

***ALMA MATER STUDIORUM***  
**UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

**SCUOLA DI SCIENZE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN ANALISI E GESTIONE  
DELL'AMBIENTE**

**DETERMINAZIONE DI CAFFEINA IN ACQUE  
SUPERFICIALI E VALUTAZIONE DEL  
BIOACCUMULO NEI MITILI**

**TESI DI LAUREA**

**in**

**fisiologia applicata all'ambiente**

**CANDIDATO:**

Marco Antonelli

**RELATORE:**

Chiar.mo. Prof. Elena Fabbri

**CORRELATORE:**

Dott.ssa Paola Valbonesi

**ANNO ACCADEMICO 2013/14**

**Sessione II**

## PREMESSA

Una tematica che di recente si è conquistata spazio ed interesse tra gli esperti di analisi e gestione dell'ambiente, environmental assessors e managers, nonché agli occhi dell'opinione pubblica, sempre più sensibile ed informata relativamente alla salvaguardia ambientale, è quella relativa alla presenza in ambiente e alle eventuali conseguenze di prodotti farmaceutici e per la cura personale.

L'entusiasmo che ha guidato le scoperte scientifiche, specie nell'ambito della chimica organica, dal XIX secolo in avanti, ha dovuto infatti fare i conti nel secondo dopoguerra con una rinnovata e forte sensibilità ambientale e preoccupazione per gli effetti collaterali in precedenza trascurati in nome di un intramontabile positivismo.

Tappa fondamentale verso questa presa di coscienza fu innegabilmente l'opera e l'attività della scrittrice americana Rachel Carson che nel 1962, con il libro "Silent Spring", pose le basi di un pensiero attento alle conseguenze per l'ambiente che il progresso industriale, in particolare chimico, stava ponendo da qualche decennio.

Tutto ciò diede il via ad una legislazione in campo ambientale esaustiva che nel corso degli anni, di pari passo con gli sviluppi in ambito analitico, ha consentito di mettere a punto un monitoraggio ed una gestione delle matrici ambientali soddisfacenti.

Alle regolamentazioni inerenti la qualità delle acque, dei suoli, dell'aria, a quelle relative ai rifiuti, nel corso degli anni si sono affiancate normative più specifiche, le quali disciplinano particolari classi di inquinanti: metalli pesanti, pesticidi, biocidi, prodotti fitosanitari, inquinanti organici persistenti (POP), inquinamento da radiazioni elettro-magnetiche e nucleari.

Le tappe più recenti di questo cammino sono rappresentate dai filoni di indagine relativi ai prodotti chimici interferenti endocrini (EDC) ed ai prodotti farmaceutici e per la cura personale (PPCP'S).

Dalla fine degli anni settanta del secolo scorso sono infatti iniziate ricerche anche in questi ambiti.

In particolare i prodotti farmaceutici e per la cura personale sono rappresentati da migliaia di composti chimici differenti, i quali hanno specifiche implicazioni per l'ambiente.

Saponi, docciaschiuma, shampoo, creme solari, lozioni per la cura del corpo e medicinali contengono sostanze le cui molecole, dopo l'uso, si riversano nelle varie matrici ambientali alterando l'equilibrio fisico-chimico-biologico: inquinamento.

Come verrà sottolineato più volte nel corso del lavoro, mediante puntuali approfondimenti, i farmaci sono una classe di composti del tutto particolare, ideati e sintetizzati per essere assorbiti quanto più rapidamente possibile e per agire a basse dosi.

Sono inoltre sostanze semi-persistenti, in quanto il tasso di immissione supera la velocità di degradazione, formano misture con altre sostanze, degradano in composti diversi e, quando entrano in contatto con organismi viventi, colpiscono bersagli molto specifici.

Questa tematica ambientale, come sarà illustrato, non dispone ancora di fondamenta legislative e normative solide, in quanto sono spesso presenti solo linee guida sviluppate da agenzie ambientali internazionali.

Al fine di potere comprendere la portata delle implicazioni sul mondo che ci circonda di una classe di composti dalle dimensioni così sterminate è opportuno procedere con biomonitoraggi che siano in grado di coniugare i diversi filoni di ricerca e le varie linee di evidenza, nell'approccio multidisciplinare TRIAD: chimica, eco- tossicologica ed ecologica.

Seguendo un iter logico infatti, dalla presa di coscienza della presenza e delle relative concentrazioni in ambiente, totali e biodisponibili, verificando che queste siano inferiori alle soglie di legge, laddove presenti (linea di evidenza chimica), l'attenzione va posta sulle conseguenze che tali concentrazioni possono arrecare agli organismi viventi ad esse esposte (linea di evidenza eco - tossicologica) e, allargando la scala di indagine, sugli effetti a livello di popolazioni e comunità floristico-faunistiche (linea di evidenza ecologica).

## OBIETTIVI DEL LAVORO SVOLTO

Il lavoro svolto, oltre ad una approfondita ricerca sulla storia della tematica, sulla sua portata e conseguenze per l'ambiente, sulle leggi, regolamentazioni e linee guida esistenti, si è incentrato sul filone di indagine della chimica analitica, fondamentale ed imprescindibile appoggio a qualsiasi studio tossicologico ed ecologico.

In particolare è stata dapprima condotta un'indagine di dettaglio sulle procedure analitiche e sugli strumenti impiegati nell'ultimo ventennio per quantificare la presenza di farmaci ambientali in acqua di mare; si tratta di macchinari ad elevato livello tecnologico, in grado di rilevare sostanze presenti in parti per trilione ( $10^{-12}$ ), ed anche da questo si può comprendere come lo sviluppo del settore abbia tardato.

Scopo cardine dell'analisi, svolta presso i laboratori di fisiologia e biochimica ambientale e di chimica analitica della sede di Ravenna dei Corsi Di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente e di Biologia Marina, è stata la messa a punto di tre procedure analitiche basate su cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), accoppiata a spettrometria di massa (MS), finalizzate alla identificazione e quantificazione di caffeina, la sostanza psicoattiva maggiormente diffusa e consumata a livello mondiale.

La prima procedura ideata è stata mirata alla determinazione dello stimolante in matrice ambientale inorganica, nella fattispecie acque superficiale salate e dolci (acqua di mare, acqua fluviale, acque nere di collettamento fognario, acque chiarificate ed acque potabili della rete di distribuzione idrica e minerali commercializzate).

Le altre due procedure, le quali condividono in larga parte passaggi e strumentazioni impiegate con quella citata poc'anzi, sono invece state congegnate per adattarsi al meglio a matrici biologiche liquide e solide, rispettivamente emolinfa e tessuto di mitilo.

Esse sono state poi impiegate, saggiandone i parametri di sensibilità, selettività, robustezza e replicabilità, a diversi casi di studio, cominciando dall'analisi di vari campioni di acqua di mare prelevata al largo di Cesenatico (FC) e soggetta in seguito ad aggiunta di varie concentrazioni di caffeina (5, 50 e 500 ng/l) ai fini di analisi eco - tossicologiche di laboratorio.

Tali acque hanno rappresentato infatti l'ambiente in cui sono stati esposti esemplari di *Mytilus galloprovincialis*, sottoposti a test con batterie di biomarker; relativamente a questo lo scopo è stato verificare l'effettivo quantitativo di caffeina presente in vasca per litro d'acqua, valutando quindi eventuali differenze rispetto ai valori numerici attesi, dovute a valori di fondo presenti nella matrice, errori nella predisposizione delle concentrazioni di indagine e variazioni temporali dipendenti da



cinetiche di degradazione della molecola.

In seguito, grazie alla disponibilità di HERA, sono state raccolte aliquote di acqua presso i punti di immissione e di uscita dall'impianto di depurazione di Cervia (RA), nonché campioni di acque superficiali, sia dolci (un canale di irrigazione e bonifica che afferisce al mare nei pressi di Cervia), che salate (acqua di mare di Cesenatico e di Cervia) al fine di verificare, mediante analisi di laboratorio, le concentrazioni della sostanza psicoattiva che caratterizzano l'effluente in ingresso all'impianto di trattamento, la capacità di abbattimento dell'impianto nei riguardi della molecola indagata, e le concentrazioni ambientali a valle di esso, alle quali fauna e flora sono effettivamente esposte.

A suggello delle analisi relative alle acque si è provveduto ad esaminare anche acque di rubinetto, acque di rubinetto soggette a deionizzazione ed un'acqua minerale naturale imbottigliata e commercializzata.

La finalità che ha guidato le ultime analisi è stata invece la determinazione di eventuali quantitativi di caffeina presenti in matrice biologica, ovvero emolinfa e tessuti dei mitili esposti alle differenti condizioni sperimentali, campionati dagli organismi al termine dell'esperimento.

A tale scopo, come si accennava, la procedura sperimentale di trattamento dei campioni relativa alle acque superficiali è stata modificata e ripensata in relazione alle specifiche necessità fatte emergere da matrici così diverse rispetto a quella ambientale, del tutto difficoltose da trattare.

Tale lavoro, unito a quello relativo alle ricerche eco-tossicologiche condotte presso il laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale, rappresenta un'ottimo esempio di ricerca interdisciplinare, la sola possibile per conoscere la vera entità del fenomeno e per orientare la comunità scientifica verso la messa a punto di normative e leggi non ancora presenti.

# INDICE

## **Capitolo I           INTRODUZIONE - FARMACI IN AMBIENTE**

- 1.1 Premessa
- 1.2 Immissione di farmaci in ambiente - gli input
- 1.3 Farmacocinetica - comportamento dei farmaci nell'organismo
- 1.4 Trattamento delle acque reflue ed efficacia nella rimozione dei residui farmaceutici
- 1.5 Impatti derivanti da residui farmaceutici presenti in ambiente
- 1.6 Quadro di riferimento normativo: disposizioni legali, linee guida e programmi di monitoraggio

## **Capitolo II           PROCEDURE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI FARMACI IN AMBIENTE E STRUMENTAZIONE DI LABORATORIO**

- 2.1 Premessa
- 2.2 Panoramica sulla procedura analitica per la ricerca di farmaci in matrici ambientali e breve glossario dei termini inerenti le figure di merito dell'analisi
- 2.3 Descrizione delle varie fasi e della strumentazione di laboratorio

## **Capitolo III       IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI CAFFEINA IN CAMPIONI SPERIMENTALI**

- 3.1 Premessa
- 3.2 Caffeina
- 3.3 Procedura analitica volta alla identificazione e quantificazione di caffeina nelle acque
- 3.4 Procedura analitica volta alla identificazione e quantificazione di caffeina in emolinfa di mitilo
- 3.4 Procedura analitica volta alla identificazione e quantificazione di caffeina in tessuto di mitilo
- 3.5 Presentazione dei risultati ottenuti
- 3.6 Interpretazione dei risultati ottenuti
- 3.7 Conclusioni

# CAPITOLO I

## INTRODUZIONE – FARMACI IN AMBIENTE

## 1.1) PREMESSA

Con l'acronimo inglese PPCP'S (pharmaceuticals and personal care products) viene indicata una macrocategoria di sostanze, prodotti farmaceutici e per la cura personale, ideate per soddisfare le più svariate esigenze umane in campo sanitario e del benessere personale, nonché per la cura di animali domestici e di allevamento.

Sotto questa sigla sono incluse decine di migliaia di molecole chimiche diverse per proprietà fisico-chimiche, volume di produzione, metabolismo nel corpo umano e animale, comportamento e quantitativi in ambiente ed implicazioni per il biota.

Quanto citato può quindi essere sufficiente ad intuire le dimensioni del fenomeno e la complicatezza di una corretta analisi del problema e della conseguente gestione ambientale.

Farmaci a libero regime, farmaci con obbligo di ricetta, farmaci ad uso veterinario, saponi, docciaschiuma, lozioni, creme, profumi e prodotti di cosmesi sono solamente alcuni dei prodotti con i quali ogni persona ha a che fare quotidianamente.

Benchè la necessità di comprendere la dimensione quali-quantitativa del fenomeno e ciò che queste sostanze comportano nella fase del post-utilizzo sia del tutto evidente, solo dalla seconda metà degli anni settanta il problema si è posto all'attenzione della comunità scientifica, con i primi articoli apparsi nelle riviste di settore; dagli anni novanta è cominciata invece una trattazione organica, grazie soprattutto allo sviluppo, in ambito chimico-analitico delle strumentazioni necessarie a rilevare la presenza di tali sostanze.

Come verrà sviluppato nel corso della trattazione però, il fatto che i riferimenti normativi a livello internazionale siano ancora in questo campo allo stadio embrionale e i programmi di monitoraggio, laddove presenti, frammentari e lacunosi, ha fatto sì che ci si riferisca a questa classe di molecole con la sigla UC (unregulated contaminants).

Molti sforzi devono quindi essere compiuti, specie in una fase dello sviluppo della civiltà in cui la presa di coscienza dei costi nascosti del progresso in termine di benessere per l'uomo e per il pianeta non può che spingere la ricerca scientifica ad indagare nuove tematiche, fino ad ora marginali e trascurate.

Il capitolo introduttivo affronterà il problema della presenza di farmaci, categoria inclusa tra i PPCP'S, in ambiente, descrivendo il fenomeno quali-quantitativamente, considerando dapprima le fonti di immissione nel biota di tali sostanze, i relativi volumi e le categorie maggiormente rappresentate (gli input).

In seguito risulterà inoltre necessario accennare alla farmacocinetica, ossia il comportamento delle sostanze all'interno dell'organismo, il quale determina a sua volta la natura e il quantitativo di quanto assorbito e quanto escreto e rilasciato in ambiente.

Doverosi sono anche riferimenti al trattamento delle acque reflue e alle tecniche più efficaci nell'abbattimento di tali contaminanti, dal momento che i depuratori sono un ulteriore step che le molecole di farmaci affrontano nel cammino dal blister alla matrice ambientale.

Verrà poi toccato l'argomento degli effetti ad ora noti sugli organismi viventi di alcune molecole farmaceutiche presenti in ambiente (impacts) e di come il biomonitoraggio non possa basarsi solamente sui tradizionali e standardizzati test di tossicità, ma implichi la necessità di integrare le tre linee di evidenza (chimica, ecotossicologica ed ecologica) - processo TRIAD - allo scopo di affrontare il problema in maniera esaustiva ed efficace.

Da ultimo si cercherà di inquadrare l'argomento dal punto di vista legislativo e normativo, esaminando la situazione internazionale ed i programmi di ricerca e monitoraggio delle più avanzate agenzie pubbliche e commissioni per l'ambiente.

## 1.2) IMMISSIONE DI FARMACI IN AMBIENTE – GLI INPUT

Il consumo di farmaci alle soglie del terzo millennio ha raggiunto dimensioni impressionanti ed il suo incremento non sembra destinato a fermarsi; a tale scopo andrebbe fatta una riflessione profonda sul rapporto che l'uomo moderno sta instaurando con sé stesso e con una società che spesso richiede una infallibilità e nella quale qualsiasi pecca, come ad esempio banali problematiche fisiche, viene vissuta come limite insormontabile.

Anche se questo verrà lasciato ad altre sedi più appropriate, è innegabile quanto questo si ripercuota sull'industria del farmaco e su usi e abusi di medicinali; ricerche statunitensi individuano una crescita del 59% tra il 1995 ed il 2009 <sup>1</sup>, con la cifra record di 3,6 miliardi di prescrizioni annue di farmaci con ricetta (12 per ogni americano) <sup>1</sup>.

Un positivismo difficile da comprendere e apparentemente inconciliabile con la moderna avversione per quanto in commercio deriva da sintesi chimica, ma del quale prendere atto per addentrarsi nella questione.

Inoltre, ai dati sopracitati andrebbero poi affiancati quelli sull'utilizzo di medicinali senza ricetta, di sostanze illecite e di droghe.

Nei paesi più sviluppati del pianeta il numero di medicinali in commercio sfiora la decina di migliaia (6000 farmaci per uso umano e 1000 per uso veterinario sul mercato irlandese <sup>2</sup>).

Le categorie farmaceutiche maggiormente commercializzate sono quelle relative a NSAID - FANS (non steroidal anti inflammatory drugs - farmaci anti infiammatori non steroidei - acido salicilico, acido acetilsalicilico, diclofenac, ibuprofene, ketoprofene, paracetamolo), antibiotici (chinolonici - ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina - sulfametossazolo, sulfametazina, cloramfenicolo, amoxicillina, claritromicina, lincomicina, eritromicina, ofloxacina), regolatori lipidici contro il colesterolo (fibrati - gemfibrozil, bezafibrato e clofibrato - statine - atorvastatina e pravastatina), beta-bloccanti anti-aritmici (atenololo, propranololo, metoprololo), anti-ipertensivi (furosemide, diltiazem), antistaminici (ranitidina, loratadina), sedativi benzodiazepinici (alprazolam, diazepam) ed antidepressivi SSRI (selective serotonin reuptake inhibitor - inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina - sertralina, paroxetina, fluoxetina).

I quantitativi prodotti e commercializzati raggiungono le migliaia di tonnellate (nei primi anni 2000 in Germania erano prodotte ogni anno 500 ton di acido acetilsalicilico - aspirina - e 180 ton di ibuprofene <sup>3</sup>, mentre in Spagna quasi 300 ton di ibuprofene e 20 ton dell'antiepilettico carbamazepina <sup>3</sup>).

Per ciò che concerne la situazione italiana si può fare affidamento su dati pubblicati regolarmente dall'AIFA (agenzia italiana del farmaco) e dall'OsMed (osservatorio sull'impiego di medicinali).

Farmaci	Prescrizioni (ton sostanza attiva/anno)	% escrezione in forma parentale	Carichi ambientali teorici (ton/anno)
amoxicillina	209.58	60 %	125.75
atenololo	22.07	90%	19.86
idrocortiazide	14.66	95%	13.93
ranitidina	26.67	40%	10.67
claritromicina	33.87	25%	8.47
ceftriaxone	8.47	70%	5.93
furosemide	6.40	90%	5.76
bezafibrato	7.60	50%	3.80
ciprofloxacina	14.82	20%	2.96
enalapril	4.91	30%	1.47
spiramicina	5.11	20%	1.02
omeprazolo	3.34	20%	0.67
eritromicina	3.92	10%	0.39

fig 1.1: dati relativi alle prescrizioni di farmaci in Italia nell'anno 2001, alla percentuale di escrezione in forma parentale ed ai conseguenti carichi ambientali.

La tabella sopra riportata introduce anche un elemento estremamente importante, che verrà toccato affrontando la farmacocinetica: il fatto che all'interno del corpo le sostanze vengano modificate e metabolizzate e solo una percentuale variabile della molecola assunta venga escreta tal quale.

Una maniera alternativa per riportare dati inerenti alla quantità di medicinali prescritti è fare riferimento alla DDD (Defined Daily Dose - Dose Definita Giornaliera), ovvero la dose di mantenimento media giornaliera di un farmaco usato per la sua indicazione principale in un adulto; questo per ovviare al fatto che farmaci diversi, a parità di effetto indotto, devono essere assunti in quantitativi differenti per originarlo.

I rapporti annui dell'agenzia del farmaco sono espressi in  $DDD * 1000 / (\text{numero abitanti} * 365)$ , ossia numero di dosi definite giornaliere consumate quotidianamente ogni 1000 abitanti.

Categorie terapeutiche	Consumo (DDD/1000 abitanti/die)	
	Health Search - CSD LPD * 2012	OSMED 2012
Farmaci per l'ipertensione e lo scompenso cardiaco	407,8	363,2
ACE-inibitori (da soli ed in associazione)	145,4	118,2
Sartani (da soli ed in associazione)	95,2	96,8
Ipolipemizzanti	81,6	71,8
Statine	73,2	60,4
Omega-3	5,3	5,4
Fibrati	2,3	2,3
Acido acetilsalicilico (B01AC06)	64,8	56,6
Warfarin/acenocumarolo	7,4	6,4
Farmaci per i disturbi ostruttivi delle vie respiratorie	33,5	37,8
Beta-2 agonisti long-acting	1,8	1,7
Corticosteroidi inalatori (da soli ed in associazione)	18,9	22,0
Antileucotrieni	1,9	2,2
Antibiotici	14,2	21,4
Macrolidi	2,5	4,1
Cefalosporine orali & iniettive	0,4	2,2
Fluorochinoloni	2,2	3,1
Antidepressivi	41,3	36,8

\* Il dato di consumo di Health Search - CSD LPD si riferisce alla prescrizione effettuata in soggetti di età superiore ai 14 anni, mentre il dato OsMed a tutta la popolazione

fig 1.2: dati relativi alle prescrizioni di farmaci in Italia nell'anno 2012.

I consumi risultano essere elevati in tutti i paesi industrializzati, con però notevoli differenze nelle categorie rappresentate: grande utilizzo di antidepressivi e sedativi nel nord Europa e maggiore consumo di antibiotici nella parte meridionale del continente.

Le varie fonti di introduzione di medicinali in ambiente non possono poi prescindere dalla scarsa e molte volte assente consapevolezza da parte delle persone di come i medicinali scaduti o inutilizzati vadano trattati.

Come è noto essi andrebbero posti negli appositi contenitori o, se non presenti, riconsegnati alle farmacie.

