



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Ambientali

Controllo e Risanamento dell'Ambiente

Ordinamento ex D.M. 270/2004

Tesi di Laurea

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Determinazione di microinquinanti organici
persistenti (POPs) ed emergenti (PFASs) in bivalvi
bentonici di aree remote: biomonitoraggio
retrospettivo (1996-2009) in campioni di
Adamussium colbecki provenienti dalla Banca
Campioni Ambientali Antartici

Relatore

Prof. Rossano Piazza

Correlatore

Dott.ssa Sarah Pizzini

Laureanda

Chiara Sbicego

839185

Anno Accademico

2016/2017

A Paola, Graziano e Claudio

Indice

PREMESSA E OBIETTIVI	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1. Gli inquinanti organici persistenti (POPs)	7
1.1.1. Policloro bifenili (PCB).....	9
1.1.1.1. 3,3'-diclorobifenile (PCB-11)	15
1.1.2. Idrocarburi policiclici aromatici (IPA).....	16
1.1.3. Policloro naftaleni (PCN).....	19
1.1.4. Polibromo difenileteri (PBDE).....	21
1.1.5. Policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF)	24
1.2. Gli inquinanti emergenti	27
1.2.1. Le sostanze perfluoroalchiliche (PFASs)	28
1.3. Bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione.....	30
1.4. L'Antartide: l'importanza del continente remoto.....	32
1.4.1. <i>Adamussium colbecki</i>	35
1.4.2. La banca campioni ambientali antartici (BCAA).....	37
1.5. Determinazione di POPs e PFASs in matrici biotiche antartiche: lo stato dell'arte.....	38
1.6. Obiettivi del lavoro di tesi	41
2. MATERIALI E METODI	42
2.1. Trattamento preliminare del campione.....	43
2.1.1. Campionamento	43
2.1.2. Liofilizzazione	44
2.1.3. Estrazione.....	45
2.1.3.1. Estrazione accelerata con solvente (ASE™).....	45
2.1.3.2. Estrazione assistita in ultrasuoni.....	46
2.1.4. Purificazione.....	47
2.1.4.1. <i>Gel Permeation Chromatography</i> (GPC)	47
2.1.4.2. Power-Prep™	48
2.1.4.3. Estrazione in fase solida (SPE).....	49
2.1.5. Riduzione di volume e pre-concentrazione: Turbovap®II.....	50
2.1.6. Procedura analitica per la determinazione di POPs.....	51

2.1.7. Procedura analitica per la determinazione di PFASs	53
2.2. Analisi Strumentale	55
2.2.1. HRGC/LRMS con analizzatore a quadrupolo.....	55
2.2.1. HRGC/HRMS con analizzatore a doppia focalizzazione	57
2.2.3. Condizioni di analisi	59
2.3. Quantificazione	62
2.4. Qualità del dato.....	64
2.4.1. Accuratezza e precisione	64
2.4.2. Limiti di rivelabilità e valutazione dei bianchi procedurali	74
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	81
3.1. PCB	81
3.1.1. PCB-11.....	83
3.2. IPA	84
3.3. PCN.....	84
3.4. PBDE	85
3.5. PCDD/PCDF.....	85
3.6. PFASs	86
3.7. <i>Trends</i> temporali.....	87
4. CONCLUSIONI	96
5. ALLEGATI.....	97
6. BIBLIOGRAFIA.....	106
7. SITOGRAFIA	112
8. TESI CONSULTATE.....	113
9. GLOSSARIO	114
RINGRAZIAMENTI.....	117

Premessa e obiettivi

L'importanza dello studio degli inquinanti organici persistenti (POPs) nelle matrici ambientali è al giorno d'oggi riconosciuta da tutta la comunità scientifica. I contaminanti appartenenti a questa famiglia possiedono caratteristiche di elevata tossicità e di resistenza alla degradazione che li rendono una minaccia quanto mai attuale per la salute dell'uomo e degli ecosistemi. La determinazione di POPs in matrici biotiche riflette la necessità di monitorare la distribuzione di queste sostanze lungo le catene trofiche globali, data dalle loro proprietà lipofile e dalla conseguente capacità di bioaccumulare nei tessuti grassi degli organismi. Nello studio e nel monitoraggio dei POPs, l'Antartide riveste un ruolo fondamentale, in quanto archivio naturale di informazioni riguardanti i processi avvenuti e tuttora in corso a livello globale e che hanno contribuito all'inquinamento anche delle zone remote polari.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in questo contesto con l'obiettivo primario di determinare e quantificare diverse classi di POPs in campioni del mollusco bivalve endemico *Adamussium colbecki* (Smith 1902), proveniente da Baia Terra Nova nel Mare di Ross. L'appartenenza dei campioni a diverse campagne di campionamento condotte tra il 1996 ed il 2009, nell'ambito del programma nazionale di ricerca in Antartide (PNRA), permetterà poi uno studio di biomonitoraggio retrospettivo che metterà in evidenza i *trends* temporali delle concentrazioni degli inquinanti oggetto di analisi. I campioni sono stati forniti dalla banca campioni ambientali antartici (BCAA) ospitata presso il dipartimento di chimica e chimica industriale (DCCI) dell'Università degli studi di Genova.

Le classi di POPs analizzate comprendono: policloro bifenili (PCB), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policloro naftaleni (PCN), polibromo difenileteri (PBDE), policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF).

Una parte del lavoro, inoltre, ha come oggetto d'indagine una classe di inquinanti emergenti di crescente interesse, le sostanze perfluoroalchiliche (PFASs), determinate negli stessi campioni di *A. colbecki* tramite una differente procedura analitica rispetto a quella utilizzata per gli altri POPs.

La parte sperimentale del lavoro ha previsto l'utilizzo di sistemi di estrazione e purificazione automatizzati per il trattamento preliminare dei campioni, mentre l'analisi strumentale è stata condotta in gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa a bassa ed alta risoluzione.

Una parte dei risultati che verranno riportati in questo lavoro di tesi è già stata oggetto di due pubblicazioni inserite all'interno del progetto della BCAA e supportate dal PNRA: Grotti *et al.*, 2016; Pizzini *et al.*, 2017.

1 INTRODUZIONE

1.1 Gli inquinanti organici persistenti (POPs)

Le sostanze definite come POPs (*Persistent Organic Pollutants*) sono classi di composti organici che, per le loro caratteristiche comuni di tossicità e di resistenza alla degradazione, sono considerate inquinanti e pericolose per la salute umana e per l'ambiente (*World Health Organization, WHO, 2003*). La pericolosità di questi composti è data principalmente dalla loro lipofilità, ossia dalla capacità di essere solubili nei tessuti grassi degli organismi e di bioaccumulare. Essi possono quindi entrare facilmente nella catena trofica e biomagnificare, raggiungendo anche l'uomo ed esercitando su di esso gli effetti tossici. Non sono rari gli studi riguardanti la determinazione di POPs nel latte materno che indicano che l'esposizione a queste sostanze è quanto mai attuale ed importante (*Antignac et al., 2016; Croes et al., 2012*). Inoltre, i POPs sono soggetti al trasporto a lungo raggio in atmosfera, meccanismo che ha contribuito a renderli inquinanti ubiquitari, distribuiti ampiamente in tutto il globo, comprese le regioni remote dell'Artico e dell'Antartide.

I primi provvedimenti legislativi redatti a livello internazionale contro questo tipo di inquinanti sono stati adottati nel 1979 con la Convenzione di Ginevra sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero (*CLRTAP, Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution*), ampliata successivamente con otto protocolli. Il più importante di questi è il Protocollo di Aarhus del 1998 sugli inquinanti organici persistenti, che pone l'attenzione su una lista di 16 sostanze prioritarie classificate come pericolose. Di questa lista fanno parte 11 pesticidi, 2 miscele chimiche industriali e 3 sottoprodotti/contaminanti. Il fine ultimo del Protocollo è quello di eliminare qualsiasi scarico, emissione o rilascio di POPs. Esso, infatti, bandisce completamente la produzione e l'uso di aldrin, clordano, clordecone, dieldrin, endrin, esabromobifenile, mirex e toxafene. Per altre sostanze, come diclorodifeniltricloroetano (DDT), eptacloro, policloro bifenili (PCB) ed esaclorobenzene, viene prevista l'eliminazione in tempi successivi. Il Protocollo, inoltre, obbliga i Paesi firmatari a ridurre le emissioni di diossine, furani, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed esaclorobenzene sotto i limiti che li caratterizzavano nel 1990. Infine, vengono riportate le

indicazioni su come gestire lo smaltimento dei rifiuti relativi ai prodotti che verranno banditi e sui limiti di emissione riguardanti l'incenerimento di rifiuti pericolosi e provenienti da attività mediche (*United Nations Economic Commission for Europe, UNECE, 1998*). Successivamente, con la Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (22-23 Maggio 2001) viene redatto lo strumento legislativo più significativo in materia di POPs, costruito direttamente sulla base del Protocollo di Aarhus. Il documento originario identifica con il nome di "Dirty Dozen" una lista di 12 classi di POPs prioritarie che destano maggiore preoccupazione per la salute umana e dell'ambiente e che necessitano di rapidi provvedimenti. A queste 12 classi vengono aggiunti altri 9 composti con un emendamento del 2009 (Tabella 1.1; *United Nations Environment Programme, UNEP, 2001*).

Tabella 1.1. Gli inquinanti organici persistenti (POPs) prioritari identificati dalla Convenzione di Stoccolma (Lohmann et al., 2007; *United Nations Environment Programme, UNEP, 2001*).

POPs	Pesticidi	Prodotti chimici industriali	Sottoprodotti
Aldrin*	X		
Dieldrin*	X		
Endrin*	X		
Clordano*	X		
DDT*	X		
Eptacloro*	X		
Esaclorobenzene*	X	X	X
Mirex*	X		
Toxafene*	X		
Policloro bifenili*		X	
Diossine*			X
Furani*			X
Clordecone	X		
Esabromobifenile		X	
Esabromodifeniletere		X	
Eptabromodifeniletere			
α-esaclorocicloesano	X		X
β-esaclorocicloesano	X		X
Lindano	X		
Pentaclorobenzene	X	X	
Acido perfluorooottansolfonico		X	
Tetrabromodifeniletere		X	
Pentabromodifeniletere		X	

*Incluso nella lista originaria di 12 POPs "Dirty Dozen".

I 151 Paesi che, ad oggi, hanno firmato il trattato si impegnano all'eliminazione dei composti prodotti intenzionalmente per scopi commerciali e alla riduzione dei sottoprodotti non

intenzionali. La Convenzione prevede inoltre l'aggiunta di nuove sostanze alla categoria POPs nel caso esse presentino le tre caratteristiche necessarie alla classificazione, dette PBT:

- Persistenza in ambiente (*Persistent*);
- Capacità di bioaccumulare (*Bioaccumulative*);
- Tossicità (*Toxic*).

Molto lavoro è stato fatto ed è attualmente in corso per definire specifici metodi convenzionali per la valutazione di queste caratteristiche (Klečka *et al.*, 2009). Per dare una valutazione sull'efficacia della Convenzione di Stoccolma, inoltre, è fondamentale uno studio accurato dei dati di monitoraggio che provengono dal programma di monitoraggio globale sui POPs (*Global Monitoring Program, GMP*), implementato nell'arco degli ultimi 11 anni, dall'entrata in vigore del trattato (Magulova e Priceputu, 2016).

Nel presente lavoro di tesi verranno indagate diverse classi di POPs, alcune delle quali identificate solo recentemente come tali o facenti parte della categoria degli inquinanti emergenti. In particolare, saranno oggetto di analisi le seguenti classi:

- Policloro bifenili (PCB);
- Idrocarburi policiclici aromatici (IPA);
- Policloro naftaleni (PCN);
- Polibromo difenileteri (PBDE);
- Policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e furani (PCDF);
- Sostanze perfluoroalchiliche (PFASs).

1.1.1 Policloro bifenili (PCB)

STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

I policloro bifenili (PCB) sono una classe di composti chimici aromatici di sintesi, di formula generale $C_{12}H_{10-n}Cl_n$. Essi sono formati dalla struttura base del bifenile i cui atomi di idrogeno sono sostituiti da atomi di cloro, in numero variabile da 1 a 10 (Figura 1.1). In base al grado di clorurazione i PCB si identificano con 209 congeneri diversi, suddivisi in 10 classi di omologhi, ciascuna delle quali comprende tutti i possibili isomeri per ogni livello di

sostituzione. La nomenclatura prevede l'assegnazione di un numero progressivo da 1 a 6 a partire dall'atomo di carbonio del legame bifenilico ed in posizione simmetrica sui due anelli. Secondo la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ogni congenere viene identificato con un numero da 1 a 209, a partire dai mono-clorurati fino al deca-clorurato (Erickson, 1997).

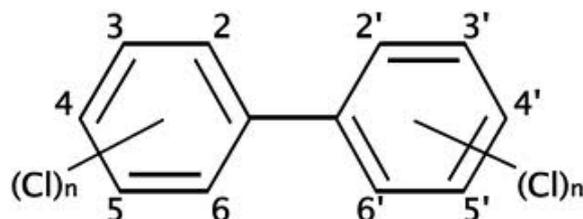


Figura 1.1. Formula di struttura dei policloro bifenili (PCB;
<http://www.webbofscience.com/2009/05/23/molecule-of-the-week-polychlorinated-biphenyls-pcbs/>).

In Tabella 1.2 sono illustrati i 209 PCB che teoricamente possono formarsi. Tuttavia, è improbabile che tutti i congeneri si formino durante il processo di clorurazione del bifenile (De Voogt e Brinkman, 1989).

Tabella 1.2. Nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), numero di isomeri, peso molecolare e contenuto in cloro dei gruppi isomerici di policloro bifenili (PCB; De Voogt e Brinkman, 1989).

Formula di Struttura	Nome (-cloro bifenile)	Numero di isomeri	Numerazione IUPAC	Peso molecolare	% Cloro	N° congeneri trovati nelle miscele commerciali
$C_{12}H_9Cl$	Mono	3	1-3	188.65	18.79	3
$C_{12}H_8Cl_2$	Di	12	4-15	233.10	31.77	12
$C_{12}H_7Cl_3$	Tri	24	16-39	257.54	41.30	23
$C_{12}H_6Cl_4$	Tetra	42	40-81	291.99	48.56	41
$C_{12}H_5Cl_5$	Penta	46	82-127	326.43	54.30	39
$C_{12}H_4Cl_6$	Esa	42	128-169	360.88	58.93	31
$C_{12}H_3Cl_7$	Epta	24	170-193	395.32	62.77	18
$C_{12}H_2Cl_8$	Otta	12	194-205	429.77	65.98	11
$C_{12}HCl_9$	Nona	3	206-208	464.21	68.73	3
$C_{12}Cl_{10}$	Deca	1	209	498.66	71.10	1

I PCB sono composti chimicamente stabili, sono solubili in un'ampia varietà di solventi organici ed hanno una bassa conducibilità elettrica. Come sostanze pure, si presentano

come liquidi o solidi non cristallini, mentre le miscele commerciali sono liquidi viscosi. Alla temperatura di 25°C, i PCB sono caratterizzati da una pressione di vapore che varia da 1.2 Pa per i congeneri mono-clorurati, a $7 \cdot 10^{-6}$ Pa per il decacloro bifenile. Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) varia tra 4.2 (mono-clorurati) a 8.3 (deca-clorurato) e la solubilità in acqua ha valori compresi tra $2 \cdot 10^{-6}$ mol·m⁻³ per il congenero deca-clorurato e 29 mol·m⁻³ per i mono-clorurati (Thomas, 2008).

FONTI ED UTILIZZI

La produzione industriale di PCB ha avuto inizio negli USA nel 1929 con la *Swan Chemical Co.*, acquistata poi dalla *Monsanto Industrial Chemicals Co.* nel 1935. Quest'ultima mise in commercio una serie di miscele complesse di PCB sotto il nome di Aroclor® e ne fu il maggiore produttore a livello mondiale. Nel periodo di maggiore diffusione, diversi Paesi commercializzarono i PCB attribuendo alle miscele nomi differenti. Ne sono un esempio Clophen® (*Bayer*, Germania Occidentale), Phenoclor® e Pyralene® (*Caffaro*, Italia), Kanechlor® (*Kanegafuchi Chemical Industries*, Giappone), Fenclor® (*Prodelec*, Francia), Delor® (*Chemko*, Cecoslovacchia; Erickson, 1997). Il nome di queste miscele è solitamente seguito da un numero che indica la percentuale in peso di cloro presente o il numero di atomi di cloro sostituenti sul bifenile.

Il processo di sintesi dei PCB comprende la clorurazione del bifenile in presenza di catalizzatore. In base alle condizioni di reazione, il grado di clorurazione può variare tra il 21% ed il 68% in peso. Il contenuto in cloro, generalmente, indica che le miscele commerciali presentano solo un certo *range* di omologhi, rappresentato principalmente dai Tetra-, Penta- ed Esa-CB (Breivik *et al.*, 2002).

I PCB sono stati prodotti industrialmente su larga scala poiché le loro proprietà chimico-fisiche conferivano un'alta versatilità in molteplici campi di utilizzo. Hanno infatti trovato applicazione come fluidi dielettrici nei condensatori e nei trasformatori, fluidi refrigeranti, fluidi idraulici ed oli lubrificanti, oltre che come additivi in pesticidi, inchiostri, vernici, pitture e carta copiativa (Erickson, 1997). Si stima che la produzione globale di PCB tra il 1930 ed il 1993 sia stata di 1.32 milioni di tonnellate (Tabella 1.3), senza contare il

contributo di alcune industrie della Polonia, della Germania dell'Est e dell'Austria di cui non si hanno dati certi (Breivik *et al.*, 2002).

Tabella 1.3. Produzione totale di policloro bifenili (PCB) in tonnellate come riportato in letteratura (Breivik *et al.*, 2002).

Produttore	Stato	Inizio produzione	Fine produzione	Quantità (t)
<i>Monsanto Industrial Chemicals</i>	USA	1930	1977	641246
<i>Geneva Industries</i>	USA	1971	1973	454
<i>Kanegafuchi Chemical Industries</i>	Giappone	1954	1972	56326
<i>Mitsubishi Chemical</i>	Giappone	1969	1972	2461
<i>Bayer</i>	Germania Ovest	1930	1983	159062
<i>Prodelec</i>	Francia	1930	1984	134654
<i>S.A. Cros</i>	Spagna	1955	1984	29012
<i>Monsanto Industrial Chemicals</i>	Regno Unito	1954	1977	66542
Caffaro	Italia	1958	1983	31092
<i>Chemko.</i>	Cecoslovacchia	1959	1984	21482
<i>OrgSteklo</i>	URSS (Russia)	1939	1990	141800
<i>Orgsintez</i>	URSS (Russia)	1972	1993	32000
<i>Xi'an</i>	Cina	1960	1979	8000
Totale		1930	1993	1'324'131

L'utilizzo massivo e lo smaltimento scorretto dei prodotti contenenti tali sostanze hanno permesso la distribuzione dei PCB in diverse matrici ambientali. Nonostante la produzione sia stata bloccata negli Anni Settanta, questi composti sono tutt'oggi presenti nei comparti ambientali a causa della loro stabilità chimica, provocando casi anche gravi di contaminazione.

TOSSICITÀ

I PCB possono essere suddivisi in base alla struttura molecolare e alla capacità di interazione con determinati recettori. I PCB cosiddetti coplanari presentano uno o nessun atomo di

cloro in posizione orto ed hanno un'alta affinità di legame con il recettore degli idrocarburi aromatici (AhR), allo stesso modo della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), molecola di riferimento per la tossicità dei PCB. I congeneri con questa conformazione sono infatti denominati *dioxin-like* o PCB diossina-simili. L'introduzione di due o più sostituenti clorurati in posizione orto determina un calo della coplanarità tra i due anelli aromatici a causa del crescente ingombro sterico. I PCB non-orto sostituiti non interagiscono con il recettore AhR ed hanno quindi una pericolosità minore (Majkova *et al.*, 2008). Il recettore AhR stimola l'induzione di particolari enzimi nel fegato, detti MFO (ossidasi a funzione mista), dipendenti dai citocromi P-448 e P-450. Essi normalmente disattivano i composti tossici rendendoli più solubili e quindi facilitandone l'escrezione dall'organismo. Tuttavia, i metaboliti che si generano da questo processo a causa dell'interazione dei PCB possono avere caratteristiche ancora più tossiche dei congeneri policlorurati di partenza e, in base alla natura del composto chimico, dei tessuti e del tipo di organismo, possono resistere all'ulteriore degradazione e non essere secreti all'esterno (Connell, 1997). In Figura 1.2 è illustrata la conformazione orto e non-orto dei PCB.

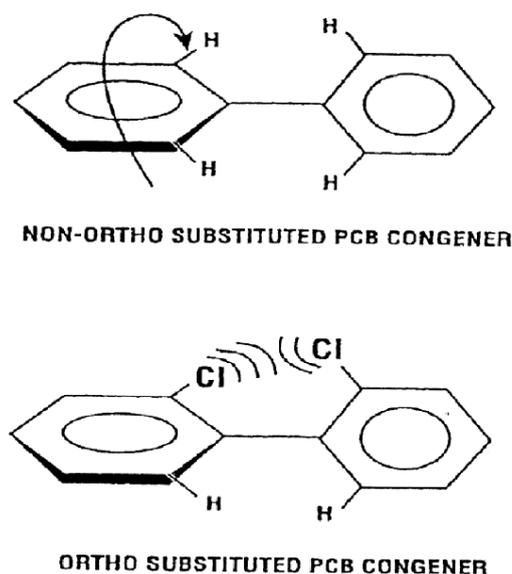


Figura 1.2. Struttura non-orto e orto- dei policloro bifenili (PCB). Gli atomi di cloro in posizione orto- impediscono la configurazione planare della molecola (Connell, 1997).

I PCB *dioxin-like* comprendono 12 congeneri tra tutti i 209 possibili: PCB-77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 e 189.

La tossicità dei PCB viene espressa tramite il calcolo del fattore di tossicità equivalente (TEF) che assume valori da 0 a 1, assegnando il valore unitario di riferimento alla 2,3,7,8-TCDD, il congenere più tossico delle dibenzodiossine. I valori di TEF possono essere utilizzati per calcolare anche la concentrazione di tossicità equivalente (TEQ) in diversi campioni ambientali, quali biota, suolo, sedimenti e acqua. La concentrazione TEQ si ottiene moltiplicando il valore di TEF relativo ad ogni congenere per la concentrazione del congenere stesso nel campione ambientale di interesse. Si può ottenere quindi il valore di TEQ di una miscela di PCB secondo la formula:

$$TEQ_{PCB\ mix} = \sum [PCB_i] \cdot TEF_i$$

dove *i* indica il congenere *i*-esimo.

In Tabella 1.4 vengono riportati i valori di TEF determinati dalla WHO per i PCB *dioxin-like* riferiti all'uomo, ai mammiferi, ai pesci ed agli uccelli (Van den Berg *et al.*, 1998).

Tabella 1.4. Fattori di tossicità equivalente (TEF) per i policloro bifenili (PCB) *dioxin-like* dati dalla World Health Organization (WHO) per l'uomo, i mammiferi, i pesci e gli uccelli (Van den Berg *et al.*, 1998).

Congeneri	TEF		
	Uomo/mammiferi	Pesci	Uccelli
3,3',4,4'-TetraCB (77)	0.0001	0.0001	0.05
3,3,4',5-TetraCB (81)	0.0001	0.0005	0.1
2,3,3',4,4'-PentaCB (105)	0.0001	<0.000005	0.0001
2,3,4,4',5-PentaCB (114)	0.0005	<0.000005	0.0001
2,3,4,4',5-PentaCB (118)	0.0001	<0.000005	0.00001
2',3,4,4',5-PentaCB (123)	0.0001	<0.000005	0.00001
3,3',4,4',5-PentaCB (126)	0.1	0.005	0.1
2,3,3',4,4',5-EsaCB (156)	0.0005	<0.000005	0.0001
2,3,3',4,4',5'-EsaCB (157)	0.0005	<0.000005	0.0001
2,3',4,4',5,5'-EsaCB (167)	0.00001	<0.000005	0.00001
3,3',4,4',5,5'-EsaCB (169)	0.01	0.00005	0.001
2,3,3',4,4',5,5'-EptaCB (189)	0.0001	<0.000005	0.00001

1.1.1.1 3,3'-diclorobifenile (PCB-11)

Il congenere 3,3'-diclorobifenile (Figura 1.3), anche detto PCB-11 secondo la nomenclatura IUPAC, riveste un ruolo di particolare importanza poiché viene considerato un *marker* della contaminazione ambientale da PCB non associata alle miscele commerciali. Il PCB-11, infatti, è stato identificato solo recentemente come co-prodotto non volontario dei processi di produzione dei pigmenti organici per vernici, soprattutto gialli diarilici. La sua immissione in ambiente deriva quindi dalla diffusione di questi pigmenti in diversi beni di uso comune tra cui giornali e riviste, imballaggi per alimenti e sacchetti di plastica. La produzione e l'utilizzo quotidiano di questi beni in tutto il mondo hanno contribuito alla dispersione del PCB-11 nei diversi comparti ambientali a livelli tali da mettere a rischio, ad esempio, il raggiungimento degli standard di qualità ambientali delle acque dati dalla somma di tutti i congeneri (PCB totali; Rodenburg *et al.*, 2010).

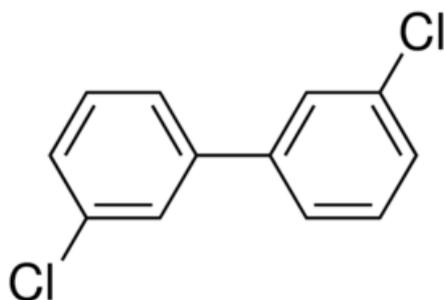


Figura 1.3. Struttura del congenere 3,3'-diclorobifenile (PCB-11;
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/34104?lang=it®ion=IT>).

Il PCB-11 è un congenere diclorurato con un'alta volatilità. Come altri PCB a basso grado di clorurazione, può persistere per lungo tempo in aria ed essere soggetto ai meccanismi di trasporto a lungo raggio, che hanno contribuito a rendere questo composto ubiquitario. Sono diversi gli studi che hanno mostrato la presenza del PCB-11 anche in aree remote del globo. In particolare, in Antartide, è stato determinato in concentrazioni non trascurabili soprattutto in campioni di aria e di neve superficiale (Piazza *et al.*, 2013; Vecchiato *et al.*, 2015).

1.1.2 Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA o *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAH) rappresentano un'ampia classe di composti organici formati da due o più anelli aromatici condensati. Essi variano dalla molecola più semplice formata da due soli anelli benzenici (Naftalene), a strutture più complesse fino a dieci anelli. Si possono distinguere IPA alternanti, contenenti solamente anelli aromatici a sei atomi di carbonio, e IPA non alternanti, formati anche da anelli a cinque atomi di carbonio (Figura 1.4). Strutture e configurazioni diverse implicano proprietà chimico-fisiche differenti. Nella loro forma più pura, gli IPA si presentano come solidi incolori, biancastri o giallo-verdi, caratterizzati da bassa volatilità e minima solubilità in acqua. La maggior parte di questi composti può essere soggetta a fotossidazione e degradare a molecole più semplici (Huang e Penning, 2014).

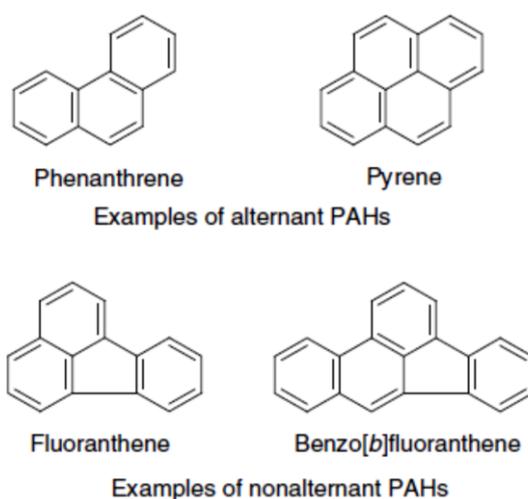


Figura 1.4. Esempio di idrocarburi policiclici aromatici (IPA o PAH) alternanti e non alternanti (Huang e Penning, 2014).

FONTI

Gli IPA si formano per condensazione di altri composti chimici più semplici, principalmente per pirolisi o pirosintesi. Quest'ultimo processo è il più importante e riguarda gli idrocarburi a catena corta: temperature superiori a 500°C portano alla rottura dei legami C-C e C-H con conseguente formazione di radicali liberi i quali, ricombinandosi e condensando tra loro, danno origine a molecole aromatiche molto stabili. Idrocarburi più pesanti, invece, portano alla formazione di IPA tramite pirolisi. La temperatura è un fattore fondamentale che incide sia sulla struttura, sia sul tipo di processo con cui si originano questi composti.

Gli IPA sono inquinanti ubiquitari che possono formarsi naturalmente in ambiente, da processi di combustione incompleta di legno, combustibili fossili, gas e biomassa, ma anche essere immessi da fonti antropiche, quali il fumo di sigaretta, l'usura degli pneumatici, la produzione di pitture, plastiche e pesticidi. Generalmente, le maggiori concentrazioni di IPA si hanno in corrispondenza delle aree urbane, a causa dell'ingente traffico veicolare, degli scarichi industriali e dell'incenerimento di rifiuti organici. Fanno eccezione eventi di incendi boschivi e di attività vulcaniche che portano, inevitabilmente, a picchi di concentrazione di queste sostanze in atmosfera. Negli Anni Settanta, l'agenzia statunitense di protezione ambientale (*United States Environmental Protection Agency*, US EPA) ha identificato 16 IPA come inquinanti prioritari. Ne fanno parte: naphthalene (NAPH), acenaphthylene (ACNY), acenaphthene (ACN), fluorene (FLU), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), fluoranthene (FLT), pyrene (PYR), chrysene (CRY), benz[a]anthracene (BAA), benzo[b]fluoranthene (BBF), benzo[k]fluoranthene (BKF), benzo[a]pyrene (BAP), indeno[1,2,3-cd]pyrene (IPYR), Benzo[g,h,i]perylene (BPER) e dibenz[a,h]anthracene (DAHA; Figura 1.5). Tra questi, il benzo[a]pirene (B[a]P) è riconosciuto come cancerogeno per l'uomo e comunemente utilizzato come indicatore dell'esposizione agli IPA (Huang e Penning, 2014).

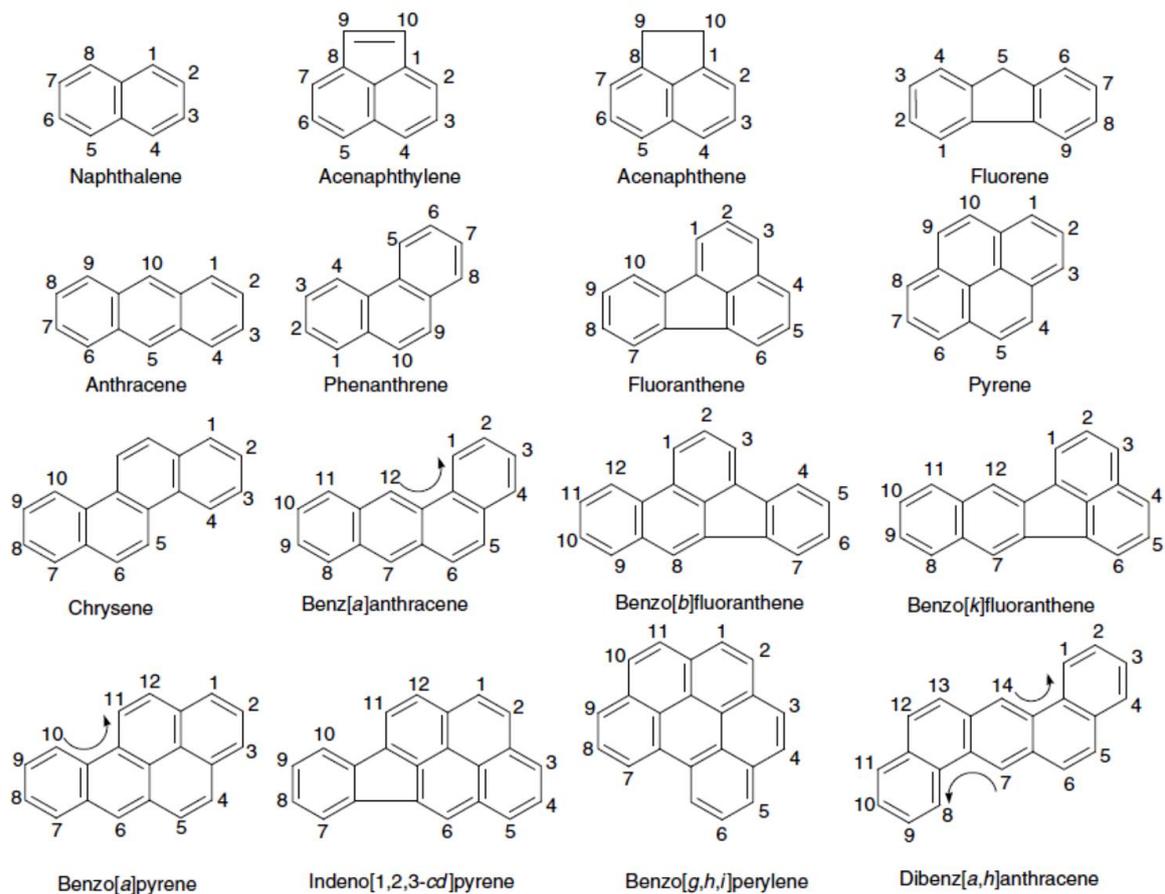


Figura 1.5. I 16 idrocarburi policiclici aromatici (IPA) prioritari identificati dalla *United States Environmental Protection Agency* (US EPA).

