ₄ NBFR e Σ ₄ PBDE nelle radici della pianta di pomodoro (sommatoria da C _R). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).	- 106 -
<i>Figura 40: Fattori di Bioconcentrazione (BCF) per I Ritardanti di Fiamma (FRs) calcolati per le piante a fine esposizione a confronto con il log Kow dei BFRs. I risultati sono espressi come media e relativa barra di errore (n=5). I valori medi di BCF accomunati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti tra loro (p ≤ 0.05).....</i>	<i>- 109 -</i>
Figura 41: Istogramma con i dati di valore medio e barre di errore (n=5) relativi alle concentrazioni (espressa in ng g ⁻¹ dw) degli analiti nei germogli della pianta di pomodoro (C _S). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05).	- 112 -
Figura 42: Istogramma con i dati di valore medio di concentrazione (espressa in ng g ⁻¹ dw) e barre di errore (n=5) relativi alla sommatoria dei Σ ₄ NBFR e Σ ₄ PBDE nei germogli della pianta di pomodoro (sommatoria da C _S). I valori medi accomunati con la stessa lettera non differiscono significativamente tra loro (p ≤ 0.05). -	- 113 -
Figura 43: Fattori di Traslocazione (TF) per I Ritardanti di Fiamma (FRs) calcolati per le piante a fine esposizione a confronto con il log Kow dei BFRs . I risultati sono espressi come media e relativa barra di errore (n=5). I valori medi di TF accomunati dalla stessa lettera non sono significativamente differenti tra loro (p ≤ 0.05).	- 114 -

6.2 indice delle tabelle

Tabella 1: i 209 congeneri della famiglia dei PBDE.....	- 7 -
Tabella 2: Composizione percentuale delle miscele commerciali PBDE	- 8 -
Tabella 3: Produzione mondiale di BFRs espressa in migliaia di tonnellate (Alaee et al., 2003)	- 9 -
Tabella 4: Concentrazioni di congeneri di BDE (mg kg ⁻¹) presenti nei componenti di rifiuti elettronici in impianto di riciclaggio nel 2002.....	- 10 -
Tabella 5: Caratteristiche chimico-fisiche dei congeneri della famiglia dei Polibromo Difenileteri (PBDE).....	- 60 -
Tabella 6: Caratteristiche chimico-fisiche dei Nuovi Ritardanti di Fiamma Bromurati (NBFR)	- 61 -
Tabella 7: Composizione del terreno standard	- 64 -
Tabella 8: Caratteristiche chimico-fisiche del terreno standard e relativi metodi impiegati per l'analisi	- 64 -
Tabella 9: Concentrazione di metalli in tracce nel suolo standard e relativi metodi per l'analisi.....	- 64 -
Tabella 10: Componenti e concentrazioni della soluzione nutritiva 3 per la fase di esposizione e per il condizionamento dei terreni al buio.	- 66 -
Tabella 11: Componenti e concentrazioni della soluzione nutritiva 1 per la fase di germinazione al buio..	- 70 -
Tabella 12: Reagenti e concentrazioni della soluzione nutritiva 2 per la fase di crescita idroponica in regime di luce:buio	- 71 -
Tabella 13: Soluzione di standard marcati di estrazione EO-5277	- 96 -
Tabella 14: Standard nativi	- 96 -

Tabella 15: Limite di rilevamento del metodo (MDL) e limite di quantificazione del metodo (MQL) nella pianta (radici e germogli) e nel suolo per ciascun composto testato. - 97 -

Tabella 16: Dati relativi ai valori medi \pm deviazione standard dei pesi delle radici, germogli ed intera pianta espressi in grammi di sostanza secca (dw), determinati con n=5 repliche. I valori medi accomunati dalla stessa lettera non differiscono significativamente tra loro ($p \leq 0.05$). - 98 -

Tabella 15: Dati relativi alla concentrazione di ritardanti di fiamma nelle piante e nel suolo. I risultati sono espressi come media e deviazione standard (n=5) in ng g^{-1} dw. **C_{soil}** – **Pr**: concentrazione del suolo pre-esposizione, **C_{soil}** – **Po**: concentrazione del suolo post-esposizione; **C_R**: concentrazione nelle radici; **C_S**: concentrazione nei germogli; **C_P**: concentrazione nella pianta..... **Errore. Il segnalibro non è definito.**

Tabella 16: Dati relativi ai fattori di bioconcentrazione **RBCF**: fattore di concentrazione nelle radici; **SBCF**: fattore di concentrazione nei germogli; **BCF**: fattore di concentrazione nella pianta; **TF**: fattore di traslocazione. I valori sono espressi come media \pm deviazione standard (n=5). - 107 -

Ringraziamenti

I miei più sentiti ringraziamenti vanno al Professor Rossano Piazza che mi ha dato la possibilità di svolgere questo studio di tesi, dandomi fiducia e supporto dall'inizio alla fine del progetto. Si è sempre mostrato disponibile nel fornire il suo aiuto e le sue conoscenze. Senza di Lui sicuramente non avrei potuto mai fare questa esperienza. Mi ha insegnato, oltre che la chimica, anche il modo più giusto di comportarsi in ambito accademico e nei rapporti umani. Una mente brillante ed effervescente.

Un grande, grandissimo, ringraziamento è rivolto al Dottor Tiziano Bonato, persona molto carismatica, energica, umile e che crede nel prossimo. Vorrei ringraziarlo per il tempo dedicatomi all'insegnamento di come si lavora in un'azienda e di come si imposta un progetto di ricerca, per avermi sempre stimolato ad apprendere nuove nozioni teoriche e pratiche e per avermi insegnato che alla base dello sviluppo scientifico e personale deve esserci passione, curiosità e dedizione. Lo ringrazio perché ha sempre creduto in me. Per me è stato un grande piacere ed onore Conoscerla e aver avuto l'opportunità di collaborare insieme in questo progetto di ricerca. Una fonte di ispirazione.

Ringrazio vivamente il dottor Giovanni Beggio per tutto il supporto durante la parte pratica del laboratorio e durante il periodo di stesura della tesi. È stato sempre disponibile e premuroso fornendomi diversi spunti e materiali. Grazie alle sue competenze a livello di ricerca, mi ha aiutato ad alleggerire il carico di lavoro.

Un grande ringraziamento a tutte le persone dell'azienda S.E.S.A. Di grande importanza è stato il supporto tecnico del Responsabile di Laboratorio Simone Marangon, che si è interessato nel seguirmi, aiutarmi ed indicarmi la maniera più giusta di lavorare in un laboratorio di chimica organica.

Infine, ma non per importanza, un ringraziamento di cuore ai miei genitori Paolo e Marina. Posso dire con sicurezza e fermezza che senza di loro tutto questo percorso (di vita, oltre che universitario) non sarebbe mai potuto esistere. Siete le persone sicuramente più importanti. Le parole probabilmente non basterebbero mai.

Alla mia famiglia, a mio fratello, alla mia ragazza ed a tutti gli amici che mi hanno sempre aiutato, stimolato e che hanno creduto in me, vi ringrazio.

Luca Laudati