A tale proposito è interessante una ricerca condotta negli Stati Uniti su un campione di 500 persone, la quale, al quesito: "Che fanno i consumatori di farmaci quando essi scadono o rimangono inutilizzati?"<sup>4</sup>, ha dimostrato come questo semplice comportamento non sia in realtà diffuso.

Li restituiscono alle farmacie	1.4%
Li gettano nell'immondizia	54.0%
Li gettano nel water	35.4%
Usano sempre tutti i farmaci	2.0%
Non usano mai farmaci	7.2%

fig 1.3: gestione di farmaci scaduti o inutilizzati <sup>4</sup>.

Anche a tale scopo nel 2007 l'agenzia U.S. EPA (environmental protection agency) ha pubblicato linee guida per la corretta gestione dei farmaci scaduti o inutilizzati (“ proper disposal of prescription drugs ”).

Considerando i vari contributi, si può quindi notare come gli input ambientali derivino da molteplici fonti:

- farmaci ad uso umano assunti, metabolizzati, escreti, convogliati nei reflui e depurati più o meno efficacemente;
- farmaci scaduti o inutilizzati gettati tal quali nel wc;
- farmaci scaduti o inutilizzati gettati nei RSU e finiti in discarica con eventuali fenomeni di percolazione (leaching) in suolo e falda;
- reflui di industrie farmaceutiche;
- fanghi di depurazione smaltiti in discarica ed eventuali fenomeni di percolazione (leaching) in suolo e falda;
- farmaci ad uso veterinario assunti dal bestiame, metabolizzati, escreti, convogliati nei reflui e depurati più o meno efficacemente;
- farmaci ad uso veterinario assunti dal bestiame, metabolizzati, escreti nel letame impiegato come fertilizzante e soggetto a percolazione in suolo e falda;
- farmaci impiegati in allevamenti di itticultura ed acquacoltura in acqua dolce o in mare.



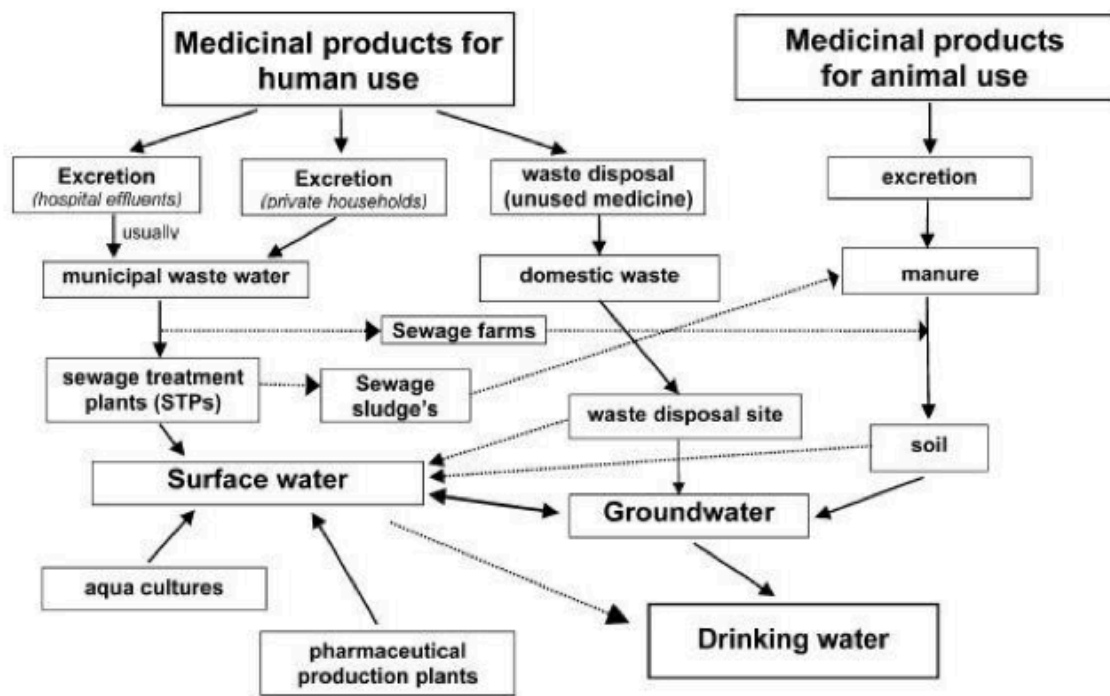


fig 1.3: schema riassuntivo sulle fonti di immissione di farmaci in ambiente.

A tali apporti già difficili da quantificare vanno aggiunti, come si diceva, quelli relativi al mercato nero e quelli relativi alle sostanze illecite.

Un sensazionale studio di Ettore Zuccato di circa un decennio fa, apparso poi anche sui quotidiani nazionali, fece luce, mediante la determinazione delle concentrazioni dei principi attivi di droghe al depuratore di Milano Nosedo, su quanto fosse diffuso il consumo di stupefacenti nel capoluogo lombardo (30000 dosi di cannabis per die e 5000 dosi di eroina) <sup>5</sup>.

Anche a livello veterinario le pratiche illecite sono alquanto diffuse, specie il ricorso a promotori di crescita (funzione auxinica) sia negli allevamenti che negli impianti di acquacoltura e itticoltura.

### 1.3) FARMACOCINETICA – COMPORTAMENTO DEI FARMACI NELL'ORGANISMO

Come precedentemente accennato, doveroso è qualche cenno alle interazioni farmacocinetiche che i medicinali instaurano con l'organismo, sia esso umano o animale.

Questa tappa nel cammino della sostanza dal banco di vendita alle latitudini oceaniche più remote è fondamentale, in quanto da essa dipende la quantità di principio attivo che verrà assorbita

dall'organismo, quella che verrà escreta tal quale nelle acque reflue ed i quantitativi dei metaboliti originati dall'organismo nel tentativo di facilitare l'espulsione dello xenobiotico.

La farmacocinetica descrive il destino e le principali interazioni di un farmaco dall'assunzione all'escrezione e può essere suddivisa in quattro sottofasi, di seguito brevemente descritte: assorbimento o uptake, distribuzione entro l'organismo, metabolismo o biotrasformazione ed escrezione.

## A) UPTAKE

Si tratta della prima fase di interazione del farmaco con l'organismo e può avvenire per ingestione di pillole o compresse, per contatto cutaneo in caso di creme, pomate o supposte, per ingresso nel derma con iniezioni sottocutanee ed intramuscolari o per ingresso diretto nel torrente circolatorio in caso di iniezioni endovenose.

Con riferimento alla via di assunzione orale, va sottolineato come le pareti intestinali siano conformate in modo da massimizzare l'assunzione di sostanze nutritive e, di conseguenza, di ogni sostanza che vi entri in contatto; questo è reso possibile da una superficie di rivestimento quanto più sottile ed estesa possibile.

Le caratteristiche fisico-chimiche della molecola che influenzano l'assorbimento sono numerose e di fondamentale importanza per il suo destino: stato fisico della sostanza, polarità-apolarità ( $\log K_{ow}$ ), acidità-basicità ( $pK_a$  e  $pK_b$ ).

Il modo più semplice e meno dispendioso, in termini energetici per l'organismo, per una sostanza di varcare tessuti e pareti cellulari è mediante diffusione semplice (trasporto passivo).

Tale meccanismo avviene per molecole neutre o apolari (elevato  $\log K_{ow}$ ), facilmente in grado di oltrepassare la membrana fosfolipidica secondo la legge di Fick:  $J = K \cdot A/d \cdot \nabla C$ .

Il flusso è dunque proporzionale al gradiente di concentrazione ( $\nabla C$ ), alla superficie di assorbimento (A) ed inversamente proporzionale allo spessore della parete (d).

Molecole polari (basso  $\log K_{ow}$ ), nonché cationi ed anioni, non sono in grado di attraversare la membrana con tale meccanismo e il loro assorbimento è dunque più lento e complesso, poiché il corpo deve impiegare energia (trasporto attivo primario o secondario) mediante proteine trans-membrana dette ATP-asi, oppure servirsi di altre proteine trans-membrana ad alta specificità: i canali ionici.

A tale scopo è illuminante l'operato dello scienziato ottocentesco Overton, il quale con centinaia di

esperimenti su molecole diverse intuì che l'assorbimento era tanto più rapido quanto più piccole fossero le molecole e tanto più rapido quanto grande fosse la solubilità in solventi apolari.

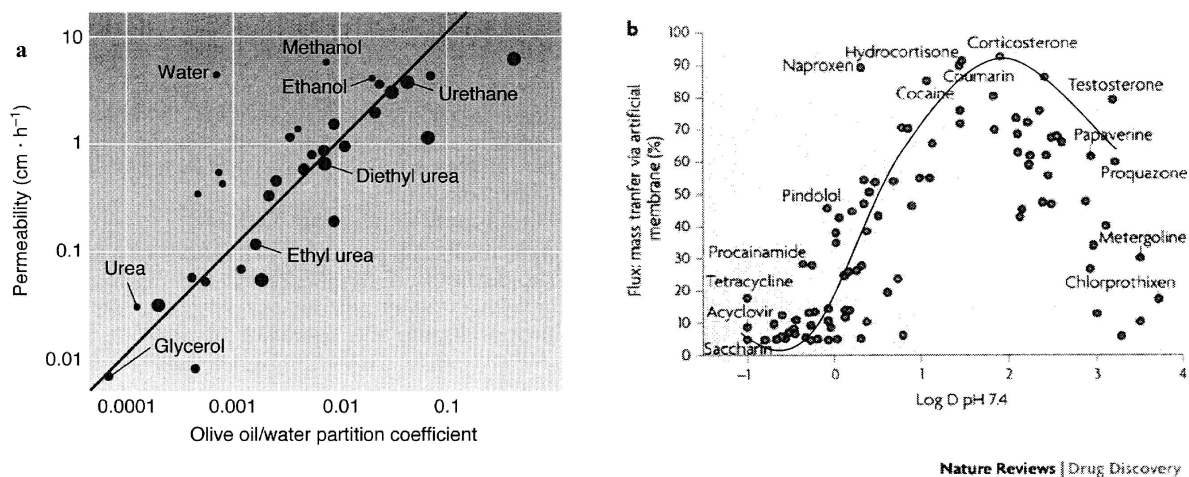


fig 1.4 a + b: velocità di assorbimento in funzione del coefficiente di ripartizione olio di oliva-acqua (approssimazione di  $K_{ow}$ ).

I grafici riassumono quanto affermato: essi rappresentano la velocità di attraversamento delle membrane cellulari in funzione di  $K_{ow}$ , il quale esprime il rapporto tra la concentrazione della sostanza di interesse in n-1-ottanolo (apolare) ed acqua (polare), all'interno di un sistema bifasico costituito da queste due sostanze immiscibili all'equilibrio.

Molecole con basso  $K_{ow}$  e quindi idrofile - polari, entrano molto più lentamente di molecole lipofile - apolari ad alto  $K_{ow}$ .

Il secondo grafico però illustra come un minimo di idrofilicità sia necessaria per muoversi attraverso i fluidi extracellulari del corpo.

Altro parametro fondamentale è la costante di dissociazione acida o basica di una sostanza, indicativa appunto del suo comportamento acido o basico.

Secondo la legge di Henderson-Hasselbach :

$$\text{pH} - \text{pKa} = \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right) \text{ per gli acidi e}$$

$$\text{pKa} - \text{pH} = \log \left( \frac{[\text{B}^+]}{[\text{BOH}]}\right) \text{ per le basi,}$$

$$\text{dove } \text{pH} = -\log [\text{H}^+], \text{ pOH} = 14 - \text{pH},$$

$$\text{Ka} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}, \text{ Kb} = \frac{[\text{B}^+][\text{OH}^-]}{[\text{BOH}]},$$

$$\text{pKb} = 14 - \text{pKa}.$$

Ne consegue che molecole acide verranno assorbite meglio in ambienti acidi ( $\text{pH} < \text{pK}_a$ ) poichè in questo modo prevale la forma indissociata neutra, mentre molecole basiche, per il medesimo motivo verranno meglio assorbite in ambienti basici ( $\text{pH} > \text{pK}_a$ ).

La combinazione delle proprietà fisiche e chimiche atte a favorire l'ingresso nell'organismo delle sostanze può tradursi in un *bioaccumulo* e *bioconcentrazione* di esse nel corpo.

Il *bioaccumulo* si verifica ogni qualvolta l'ingresso o uptake di una sostanza nel corpo è più rapido rispetto alla sua escrezione; essendo esso legato prevalentemente alla apolarità o lipofilità della specie chimica, il  $\log K_{ow}$  è anche detto potenziale di *bioaccumulo*.

Il concetto di bioconcentrazione è molto simile ad esso, ma è espresso mediante il BCF (bioconcentration factor) :  $[A]_{\text{organismo}} / [A]_{\text{matrice ambientale}}$  , il quale esprime il rapporto tra la concentrazione della sostanza in organismo e la concentrazione nell'ambiente circostante.

Altro fenomeno a cui possono dare luogo le molecole con la maggiore tendenza ad essere assorbite nei tessuti animali è la *biomagnificazione*, ovvero l'aumento di concentrazione di una specie chimica all'interno degli organismi a mano a mano che si avanza verso livelli gerarchici superiori lungo la catena trofica.

## B) DISTRIBUZIONE

Nei vertebrati e nei crostacei cefalopodi la distribuzione delle molecole entro l'organismo avviene attraverso il sistema circolatorio chiuso, dotato di distretti ben definiti attraversati dai fluidi.

Lo scambio di ossigeno e nutrienti avviene mediante le ramificazioni più sottili, i capillari.

Il sistema circolatorio aperto degli organismi più semplici invece prevede la presenza di un limitato numero di tratti arteriosi, oltre i quali le sostanze si distribuiscono per contatto diretto con le cellule.

## C) METABOLISMO - BIOTRASFORMAZIONE

Si tratta forse della fase più importante e delicata per il destino di uno xenobiotico nell'organismo ed è il risultato di varie sottofasi e meccanismi che operano in collaborazione allo scopo di base di facilitare l'escrezione della molecola dall'organismo; le sostanze maggiormente coinvolte in tale fase sono quelle lipofile, le più difficili da rimuovere.

L'obiettivo di fondo è dunque quello di rendere la molecola maggiormente idrofila e polare, favorendone l'escrezione per via urinaria.

Le sottofasi in questione sono tre:

## I) FASE DI FUNZIONALIZZAZIONE

In essa sono coinvolti numerosi enzimi, i quali mediante aggiunta di gruppi funzionali allo xenobiotico (OH, NH<sub>2</sub>, COOH), ossido/riduzione oppure idrolisi avviano la metabolizzazione.

Enzimi di fondamentale importanza sono quelli coinvolti nell'eliminazione dei radicali reattivi dell'ossigeno (ROS), come la superossidodismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e il tripeptide glutatione (GSSG), i quali con un intreccio di reazioni di ossido/riduzione abbattano i radicali.

La famiglia degli enzimi CYP 450 ha un'estrema importanza nell'interazione coi farmaci: si tratta di una superfamiglia di oltre 7700 enzimi presenti nelle specie viventi dai vegetali all'uomo.

Risiedono in elevato numero nei microsomi degli epatociti e la loro funzione principale è quella di operare un'ossidazione degli xenobiotici:  $RH + 2H^+ + 2e^- = ROH + H_2O$  .

## II) FASE DI CONIUGAZIONE

Questo step prevede l'unione alle molecole di xenobiotico da rimuovere di piccoli metaboliti; può trattarsi di SOLFATAZIONE (gruppo solfato), METILAZIONE (gruppo metile), ACETILAZIONE (acetile), GLUCORONAZIONE (acido glucoronico), oppure coniugazione con GLUTATIONE o con AMMINOACIDI.

## III) FASE DI ESCREZIONE

In quest'ultima fase, alcune proteine ATP dipendenti e quindi energivore, operano l'eliminazione dei metaboliti dalla cellula: si tratta di proteine MRP (multidrug resistance related protein) e MVP (major vault protein).

## D) ELIMINAZIONE - ESCREZIONE

Il principale canale di eliminazione di una sostanza metabolizzata dal corpo umano è il filtro renale, seguito dalla vescica e dalle vie urinarie; altra via di allontanamento è chiaramente la via intestinale tramite feci.

Si tratta delle modalità di escrezione maggiormente coinvolte nel percorso di un medicinale e dei suoi metaboliti dal corpo umano, agli impianti di trattamento acque reflue, sino all'ambiente.

Sostanze altamente lipofile e apolari sono del tutto difficili da rimuovere e possono concentrarsi nella massa lipidica o nel latte materno, raggiungendo livelli di concentrazione nell'organismo

superiori a quelli dell'ambiente esterno: bioconcentrazione ( $BCF = C_{org} / C_{amb}$ ).

Lo schema riportato di seguito riassume bene i possibili iter di una sostanza nell'organismo.

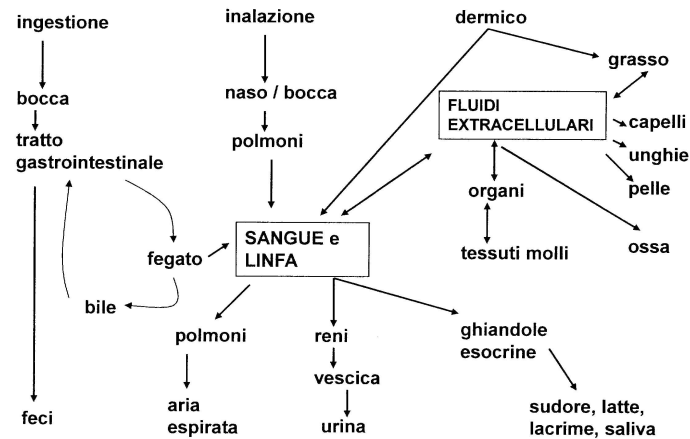


fig 1.5: principali percorsi seguiti da uno xenobiotico nell'organismo dall'assorbimento all'escrezione.

Come accennato in precedenza (dati AIFA fig 1.1), all'uscita dall'organismo gli xenobiotici saranno presenti in forma parentale in percentuali variabili da 3% (paracetamolo) al 90-95% (atenololo, furosemide e idroclorotiazide).

A titolo di esempio, il FANS ibuprofene è escreto solo per il 15% come tale, per il 26% in forma idrossilata (IBU - OH) e per il 43% in forma carbossilata (IBU - CX), mentre per le restanti percentuali come altri metaboliti meno diffusi.

La caffeina invece, oggetto della parte sperimentale affrontata in seguito, è escreta dall'organismo sottoforma di oltre 20 diversi metaboliti, tra i quali i più diffusi sono la paraxantina, la teobromina e la teofilina.

E' quindi doveroso tenere conto di questo sia al fine di elaborare una procedura analitica il cui obiettivo sia la quantificazione di un farmaco in ambiente e la seguente ricostruzione delle abitudini di consumo e dei volumi veicolati in ambiente, sia al fine di operare un biomonitoraggio che consideri gli effetti sugli organismi viventi, del tutto diversi tra sostanza in forma parentale, metabolita o, spingendoci oltre, mistura e combinazione con altre specie chimiche.

## 1.4) TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE ED EFFICACIA NELLA RIMOZIONE DI RESIDUI FARMACEUTICI

Essendo l'inquinamento da farmaci un problema prettamente antropico, alimentato soprattutto dai grandi agglomerati urbani, gli impianti di trattamento reflui sono una tappa importante nel percorso del medicinale dalla farmacia all'ambiente e, idealmente, dovrebbero essere una barriera che consente di abbattere oltre al carico organico, all'azoto e al fosforo, anche farmaci e loro metaboliti. Nella realtà questo avviene solo in parte ed in maniera molto variabile da un impianto all'altro e da una classe di farmaci ad un'altra, con una eterogeneità di risultati influenzata anche da condizioni meteorologiche (temperatura e precipitazioni) e rapporto tra portata in ingresso e portata di by-pass. I depuratori, presenti in Italia in molti casi solo a partire da un passato prossimo e quasi tutti concepiti negli anni ottanta, in seguito alla legge Merli del 1976, inerente la tutela delle acque dall'inquinamento, non furono e non sono progettati specificamente per abbattere una classe così eterogenea di composti quale quella dei farmaci ambientali.

Tali molecole sono diversissime tra di loro per proprietà fisico-chimiche e sovente presenti a concentrazioni troppo basse per essere efficacemente rimosse, ma sufficientemente alte per esplicare la loro azione una volta giunte in ambiente.

Ciò che si farà in questa sede sarà, con riferimento alle soluzioni prevalentemente adottate, dare una descrizione per sommi capi delle principali fasi di trattamento della linea acque reflue, con attenzione particolare ai processi più efficaci nell'abbattimento di medicinali, ovvero i processi terziari; verrà descritta anche la linea fanghi, nei quali molti principi attivi incrementano la loro concentrazione per poi raggiungere l'ambiente mediante spandimento di essi ai fini agricoli, conferimento a discarica o incenerimento.

In seguito verranno citati i risultati di uno studio condotto da Ettore Zuccato <sup>6</sup> sull'efficacia nella rimozione dei farmaci nell'impianto di Milano Nosedo e di altri depuratori italiani, nonché risultati di altre ricerche analoghe.