Successivamente, a questa lista è stato aggiunto il benzo[j]fluoranthene secondo le direttive e gli studi condotti dall'ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*). Questi 17 IPA sono stati scelti come prioritari poiché: 1) sono disponibili più informazioni su di essi rispetto ad altri composti; 2) si suppone che abbiano una pericolosità maggiore di altri e mostrano effetti negativi che sono rappresentativi degli IPA; 3) esiste una maggiore probabilità di esposizione a questi composti rispetto ad altri; 4) tra tutti gli IPA analizzati, questi sono quelli identificati con le concentrazioni più alte nei siti di rifiuti pericolosi dell'NPL (*National Priority List*) statunitense (ATSDR, 1995).

TOSSICITÀ

Gli IPA sono presenti in diverse matrici ambientali, quali aria, suolo, acqua, oltre che in matrici biotiche e in alimenti, data la loro alta lipofilità. Le vie di esposizione sono molteplici ed includono l'inalazione, il contatto con la pelle e l'ingestione. Questi composti

possono presentare un pericolo per la salute sotto diversi aspetti. Studi su animali hanno evidenziato lo sviluppo di tumori dopo periodi prolungati di esposizione ad alcuni composti quali benz[a]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, chrysene, dibenzo[a,h]anthracene e indeno[1,2,3-cd]pyrene. Studi sull'uomo hanno mostrato che individui esposti per inalazione o contatto dermico per lungo periodo a miscele contenenti IPA possono anch'essi sviluppare il cancro (ATSDR, 1995).

Secondo l'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) sono definiti come probabili cancerogeni per l'uomo il benz[a]anthracene e il benzo[a]pyrene, mentre come possibili cancerogeni i seguenti composti: benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene e indeno[1,2,3-cd]pyrene. Non sono invece classificati come cancerogeni i composti: antracene, benzo[g,h,i]perylene, benzo[e]pyrene, chrysene, fluoranthene, fluorene, phenanthrene e pyrene.

L'attività cancerogena di questi composti deriva generalmente dalle vie metaboliche che essi percorrono una volta entrati nell'organismo. Alcuni IPA posseggono una conformazione tale da portare alla trasformazione della molecola per via enzimatica in 27 possibili metaboliti derivati, in grado di interagire con DNA, RNA e proteine. Gli IPA interessati da questa via biochimica presentano una struttura "a sella", caratterizzata dalla cosiddetta "regione recesso" (*bay region*) sulla quale è possibile la formazione di dioli epossidi capaci di legarsi agli acidi nucleici e causare effetti genotossici e cancerogeni (ATSDR, 1995).

1.1.3 Policloro naftaleni (PCN)

STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

I policloro naftaleni (PCN) sono una classe di composti organici aromatici di formula $C_{10}H_{8-n}Cl_n$. Essi derivano dalla struttura base del naftalene in cui gli atomi di idrogeno sono sostituiti da atomi di cloro in numero variabile da 1 a 8. Esistono 75 congeneri possibili identificabili tramite la numerazione mostrata in Figura 1.6.

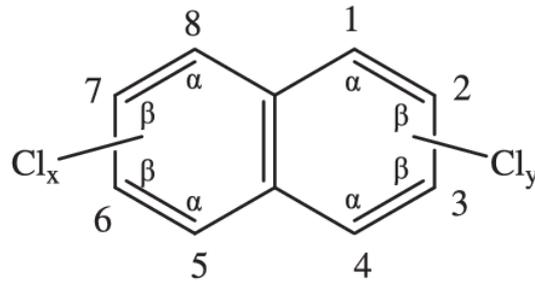


Figura 1.6. Formula di struttura dei policloro naftaleni (PCN; Liu *et al.*, 2014).

Le molecole di PCN sono quindi planari, ad eccezione del congenere otta-clorurato che presenta un'importante distorsione strutturale data dall'ingombro sterico degli atomi di cloro sostituenti.

I PCN sono composti lipofili con un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) che varia da 3.90 per il congenere mono-clorurato (PCN-1), a 6.42 per il congenere otta-clorurato (PCN-75). La maggior parte di queste sostanze risulta altamente solubile in solventi organici, mentre la solubilità in acqua è molto ridotta. Ad eccezione del congenere PCN-1, che è liquido a temperatura ambiente, i PCN si presentano come composti solidi cristallini. Il punto di fusione aumenta con l'aumentare del grado di clorurazione, con variazioni significative tra ogni gruppo di omologhi. In ambito commerciale i PCN vengono prodotti come miscele complesse di isomeri ed omologhi, generalmente sotto forma di cere con un'alta compatibilità con altri materiali (Jacobsson e Asplund, 2000).

FONTI ED UTILIZZI

Date le caratteristiche di alta stabilità chimica e di ampia compatibilità con diversi materiali, i PCN sono stati largamente prodotti ed utilizzati in moltissime applicazioni. Hanno trovato impiego come fluidi dielettrici, lubrificanti, isolanti per cavi elettrici, prodotti per la conservazione di legno, carta e tessuti, plastificanti. La produzione industriale globale di PCN è stata stimata in 150'000 tonnellate tra il 1930 ed il 1980. Le miscele commerciali di queste sostanze presentano nomi differenti a seconda del Paese di produzione. Ne sono un esempio Halowax (USA), Nibren (Germania), Clonacire (Francia), Seekay (Regno Unito). La contaminazione da PCN deriva soprattutto da questi diretti utilizzi commerciali, ma trova un'origine involontaria anche in altri processi industriali di produzione di composti chimici

simili, come i PCB. La molecola di naftalene, infatti, se presente come contaminante nel processo di formazione dei PCB, subisce clorurazione esattamente come la molecola di bifenile, portando all'origine di PCN come co-prodotti indesiderati (Fernandes *et al.*, 2017).

I PCN possono formarsi anche da processi termodinamici industriali, come l'incenerimento di rifiuti urbani. Alcuni studi suggeriscono una possibile via di formazione di policloro naftaleni da molecole di IPA precursori, in particolare dal perylene e dal benzo[g,h,i]perylene in seguito a combustione di rifiuti (Liu *et al.*, 2014).

TOSSICITÀ

I policloro naftaleni sono molecole lipofile e planari, con una struttura molto simile a quella della 2,3,7,8-TCDD. I PCN a più alto grado di clorurazione (PCN-66 e PCN-67) hanno mostrato lo stesso comportamento dei PCB *dioxin-like*, interagendo con gli enzimi nel fegato associati al citocromo P-450 e con il recettore AhR (Hooth *et al.*, 2012). Gli effetti maggiormente osservati sull'uomo in seguito all'esposizione ai PCN sono cloracne e danni al fegato. Altri sintomi meno comuni comprendono irritazione agli occhi, affaticamento, emicrania, anemia, ematuria, anoressia, vomito e dolori addominali. Rari casi di morte sono stati associati all'itterizia e all'epatotossicità, mentre sono necessari ulteriori studi per investigare gli effetti carcinogenici di questi composti (Hayward, 1998).

1.1.4 Polibromo difenileteri (PBDE)

STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

I polibromo difenileteri (PBDE) sono composti organici alogenati di formula generale $C_{12}H_{10-n}Br_nO$ prodotti dalla bromurazione del difeniletere in presenza di un catalizzatore, come $AlCl_3$ (Alaee *et al.*, 2003). La molecola di difeniletere contiene 10 atomi di idrogeno, ognuno dei quali può essere sostituito da un atomo di bromo, formando 209 diversi congeneri teorici (Figura 1.7). 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.

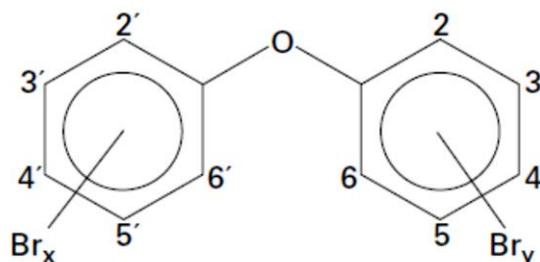


Figura 1.7. Formula di struttura dei polibromo difenileteri (PBDE; Darenrud *et al.*, 2001).

I PBDE presentano un'alta resistenza alla degradazione fisica, chimica e biologica, un punto di ebollizione compreso tra 310 e 425°C ed una pressione di vapore molto bassa a temperatura ambiente. Questi composti hanno una solubilità in acqua molto limitata e sono estremamente lipofili, con un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log K_{ow}$) compreso tra 4.3 e 9.9. Per questo motivo i PBDE hanno spiccata tendenza al bioaccumulo, specialmente negli organismi acquatici, ed entrano così nella rete trofica (Darnrud *et al.*, 2001).

FONTI ED UTILIZZI

Nel corso degli ultimi cinquant'anni la produzione e l'utilizzo di polimeri hanno conosciuto un notevole sviluppo. Al giorno d'oggi questa grande varietà di sostanze viene impiegata nella produzione di tessuti, mobili, elettronica, veicoli e computer. Le automobili moderne, ad esempio, contengono fino a 100 kg di polimeri di vario tipo, la maggior parte dei quali sono derivati del petrolio e, per questo, facilmente infiammabili. Nasce da qui la necessità, per ragioni di sicurezza, di introdurre nei polimeri, come in altri materiali combustibili, dei ritardanti di fiamma in grado di aumentare la resistenza al fuoco di tali prodotti. La classe più comune di composti con tale proprietà è quella dei ritardanti di fiamma bromurati (*Brominated Flame Retardants*, BFR), di cui fanno parte i PBDE (Alaee *et al.*, 2003).

I PBDE vengono sintetizzati tramite la bromurazione del difeniletere e messi in commercio come miscele di omologhi. Principalmente i prodotti commerciali contengono miscele di Penta-, Epta-, Otta- e Decabromo difenileteri, la cui composizione è illustrata in Tabella 1.5 (Darnrud *et al.*, 2001). Questi composti si trovano dispersi nel materiale in cui sono inseriti, ma non sono covalentemente legati alla matrice polimerica. Con il tempo, l'usura del

materiale porta al rilascio graduale in ambiente di PBDE. La schiuma poliuretanic, se esposta all'ambiente esterno per 4 settimane ad esempio, va incontro a degradazione, rilasciando frammenti contenenti Penta-BDE (Siddiqi *et al.*, 2003).

Tabella 1.5. Composizione delle miscele commerciali di polibromo difenileteri (PBDE; Darnerud *et al.*, 2001).

Classe di omologhi	Prodotto commerciale			
	Tetra-BDE (%)	Penta-BDE (%)	Otta-BDE (%)	Deca-BDE (%)
Tri-BDE		0-1		
Tetra-BDE	41-41.7	24-38		
Penta-BDE	44.4-45	50-62		
Esa-BDE	6-7	4-8	10-12	
Epta-BDE			43-44	
Otta-BDE			31-35	
Nona-BDE			9-11	0.3-3
Deca-BDE				97-98

TOSSICITÀ

L'elevata lipofilicità è la caratteristica principale che rende i PBDE pericolosi per l'ambiente e per l'uomo. Diversi studi riportano alti livelli di PBDE nei tessuti di pesci e molluschi, sia di zone urbanizzate, sia di aree remote, come l'Antartide (Pizzini *et al.*, 2015; Borghesi *et al.*, 2009; Hahm *et al.*, 2009). Altri lavori mettono in evidenza come i PBDE destino grande preoccupazione anche per l'uomo: concentrazioni elevate sono state determinate nel latte materno e nei tessuti adiposi del seno delle donne (Siddique *et al.*, 2012; Petreas *et al.*, 2011). Tuttavia, gli effetti tossici dei PBDE sono ancora incerti e oggetto di numerosi studi. Ci sono evidenze sulla correlazione tra l'esposizione alle miscele commerciali e l'incremento dei livelli dell'ormone tiroideo T₄ nel sangue (Ding *et al.*, 2017). Danni alla capacità di apprendimento ed alla memoria sono stati associati all'esposizione al congenere PBDE-209, in grado di indurre l'autofagia dei neuroni nell'ippocampo dei feti (Sun *et al.*, 2017).

1.1.5 Policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF)

STRUTTURA E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Le policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e i policloro dibenzofurani (PCDF) sono due classi strutturalmente simili di idrocarburi aromatici alogenati. Queste molecole sono costituite da due anelli benzenici interconnessi da atomi di ossigeno e con grado di clorurazione da 1 a 8. Le combinazioni possibili danno luogo a 75 congeneri per le PCDD e a 135 congeneri per i PCDF (Tabella 1.6). Le due classi di composti si differenziano per la diversa connessione tra gli anelli aromatici, illustrata in Figura 1.8.

Tabella 1.6. Numero di congeneri per classe di omologhi di policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e di policloro dibenzofurani (PCDF; Kulkarni *et al.*, 2011).

Grado di clorurazione	Numero di congeneri	
	PCDD	PCDF
Mono	2	4
Di	10	16
Tri	14	28
Tetra	22	38
Penta	14	28
Esa	10	16
Epta	2	4
Otta	1	1
Totale	75	135

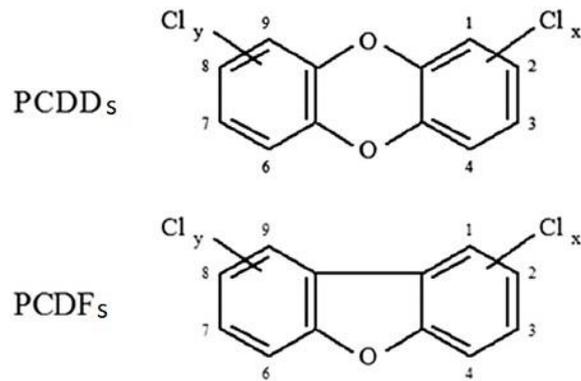


Figura 1.8. Formula di struttura di policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF; Hoogenboom *et al.*, 2015).

PCDD e PCDF sono composti apolari, insolubili in acqua, lipofili e chimicamente stabili. Le loro proprietà variano in base al grado di clorurazione e alla posizione dei sostituenti (Kulkarni *et al.*, 2011).

FONTI ED UTILIZZI

Le principali fonti di emissione di PCDD e PCDF in ambiente possono essere suddivise in tre categorie:

- fonti stazionarie (processi termici, industria chimica);
- fonti diffuse (combustibili fossili, incendi);
- sorgenti secondarie (*biocompost*, fanghi di depurazione).

Le diossine sono sottoprodotti indesiderati della combustione di materiale organico contenente cloro e dell'incenerimento incontrollato di rifiuti urbani, ospedalieri e pericolosi. Emissioni di questi composti possono derivare, inoltre, dalla combustione del carbone, del legno e dei combustibili fossili, come dal fumo delle sigarette. I principali meccanismi di formazione di diossine durante i processi di combustione comprendono reazioni che portano alla sostituzione di radicali, alla ciclizzazione e all'aromatizzazione di molecole a temperature intorno ai 600°C, alla condensazione di precursori di PCDD/F e a reazioni di radicali liberi mediate sulla superficie del particolato atmosferico a temperature maggiori di 300°C. Possono essere considerate fonti stazionarie i processi chimici per la produzione della carta, l'industria petrolchimica, la produzione di pesticidi ed erbicidi clorurati, i processi

metallurgici e il riciclo dei metalli. Fonti remote di tipo naturale sono anche le eruzioni vulcaniche e gli incendi boschivi (Pereira, 2004).

TOSSICITÀ

Diossine e furani hanno cominciato a destare molta preoccupazione a partire dagli Anni Settanta, soprattutto in seguito all'incidente avvenuto a Seveso, in Italia, nel 1976, dove un'esplosione nell'industria chimica ICMESA (*Industrie Chimiche Meda Società Azionaria*) causò la dispersione di una nube tossica contenente diossine su un'area di quasi 3 km². Si manifestarono immediati casi di cloracne ed effetti più a lungo termine come malattie cardiovascolari (Nerin *et al.*, 2014). Il congenere identificato come più pericoloso è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, denominata anche "diossina di Seveso", dalla cui tossicità la WHO ha definito il concetto di fattore di tossicità equivalente (TEF). I valori di TEF sono stati definiti anche per altri 16 congeneri prioritari tra le due classi PCDD e PCDF, che presentino una struttura molecolare simile alla 2,3,7,8-TCDD (Tabella 1.7; WHO, 2005).

Tabella 1.7. Valori del fattore di tossicità equivalente (TEF) per policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF) dati dalla *World Health Organization* (WHO, 2005).

	WHO 2005 TEF
Dibenzodiossine clorurate	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01
OCDD	0.0003
Dibenzofurani clorurati	
2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1

2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
OCDF	0.0003

La pericolosità di composti strutturalmente simili alla 2,3,7,8-TCDD è data dalla planarità delle molecole, che consente l'interazione con il recettore AhR, tramite lo stesso meccanismo descritto precedentemente per i PCB *dioxin-like* ed i PCN. La formula di struttura della 2,3,7,8-TCDD è rappresentata in Figura 1.9.

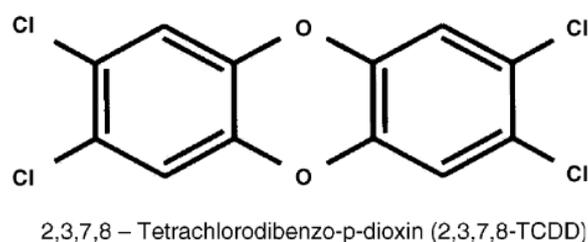


Figura 1.9. Formula di struttura della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (2,3,7,8-TCDD; Schecter *et al.*, 2006).

L'elevata stabilità chimica ha reso diossine e furani inquinanti ubiquitari, presenti in diverse matrici ambientali, quali aerosol, suolo e acque. Le proprietà lipofile hanno inoltre permesso il bioaccumulo di questi composti in pesci, molluschi, uccelli e mammiferi, soprattutto in aree vicine ad industrie chimiche o ad impianti di trattamento dei rifiuti (Kapp Jr., 2014).

1.2 Gli inquinanti emergenti

Si definiscono come inquinanti emergenti le sostanze chimiche o i materiali che rappresentano una reale o percepita minaccia per la salute umana e l'ambiente e per i quali esiste una mancanza di standard comuni in materia sanitaria e ambientale. Un contaminante può essere definito "emergente" anche in seguito alla scoperta di nuove fonti di emissione e nuove vie di esposizione per l'uomo, o di nuovi metodi e tecnologie per la sua determinazione (Murnyak *et al.*, 2011). I contaminanti emergenti includono un'ampia

gamma di composti chimici di sintesi, come sostanze perfluorate, sottoprodotti della disinfezione delle acque, additivi per carburanti, prodotti farmaceutici, microplastiche, nanomateriali e filtri UV, che hanno conosciuto uno sviluppo significativo nella società moderna. Attualmente non si hanno ancora sufficienti informazioni sul comportamento e sul destino ambientale di questi nuovi inquinanti e molti studi devono essere ancora condotti per documentare il potenziale rischio per la salute umana e per gli ecosistemi (Lei *et al.*, 2015).

1.2.1 Le sostanze perfluoroalchiliche (PFASs)

Con il termine “sostanze fluorurate” si identificano composti chimici organici ed inorganici contenenti almeno un atomo di fluoro. Un sottoinsieme della famiglia delle sostanze fluorurate è rappresentato dalle sostanze alifatiche altamente fluorurate che possiedono uno o più atomi di carbonio sui quali tutti gli atomi di idrogeno sono stati sostituiti da atomi di fluoro. Sulla molecola è quindi presente un gruppo perfluoroalchilico C_nF_{2n+1} . Composti di questo tipo vengono definiti con il nome di sostanze poli- e per-fluoroalchiliche, identificate dall’acronimo PFASs (Buck *et al.*, 2011). I PFASs sono una classe di inquinanti emergenti persistenti costituiti da una catena alchilica idrofobica completamente (per-) o parzialmente (poli-) fluorurata e legata ad un gruppo idrofilo ad un’estremità (Arvaniti e Stasinakis, 2015). In Figura 1.10 è riportata la struttura generale di questi composti che, in base alla natura del gruppo X, si suddividono in ulteriori sottoclassi, come gli acidi carbossilici perfluoroalchilici (PFCA, laddove X sia un gruppo carbossilico -COOH) e gli acidi solfonici perfluoroalchilici (PFSA, in cui X è un gruppo solfonico -SO₃H).

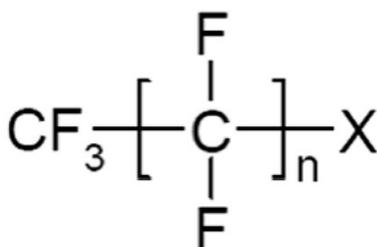


Figura 1.10. Struttura generale dei composti perfluorurati (PFAS; Arvaniti e Stasinakis, 2015).

Grazie alle loro proprietà fisico-chimiche uniche, come l'alta resistenza termica e all'ossidazione, i PFASs sono largamente utilizzati in molte industrie e in applicazioni domestiche: sono presenti nei surfattanti, nelle schiume antincendio e negli imballaggi per gli alimenti. Queste sostanze trovano impiego anche nell'industria tessile, specialmente nell'abbigliamento tecnico, cartiera e conciaria per le loro eccellenti proprietà idrorepellenti (De Voogt, 2006). Recenti studi hanno evidenziato un potenziale rischio per la salute umana dato dall'esposizione ai PFASs, in particolare riguardo ad effetti avversi nella crescita e nel peso alla nascita, a disfunzioni riproduttive, a fenomeni di menopausa precoce nelle donne, a forme tumorali e malformazioni della tiroide (Rahman *et al.*, 2014). L'immissione in ambiente di questi composti avviene tramite fonti dirette, attraverso la produzione e l'utilizzo di materiali che li contengono, e fonti indirette legate alla degradazione di precursori. Una volta rilasciate in ambiente le sostanze polifluoroalchiliche possono essere biodegradate in atmosfera, o in condizioni aerobiche, in acidi carbossilici perfluoroalchilici (PFCA) e acidi solfonici perfluoroalchilici (PFSA), derivati più persistenti che sono stati determinati in diverse matrici quali acqua, aria, alimenti, biota e anche nell'uomo. La provata capacità di bioaccumulo e, quindi, il conseguente pericolo per la salute umana hanno portato all'inclusione del perfluorooottansolfonato (PFOS) nella lista dei POPs della Convenzione di Stoccolma nel 2009 (Arhens, 2011).

I PFASs possiedono un'elevata solubilità in acqua, hanno proprietà sia idrofile, sia idrofobe ed una bassa volatilità, caratteristiche che li hanno resi ubiquitari in ambiente acquatico e riscontrabili anche nell'acqua piovana. È stato dimostrato che la bioconcentrazione ed il bioaccumulo di PFASs negli animali aumentano significativamente all'aumentare della lunghezza della catena fluorurata. Per una data lunghezza della molecola, il bioaccumulo risulta più marcato per i PFSA rispetto ai PFCA, ma dipende fortemente dal tipo di organismo che si considera (Krafft e Riess, 2015). Recentemente, a destare molta preoccupazione è la presenza di queste sostanze nell'acqua potabile: i valori che si determinano nell'acqua sono generalmente bassi, ma i livelli nel sangue possono aumentare se l'esposizione risulta prolungata nel tempo, e raggiungere una concentrazione molto elevata a causa del bioaccumulo.

1.3 Bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione

Lo studio di come i microinquinanti organici entrano e si distribuiscono nella rete trofica è indispensabile per una valutazione scientifica del rischio che queste sostanze chimiche pongono per l'uomo e per l'ambiente. Il potenziale di un contaminante chimico di accumularsi all'interno degli organismi e nella catena alimentare dipende da molte variabili, come le proprietà chimico-fisiche dell'inquinante stesso (lipofilità e stabilità chimica), i fattori ambientali (salinità, temperatura, concentrazione di altri contaminanti, potenziale redox), i fattori biotici (modalità di nutrizione dell'organismo, posizione nella rete trofica, concentrazione lipidica, metabolismo) e la biodisponibilità (meccanismi di trasporto, grado di contaminazione; Hall, 2014).

I meccanismi attraverso i quali i microinquinanti raggiungono gli organismi sono i seguenti:

1. Bioconcentrazione

La bioconcentrazione è il fenomeno per cui una sostanza chimica viene assorbita da un organismo direttamente dall'ambiente in cui vive, solamente tramite la respirazione ed il contatto dermico. Non è compresa quindi l'esposizione attraverso l'alimentazione. Questo processo può essere meglio compreso considerando il bilancio tra il tasso di assorbimento ed il tasso di escrezione che un organismo possiede per una data sostanza. L'escrezione deve tenere conto non solo dell'eliminazione fecale, ma anche di tutte le biotrasformazioni metaboliche che la sostanza in oggetto subisce all'interno dell'organismo e della diluizione legata alla crescita. Quest'ultimo fattore è considerato un processo di pseudo-eliminazione poiché la sostanza chimica non viene di fatto espulsa dall'organismo, ma subisce una diluizione a causa dell'aumento dei volumi dei tessuti. Il grado di bioconcentrazione può essere stimato tramite il fattore di bioconcentrazione (BCF), un semplice rapporto matematico definito come:

$$BCF = \frac{C_B}{C_W}$$

in cui, C_B rappresenta la concentrazione della sostanza chimica nell'organismo in $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ e C_W la concentrazione della stessa sostanza dissolta in acqua in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Questa equazione si assume valida se si suppone di essere in stato stazionario, laddove

entrambe le concentrazioni, C_B e C_W , possano essere considerate stabili nel tempo (Arnot e Gobas, 2006).

2. Bioaccumulo

Il bioaccumulo è il fenomeno per cui una sostanza chimica viene assorbita da un organismo attraverso ogni via di esposizione possibile in un dato ambiente. È compresa quindi l'assimilazione sia tramite la respirazione ed il contatto dermico, sia tramite la nutrizione. Come per la bioconcentrazione, il processo di bioaccumulo è il risultato del bilancio tra l'assimilazione e l'eliminazione del contaminante dall'organismo, con l'aggiunta dell'assunzione indiretta attraverso il cibo. Il grado di bioaccumulo viene espresso tramite il fattore di bioaccumulo (BAF), dato da:

$$\text{BAF} = \frac{C_B}{C_W}$$

dove C_B e C_W rappresentano gli stessi termini visti in precedenza per la bioconcentrazione, con la differenza che il valore di C_B tiene conto anche della concentrazione della sostanza chimica nell'organismo derivante dall'alimentazione. Anche in questo caso, si assume la condizione di stato stazionario. Il BAF può essere espresso sulla base del peso secco, del peso umido e del peso riferito alla sola parte lipidica. Comunemente si utilizza il peso umido dell'organismo, per cui il BAF viene misurato in $\text{L}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (Arnot e Gobas, 2006).

3. Biomagnificazione

La biomagnificazione è il fenomeno che porta una sostanza chimica ad accumularsi e distribuirsi lungo la rete trofica. Si tratta di un caso particolare di bioaccumulo, in cui viene considerata principalmente l'assimilazione di una sostanza tramite la nutrizione (Sbicego, Tesi, A.A. 2013/2014). La biomagnificazione è espressa tramite il fattore di biomagnificazione (BMF):

$$\text{BMF} = \frac{C_B}{C_A}$$

dato dal rapporto tra la concentrazione della sostanza chimica nell'organismo (C_B) e la concentrazione della sostanza nella dieta dell'organismo stesso (C_A) in condizioni di stato stazionario. Queste concentrazioni possono essere espresse sulla base del peso umido o del peso secco. Tuttavia, è preferibile definire il BMF come rapporto di fugacità:

$$\text{BMF} = \frac{f_B}{f_A}$$

che rappresenta direttamente l'incremento dell'attività di una sostanza chimica all'interno di un organismo in relazione all'interazione trofica.

Il potenziale di bioconcentrazione e di bioaccumulo di un composto chimico organico viene spesso confrontato con il coefficiente K_{ow} , indice della lipofilità e dell'idrofobicità della sostanza e di come essa si distribuisce tra la fase organica e la fase acquosa. K_{ow} è inversamente proporzionale alla solubilità in acqua e raggiunge valori, espressi come $\log K_{ow}$, generalmente maggiori di 6 per composti altamente idrofobici (Arnot e Gobas, 2006).

1.4 L'Antartide: l'importanza del continente remoto

Il continente antartico si estende per circa 14 milioni di km^2 ed è ricoperto per il 98% della sua superficie da ghiaccio, con uno spessore medio di 2 km (Figura 1.11). L'Antartide viene comunemente considerata una terra ostile e remota ed il simbolo dell'ultima grande area selvaggia non contaminata dall'uomo. Per molto tempo la sua collocazione geografica e la sua inospitalità ne hanno scoraggiato l'esplorazione, ma a partire dai primi anni del Novecento sempre più persone si sono spinte verso il continente per attività esplorative, di navigazione e di caccia alle balene. La pesca e la caccia hanno portato alcune specie marine antartiche sull'orlo dell'estinzione ed il trasporto e l'introduzione di piante e di specie invertebrate invasive hanno avuto pesanti ripercussioni sulla biodiversità e sul funzionamento degli ecosistemi in molte isole subantartiche (Bargagli, 2008). Dalla seconda metà del secolo scorso, e soprattutto dall'entrata in vigore del Trattato Antartico nel 1961, diversi strumenti legislativi e regolamenti internazionali sono stati redatti allo scopo di preservare e proteggere l'ambiente e le risorse naturali del continente. L'Antartide è da

allora considerata una “riserva naturale dedicata alla pace ed alla scienza”, non oggetto di rivendicazioni territoriali e di cui è riconosciuta l’importanza per la ricerca. La comunità scientifica, infatti, riconosce il continente come un “archivio ideale” di dati necessari per una maggiore comprensione dei processi globali, per lo studio di organismi con caratteristiche ecofisiologiche uniche, data la loro lunga storia evolutiva in un ambiente isolato, e per l’opportunità unica di condurre ricerche astronomiche ed astrofisiche (Bargagli, 2008).

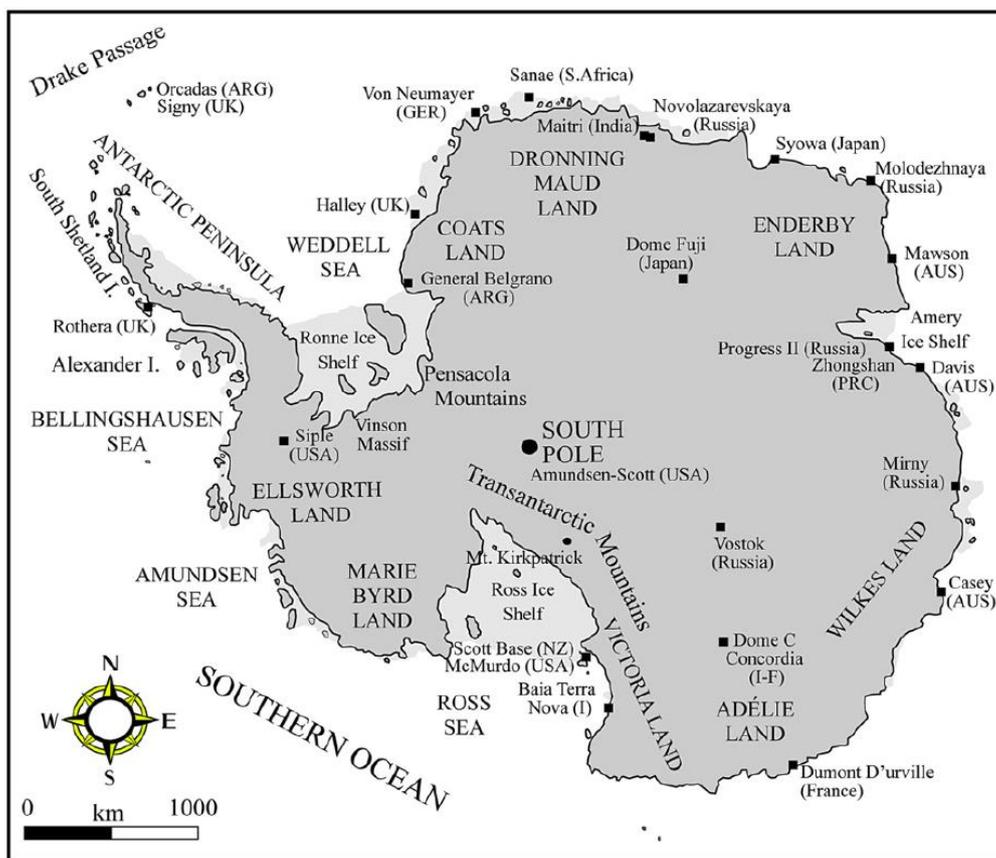


Figura 1.11. Mappa del continente antartico (Bargagli, 2008).

L’Antartide è protetta dall’entrata di masse d’aria e di acqua dalle basse latitudini da barriere naturali date dalla particolare circolazione oceanica ed atmosferica che caratterizza l’area. Tuttavia, la presenza di sostanze inquinanti mai prodotte nel continente, come pesticidi, POPs e gas serra, hanno indicato una stretta correlazione tra l’ambiente antartico ed i processi che avvengono a livello globale in grado di trasportare i contaminanti dall’emisfero boreale fino alle aree remote. Gli inquinanti organici persistenti volatilizzano

dal suolo, dall'acqua e dalla vegetazione, entrando in atmosfera e raggiungendo il continente antartico tramite meccanismi di trasporto a lungo raggio. Nelle regioni polari i POPs condensano e si depositano mentre le rigide temperature ne bloccano o ne riducono l'evaporazione. Questo produce dei livelli di concentrazione molto alti e l'induzione di processi di biomagnificazione, diventati una minaccia anche per la fauna antartica (Bargagli, 2008).

Uno degli aspetti più sorprendenti degli ecosistemi antartici è il contrasto tra l'estremo impoverimento degli ecosistemi terrestri e la ricchezza e l'enorme biodiversità che caratterizza l'ambiente marino. L'Oceano Australe che circonda il continente si estende fino a 2500 km dalle coste antartiche. Le dense masse d'acqua, a temperatura inferiore agli zero gradi (circa -1.9°C), che si formano lungo i margini continentali, si protendono poi verso Nord, distribuendosi nei profondi bacini oceanici e ventilando e raffreddando un'ampia porzione degli oceani globali. A differenza dell'Artico, il ghiaccio marino che circonda l'Antartide in inverno, si scioglie durante la primavera e l'estate. Le condizioni ambientali uniche hanno permesso l'instaurarsi di moltissime specie di organismi marini, sia pelagici, sia bentonici. Le comunità pelagiche includono, oltre a gammaridi, copepodi, chetognati ed altri, il *krill*, principale fonte di cibo per molti pesci, cefalopodi, balene, foche, pinguini ed altri uccelli marini. Le comunità bentoniche comprendono diverse specie endemiche di invertebrati come spugne, tunicati, idroidei, policheti, nemeridi, isopodi, bivalvi e molti altri. In generale, gli organismi marini antartici sono caratterizzati da alti livelli di endemismo, gigantismo, longevità, lenti tassi di crescita, tarda maturazione ed assenza di stadi larvali pelagici. Mentre la rete trofica pelagica si basa sul *krill*, a livello continentale un ruolo fondamentale viene svolto dagli invertebrati bentonici, i quali contribuiscono al trasferimento di contaminanti dal fitoplancton e dai sedimenti superficiali ai pesci, agli uccelli marini nidificanti ed alle foche (Bargagli, 2008).

1.4.1 *Adamussium colbecki*



Figura 1.12. *Adamussium colbecki* (Smith, 1902; <http://afg.biodiversity.aq/species/23-adamussium-colbecki>).

CLASSIFICAZIONE

Regno: *Animalia*

Phylum: *Mollusca*

Classe: *Bivalvia*

Ordine: *Pectinoidea*

Famiglia: *Pectinidae*

Genere: *Adamussium*

Specie: *Adamussium colbecki* (Smith, 1902)

L'*Adamussium colbecki* (Figura 1.12) è l'organismo bivalve più diffuso nell'ambiente costiero antartico ed è stato descritto per la prima volta da Smith nel 1902 presso Franklin Island, nel Mare di Ross. Questa specie è considerata endemica e circumpolare ed è presente principalmente nelle vicinanze di Syowa Station, Stonington Island, McMurdo Sound e nella Baia Terra Nova, dove sono state trovate le popolazioni più numerose ad una profondità tra i 20 e gli 80 m (Chiantore *et al.*, 1998). Con valori di densità e di biomassa estremamente alti (rispettivamente di 60 ind·m⁻² e di 120 g·m⁻² di peso secco) l'*A. colbecki* riveste un ruolo fondamentale nei flussi di energia che intercorrono tra la colonna d'acqua e la comunità bentonica antartica (Cattaneo-vietti *et al.*, 1997). Questo organismo è un mollusco longevo

e con un tasso di crescita molto basso che dipende molto dalle dimensioni degli individui: risulta più elevato negli individui più piccoli (lunghezza della conchiglia <40 mm) con valori medi di $10 \text{ mm}\cdot\text{anno}^{-1}$, rispetto agli $0.8 \text{ mm}\cdot\text{anno}^{-1}$ degli organismi più grandi (Guidetti *et al.*, 2006). Gli individui adulti vivono liberi nella colonna d'acqua, mentre i più giovani si trovano ancorati alle valve degli adulti o a substrati rocciosi superficiali tramite il bisso. La conchiglia presenta degli anelli concentrici ben definiti, solitamente utilizzati per stimare l'età degli individui. Un esempio è illustrato in Figura 1.13, dove si possono notare gli anelli di crescita dal terzo (punto bianco) al settimo, mentre i primi due non sono visibili (Cattaneo-vietti *et al.*, 1997).



Figura 1.13. Fotografia a raggi X di un esemplare di *Adamussium colbecki*. Si distinguono gli anelli di crescita dal terzo (punto bianco) al settimo, mentre i primi due non sono visibili (Cattaneo-vietti *et al.*, 1997).

Le dimensioni medie della conchiglia di questi organismi sono stimate tra i 60 ed i 70 mm, con valori massimi attorno ai 100 mm, indicando una durata media del ciclo di vita di 18 anni (Chiantore *et al.*, 2003). L'*A. colbecki* è una specie dioica che raggiunge la maturità sessuale tra i 5 e i 7 anni di vita, mostrando un ciclo gametogenico annuale. Nella zona del Mare di Ross alcuni studi hanno evidenziato come il raggiungimento della maturità sessuale avvenga principalmente nella tarda estate, probabilmente a causa della più marcata disponibilità di cibo, data dal *bloom* fitoplanctonico del periodo (Chiantore *et al.*, 2002). L'*A. colbecki* è, infatti, un organismo filtratore che si nutre principalmente di sospensioni fitoplanctoniche, diatomee bentoniche, foraminiferi e detriti in generale, filtrando l'acqua con un tasso medio di $3 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (Stockton, 1984). L'importanza ecologica di questa specie per gli ecosistemi antartici è definita dalla sua posizione nella catena trofica e dagli ingenti flussi energetici che caratterizzano questa popolazione. Essendo un organismo sospensivoro, l'*A.*

colbecki rappresenta un legame diretto tra la produzione primaria pelagica ed i predatori bentonici (Heilmayer *et al.*, 2003). Come molte altre specie bivalvi, questo organismo è in grado di accumulare contaminanti nei tessuti: un primo studio condotto in questa direzione da Berkman e Nigro nel 1992 ha mostrato concentrazioni non trascurabili di metalli pesanti, quali Zn, Cd, Cu e Mn, in campioni di *A. colbecki* provenienti dalla Baia Terra Nova, da Swoya Station e da Explorers Cove. Con questo lavoro è stato proposto l'inserimento nel programma di monitoraggio globale "Mussel Watch" dell'*A. colbecki*, in quanto specie chiave degli ambienti costieri antartici. Attualmente non si hanno sufficienti lavori in letteratura che documentino l'effettivo accumulo di POPs in questi organismi. Le poche evidenze lasciano aperte diverse possibilità di indagine e di approfondimento.

1.4.2 La banca campioni ambientali antartici (BCAA)

Il progetto della banca campioni ambientali antartici (BCAA) è nato nel 1994 con lo scopo di raccogliere e classificare campioni provenienti dall'ecosistema antartico da utilizzare per studi futuri. In particolare, la BCAA si propone come strumento per la caratterizzazione chimica dei cambiamenti negli ecosistemi e svolge un ruolo essenziale nella valutazione della contaminazione in Antartide. La BCAA è parte integrante del progetto italiano "Evoluzione e cicli biogeochimici dei contaminanti", che si inserisce nel Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA). Le unità di ricerca sono coordinate dal Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università Ca'Foscari di Venezia e dall'Istituto Superiore di Sanità per quanto concerne il progetto collaterale sulla preparazione di materiali standard di riferimento antartici (*Certified Reference Materials*, CRMs). Le principali finalità della BCAA sono riassumibili come segue (Soggia *et al.*, 2001):

- il controllo retrospettivo dei dati analitici, assicurando che il confronto fra i *trends* temporali di dati possa essere eseguito in tempi differenti grazie a campioni stoccati precedentemente;
- lo studio dei percorsi, del trasporto e dell'accumulo di composti chimici nell'ecosistema antartico;
- l'opportunità per la ricerca di utilizzare nuovi parametri non studiati attualmente;

- la massima accessibilità dei campioni per la ricerca;
- la caratterizzazione chimica dei campioni in collaborazione con altri gruppi di ricerca rilevanti per il PNRA;
- la creazione di una banca dati contenente informazioni sulla conservazione dei campioni, il campionamento, il loro trattamento e la caratterizzazione chimica.

La BCAA è organizzata presso il Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale (DCCI) dell'Università degli studi di Genova ed è dotata di apparecchiature che consentono la conservazione dei campioni antartici sino a temperature di -150°C. I campioni stoccati comprendono diverse matrici ambientali, quali aria e aerosol, sedimenti, suolo, acqua marina e lacustre, neve, ghiaccio e organismi, come *plancton*, *benthos*, *necton*, alghe, muschi e licheni (Soggia *et al.*, 2001).

1.5 Determinazione di POPs e PFASs in matrici biotiche antartiche: lo stato dell'arte

L'ubiquitarietà dei POPs è ormai riconosciuta dalla comunità scientifica e la letteratura riguardante la loro determinazione in diverse matrici ambientali risulta vasta ed importante. Il continente antartico riveste un ruolo fondamentale nello studio dei POPs e dei meccanismi che contribuiscono alla distribuzione di questi contaminanti in un ambiente remoto ed isolato, che non dovrebbe essere affetto da impatti antropici. Tuttavia, è stato ormai provato che il trasporto a lungo raggio, il turismo e le basi di ricerca costituiscono le principali fonti di inquinamento da POPs in diverse matrici ambientali antartiche (Corsolini, 2009; Vecchiato *et al.*, 2015). Gli studi condotti su matrici biotiche in Antartide indagano la presenza di pesticidi ed altri composti organici persistenti nei tessuti di organismi bentonici e pelagici, analizzandone il bioaccumulo ed i potenziali rischi derivanti dalla migrazione di questi inquinanti lungo la catena trofica.

Gli organismi endemici delle zone polari hanno sviluppato alcuni meccanismi per gestire le sostanze estranee provenienti da fonti antropiche, perciò una valutazione dei livelli e della potenziale tossicità dei contaminanti è una via importante per conoscere i processi metabolici e di detossificazione che le specie antartiche, ancora poco studiate, possiedono.

Inoltre, le reti trofiche antartiche sono relativamente semplici e brevi: gli animali ai livelli più alti dipendono da poche specie chiave, come l'aringa antartica (*Pleuragramma antarcticum*; Boulenger, 1902) ed il krill (*Euphasia superba*; Dana, 1850), i quali sono la fonte primaria di cibo per diverse specie di uccelli e di mammiferi marini (Corsolini, 2009). È importante, in un'ottica di monitoraggio dei POPs in Antartide, considerare specie di organismi che trascorrono l'intero ciclo di vita nel continente, senza abitudini migratorie. A questo scopo, alcune specie di pinguini e di foche antartici sono tra gli esemplari più studiati.

Una prima evidenza della presenza di diossine e furani e di PCB *dioxin-like* in biota antartico si ha con uno studio condotto da Kumar *et al.* nel 2002 che mostra livelli significativi di PCDD/PCDF e PCB in campioni di uova di pinguini di Adelia (*Pygoscelis adeliae*; Hombron e Jacquinet, 1841) e di skua (*Stercorarius antarcticus*; Lesson, 1831), raccolti rispettivamente nei periodi 1995-1996 e 1998-1999. Le concentrazioni trovate di PCDD/PCDF nelle uova di pinguino di Adelia, come somma di congeneri, variano da 9.4 a 43 pg·g⁻¹ di peso grasso, con livelli di PCDF maggiori di quelli di PCDD. Le concentrazioni nelle uova di skua mostrano *pattern* simili, seppure con valori più elevati (in media 181 pg·g⁻¹ di peso grasso). I PCB *dioxin-like* sono stati determinati in alte concentrazioni nelle uova di skua (679-2390 ng·g⁻¹ di peso grasso), mentre nelle uova di pinguino di Adelia variano da 11 a 60 ng·g⁻¹ di peso grasso (Kumar *et al.*, 2002). Taniguchi *et al.* nel 2009 riportano valori di concentrazione di PCB e di IPA in campioni di tessuti grassi di tre specie di pinguini antartici (il già citato pinguino di Adelia e i pinguini Chinstrap e Gentoo, rispettivamente *Pygoscelis antarcticus* e *Pygoscelis papua* Forster, 1781) e di skua bruno dell'area di King George Island. I risultati evidenziano concentrazioni molto più alte delle due classi di POPs nei tessuti di skua rispetto ai tessuti dei pinguini, suggerendo come le abitudini migratorie degli skua possano giocare un ruolo importante. Questi uccelli, infatti, sono predatori a lungo raggio che si nutrono per una parte dell'anno al di fuori del continente antartico e ricoprono, inoltre, una posizione più elevata nella catena trofica rispetto ai pinguini (Taniguchi *et al.*, 2009).

Uno degli impatti maggiori riscontrato in ambiente antartico è dato dalla classe di contaminanti dei PBDE: poiché il rischio di incendio in Antartide è estremamente alto a causa dell'atmosfera molto secca, l'utilizzo di ritardanti di fiamma negli edifici delle basi di ricerca è ingente. Diversi studi riportano alti valori di questi composti in molte specie di organismi marini antartici: un lavoro di Cincinelli *et al.* del 2016 mostra un chiaro *trend*

temporale di concentrazioni di PBDE in campioni di *Trematomus bernacchii* (Boulenger, 1902), un organismo sentinella considerato un buon bioindicatore per il monitoraggio. Questo pesce è infatti una specie distribuita in quasi tutti gli ambienti bentonici antartici e può essere facilmente catturato. Inoltre, il *T. bernacchii* vive a stretto contatto con i fondali ed è il principale predatore del mollusco antartico *Adamussium colbecki*. Le concentrazioni di PBDE riportate in questa specie nell'arco temporale 2001-2011 variano tra 0.05-0.35 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$, con il massimo valore registrato nel 2005 (Cincinelli *et al.*, 2016). Significativi livelli di PBDE sono stati determinati in altre specie di pesci antartici, come il planctivoro *Champscephalus gunnari* (Lönnerberg, 1905) ed il pescivoro *Chaenocephalus aceratus* (Lönnerberg, 1906; Strobel *et al.*, 2016).

Pochi lavori riportano l'accumulo di POPs in organismi dei bassi livelli trofici (plancton ed altri invertebrati) e gli esigui risultati risultano generalmente disomogenei tra di loro. Inoltre, non esistono particolari evidenze sul fatto che le concentrazioni di POPs aumentino da un livello trofico al successivo, o dall'organismo più piccolo a quello più grande. Questo può essere dovuto ai differenti periodi di campionamento, che rivestono grande importanza per quanto riguarda il bioaccumulo: lo scioglimento dei ghiacci è considerato la principale fonte di inquinamento nelle regioni polari, in quanto i contaminanti rimasti intrappolati nel ghiaccio vengono rilasciati in mare durante il periodo estivo. Di conseguenza, gli organismi che abitano le acque sotto il *pack* antartico (*krill*, piccole larve ed altri organismi planctonici) accumulano i POPs in quantità maggiori durante i periodi in cui avviene questo fenomeno (Corsolini, 2009). Poiché lo scioglimento dei ghiacci si verifica in momenti diversi in zone differenti, i livelli di inquinanti determinati negli organismi planctonici possono variare sensibilmente in relazione al periodo ed ai siti di campionamento. Alcuni studi dimostrano l'accumulo di pesticidi organo-clorurati nel *krill* di aree vicine ad Elephant Island, nel Mare di Weddell e nel Mare di Ross (Goerke *et al.*, 2004; Cincinelli *et al.*, 2009). Solo pochi articoli riportano valori di POPs in molluschi antartici e negli invertebrati bentonici: la concentrazione di PCB in specie di calamari provenienti dalle isole subantartiche di Falkland è stata stimata in 300 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ di peso umido in uno studio poco recente e riportato nella *review* di Corsolini sui contaminanti industriali nel biota antartico (2009). Nella stessa *review* sono riportate le concentrazioni di PCB anche in campioni di *A. colbecki* con valori tra 0.04 e 0.06 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ di peso umido.

Recentemente, alcuni lavori hanno evidenziato l'accumulo di sostanze perfluoroalchiliche in campioni di sterco e di tessuti di pinguini Papua dei siti antartici di Ardley Island, Neko Bay e Winter Island, raccolti durante una campagna di campionamento condotta nel 2010. I valori presentano livelli tra 95 e 603 ng·g⁻¹ di PFOS, congenere predominante in tutti i campioni (Llorca *et al.*, 2012). Ulteriori ricerche condotte da Schiavone *et al.* nel 2009 mostrano livelli medi di PFOS in campioni di muscoli e di fegato di foca antartica di 1.3 e 9.4 ng·g⁻¹ di peso umido, rispettivamente. Concentrazioni medie dello stesso congenere in campioni di uova di pinguini Gentoo e di Adelia risultano rispettivamente di 0.3 e di 0.38 ng·g⁻¹ di peso umido (Schiavone *et al.*, 2009).

1.6 Obiettivi del lavoro di tesi

Come si evince dallo stato dell'arte, gli studi presenti in letteratura sulla determinazione di POPs e PFASs in matrici biotiche antartiche sono esigui ed i dati risultano disomogenei e poco comparabili. Per questo motivo, è impossibile definire dei *trends* temporali significativi sull'evoluzione della presenza e della distribuzione dei contaminanti nel biota antartico. Inoltre, ad oggi, non esistono ulteriori dati pubblicati sulle concentrazioni di POPs e PFASs in campioni di *Adamussium colbecki*.

Il presente lavoro di tesi, infatti, si propone come prima evidenza della contaminazione da PCB, IPA, PCN, PBDE, PCDD/PCDF e PFASs in campioni di *A. colbecki* provenienti dal sito di Baia Terra Nova, nel Mare di Ross, fornendo dati importanti per futuri studi di biomonitoraggio in area antartica. Oltre alla quantificazione dei contaminanti, in questo lavoro verranno indagati i *trends* temporali dei livelli di concentrazione di POPs nei *pool* di campioni forniti dalla BCAA. L'arco temporale comprende il periodo 1996-2009, in cui sono state condotte diverse campagne di campionamento supportate dal PNRA.

Di seguito vengono descritti i materiali e la strumentazione utilizzata in fase di trattamento preliminare dei campioni ed in fase di analisi strumentale, distinguendo le procedure utilizzate per i POPs e per i PFASs. Infine, vengono esposti i risultati con particolare attenzione ai *trends* temporali ed al significato ambientale che essi possono esprimere.

2 MATERIALI E METODI

Tutti i solventi utilizzati (acetonitrile, alcol isobutilico, cicloesano, diclorometano, etilacetato, isottano, metanolo, *n*-esano e toluene) hanno grado di purezza pesticidi (*Romil Ltd.*, Cambridge, UK). I reagenti impiegati (isobutilcloroformiato e piridina) sono stati acquistati da *Sigma-Aldrich Co.* (Saint Louis, MO, USA) Le soluzioni standard marcate isotopicamente ¹³C per PCB e PCN (EC-1426, EC-1434, EC-4187, EC-4188 ed EC-4189-A) per IPA (CLM-2451, CLM-2477, CLM-2722 e CLM-3757), per PBDE (EO-5101 ed EO-5277), per PCDD e PCDF (EDF-5999 e EDF-8999) e per PFASs (CLM-8005) sono state acquistate da *CIL Inc. (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, USA)*. Le soluzioni standard native di PCB (C-CS-01, C-CS-02, C-CS-03, C-CS-05, PCB-11, PCB-90, PCB-126 e PCB-169), di IPA (PAH-Mix 9), di PCN (ECN-5178), di PBDE (EO-5103), di PCDD e PCDF (EDF-9999-A – CS3) e di PFASs (171468, 177741, 342041, 394459, 406449, 446777 e ML163) provengono da *Accustandard Inc. (New Haven, CT, USA)*, *Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germania)*, *CIL Inc.*, *Sigma-Aldrich Co.* e *A2S Analytical Standards SÀRL (Saint Jean d'Illac, Francia)*, mentre la soluzione standard di acido nonadecanoico (72332) da *Sigma-Aldrich Co.* Le soluzioni di calibrazione PFK e PFTBA sono state acquistate rispettivamente da *Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)* e *Sigma-Aldrich Co.* I materiali certificati di riferimento (*Standard Reference Materials, SRMs*): 2977 (*Mussel Tissue – Organic Contaminants and Trace Elements*), 1974c (*Organics in Mussel Tissue – Mytilus edulis*), 1649b (*Urban Dust*) e NWDX-1 (*Lake sediment – Dioxin and furan congeners*) sono stati prodotti da NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e acquistati da *LabService Analytica S.r.l. (Bologna, Italia)*. La resina che compone la fase stazionaria della colonna di purificazione del sistema Power Process Purification Fractions® proviene da *LabService Analytica S.r.l.*, mentre le colonne in silice neutra del sistema Power-Prep™ da *FMS Inc. (Fluid Management System Inc., Watertown, MA, USA)*. Per concentrare gli estratti è stato impiegato azoto 5.0 con grado di purezza pari a 99.999% (*SAPIO Produzione Idrogeno Ossigeno S.r.l., Monza, Italia*).

La vetreria e i materiali in acciaio e Teflon® utilizzati nel trattamento del campione sono stati lavati con acqua e una soluzione acquosa al 2% (v/v) di detergente Contrad®2000 e, prima dell'impiego, sono stati asciugati con acetone.

2.1 Trattamento preliminare del campione

Il trattamento preliminare del campione si effettua con lo scopo principale di semplificare la matrice contenente gli analiti, in modo da renderla più idonea alla successiva analisi strumentale. Le matrici biologiche sono tra le più difficili da trattare e necessitano di diverse fasi di purificazione con tecniche di cromatografia preparativa che consentano la separazione degli analiti dalle componenti lipidiche che la compongono. Queste ultime comprendono composti ad alto peso molecolare che andrebbero a diminuire, durante l'analisi strumentale, la *performance* della colonna cromatografica e a disturbare il segnale analitico. Per questo motivo una buona fase preparativa risulta fondamentale per la validità dei risultati delle analisi.

2.1.1 Campionamento

Il campionamento di *Adamussium colbecki* è stato condotto tra Gennaio 1996 e Dicembre 2009 durante otto diverse spedizioni di ricerca italiane inserite nel PNRA. Gli esemplari sono stati raccolti nella Baia Terra Nova, un'area di 80 x 30 km localizzata nella parte sud-occidentale del Mare di Ross, delimitata a Nord dalla penisola di Cape Washington e a Sud dalla Drygalski Ice Tongue. Il sito di campionamento è illustrato in Figura 2.1.

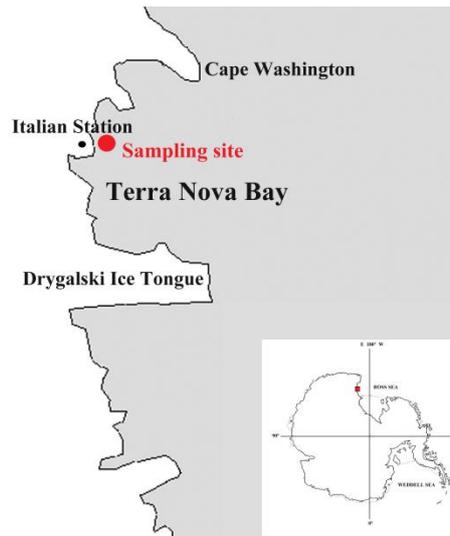


Figura 2.1. Sito di campionamento: 74°40'-74°43' Latitudine Sud – 164°02'-164°08' Longitudine Est (Grotti *et al.*, 2016).

La baia è ricoperta di ghiaccio per almeno 9 mesi l'anno, generalmente dalla fine di Marzo all'inizio di Gennaio.

I campioni sono stati raccolti manualmente da sommozzatori ad una profondità tra i 10 ed i 30 m, sigillati in sacchetti di polietilene e conservati a -80°C nella banca campioni ambientali antartici fino al momento dell'analisi. La lunghezza degli esemplari campionati varia tra 53 - 99 mm, mentre il peso è compreso tra 12.9 - 57.4 g.

2.1.2 Liofilizzazione

I campioni di *A. colbecki* sono stati scongelati a 4°C, misurati e pesati. I tessuti molli sono stati separati dalle valve, lavati con acqua ultrapura per rimuovere eventuali detriti (ELGA LabWater PURELAB®flex system, Veolia Water VWS Ltd., High Wycombe, UK) e liofilizzati. La liofilizzazione è un processo di essiccamento che elimina l'acqua dai tessuti per sublimazione e permette una conservazione a lungo termine dei materiali trattati.

È stato utilizzato un liofilizzatore *Edwards Ltd. Modulyo*® (Crawley, UK) alle condizioni operative di temperatura e pressione di -50°C e 0.5 mbar rispettivamente (Figura 2.2).



Figura 2.2. Liofilizzatore Modulyo®, Edwards Ltd. (Crawley, UK).

Dopo essere stati liofilizzati, i campioni sono stati raggruppati in *pool* di 10 individui ciascuno e preparati per l'analisi di contaminanti organici.

2.1.3 Estrazione

2.1.3.1 Estrazione accelerata con solvente (ASE™)



Figura 2.3. ASE™ 350, Dionex® Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, USA).

L'estrazione accelerata con solvente è un processo automatizzato che utilizza un solvente in condizioni di alta temperatura ed alta pressione. La temperatura elevata aumenta la velocità di desorbimento degli analiti dalla matrice e la loro solubilità nel solvente di estrazione,

mentre l'alta pressione mantiene il solvente in fase liquida, impedendone la vaporizzazione. Lo strumento utilizzato è l'ASE™ 350 (Dionex® Thermo Fisher Scientific Inc.; Figura 2.3): il sistema lavora sotto pressione con flussi di aria ed azoto e permette l'impiego di tre solventi differenti nel medesimo processo, i quali possono essere utilizzati singolarmente o miscelati automaticamente una volta impostato il rapporto volumetrico. Le *vessels* in acciaio, caricate con i campioni, sono poste sul comparto superiore, mentre in quello inferiore si inseriscono le *vials* in vetro di raccolta degli estratti. Si imposta il metodo (temperatura del forno, durata del riscaldamento e numero dei cicli di estrazione) e la sequenza di lavoro (numero e ordine delle *vessels* da trattare) prevedendo, inoltre, dei cicli di pulizia delle linee da alternare ai cicli di estrazione.

2.1.3.2 Estrazione assistita in ultrasuoni

L'estrazione assistita in ultrasuoni è una tecnica di estrazione con solvente accompagnata da sonicazione. I principali vantaggi di tale tecnica rispetto ad altre tecniche automatizzate riguardano i tempi ridotti di estrazione e le minori quantità di solvente impiegate, aspetto che la rende un'alternativa più sostenibile, "green" e a basso costo. Di norma, questo tipo di estrazione viene condotta in bagni ad ultrasuoni che permettono il trattamento di più campioni in un ciclo. Lo strumento impiegato, mostrato in Figura 2.4, è un bagno ad ultrasuoni LABSONIC LBS1 con frequenza di 50 kHz (Falc Instruments S.r.l., Bergamo, Italia).



Figura 2.4. Bagno ad ultrasuoni LABSONIC LBS1, Falc Instruments S.r.l. (Bergamo, Italia).

Il processo di estrazione si basa sul disturbo creato dalle onde ultrasoniche quando vengono trasmesse in un mezzo: se la radiazione viene ripetuta periodicamente, si creano dei cicli di espansione e compressione durante i quali si verifica il fenomeno della cavitazione. La cavitazione è un processo per cui le bolle che si formano nei cicli di espansione implodono e collassano. L'effetto nell'estrazione solido-liquido è la penetrazione del solvente all'interno della matrice e la conseguente erosione meccanica della stessa, che porta anche alla rottura delle particelle e ad un più efficiente trasferimento di massa dal solido al sovente organico. La sonicazione permette quindi uno stretto contatto tra la matrice solida ed il liquido estraente, portando generalmente a buoni recuperi degli analiti (Albero *et al.*, 2015).

2.1.4 Purificazione

2.1.4.1 *Gel Permeation Chromatography (GPC)*



Figura 2.5. Power Process Purification Fraction®[®], LabService Analytica S.r.l. (Bologna, Italia).

La cromatografia ad esclusione dimensionale (*Gel Permeation Chromatography*, GPC o *Size Exclusion Chromatography*, SEC) è una tecnica preparativa di purificazione che separa i componenti di una soluzione in base alle loro differenti dimensioni molecolari. Essa sfrutta, quindi, i principi della cromatografia liquida, utilizzando una fase stazionaria polimerica in

forma di gel ed una fase liquida mobile, generalmente un solvente organico. La miscela contenente gli analiti viene trasportata lungo una colonna dal solvente organico e frazionata secondo le dimensioni dei vari componenti: le molecole di dimensioni maggiori non vengono trattenute dalla fase stazionaria, poiché non riescono a penetrare nei pori delle particelle di gel, ed escono per prime secondo percorsi più brevi. Le molecole di dimensioni inferiori, invece, subiscono un rallentamento dato dalla maggiore interazione con la fase stazionaria e attraversano la colonna in tempi diversi, seguendo percorsi multipli. Lo strumento utilizzato per questo tipo di analisi è il Power Process Purification Fraction® (*LabService Analytica S.r.l.*) illustrato in Figura 2.5. La fase mobile eluente è una miscela etilacetato/cicloesano 1:1 (v/v), mentre la fase stazionaria in colonna è del tipo *Bio-beads S-X3*, un copolimero stirene-divinilbenzene (200-400 mesh).

2.1.4.2 Power-Prep™

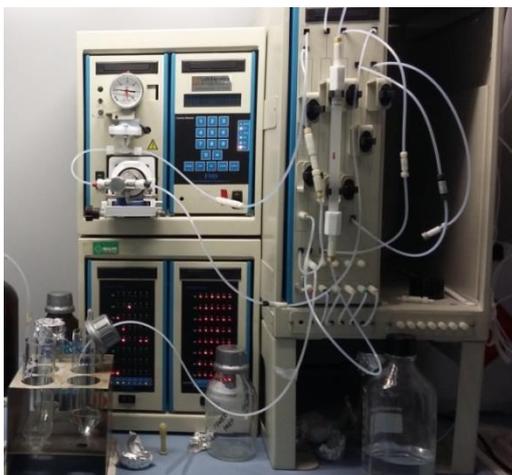


Figura 2.6. Power-Prep™, *FMS Inc.* (Watertown, MA, USA).