I moderni impianti di depurazione accolgono le acque reflue provenienti dal sistema fognario, trattandole in tre sezioni successive: trattamento primario, secondario e terziario.

Scopo fondamentale è quello di portare i valori di carico organico in ingresso (BOD<sub>5</sub> e COD) e di solidi sospesi al di sotto delle soglie limite previste dapprima dalla legge Merli 319/76, poi dal D.lgs 152/99 sulla tutela delle acque dall'inquinamento ed infine dal D.lgs 152/06, testo unico sull'ambiente, e successive modifiche, nonché abbattere il carico di azoto e fosforo nelle zone

vulnerabili a nitrati e fosfati, ovvero quelle maggiormente interessate dal rischio eutrofizzazione.

Parametri (media annua)	Potenzialità impianto in A.E.			
	10.000 – 100.000		>100.000	
	Concentrazione	% di riduzione	Concentrazione	% di riduzione
Fosforo totale (P mg/L) <sup>(1)</sup>	£ 2	80	£ 1	80
Azoto totale (N mg/L) <sup>(2)(3)</sup>	£ 15	70-80	£ 10	70-80

Potenzialità impianto in A.E. (abitanti equivalenti)	2.000 – 10.000		>10.000	
	Concentrazione	% di riduzione	Concentrazione	% di riduzione
Parametri (media giornaliera) (1)				
BOD5 (senza nitrificazione) mg/L <sup>(2)</sup>	≤ 25	70-90 <sup>(5)</sup>	≤ 25	80
COD mg/L <sup>(3)</sup>	≤ 125	75	≤ 125	75
Solidi Sospesi mg/L <sup>(4)</sup>	≤ 35 <sup>(5)</sup>	90 <sup>(5)</sup>	≤ 35	90

fig 1.6 a + b: tabelle recanti i limiti di emissione per gli impianti di depurazione (All V alla parte terza D.Lgs 152/06).

Caratteristica fondamentale di ciascun impianto è la separazione tra due linee di trattamento: la linea acque, finalizzata alla rimozione di contaminanti organici ed inorganici prima della reimmissione dell'effluente in corpo idrico ricettore o nel suolo e la linea fanghi, destinata al trattamento di stabilizzazione biologica dei fanghi originatisi per sedimentazione e ricchi di contenuto organico.



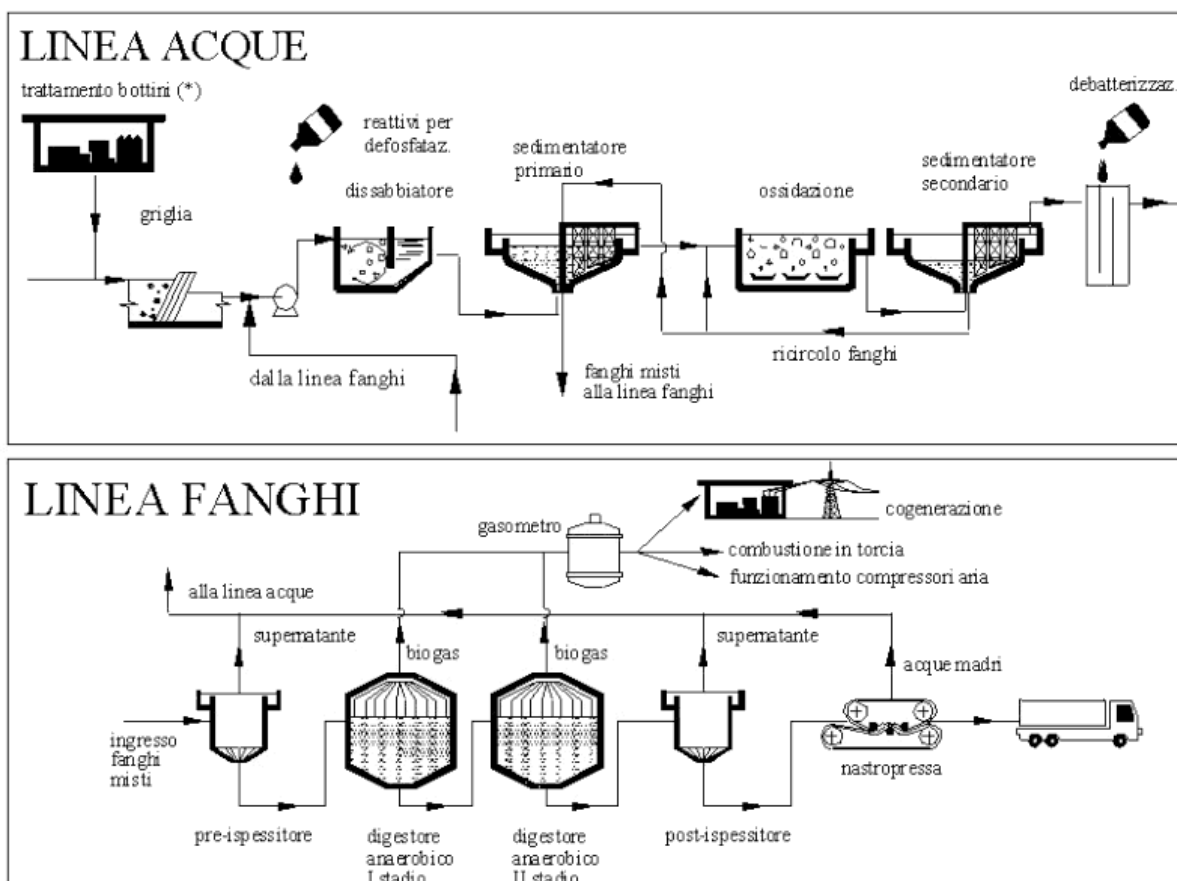


fig 1.7: schema generale di impianto di trattamento reflui con distinzione tra la linea di trattamento acque e la linea fanghi.

## LINEA ACQUE

### A) TRATTAMENTO PRIMARIO

I reflui in ingresso, di natura domestica o industriale se quantitativamente e qualitativamente assimilabili ai primi, nonché, in assenza di separazione tra acque nere ed acque bianche, un quantitativo di acque meteoriche variabile a seconda degli eventi meteorici, sono soggetti ad una serie di pretrattamenti meccanici, durante i quali le frazioni solide più grossolane sono rimosse.

Queste, specie nel caso di fognature miste, costituirebbero infatti un serio problema per il funzionamento ottimale del cuore biologico dell'impianto, abbattendo drasticamente il rendimento, causando ostruzioni e abrasione dei condotti e delle parti meccaniche.

I processi in seguito elencati non sono presenti in tutti gli impianti, in quanto spesso considerati come fasi accessorie alla riuscita della depurazione.

## I) GRIGLIATURA

Durante questa fase una serie di griglie metalliche, poste in sequenza all'interno delle condotte di ingresso, prima delle pompe di sollevamento, opera una rimozione dei frammenti di maggiori dimensioni, fondamentale per l'efficacia del processo.

I reflui attraversano la griglie da quelle di luce maggiore a quelle di dimensioni più piccole; le luci impiegate variano da 5 - 10 cm per la prima grigliatura grossolana, a 2,5 - 5 cm per la grigliatura media a 1 - 2,5 cm per l'ultimo step.

## II) DISOLEATURA - DISSABBIATURA

Il primo trattamento che avviene dopo il sollevamento con elettropompe centrifughe o a coclea archimedeo è quello di rimozione della frazione solida sedimentabile assimilabile a sabbia entro la vasca di dissabbiatura; si tratta di vasche a pianta rettangolare, con tempi di permanenza di poche decine di minuti, ove le particelle con diametro prossimo al millimetro e densità superiore a quella della fase liquida sedimentano in base alla legge di Stokes valida per i flussi laminari.

In parallelo a questo processo, nella parte superiore della vasca avviene il galleggiamento dei composti di natura oleosa (grassi, saponi, tensioattivi, urea).

Entrambe le frazioni sono opportunamente rimosse e gestite.

## III) SEDIMENTAZIONE PRIMARIA

Nelle vasche a pianta circolare di sedimentazione primaria avviene un primo significativo abbattimento ( $\approx 30\%$ ) del carico organico presente, nonché il quasi completo allontanamento della frazione sedimentabile di natura inorganica; anche in questo caso le particelle sedimentano indipendentemente le une dalle altre secondo la legge di Stokes.

Il tempo di residenza del liquame è di circa 2-3 ore, abbattendosi fino a meno di un'ora in caso di grandi portate derivanti da eventi meteo significativi.

Il refluo fa il suo ingresso in vasca dalla parte centrale e, una volta libero da quanto precipitato, sfiora in canalette laterali verso i trattamenti secondari; raschiatori giranti azionati da motori elettrici provvedono a rimuovere quanto precipitato convogliandolo verso la linea fanghi.

## B) TRATTAMENTO SECONDARIO

La fase secondaria può essere considerata il cuore vero e proprio di un impianto ed è quella ove avviene la rimozione della quasi totalità della frazione organica in ingresso ( $\approx 90\%$  di quanto proviene dalle fasi di pretrattamento).

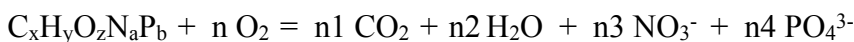
Sfruttando il metabolismo di ceppi batterici eterotrofi selezionati (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*), si attua, in condizioni accelerate e controllate, ciò che avviene spontaneamente in natura nel corso della degradazione aerobica.

Il processo è realizzato in due vasche poste in sequenza: una vasca di aerazione/ossidazione ed una di sedimentazione secondaria.

### I) VASCA DI OSSIDAZIONE

In tali vasche, spesso di sezione rettangolare, i batteri, presenti in fiocchi galleggianti, sfruttano il carico organico per accrescere la loro biomassa e ricavare energia abbattendo il BOD secondo cinetiche esponenziali del primo ordine ( $BOD_t = BOD_o * e^{-kt}$ ).

Spesso l'aerazione è garantita da agitatori o giranti, mentre più raramente da insufflazione di aria o  $O_2$ . La reazione che avviene può essere sintetizzata dalla seguente formula:



Di frequente, negli impianti che prevedono anche un abbattimento del carico di nutrienti, N e P, e quindi posti in aree sensibili, in questa vasca sono presenti anche colonie batteriche autotrofe di *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*; le quali trasformano l'azoto organico e ammoniacale presente nei reflui in nitriti e nitrati (nitrificazione), successivamente allontanati come azoto gassoso da altre colonie batteriche poste in una vasca separata, quella di denitrificazione, operante in condizioni anossiche.

Quest'ultima può essere posta a monte della vasca di ossidazione, in modo che i batteri eterotrofi denitrificanti possano disporre di un carico organico fresco ed abbondante; in questo caso si opera un ricircolo che porti alla vasca quanto già nitrificato a valle.

A tale proposito si stanno facendo strada due soluzioni impiantistiche innovative:

- tecnologia A / O, la quale prevede una vasca di predenitrificazione in condizioni anossiche (assenza di ossigeno molecolare, ma nitrati riciccolati dal sedimentatore secondario), seguita dall'ossidazione;

- tecnologia ANANOX - A<sup>2</sup>/O (anaerobic/anoxic/oxic), la quale prevede una prima vasca in condizioni anaerobiche (assenza totale di ossigeno, sia di ossigeno molecolare che nitrati, solfati e fosfati), seguita da una vasca di predenitrificazione in condizioni anossiche (assenza di ossigeno molecolare, ma nitrati ricircolati dal sedimentatore secondario), seguita a sua volta dalla consueta vasca di ossidazione.

Alternativamente la vasca anossica di denitrificazione può essere collocata a valle della ossidazione, prima del sedimentatore secondario (processo Wuhrmann).

Al fine di rimuovere i fosfati presenti (defosfatazione) non si opera frequentemente per via biologica, ma si impiegano sostanze chimiche (calce spenta, solfato di alluminio, solfato di ferro) che formino aggregati sedimentabili con questi ultimi.

## II) SEDIMENTAZIONE SECONDARIA

Tale vasca è strutturalmente simile alla sedimentazione primaria, benchè la natura dei solidi che ivi precipitano sia del tutto diversa; ciò che sedimenta ha infatti un elevatissimo contenuto organico, essendo costituito da biomassa di fanghi attivi.

Quanto presente sul fondo viene convogliato alla linea fanghi ed in parte ricircolato alla vasca di predenitrificazione, ove presente, o alla vasca di ossidazione, in modo da mantenere costante la qualità e quantità dei fanghi attivi e da selezionare ceppi batterici idonei.

## C) TRATTAMENTO TERZIARIO

Relativamente all'argomento cardine del lavoro di tesi, la presenza di farmaci in matrici ambientali, la fase terziaria, salvo poche eccezioni (la caffeina è rimossa in modo soddisfacente al secondario), è quella che numerosi studi indicano come la più efficace nell'abbattimento dei medicinali e dei loro metaboliti; malauguratamente è però anche quella nei confronti della quale vengono rivolte le minori cure progettuali ed impiantistiche, basti pensare che molti impianti ne sono del tutto privi.

Lo scopo fondamentale del terziario è abbattere il contenuto di ceppi batterici e virali, migliorando le caratteristiche microbiologiche dell'effluente; a tale scopo si adottano varie alternative.

Per ciò che concerne i rendimenti specifici di rimozione delle seguenti soluzioni a riguardo dei farmaci, si dirà nel seguito della trattazione.

## DISINFEZIONE CON CLORO O ACIDO PERACETICO

Si tratta di quanto più diffuso negli impianti di concezione più datata; l'azione biocida del cloro è sfruttata immettendo in vasche con percorso a serpentina cloro molecolare, ipoclorito di sodio, biossido di cloro o acido peracetico.

## OZONIZZAZIONE

Meno diffusa della tecnica precedente in quanto più complessa e costosa (l'ozono è un gas instabile e deve essere prodotto in loco mediante ozonizzatori che con scariche elettriche consentono all'ossigeno di dissociarsi e poi generare ozono reagendo con altro ossigeno indissociato).

Essa non dà luogo a cattivi odori, non immette sostanze chimiche nelle acque ed oltre ad avere un elevato potere biocida è in grado di abbattere anche contaminanti inorganici come Fe, Mn, As, HCN.

## ATTINIZZAZIONE

In questo caso viene sfruttata la radiazione ultravioletta (UVC,  $\lambda \approx 250$  nm) generata da lampade a vapori di mercurio.

Anche in questo caso l'elevato potere biocida è coniugato all'assenza di cattivi odori e di immissione di sostanze chimiche, ma comporta elevati costi e la necessità di disporre di un effluente particolarmente limpido per essere efficace.

## COLONNE A CARBONE ATTIVO GRANULARE

La grande capacità di assorbimento dei carboni attivi trae origine dalla porosità dalla quale è caratterizzato (pori con diametro da 10 a  $250 \cdot 10^{-10}$  m).

Anche l'impiego di questa soluzione comporta costi elevati, a causa della frequente manutenzione a cui i filtri sono soggetti e dei costi di produzione dei carboni attivi a partire dalle materie prime carbone, torba, lignite.

## FILTRAZIONE SU LETTI DI SABBIA

Si tratta di una tecnica di filtrazione piuttosto rudimentale la quale si basa sul passaggio

dell'effluente attraverso due strati: un primo strato di sabbia (costituita da silice, ilmenite, antracite e granato) posto al di sopra di un letto di ghiaia.

Benchè i costi siano del tutto contenuti, essa non dà luogo a risultati soddisfacenti, anche per i continui intasamenti e la notevole manutenzione richiesta.

#### MICROFILTRAZIONE E ULTRAFILTRAZIONE A MEMBRANA

Questa tecnologia sfrutta membrane porose di materiale sintetico (acetato di cellulosa, PVDN - polivinildenfluoruro, PAN - poliacrilonitrile, PES - polieteresulfone) attraverso le quali il refluo è fatto passare in pressione; esse differiscono per il diametro dei pori della membrana (0,002 - 0,1 µm per l'ultrafiltrazione e 0,1 - 10 µm per la microfiltrazione)

#### OSMOSI INVERSA O IPERFILTRAZIONE

Filtri ad osmosi inversa sono efficacissimi nella rimozione di metalli pesanti, fitofarmaci e residui farmaceutici dall'effluente in quanto coniugano all'ostacolo fisico rappresentato dal diametro dei pori, una separazione chimica basata su idrofilicità ed idrofobicità delle sostanze; questo viene fatto scegliendo il materiale della membrane semipermeabile (TFCM - thin film composite membrane) a seconda delle esigenze.

Si tratta di una tecnica alquanto dispendiosa energeticamente, in quanto il solvente deve essere forzato a passare da una regione a minore concentrazione del soluto ad una a maggiore concentrazione di quest'ultimo.

Le tecniche di filtrazione su carboni attivi, microfiltrazione, ultrafiltrazione ed iperfiltrazione non sono frequentemente impiegate al terziario di un impianto di depurazione, o comunque meno di quanto invece non lo siano in impianti di potabilizzazione delle acque o di dissalazione.

#### LINEA FANGHI

La linea fanghi ha un ruolo fondamentale per ciò che concerne la corretta gestione dei contaminanti inorganici ed organici rimossi dall'effluente nelle fasi di depurazione.

Si tratta di una serie di procedure molto delicate per il notevole impatto ambientale che queste sostanze, non adeguatamente trattate, potrebbero comportare.

Inoltre, come riportato nello schema iniziale relativo agli input in ambiente di farmaci, i fanghi di depurazione, una volta trasportati a discarica o impiegati come ammendante ai fini agronomici, potrebbero rappresentare una via di ingresso di tali sostanze nelle diverse matrici (percolazione ed infiltrazione nel terreno, ingresso in falda e contaminazione di acque superficiali).

Per fango di depurazione si intende il materiale proveniente dalla sedimentazione primaria e quello sedimentato al secondario, molto diverso dal primo come caratteristiche fisico-chimiche e contenuto organico; obiettivo fondamentale della linea fanghi è quello di rimuovere e allontanare quanto più possibile la frazione acquosa e di operare una stabilizzazione biologica del tutto per impedire ulteriori fenomeni di degradazione e putrescenza.

#### A) ISPESSIMENTO

Il contenuto di acqua nel materiale proveniente dai due stadi di sedimentazione è prossimo al 100% e per questo è necessario allontanare quanta più acqua possibile, al fine di ridurre i volumi in uscita e le dimensioni degli apparati posti a valle.

La fase di ispessimento può essere operata gravitativamente in vasche in tutto e per tutto simili a quelle di sedimentazione ma con velocità di sedimentazioni molto minori e tempi più lunghi; esse possono operare in modo discontinuo (statiche) o in modo continuo (dinamiche).

Altra soluzione è rappresentata dal processo inverso: la flocculazione ed il galleggiamento in superficie delle particelle solide, favorito da microbolle insufflate in vasca.

Entrambe le modalità implicano una separazione tra fase solida, che continua il percorso nella linea fanghi e fase liquida, ricircolata al primario; tuttavia in uscita da questo stadio il contenuto di acqua supera ancora il 90%.

#### B) STABILIZZAZIONE BIOLOGICA

La stabilizzazione biologica ha lo scopo di impedire ulteriori processi di degradazione e putrescenza nel materiale in uscita dall'impianto.

Vi sono due alternative principali nel raggiungimento di questo obiettivo:

##### *- DEGRADAZIONE AEROBICA (COMPOSTAGGIO)*

In questo caso i fanghi sono posti all'interno di particolari capannoni aerati entro i quali avviene

l'ossidazione del materiale organico presente ad opera di colonie batteriche.

Parametri importanti sono la temperatura, il tasso di umidità (55-70%) e la corretta aerazione (5-10% di O<sub>2</sub>), ottenuta anche con movimentazione meccanica del materiale.

Successive sottofasi (fase iniziale o mesofila, termofila e di maturazione) portano alla stabilizzazione (per ossidazione e mineralizzazione) e all'igienizzazione (per scomparsa di agenti patogeni dovuta alle alte temperature raggiunte) del compostato.

Attori del processo sono varie colonie batteriche che nel corso dei vari mesi di durata si sostituiscono le une alle altre, in funzione della temperatura e del materiale organico presente e da degradare per svolgere i processi metabolici.

Questa soluzione non è molto diffusa negli impianti di maggiori dimensioni e, benché concettualmente ed operativamente sia la più semplice, non è prediletta negli impianti di moderna concezione.

#### *- DIGESTIONE ANAEROBICA (PRODUZIONE DI BIOGAS)*

Soluzione estremamente diffusa è la degradazione in condizioni anaerobiche dei fanghi.

Questo processo ha luogo nei digestori, reattori operanti in condizioni controllate e specifiche per le numerose colonie batteriche che vi risiedono e che, attraverso una catena di step successivi, realizzano una stabilizzazione biologica ed una igienizzazione del materiale.

Dapprima batteri idrolitici scindono le macromolecole di carboidrati, proteine e lipidi, poi batteri acetogeni portano alla formazione di acidi grassi volatili, tra i quali l'acido acetico, ed infine colonie metanogene rilasciano biogas, contenente prevalentemente metano e anidride carbonica.