Il Power-Prep™ (*FMS Inc.*; Figura 2.6) è un sistema automatizzato, basato sui principi della cromatografia liquida, specifico per la purificazione di campioni ambientali destinati all'analisi in tracce. Il processo prevede l'iniezione della miscela contenente gli analiti in una colonna pre-impaccata in cui sia presente la fase stazionaria, e la successiva eluizione del campione con solvente organico. Per l'analisi simultanea delle diverse classi di POPs indagate, è stata utilizzata una fase stazionaria di silice neutra e, come fase mobile, una

prima aliquota di *n*-esano, seguita da una miscela diclorometano/*n*-esano 1:1 (v/v). Uno strumento di questo tipo garantisce un notevole vantaggio in termini di tempo, eseguendo cicli di eluizione della durata di pochi minuti rispetto alle tecniche di purificazione tradizionali non automatizzate. Inoltre, l'utilizzo di colonne usa e getta è un'ulteriore garanzia della ripetibilità dell'intero processo.

2.1.4.3 Estrazione in fase solida (SPE)

L'estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE) è una tecnica di purificazione del campione basata sull'interazione tra la miscela contenente gli analiti ed una fase solida adsorbente. Il principio guida si colloca a metà strada tra quello classico dell'estrazione liquido-solido e quello della purificazione degli estratti mediante cromatografia liquida preparativa su colonna. La SPE prevede, infatti, l'utilizzo di cartucce contenenti una fase adsorbente, nelle quali viene fatto passare o direttamente il campione in fase acquosa, o il solvente organico, contenente gli analiti, ottenuto da una precedente fase di estrazione. Nel primo caso la maggiore affinità degli analiti per la fase adsorbente permette la loro ritenzione nella cartuccia, ed il passaggio degli interferenti con la fase acquosa durante l'eluizione. Nel secondo caso la maggiore affinità degli interferenti per la fase adsorbente comporterà la loro ritenzione ed il passaggio degli analiti con il solvente organico di eluizione. Laddove gli analiti vengano trattenuti dalla fase adsorbente, sarà necessaria una successiva fase di eluizione degli stessi mediante un solvente organico affine agli stessi.

La SPE permette di ridurre le quantità di solventi utilizzate rispetto ad altre tecniche di *clean-up* e di ottenere estratti altamente purificati. È una tecnica selettiva, in quanto è possibile scegliere tra un'ampia gamma di meccanismi di ritenzione, fasi adsorbenti e solventi di eluizione. Inoltre, consente di estrarre analiti entro un più ampio *range* di polarità rispetto ad altre tecniche (Moret *et al.*, 2014). Sono state impiegate cartucce Oasis® in fase inversa HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balanced*; Waters Corp., Milford, MA, USA) con fase stazionaria composta da 1-vinil-2-pirrolidone e divinilbenzene, e il sistema a vuoto Visiprep™ (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA; Figura 2.7).



Figura 2.7. Visiprep™, Supelco Inc. (Bellefonte, PA,, USA).

2.1.5 Riduzione di volume e pre-concentrazione: Turbovap®II

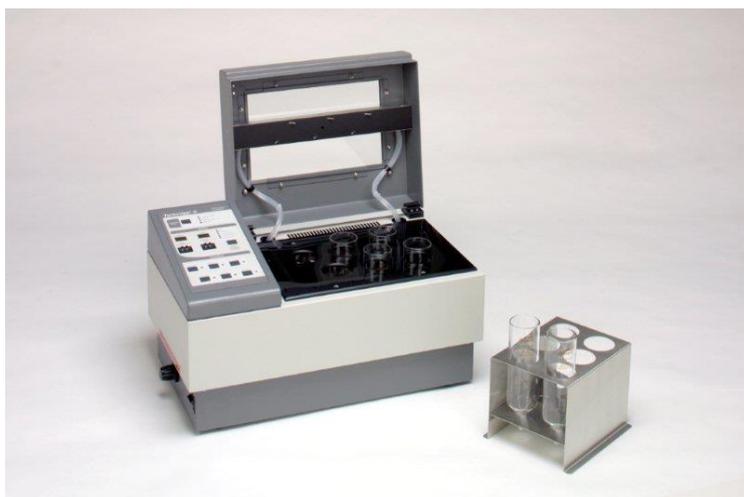


Figura 2.8. Turbovap®II, Caliper Life Science Inc. (Hopkinton, MA, USA).

Il Turbovap®II (Caliper Life Science Inc., Hopkinton, MA, USA; Figura 2.8) è un concentratore automatizzato che sfrutta un flusso di gas inerte, generalmente azoto, per ridurre di volume il campione durante la fase preparativa. Questo sistema utilizza un meccanismo di miscelazione a vortice detto *Gas Vortex Shearing Action*. I ditali impiegati sono in vetro, con volume di 200 mL e provvisti di peduncolo finale. Il flusso di azoto percorre il ditale, contenente il campione, con un movimento ad elica, in modo da pulire in continuo le pareti. Il Turbovap®II utilizza un microprocessore integrato che, automaticamente, regola il tempo

di concentrazione, la temperatura del bagno termostato ed il flusso di gas. Inoltre, un sensore ottico all'interno del bagno termostato permette l'interruzione automatica dello strumento una volta che il livello del campione ha raggiunto il volume finale di 500 μ L. È possibile impostare il funzionamento manuale ed allungare i tempi di concentrazione, nel caso in cui fosse necessario portare il campione a volumi ancora più ridotti.

2.1.6 Procedura analitica per la determinazione di POPs

La procedura utilizzata per il trattamento preliminare dei campioni e, successivamente, per l'analisi strumentale è stata messa a punto e validata da Pizzini *et al.* nel 2016. Il punto di forza di questa metodica analitica riguarda la possibilità di determinare simultaneamente diverse classi di POPs nello stesso campione, risparmiando sui costi e sul tempo di analisi.

È fondamentale, prima di ogni *step* analitico, eseguire un'accurata decontaminazione dei materiali e degli strumenti impiegati. La vetreria (*beckers*, ditali, *vials*, pipette Pasteur e siringhe) è stata decontaminata con tre aliquote di diclorometano e tre aliquote di *n*-esano, allo stesso modo di pinzette, imbuti e spatole in acciaio inossidabile. I filtri in cellulosa impiegati nell'ASE™ sono stati decontaminati per immersione in diclorometano e *n*-esano. Le *vessels* dell'ASE™, con i loro tappi e filtri in acciaio inossidabile, essendo i primi materiali a venire in contatto con i campioni, sono stati sottoposti a decontaminazione più spinta in ultrasuoni, con 6 cicli da 5 minuti ciascuno, di cui 3 in diclorometano e 3 in *n*-esano. I materiali più delicati ed in Teflon® (*o-rings* dell'ASE™, tappi delle *vials*, filtri del sistema GPC, dadi, *frits* e siringa del Power-Prep™) sono stati decontaminati utilizzando solo *n*-esano, in quanto il diclorometano risulta più aggressivo su questo tipo di materiali. I capillari delle Transferpettor® (*BrandTech Scientific Inc.*, Essex, CT, USA) sono stati decontaminati mediante lavaggi in diclorometano e in *n*-esano. Lo stantuffo, essendo in Teflon®, è stato risciacquato solamente con *n*-esano.

Ogni strumento prevede uno specifico programma di pulizia delle linee: per l'ASE™ sono stati impostati 6 cicli di lavaggio da 15 mL di solvente ciascuno (3 cicli in toluene e 3 cicli in

miscela diclorometano/*n*-esano 1:1 (v/v)) da eseguire tra una sequenza analitica e la successiva. La pulizia del sistema GPC prevede un primo lavaggio di 15 minuti in miscela etilacetato/cicloesano 1:1 (v/v), con flusso a 1 mL·min⁻¹ e con la valvola a sei vie impostata in modalità *load*. In seguito è stato eseguito un successivo lavaggio di 15 minuti, identico al precedente, ma cambiando la posizione della valvola, in modo da consentire la pulizia di tutte le vie dello strumento. A seguire si effettuano 2 iniezioni di aria, 2 iniezioni da 5 mL ciascuna di miscela etilacetato/cicloesano 1:1 (v/v) e 2 iniezioni finali di aria per una pulizia accurata di tutte le linee strumentali e la rimozione di eventuali residui al loro interno. Il programma di lavaggio del Power-Prep™, infine, prevede tre cicli da 50 mL in miscela diclorometano/*n*-esano 1:1 (v/v) alternati a tre cicli da 50 mL in *n*-esano.

Di ogni campione liofilizzato ed omogeneizzato è stata prelevata un'aliquota di circa 0.5 g (pesata analitica) ed è stata caricata in *vessel* da 22 mL per l'estrazione all'ASE™. La preparazione delle *vessels* ha compreso l'aggiunta ai campioni, dopo accurata decontaminazione, di solfato di sodio anidro (*Sigma-Aldrich Co.*), per eliminare eventuale umidità residua, e di terra di diatomee e sabbia di Ottawa come materiali di supporto (*Applied Separations Inc.*, Allentown, PA, USA). Prima dell'estrazione, ad ogni campione è stata aggiunta una quantità nota di standard interni marcati ¹³C per PCB, IPA, PCN, PBDE e PCDD/PCDF. L'estrazione è stata eseguita con tre cicli della durata di 5 minuti ciascuno in miscela diclorometano/*n*-esano 1:1 (v/v), alla temperatura di 100°C e alla pressione di 100 bar (60% *refill* e 90 secondi di *purge*). Gli estratti sono stati raccolti in *vials* di vetro e trasferiti in ditali, anch'essi di vetro, per una prima riduzione di volume in Turbovap®II a 23°C, fino a raggiungere i 500 µL. Per la successiva fase di purificazione è stato necessario effettuare un cambio di solvente, in quanto il sistema GPC utilizza una miscela etilacetato/cicloesano 1:1 (v/v). Questa operazione ha implicato quindi un'ulteriore concentrazione del campione a 500 µL prima del caricamento diretto nelle linee dello strumento. La purificazione in sistema GPC ha previsto un ciclo da 43 minuti in miscela etilacetato/cicloesano 1:1 (v/v) con flusso di 1 mL·min⁻¹. Dopo aver scartato i primi 23 mL in cui eluisce la fase lipidica del campione, i successivi 20 mL di eluato sono stati raccolti in ditale e sottoposti nuovamente a riduzione di volume a 23°C fino al raggiungimento di 500 µL. Prima dell'ulteriore purificazione in Power-Prep™, è stato necessario un secondo cambio di solvente in *n*-esano con successiva riduzione di volume. Il caricamento del campione in

Power-Prep™ è avvenuto direttamente in colonna di silice neutra con 6 g di fase stazionaria, tramite siringa specifica ed il programma di purificazione ha previsto un ciclo da 30 mL di *n*-esano, seguiti da 30 mL di miscela diclorometano/*n*-esano 1:1 (v/v). L'eluato, raccolto in ditale, è stato sottoposto alla riduzione di volume finale a 23°C fino a raggiungere i 100 µL, aggiungendo 100 µL di isotano in funzione di *keeper* per impedire l'eventuale evaporazione del campione durante quest'ultima concentrazione spinta. Prima del trasferimento in *vial*, al campione sono stati aggiunti gli standard interni marcati ¹³C di recupero in quantità nota. Tutte le aggiunte specifiche sono state effettuate con apposite Transferpettor®. Le *vial* sigillate sono state conservate a basse temperature fino all'analisi strumentale.

2.1.7 Procedura analitica per la determinazione di PFASs

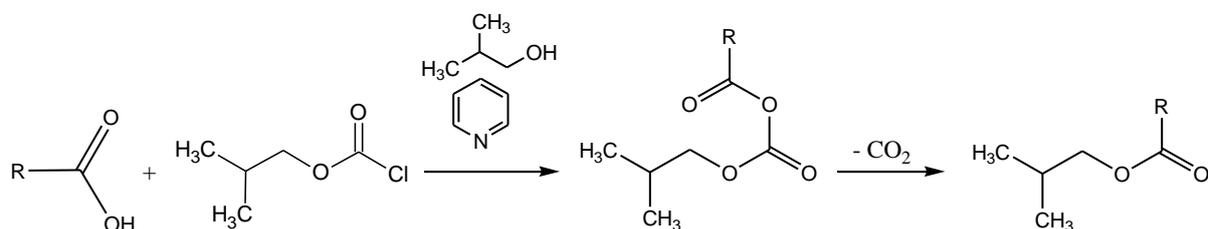
Per la determinazione delle diverse classi di PFASs le metodiche analitiche presenti in letteratura prevedono l'utilizzo di strumentazione HPLC/MS-MS (cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a spettrometria di massa *tandem*), date le caratteristiche di idrosolubilità e scarsa volatilità di tali analiti. Queste procedure, però, seppur valide e analiticamente robuste, richiedono costi di analisi molto più elevati se paragonati all'impiego di una strumentazione di comune utilizzo come la GC/MS (gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa). La principale sfida analitica che si è inteso affrontare, dunque, è stata la determinazione strumentale di tali inquinanti mediante l'utilizzo di GC/MS in seguito a derivatizzazione degli analiti. La procedura seguita è stata messa a punto con riferimento alla letteratura scientifica esistente in merito. In particolare, alcuni lavori di Dufková *et al.* (2009; 2012) propongono una procedura di esterificazione dei PFCA mediante l'impiego di alchilcloroformiati.

Anche in questo caso è stata eseguita un'accurata decontaminazione dei materiali e degli strumenti impiegati. Particolare attenzione è stata posta nell'evitare l'utilizzo di materiale di laboratorio a base di polimeri fluorurati, al fine di ridurre le possibili contaminazioni.

Di tre campioni *target*, liofilizzati ed omogeneizzati, è stata prelevata un'aliquota di circa 0.3 g (pesata analitica) ed è stata trasferita in *vials* da 22 mL. Prima dell'estrazione, ad ogni

campione è stata aggiunta una quantità nota di standard interno marcato ^{13}C : acido perfluorottanoico (PFOA). I campioni sono stati estratti a temperatura ambiente con 10 mL di metanolo, per 10 minuti, in bagno ad ultrasuoni e, successivamente, centrifugati per 3 minuti a $3000 \text{ giri}\cdot\text{min}^{-1}$ in una centrifuga Rotina 380 (*Hettich Lab Technology GmbH & Co.KG*, Tuttlingen, Germania). Sono stati effettuati tre cicli estrattivi di questo tipo, prelevando ogni volta il surnatante e trasferendolo in ditali di vetro per la riduzione di volume in Turbovap®II, effettuata a 35°C fino a raggiungere i $500 \mu\text{L}$. Prima della fase di purificazione, il campione è stato diluito in 5 mL di acqua ultrapura secondo un rapporto 1:100 (v/v). Il metodo di purificazione utilizzato in questo lavoro ha previsto l'utilizzo di cartucce SPE con 200 mg di fase adsorbente, condizionate con 6 mL di metanolo e, successivamente, 10 mL di acqua ultrapura. Il campione è stato caricato nella cartuccia con flusso di $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e, dopo aver scartato l'eluato e lasciato asciugare la fase stazionaria, gli analiti sono stati eluiti con 5 mL di metanolo, raccolti in ditale, portati a secco a 35°C e ripresi con $500 \mu\text{L}$ di acetonitrile.

Come accennato in precedenza, gli analiti di interesse sono composti altamente polari e poco volatili, caratteristiche non ottimali per l'analisi gascromatografica, che rendono fondamentale l'introduzione di uno *step* di derivatizzazione. Questo processo porta alla conversione degli analiti in molecole più volatili e meno polari tramite reazioni chimiche studiate allo scopo. In particolare, l'utilizzo di isobutilcloroformiato in presenza di alcol isobutilico e piridina come catalizzatore, ha portato alla conversione degli analiti (acidi carbossilici), nei corrispondenti isobutilesteri secondo la seguente reazione:



Un'aliquota dei campioni ripresi in acetonitrile è stata trasferita in *vial* di vetro trasparente, a cui sono stati aggiunti, nell'ordine: una quantità nota di standard interno di recupero (acido nonadecanoico), $4 \mu\text{L}$ di piridina, $8 \mu\text{L}$ di alcol isobutilico e $10 \mu\text{L}$ di isobutilcloroformiato, fino ad ottenere un volume finale di $200 \mu\text{L}$. I campioni sono stati poi posti in bagno ad ultrasuoni per 20 secondi e lasciati a riposo per 8 minuti. Dopo l'aggiunta

di 200 μL di *n*-esano, è stata eseguita un'ulteriore sonicazione di 1 minuto allo scopo di favorire la ripartizione degli analiti derivatizzati dall'acetonitrile al *n*-esano, solvente più leggero, più affine agli esteri ottenuti e più adatto all'analisi gascromatografica. Sono stati prelevati, infine, 100 μL di surnatante e trasferiti in *vial* ambrate per l'analisi strumentale.

I campioni utilizzati per le analisi di PFASs sono stati scelti sulla base di una serie di considerazioni tecniche e metodologiche: come accennato in precedenza, l'analisi di tale classe di inquinanti è stata condotta allo scopo di testare una nuova metodica analitica. I dati riportati successivamente in questo lavoro di tesi, dunque, hanno natura puramente qualitativa. Trattandosi infatti delle prime prove esplorative effettuate in tale direzione, si è deciso di utilizzare un numero minore di campioni di *A. colbecki*, rispetto a quelli impiegati per la determinazione quantitativa delle altre classi di analiti. La scelta specifica dei tre campioni *target* è stata fatta, inoltre, in base alle ristrettezze imposte dal materiale disponibile, il quale non è risultato sufficiente per un approccio metodologico completo.

2.2 Analisi strumentale

2.2.1 HRGC/LRMS con analizzatore a quadrupolo

La determinazione di PCB, IPA e PCN è stata condotta in un'unica corsa analitica con gascromatografo ad alta risoluzione (HRGC) *Hewlett Packard – Agilent 6890 Series GC System* equipaggiato con colonna capillare in silice fusa con fase stazionaria in (5%-fenil)-metilpolisilossano (HP-5ms, diametro interno da 0.25 mm e spessore del film di 0.25 μm ; *Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA, USA) della lunghezza di 30 m. Ad esso è accoppiato uno spettrometro di massa a bassa risoluzione (LRMS) con analizzatore a quadrupolo (*Agilent 5973 inert Mass Selective Detector; Agilent Technologies Inc.*; Figura 2.9). La determinazione di PFASs è stata condotta con il medesimo strumento.



Figura 2.9. Hewlett Packard – Agilent 6890 Series GC System accoppiato ad Agilent 5973 inert Mass Selective Detector (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

Dopo l'iniezione il campione viene vaporizzato all'interno del *liner* e trasportato dalla fase mobile, costituita da un flusso di elio 5.5 (*carrier gas*) con grado di purezza pari a 99.9995% (SAPIO Produzione Idrogeno Ossigeno S.r.l.) in testa alla colonna dove ricondensa. La separazione cromatografica avviene grazie ad un aumento progressivo e graduale della temperatura che consente il trasporto in colonna dei diversi componenti del campione in base al loro punto di ebollizione. La ionizzazione ha luogo nella sorgente ad impatto elettronico (EI) dello spettrometro di massa, in cui un filamento di tungsteno riscaldato in condizioni di vuoto emette un fascio di elettroni che provoca la frammentazione dei composti. Si generano quindi particelle cariche positivamente, le quali vengono poi accelerate tramite una differenza di potenziale (70 eV) e convogliate nell'analizzatore tramite un sistema di lenti focalizzatrici. L'analizzatore consiste in un quadrupolo, formato da quattro barre parallele e diametralmente opposte, a cui sono applicati due potenziali: uno continuo e costante ed uno a radiofrequenza, che varia facendo invertire la carica delle barre. 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 (Figura 2.10).

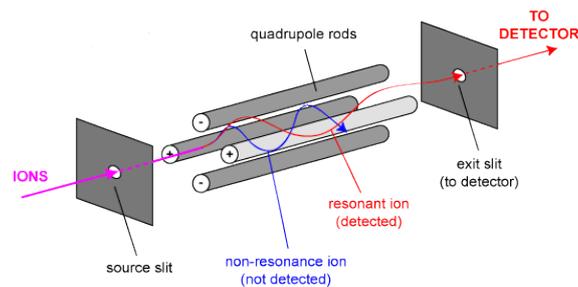


Figura 2.10. Illustrazione dell'analizzatore a quadrupolo (<http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html>).

Questo tipo di analizzatore separa gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z). Infatti, solamente gli ioni con una massa tale da poter mantenere una traiettoria stabile riescono ad attraversare il quadrupolo e raggiungere il rivelatore. Quest'ultimo è un elettromoltiplicatore che ha la funzione di amplificare la corrente ionica e di restituire il segnale analitico. Le analisi sono state condotte in modalità di acquisizione SIM (*Selected Ion Monitoring*). La calibrazione dello strumento viene effettuata periodicamente tramite una sostanza di riferimento: la perfluorotributilammina (PFTBA).

2.2.2 HRGC/HRMS con analizzatore a doppia focalizzazione

Per l'analisi di PBDE e PCDD/PCDF è stato utilizzato un gascromatografo ad alta risoluzione (HRGC) *Hewlett Packard – Agilent 6890 Series GC System* accoppiato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (HRMS) a doppia focalizzazione (Thermo Finnigan MAT 95 XP, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, USA; Figura 2.11). Il gascromatografo è stato equipaggiato con colonne capillari HP-5ms (*Agilent Technologies Inc.*) della lunghezza di 15 m per l'analisi di PBDE, e di 60 m per la determinazione di PCDD/PCDF.



Figura 2.11. Sistema HRGC/HRMS con analizzatore a doppia focalizzazione.

Anche in questo caso gli analiti, in uscita dal gascromatografo, vanno incontro a ionizzazione nella sorgente ad impatto elettronico dello spettrometro di massa (45 eV). Gli ioni positivi vengono convogliati tramite un sistema di lenti focalizzatrici nel settore magnetico dello strumento. La selezione degli ioni avviene in base al loro rapporto massa/carica (m/z) ed all'intensità del campo magnetico a cui sono sottoposti. La forza di Lorentz impone alle particelle un moto circolare, il cui raggio è proporzionale alla massa delle particelle stesse. Solamente gli ioni con un determinato rapporto m/z avranno una traiettoria uguale alla curvatura del tubo di volo, riuscendo così ad attraversare il settore magnetico e a raggiungere il filtro elettrostatico. In quest'ultimo avviene un'ulteriore selezione sulla base dell'energia cinetica. Lo schema di funzionamento del MAT 95 XP è rappresentato in Figura 2.12.

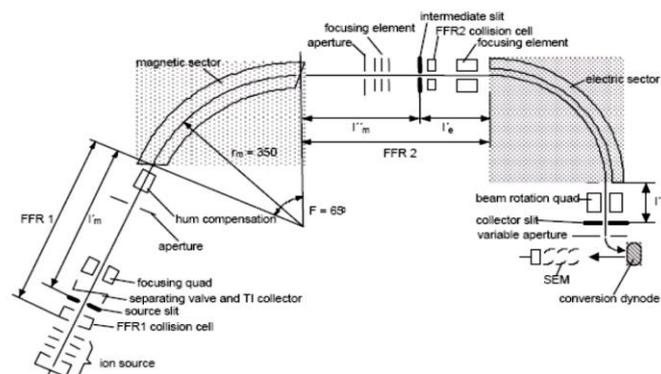


Figura 2.12. Schema di funzionamento dello spettrometro di massa a doppia focalizzazione Thermo Finnigan MAT 95 XP, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA).

Il potere risolutivo di questo strumento arriva a valori maggiori di 60'000. La risoluzione è indice della qualità dello strumento ed è definita dal rapporto:

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

in cui Δm rappresenta la differenza tra le masse di due ioni i cui picchi si sovrappongono al massimo per il 10%, mentre 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, quindi, di distinguere due ioni aventi masse simili.

L'acquisizione viene effettuata in modalità MID (*Multiple Ion Detection*) che permette di impostare le masse esatte degli ioni di interesse. In contemporanea avviene la calibrazione in continuo tramite l'acquisizione di due masse (*Lock mass* e *Cali mass*) specifiche della sostanza calibrante. Oltre alla PFTBA, impiegata nella determinazione di PCDD/PCDF, è stato utilizzato il perfluorokerosene (PFK), il quale calibra lo strumento su un *range* di masse più ampio (fino a 800 uma), necessario per composti ad alto peso molecolare, come i PBDE.

2.2.3 Condizioni di analisi

ANALISI DI PCB, IPA E PCN

Numero di analiti: 127 PCB, 16 IPA e 6 PCN

Gascromatografo

Modalità iniettore: *Splitless*

Temperatura iniettore: 260°C

Flusso *carrier gas*: 1.2 mL·min⁻¹

Rampa di temperatura: 50°C per 5 min; 5°C·min⁻¹ fino a 160°C; 3°C·min⁻¹ fino a 260°C con 15 min di statica

Durata della corsa: 75 min

Post run: 2 min a 305°C

Spettrometro di massa

Sorgente: EI a 70 eV

Temperatura sorgente: 230°C

Temperatura quadrupolo: 150°C

Temperatura *transfer line*: 260°C

Calibrante: PFTBA

ANALISI DI PBDE

Numero di analiti: 14

Gascromatografo

Modalità iniettore: *Splitless*

Temperatura iniettore: 290°C

Flusso *carrier gas*: 1.0 mL·min⁻¹

Rampa di temperatura: 100°C per 2 min; 19°C·min⁻¹ fino a 255°C con 2 min di statica; 20°C·min⁻¹ fino a 310°C con 8 min di statica

Durata della corsa: 23 min

Post run: 17 min a 310°C

Spettrometro di massa

Sorgente: EI a 45 eV

Temperatura sorgente: 280°C

Temperatura *transfer line*: 295°C

Calibrante: PFK

ANALISI DI PCDD/PCDF

Numero di analiti: 7 PCDD e 10 PCDF

Gascromatografo

Modalità iniettore: *Splitless*

Temperatura iniettore: 290°C

Flusso *carrier gas*: 1.2 mL·min⁻¹

Rampa di temperatura: 150°C per 1 min; 5°C·min⁻¹ fino a 200°C; 3°C·min⁻¹ fino a 235°C con 10 min di statica; 12°C·min⁻¹ fino a 290°C con 11 min di statica

Durata della corsa: 48 min

Post run: 39 min a 290°C

Spettrometro di massa

Sorgente: EI a 45 eV

Temperatura sorgente: 290°C

Temperatura *transfer line*: 295°C

Calibrante: PFTBA

ANALISI DI PFASs

Numero di analiti: 6 PFCA

Gascromatografo

Modalità iniettore: *Splitless*

Temperatura iniettore: 250°C

Flusso *carrier gas*: 1.0 mL·min⁻¹

Rampa di temperatura: 40°C per 1 min; 4°C·min⁻¹ fino a 76°C; 15°C·min⁻¹ fino a 166°C con 1 min di statica

Durata della corsa: 17 min

Post run: 8 min a 305°C

Spettrometro di massa

Sorgente: EI a 70 eV

Temperatura sorgente: 230°C

Temperatura quadrupolo: 150°C

Temperatura *transfer line*: 300°C

Calibrante: PFTBA

2.3 Quantificazione

La quantificazione degli analiti è stata eseguita utilizzando degli standard interni e la tecnica della diluizione isotopica. Gli standard interni sono composti marcati ^{13}C il cui comportamento è del tutto analogo ai corrispondenti composti nativi durante tutte le fasi di trattamento del campione. Durante la fase preparativa, perdite di analita sono inevitabili e l'utilizzo di standard interni marcati isotopicamente, aggiunti in quantità nota, permette la loro quantificazione in base al confronto delle aree dei picchi cromatografici. Inoltre, lo spettrometro di massa riesce a distinguere i composti marcati isotopicamente dai composti nativi, grazie al loro diverso rapporto massa/carica (m/z).

La sensibilità strumentale, però, mostra delle variazioni nei confronti dei singoli congeneri e risulta pertanto necessario correggere la risposta dello strumento con delle soluzioni standard contenenti tutti i composti, nativi e marcati isotopicamente, a concentrazione nota, al fine di ottenere un fattore di risposta strumentale per ogni analita. Queste soluzioni vengono iniettate nelle stesse condizioni di lavoro impiegate per i campioni. Dal confronto tra le aree dei picchi si ottengono i valori di concentrazione corretti.

Il valore dei fattori di risposta (FR) viene calcolato tramite la formula:

$$FR_i = \frac{A_i}{A_m} \cdot \frac{C_m}{C_i}$$

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 risulta tanto più corretto, tanto più i valori dei fattori di risposta congenere-specifici tendono a 1. La concentrazione degli analiti si ottiene rapportando le aree dei picchi ai fattori di risposta ed al peso del campione, tramite la formula:

$$C_i = \frac{A_i}{A_m} \cdot \frac{Q_m}{FR_i} \cdot \frac{1}{P_c}$$

in cui,

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 poter quantificare le perdite di analita in fase di trattamento del campione è necessario aggiungere degli standard interni a monte e a valle dell'intero processo. Le soluzioni aggiunte a valle prendono il nome di standard interni di recupero, tramite i quali è possibile calcolare la resa percentuale del metodo (R%):

$$R\% = \frac{A_m}{A_r} \cdot \frac{Q_r}{Q_m} \cdot \frac{1}{FR} \cdot 100$$

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.

Le soluzioni di standard interni impiegate sono illustrati in Allegato A.

2.4 Qualità del dato

2.4.1 Accuratezza e precisione

Accuratezza e precisione della metodica analitica sono state testate analizzando diversi materiali certificati di riferimento. Per tali materiali, il NIST fornisce i valori di riferimento con cui confrontare i valori calcolati e stimare l'accuratezza della misura, cioè il grado di concordanza tra i due valori. La precisione, intesa come ripetibilità, permette invece una stima del grado di concordanza tra diverse repliche dello stesso campione nelle medesime condizioni di analisi. L'accuratezza viene espressa tramite l'errore relativo (E_r) rispetto al valor medio certificato, mentre la precisione tramite la deviazione standard relativa percentuale (RSD%) delle misure replicate.

Per PCB, IPA e PBDE sono stati analizzati campioni di circa 0.5 g di SRM liofilizzato *Mussel Tissue 2977*. Poiché non sono disponibili valori di concentrazione certificati per i PCN, è stato necessario fortificare la matrice con uno *spike* di soluzione standard contenente i composti nativi di quella classe di analiti. Per il PCB-11 accuratezza e precisione sono state stimate analizzando, tra i congeneri certificati dal NIST nell'SRM 2977, solamente quelli con grado di clorurazione più vicino al congenere di interesse (Di- e Tri-cloro bifenili), poiché non sono disponibili valori certificati per il PCB-11 in matrice biotica. Per PCDD e PCDF accuratezza e precisione sono state testate su due diversi SRM, *Urban Dust 1649b* e *Lake Sediment NWDX-1*. La ragione di questa scelta deriva dalla mancanza di materiali certificati di riferimento per PCDD e PCDF in matrice biotica. Un'accurata analisi di entrambi i materiali consente di avere comunque una buona stima della validità del metodo. La matrice di sedimento certificata risulta quella con caratteristiche più simili alla matrice di analisi di questo lavoro. Il test condotto anche sulla matrice *Urban Dust*, molto diversa dalla matrice biotica dei campioni reali, ha permesso di verificare ulteriormente la robustezza del metodo. Sono stati analizzati circa 0.3 g di SRM per ogni analisi effettuata. Per i PFASs, infine, le analisi sono state condotte a scopo qualitativo e di sviluppo di una nuova metodica analitica, come verrà descritto nel dettaglio nel paragrafo 3.6. Non verranno pertanto qui riportate informazioni relative alla qualità del dato per tali analiti.

Per ognuna delle matrici indagate, sono state eseguite 3 diverse repliche. I valori medi di Er e di RSD% per le diverse classi di composti sono riportati in Tabella 2.1, mentre il confronto tra i valori certificati NIST ed i valori calcolati per le tre repliche dei diversi SRM si può evincere dai grafici riportati di seguito (Figure 2.13 - 2.29). I valori di concentrazione riportati sono tutti in peso secco ad eccezione dei grafici relativi ai PCN, in cui vengono indicati i nanogrammi assoluti con cui è stata fortificata la matrice.

Tabella 2.1. Valori medi dell'errore relativo (Er) e della deviazione standard relativa percentuale (RSD%) per le diverse classi di analiti determinate in materiali certificati di riferimento.

	Er	RSD%
PCB	0.33	2.5%
PCB-11	-*	5.2%
IPA	0.32	8.6%
PCN	0.04	3.9%
PBDE	-	5.4%
PCDD/PCDF**	-	6.7%
*Tutti i valori di concentrazione calcolata risultano compresi nell'intervallo $\pm\sigma$		
**I valori si riferiscono al materiale certificato di riferimento NWDX-1.		

PCB

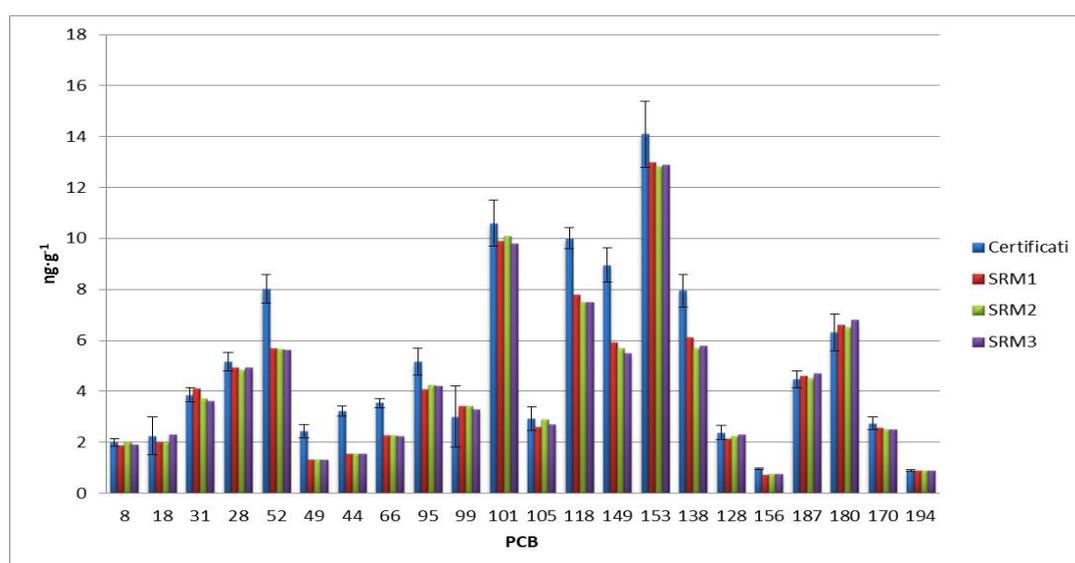


Figura 2.13. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati di policoro bifenili (PCB) in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*.

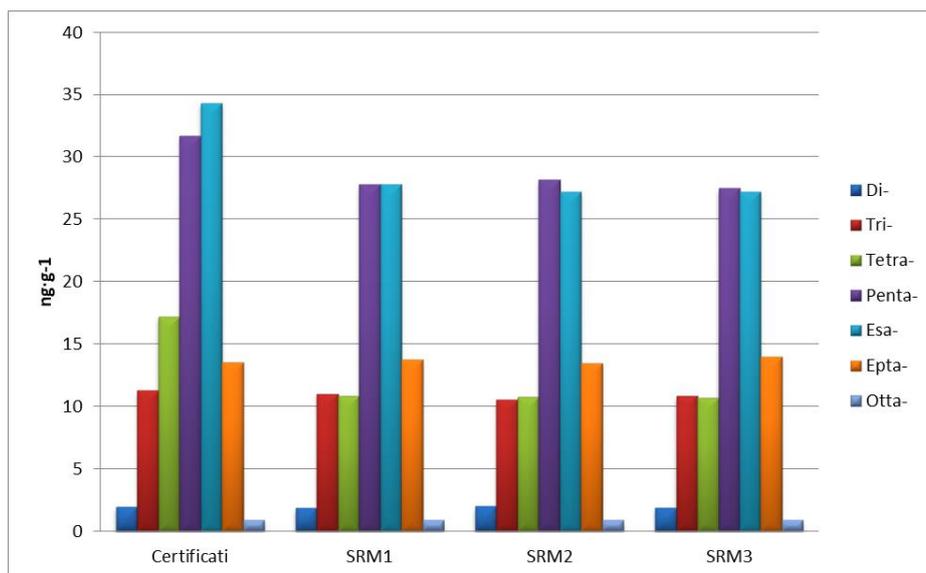


Figura 2.14. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology (NIST)* e i valori calcolati di policloro bifenili (PCB), suddivisi per classi di omologhi, in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*.

In generale, si riscontra per i PCB un sistematico errore di sottostima, più marcato nel caso della classe di congeneri Tetra-clorurati, nonostante il 59% dei valori risultino compresi nell'intervallo $\pm\sigma$. L'errore relativo varia da un minimo di 0.19 ad un massimo di 0.520, entrambi riscontrati per un solo congenero, il PCB-95 ed il PCB-44 rispettivamente. I valori di RSD% variano tra 0.3% per il PCB-194 e 8.8% per il PCB-18.

PCB-11

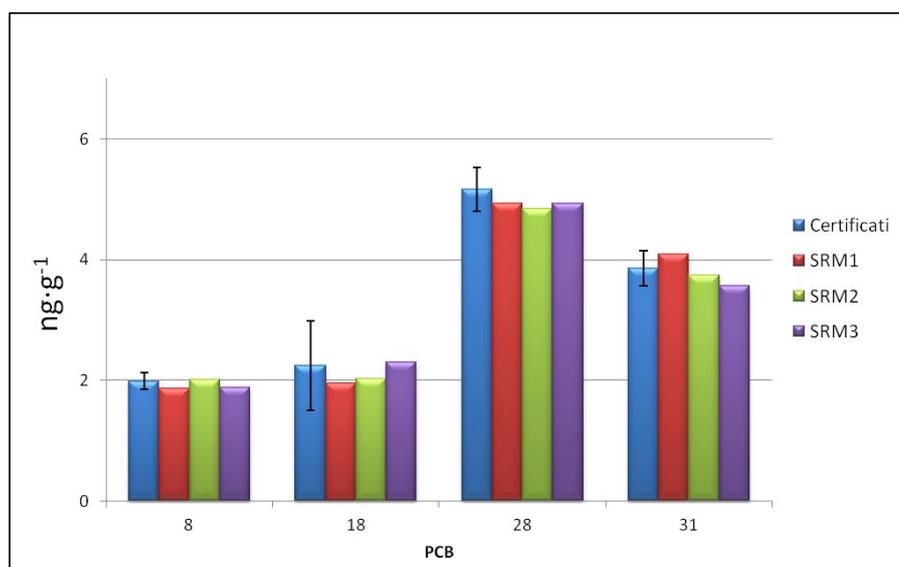


Figura 2.15. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology (NIST)* e i valori calcolati di policloro bifenili (PCB) in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*.

Come accennato in precedenza, accuratezza e precisione per il PCB-11 sono state stimate sulla base dei congeneri PCB-8, PCB-18, PCB-28 e PCB-31 dell'SRM 2977. Tutti i valori di concentrazione calcolata risultano compresi nell'intervallo $\pm\sigma$, ed i valori di RSD% variano da un minimo di 1.1% per il PCB-28, ad un massimo di 8.8% per il PCB-18.

IPA

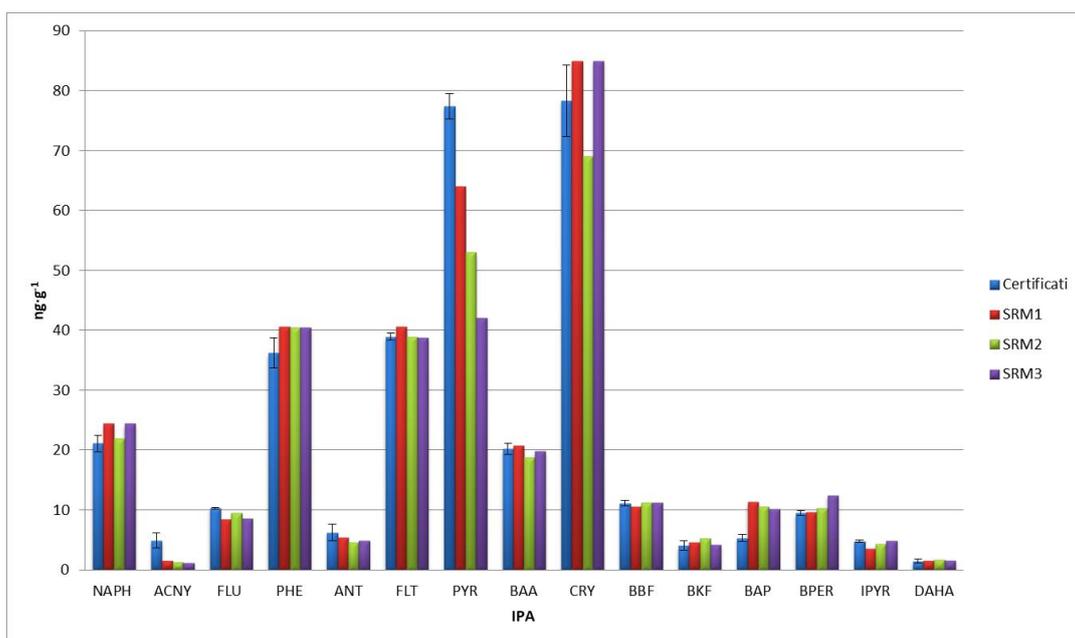


Figura 2.16. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*. Le sigle relative ai diversi composti analizzati sono esposte nel Glossario.

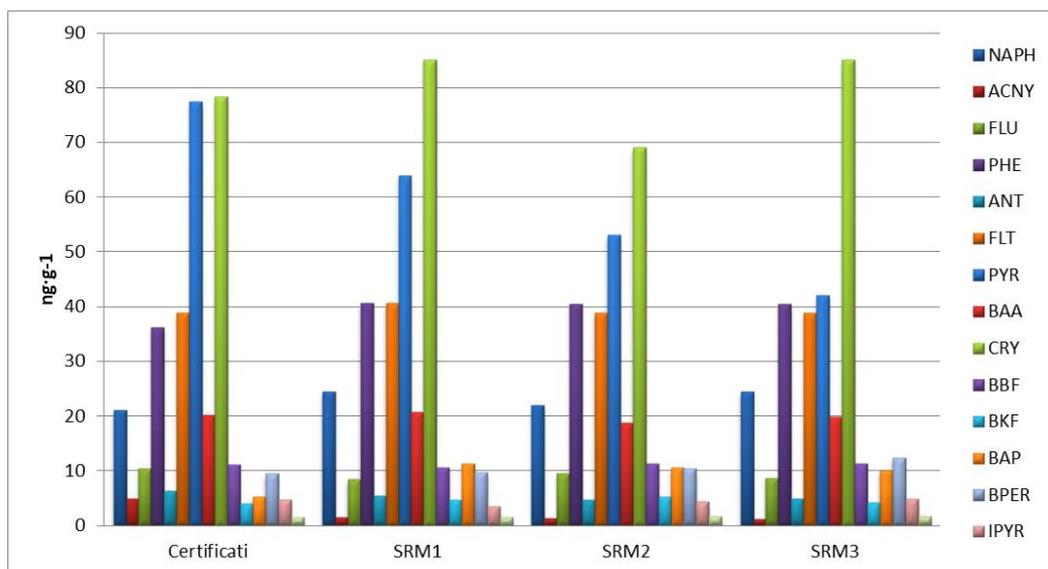


Figura 2.17. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology (NIST)* e i valori calcolati di idrocarburi policiclici aromatici (IPA), suddivisi per campione, in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*. Le sigle relative ai diversi composti analizzati sono riportate nel Glossario.

Per gli IPA si nota un andamento più variegato, con errori compiuti principalmente in sottostima, con il 60% dei valori di concentrazione calcolata che rientrano nell'intervallo $\pm 2\sigma$. Escludendo il Benzo[a]pyrene per il quale vi è un importante errore in sovrastima, l'errore relativo varia in maniera considerevole all'interno del *range* 0.01-0.7. I valori di RSD% variano tra 0.1% per il Phenanthrene e 19.8% per il Pyrene.

PCN

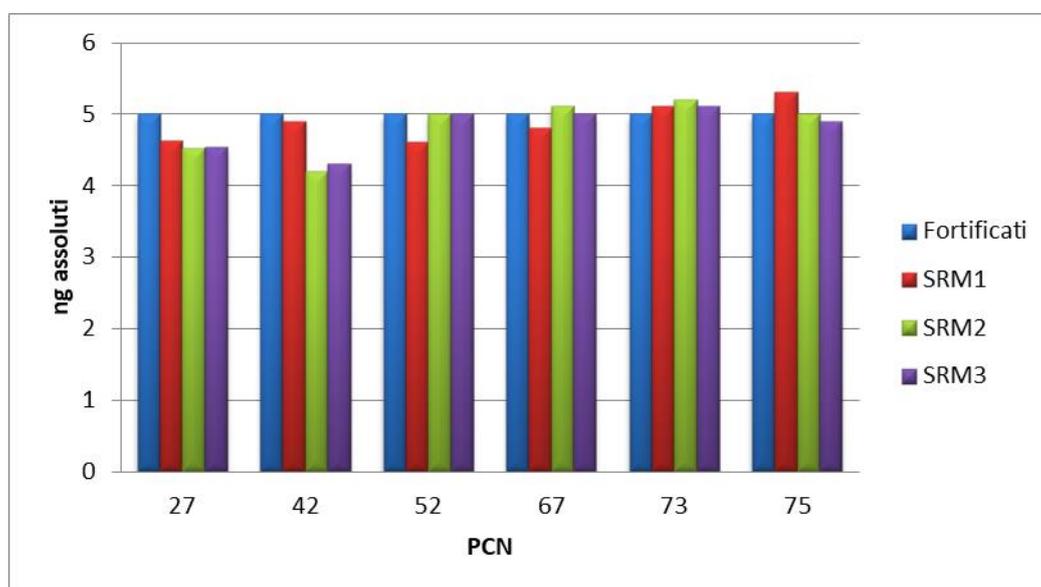


Figura 2.18. Confronto tra i valori di concentrazione attesi dati dalla fortificazione del materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977* con una quantità nota di standard di policloro naftaleni (PCN) e i valori calcolati in 3 diverse repliche.

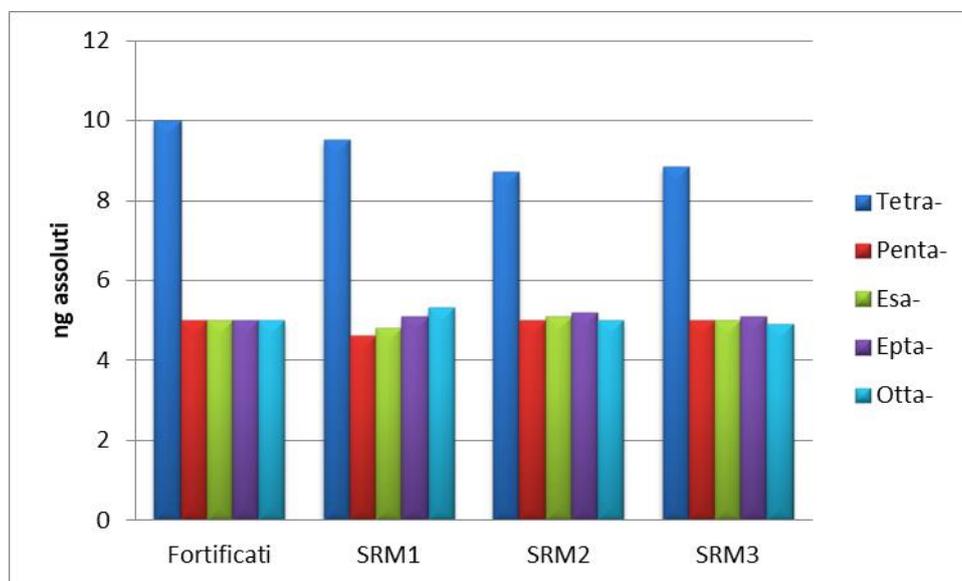


Figura 2.19. Confronto tra i valori di concentrazione attesi dati dalla fortificazione del materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977* con una quantità nota di standard di policloro naftaleni (PCN) e i valori calcolati, suddivisi per classi di omologhi, in 3 diverse repliche.

Per i PCN i valori di Er variano da un minimo di 0.1 ad un massimo di 1.0, valori riferiti ai congeneri PCN-67 e PCN-42 rispettivamente, mentre l'RSD% varia tra 1.1% per il PCN-27 e 8.5% per il PCN-42.

PBDE

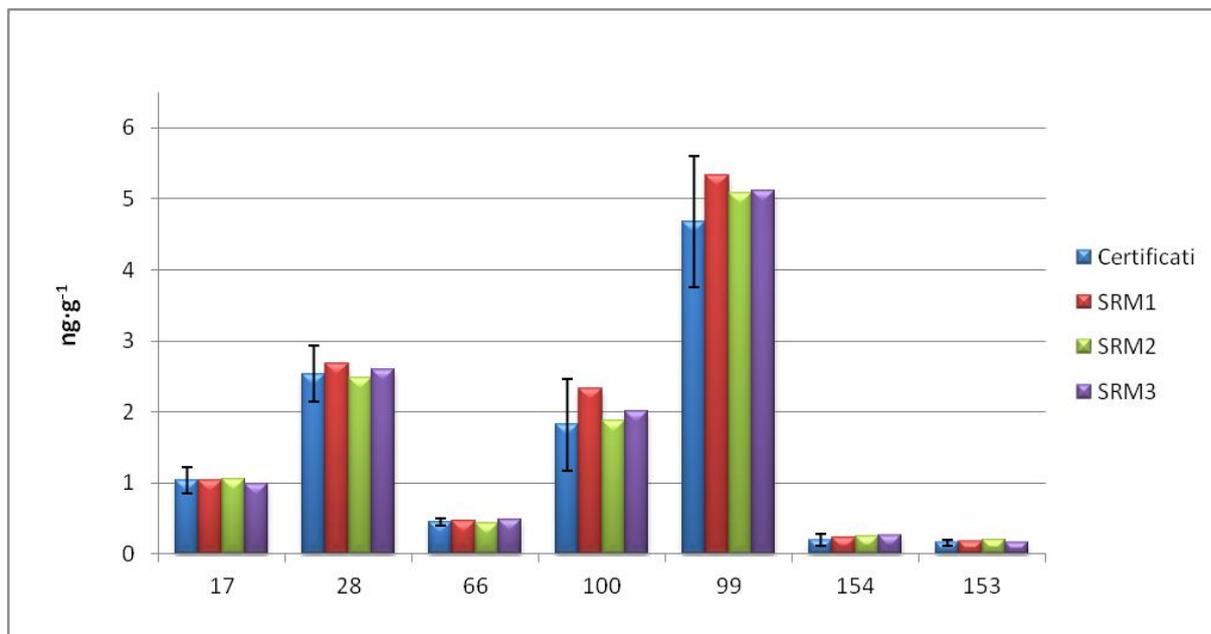


Figura 2.20. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati di polibromo difenileteri (PBDE) in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*.

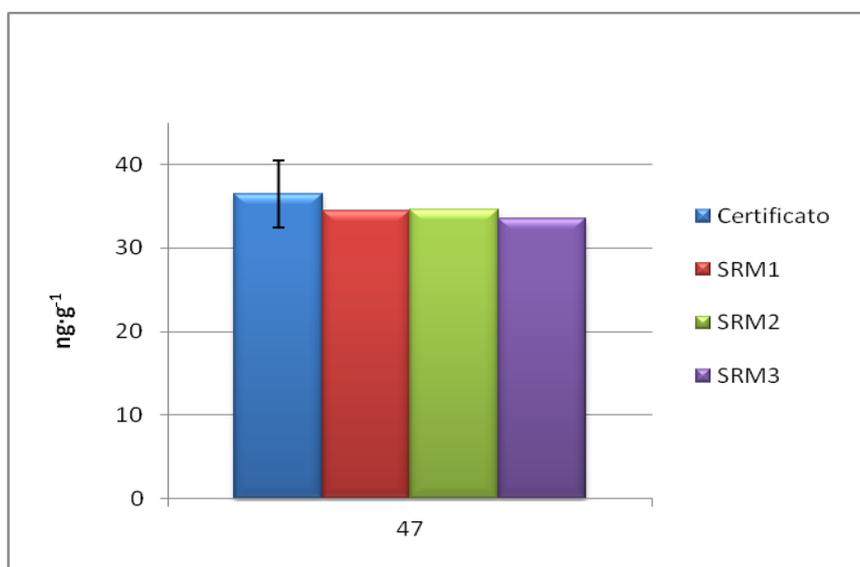


Figura 2.21. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977* per il congenere BDE-47.

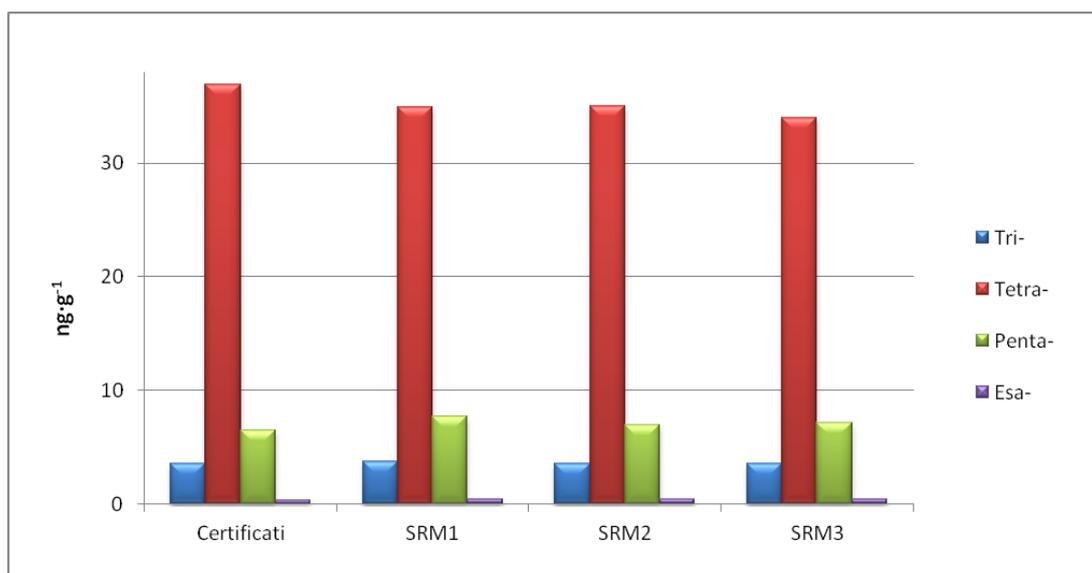


Figura 2.22. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati di polibromo difenileteri (PBDE), suddivisi per classi di omologhi, in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Mussel Tissue 2977*.

Dal confronto tra i valori di concentrazione certificati dal NIST ed i valori calcolati su tre repliche dell'SRM, è emerso come tutti i valori risultino compresi nell'intervallo $\pm\sigma$. I valori di RSD% variano tra un minimo di 1.8% per il BDE-47 ed un massimo di 11.2% per il BDE-100.

PCDD/PCDF

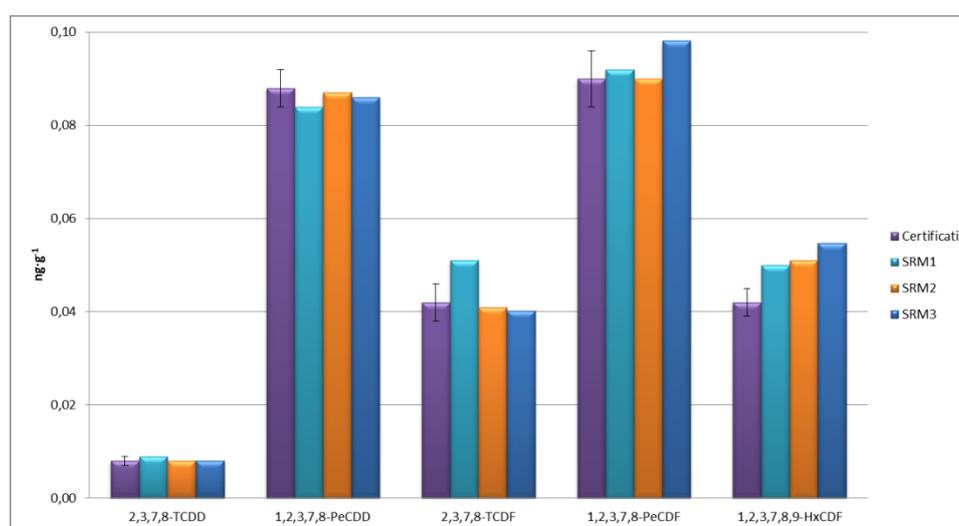


Figura 2.23. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Urban Dust 1649b* per i congeneri 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF e 1,2,3,7,8,9-HxCDF.

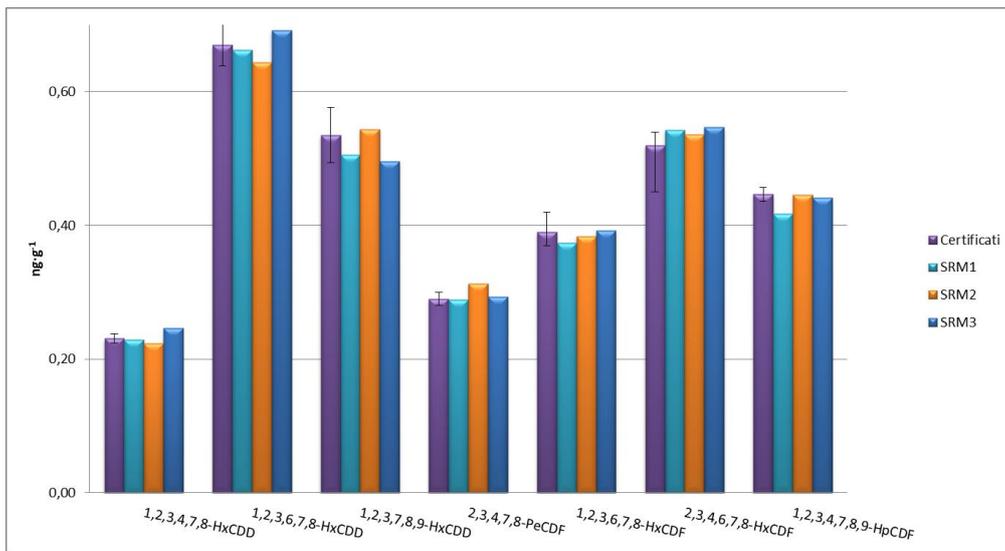


Figura 2.24. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Urban Dust 1649b* per i congeneri 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 2,3,4,6,7,8-HxCDF e 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF.

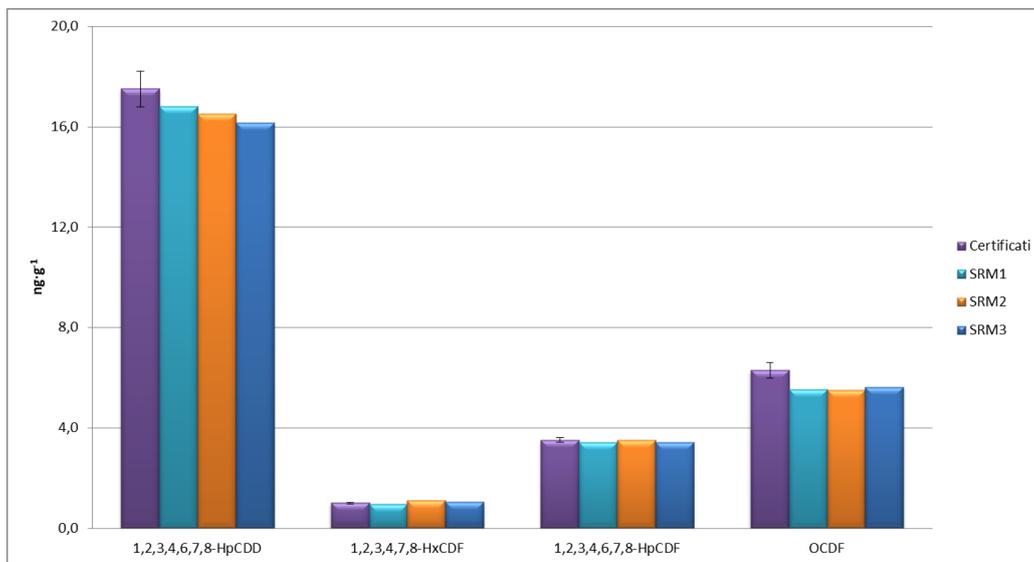


Figura 2.25. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Urban Dust 1649b* per i congeneri 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF e OCDF.

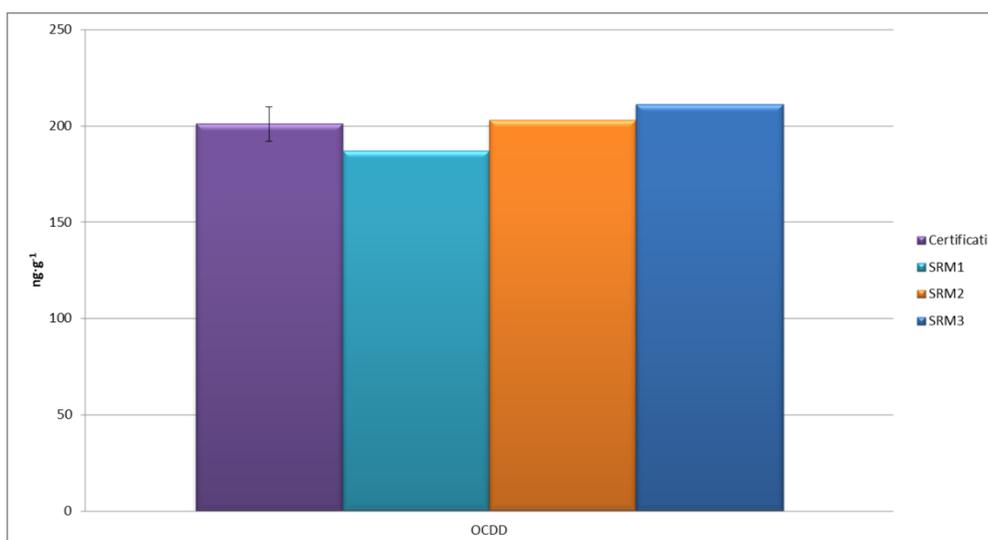


Figura 2.26. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Urban Dust 1649b* per il congenere OCDD.

L'RSD% calcolata su 3 repliche di *Urban Dust 1649b* presenta valori compresi tra 1.0% (2,3,4,6,7,8-HxCDF) e 13.7% (2,3,7,8-TCDF), con una media di 4.5%. Il 76% dei congeneri certificati risulta accurato all'interno dell'intervallo $\pm\sigma$ (88% nell'intervallo $\pm 2\sigma$). L'Er medio risulta 0.11 con valori minimi di 0.03 e massimi di 0.236.

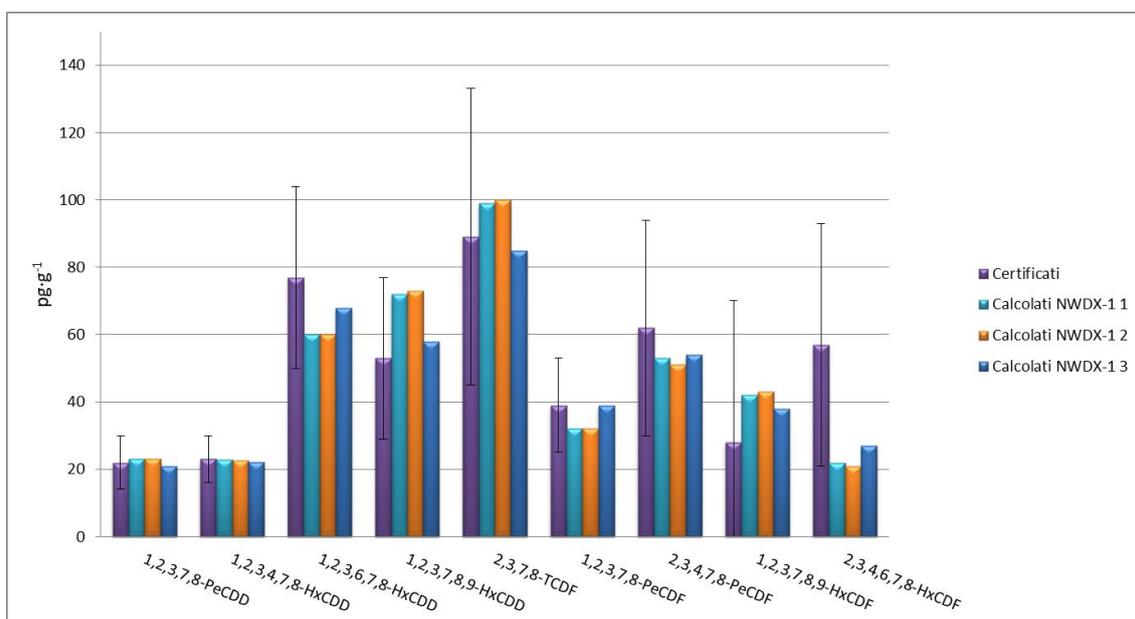


Figura 2.27. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Lake Sediment NWDX-1* per i congeneri 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,6,7,8-HxCDD, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,7,8,9-HxCDF e 2,3,4,6,7,8-HxCDF.