Il biogas ottenuto può essere raffinato (innalzamento della percentuale di metano dal 50% al 95-99%) ed impiegato ai fini della cogenerazione, ossia produzione simultanea, grazie alla combustione del gas in motori endotermici, di energia termica per il riscaldamento dei locali impiantistici e di utenze domestiche prossime ad esso (teleriscaldamento) ed energia elettrica per il funzionamento dei macchinari dell'impianto.

#### C) DISIDRATAZIONE

Un'ultima fase di disidratazione può essere operata sul materiale proveniente dalla stabilizzazione.

Le soluzioni principalmente adottate sono:



- *letti di essiccamento (disidratazione naturale)*: vasche rettangolari dalle quali l'acqua è allontanata per percolazione dal fondo drenante della vasca e per evaporazione;
- *filtrazione sotto vuoto e sotto pressione (disidratazione meccanica)*: la prima è realizzata con tamburi rotanti sui quali è posta una membrana filtrante, parzialmente immersi nel fango da trattare; la filtrazione sotto pressione, molto più diffusa è fatta con le tradizionali nastropresse e filtropresse;
- *incenerimento (disidratazione termica)*: questa soluzione prevede, all'interno di appositi forni (rotativi, a letto fluido o multipli effetti), l'evaporazione della totalità dell'acqua presente e la combustione del materiale al fine di ottenere inerti facilmente smaltibili e talvolta riutilizzabili.

Il materiale in uscita dalla linea fanghi può, secondo la normativa vigente, avere diversi destini:

- *impiego in agricoltura come ammendante*, in particolare il compostato proveniente da stabilizzazione aerobica; tale impiego è regolato dalla direttiva 86/278/CE, recepita con il D.Lgs 99/92, che ne disciplina i contenuti in contaminanti organici ed inorganici ed i parametri microbiologici (batteri e virus);
- *smaltimento in discariche controllate per rifiuti speciali*, secondo le prescrizioni del D.lgs 36/03;
- *incenerimento*;
- *impiego per la realizzazione di bitumi, asfalti e conglomerati*.

## EFFICACIA NELLA RIMOZIONE DI RESIDUI FARMACEUTICI

Per valutare la possibilità da parte degli impianti di trattamento acque reflue di abbattere efficacemente il carico di farmaci ambientali in arrivo dai collettamenti fognari, bisogna fare riferimento ad un filone di indagine che, come accennato, si è sviluppato solamente negli ultimi vent'anni ad opera spesso di pionieristici ricercatori.

Non si dispone quindi di una vasta mole di dati, ma lavori estremamente accurati ed organici sono in grado di introdurre e guidare lo studioso alla complessità della tematica.

Il problema fondamentale nella corretta gestione da parte dei progettisti di impianti è lo sconfinato numero di molecole chimiche appartenenti alla macrocategoria dei medicinali che possono giungere al depuratore; ogni classe di farmaci, secondo la classificazione ATC (anatomico - terapeutico - chimica) è ideata per agire in determinati siti del corpo, interagendo con recettori specifici ed entrando in competizione con le molecole naturali protagoniste del metabolismo umano al fine di esplicare il loro effetto.

I meccanismi sui quali possono agire sono numerosissimi e questo si traduce in enorme eterogeneità a livello di proprietà fisico - chimiche, ad esempio polarità/apolarità, acidità/basicità, solubilità in particolari solventi, tendenza alla fotodegradazione, biodegradazione, evaporazione, adsorbimento su substrati; bisogna poi ricordare come le concentrazioni di medicinali veicolate all'impianto siano estremamente basse per i macchinari in opera (ppb o ppt), benchè sufficientemente alte per perturbare la matrice in cui si riverseranno.

A questo va aggiunto il fatto che i depuratori in esercizio riescono in molti casi a malapena ad assicurare il rispetto della normativa in termini di abbattimento di carico organico e, nella migliore delle ipotesi, del carico di nutrienti (in corrispondenza di zone sensibili).

Inoltre il funzionamento di un impianto non può, benchè una corretta progettazione abbia lo scopo di mitigare quanto più possibile questo fenomeno, essere visto come stabile e costante nel tempo; le portate in ingresso e di conseguenza i carichi trattati ed abbattuti variano a seconda delle condizioni meteo-climatiche e delle fluttuazioni nelle abitudini di vita delle persone nel corso dell'anno.

Unendo queste considerazioni si può già avere un'idea di quanto complessa sia la materia.

Nel nostro paese sono state condotte ricerche in merito all'inizio degli anni duemila dal gruppo di ricerca di Ettore Zuccato, dell'Istituto Mario Negri; queste trattazioni hanno consentito di avere i primi dati organici sull'efficacia nella rimozione di farmaci da parte di numerosi impianti di depurazione di varie città italiane.

In particolare un'analisi approfondita è stata condotta relativamente al depuratore di Milano <sup>6</sup>.

Il capoluogo lombardo ha potuto disporre del suo primo impianto di trattamento delle acque reflue solo nel 2003, alimentando per anni l'emergenza ambientale dell'inquinamento del fiume Po e del mare Adriatico.

Nonostante questo sia di dubbia comprensione, il rovescio della medaglia è stata la costruzione di un impianto estremamente efficace nel trattamento delle acque.

Per quanto non disponga di trattamenti terziari all'avanguardia e affondi le sue radici nella semplicità progettuale (a valle della sedimentazione secondaria è presente un semplice step di disinfezione con acido peracetico), l'abbattimento di farmaci ambientali supera rendimenti del 75% .

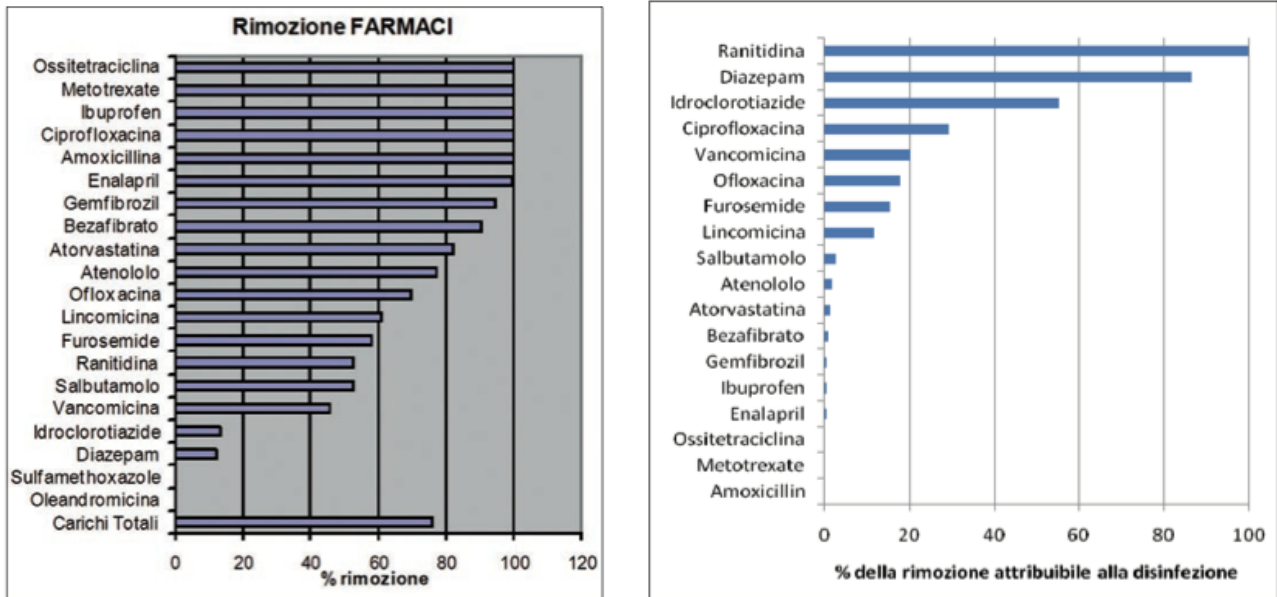


fig 1.8 a + b: efficacia nella rimozione delle varie tipologie di farmaci indagate e percentuale di rimozione attribuibile al terziario (disinfezione) per l'impianto di Milano Nosedo <sup>6</sup>.

Come si sottolineava, la rimozione di farmaci è estremamente eterogenea da una classe terapeutica all'altra, ma le percentuali di rimozione riportate dal grafico sono in linea con quelle di altri studi internazionali:

antibiotici fluorochinolonici  $\approx 100\%$

regolatori lipidici fibrati  $\approx 90\%$

beta-bloccanti antiaritmici  $\approx 80\%$

sedativi benzodiazepinici  $\approx 10\%$

Altro elemento importante è il notevole contributo dello stadio secondario nel raggiungimento di tale risultato, in altre situazioni molto più deficitario da questo punto di vista.

Il confronto con le percentuali di abbattimento di farmaci raggiunte da altri depuratori italiani sottolinea la bontà dei risultati raggiunti a Nosedo.

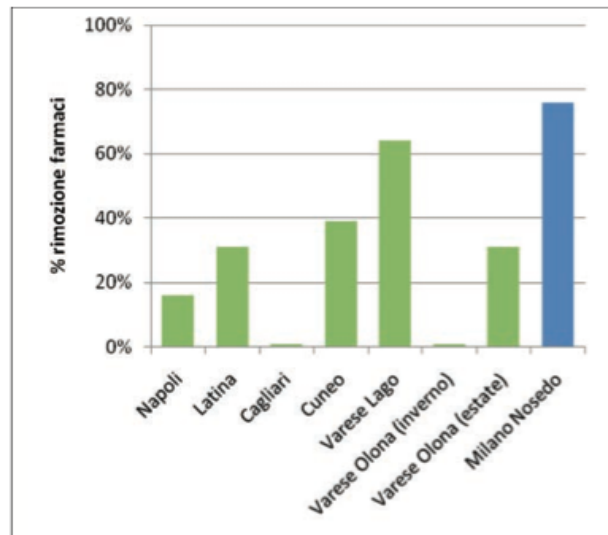


fig 1.9: efficacia nella rimozione del carico totale di farmaci raggiunta in vari depuratori italiani <sup>6</sup>.

Ulteriore studio del tutto all'avanguardia, che consente di avere importanti dati ed informazioni sulla diversa efficacia che le fasi del terziario rivestono nei confronti di tale problematica, è quello condotto nel 2009 dal Department of Environmental Science & Engineering, Tsinghua University, Beijing <sup>7</sup>.

Questo lavoro ha preso in considerazione quattro impianti di trattamento acque reflue della città di Pechino e la loro efficacia nella rimozione di farmaci FANS (diclofenac, ketoprofene, indometacina e acido mefenamico), antibiotici (trimethoprim, acido nalixidico e cloramfenicolo), regolatori lipidici fibrati (bezafibrato, gemfibrozil e acido clofibrico), un beta-bloccante anti-aritmico (metoprololo), antipsicotici (carbamazepina e sulpiride), lo stimolante caffeina e l'insetticida DEET (dietilmetatoluammide).

Lo stadio di depurazione primario non si rivela minimamente efficace nell'abbattimento di farmaci ambientali e questo perchè molto spesso tali molecole risultano essere polari o moderatamente apolari ( $\log K_{ow}$  0 - 4), mostrando quindi una tendenza spiccata a rimanere disciolte in fase liquida. Procedendo nell'analisi, si è notato che, benchè i depuratori differissero per soluzioni tecniche adottate al secondario (semplice ossidazione e sedimentazione, pre-denitro con schema A/O e pre-denitro con schema A<sup>2</sup>/O), le performance raggiunte da questo stadio si sono dimostrate piuttosto valide ed uniformi tra essi.

Valori prossimi al 100 % di rimozione sono stati raggiunti per i fibrati (come nel capoluogo lombardo), per la caffeina, il DEET e l'antibiotico trimethoprim.

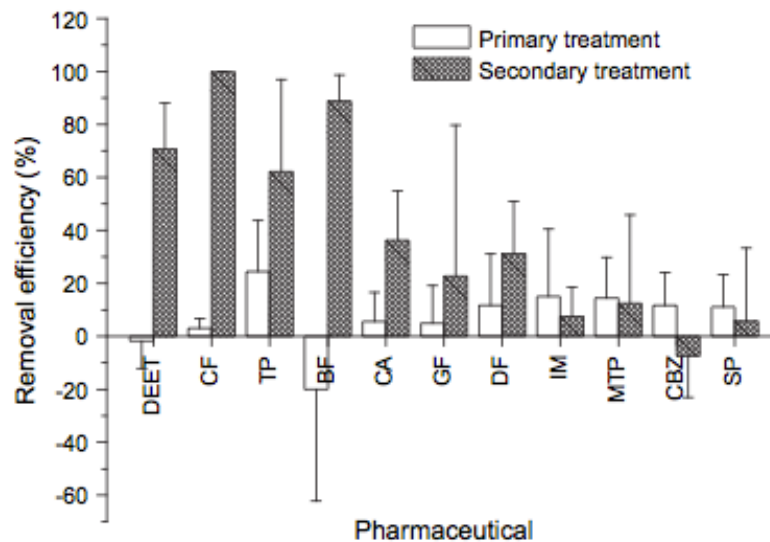


fig 1.10: percentuali di abbattimento di farmaci conseguite al primario e al secondario negli impianti di Pechino (media tra i quattro impianti oggetto di studio): DEET: dietilmetatoluammide, CF: caffeina, TP: trimethoprim, BF: bezafibrato, CA: acido clofibrico, GF: gemfibrozil, DF: diclofenac, IM: indometacina, MTP: metoprololo, CBZ: carbamazepina, SP: sulpiride <sup>7</sup>.

Questo ed altri progetti di ricerca hanno sottolineato come parametri fondamentali per l'efficacia di rimozione al secondario siano un tempo di residenza dell'effluente maggiore di 12 ore ed una età dei fanghi (approssimata dal rapporto tra la massa di fanghi attivi presenti al secondario e quella evacuata quotidianamente) che superi i 5 giorni.

Passando ai trattamenti terziari, gli impianti in questione differivano per le scelte operate: un impianto non disponeva di terziario, un impianto disponeva di filtrazione su letto di sabbia, un'altro di ultrafiltrazione abbinata ad ozonizzazione e l'ultimo di microfiltrazione seguita da trattamento ad osmosi inversa.

La bontà nell'abbattimento delle molecole considerate si è dimostrata del tutto in linea con quella rilevata in altri studi di settore condotti in varie parti del mondo.

In particolare, la filtrazione su letti di sabbia risulta essere inefficace per queste specie target anche secondo le ricerche del tedesco Gobel <sup>8</sup>.

Numerosi studi (Nakada <sup>9 - 10</sup> e Ukuda <sup>11</sup> in Giappone, Ternes <sup>12</sup> in Germania) hanno invece riscontrato notevoli risultati impiegando al terziario un trattamento di ozonizzazione.

Compound	WWTP A		WWTP B	WWTP D
	UF	Ozone	SF	MF/RO
DEET	0-50	50-80	0-50	>90
CF	<0	50-80	<0	50-80
TP	0-50	>90	80-90	>90
BF	0-50	0-50	0-50	>90
CA	<0	50-80	<0	80-90
GF	0-50	80-90	50-80	>90
DF	0-50	>90	<0	>90
IM	0-50	>90	<0	>90
MA	0-50	80-90	<0	0-50
MTP	0-50	80-90	<0	>90
CBZ	<0	>90	0-50	>90
SP	0-50	>90	0-50	>90

In questo caso le particelle sono ossidate e mineralizzate per azione diretta dell'ozono o del radicale ossidrile che si forma quando l'ossigeno triatomico è eccitato energeticamente; le uniche molecole che si rivelano insensibili a questo risultano sono la caffeina, il DEET ed i fibrati, peraltro già efficacemente rimosse al secondario.

fig 1.11: percentuali di abbattimento di farmaci conseguite con varie tecniche di trattamento terziario nei vari impianti di Pechino <sup>7</sup>.

Risultati invero poco soddisfacenti sono raggiunti con l'ultrafiltrazione su membrane di materiale sintetico (PVD - polivinildenfluoruro, PAN - poliacrilonitrile, PES - polieteresulfone, acetato o nitrato di cellulosa) con diametro compreso tra 0,002 e 0,1  $\mu\text{m}$ , in linea con quanto esposto anche da Yoon e Westerhoff <sup>13</sup>.

L'accoppiamento tra microfiltrazione (membrane dello stesso materiale sopra citato, ma diametri tra 0,1 e 10  $\mu\text{m}$ ) ed osmosi inversa ha dato risultati molto migliori, anche secondo le ricerche di Kahn <sup>14</sup>, Nghiem <sup>15</sup>, Drewes <sup>16</sup> e Radjenovic <sup>17</sup>.

Il trattenimento delle molecole chimiche sulla membrana avviene per adsorbimento ed ingombro sterico; inoltre il materiale può essere scelto al fine di massimizzare le interazioni con la specie che si desidera trattenere.

Membrane apolari saranno scelte in caso di contaminanti apolari, in modo da instaurare interazioni idrofobiche e legami di Van der Waals; per contro materiali polari saranno impiegati per trattenere contaminanti polari, mettendo in atto interazioni idrofiliche, ponti H, legami dipolo-dipolo.

Altri dati importanti e spunti di riflessione possono essere forniti dall'opera di Buerge e Pointer <sup>18</sup>, della Swiss Federal Research Station.

Nel loro studio inerente l'utilizzo della caffeina come specie chimica marker di inquinamento antropogenico, hanno appurato che la percentuale di abbattimento di questo stimolante in 13 impianti della regione di Zurigo si attesta su valori compresi tra l'80 % ed il 100 % e questo grazie ad una efficace rimozione allo stadio secondario, conferma di quanto riportato in precedenza.

Meno informazioni a disposizione sono invece presenti in letteratura riguardo la concentrazione di residui farmaceutici in fanghi di depurazione; si tratta infatti di una materia ancora più complessa, per la quale le procedure analitiche messe a punto si rivelano più laboriose.

Risulta all'avanguardia da questo punto di vista il lavoro della School of Chemical Sciences e della School of Biotechnology di Dublino <sup>19</sup>.

Il gruppo di ricerca guidato dal Professor Barron ha preso in considerazione fanghi provenienti da due impianti di depurazione irlandesi, riscontrando in essi la presenza in concentrazioni significative ( $\mu\text{g/g}$ , ppm) dell'antibatterico triclosano, impiegato in prodotti cosmetici, come profumi, saponi, docciaschiuma.

Inoltre è stata rilevata la presenza in essi dell'antiepilettico carbamazepina e dell'anticoagulante warfarina, in concentrazione di tre ordini di grandezza minori.

Lo studio ha anche rilevato come la disidratazione termica per incenerimento dei fanghi possa abbattere notevolmente tali concentrazioni.

Altri studi (Golet et al. <sup>20</sup>) sottolineano come la capacità di legarsi ai fanghi per adsorbimento sia tipica degli antibiotici fluorochinolomici, per altro diffusissimi e largamente impiegati (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, acido nalixidico, ofloxacina).

I fanghi di depurazione impiegati in agricoltura o conferiti a discarica possono costituire una importante via di accesso di tali contaminanti all'ambiente, specie a causa di infiltrazioni e percolamenti nel suolo sino a raggiungere la falda, fenomeno che il D.lgs 36/03 sulle discariche si propone di scongiurare.

Il miglioramento nelle tecniche di abbattimento di queste classi di contaminanti non può però prescindere da un'azione a monte, realizzata coniugando gli sforzi delle aziende farmaceutiche, delle agenzie per i farmaci e dei consumatori.

Come suggerisce Gabriel Eckstein, insegnante di diritto alla Texas A&M University, nel suo articolo "Alternative strategies for addressing the presence and the effects of PPCPs in fresh water resources" <sup>21</sup>, i farmaci andrebbero concepiti per minimizzare la quantità di essi escreti nelle feci e nelle urine (Green Chemistry, Green Drug by Design).

Molte agenzie per i farmaci che regolano l'immissione nel mercato dei prodotti medicinali (ad esempio la Sweden Medical Agency), iniziano a considerare tra le prerogative che un farmaco deve avere la sua compatibilità ambientale, stilando liste dei medicinali più ecocompatibili.

Inoltre andrebbero maggiormente curate le campagne di restituzione di farmaci inutilizzati o scaduti (take back initiatives), come la U.S. E.P.A. sta facendo da qualche anno a questa parte.

Sarebbe utile sensibilizzare l'opinione pubblica sulle conseguenze derivanti da uso inopportuno e

abuso di farmaci, nonché da una cattiva gestione dei medicinali inutilizzati, conseguenze dirette ed indirette delle quali si parlerà nel seguente paragrafo relativo agli impatti sull'ambiente dei farmaci che raggiungono le matrici ambientali.

## 1.5) IMPATTI DERIVANTI DA RESIDUI FARMACEUTICI PRESENTI IN AMBIENTE

Doverosa premessa alla trattazione di questo paragrafo è la sottolineatura di come i pochi risultati disponibili relativi agli effetti di residui farmaceutici su organismi animali e vegetali siano stati ottenuti sovente prescindendo da alcune importanti considerazioni.