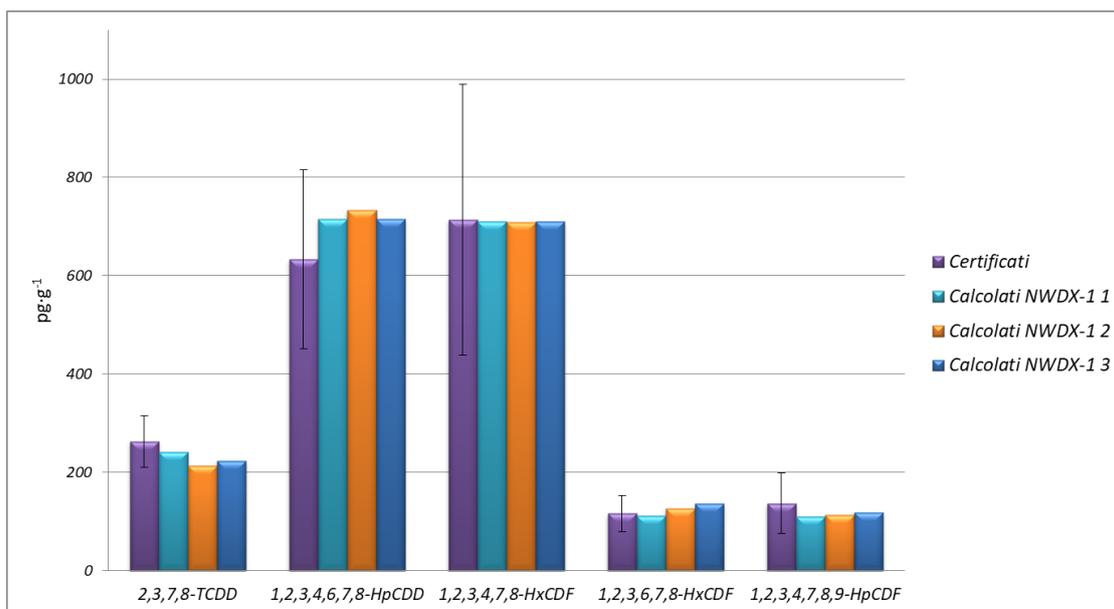


Figura 2.28. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Lake Sediment NWDX-1* per i congeneri 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF e 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF.

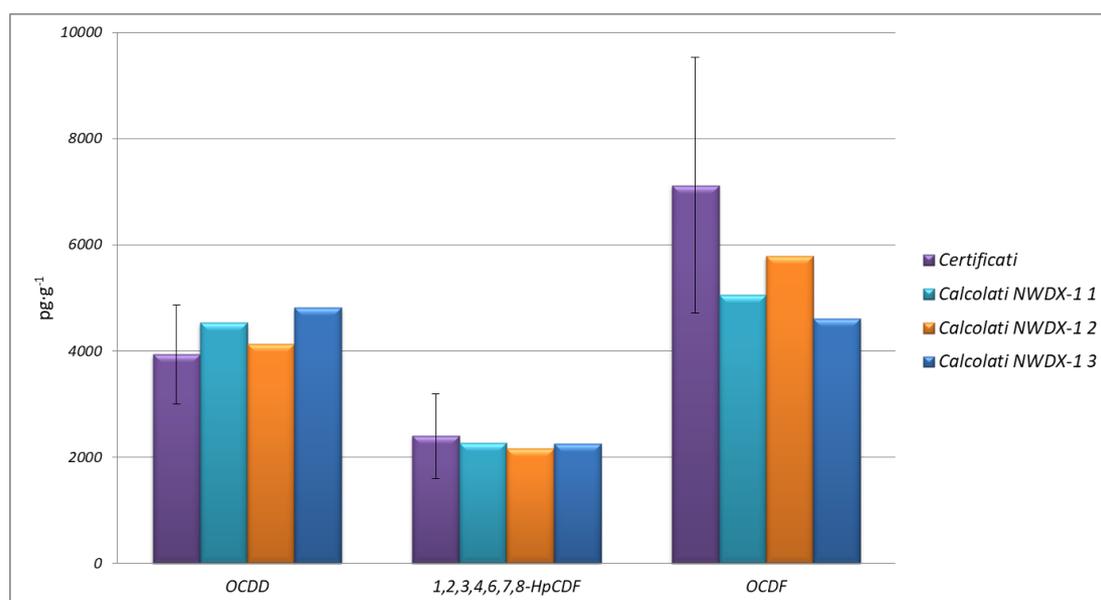


Figura 2.29. Confronto tra i valori di concentrazione certificati dal *National Institute of Standard and Technology* (NIST) e i valori calcolati in 3 repliche di materiale certificato di riferimento (SRM) *Lake Sediment NWDX-1* per i congeneri OCDD, 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF e OCDF.

Dall'analisi del materiale certificato NWDX-1 risulta come tutti i valori di concentrazione calcolata siano compresi nell'intervallo $\pm\sigma$. L'RSD% è compresa tra 0.1% (1,2,3,4,7,8-HxCDF) e 13.8% (2,3,4,6,7,8-HxCDF).

2.4.2 Limiti di rivelabilità e valutazione dei bianchi procedurali

Il limite di rivelabilità (*Limit Of Detection*, LOD) si definisce come la concentrazione minima di analita che può essere rilevata dallo strumento e corrisponde ad un valore del rapporto segnale su rumore di fondo (*Signal to Noise ratio*, S/N) maggiore o uguale a 3.

La determinazione dei valori di LOD è stata effettuata, per tutte le classi di composti, iniettando 3 diverse repliche di 4 soluzioni standard a concentrazione decrescente, mediante regressione lineare ed interpolazione.

PCB

I limiti di rivelabilità per i PCB sono stati calcolati per i soli congeneri *indicators* e *dioxin-like*, i quali presentano un'importanza tossicologica più significativa. I PCB *indicators* comprendono: PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153 e PCB-180. I congeneri *dioxin-like* sono, invece: PCB-77, PCB-81, PCB-105, PCB-114, PCB-118, PCB-123, PCB-126, PCB-156, PCB-157, PCB-167, PCB-169 e PCB-189. I LOD strumentali calcolati sono riportati in Tabella 2.2.

Tabella 2.2. Limiti di rivelabilità strumentali (LOD) per i policloro bifenili (PCB) *indicators* e *dioxin-like*, espressi in picogrammi assoluti.

PCB	LOD (pg assoluti)
28	0.07
52	0.08
77	0.20
81	0.23
101	0.10
105	0.36
114	0.31
118	0.24
123	0.27
126	1.16
138	0.20
153	0.34
156	0.77
157	0.56

167	0.49
169	0.49
180	1.12
189	2.07

IPA

I limiti di rivelabilità strumentali per gli IPA sono stati calcolati per tutti i 16 composti prioritari ed i valori sono riportati in Tabella 2.3.

Tabella 2.3. Limiti di rivelabilità strumentali (LOD) per i 16 idrocarburi policiclici aromatici (IPA), espressi in picogrammi assoluti. Le sigle relative ai diversi composti analizzati sono espone nel Glossario.

IPA	LOD (pg assoluti)
NAPH	0.12
ACNY	0.11
ACN	0.12
FLU	0.13
PHE	0.07
ANT	0.30
FLT	0.10
PYR	0.06
BAA	0.55
CRY	0.48
BBF	2.08
BKF	2.39
BAP	4.12
BPER	4.20
IPYR	0.57
DAHA	4.88

PCN

I limiti di rivelabilità strumentali per i PCN sono riportati in Tabella 2.4.

Tabella 2.4. Limiti di rivelabilità strumentali (LOD) per i policloro naftaleni (PCN), espressi in picogrammi assoluti.

PCN	LOD (pg assoluti)
27	0.17
42	0.17
52	0.16
67	0.24
73	1.08
75	2.66

PBDE

Nella Tabella 2.5 vengono invece indicati i valori di LOD strumentali per i PBDE, espressi in femtogrammi assoluti.

Tabella 2.5. Limiti di rivelabilità strumentali (LOD) per i polibromo difenileteri (PBDE), espressi in femtogrammi assoluti.

PBDE	LOD (fg assoluti)
17	50
28	50
47	15
66	30
71	40
85	40
99	15
100	35
138	40
153	25
154	25
183	10
190	10
209	30

PCDD/PCDF

I limiti di rivelabilità strumentali per policoro dibenzo-p-diossine e policloro dibenzofurani sono riportati in Tabella 2.6.

Tabella 2.6. Limiti di rivelabilità strumentali (LOD) per policloro dibenzo-p-diossine e policloro dibenzofurani (PCDD/F) espressi in picogrammi assoluti.

PCDD/F	LOD (pg assoluti)
2,3,7,8-TCDD	0.1
1,2,3,7,8-PeCDD	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.3
OCDD	0.2
2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.3
2,3,4,7,8-PeCDF	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.2
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.2
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.2

1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.2
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.2
OCDF	0.2

L'analisi dei bianchi procedurali ha permesso, inoltre, la determinazione dei limiti di rivelabilità metodologici (*Method Detection Limits*, MDL). Un bianco procedurale è una soluzione costituita dalla stessa matrice del campione, ma priva degli analiti di interesse, la quale viene sottoposta alla stessa procedura di analisi utilizzata per i campioni. Questo consente di monitorare gli eventuali interferenti che possono portare a sovrastime in fase di quantificazione degli analiti.

I valori di MDL sono stati determinati dalla media dei valori calcolati nelle diverse repliche dei bianchi procedurali. Per i congeneri di cui non sono stati riscontrati picchi cromatografici, si considera come valore di limite di rivelabilità metodologico, il LOD strumentale.

PCB

I valori di MDL per i PCB sono stati stimati dalla media di 3 bianchi procedurali e sono riportati in Tabella 2.7.

Tabella 2.7. Valori dei limiti di rivelabilità metodologici (MDL) per i policloro bifenili (PCB), espressi in picogrammi assoluti.

PCB	MDL (pg assoluti)	PCB	MDL (pg assoluti)	PCB	MDL (pg assoluti)
1	49	56, 60	14	101, 90	52
2	57	66	101	105	48
3	44	70	99	110	21
8, 5	104	71, 64, 41	23	118	20
12	40	74	7	149	18
28	107	93, 95	38	153	20
31	103	99	22	174	32
33, 20	36				

IPA

I limiti di rivelabilità metodologici per gli IPA sono stati calcolati dalla media di 3 bianchi procedurali. I valori sono riportati in Tabella 2.8.

Tabella 2.8. Valori dei limiti di rivelabilità metodologici (MDL) per gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), espressi in nanogrammi assoluti. Le sigle relative ai diversi composti analizzati sono esposte nel Glossario.

IPA	MDL (ng assoluti)
NAPH	16.7
ACNY	1.20
ACN	3.40
FLU	3.54
PHE	10.2
ANT	2.03
FLT	9.27
PYR	8.53
BAA	0.27
CRY	1.26
BAP	0.72
IPYR	3.27

PCN

La valutazione dei bianchi procedurali per i PCN non ha evidenziato picchi significativi, perciò si considerano come valori di limiti di rivelabilità metodologici i LOD strumentali riportati in Tabella 2.4.

PBDE

I valori di MDL per i PBDE sono stati determinati dalla media di 3 bianchi procedurali e sono riportati in Tabella 2.9.

Tabella 2.9. Valori dei limiti di rivelabilità metodologici (MDL) per i polibromo difenileteri (PBDE), espressi in picogrammi assoluti.

PBDE	MDL (pg assoluti)
17	34
28	96
47	2591
66	92
71	75

85	63
99	1306
100	458
138	135
153	94
154	119
183	10

PCDD/PCDF

I limiti di rivelabilità metodologici per PCDD e PCDF sono stati determinati dalla media di 7 bianchi procedurali. I valori sono mostrati in Tabella 2.10 e sono espressi in picogrammi assoluti.

Tabella 2.10. Valori dei limiti di rivelabilità metodologici (MDL) per policloro dibenzo-p-diossine e policloro dibenzofurani (PCDD/F), espressi in picogrammi assoluti.

PCDD/F	MDL (pg assoluti)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1.5
OCDD	1.4
1,2,3,7,8-PeCDF	1.7
2,3,4,7,8-PeCDF	1.4
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.3
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.4
1,2,3,7,8,9-HxCDF	1.0
2,3,4,6,7,8-HxCDF	3.3
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.1
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.8
OCDF	0.3

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli 8 *pool* di campioni oggetto di analisi sono descritti in dettaglio in Tabella 3.1. Essi verranno indicati, nel seguito della trattazione, come AC11, AC13, AC14, AC15, AC17, AC20, AC21 e AC25, indicando con la sigla *AC* la specie *Adamussium colbecki*, mentre il numero corrisponde alla spedizione antartica condotta nell'ambito del PNRA nella quale è avvenuto il campionamento di quello specifico *pool*. I valori di concentrazione riportati sono da considerarsi in peso secco.

Tabella 3.1. Area di campionamento, coordinate geografiche e data di campionamento degli 8 *pool* di campioni analizzati.

Campione	Spedizione antartica italiana PNRA	Area di campionamento	Latitudine	Longitudine	Data di campionamento
AC11	XI	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°41' S	164°02' E	10/01/1996
AC13	XIII	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°42' S	164°08' E	31/01/1998
AC14	XIV	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°40' S	164°04' E	16/12/1998
AC15	XV	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°43' S	164°07' E	10/12/1999
AC17	XVII	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°41' S	164°06' E	05/11/2001
AC20	XX	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°41' S	164°08' E	13/02/2005
AC21	XXI	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°41' S	164°06' E	16/01/2006
AC25	XXV	Baia Terra Nova (Mare di Ross)	74°41' S	164°06' E	12/12/2009

Vengono di seguito presentati i risultati ottenuti, suddivisi per classe di contaminanti oggetto di analisi. Particolare attenzione verrà dedicata ai *trends* temporali che è stato possibile investigare.

3.1 PCB

L'analisi di policloro bifenili ha compreso 126 dei 209 congeneri possibili, quelli più comunemente impiegati nelle miscele commerciali Aroclor®. Le concentrazioni, suddivise per classi di omologhi e come somma di PCB totali ($\Sigma_{126}\text{PCB}$), *indicators* ($\Sigma_7\text{iPCB}$) e *dioxin-like* ($\Sigma_{12}\text{DL-PCB}$) sono riportate in Tabella 3.2. I valori di concentrazione congenere-specifici sono invece indicati in Allegato B, Tabella 5.1. I congeneri considerati sono stati determinati in tutti i campioni, ad eccezione degli Otta- e Nona-clorurati che sono risultati sempre al di sotto del limite di rivelabilità strumentale (LOD), mentre il deca-clorurato è presente solamente nel campione AC13. In tutti i campioni si rileva un'abbondanza dei congeneri Tetra-, Penta- ed Esa-CB, rispetto a quelli a minor grado di clorurazione, facendo supporre un importante apporto alla contaminazione da parte di fonti locali, oltre che dal trasporto a lungo raggio dalle medie latitudini. La somma dei PCB totali varia tra un valore massimo di 24.86 ng·g⁻¹ nel campione AC11 ed un valore minimo di 4.18 ng·g⁻¹ nel campione AC25, con un valor medio di 11.70 ng·g⁻¹. Il campione AC13 presenta, invece, un valore della somma di PCB molto elevato (183.60 ng·g⁻¹). Nello stesso campione, corrispondente al campionamento condotto nell'estate australe 1997-98, il 44% del totale dei PCB è rappresentato dai PCB *dioxin-like* (81.11 ng·g⁻¹). Le concentrazioni di PCB *dioxin-like* negli altri campioni, invece, mostrano livelli notevolmente più bassi e tutti dello stesso ordine di grandezza, con un minimo di 0.49 ng·g⁻¹ in AC25, il campione più recente. Tra i singoli congeneri *dioxin-like*, il PCB-105 risulta tra i più abbondanti nei campioni da AC14 in poi. Il PCB-209 è stato determinato solamente nel campione AC13, avvalorando l'ipotesi di una fonte di contaminazione locale significativa durante gli anni 1997 e 1998.

Tabella 3.2. Valori di concentrazione di policloro bifenili (PCB) suddivisi per classi di omologhi e come somma di PCB totali ($\Sigma_{126}\text{PCB}$), *indicators* ($\Sigma_7\text{iPCB}$) e *dioxin-like* ($\Sigma_{12}\text{DL-PCB}$) negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1996-2009. Valori in ng·g⁻¹ (Grotti *et al.*, 2016).

Analiti	AC11	AC13	AC14	AC15	AC17	AC20	AC21	AC25
Mono-CB	0.40	0.58	0.21	0.003	0.01	< LOD	0.44	< LOD
Di-CB	0.87	1.38	1.05	0.46	1.02	1.50	1.51	1.02
Tri-CB	2.34	4.38	1.53	0.38	1.16	1.05	0.83	0.58
Tetra-CB	1.45	29.98	0.89	1.45	1.07	0.94	1.01	0.41
Penta-CB	5.25	60.35	4.65	3.61	2.23	2.08	5.99	1.27
Esa-CB	9.84	53.96	< LOD	3.09	9.33	1.17	0.80	0.91
Epta-CB	4.71	32.03	< LOD	2.21	0.28	0.68	< LOD	< LOD
Otta-CB	< LOD*	< LOD						

Nona-CB	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Deca-CB	< LOD	0.97	< LOD					
Σ_{126}PCB	24.86	183.60	8.33	11.19	15.10	7.43	10.59	4.18
Σ_7iPCB	10.78	38.61	1.09	2.23	5.98	1.40	1.64	1.25
Σ_{12}DL-PCB	0.90	81.11	2.75	4.93	1.11	1.21	4.19	0.49
* Valori inferiori al limite di rivelabilità (<i>Limit Of Detection, LOD</i>).								

3.1.1 PCB-11

Il PCB-11, congenere non-Aroclor®, è stato determinato in tutti i *pool* di campioni analizzati. Le concentrazioni mostrano che questo congenere risulta uno dei più abbondanti tra i PCB analizzati, rappresentando in media il 17.6% del totale, dato dal rapporto PCB-11/ Σ_{127} PCB. La concentrazione di PCB-11 nei campioni varia tra un massimo di 6.10 ng·g⁻¹ ed un minimo di 0.25 ng·g⁻¹, valori rilevati nei campioni AC17 e AC25 rispettivamente, con un valor medio di 2.73 ng·g⁻¹ (Tabella 3.3). Il campione AC13 mostra valori anomali, molto più elevati rispetto agli altri *pool* (36.49 ng·g⁻¹), confermando l'ipotesi espressa precedentemente per l'intera classe di PCB.

In letteratura non sono presenti ulteriori dati sulla presenza di PCB-11 in campioni di *A. colbecki*.

Tabella 3.3. Valori di concentrazioni di 3,3'-diclorobifenile (PCB-11) determinati negli 8 *pool* di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1996-2009 (Pizzini et al., 2017). Valori in ng·g⁻¹.

Analita	AC11	AC13	AC14	AC15	AC17	AC20	AC21	AC25
PCB-11	3.46	36.49	3.69	3.21	6.10	0.60	1.77	0.25

3.2 IPA

Concentrazioni significative di IPA sono state determinate nei campioni AC11, AC13, AC15, AC17, AC20 e AC25. I campioni AC14 e AC21, invece, mostrano valori inferiori al LOD per tutti i 16 composti analizzati (Tabella 3.4). Il *range* di concentrazioni, riferito alla somma degli IPA totali (Σ_{16} IPA), risulta molto ampio, con un minimo di 2.46 ng·g⁻¹ rilevati nel campione AC11, ed un massimo di 263.7 ng·g⁻¹ nel campione AC17. Il maggior contributo è dato dai composti a più alto peso molecolare, come il fluoranthene, il pyrene e

l'indeno[1,2,3-cd]pyrene, portando all'ipotesi di una contaminazione data, principalmente, da fonti locali. I campioni più recenti, AC21 e AC25, risultano meno contaminati, mentre AC13, AC17 e AC20 presentano livelli di concentrazione tra loro simili, e di uno o due ordini di grandezza maggiori rispetto agli altri campioni. I valori di concentrazione dei singoli composti sono riportati in Allegato B, Tabella 5.1.

Tabella 3.4. Valori di concentrazione come somma di idrocarburi policiclici aromatici (Σ_{16} IPA) negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1996-2009. Valori in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Grotti et al., 2016).

	AC11	A13	AC14	AC15	AC17	AC20	AC21	AC25
$\Sigma_{16}\text{IPA}$	2.46	104.5	< LOD*	15.22	263.7	161.0	< LOD	53.70
* Valori inferiori al limite di rivelabilità (<i>Limit Of Detection</i> , LOD).								

3.3 PCN

Tra i 6 congeneri di PCN, solamente il PCN-27 ed il PCN-42 hanno valori di concentrazione superiori al LOD. Tali congeneri tetra-clorurati sono stati determinati nella maggior parte dei campioni ad eccezione di AC13 i cui valori di concentrazione sono tutti inferiori al LOD. In Tabella 3.5 è riportata la somma dei valori di concentrazione dei congeneri di PCN ($\Sigma_6\text{PCN}$) negli 8 campioni analizzati. Il valore più elevato si ha per AC21 ($0.632 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), corrispondente al campionamento condotto nell'estate australe 2005-06, mentre il valore minimo è stato riscontrato nel campione AC15 ($0.004 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$). I valori di concentrazione congenere-specifici sono riportati in Allegato B, Tabella 5.1.

Tabella 3.5. Valori di concentrazione come somma di policloro naftaleni ($\Sigma_6\text{PCN}$) negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1996-2009. Valori in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Grotti et al., 2016).

	AC11	A13	AC14	AC15	AC17	AC20	AC21	AC25
$\Sigma_6\text{PCN}$	0.136	< LOD*	0.202	0.004	0.319	0.142	0.632	0.066
* Valori inferiori al limite di rivelabilità (<i>Limit Of Detection</i> , LOD).								

3.4 PBDE

Livelli significativi di PBDE sono stati determinati in tutti i campioni analizzati, ad eccezione del congenere Deca-BDE che risulta presente solo nel campione AC20 con una concentrazione di $4.50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. I valori di concentrazione, suddivisi per classi di omologhi e come somma di PBDE totali ($\Sigma_{14}\text{PBDE}$), sono riportati in Tabella 3.6. I livelli di concentrazione totale variano da un minimo di $0.29 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ad un massimo di $18.88 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, rilevati nei campioni AC17 e AC20 rispettivamente. I congeneri più abbondanti risultano essere i Tetra-bromurati, in particolare il BDE-47, e i Penta-bromurati con il BDE-99. Tuttavia, nell'unico campione in cui è stato determinato, il BDE-209, rappresenta il 24% della contaminazione totale da PBDE, superiore anche a quella dei congeneri Penta-bromurati. I valori di concentrazione congenere-specifici sono riportati in Allegato B, Tabella 5.2.

Tabella 3.6. Valori di concentrazione di polibromo difenileteri (PBDE) suddivisi per classi di omologhi e come somma di PBDE totali ($\Sigma_{14}\text{PBDE}$) negli 8 *pool* di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1996-2009. Valori in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

Analiti	AC11	A13	AC14	AC15	AC17	AC20	AC21	AC25
Tri-BDE	0.06	0.32	0.21	< LOD*	0.02	0.21	< LOD	0.11
Tetra-BDE	0.22	6.27	11.06	1.26	0.08	9.69	2.31	8.17
Penta-BDE	0.24	2.73	5.01	0.73	< LOD	4.01	2.00	3.68
Esa-BDE	0.04	0.29	0.61	0.11	0.03	0.32	0.29	0.21
Epta-BDE	< LOD	0.05	0.10	0.08	0.16	0.15	0.05	0.19
Deca-BDE	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4.50	< LOD	< LOD
$\Sigma_{14}\text{PBDE}$	0.56	9.67	17.00	2.19	0.29	18.88	4.65	12.36
* Valori inferiori al limite di rivelabilità (<i>Limit Of Detection, LOD</i>).								

3.5 PCDD/PCDF

Tra i diversi congeneri di PCDD e PCDF analizzati, solo quelli ad elevato grado di clorurazione: Esa-, Epta- e Otta-, hanno mostrato concentrazioni superiori al LOD. Valori significativi di PCDD e PCDF sono stati determinati in 5 degli 8 *pool* di campioni analizzati, mentre nei campioni AC15, AC17 e AC25 i valori di concentrazione risultano inferiori al LOD per tutti i congeneri. Il *range* di concentrazione varia da 0.036 a $0.705 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, rilevate per i campioni AC21 e AC14 rispettivamente. Tra i restanti campioni, AC11 e AC20 presentano valori dello stesso ordine di grandezza ($0.106 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0.186 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, rispettivamente), mentre

il campione AC13 risulta meno contaminato, con valori di concentrazione inferiori di un ordine di grandezza. La presenza di contaminazione da congeneri ad elevato grado di sostituzione può far supporre la presenza di fonti di contaminazione locali, più che di apporti legati al trasporto atmosferico a lungo raggio. I valori di concentrazione, suddivisi per classi di omologhi e come somma di PCDD e PCDF totali (Σ_{17} PCDD/F) sono riportati in Tabella 3.7, mentre i valori congenere-specifici sono indicati in Allegato B, Tabella 5.3.

Tabella 3.7. Valori di concentrazione di policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF) suddivisi per classi di omologhi e come somma di PCDD/F totali (Σ_{17} PCDD/F) negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1996-2009. Valori in $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

Analiti	AC11	A13	AC14	AC15	AC17	AC20	AC21	AC25
Tetra-CDD	< LOD							
Tetra-CDF	< LOD							
Penta-CDD	< LOD							
Penta-CDF	< LOD							
Esa-CDD	< LOD							
Esa-CDF	< LOD	0.003	< LOD					
Epta-CDD	0.027	< LOD	0.078	< LOD	< LOD	0.084	0.019	< LOD
Epta-CDF	0.040	0.008	0.062	< LOD	< LOD	< LOD	0.017	< LOD
Otta-CDD	0.039	0.055	0.393	< LOD				
Otta-CDF	< LOD	0.012	0.172	< LOD	< LOD	0.102	< LOD	< LOD
Σ_{17}PCDD/F	0.106	0.078	0.705	< LOD	< LOD	0.186	0.036	< LOD
* Valori inferiori al limite di rivelabilità (<i>Limit Of Detection</i>, LOD).								

3.6 PFASs

La determinazione di PFASs è stata condotta in ottica qualitativa per dare una prima evidenza sulla presenza di questi composti in campioni reali di *A. colbecki*. In tale modo è stato inoltre possibile testare il processo di derivatizzazione degli analiti e la metodica analitica impiegata. Il metodo è ancora in fase di sviluppo e validazione, ma già i primi risultati inducono a proseguire in questo senso per perfezionare una procedura che permetta l'analisi di composti perfluorurati in gascromatografia.

Sono stati analizzati i campioni AC13, AC15 e AC20, nei quali sono stati ricercati acidi carbossilici perfluoroalchilici (PFCA) a diversa lunghezza di catena (da C₇ a C₁₂). In tutti i campioni sono stati individuati l'acido perfluoroottanoico (PFOA) e l'acido perfluorodecanoico (PFDA). Il PFDA risulta sempre più abbondante del PFOA, con un segnale

strumentale di circa 3 volte maggiore. L'acido perfluoroeptanoico (PFHpA) e l'acido perfluoroundecanoico (PFUnA) sono stati determinati solamente nel campione AC13, con il PFHpA che presenta un'abbondanza di un ordine di grandezza più elevato rispetto al PFUnA. L'acido perfluorododecanoico (PFDoA), infine, è stato riscontrato solamente nel campione AC20, con un segnale strumentale relativamente basso. Dei tre campioni *target* oggetto d'indagine, il campione AC13 si è dimostrato essere il più contaminato, con 4 dei 6 PFCA analizzati rilevati (PFHpA, PFOA, PFDA e PFUnA). In Tabella 3.8 sono riportate le aree dei picchi determinati per i 6 PFCA.

Tabella 3.8. Area dei picchi cromatografici degli acidi carbossilici perfluoroalchilici (PFCA) individuati in 3 *pool* di campioni di *Adamussium colbecki* raccolti nella Baia Terra Nova durante le spedizioni antartiche italiane dell'arco temporale 1998-2005. Le sigle relative ai diversi composti analizzati sono riportate nel Glossario.

Analita	AC13	AC15	AC20
PFHpA	1304	n.r.*	n.r.-
PFOA	313	498	183
PFNA	n.r.-	n.r.-	n.r.-
PFDA	1753	1369	467
PFUnA	138	n.r.-	n.r.-
PFDoA	n.r.-	n.r.-	103
* Picchi non rilevabili (n.r.).			

3.7 Trends temporali

La distribuzione delle concentrazioni delle diverse classi di POPs nei campioni riferiti all'arco temporale 1996-2009 varia su *range* differenti a seconda degli analiti considerati. In generale, si nota un arricchimento di congeneri a più alto peso molecolare, specialmente per le classi di IPA e PCDD/PCDF, che evidenzia l'importante ruolo rivestito dalle sorgenti di contaminazione locale.

I PCB presentano un *trend* abbastanza lineare, con concentrazioni che, valutando le singole classi di clorurazione, non superano i 10 ng·g⁻¹: il valore più elevato è quello dei congeneri

Esa-clorurati nel campione AC11 ($9.84 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), *pool* corrispondente all'estate australe 1995-96. Valori molto simili si riscontrano nel campione AC17, relativo al periodo 2001-02, con valori di $9.33 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per i congeneri Esa-CB. Nei campioni più recenti si nota una leggera diminuzione delle concentrazioni di quasi tutte le classi di omologhi, specialmente nel campione relativo al Dicembre 2009: AC25, in cui i valori variano da un minimo di $0.41 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per i Tetra-CB, ad un massimo di $1.27 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per i Penta-CB.

Livelli di concentrazione anomali sono stati riscontrati nel campione AC13, campionato durante l'estate australe 1997-98, con valori di Tetra-, Penta-, Esa- ed Epta-CB di un ordine di grandezza superiore rispetto a quelli determinati negli altri campioni. Gli elevati livelli di concentrazione di congeneri ad alto grado di clorurazione hanno condotto all'ipotesi della presenza, in quel periodo, di forti contributi da parte di fonti di contaminazione locale. Come possibile conferma di tale ipotesi è stato riscontrato che, nell'estate australe 1997-98, sono state effettuate due importanti installazioni presso la base italiana di ricerca scientifica Mario Zucchelli a Baia Terra Nova: un nuovo generatore elettrico e un deposito di carburante (ENEA – Progetto Antartide, Rapporto sulla campagna antartica, Tredicesima Spedizione, 1998). La distribuzione complessiva di PCB lungo l'arco temporale considerato è illustrata in Figura 3.1.

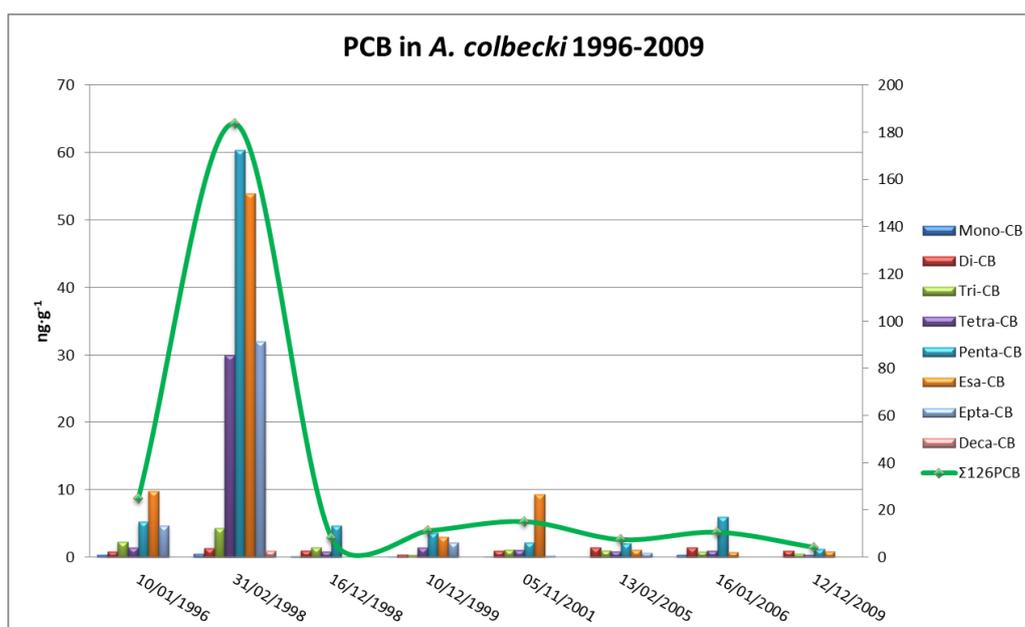


Figura 3.1. Distribuzione delle concentrazioni di policloro bifenili (PCB), suddivise per classi di omologhi, negli 8 *pool* di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

Il PCB-11 segue l'andamento generale dei PCB totali, con valori in linea con quelli rilevati per gli altri congeneri (Figura 3.2). Anche in questo caso si nota l'anomalia rappresentata dal campione AC13, che riconduce all'ipotesi, espressa in precedenza, relativa alla presenza di una fonte puntuale e locale di contaminazione.

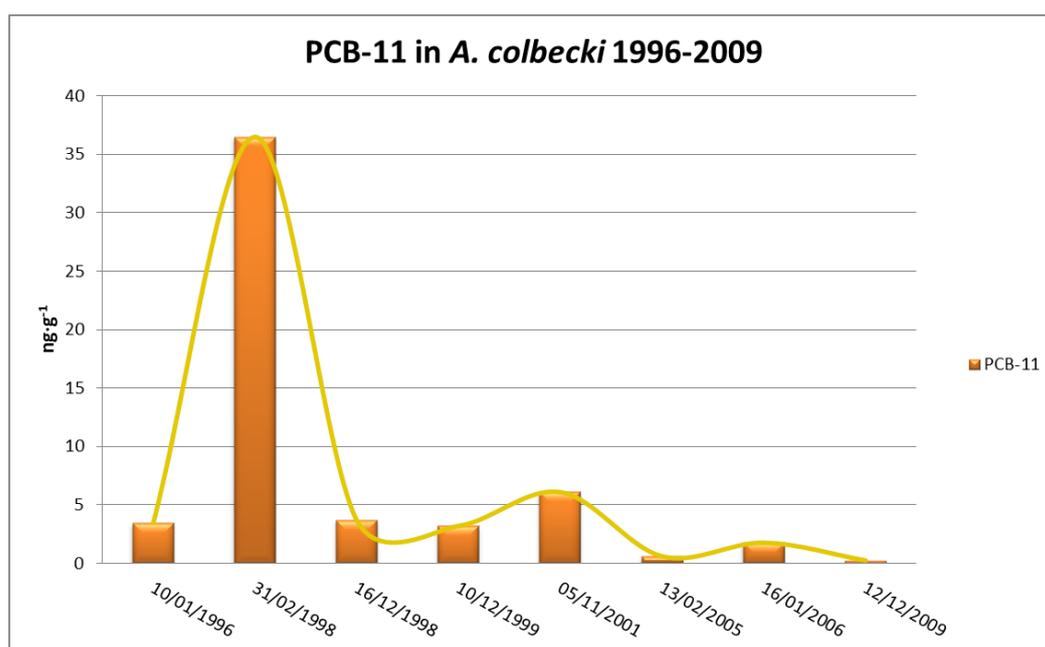


Figura 3.2. Distribuzione della concentrazione di 3,3'-diclorobifenile (PCB-11) negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

Il PCB-11 presenta valori di concentrazione significativi in tutti i campioni e da solo rappresenta, in media, il 17% del totale dei 127 congeneri analizzati. Tale dato è indice di una contaminazione importante, da riferire a sorgenti di tipologia differente da quelle comunemente riportate in letteratura per gli altri congeneri. Essendo un congenere diclorurato e, quindi, leggero, il PCB-11 è sicuramente soggetto al trasporto a lungo raggio dalle zone urbanizzate del Globo. A differenza di altri congeneri di PCB, esso presenta una solubilità in acqua relativamente elevata ed un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua piuttosto basso ($\log K_{ow} = 5.27$), caratteristiche che fanno supporre una capacità di bioaccumulo minore rispetto a quella di altri PCB a più alto grado di clorurazione. Le elevate concentrazioni determinate, soprattutto in riferimento al campione AC13, inducono tuttavia

a considerare sorgenti locali di PCB-11. Il dilavamento dato dallo scioglimento dei ghiacci e la deposizione dall'atmosfera possono portare ad un incremento della concentrazione di questo congenere nella colonna d'acqua, ma è stata ipotizzata anche una possibile fonte diretta legata principalmente a processi termici, come l'incenerimento di carta o plastica contenente pigmenti diarilici (Pizzini *et al.*, 2017). In Figura 3.3 viene illustrato il *trend* temporale del PCB-11 in rapporto alla totalità dei congeneri ($\Sigma_{127}\text{PCB}$), da cui si evince l'importante contributo di questo composto non-Aroclor[®], costituente quasi il 30% dei PCB totali anche in campioni relativamente recenti come AC17 (estate australe 2001-02).

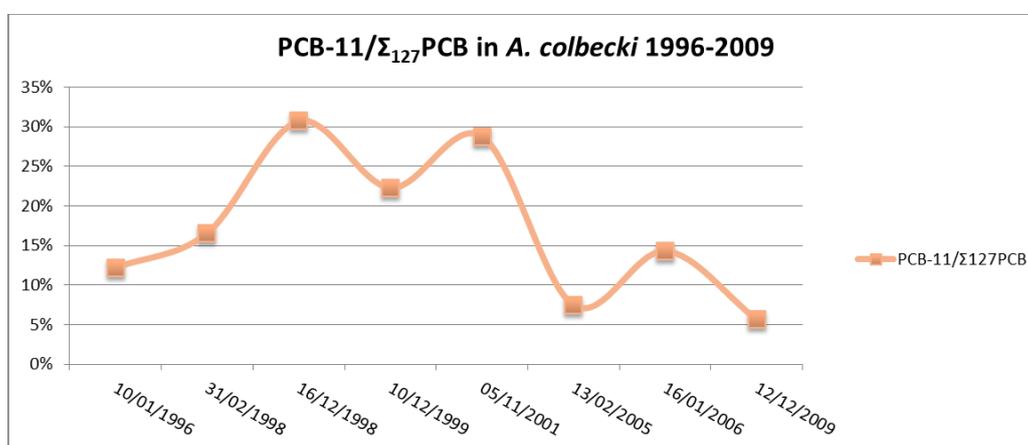


Figura 3.3. Distribuzione della concentrazione di 3,3'-diclorobifenile (PCB-11) in rapporto alla somma dei PCB totali ($\Sigma_{127}\text{PCB}$) negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

Gli IPA presentano un *trend* più variabile, ma riconducibile a quanto affermato per i PCB (Figura 3.4). La concentrazione complessiva ($\Sigma_{16}\text{IPA}$) risulta relativamente bassa nel campione AC11 ($2.46 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) per poi aumentare significativamente, anche di due ordini di grandezza, nei campioni AC13 ($104.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), AC17 ($263.7 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) e AC20 ($161.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$). Tuttavia, nei campioni AC14 e AC21 i valori di concentrazione sono inferiori al LOD. In tutti i campioni predominano i congeneri più pesanti (4-6 anelli aromatici) indice, anche in questo caso, di un significativo contributo dato da sorgenti di contaminazione locali.

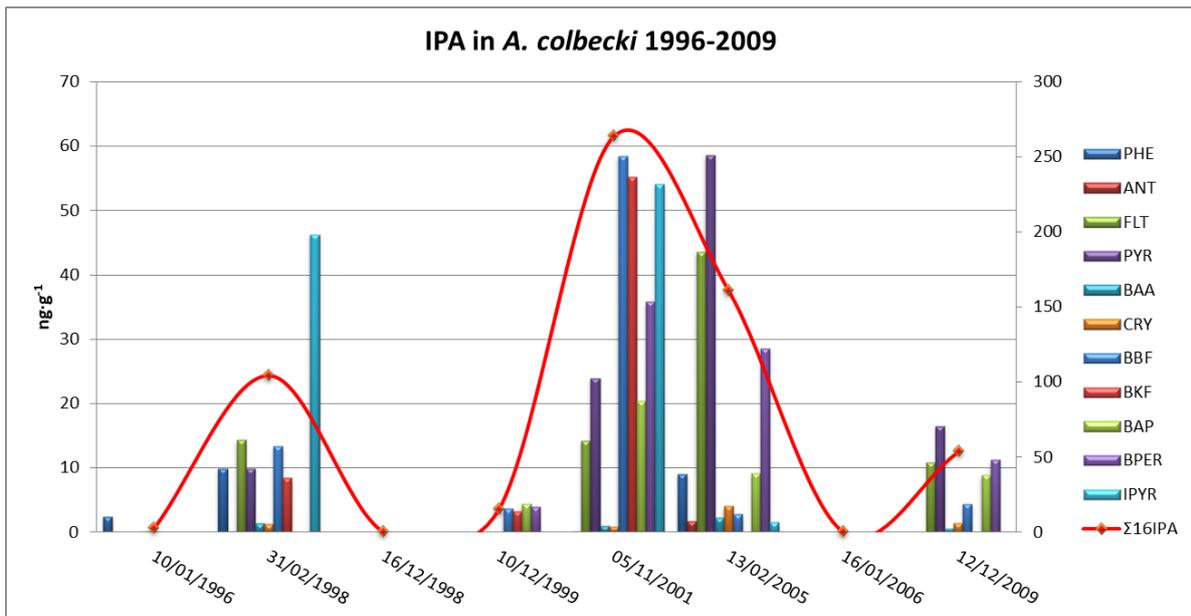


Figura 3.4. Distribuzione delle concentrazioni di idrocarburi policiclici aromatici (IPA), suddivise per composto, negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross). Le sigle relative ai diversi composti analizzati sono riportate nel Glossario.

I PCN presentano bassi livelli di concentrazione rispetto alle altre classi di POPs, con valori anche di molto inferiori a $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. In generale, si nota una certa omogeneità nella distribuzione temporale: le concentrazioni sono dello stesso ordine di grandezza per 5 degli 8 campioni ($0.136 - 0.636 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), mentre i restanti presentano valori al di sotto degli $0.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. L'andamento, illustrato in Figura 3.5, mostra un'alternanza tra i periodi in cui sono state determinate le concentrazioni maggiori e quelli in cui c'è stata scarsa o nessuna evidenza di contaminazione da PCN. I valori di PCN sono complessivamente in accordo con quelli comunemente rilevati in ambiente antartico e riportati in letteratura. Tuttavia, non ci sono ulteriori studi, oltre a quelli su cui si basa questo lavoro si tesi, sulla determinazione di PCN nel biota antartico. I valori determinati sono comunque poco elevati e l'incidenza dei PCN sulla contaminazione totale in *A. colbecki* risulta poco significativa.

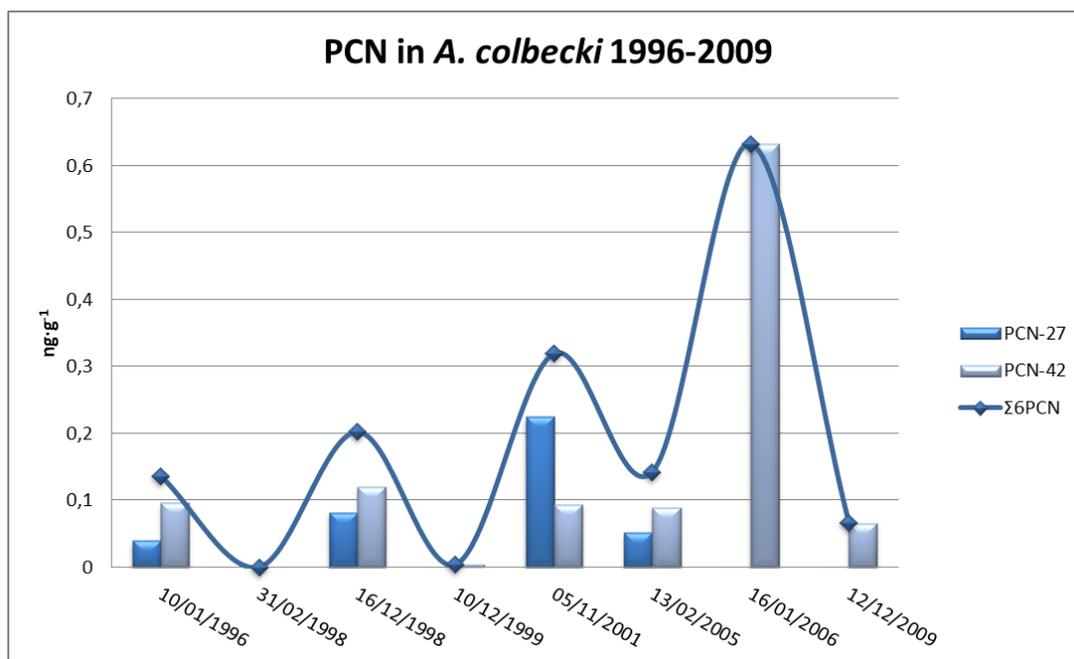


Figura 3.5. Distribuzione delle concentrazioni di policloro naftaleni (PCN), suddivise per congenere, negli 8 *pool* di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

La contaminazione da PBDE presenta un *trend* simile a quello visto per gli IPA (Figura 3.6). Le concentrazioni maggiori si riferiscono ai periodi estivi 1998-99 (campione AC14) e 2004-05 (campione AC20). Anche in questo caso, come riscontrato per gli IPA, il campione più recente (AC25) è caratterizzato da valori significativi ($12.36 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), a differenza di quanto emerso per i PCB ed i PCN, per i quali lo stesso campione è risultato uno tra i meno inquinati.

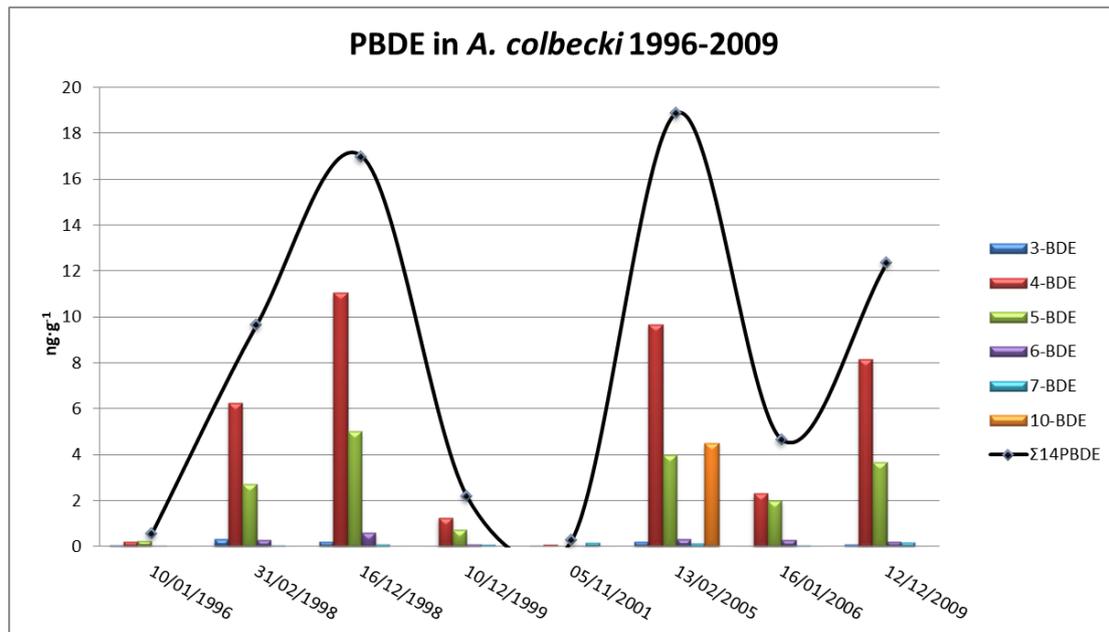


Figura 3.6. Distribuzione delle concentrazioni di polibromo difenileteri (PBDE), suddivise per classi di omologhi, negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

Il trend di PCDD e PCDF è molto simile a quanto appena descritto per i PBDE, con periodi di maggiore contaminazione riconducibili agli anni 1998-99 (campione AC14) e 2004-05 (campione AC20). Il campione AC14, in particolare, presenta i livelli di concentrazione maggiori ($0.705 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) grazie soprattutto al contributo dei congeneri Otta-CDD e Otta-CDF. Il campione più recente, invece, risulta il meno contaminato, in linea con quanto emerso per i PCB (Figura 3.7). In linea generale la distribuzione delle concentrazioni mostra un arricchimento dei congeneri a maggior grado di clorurazione: Epta- ed Otta-CDD/F.

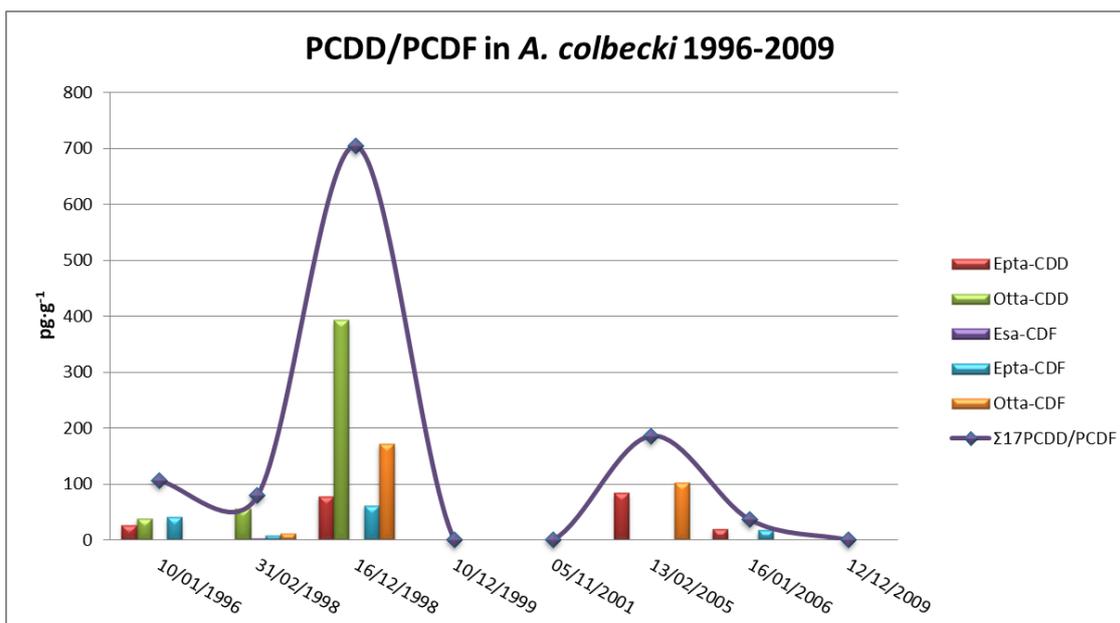


Figura 3.7. Distribuzione delle concentrazioni di policloro dibenzo-p-diossine (PCDD) e policloro dibenzofurani (PCDF), suddivise per classi di omologhi, negli 8 pool di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

Alla luce di quanto emerso dalle diverse distribuzioni di POPs sopra descritte, un'ipotesi comune rimane quella del forte contributo dato da sorgenti locali alla contaminazione, in aggiunta al trasporto a lungo raggio che, generalmente, caratterizza tutte le classi di inquinanti organici persistenti.

In Figura 3.8 viene illustrata la distribuzione delle abbondanze degli acidi carbossilici perfluoroalchilici individuati nei tre campioni *target* analizzati (AC15, AC17 e AC20, riferiti agli anni 1997-98, 1998-99 e 2004-05). Pur essendo un'analisi puramente qualitativa, si possono fare alcune considerazioni: si nota una generale diminuzione dei composti perfluorurati nel *pool* più recente rispetto ai due precedenti. Il *pattern* è guidato dall'acido perfluorodecanoico (PFDA), che risulta il composto più abbondante nei tre campioni. L'unico altro congenere individuato in tutti i campioni, l'acido perfluoroottanoico (PFOA), presenta un andamento più lineare.

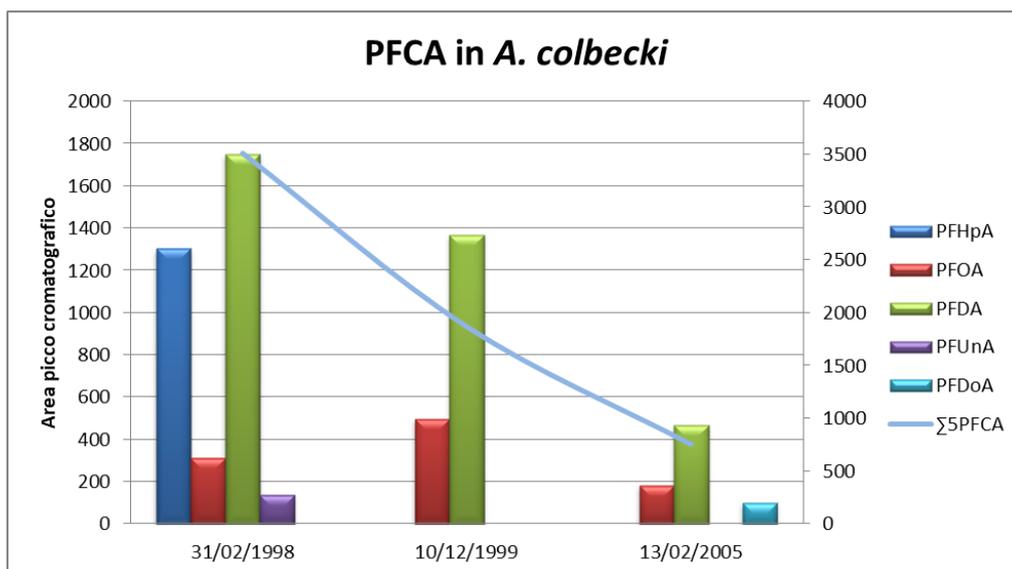


Figura 3.8. Distribuzione delle abbondanze degli acidi carbossilici perfluoroalchilici (PFCA), suddivisi per composto, individuati in 3 pool di campioni di *Adamussium colbecki* campionati tra il 1996 ed il 2009 nella Baia Terra Nova (Mare di Ross).

4 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi riporta i primi dati relativi alle concentrazioni di PCB, IPA, PCN, PBDE e PCDD/PCDF in esemplari di *Adamussium colbecki* grazie all'analisi di organismi campionati nell'arco temporale 1996-2009 e stoccati in banca campioni ambientali antartici (BCAA). La determinazione di queste classi di POPs in tale organismo bivalve antartico ha evidenziato una presenza maggiore di composti ad alto peso molecolare, rispetto a molecole leggere e a basso grado di sostituzione, conducendo all'ipotesi di fonti di contaminazione locali significative.

L'analisi degli 8 *pool* di campioni con la medesima procedura analitica ha portato a dati omogenei e comparabili. È stato, quindi, possibile illustrare dei *trends* temporali della contaminazione da POPs in *A. colbecki*, i quali hanno mostrato una certa concordanza tra loro, evidenziando periodi dove gli organismi sono risultati maggiormente inquinati, ed altri in cui la contaminazione è risultata particolarmente bassa. A causa dei pochissimi studi a disposizione sull'*A. colbecki*, risulta difficile dare un significato ambientale certo alla contaminazione rilevata dal presente lavoro. Un aspetto importante da considerare è certamente rappresentato dai periodi di campionamento. Le 8 spedizioni sono state tutte condotte nel periodo estivo australe, in cui il fenomeno dello scioglimento dei ghiacci porta al dilavamento degli inquinanti dal continente alla colonna d'acqua, rendendoli così biodisponibili. Le anomalie emerse dal *pool* di campioni dell'estate australe 1997-98 hanno portato ad ipotizzare un apporto alla contaminazione dato dalla più intensa attività antropica riscontrata in Baia Terra Nova in quel periodo.

La determinazione qualitativa degli acidi carbossilici perfluoroalchilici ha risposto alla sfida analitica della messa a punto di una metodica per l'analisi di PFASs in gascromatografia. I risultati ottenuti inducono a procedere nel perfezionamento del metodo. La presenza di questi composti in campioni di *A. colbecki* non risulta oggetto di altri studi disponibili in letteratura e rappresenta, quindi, un'evidenza importante. Da qui l'interesse ad effettuare, in un futuro prossimo, nuove analisi su ulteriori aliquote degli stessi campioni richieste alla BCAA, in un'ottica quantitativa.

5 ALLEGATI

ALLEGATO A

Soluzioni standard marcate isotopicamente utilizzate per PCB, PCN, IPA, PBDE, PCDD/PCDF e PFASs.

EC-4187	Co-Planar PCB Mixture	3 mL in Nonane
	Labeled PCBs	IUPAC#
	3,3',4,4'-TetraCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	77
	3,4,4',5-TetraCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	81
	3,3',4,4',5-PentaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	126
	3,3',4,4',5,5'-HexaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	169
		Concentration (µg/mL)
		1.0
		1.0
		1.0
		1.0
EC-4188	Mono-Ortho PCB Mixture	3 mL in Nonane
	Labeled PCBs	IUPAC#
	2,3,3',4,4'-PentaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	105
	2,3,4,4',5-PentaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	114
	2,3',4,4',5-PentaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	118
	2',3,4,4',5-PentaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	123
	2,3,3',4,4',5-HexaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	156
	2,3,3',4,4',5'-HexaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	157
	2,3',4,4',5,5'-HexaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	167
	2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB (¹³ C ₁₂ ,99%)	189
		Concentration (µg/mL)
		1.0
		1.0
		1.0
		1.0
		1.0
		1.0
		1.0
EC-4189-A	¹³ C ₁₂ -Labeled Mono-Deca PCBs PCBs-3/15/28/52/118/153/180/194/208/209	3 mL in Nonane
	¹³C-Labeled Compounds	IUPAC#
	4-Monochlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	3
	4,4'-Dichlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	15
	2,4,4'-Trichlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	28
	2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	52
	2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	118
	2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	153
	2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	180
	2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	194
	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-Nonachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	208
	Decachlorobiphenyl (¹³ C ₁₂ , 99%)	209
		Concentration (ug/mL)
		1
		1
		1
		1
		1
		1
		1
		1
		1
		1

Labeled PCBs solutions		1.2 mL in Nonane
	Labeled PAHs	Concentration µg/mL
EC-1426	2,2',3,4,5,5'-HEXACB (PCB-141) (¹³ C ₁₂ ,99%)	40 ± 2
EC-1434	2,2',4,4'-TETRACB (PCB-47) (¹³ C ₁₂ ,99%)	40 ± 2

Labeled PAHs solutions		1.2 mL in Nonane
	Labeled PAHs	Concentration µg/mL
CLM-2451	Phenanthrene (¹³ C ₆ ,99%)	100
CLM-2477	Acenaphthylene (¹³ C ₆ ,99%)	100
CLM-2722	Benzo[a]pyrene (¹³ C ₄ ,99%)	100
CLM-3757	Chrysene (¹³ C ₆ ,99%)	100

EO-5277	Method 1614 Labeled Surrogate Stock Solution	1.2 mL in Nonane
Labeled BDEs	BDE #	Concentration (µg/mL)
2,4,4'-TriBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	28L	1
2,2',4,4'-TetraBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	47L	1
2,2',4,4',5-PentaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	99L	1
2,2',4,4',6-PentaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	100L	1
2,2',4,4',5,5'-HexaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	153L	1
2,2',4,4',5,6'-HexaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	154L	1
2,2',3,4,4',5',6-HeptaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	183L	1
DecaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	209L	10

EDF-8999	Method 1613 Labeled Compound Stock Solution	500 µl in Nonane
Labeled Dioxins & Furans	Concentration (ng/mL)	
2,3,7,8-TCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
2,3,7,8-TCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,7,8-PeCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,7,8-PeCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
2,3,4,7,8-PeCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,4,7,8-HxCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,6,7,8-HxCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,4,7,8-HxCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,6,7,8-HxCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,7,8,9-HxCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
2,3,4,6,7,8-HxCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	
OCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	200	

EO-5101	Polybrominated Diphenyl Ether Performance Standard Solution	1.2 mL in Nonane	
		EO-5101	EO-5101-10x-1.2
	Labeled BDEs	Concentration (ng/mL)	Concentration (ng/mL)
	BDE#		
	3,3',4,4'-TetraBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	100	1000
	3,3',4,4',5-PentaBDE (¹³ C ₁₂ ,99%)	150	1500

EDF-5999	Method 1613 Internal Standard Spiking Solution	0.5 mL in Nonane	
	Labeled Dioxins	Concentration (ng/mL)	
	1,2,3,4-TCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	200	
	1,2,3,7,8,9-HxCDD (¹³ C ₁₂ ,99%)	200	

Labeled PFASs solution

1.2 mL in Nonane

	Labeled PFASs	Concentration µg/mL
CLM-8005	Perfluorooctanoic acid (PFOA) (¹³ C ₈ ,99%)	50

ALLEGATO B

Tabella 5.1. Concentrazioni di PCB, PCN e IPA e somma delle concentrazioni (Σ PCB, Σ PCN, Σ IPA) dei congeneri negli 8 *pool* di campioni di di *A. colbecki* raccolti a Baia Terra Nova nell'arco temporale 1996-2009 (ng·g⁻¹ peso secco; Grotti *et al.*, 2016).