Come evidenziato già dalla prefazione, si tratta di una categoria di composti con le seguenti caratteristiche comuni:

- concepimento e sintesi delle molecole finalizzate al maggiore e quanto più rapido assorbimento della specie chimica nell'organismo e all'effetto a basse concentrazioni;
- semi-persistenza di tali sostanze, in quanto il tasso di immissione supera la velocità di degradazione in ambiente;
- degradazione sia all'interno dell'organismo che nelle matrici ambientali e conseguente formazione di metaboliti e sottospecie chimiche con caratteristiche diverse e sovente più deleterie;
- formazione di complesse misture con altre molecole ed effetti sinergici poco controllabili;
- azione su bersagli specifici, poco rappresentati dai consueti test di tossicità generica;
- possibilità di bioconcentrarsi e biomagnificare.

Da queste considerazioni emerge come i test di tossicità inerenti queste sostanze finora condotti si rivelino inadeguati nel rappresentare il reale effetto dei medicinali sui vari organismi.

Troppo spesso si tratta di test di tossicità acuta, nei quali gli organismi sono esposti a varie concentrazioni della sostanza indagata, registrando endpoint letali, come l'immobilizzazione o la morte dell'individuo.

I farmaci non possono però essere considerati alla stregua di contaminanti tradizionali perchè, come detto, agiscono con meccanismi complessi su bersagli sensibili, in funzione della diversa categoria ATC (anatomica - terapeutica - chimica) di appartenenza.

In secondo luogo gli organismi impiegati nei test (alghe, piccoli invertebrati, crostacei, piccoli



pesci) sono sprovvisti dei bersagli specifici sui quali può esplicarsi l'effetto del farmaco, effetto che nelle specie viventi sensibili ad esso possono verificarsi a concentrazioni ben inferiori a quelle di letalità.

Inoltre anche a livello ecologico si verifica la contemporanea presenza di varie specie nello stesso luogo fisico ed i legami e le dinamiche a livello di comunità possono influire notevolmente sul risultato complessivo dell'azione di una o più molecole.

Il semplice confronto tra concentrazione rilevata in ambiente e concentrazione di letalità derivante da un test acuto con endpoint letali non può quindi essere ritenuto soddisfacente e sufficiente a comprendere dinamiche così complesse.

L'unico approccio foriero di risultati attendibili nel campo del biomonitoraggio si rivela essere l'integrazione delle linee di evidenza e di ricerca rappresentata dal TRIAD.

In esso studi chimici (concentrazioni totali e biodisponibili di contaminanti di interesse), ecotossicologici (test di tossicità ed uso di biomarker) ed ecologici (studi a livello di popolazione e comunità) vengono integrati al fine di avere una comprensione complessiva e globale del fenomeno, affrontato nella sua interezza.

Ciascuna delle tre linee di evidenza prevede test e analisi specifiche articolati su quattro livelli di complessità crescente:

- 1) SCREENING SEMPLICE;
- 2) SCREENING RIFINITO;
- 3) ANALISI DI DETTAGLIO;
- 4) ANALISI CONCLUSIVA.

L'ottimizzazione di tempo e costi è perseguita interrompendo il cammino verso livelli di maggiore complessità ogniqualvolta vi sia accordo tra i tre filoni di indagine.

Per consentire la comprensione dell'approccio verrà data una breve descrizione di ciascuno dei tre settori.

#### LINEA DI EVIDENZA CHIMICA (OGGETTO DEL PRESENTE LAVORO)

- 1) determinazione delle concentrazioni totali dei contaminanti di interesse e confronto con valori soglia (se presenti);

- 2) determinazione delle concentrazioni dei contaminanti di rilievo dopo estrazione (stima grossolana della biodisponibilità);
- 3) determinazione delle concentrazioni con varie tipologie di estrazione per meglio valutare la biodisponibilità;
- 4) valutazione del bioaccumulo su specie target.

#### LINEA DI EVIDENZA ECOLOGICA

- 1) valutazione generale della struttura e del funzionamento dell'ecosistema in esame;
- 2) valutazione più approfondita della funzionalità dell'ecosistema;
- 3) stima dei possibili impatti della contaminazione a livello di popolazione e comunità;
- 4) monitoraggio di dettaglio delle biodiversità stagionali e studio approfondito dell'intera catena trofica.

#### LINEA DI EVIDENZA ECO-TOSSICOLOGICA

- 1) test di tossicità acuta con endpoint letali, effettuati su organismi semplici (sovente questi kit per test di tossicità sono presenti in commercio);
- 2) test di tossicità con endpoint sub-letali su organismi semplici;
- 3) test di tossicità con endpoint sub-letali su organismi più complessi ed utilizzo di biomarker;
- 4) test di tossicità con endpoint sub-letali su organismi complessi ed uso di biomarker effettuati in situ (organismi sentinella trapiantati).

Come si evince dalla lista, l'uso dei biomarker si rivela fondamentale per ottenere informazioni di dettaglio ed attendibili sugli effetti di contaminanti su organismi ed andrebbe operato anche nei primi livelli di uno screening eco-tossicologico.

La direttiva 2008/56/UE (Marine Framework Strategy Directive) per la prima volta ne prevede l'utilizzo ai fini del bioassessment.

Tali indicatori biochimici, fisiologici, istologici e genetici sono infatti estremamente specifici e caratteristici del *modus operandi* di determinate classi di sostanze, considerando l'effetto su bersagli tipici della molecola, a differenza dei più rudimentali bioassays.

La produzione di un effetto tossico o comunque di un effetto che alteri la normale omeostasi dell'organismo da parte di un contaminante si sviluppa su diversi livelli gerarchici, dei quali

l'immobilizzazione o la morte sono solo l'ultimo e più evidente gradino.

Si può giungere ad essa mediante alterazioni a livello genetico, variazioni nell'espressione di proteine, alterazioni istopatologiche e del sistema immunitario ed i biomarker consentono di valutare l'esposizione ad una sostanza o i suoi effetti a questi livelli.

Inoltre essi consentono di determinare l'effetto sinergico di più contaminanti presenti in ambiente sotto soglia o gli effetti di esposizioni avvenute in passato, anche se ora il contaminante non è più presente.

Il grosso limite attribuibile ad essi è l'ottenimento di risultati a livello di individuo e non di popolazione o comunità; per questo, mediante l'uso di biomarker è solo ipotizzabile una variazione a livello di organizzazione ecologica superiore, ma questo non può essere suffragato da dati certi.

La linea di evidenza ecologica fornisce di sicuro risposte complete e di grande qualità da questo punto di vista, con l'handicap però di comportare tempi lunghissimi per essere messa in atto.

La relativa novità di un approccio di questo tipo non consente ad oggi di avere una mole di dati di dimensioni soddisfacenti e questo ha portato la U.S. E.P.A. a dichiarare l'assenza di evidenze riguardo ad implicazioni per l'ambiente o per la salute umana da parte di residui farmaceutici presenti in ambiente.

Recenti studi, d'altro canto, hanno dimostrato significativi effetti di residui farmaceutici su organismi viventi e questo già alle bassissime concentrazioni (ppt) alle quali essi si trovano nelle matrici ambientali habitat di tali organismi.

Si riporteranno i risultati di alcuni di questi studi a titolo di esempio.

Il 17- $\alpha$ -etinilestradiolo, ormone estrogeno presente nei farmaci anticoncezionali, è stato osservato comportare femminilizzazione di pesci e rane già a concentrazioni di 1 ng/l (Kidd et al. <sup>22</sup>), un'azione di interferenza a livello endocrino (EDC); il diclofenac inoltre, principio attivo di numerosi antidolorifici commerciali, a concentrazioni di 100 ng/l determina danneggiamento dei reni di alcune specie di pesci e dell'apparato osmoregolatorio nel granchio *Carcinus Maenas* (Waring et al. <sup>23</sup>).

Altri studi, condotti dalla università del Wisconsin (Klaper et al. <sup>24</sup>), in questo caso sulla fluoxetina, antidepressivo inibitore della ricaptazione della serotonina, dimostrano come popolazioni di ciprinidi esposte a concentrazioni intorno ai 100 ng/l siano profondamente danneggiate a livello di competizione intraspecifica, impiegando molto più tempo nella cattura di prede e tendendo a riprodursi in maniera significativamente minore.

L'università di Umea (Fick et al. <sup>25</sup>) ha invece dimostrato come il norgestrel, ormone femminile progestinico presente anch'esso in farmaci anticoncezionali, comporti a concentrazioni ambientali femminilizzazione di individui di trota arcobaleno, la cui fertilità viene in questo modo compromessa.

Altre gravi implicazioni, in questo caso per la salute umana, sono la selezione di ceppi batterici antibiotico-resistenti ad opera di residui di antibiotici in ambiente; tali specie mutanti (mutazioni a livello di genotipo premiate in termini di successo evolutivo) vengono chiamate "superbugs" e, anche se finora l'opinione pubblica non sembra esserne a conoscenza, è auspicabile che non passino alla cronaca per deleterie epidemie.

Si annoverano tra di esse lo *Staphilococcus Aureus* e la *Pseudomonas Aeuriginosa* (Kummerer et al. <sup>26</sup>), responsabili di infezioni intestinali, delle vie respiratorie, dell'apparato muscolo-scheletrico e del sistema nervoso.

Un modello teorico che si è diffuso nell'ultimo decennio, sviluppato dai ricercatori dell'università texana di Baylor <sup>27</sup>, è il Fish Plasma Model.

Quest'ultimo si propone, tramite numerose assunzioni che verranno esposte, di valutare il rischio che residui farmaceutici eventualmente presenti nella matrice ambientale in cui vivono pesci (il modello è stato sviluppato tramite studi sulla trota arcobaleno) possano esplicare effetti avversi su di essi, ovvero specie "non target".

Esso si basa sull'assunto che i meccanismi farmacodinamici/tossicodinamici siano estremamente simili tra i mammiferi, in particolare l'essere umano per cui tali farmaci sono ideati, sintetizzati e commercializzati, ed i pesci presenti nell'ambiente potenzialmente contaminato; in particolare si presuppone che le interazioni dei principi attivi con i recettori ormonali dei loro pathways di azione siano le medesime.

Rapportando le concentrazioni della sostanza considerata nel sangue umano di persone che assumono una dose terapeutica del farmaco ( $H_tPC$  - Human Therapeutic Plasma Concentration) a quella misurata nel plasma dei pesci analizzati ( $FPC$  - Fish Plasma Concentration), si calcola l'ER (Effect Ratio).

$$ER = H_tPC / FPC$$

Qualora il rapporto sia minore di uno il modello presuppone l'insorgenza di meccanismi tossicodinamici nei pesci in tutto e per tutti simili a quelli umani.

Una variante del modello <sup>28</sup> prescinde dalla misura diretta delle concentrazioni plasmatiche ittiche, ricavando direttamente il dato dal coefficiente di ripartizione ottanolo - acqua, indice di lipofilità della sostanza:

BCF (Bioconcentration Factor - concentrazione nel plasma rapportata a quella ambientale) =  
 $\log (FPC / EC) = 0,73 * \log K_{ow} - 0,88$

Dal momento che l'omologia tra pesci ed umani a livello di recettori target dei principi attivi studiati (oltre 500) non supera il 50 % - 60 %, il modello è affetto in molti casi da una sovrastima del rischio reale per le popolazioni ittiche dell'ambiente considerato.

Inoltre la determinazione della concentrazione plasmatica senza misura diretta, a partire dal coefficiente di ripartizione ottanolo - acqua e dunque da proprietà fisico - chimiche si rivela valida solamente per sostanze apolari ( $\log K_{ow} > 4$ ).

Come sottolineato, la ricerca è solamente all'inizio e tra qualche decennio saranno sicuramente note implicazioni più numerose e gravi per l'ambiente e la salute; questa considerazione ci impone di non sottovalutare la materia ed infatti, anche a livello legislativo e normativo, nonché di linee guida qualcosa si sta muovendo, anche se a piccoli passi, come verrà sviluppato nel paragrafo seguente.

## 1.6) QUADRO DI RIFERIMENTO NORMATIVO: DISPOSIZIONI LEGALI, LINEE GUIDA E PROGRAMMI DI MONITORAGGIO

Il miglior modo di introdurre il seguente paragrafo è ricordare il fatto che i residui farmaceutici presenti in ambiente vengono sovente considerati appartenenti alla più ampia categoria dei UC (unregulated contaminants), contaminanti non regolati da normative.

Si tratta infatti di inquinanti emergenti per i quali il quadro di riferimento è in molti casi del tutto assente o, laddove presente, non ancora sufficiente a disciplinare in modo organico una materia così complessa; anche dal punto di vista del biomonitoraggio la situazione è ancora allo stadio embrionale.

Come accennato nella prefazione infatti, la sensibilità ambientale che si è fatta strada nel corso dell'ultimo cinquantennio ha portato ad indagare in modo esaustivo varie tematiche relative all'ambiente ed al suo inquinamento; in questo modo sono state elaborate disposizioni legali

relative alle acque, ai suoli, all'aria, ai rifiuti ed alle valutazioni di impatto ambientale necessarie a monte della realizzazione di opere e progetti ed alle valutazioni ambientali strategiche relative alla pianificazione territoriale.

Varie categorie di inquinanti sono state disciplinate da specifiche direttive ed accordi internazionali: inquinanti organici ed inorganici, metalli pesanti, particolato atmosferico, gas clima alteranti, gas responsabili del deterioramento della fascia di ozono stratosferico, gas legati alla formazione di ozono troposferico, sostanze cancerogene, teratogene, mutagene.

Di recente passi significativi sono compiuti anche nel campo di inquinanti dei quali solo da poco è stato intuito il potenziale distruttivo per l'ambiente e gli organismi viventi, come gli interferenti endocrini ed i residui di farmaci ambientali, categorie che molto spesso si sovrappongono.

Di seguito verrà presentata una panoramica dei più recenti ed importanti provvedimenti a carattere legislativo e di linee guida, adottati nei paesi più all'avanguardia come sensibilità ambientale, o meglio, nei paesi in cui le risorse economiche disponibili consentono di farlo.

## STATI UNITI DI AMERICA

In uno dei paesi maggiormente avanzati dal punto di vista tecnico - scientifico, l'inquadramento normativo del problema dei residui farmaceutici in ambiente si sta facendo strada, anche se, come criticato e contestato da molti, in maniera alquanto lenta.

In una nota risalente al maggio del 2012 redatta dall' "Inspector General" della U.S. E.P.A. (agenzia di protezione ambientale statunitense), garante della regolarità ed efficacia dell'operato dell'agenzia, viene sottolineato come la lentezza nell'inquadrare a livello normativo e di monitoraggio ambientale la categoria dei farmaci ambientali possa tradursi in testi legislativi incompleti ed incapaci di garantire la protezione dell'ambiente e dell'uomo in maniera totale: " Inaction in identifying hazardous waste pharmaceuticals may result in unsafe disposal " <sup>29</sup>.

Negli Stati Uniti non esistono ancora testi di legge che affrontino il problema in maniera specifica e, alla stregua di altri contaminanti con caratteristiche del tutto diverse, i residui farmaceutici sono disciplinati da un decreto sui rifiuti del 1976 (RCRA - Resource Conservation and Recovery Act).

Questo testo indica come pericolosi i rifiuti che posseggano una delle seguenti caratteristiche: tossicità, possibilità di innesco, corrosività e reattività con altre sostanze.

Solamente una piccolissima parte delle migliaia di molecole sintetizzate a livello farmaceutico sono state valutate relativamente a queste caratteristiche e di queste solo 31 principi attivi farmaceutici sono riconosciuti come rifiuti pericolosi e come tali trattati (divieto di smaltimento in discariche

convenzionali, divieto di convogliamento ad impianti di trattamento acque reflue).

Pressioni esercitate dall'agenzia di salute e sicurezza sul lavoro (O.S.H.A.) e dalla nota sopra citata hanno fatto sì che, nel 2012, 8 farmaci ancora non regolati venissero inclusi nella lista dei rifiuti pericolosi e che 21 fossero inseriti in quella dei rifiuti tossici.

Altri testi di legge come ad esempio il C.W.A. (Clean Water Act), il S.D.W.A. (Safe Drinking Water Act) e il T.S.C.A. (Toxic Substances Control Act) mancano di qualsiasi riferimento a residui farmaceutici.

Ciò che manca è però il riferimento a contaminanti di origine farmaceutica già presenti in ambiente e soprattutto la definizione di valori limite di concentrazione superati i quali una matrice può essere considerata contaminata e necessita di bonifica.

Per quello che concerne invece l'introduzione sul mercato e la commercializzazione di prodotti farmaceutici invece, sia il F.F.D.C.A. (Federal Food, Drugs and Cosmetics Act) della F.D.A. (Food and Drug Administration) che il N.E.P.A. (National Environmental Policy Act) dell'E.P.A. prevedono che a tale scopo venga realizzata una valutazione di impatto in due stadi successivi: EA (environmental assessment) mirato a considerare gli effetti della presenza in ambiente della specie chimica ed eventuali misure di compensazione e mitigazione ed EIS (environmental impact statement) nel caso emerga la necessità di un approfondimento più dettagliato sull'impatto ambientale di tali contaminanti.

Dal punto di vista del monitoraggio in ambiente di questa categoria di sostanze invece gli Stati Uniti possono essere considerati all'avanguardia, sia grazie all'operato dell'E.P.A. (tramite le sue sottosezioni O.R.D. - Office of Research and Development - N.E.R.L. - National Exposure Research Laboratory) che della U.S.G.S. (United States Geological Survey), agenzie che nell'ultimo quindicennio hanno condotto e stanno conducendo quattro significativi programmi di monitoraggio delle acque:

1) U.S.G.S. (1999 - 2000) <sup>30</sup>: una ricerca condotta dal dipartimento statunitense di ricerche geologiche negli anni 1999 - 2000 ha evidenziato come l'80 % di 145 corsi d'acqua monitorati (la ricerca si estendeva anche a 55 falde freatiche e 7 impianti di depurazione) fosse caratterizzato dalla presenza di residui farmaceutici (95 principi attivi rilevati, in particolare ormoni ed antibiotici);

2) E.P.A. (2006-2009) <sup>31</sup>: un importante studio pilota dell'agenzia di protezione ambientale, in collaborazione con l'università di Baylor, è stato mirato a riscontrare l'eventuale presenza di PPCP's e, tra di essi, di residui farmaceutici in matrice biologica costituita da fegato e filetto di pesci fluviali (specie non specificata), campionati in cinque fiumi nei pressi di punti di scarico di effluenti depurati (18-24 pesci in ognuno dei 5 siti).

Dei 24 farmaci ricercati, 7 sono stati rilevati e 3 di essi in ognuno dei siti considerati:

l'anitistaminico difenidramina e gli antidepressivi norfluoxetina e sertralina.

3) E.P.A. (2008-2014) <sup>31</sup>: il "National Rivers and Streams Assessment", tuttora in corso, si propone di indagare la presenza di PPCP's ed in particolare residui farmaceutici in pesci fluviali campionati in 164 punti posti nelle adiacenze di macro-agglomerati urbani e 378 punti lontani da centri urbani (5 pesci per ogni sito). La ricerca, a differenza dello studio pilota sopra citato, è in questo caso estesa a 48 diversi Stati e non solamente a Florida, Texas e New Mexico.

4) E.P.A. - U.C.M.R. III (2013-2015): il terzo aggiornamento delle regole di monitoraggio per i contaminanti non normati prevede che, relativamente all'acqua potabilizzata da appositi impianti PWS (Public water Systems), venga testata l'eventuale presenza di 30 contaminanti non normati nel periodo in questione; in particolare, per ciò che concerne i residui farmaceutici, è previsto uno Screening Survey di 7 ormoni (17- $\alpha$ -etinilestradiolo, 17- $\beta$ -estradiolo, estriolo, estrone, equilino, testosterone e 4-androstene-3,17-dione) che riguarda la totalità dei potabilizzatori con utenze superiori a 100000 unità, 320 impianti con utenze tra 10000 e 100000 unità e 480 impianti con utenze inferiori alle 10000 unità.

Parallelamente a queste iniziative a livello nazionale, anche i singoli Stati e le singole amministrazioni urbane si stanno muovendo in questo senso, come dimostra quanto intrapreso dal NYC Department of environmental protection, il quale ha programmato uno studio mirato a rilevare la presenza di contaminanti farmaceutici e prodotti per la cura personale nelle acque potabilizzate dagli impianti cittadini.

## UNIONE EUROPEA

Anche per ciò che concerne la situazione normativa dell'Unione Europea non esistono ancora disposizioni specifiche su PPCP's e residui farmaceutici, nè tantomeno tabelle nelle quali vengano



indicate soglie o valori limite di concentrazione in ambiente.

Il testo unico sull'ambiente (D.Lgs 152/06) prende in considerazione i residui farmaceutici solo dal punto di vista della gestione di essi come rifiuto (parte IV), una situazione analoga alla normativa statunitense; in particolare essi sono considerati come rifiuti speciali non pericolosi (C.E.R. 18 01 09) o, se citotossici e citostatici, come rifiuti speciali pericolosi (C.E.R. 18 01 08) e soggetti alle modalità di smaltimento per termodistruzione (incenerimento) e stoccaggio in contenitori inerti per essi previste; altro testo di legge sulle modalità di smaltimento di farmaci inutilizzati e scaduti è il D.P.R 254/03, sui rifiuti di origine sanitaria.