Campione	PCB-1	PCB-2	PCB-3	PCB-4,10	PCB-9,7	PCB-6	PCB-8,5	PCB-12	PCB-15	PCB-19	PCB-18	PCB-17
AC11	0.223	0.141	0.036	< LOD ^a	< LOD	< LOD	0.533	< LOD	0.341	< LOD	< LOD	< LOD
AC13	0.187	0.226	0.169	< LOD	0.090	0.382	0.622	< LOD	0.287	< LOD	0.154	0.190
AC14	0.128	0.050	0.030	< LOD	< LOD	0.319	0.482	< LOD	0.249	< LOD	0.218	0.375
AC15	< LOD	0.003	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.362	< LOD	0.093	< LOD	0.050	0.025
AC17	< LOD	0.010	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.766	< LOD	0.250	< LOD	0.113	0.066
AC20	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.551	< LOD	0.525	0.136	0.290	< LOD	0.063	0.089
AC21	0.249	0.014	0.177	< LOD	< LOD	< LOD	0.949	< LOD	0.565	< LOD	< LOD	< LOD
AC25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.520	< LOD	0.293	< LOD	0.208	< LOD	0.069	0.090
Campione	PCB-27,24	PCB-32,16	PCB-29	PCB-34	PCB-26	PCB-25	PCB-31	PCB-28	PCB-33,20	PCB-22	PCB-37	PCB-45
AC11	< LOD	0.229	< LOD	< LOD	< LOD	0.282	< LOD	0.888	0.318	0.500	0.128	< LOD
AC13	< LOD	0.150	< LOD	< LOD	< LOD	0.234	0.782	2.180	0.279	0.415	< LOD	< LOD
AC14	< LOD	0.116	< LOD	< LOD	0.108	0.134	< LOD	0.103	0.188	0.235	0.054	< LOD
AC15	< LOD	0.090	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.100	0.110	< LOD	< LOD	< LOD
AC17	0.464	0.075	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.005	0.245	< LOD	0.196	0.171
AC20	0.137	0.070	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.037	0.252	< LOD	0.404	0.043
AC21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.039	0.283	0.282	0.222	0.447
AC25	0.071	0.050	0.022	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.124	0.076	0.074	< LOD
Campione	PCB-46	PCB-69	PCB-52	PCB-49	PCB-47,48	PCB-44	PCB-59,42	PCB-71,64,41	PCB-40	PCB-67	PCB-63	PCB-74
AC11	< LOD	< LOD	0.242	< LOD	0.159	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.116
AC13	< LOD	< LOD	3.417	0.086	0.245	0.716	< LOD	0.537	< LOD	0.326	< LOD	1.086
AC14	< LOD	< LOD	0.282	0.037	0.099	0.105	0.002	< LOD	0.027	< LOD	< LOD	0.104
AC15	< LOD	< LOD	0.243	< LOD	0.027	0.032	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.020
AC17	0.131	0.007	0.093	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.182	< LOD	< LOD	0.053	0.413
AC20	0.123	0.032	0.093	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.260	< LOD	< LOD	0.057	0.332
AC21	< LOD	0.100	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.376	< LOD	< LOD	< LOD	0.503
AC25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.215	< LOD	< LOD	0.007	0.255

Campione	PCB-99	PCB-119	PCB-83	PCB-97	PCB-87,115	PCB-85	PCB-110	PCB-82	PCB-107	PCB-123	PCB-118	PCB-114
AC11	0.366	< LOD	< LOD	0.177	0.330	< LOD	0.907	< LOD	< LOD	0.904	< LOD	< LOD
AC13	5.195	< LOD	< LOD	0.547	0.963	0.480	7.017	0.679	< LOD	6.074	7.878	7.064
AC14	0.268	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.368	< LOD	< LOD	0.221	< LOD	< LOD
AC15	0.279	< LOD	< LOD	0.001	0.050	< LOD	0.420	< LOD	< LOD	0.309	0.398	0.317
AC17	0.146	< LOD	< LOD	0.059	0.105	0.033	0.314	< LOD	< LOD	< LOD	0.158	< LOD
AC20	0.098	< LOD	< LOD	0.058	0.114	0.036	0.248	< LOD	< LOD	< LOD	0.190	< LOD
AC21	0.228	< LOD	< LOD	0.121	0.180	< LOD	0.396	< LOD	< LOD	0.469	< LOD	< LOD
AC25	0.031	< LOD	< LOD	0.002	0.037	< LOD	0.153	< LOD	0.074	< LOD	0.086	< LOD
Campione	PCB-105	PCB-126	PCB-136	PCB-151	PCB-135,144	PCB-147	PCB-149	PCB-134	PCB-131	PCB-146	PCB-153	PCB-132
AC11	< LOD	< LOD	0.283	0.404	0.294	< LOD	1.573	< LOD	< LOD	< LOD	3.264	0.639
AC13	7.470	6.184	0.132	4.184	0.186	0.184	4.630	< LOD	< LOD	5.085	6.119	0.372
AC14	2.528	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC15	0.767	0.323	0.001	0.218	< LOD	< LOD	0.297	< LOD	< LOD	0.249	0.341	< LOD
AC17	0.771	< LOD	0.401	0.529	0.371	< LOD	1.813	< LOD	< LOD	< LOD	2.798	0.607
AC20	0.685	< LOD	< LOD	0.106	0.115	< LOD	0.262	< LOD	< LOD	< LOD	0.297	0.051
AC21	3.718	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.167	< LOD	< LOD	< LOD	0.274	< LOD
AC25	0.354	0.052	< LOD	0.022	0.039	< LOD	0.209	< LOD	< LOD	< LOD	0.273	< LOD
Campione	PCB-141	PCB-137	PCB-164,138	PCB-158	PCB-129	PCB-128	PCB-167	PCB-156	PCB-157	PCB-169	PCB-179	PCB-176
AC11	0.462	< LOD	2.918	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.153	< LOD
AC13	< LOD	< LOD	5.981	< LOD	< LOD	5.450	5.816	5.588	5.804	4.432	< LOD	< LOD
AC14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC15	0.044	0.231	0.402	< LOD	< LOD	0.203	0.327	0.285	0.279	0.211	< LOD	0.109
AC17	0.411	< LOD	2.398	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.098
AC20	0.039	< LOD	0.299	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.263
AC21	< LOD	< LOD	0.362	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC25	0.054	< LOD	0.309	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Campioni	PCB-178	PCB-187	PCB-183	PCB-185	PCB-174	PCB-177	PCB-171	PCB-173	PCB-172	PCB-180	PCB-193	PCB-191
AC11	< LOD	0.646	< LOD	< LOD	0.475	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1.971	< LOD	< LOD
AC13	< LOD	6.042	4.975	< LOD	< LOD	5.105	< LOD	< LOD	< LOD	5.999	< LOD	< LOD
AC14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC15	< LOD	0.320	0.284	< LOD	< LOD	0.240	< LOD	< LOD	< LOD	0.297	0.091	< LOD
AC17	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC20	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.010	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.077	< LOD	< LOD
AC21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.165	< LOD	< LOD
Campioni	PCB-170,190	PCB-189	PCB-197	PCB-199	PCB-203,196	PCB-195	PCB-194	PCB-205	PCB-208	PCB-207	PCB-206	PCB-209
AC11	1.465	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC13	3.998	5.909	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.972
AC14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC15	0.279	0.591	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC17	< LOD	0.184	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC20	< LOD	0.332	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Campioni	PCN-27	PCN-42	PCN-52	PCN-67	PCN-73	PCN-75	NAPH^b	ACNY	ACN	FLU	PHE	ANT
AC11	0.040	0.096	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2.419	< LOD
AC13	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	9.848	0.041
AC14	0.082	0.120	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC15	< LOD	0.004	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC17	0.225	0.094	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.017
AC20	0.052	0.089	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	8.999	1.714
AC21	< LOD	0.632	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC25	< LOD	0.066	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Campioni	FLT	PYR	BAA	CRY	BBF	BKF	BAP	BPER	IPYR	DAHA	ΣPCB	ΣPCN
AC11	< LOD	< LOD	0.036	< LOD	< LOD	< LOD	24.86	0.136				
AC13	14.26	9.823	1.342	1.239	13.32	8.370	< LOD	< LOD	46.26	< LOD	183.6	< LOD
AC14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	8.325	0.202
AC15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	3.658	3.227	4.411	3.926	< LOD	< LOD	11.19	0.004
AC17	14.24	23.87	0.921	0.844	58.45	55.26	20.30	35.77	54.07	< LOD	15.10	0.319
AC20	43.55	58.58	2.295	4.050	2.734	< LOD	9.053	28.52	1.523	< LOD	7.425	0.142
AC21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	10.59	0.632
AC25	10.87	16.48	0.496	1.463	4.276	< LOD	8.892	11.22	< LOD	< LOD	4.176	0.066
Campioni	ΣIPA											
AC11	2.455											
AC13	104.5											
AC14	< LOD											
AC15	15.22											
AC17	263.7											
AC20	161.0											
AC21	< LOD											
AC25	53.70											

Note: ^a *Limit Of Detection*;

^b NAPH: Naphthalene; ACNY: Acenaphthylene; ACN: Acenaphthene; FLU: Fluorene; PHE: Phenanthrene; ANT: Anthracene; FLT: Fluoranthene; PYR: Pyrene; BAA: Benz[a]anthracene; CRY: Chrysene; BBF: Benzo[b]fluoranthene; BKF: Benzo[k]fluoranthene; BAP: Benzo[a]pyrene; BPER: Benzo[ghi]perylene; IPYR: Indeno[1,2,3-cd]pyrene; DAHA: Dibenz[a,h]anthracene.

Tabella 5.2. Concentrazioni di PBDE per congeneri negli 8 *pool* di campioni di *A. colbecki* raccolti a Baia Terra Nova nell'arco temporale 1996-2009 (ng·g⁻¹ peso secco).

Campione	BDE-17	BDE-28	BDE-71	BDE-47	BDE-66	BDE-100	BDE-99
AC11	0.02	0.04	0.08	0.07	0.08	0.21	LDL
AC13	0.12	0.20	0.39	5.79	0.08	0.64	2.02
AC14	0.09	0.12	0.61	10.0	0.45	1.56	3.30
AC15	< LOD	< LOD	0.08	0.98	0.20	0.16	0.50
AC17	0.01	0.01	0.08	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC20	0.07	0.14	0.38	8.83	0.48	0.93	2.99
AC21	< LOD ^a	< LOD	0.22	2.06	0.04	1.13	0.66
AC25	0.01	0.10	0.32	7.55	0.31	0.80	2.76
Campione	BDE-85	BDE-154	BDE-153	BDE-138	BDE-183	BDE-190	BDE-209
AC11	0.03	0.04	< LOD				
AC13	0.08	0.08	0.08	0.13	0.05	< LOD	< LOD
AC14	0.16	0.29	0.32	< LOD	< LOD	0.10	< LOD
AC15	0.07	0.04	0.07	< LOD	0.04	0.04	< LOD
AC17	< LOD	< LOD	0.02	0.01	0.03	0.13	< LOD
AC20	0.09	0.15	0.13	0.04	0.15	< LOD	4.50
AC21	0.21	0.09	0.15	0.04	< LOD	0.05	< LOD
AC25	0.12	0.14	0.07	< LOD	0.19	< LOD	< LOD

Note: ^a *Limit Of Detection*.

Tabella 5.3. Concentrazioni di PCDD E PCDF per congeneri negli 8 *pool* di campioni di *A. colbecki* raccolti a Baia Terra Nova nell'arco temporale 1996-2009 (ng·g⁻¹ peso secco).

Campione	2,3,7,8-TCDD	1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	OCDD	2,3,7,8-TCDF	1,2,3,7,8-PeCDF
AC11	< LOD ^a	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	26.61	38.71	< LOD	< LOD
AC13	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	55.34	< LOD	< LOD
AC14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	77.98	392.66	< LOD	< LOD
AC15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC17	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
AC20	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	83.74	< LOD	< LOD	< LOD
AC21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	19.05	< LOD	< LOD	< LOD
AC25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Campione	2,3,4,7,8-PeCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	OCDF	
AC11	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	18.40	22.18	< LOD	
AC13	< LOD	< LOD	< LOD	3.21	< LOD	8.37	< LOD	12.18	
AC14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	51.77	10.09	171.56	
AC15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
AC17	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
AC20	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	102.26	
AC21	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	17.25	< LOD	< LOD	
AC25	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	

Note: ^a LOD = Limit of Detection.

6 BIBLIOGRAFIA

- Alaee M., Arias P., Sjo A. (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, 683–689.
- Albero B., Sánchez-Brunete C., García-Valcárcel A. I., Pérez R. A. (2015). *Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples*. Trends in Analytical Chemistry, 71, 110-118.
- Antignac J. P., Main K. M., Virtanen H. E., Boquien C. Y., Marchand P. (2016). *Country-specific chemical signatures of persistent organic pollutants (POPs) in breast milk of French, Danish and Finnish women*. Environmental Pollution, 218, 728–738.
- Arhens L. (2011). *Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate*. Journal of Environmental Monitoring, 13, 20–31.
- Arnot J. A., & Gobas F. A. P. C. (2006). *A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms*, Environmental Reviews, 14, 257–297.
- Arvaniti O. S., Stasinakis A. S. (2015). *Review on the occurrence, fate and removal of perfluorinated compounds during wastewater treatment*. Science of the Total Environment, 524–525, 81–92.
- ATSDR (1995). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. US Department of Health and Human Services, editor.
- 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.
- Bargagli R. (2008). *Environmental contamination in Antarctic ecosystems*. Science of the Total Environment, 400(1–3), 212–226.
- Berkman, A. P., Nigro, M. (1992). *Trace Metal Concentrations in Scallops Around Antarctica: the Southern Ocean*. Marine Pollution Bulletin, 24, 322–323.
- Brevik K., Sweetman A., Pacyna J. M., Jones K. C. (2002). *Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners - a mass balance approach 1. Global production and consumption*, The Science of the Total Environment, 290, 181–198.

- Borghesi N., Corsolini S., Leonards P., Brandsma S., Boer J. De, Focardi, S. (2009). *Polybrominated diphenyl ether contamination levels in fish from the Antarctic and the Mediterranean Sea*. *Chemosphere*, 77(5), 693–698.
- Buck R. C., Franklin J., Berger U., Conder J. M., Cousins I. T., De Voogt P., Jensen A. A., Kannan K., Mabury A. S., van Leeuwen S. P. J. (2011). *Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances in the Environment: Terminology, Classification, and Origins*, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4), 513–541.
- Cattaneo-vietti R., Chiantore M., Albertelli G. (1997). *The population structure and ecology of the Antarctic scallop Adamussium colbecki (Smith, 1902) at Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctic)*, *Scientia Marina*, 61,15–24.
- Chiantore M., Albertelli G., Misic C., Fabiano M. (1998). *Role of filtering and biodeposition by Adamussium colbecki in circulation of organic matter in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica)*, *Journal of Marine Systems*, 17, 411-424.
- Chiantore M., Cattaneo-vietti R., Elia L., Guidetti M., Antonini M. (2002). *Reproduction and condition of the scallop Adamussium colbecki (Smith 1902), the sea-urchin Stereochinus neumayeri (Meissner 1900) and the sea-star Odontaster validus (Koehler 1911) at Terra Nova Bay (Ross Sea): different strategies related to inter-annual variations in food availability*. *Polar Biology*, 25(4), 251-255.
- Chiantore M., Cattaneo-vietti R., Heilmayer O., (2003). *Antarctic scallop (Adamussium colbecki) annual growth rate at Terra Nova Bay*. *Polar Biology*. 26, 416-419.
- Cincinelli A., Martellini T., Del Bubba M., Lepri L., Corsolini S., Borghesi N. King M. D., Dickhut R. M. (2009). *Organochlorine pesticide air-water exchange and bioconcentration in krill in the Ross Sea*. *Environmental Pollution*, 157(7), 2153–2158.
- Cincinelli A., Martellini T., Pozo K., Kuku P. (2016). *Trematomus bernacchii as an indicator of POP temporal trend in the Antarctic seawaters*, *Environmental Pollution*, 217, 19–25.
- Connell, W. (1997). *Basic concept of environmental chemistry*. Lewis Publisher, USA.
- Corsolini S. (2009). *Industrial contaminants in Antarctic biota*, *Journal of Chromatography A*, 1216, 598–612.
- Croes K., Colles A., Koppen G., Govarts E., Bruckers L., Van De Mierop E., Nelen V., Covaci A., Dirtu A.C., Thomsen C., Haug L.S., Becher G., Mampaey M., Schoeters G. Van Larebeke N., Baeyens W. (2012). *Chemosphere Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: A biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium)*. *Chemosphere*, 89(8), 988–994.
- Darnerud P.O., Eriksen G.S., Jóhannesson T., Larsen P.B., Viluksela M. (2001). *Polybrominated Diphenyl Ethers: Occurrence, Dietary Exposure and Toxicology Chemical and Physical Properties of PBDEs*, *Environmental Health Perspectives*, 109, 49–68.

- De Voogt P., Brinkman U. A. Th. (1989). *Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls*. Kimbrough and Jensen (eds.) Halogenated biphenyls, Terphenyls, Naphtalenes, Dibenzodioxins and related products, Chapter 1, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).
- De Voogt P. (2006). *Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances*, Trends in Analytical Chemistry, 25(4).
- Ding G., Yu J., Chen L., Wang C., Zhou Y., Hu Y., Shi R., Zhang Y., Cui C., Gao Y., Tian Y., Liu, F. (2017). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and thyroid hormones in cord blood, Environmental Pollution, 229, 489-495.
- Dufková V., Cabala R., Maradová D., Stícha M. (2009). *A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids*, Journal of Chromatography A, 1216, 8659–8664.
- Dufková, V., Radomír, C, Ševc, V. (2012). *Determination of C5 - C12 perfluoroalkyl carboxylic acids in river water samples in the Czech Republic by GC-MS after SPE preconcentration*, Chemosphere, 87, 463–469.
- ENEA – Progetto Antartide. Programma Nazionale di Ricerche in Antartide. Rapporto sulla Campagna Antartica Estate Australe 1997-98. Tredicesima Spedizione. A cura di M. Chiara Ramorino.
- Erickson M. D. (1997), *Analytical Chemistry of PCBs*, Second edition, Boca Raton, FL: CRC Press/Lewis Publisher, USA.
- Fernandes A., Rose M., Falandysz J. (2017). *Polychlorinated naphthalenes (PCNs) in food and humans*. Environment International, 104, 1-13.
- Goerke H., Weber K., Bornemann H., Ramdohr S., Plötz J. (2004). *Increasing levels and biomagnification of persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic biota*, Marine Pollution Bulletin, 48, 295–302.
- Grotti M., Pizzini S., Luisa M., Cozzi G., Piazza R., Soggia F. (2016). *Retrospective biomonitoring of chemical contamination in the marine coastal environment of Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica) by environmental specimen banking*. Chemosphere, 165, 418–426.
- Guidetti M., Marcato S., Chiantore M., Patarnello T., Albertelli G., Cattaneo-vietti, R. (2006). *Exchange between populations of *Adamussium colbecki* (Mollusca: Bivalvia) in the Ross Sea*, 18(4), 645–653.
- Hahm J., Manchester-Neesvig J.B., DeBrod D., Sonzogni W.C. (2009). *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Lake Michigan forage fish*. Journal of Great Lakes Research (Vol.35), 154-158.

- Hall J. E. (2014). *Bioconcentration, Bioaccumulation, and the Biomagnification in Puget Sound Biota: Assessing the Ecological Risk of Chemical Contaminants in Puget Sound*, Tahoma West Literary Arts Magazine 8,40–51.
- Hayward, D. (1998). *Identification of Bioaccumulating Polychlorinated Naphthalenes and Their Toxicological Significance*, Environmental Research, Section A 76, 1-18.
- Heilmayer O., Brey T., Chiantore M., Cattaneo-vietti R., Arntz W. E. (2003). *Age and productivity of the Antarctic scallop, Adamussium colbecki, in Terra Nova Bay*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 288, 239–256.
- Hoogenboom R., Traag W., Fernandes A., Rose M. (2015). *European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain*. Food Control, 50, 670–683.
- Hooth, M. J., Nyska, A., Fomby, L. M., Vasconcelos, D. Y., Vallant, M., Devito, M. J., & Walker, N. J. (2012). *Repeated dose toxicity and relative potency of 1,2,3,4,6,7-hexachloronaphthalene (PCN 66) 1,2,3,5,6,7-hexachloronaphthalene (PCN 67) compared to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) for induction of CYP1A1, CYP1A2 and thymic atrophy in female Harlan Sprague - Dawley rats*. Toxicology, 301(1-3), 85-93.
- Huang, M. & Penning T. M. (2014). *Processing Contaminants: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Encyclopedia of Food Safety (Vol. 2). Elsevier Inc.
- Jakobsson E, Asplund L. (2000). *Polychlorinated naphthalenes (PCNs)*. In: Paasivirta J, editor. The Handbook of Environmental Chemistry -New Types of Persistent Halogenated Compounds. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag pp. 97-126.
- Kapp Jr, R. W. (2014). *TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)*. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) Vol. 4, 476-480.
- Klečka G. M., Muir D. C. G., Dohmen P., Eisenreich S. J., Gobas F. A. P. C., *et al.*, (2009). *Introduction to Special Series: Science-Based Guidance and Framework for the Evaluation and Identification of PBTs and POPs*. Integrated Environmental Assessment and Management 5(4): 535-538.
- Krafft M. P., Riess J. G. (2015). *Per- and poly fluorinated substances (PFASs): Environmental challenges*, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 20, 192–212.
- Kulkarni P. S., Crespo J. G., Alfonso C. A. M. (2011). *Dioxins*. Encyclopedia of Environmental Health, Elsevier, New York. 83-92.
- Kumar K. S., Kannan K., Corsolini, S. (2002). *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in polar bear, penguin and south polar skua*, Environmental Pollution, 119, 151–161.
- Lei M., Zhang L., Lei J., Zong L., Li J., Wu Z., Wang Z. (2015). *Overview of Emerging Contaminants and Associated Human Health Effects*, BioMed Research International.

- Liu, G., Cai, Z., & Zheng, M. (2014). *Sources of unintentionally produced polychlorinated naphthalenes*. *Chemosphere*, 94, 1-12.
- Lohmann R., Breivik K., Dachs J., Muir D. (2007). *Global fate of POPs: Current and future research directions*, *Environmental Pollution*, 150, 150–165.
- Llorca M., Farré M., Sebastián M., Alonso B., Koremblit G., Barceló, D. (2012). *Fate of a broad spectrum of per fluorinated compounds in soils and biota from Tierra del Fuego and Antarctica*. *Environmental Pollution*, 163, 158–166.
- Magulova, K., & Priceputu, A. (2016). *Global monitoring plan for persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention: Triggering, streamlining and catalyzing global POPs monitoring*. *Environmental Pollution*, 217, 82–84.
- Majkova, Z., Oesterling, E., Toborek, M., & Hennig, B. (2008). *Impact of nutrition on PCB toxicity*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25, 192–196.
- Moret S., Purcaro G., Conte L. S. (2014). *Il campione per l'analisi chimica. Tecniche innovative e applicazioni nei settori agroalimentare e ambientale*. Springer-Verlag Mailand. ISBN 978-88-470-5738-8.
- Murnyak G., Vandenberg J., Yaroschak P. J., Williams L., Prabhakaran K., Hinz J. (2011). *Emerging contaminants: Presentations at the 2009 Toxicology and Risk Assessment Conference*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(2), 167–169.
- Nerin C., Seco B., Tena A., Calvo M. (2014). *Seveso Disaster and the European Seveso Directives*. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition) Vol. 4*, 244-247.
- Rodenburg L. A., Guo J., Du S., Cavallo G. J. (2010). *Evidence for Unique and Ubiquitous Environmental Sources of 3,3'-Dichlorobiphenyl (PCB 11)*, *Environmental Science and Technology*, 44, 2816–2821.
- Pereira, M.D.S., (2004). *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): main sources, environmental behaviour and risk to man and biota*, *Quimica Nova*, 27(6), 934–943.
- Petreas M., Nelson D., Brown F. R., Goldberg D., Hurley S., Reynolds P. (2011). *High concentrations of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in breast adipose tissue of California women*. *Environment International*, 37(1), 190–197.
- Piazza R., Gambaro A., Argiriadis E., Vecchiato M., Zambon S., Cescon P., Barbante C., (2013). *Development of a method for simultaneous analysis of PCDDs, PCDFs, PCBs, PBDEs, PCNs and PAHs in Antarctic air*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405, 917-932.
- Pizzini S., Marchiori E., Piazza R., Cozzi G., Barbante C. (2015). *Determination by HRGC/HRMS of PBDE levels in edible Mediterranean bivalves collected from north-western Adriatic coasts*. *Microchemical Journal*, 121, 184–191.

- Pizzini S., Sbicego C., Corami F., Grotti M., Magi E., Bonato T., Cozzi G., Barbante C., Piazza, R. (2017). *3,3'-dichlorobiphenyl (non-Aroclor PCB-11) as a marker of non-legacy PCB contamination in marine species: comparison between Antarctic and Mediterranean bivalves*. *Chemosphere*, 175, 28–35.
- Rahman M. F., Peldszus S., Anderson W. B. (2014). *Behaviour and fate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: A review*. *Water Research*, 50, 318–340.
- Schechter A., Birnbaum L., Ryan J. J., Constable J. D. (2006). *Dioxins: An overview*, *Environmental Research*, 101, 419–428.
- Schiavone A., Corsolini S., Kannan K., Tao L., Trivelpiece W., Torres Jr D., Focardi, S. (2009). *Perfluorinated contaminants in fur seal pups and penguin eggs from South Shetland, Antarctica*. *Science of the Total Environment*, 407(12), 3899–3904.
- Soggia F., Ianni C., Magi E., Frache R. (2001). *Antarctic Environmental Specimen Bank*. In: Caroli, S., Cescon, P., Walton, B.T. (Eds.), *Environmental Contamination in Antarctica, a Challenge to Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 305-325. ISBN 978-0-08-043199-4.
- Siddiqi M. A., Laessig R. H., Reed K. D. (2003). *Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants-Old Diseases*. *Clinical Medicine & Research*, 1(4), 281-290.
- Siddique S., Xian Q., Abdelouahab N., Takser L., Phillips S. P., Feng Y., Wang B., Zhu, J. (2012). *Levels of dechlorane plus and polybrominated diphenylethers in human milk in two Canadian cities*. *Environment International*, 39(1), 50–55.
- Stockton W. L. (1984). *The biology and ecology of the epifaunal scallop *Adamussium colbecki* on the west side of McMurdo Sound, Antarctica*, *Marine Biology*, 78, 171–178.
- Strobel A., Schmid P., Segner H., Burkhardt-holm P., Zennegg M. (2016). *Persistent organic pollutants in tissues of the white-blooded Antarctic fish *Champscephalus gunnari* and *Chaenocephalus aceratus**. *Chemosphere*, 161, 555–562.
- Sun W., Du L., Tang W., Kuang L., Du P., Chen J., Chen D. (2017). *PBDE-209 exposure damages learning and memory ability in rats potentially through increased autophagy and apoptosis in the hippocampus neuron*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 50, 151–158.
- Taniguchi S., Montone R. C., Bicego M. C., Imperatrice F., Roland R., Sericano J. L. (2009). *Chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in the fat tissue of seabirds from King George Island, Antarctica*. *Marine Pollution Bulletin*, 58(1), 129–133.
- Thomas G. O. (2008). *Polychlorinated Biphenyls*. *Ecotoxicology*, 2872-2881.

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, 2001. Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs).

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunström B., Cook P., et al. (1998), *Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for human and wildlife*. Environmental Health Perspectives 106: 775-792.

Vecchiato M., Argiriadis E., Zambon S., Barbante C., Toscano G., Gambaro A., Piazza R. (2015). *Persistent Organic Pollutants (POPs) in Antarctica: Occurrence in continental and coastal surface snow*. Microchemical Journal, 119, 75–82.

WHO, 2003. *Health risk of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution*.

WHO, 2005. *The World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds*, Toxicological Sciences 93(2), 223-241.

7 SITOGRAFIA

1. http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.htm.
2. <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>.
3. <http://www.webbofscience.com/2009/05/23/molecule-of-the-week-polychlorinated-biphenyls-pcbs/>
4. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/34104?lang=it®ion=IT>
5. <http://afg.biodiversity.aq/species/23-adamussium-colbecki>
6. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html>

8 TESI CONSULTATE

ARGIRIADIS ELENA. *Determinazione di composti organici persistenti (POPs) in campioni di aerosol provenienti da aree urbane e remote*. Università Ca' Foscari di Venezia. Corso di Laurea in Scienze Ambientali, A.A. 2009/2010.

FEDON LORENZO. *Determinazione di microcontaminanti organici (PBDE) in campioni di terreno prelevati nei pressi della stazione scientifica italiana Mario Zucchelli (MZS) a Baia Terra Nova, Antartide*. Università Ca' Foscari di Venezia. Corso di Laurea in Scienze Ambientali, A.A. 2014/2015.

MARCHIORI ENRICO. *Determinazione di POPs provenienti da combustione di scarti di potatura di vigneto in atmosfera controllata*. Università Ca' Foscari di Venezia. Corso di Laurea in Scienze Ambientali, A.A. 2012/2013.

POLO FABIO PAOLO. *Studio della contaminazione chimica nella Laguna di Nador (Marocco) attraverso l'analisi di microcontaminanti organici ed inorganici in campioni di sedimento*. Università Ca' Foscari di Venezia. Corso di Laurea in Scienze Ambientali, A.A. 2010/2011.

RIZZATO GIOVANNI. *Studio dell'ambiente litoraneo veneto attraverso la caratterizzazione chimica di microcontaminanti in campioni di acqua*. Università Ca' Foscari di Venezia. Corso di Laurea in Scienze Ambientali, A.A. 2011/2012.

SBICEGO CHIARA. *Sviluppo e validazione di una metodica analitica unica per la determinazione simultanea di due classi di microinquinanti organici (PCB e IPA) in specie ittiche di interesse alimentare*. Università Ca' Foscari di Venezia. Corso di Laurea in Scienze Ambientali, A.A. 2013/2014.

9 GLOSSARIO

Sigla	Significato
ACN	Acenaphtene
ACNY	Acenaphthylene
AhR	Recettore degli idrocarburi aromatici
ANT	Anthracene
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BAA	Benz[a]anthracene
BAF	Fattore di bioaccumulazione
BAP	Benzo[a]pyrene
BBF	Benzo[b]fluoranthene
BCAA	Banca campioni ambientali antartici
BCF	Fattore di bioconcentrazione
BFR	Brominated Flame Retardants
BKF	Benzo[k]fluoranthene
BMF	Fattore di biomagnificazione
BPER	Benzo[ghi]perylene
CLRTAP	Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution
CRY	Chrysene
DAHA	Dibenz[a,h]anthracene
DCCI	Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale
DDT	para-Diclorodifeniltricloroetano
EI	Impatto Elettronico
EPA	Environmental Protection Agency
FLT	Fluoranthene
FLU	Fluorene
FMS	Fluid Management System
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
GMP	Global Monitoring Program
GPC	Gel Permeation Chromatography
HpCDD	Eptacloro dibenzodiossina
HpCDF	Eptacloro dibenzofurano
HRGC/HRMS	High Resolution Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometer
HRGC/LRMS	High Resolution Gas Chromatography/Low Resolution Mass Spectrometer
HPLC/MS-MS	High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometer
HxCDD	Esacoloro dibenzodiossina
HxCDF	Esacoloro dibenzofurano
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICMESA	Industrie Chimiche Meda Società Azionaria
IPA	Idrocarburi Policiclici Aromatici

IPYR	Indeno[1,2,3-CD]pyrene
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LOD	Limit Of Detection
MDL	Method Detection Limit
MID	Multiple Ion Detection
NAPHT	Naphtalene
NIST	National Institute of Standards and Technology
NPL	National Priority List
OCDD	Ottacoloro dibenzodiossina
OCDF	Ottacoloro dibenzofurano
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PBDE	Polibromo difenileteri
PBT	Persistent, Bioaccumulative and Toxic
PCB	Policloro bifenili
PCDD	Policloro dibenzo-para-diossina
PCDF	Policloro dibenzofurani
PCN	Policloro naftaleni
PeCDD	Pentacoloro dibenzodiossina
PeCDF	Pentacoloro dibenzofurano
PFASs	Sostanze perfluoroalchiliche
PFCA	Acidi carbossilici perfluoroalchilici
PFDA	Acido perfluorodecanoico
PFDoA	Acido perfluorododecanoico
PFK	Perfluorokerosene
PFHpA	Acido perfluoroeptanoico
PFOA	Acido perfluoroottanoico
PFOS	Perfluoroottansolfonato
PFNA	Acido perfluorononanoico
PFSA	Acidi solfonici perfluoroalchilici
PFTBA	Perfluorotributilammina
PFUnA	Acido perfluoroundecanoico
PHE	Phenantrene
PNRA	Programma Nazionale di Ricerche in Antartide
POPs	Persistent Organic Pollutants
PYR	Pyrene
SEC	Size Exclusion Chromatography
SIM	Singol Ion Monitoring
SNR	Signal to Noise Ratio
SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Standard Reference Material
TCDD	Tetracloro dibenzo-p-diossina
TEF	Fattore di tossicità equivalente
TEQ	Quoziente di tossicità equivalente

UNECE	United Nations Economic Commission for Europe
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization

Ringraziamenti

Si ringrazia la banca campioni ambientali antartici (BCAA) nell'ambito del programma nazionale di ricerche in Antartide (PNRA), nelle persone di Marco Grotti, Emanuele Magi e Francesco Soggia del dipartimento di chimica e chimica industriale (DCCI) dell'Università degli Studi di Genova, grazie a cui è stata possibile la stesura di questo lavoro.

Al Prof. Rossano Piazza, il ringraziamento più sentito e sincero per gli insegnamenti, il supporto, la guida e la fiducia, aspetti che non sono mai mancati e che sono stati fondamentali per la buona riuscita di questo mio percorso. Per le opportunità, per avermi permesso di vivere numerose esperienze didattiche e professionali, ognuna delle quali ha lasciato un segno importante. Per la disponibilità e la presenza costante a livello sia lavorativo, che umano. Grazie.

Alla Dott.ssa Sarah Pizzini, GRAZIE per avermi insegnato la correttezza, la precisione ed il rigore nel lavoro. Per avermi seguito cinque anni, in una crescita professionale data dalla possibilità di lavorare fianco a fianco con una persona esperta e paziente. Per avermi fatto capire come ci si rialza dai momenti di sconforto. Per la fiducia nelle mie capacità. Per mille altri motivi.

Ai miei genitori e a mio fratello dedico questo lavoro, ringraziandoli per la pazienza ed il sostegno in questo mio lungo percorso di studi accademici. Senza di voi non sarebbe stato possibile.

A Lorenzo Fedon, per l'infinito supporto e la bella amicizia in questa avventura magistrale. A Marta Radaelli e al gruppo di ricerca. Grazie.

Agli amici ex compagni di corso, Alessandra, Camilla, Irene e Yari, grazie a voi ed al sostegno reciproco questi cinque anni sono volati senza particolari difficoltà.

Ai miei maestri nella vita musicale, troppi per essere nominati, un ringraziamento per l'infinita ispirazione che da sempre ricevo e per avermi fatto capire l'importanza di seguire una passione.

Agli amici di sempre e agli amici lontani. Grazie.