Riferimenti ai residui già presenti in matrice ambientale sono invece assenti, benchè gli ultimi aggiornamenti della W.F.D. (Water Framework Directive), DIR 2013/39/UE inerente la tutela qualitativa delle acque superficiali interne, di transizione e costiere, prevedono però l'inserimento (art. 8-ter) in una lista di controllo di diclofenac, 17- $\alpha$ -etinilestradiolo e 17- $\beta$ -estradiolo; le sostanze sono incluse in questa lista al fine di una successiva definizione di priorità di intervento nel campo del monitoraggio e di conseguenti valori limite da adottare.

L'introduzione sul mercato di farmaci (AIC - autorizzazione all'introduzione in commercio) e la successiva commercializzazione è anche nel nostro continente sottostante allo svolgimento di una valutazione del rischio ambientale - E.R.A, oltre che all'attestazione dei necessari requisiti di qualità, sicurezza ed efficacia (test farmacologici, chimici e biologici).

La valutazione è disciplinata dall'E.M.E.A. (European Medicine Evaluation Agency) attraverso una serie di linee guida emanate dal 1994 ad oggi (1994: linee guida per farmaci ad uso umano contenenti O.G.M. ; 1997: linee guida per farmaci ad uso veterinario ; 2006: documento finale).

Esse sono raccolte nella direttive 2001/83/CE (codice comunitario per i medicinali ad uso umano) e 2001/82/CE (codice comunitario per i medicinali ad uso veterinario); esse prevedono una valutazione del rischio in due successive fasi:

1) *fase di screening (stima dell'esposizione)*, la quale considera il comportamento in ambiente di residui farmaceutici in termini di bioaccumulo e persistenza. Se questa prima fase dà esito positivo e i dati di esposizione lo indicano come necessario, si passa alla seguente fase;

2) *fase di valutazione del rischio vera e propria*, la quale mediante l'esecuzione di test di tossicità I.S.O. (International Standard Organization) e O.E.C.D. (Organization for Economic and

Commercial Development) su piccoli invertebrati, alghe e pesci valuta la P.N.E.C. (predicted no effect concentration).

La valutazione del rischio finale si basa sull'incrocio tra dati relativi alle concentrazioni in ambiente e quelli relativi alle concentrazioni di non effetto ricavate dai test di tossicità.

$RISK = f(PEC / PNEC)$ ,

PEC = Predicted Environmental Concentration

PNEC = Predicted No Effect Concentration

$PEC \text{ (matrice acquosa)} = A * (100-R) / 365 * P * D * 100 * DOT$ , dove A è il carico totale del farmaco in kg/anno, R è la percentuale di rimozione che avviene ad opera del metabolismo e degli impianti di depurazione, P il numero totale di persone considerate, D la diluizione considerata (di norma 100) e DOT la dotazione idrica giornaliera pro-capite.

$PNEC = LC_{50} \text{ o } EC_{50} / AF$ , dove  $LC_{50}$  è la concentrazione di farmaco che si rivela letale per il 50% degli organismi testati in caso di test letali,  $EC_{50}$  la concentrazione di farmaco che sortisce l'effetto considerato nel 50% degli organismi in caso di test sub-letali e AF è il fattore di sicurezza (10 se sono presenti test letali e sub-letali su individui a vari livelli della catena trofica e 1000 se sono presenti solo dati da test letali sui livelli più semplici e basilari della catena trofica).

In base al rapporto R tra PEC e PNEC si ha che:

- 1)  $R < 1$ : non si necessita di ulteriori azioni;
- 2)  $1 < R < 10$ : ulteriori azioni nel caso in cui il farmaco, al momento del rinnovo dell'autorizzazione, sia caratterizzato da un progressivo aumento nelle vendite;
- 3)  $10 < R < 100$ : ulteriori azioni;
- 4)  $R > 100$ : ulteriori azioni adottate con urgenza.

Il farmaco è autorizzato all'introduzione sul commercio per ciascuno dei quattro esiti relativi all'Environmental risk assessment of medicines, ma le ulteriori azioni prevedono che vengano adottate misure di prevenzione e sicurezza (ad esempio, etichettatura speciale riportante informazioni sui rischi ambientali e sulle corrette modalità di smaltimento del farmaco).

Parallelamente a quanto avvenuto negli Stati Uniti, a partire dal 2001 l'Unione Europea ha sostenuto economicamente un progetto di ricerca mirato all'identificazione e quantificazione di residui farmaceutici in acque superficiali ed acque di depurazione, il progetto PHARMA<sup>30</sup>.

Tale progetto include tre distinti studi che hanno previsto la collaborazione di Università di 13 diversi paesi Europei:

1) progetto *REMPHARMAWATER* (“ Ecotoxicological Assessments and Removal Technologies for Pharmaceuticals in Wastewater ”)<sup>32</sup>

Lo studio guidato dal Prof. Andreozzi dell'Università Federico II di Napoli ha previsto la collaborazione di gruppi di ricerca italiani, francesi, svedesi e greci.

L'obiettivo di tale lavoro è stata l'identificazione e la quantificazione di residui farmaceutici in acque reflue, seguita da una valutazione del rischio ecologico e da un'indagine su quali fossero le tecniche maggiormente all'avanguardia nella rimozione di tali residui.

Le categorie di farmaci indagati sono: FANS, regolatori lipidici fibrati, antiaritmici beta-bloccanti, antibiotici, antidepressivi ed antipsicotici.

Il progetto ha previsto l'esecuzione di test di tossicità su alghe, invertebrati e piccoli pesci, oltre allo studio delle cinetiche di degradazione in ambiente e delle tecniche di rimozione negli impianti di trattamento per ciascuno dei 20 farmaci indagati.

2) progetto *POSEIDON* (“ Assessment of Technologies for the Removal of PPCP's in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse ”)<sup>32</sup>

Questa ricerca internazionale, guidata dal Dott. Ternes dell'Istituto ESWE di Berlino, la quale ha previsto la collaborazione di studiosi provenienti da Germania, Austria, Svizzera, Finlandia, Polonia, Francia e Spagna, è stata incentrata sulla verifica della presenza di residui farmaceutici in acque di scarico all'ingresso ed all'uscita di impianti di depurazione e in acque di potabilizzatori.

Si sono valutate poi le migliori tecnologie atte ad abbattere tale carico di inquinanti, mediante una dettagliata analisi dei processi terziari di depurazione: ozonizzazione, attinizzazione, microfiltrazione, ultrafiltrazione ed osmosi inversa.

3) progetto ERAVMIS (“ Environmental Risk Assessment of Veterinary Medicines in Sludge ”)<sup>32</sup>

Quest'ultimo progetto di ricerca, guidato dal Dott. Boxall della Cranfield University con la collaborazione di gruppi provenienti da Gran Bretagna, Danimarca, Olanda e Spagna, è stato finalizzato alla determinazione della presenza di residui farmaceutici veterinari in fanghi di depurazione e terreni con essi concimati.

In particolare si è fatta luce su quali fossero i fattori maggiormente coinvolti nel trasporto ambientale, nella degradazione, nel destino di tali contaminanti e sulle principali implicazioni per organismi terrestri ed acquatici, sviluppando un modello utilizzabile dai legislatori allo scopo di elaborare piani d'azione (gestione del rischi).

Inoltre, le agenzie internazionali per la protezione ambientale sono attive sul tema dei residui farmaceutici in ambiente anche in ambito europeo.

La commissione per il nord-est Atlantico (OSPAR), fondata nel 1992 sulla base di quanto dichiarato dalle parti contraenti (Unione Europea in primis, Germania, Danimarca, Belgio, Olanda, Francia, Regno Unito, Irlanda, Islanda, Norvegia, Svezia, Finlandia, Spagna, Portogallo, Lussemburgo e Svizzera) nei trattati di Oslo e Parigi negli anni settanta ha raggruppato il suo operato in 6 tematiche: biodiversità, cambiamento climatico, eutrofizzazione, industria del petrolio e del gas offshore, sostanze pericolose e sostanze pericolose radioattive.

Nel gruppo delle sostanze pericolose sono state recentemente inserite, al fianco di metalli pesanti e inquinanti organici persistenti, anche 19 principi attivi contenuti in farmaci.

La lista che li raggruppa è denominata “ List of Chemicals for priority action ” e sta ad indicare come per esse vadano urgentemente definite priorità di intervento a livello di monitoraggio ambientale e di determinazione delle concentrazioni in ambiente.

La commissione di Helsinki HELCOM per la tutela del Baltico (alla quale aderiscono Germania, Danimarca, Finlandia, Russia, Estonia, Lettonia, Lituania ed Unione Europea) prevede nel suo BSAP (Baltic Sea Action Plan) il monitoraggio delle concentrazioni di diclofenac, 17- $\alpha$ -etinilestradiolo e 17- $\beta$ -estradiolo nelle acque di numerosi depuratori (San Pietroburgo, Svezia e Finlandia).

Dal quadro riportato emerge come, poco a poco, passo dopo passo, si stia comunque prendendo coscienza del problema inerente ai residui farmaceutici in ambiente e come, in realtà, già numerose campagne di monitoraggio ed iniziative a carattere legale siano state intraprese.

Si è ancora lontani dal disporre di un quadro organico della materia, anche a causa della sconfinata mole di sostanze presenti in ambiente, ma il cammino è ormai segnato e forse già a breve non si

potrà più parlare di unregulated contaminants riferendosi ai PPCP's.

Gli elementi cardine che dovranno guidare la messa a punto di valori soglia e limiti di legge saranno il raggruppamento in macrocategorie dal comportamento simile, la considerazione dei volumi di produzione e di vendita, la conoscenza del destino in ambiente (degradazione, bioaccumulo, bioconcentrazione e biomagnificazione), nonché delle maggiori implicazioni per l'ambiente (biota e salute umana).

Solo la collaborazione e l'integrazione dei vari filoni di ricerca (chimico - ecotossicologico - ecologico) potrà allora fornire adeguato sostegno a questo iter legale, come per altro è successo nei decenni trascorsi relativamente ad altri inquinanti.

## CAPITOLO II

# PROCEDURE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI FARMACI IN AMBIENTE

–

## STRUMENTAZIONE DI LABORATORIO

## 2.1) PREMESSA

Il grande progresso tecnologico che ha avuto luogo durante il secolo scorso ha fatto sì che filoni di indagine scientifica del tutto nuovi facessero la loro comparsa e questo, come detto, è avanzato di pari passo con una rinnovata e consapevole sensibilità ambientale che ha coinvolto fasce sempre maggiori di popolazione.

In questo modo la chimica analitica, insieme al progresso di un numero enorme di altre branche scientifiche, ha posto l'essere umano nella condizione del tutto nuova di svincolarsi dalle proprie percezioni sensoriali, al fine di indagare settori e tematiche pressochè impenetrabili.

Fino all'inizio del novecento infatti gli unici campanelli di allarme agli occhi dell'uomo provenivano dagli stimoli captati dal corpo umano, come ad esempio il terribile smog e polvere nella Londra delle rivoluzioni industriali o il forte odore proveniente dalle acque reflue e dalle deiezioni umani, nonchè dalle fabbriche in fermento o ancora il pessimo sapore che assumevano frutti e ortaggi coltivati nei pressi di industrie o fertilizzati con sostanze a forte impatto.

I primi monitoraggi in campo ambientale e le disposizioni legislative in merito erano dunque fortemente legati a quanto gli esseri viventi fossero in grado di percepire, a quanto a livello macroscopico non andava; si trattava quindi di fenomeni rapidi, con un orizzonte temporale tale da essere notati in maniera evidente.

In seguito fenomeni come il cambiamento climatico, la perdita di biodiversità, l'acidificazione dei suoli, l'effetto serra, il buco nell'ozono stratosferico, lo smog fotochimico, ma anche l'aumento di incidenza di tumori, di malattie prettamente correlate a particolari categorie di sostanze, hanno richiesto che la consapevolezza umana si affrancasse dalla semplice osservazione sensoriale di ciò che ci circonda.

Anzi, la percezione sensoriale non può più in molti casi essere in grado di guidarci, basti pensare all'ottimo odore che per molte persone sprigionano le benzine o il gasolio, o l'abitacolo di un'auto nuova, frutto invece di sostanze chimiche che mandano in tilt la parte più primitiva del nostro cervello; bisogna quindi raggiungere, come sostiene Daniel Goleman nel suo libro “ Intelligenza Ecologica “<sup>33</sup>, una nuova consapevolezza che ci porti a battere nuovi sentieri.

Il ragionamento può essere spinto molto avanti, fino all'oggetto della trattazione: la presenza di residui farmaceutici in matrici ambientali.

Le sostanze in esame, qualora presenti, sono caratterizzate da concentrazioni infinitesimali (parts per billion / parts per trillion); per meglio comprendere questi ordini di grandezza e riportarci quindi ad una dimensione sensoriale, è lo stesso rapporto presente tra una giornata della nostra vita ed il

numero di giorni che intercorrono tra oggi ed il mesozoico, l'epoca dei dinosauri, o lo stesso rapporto che c'è tra una goccia sulla pelle una volta usciti da una piscina e l'intero volume di acqua contenuto nella piscina.

Da questi semplici esempi si comprende come si sia dovuto attendere sino agli anni settanta del secolo scorso per potere avere a disposizione una strumentazione analitica all'altezza del problema in esame.

I primi studi relativi a residui farmaceutici nelle acque risalgono infatti al 1976, quando Garrison <sup>34</sup> ed allievi, in Kansas, rilevarono la presenza di acido clofibrato a concentrazioni dell'ordine del µg/l in acque di falda riempite con acque depurate da un locale impianto di trattamento (l'acido clofibrato, derivato dalla degradazione del regolatore lipidico clofibrato, è una delle sostanze più difficilmente degradabili una volta giunte in ambiente).

L'anno successivo, Hignite e Azarnoff <sup>35</sup>, conducendo studi sul medesimo depuratore, determinarono, oltre alla sopra citata sostanza, la presenza di caffeina, nicotina ed acido salicilico.

Nel 1984 invece Watts <sup>36</sup> scoprì che l'antibiotico eritromicina e due metaboliti della caffeina (teobromina e teofilina) erano presenti in un fiume degli Stati Uniti Meridionali.

Nel corso degli anni settanta ed ottanta non si andò oltre questi rivoluzionari studi e si dovettero attendere gli anni novanta e duemila per una trattazione organica del problema.

Fu così che dai tre/quattro articoli apparsi sull'argomento fino agli anni novanta, si è passati oggi giorno agli oltre trecento studi pubblicati ogni anno.

Il monitoraggio dei farmaci in ambiente dapprima seguiva una logica piuttosto casuale, basata sulla determinazione di tutto quello che era presente in una matrice.

In seguito si è passati a monitoraggi sistematici, mirati ad indagare specifiche classi di contaminanti, in base a volumi di produzione, volumi commercializzati e consumati, comportamento in ambiente ed implicazioni per l'ambiente ed il biota, come si è potuto evincere dai programmi di monitoraggio finanziati da U.S. E.P.A. , Unione Europea, OSPAR ed HELCOM.

Le classi farmacologiche al centro delle indagini scientifiche nel maggior numero di casi sono:

- NSAID / FANS (non steroidal antiinflammatory drugs / farmaci antiinflammatori non steroidei):  
acido salicilico, acido mefenamico, diclofenac, ketoprofene, ibuprofene, indometacina, sali di lisina, nimesulide, etc. ;

- REGOLATORI LIPIDICI FIBRATI: gemfibrozil, bezafibrato, clofibrato e statine;



- BETA-BLOCCANTI ANTIARITMICI: metoprololo, propranololo, atenololo;
- ANTIBIOTICI: trimethoprim, ofloxacina, sulfametossazolo, sulfametazina, amoxicillina, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, cloramfenicolo, eritromicina, lincomicina, etc. ;
- ANTIDEPRESSIVI SSRI (inibitori della ricaptazione della serotonina): sertralina, fluoxetina, paroxetina;
- SEDATIVI BENZODIAZEPINICI: diazepam, alprazolam, lorazepam, etc;
- ANTIEPILETTICI: carbamazepina in primis;
- ANTIPERTENSIVI: furosemide, diltiazem, etc;
- ANTICOAGULANTI: eparina, warfarina, etc;
- ANTISTAMINICI: ranitidina, loratadina, difenilidrammina, etc;
- STIMOLANTI SNC: caffeina e suoi metaboliti, cocaina, eroina, amfetamine, etc;
- ORMONI: estrogeni (17-b-estradiolo, 17-a-etinilestradiolo, estrone, estriolo), progestinici (norgestrel), androgenici (testosterone, androsterone), etc.

Le nazioni maggiormente all'avanguardia in questa ricerca sono gli stati del nord Europa (Irlanda, Gran Bretagna, Norvegia, Svezia, Olanda, Belgio, Germania,), gli Stati Uniti d'America e, da qualche anno a questa parte, anche l'Italia.

Pubblicazioni sempre più numerose stanno facendo la loro comparsa in Cina, Giappone e Corea.

Le matrici indagate sono costituite per lo più da acque reflue, da acque dolci superficiali e, in misura minore, di falda, mentre solo di recente da acque salmastre o marine; questo per la maggiore complessità nel trattamento del campione a monte della fase cromatografica.

Come visto, piuttosto rare sono anche le analisi condotte su matrice solida (suoli e fanghi di depurazione) , ancora più laboriose nel pre - trattamento dei campioni.

Pochissimi sono infine gli studi su matrice biologica (sangue, plasma, emolinfa di insetti o di mitili)

e questo rappresenta il filone di indagine più complesso nell'ambito del settore.

Dal punto di vista analitico, ciò che ha consentito di fare il salto di qualità in questo settore è stato l'accoppiamento, all'inizio degli anni novanta, della tecnica di separazione mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC o UHPLC) alla spettrometria di massa (MS).

Questo ha consentito di raggiungere livelli di sensibilità, selettività e risoluzione mai raggiunti prima di quel momento.

In questo modo si sono potute determinare le concentrazioni di tali residui farmaceutici nelle acque dell'Antartide (studio di Christina Brosius <sup>37</sup> - Università del Tennessee - il quale ha riscontrato la presenza di paracetamolo, sulfametossazolo e caffeina nei pressi delle Shetland meridionali, a valori di pochi ng/l) o del mar di Norvegia settentrionale (studio del Prof. Weigel <sup>38</sup> - Università di Wageningen - che ha determinato la presenza di triclosano, DEET, caffeina ed ibuprofene a nord di Tromsø).

Si sono potute elaborare inoltre numerose procedure “ multi - residuo ”, in grado di determinare la simultanea presenza di decine di molecole (in molti casi fino a cinquanta) di interesse nello stesso campione (ad esempio “ High sensitivity HPLC Analysis of Contaminants of Emerging Concern in Water Using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System ” - Università di Tucson in collaborazione con Agilent <sup>39</sup>).

Nel corso del seguente capitolo si darà una descrizione della procedura analitica standard alla quale gli studi per la determinazione di residui farmaceutici in matrice acquosa fanno riferimento (linea blu del seguente diagramma <sup>fig. 2.1</sup>).

Per ciascuna delle fasi previste, verrà fatto un approfondimento tecnico - scientifico, che consentirà di avere un'idea del preciso funzionamento dei macchinari e delle modalità operative.

Le procedure analitiche relative alle matrici biologiche analizzate (linea oro e linea rossa) si sovrappongono largamente a quella qui riportata, presentando step preliminari aggiuntivi (procedura su tessuti) o step alternativi di modesta complessità (procedura su emolinfa), descritti in dettaglio nel capitolo relativo alla parte sperimentale.

Per queste ultime la fase relativa al trattamento del campione antecedente all'analisi HPLC - MS è derivata dunque da quella propria dei campioni in matrice acquosa e prevede adattamenti necessari alla diversa natura del medium di partenza realizzabili in poco tempo con le normali apparecchiature di cui è dotato qualsiasi laboratorio (miscelatore, centrifuga, omogeneizzatore e agitatori).

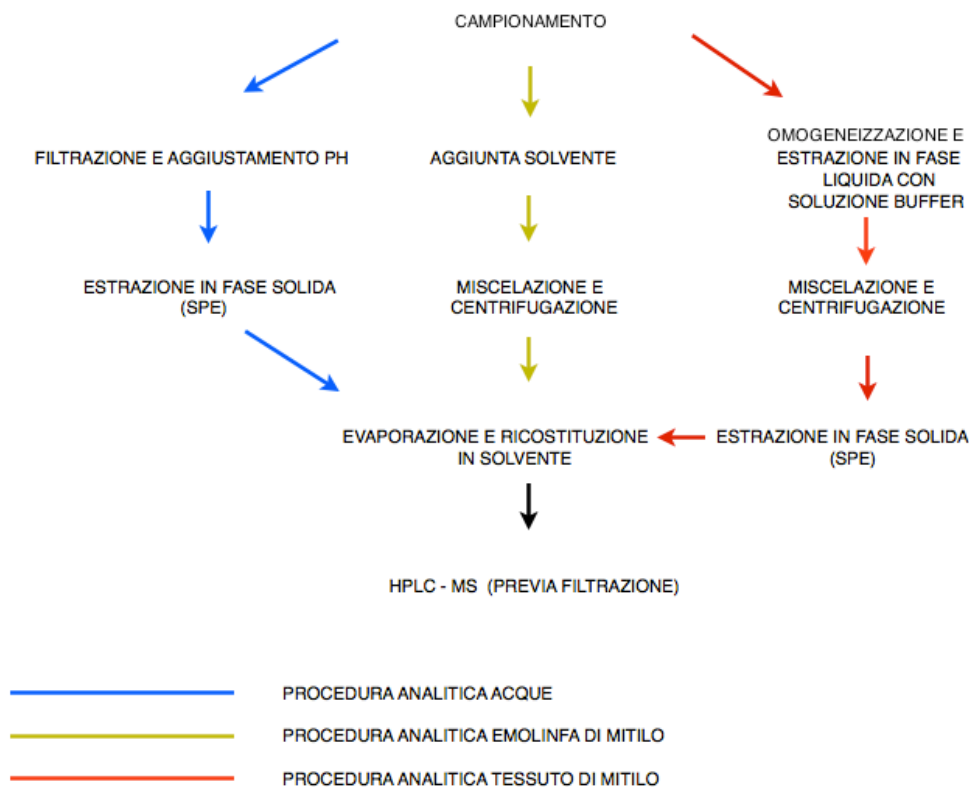


fig 2.1: iter delle tre distinte procedure analitiche per l'identificazione e quantificazione di farmaci in matrice liquida ambientale, in matrice liquida biologica (emolinfa di mitilo) ed in matrice solida biologica (tessuto di mitilo).

## 2.2) PANORAMICA SULLA PROCEDURA ANALITICA E BREVE GLOSSARIO DEI TERMINI INERENTI LE FIGURE DI MERITO DELL'ANALISI

Come sottolineato più volte nel corso della trattazione, l'insieme delle operazioni che consentono di passare dal prelievo del campione al dato numerico relativo alla concentrazione alla quale la specie chimica di interesse è presente nella matrice, è alquanto complesso e laborioso.

Nel corso dell'ultimo ventennio la procedura si è affinata sempre più e si può considerare pressochè standardizzata nelle sue fasi principali, benchè le strumentazioni a disposizione di ogni laboratorio differiscano per prestazioni, sensibilità, selettività, risoluzione e benchè un grande numero di variabili (condizioni di pH e temperatura, materiale di filtrazione, materiale per l'estrazione in fase solida, condizioni cromatografiche, solventi impiegati e modalità di esercizio della spettrometria) vengano scelte in funzione dell'analita o degli analiti considerati.

Tale omogeneizzazione obbedisce al requisito fondamentale di questo nuovo filone di indagine: il fatto che studi di questo tipo possano essere condotti in maniera rapida, possano dare risposte

affidabili, in maniera riproducibile e stabile nel tempo, si rivelino quindi robusti.

I metodi e i macchinari devono poi essere caratterizzati da *sensibilità* e *selettività*.

Solo in questo modo si potranno condurre estese campagne di monitoraggio per stabilire eventualmente i limiti di legge che ad oggi ancora mancano.

Prima di addentrarsi nel cuore della questione è opportuno dare la spiegazione del significato di alcuni dei termini che saranno ricorrenti nel seguito e che indicano la bontà, il merito, di un macchinario o della intera procedura analitica.

*sensibilità*: la sensibilità del metodo o di uno strumento è la minima variazione della grandezza fisica tale da determinare una variazione nella grandezza misurata; riferendoci ad una concentrazione, essa sarà dunque la minima variazione della massa per unità di volume apprezzabile mediante la variazione nell'altezza della linea di un tracciato cromatografico ( $S = \Delta R / \Delta E$ , ove R è la grandezza misurata dal macchinario ed E è la grandezza reale).

Si vede quindi come, nella fattispecie, essa rappresenti il coefficiente angolare della retta di regressione tra la quantità di specie chimica in esame ed il segnale fornito.

*selettività*: per selettività si intende invece la capacità del metodo di originare una diversa risposta per l'analita e gli altri componenti della matrice di indagine, in modo da distinguere ciò che è di interesse, da ciò che non lo è.

*LOD (limit of detection / limite di rivelabilità)*: tale limite è la minima quantità di una sostanza, quantità per unità di volume se ci si riferisce ad una concentrazione, in grado di determinare una risposta dello strumento statisticamente diversa dal bianco, ovvero dall'assenza della sostanza.

Nella maggior parte dei casi viene determinato considerando la concentrazione alla quale il segnale dello strumento è pari a 3 volte al segnale associato al bianco, ovvero al rumore di fondo, nella quasi totalità dei casi diverso da zero ( $S/N = 3$ ); in maniera più precisa può anche essere determinato considerando il fatto che, leggendo più volte una soluzione alla stessa concentrazione, uno strumento, per i limiti tecnici inevitabili, sarà sempre affetto da un margine di imprecisione, e le risposte date non potranno essere mai le medesime.

Esse seguono in buona approssimazione una distribuzione statistica a campana gaussiana.

In molti casi quindi il segnale associato al bianco non sarà nullo, ma assumerà valori più alti, valori che una relazione di corrispondenza biunivoca tra segnale e concentrazione assocerebbe a quantità

di analita diverse dallo zero.

Il LOD può essere considerato come la concentrazione associata al segnale che, analizzando una serie ipoteticamente infinita di bianchi, lo strumento misurerebbe nello 0,15 % dei casi (ovvero distanza  $3\sigma$  - dev.st. - dalla media dei segnali associati al bianco), con una probabilità di falso positivo quindi dello 0,15 %.

*LOQ (limit of quantification / limite di quantificazione)*: tale limite è invece associato alla minima concentrazione di analita che possa essere quantificata e si rivela più alto del LOD.

Molto spesso è determinato considerando la concentrazione di analita in grado di determinare un segnale dello strumento pari a 10 volte quello del bianco ( $S/N = 10$ ), ovvero al rumore di fondo.

In maniera più precisa, riferendosi sempre alla distribuzione di probabilità dei segnali che la macchina associa al bianco, è individuato considerando il segnale che si trova ad una distanza di  $10\sigma$  dalla media dei segnali in assenza di analita e risalendo, tramite la curva di regressione, alla concentrazione corrispondente.

Si tratta quindi di un segnale, e di conseguenza di una concentrazione, che lo strumento leggerebbe in un numero infinitesimale di volte con una batteria ipoteticamente infinita di bianchi, cautelandosi quindi quasi del tutto dalla possibilità di avere falsi positivi.

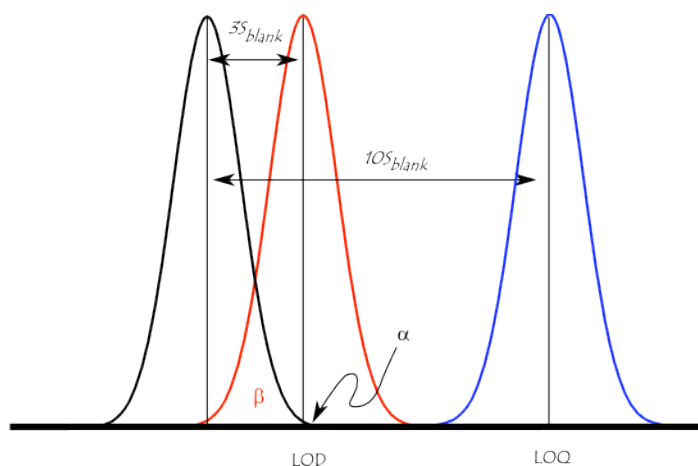


fig. 2.2: distribuzioni gaussiane associate ai segnali che uno strumento rileva in corrispondenza di concentrazione di analita nulla (bianco), di concentrazione pari al LOD e di concentrazione pari al LOQ.

*MRL (method reporting limit / limite di quantificazione del metodo)*: a differenza di LOD e LOQ, i quali sono prettamente associati allo strumento e alle sue potenzialità, il limite di quantificazione del metodo rappresenta la minima quantità di analita presente nel campione di partenza che può essere determinata dalla procedura analitica nel suo complesso.

Sarà quindi pari al LOQ diviso per il numero di concentrazioni effettuato dalle operazioni

preliminari all'analisi strumentale e per il fattore di efficienza del processo, ovvero il rapporto tra quantità dell'analita letta dallo strumento e quella presente realmente nel campione.

$MRL = LOQ / (C * ETP)$ , dove C = concentrazioni effettuate e ETP = efficienza totale del processo (quantità di analita rilevata dallo strumento / quantità di analita nel campione di partenza), sempre  $< 1$  a causa delle perdite nei vari passaggi e del disturbo nell'analisi operato da interferenti.

*LINEARITA' DI RISPOSTA*: lo strumento che rende possibile la determinazione della concentrazione di analita presente in matrice deve essere in grado di presentare una corrispondenza biunivoca tra quantità (o concentrazione se la si rapporta al volume in ingresso per ogni analisi) e segnale fornito e questo deve accadere per un range che copra svariati ordini di grandezza (intervallo dinamico di linearità), o per lo meno l'intervallo di concentrazioni atteso per i campioni. Questo parametro può essere misurato tramite il coefficiente di correlazione ( $\rho_{xy} = \sigma_{xy} / (\sigma_x * \sigma_y)$ ), (dove x è la concentrazione nota, y il segnale dello strumento,  $\sigma_{xy}$  la covarianza tra x e y,  $\sigma_x$  e  $\sigma_y$  le deviazioni standard di x e di y), oppure mediante il più noto coefficiente di determinazione  $R^2$ , la sua radice quadrata.

La corrispondenza viene ottenuta analizzando vari standard in solvente a concentrazione nota che vengono inseriti direttamente nello strumento, non essendo soggetti all'intera procedura e dunque a eventuali perdite.

*EFFETTO MATRICE*: come si vedrà meglio nella parte relativa alla spettrometria di massa, l'effetto matrice è dovuto all'interferenza che altri componenti della matrice operano nei confronti della molecola di interesse.

Questo può comportare un indebolimento dei segnali associati all'analita, rilevando concentrazioni più basse di quelle effettivamente presenti (falsi negativi) o, in casi più rari, un rafforzamento e falsi positivi.

*PRECISIONE*: la precisione è la vicinanza di accordo tra più repliche dello stesso campione; esistono a tale proposito due principali teorie le quali differiscono per costi e tempo di analisi.

Si possono eseguire repliche che prevedono la ripetizione dell'intera procedura analitica o, per contro, repliche del medesimo campione soggetto solo una volta all'intera procedura di laboratorio, ma sottoposto a diverse analisi strumentali.

Ovviamente questa seconda opzione richiede meno tempo e racchiude in sé un margine di

incertezza molto minore; è quindi necessario chiarire cosa viene inteso per replica.

La precisione è misurata mediante la varianza di quanto misurato dallo strumento ( $\sigma^2 = E(X^2) - [E(X)]^2$ ) o tramite la sua radice quadrata, la deviazione standard.

*ACCURATEZZA*: per accuratezza si intende invece la concordanza tra la media dei risultati ottenuti dalle misure strumentali  $X_m$  ed il valore ritenuto vero  $T$  (anch'esso si discosta dal vero ideale  $\tau$ ). Tale parametro è determinato facendo uso di soluzioni realizzate immettendo la molecola di interesse in concentrazione nota in una matrice in tutto e per tutto identica a quella in questione e sottoponendola all'intera procedura analitica.

Il rapporto tra la concentrazione rilevata dall'analisi e quella nota di partenza viene chiamato ETP ( $ETP = X_m / T$  - efficienza totale del processo) e tiene conto sia delle perdite di sostanza che inficiano il recupero, sia dell'effetto matrice sopra citato.

Per distinguere i due contributi si può aggiungere una quantità nota di analita al termine della procedura di preparazione del campione, scongiurando quindi ogni eventuale perdita e confrontare il risultato con quello ottenuto in precedenza.

Da questi semplici parametri di bontà dell'analisi si vede come alla riuscita del tutto contribuisca non solo una strumentazione in grado di garantire elevate performance, ma anche una procedura ideata nel suo complesso per ottimizzare il recupero della sostanza desiderata mediante solventi e materiali opportuni, concentrandola a valori sufficientemente elevati per essere letti.

Da ultimo, non certo per importanza, è richiesta anche un'abilità notevole delle persone coinvolte, abilità manuale nelle varie operazioni, conoscenze avanzate nel campo della chimica generale, organica ed analitica, e conoscenze fisico-matematiche che consentano di controllare gli strumenti.

La procedura per l'analisi di residui farmaceutici in matrice acquosa prevede nel suo complesso un numero limitato di step, i quali però richiedono una cura e meticolosità estreme:

- 1) PRELIEVO DEL CAMPIONE ED ADEGUATA CONSERVAZIONE
- 2) FILTRAZIONE ED EVENTUALE AGGIUSTAMENTO DEL PH
- 3) SPE (SOLID PHASE EXTRACTION / ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA)
- 4) EVAPORAZIONE E RICOSTITUZIONE DEL CAMPIONE
- 5) ULTERIORE FILTRAZIONE

6) HPLC/UHPLC (CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE)

7) MS (SPETTROMETRIA DI MASSA)

Nel paragrafo seguente verranno descritti con dovizia di particolari, cercando di rendere comprensibili le finalità e le modalità operative di ciascun passaggio.

## 2.3) DESCRIZIONE DELLE VARIE FASI E DELLA STRUMENTAZIONE DI LABORATORIO

### PRELIEVO DEL CAMPIONE ED ADEGUATA CONSERVAZIONE

La fase apparentemente più banale deve essere condotta con grande attenzione poichè anche da essa dipenderà la riuscita o meno dell'analisi.

L'operazione di campionamento richiede una impostazione secondo precisi criteri e considerazioni di tipo statistico.

Indipendentemente dalla domanda che guida uno studio scientifico infatti, in questo caso la determinazione di una concentrazione infinitesimale, ciò che si effettua mediante la raccolta, organizzazione, analisi ed interpretazione di campioni è una operazione di *inferenza* statistica.

Dallo studio di una porzione piccola, limitata e circoscritta del sistema in considerazione si attribuiscono dei valori alla popolazione nel suo complesso, ovvero tramite statistiche campionarie si cerca di determinare statistiche di popolazione.

Risulta evidente come questa operazione comporti approssimazioni ed inevitabili errori e per tale motivo le unità di campionamento vanno scelte con estrema cura.

I campioni devono dunque essere *rappresentativi* del sistema nel suo complesso (le loro caratteristiche e proprietà fisico-chimico-biologiche devono riflettere quelle dell'intero sistema), *omogenei* (costanza ed uniformità di caratteristiche) ed *integri* (non devono subire alterazioni e perdita delle caratteristiche originarie nel corso del trasporto e della conservazione).

Si può impostare un campionamento in modo *casuale*, termine che non significa senza criterio e senza una logica, ma che indica come ci si debba svincolare da scelte soggettive allo scopo di garantire significatività delle statistiche determinate.

In questo modo, avendo un'area oggetto di campionamento, si potrebbero scegliere le coordinate geografiche dei punti da campionare in modo casuale ed aleatorio.

Non è garantito però che un campionamento casuale risulti anche rappresentativo dell'intero; i punti



estratti casualmente potrebbero infatti essere localizzati in un'area molto ristretta rispetto all'area totale, nella quale un fattore perturbativo indipendente da ciò che si vuole determinare falsa lo studio.

Un'altra strategia è rappresentata dal campionamento *stratificato o casuale con restrizioni*; esso prevede la divisione della zona analizzata in sottozone, all'interno di ciascuna delle quali le unità di campionamento vengono scelte con il criterio della aleatorietà.

Il numero di campioni per ogni sottoarea sarà proporzionale all'estensione di essa rispetto al totale; in questo modo l'intera area di studio sarà rappresentata in maniera uniforme.

Da ultimo, il campionamento può essere condotto anche in maniera *sistematica*, ovvero determinando con un preciso criterio i punti di campionamento; l'area indagata verrà così divisa mediante una griglia o dei transetti e le unità di campionamento saranno rappresentate dai nodi della griglia o da punti a passo costante nel transetto.

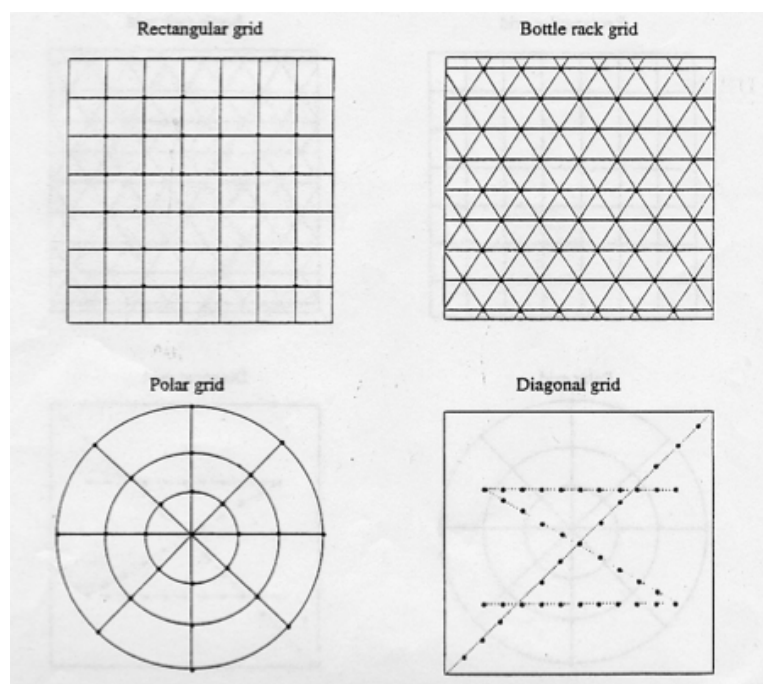


fig. 2.3: diverse modalità di divisione dell'area oggetto di studio nel corso di un campionamento sistematico.

Una volta raccolte le unità di campionamento è fondamentale evitare che possa modificare le sue proprietà nell'intervallo di tempo tra il prelievo e l'analisi di laboratorio, che può avvenire anche dopo mesi.

Bisogna quindi limitare quanto più possibile i fenomeni di *foto-degradazione*, *biodegradazione*, *termodegradazione*, *degradazione chimica* e trasformazione in sottoprodotti, *volatilizzazione*,

*adsorbimento* alle pareti del contenitore, *precipitazione*.

La prassi più comune è il prelievo di acque da analizzare in contenitori oscurati, in quanto la fotodegradazione è spesso la prima causa di alterazione del campione; in alternativa il recipiente può essere schermato mediante uno strato di alluminio.

In qualche caso, qualora sia notevole il contributo di fenomeni metabolici da parte di colonie batteriche nella degradazione degli analiti considerati, si provvede ad autoclavaggio del contenitore.

Fondamentale è poi operare un surgelamento ( $- 20^{\circ} \text{C}$ ) dei campioni.

Talvolta, in caso di analiti caratterizzati da notevole polarità, si effettua una silanizzazione dei contenitori in vetro; gli atomi di silicio, molto spesso legati a gruppi ossidrilici, risultano marcatamente polari e potrebbero comportare una adesione delle molecole in questione al recipiente.

Per tale motivo si legano catene idrocarburiche agli atomi di silicio, rimuovendo i gruppi carbossilici ed abbattendo drasticamente la polarità.

## FILTRAZIONE ED EVENTUALE AGGIUSTAMENTO DEL PH

La vera e propria procedura analitica di laboratorio, in seguito allo scongelamento del campione, si apre nella totalità dei casi con una operazione di filtrazione.

Si tratta di una operazione di separazione fisica con lo scopo di eliminare le impurezze solide che potrebbero falsare o comunque ostacolare l'analisi del liquido in esame.

Essa può essere effettuata per semplice *gravità* oppure, nella grande maggioranza dei casi, operando

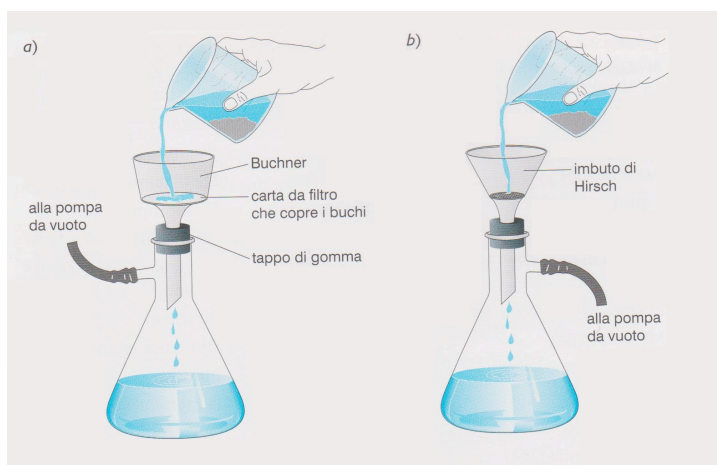


fig. 2.4 : filtrazione sottovuoto con imbuto Buchner e imbuto Hirsch.

25  $\mu\text{m}$ ); al di sotto di essi viene posta una beuta o un becher di raccolta.

*sottovuoto* per velocizzare il tutto, mediante una pompa meccanica e l'impiego di vetreria a tenuta.

Gli esempi più comuni di strumentazione per filtrare sottovuoto sono l'imbuto BUCHNER e l'imbuto HIRSCH, contenitori in vetro, porcellana o plastica con fori sul fondo, di forma rispettivamente cilindrica e conica, sui quali viene posta carta filtrante (diametro delle particelle trattenute compreso tra 1 e

Qualora si desideri trattenere e rimuovere particelle di diametro inferiore si ricorre a medium filtrante di materiale diverso dalla carta.

Filtri in quarzo o fibra di vetro consentono ad esempio il trattenimento di particelle di diametri compresi tra 0,7 e 2,7  $\mu\text{m}$ , mentre filtri a membrana (in assoluto i più utilizzati) consentono di scendere sino all'ordine di 10 nm.

A tale scopo la scelta ricade su materiali sintetici: PVDF (polivinildenfluoruro), PAN (poliacrilonitrile), PES (poliesteresulfone), PC (policarbonato), PETF (polietilentetrafluoruro), etc. Dunque, minore è il diametro dei pori della trama filtrante, maggiore è la ritentività e più lenta risulterà l'operazione.

In molti casi, in seguito ad una filtrazione, si provvede ad effettuare un aggiustamento del pH, allo scopo di favorire la presenza della molecola di interesse nella forma desiderata (indissociata-non ionica o dissociata-ionica).

Richiamando la legge di Henderson-Hasselbach, già citata nel capitolo introduttivo in merito all'uptake di una sostanze nell'organismo, si ha che per sostanze acide a pH superiori rispetto alla costante di dissociazione acida prevale la forma ionica della molecola, mentre per sostanze basiche questo avviene a pH inferiori a tale costante.

$\text{pH} - \text{pK}_a = \log ([\text{A}^-] / [\text{HA}])$  per gli acidi e

$\text{pK}_a - \text{pH} = \log ([\text{B}^+] / [\text{BOH}])$  per le basi,

dove  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ ,

$\text{K}_a = [\text{H}^+][\text{A}^-] / [\text{HA}]$ ,

$\text{K}_b = [\text{B}^+][\text{OH}^-] / [\text{BOH}]$ ,

$\text{pOH} = 14 - \text{pH}$ ,

$\text{pK}_b = 14 - \text{pK}_a$ .

Generalmente, in vista di una estrazione SPE e di una separazione cromatografica (HPLC/UHPLC) basate sul principio della polarità, di seguito illustrato (diversa polarità degli analiti rispetto alla matrice in cui sono presenti e rispetto ai solventi impiegati), la soluzione di gran lunga più adottata, si preferisce mantenere la specie chimica nella sua forma indissociata e non ionica.

Volendo invece fare affidamento su cartucce SPE o colonne cromatografiche a scambio ionico, l'operatore agirà al fine di massimizzare la porzione di molecole ionizzate (anioni in caso di acidi e

cationi in caso di basi).

In ogni caso bisogna prestare massima attenzione ai prodotti chimici (acidi o basi) impiegati per regolare il pH; apparecchi di spettrometria di massa sono infatti estremamente delicati ed è assolutamente sconsigliabile l'adozione di acidi forti, come HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HI, HBr, HF.

A tale scopo la scelta ricade quindi su HCOOH o CH<sub>3</sub>COOH, mentre per le basi non sono richieste particolari precauzioni.

## SPE (SOLID PHASE EXTRACTION / ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA)

Passaggio di fondamentale importanza nella serie di operazioni di trattamento del campione in vista della cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (HPLC-MS) è l'estrazione in fase solida SPE.

Si tratta di una separazione realizzata in vari step, di seguito descritti, ottenuta per mezzo di particelle solide impaccate in una cartuccia, avente lo scopo di eliminare gli interferenti (specie chimiche che non sono di interesse, ma solo di ostacolo) ed ottenere campioni più puri.

Nel corso degli anni questa tecnica è venuta a sostituire l'estrazione LLE (liquid / liquid), nella quale non si utilizzava un medium solido per condurre la separazione, ma le molecole di interesse si ripartivano tra il liquido costituente la matrice ed il solvente; questo richiedeva maggiori quantità di solvente e tempi più lunghi.

Come principio di funzionamento l'estrazione in fase solida, come si vedrà, è estremamente simile alla cromatografia liquida e regolata dalle medesime leggi e considerazioni.

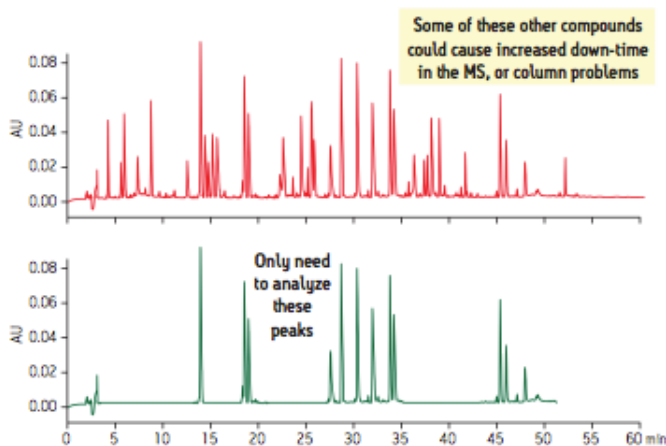
Volendo dare una prima idea di questa procedura, essa può essere descritta come il passaggio del campione, precedentemente filtrato, attraverso una siringa in materiale plastico entro la quale è posta la cartuccia di estrazione, il cuore di questa tecnica di separazione.

La cartuccia è realizzata in materiale di caratteristiche e dimensioni tali da trattenere la specie o le specie chimiche di interesse (in questo caso residui di farmaci ambientali) e da lasciar passare la matrice acquosa insieme al maggior quantitativo possibile di interferenti.

In seguito ad un risciacquo che rimuove altri interferenti, le molecole di interesse vengono eluite (asportate dalla cartuccia alla quale si erano legate) mediante l'impiego di uno o più (eluizione multi-step) opportuni solventi.

Nel dettaglio, le finalità di questa estrazione sono molteplici e qui elencate:

### 1) RIDUZIONE DELLA COMPLESSITA' DELLA MATRICE DI PARTENZA E PURIFICAZIONE DEGLI ANALITI DI INTERESSE



Come si può notare dal confronto tra cromatogrammi (grafici che mostrano picchi proporzionali all'abbondanza dell'analita in funzione del tempo - output di un software HPLC-MS), il numero di interferenti e picchi di disturbo post SPE cala drasticamente.

fig. 2.5 : confronto tra il cromatogramma di un campione senza SPE (sopra) e di un campione con SPE (sotto).

### 2) RIDUZIONE DELL'EFFETTO MATRICE

I due cromatogrammi mostrano come l'effetto di soppressione del segnale dovuto ad interferenti presenti nella matrice (una delle possibili conseguenze dell' "effetto matrice"), che ha come conseguenza la sottostima della reale quantità di analita, cali in maniera del tutto evidente dopo una SPE fig. 2.6.

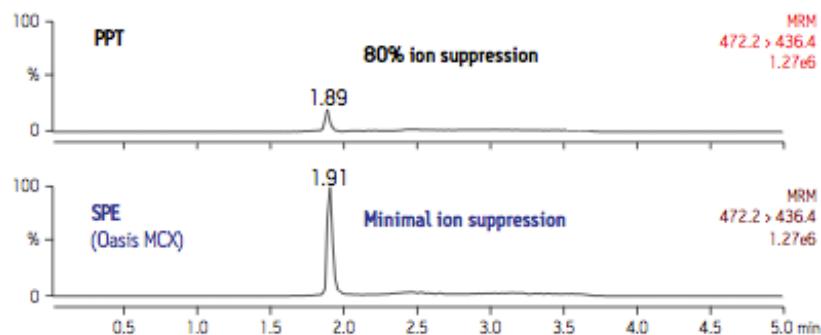


fig. 2.6: confronto tra il cromatogramma di un campione senza SPE (sopra) e di un campione con SPE (sotto): entrambi i cromatogrammi sono relativi alla selezione dello ione desiderato agendo sui parametri dello spettrometro di massa.

### 3) SEPARAZIONE DEGLI ANALITI DI INTERESSE IN CLASSI DI COMPOSTI

Questo è realizzato utilizzando vari tipi di solvente, uno di seguito all'altro (eluizione multi-step), ciascuno quanto più possibile affine alla classe di analiti da isolare rispetto alle altre.

#### 4) RILEVAZIONE PIU' FACILE DI SOSTANZE PRESENTI IN TRACCE

Nello specifico la procedura SPE può essere realizzata secondo due principali principi fisici:

- separazione in base a *polarità* delle molecole;
- separazione in base a *scambio di ioni*.

#### POLARITY SOLID PHASE EXTRACTION

Si tratta della soluzione prevalentemente scelta, la quale prevede la separazione e conseguente concentrazione delle molecole in base alla loro polarità e alla maggiore affinità di esse per il solvente di eluizione rispetto alla matrice.

Come per la cromatografia di ripartizione, si può realizzare una SPE in base alla polarità agendo in *normal phase* o in *reversed phase*.

#### *NORMAL PHASE*

Il termine *normal phase*, in analogia con la cromatografia liquida, deriva dal fatto che questa fu la prima modalità in cui le separazioni venivano condotte; tale scelta è indicata qualora si abbia a che fare con analiti di natura polare o moderatamente apolare, presenti all'interno di una matrice apolare (matrice organica o solventi organici).

Il materiale con il quale la cartuccia è realizzata è idrofilo/polare, in modo da trattenere tramite interazioni idrofiliche, ponti H ed interazioni dipolo-dipolo, le molecole di interesse nel momento in cui il campione è fatto fluire.

Anche il solvente di eluizione deve essere in questo caso polare, al fine di asportare l'analita e concentrarlo in una aliquota finale.

I materiali con i quali le cartucce SPE *normal phase* sono realizzate sono costituiti prevalentemente da:

- particelle di silice tal quali ( $\text{SiO}_2$ );
- gel di silice con fase legata costituita da gruppi funzionali CN o  $\text{NH}_2$ ;
- gel di silice con fase legata costituita da gruppi funzionali di silicati di magnesio o allumina.

## REVERSED PHASE

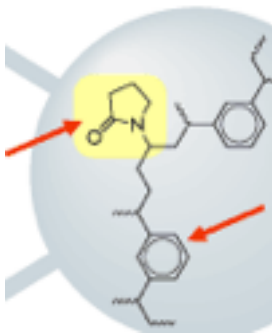
Di gran lunga la tipologia di cartucce più adottate nel campo di procedure analitiche su campioni acquosi (acqua di fiume, lago, falda, mare, etc.) e quindi polari, qualora si abbia a che fare con analiti apolari o moderatamente polari.

Le cartucce sono realizzate legando ad un gel di silice (di caratteristiche, come visto poc'anzi, idrofile) gruppi funzionali idrofobici, i quali consentono di trattenere quanto desiderato mediante interazioni idrofobiche e ponti di Van der Waals.

Anche il solvente con cui l'eluizione finale è realizzata dovrà avere proprietà apolari o comunque essere meno polare della matrice di partenza.

I materiali con i quali le cartucce SPE reversed phase sono realizzate sono costituiti prevalentemente da:

- gel di silice con fase legata costituita da lunghe catene di idrocarburi ( $C_{18}$  o  $C_8$ ) : in questo caso le interazioni si verificano tra i gruppi C-H della molecola analizzata e delle catene di HC;
- gel di silice con fase legata costituita da grafite: indicate per il trattenimento di idrocarburi ciclici , con interazioni che si verificano tra gli anelli esagonali di atomi di C.



Una soluzione intermedia tra la reversed phase e la normal phase è rappresentata da cartucce SPE HLB (hydrophilic lipophilic balanced) in stirene o divinilbenzene (DVB); in questo caso è possibile isolare e concentrare sia molecole polari che molecole apolari, grazie alla contemporanea presenza di gruppi funzionali con caratteristiche idrofiliche ed idrofobiche.

fig. 2.7: struttura molecolare di una cartuccia HLB (contemporanea presenza di gruppi apolari e di gruppi polari).

## ION EXCHANGE SOLID PHASE EXTRACTION

In questo caso la proprietà sulla quale si fa leva al fine di separare le molecole è la presenza di ioni liberi che possano interagire con gruppi funzionali ionici nella cartuccia.

In particolare, per le molecole acide ionizzate si adottano materiali *anion exchanger* sui quali sono presenti cationi come  $N^+$ , mentre per le sostanze basiche si scelgono materiali *cation exchanger*,

con gruppi funzionali anionici come  $\text{SO}_3^-$ ; ne consegue che il pH dovrà essere regolato in modo da garantire la presenza della molecola in fase dissociata.

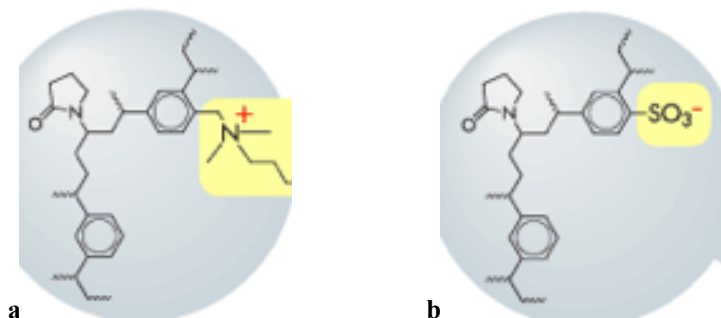


fig. 2.8 a+b: in evidenza i gruppi funzionali legati alla trama in DVB per facilitare gli scambi ionici.



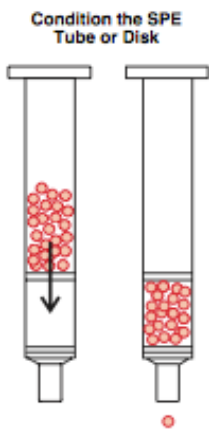
Dal punto di vista pratico, nella maggior parte dei casi si opera sottovuoto mediante utilizzo di un manifold che consente di realizzare la contemporanea estrazione di numerosi campioni.

fig 2.9: vacuum manifold.

Indipendentemente dalla scelta del materiale adottata le diverse sottofasi di una procedura SPE sono le medesime:



### 1) CONDIZIONAMENTO



La cartuccia SPE è dapprima condizionata mediante il passaggio di una piccola aliquota del solvente (pochi ml) che verrà scelto per l'eluizione, in modo da bagnare i pori della trama a sufficienza ed attivare i siti attivi; qualora non si provveda ad un condizionamento preliminare, la superficie di scambio che viene attivata cala in modo drastico (de-wetting e conseguente break-through, ovvero passaggio della totalità dell'analita attraverso la cartuccia, senza essere trattenuto).

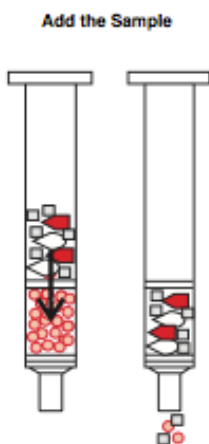
fig 2.10: conditioning step.

### 2) EQUILIBRAZIONE

Un'altra piccola aliquota, in questo caso della matrice in cui è presente il campione, viene fatta fluire attraverso la cartuccia, in quanto se non si provvedesse ad asportare il solvente di condizionamento l'analita non potrebbe interagire con i siti attivi della cartuccia, ma si legherebbe solo alle poche gocce di solvente presenti.

Queste due fasi non sono particolarmente sensibili alle velocità di flusso utilizzate, comunque mantenute sull'ordine della decina di ml/min, adottando pressioni dello strumento al di sotto dei 20 mmHg.

### 3) PASSAGGIO DEL CAMPIONE (RETENTION)

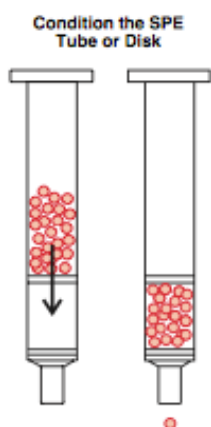


La fase più delicata è quella che prevede il passaggio del campione (volumi sino a 1l) attraverso la cartuccia; è infatti estremamente sensibile alla velocità di flusso, la quale deve essere mantenuta molto bassa (nell'ordine di 5 ml/min), in modo che le molecole abbiano il tempo per interagire con i siti attivi e legarsi alla fase solida quanto meglio possibile.

Questo richiede quindi tempi piuttosto lunghi, dell'ordine di una o più ore.

fig 2.11: retention step.

#### 4) RISCIAQUO (RINSING/WASHING)



Una quota parte di interferenti presenti nella cartuccia viene asportata mediante il passaggio di un piccolo volume (qualche ml) di solvente più “forte” della matrice di partenza, ma più “debole” di quello usato per eluire.

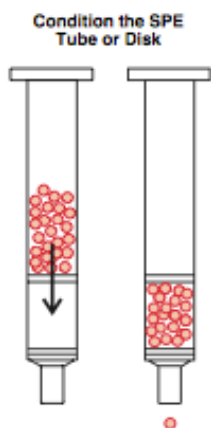
L’aggettivo forte viene in questo caso utilizzato per indicare l’affinità nei confronti dell’analita indagato; ne consegue che in normal phase solventi forti saranno polari, mentre in reversed phase, per contro, solventi forti saranno apolari.

Il solvente deve essere quindi sufficientemente “forte” da rimuovere gli interferenti, ma non al punto da asportare le molecole oggetto di studio.

fig. 2.12: rinsing step.

#### 5) ELUIZIONE

Grandissima cura deve essere posta nella scelta del giusto solvente di eluizione, del quale verrà fatto fluire un volume ridotto (qualche ml); nel caso di SPE reversed phase, la modalità indicata per



i campioni in matrice acquosa oggetto dello studio, si scelgono solitamente sostanze appena meno polari dell’acqua, come  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (rispettivamente metanolo, etil-acetato, acetone, acido acetico, diclorometano).

Nel caso di suddivisione degli analiti in varie classi di interesse si operano eluizioni multi-step, con solventi a differente grado di polarità, quello della classe alla quale sono rivolti.

Ancora una volta la velocità di flusso è un parametro da mantenere basso e da controllare accuratamente (1-2 ml/min).

fig 2.13: elution step.

La totalità dei solventi impiegati deve avere una purezza sufficiente a condurre le successive analisi di HPLC - MS (“purezza grado massa”), in modo da evitare ostruzioni in colonna cromatografica e nei capillari dello spettrometro, nonché vari problemi di effetto matrice.

## EVAPORAZIONE E RICOSTITUZIONE DEL CAMPIONE

La totalità dei protocolli seguiti per questo tipo di analisi prevede un'evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto gassoso, in modo da ottenere la volatilizzazione del solvente impiegato nell'ultimo step dell'estrazione SPE.

In questo modo le molecole di interesse, le quali hanno tensione di vapore minore rispetto al solvente, rimangono "teoricamente" le sole ad essere adese alla parete del recipiente, mentre solvente ed interferenti sono rimossi.

Il flusso gassoso deve essere controllato accuratamente, onde evitare fuoriuscite e perdite delle specie chimiche desiderate; per questo motivo risulta una delle operazioni più gravose in termini di tempo.

In seguito l'analita viene ricostituito (ossia riportato ad un volume paragonabile a quello pre-evaporazione) con una miscela di solventi corrispondente a quella impiegata all'inizio della separazione cromatografica, in modo da non falsare le dinamiche di separazione in colonna.

## ULTERIORE FILTRAZIONE



Da ultimo, prima del passaggio in HPLC - MS, si opera una filtrazione con materiale sintetico (PVDF, PAN, PES, PC, PP, PTFE, etc.) di porosità estremamente ridotta ed alta ritentività (diametro inferiore a  $0,5 \mu\text{m}$ ), per evitare quanto più possibile di introdurre particelle indesiderate nei macchinari; a tale scopo sono largamente impiegati filtri a siringa, più pratici nel momento in cui si lavora con volume ridotti (circa 1 ml).

fig. 2.14: esempio di filtro a siringa.

## HPLC / UHPLC (HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY / ULTRA HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

La tecnica di separazione mediante cromatografia liquida ad alta pressione o mediante la sua variante, ancora più performante, di ultra cromatografia liquida ad alta pressione, è quella di gran

lunga più impiegata in vista di un'analisi qualitativa o quantitativa che si affidi a rivelatori a spettrometria di massa.

Si tratta di una procedura che separa ed isola le varie componenti di una matrice complessa in base al diverso tempo che esse impiegano per attraversare, sotto la spinta di una fase mobile liquida iniettata in pressione, un condotto cilindrico, la colonna cromatografica, sulle pareti del quale è presente la fase stazionaria, ovvero particelle solide o particelle liquide fatte adsorbire su un supporto solido.

In base alla differente affinità che ciascuna specie chimica presenta per la fase stazionaria emergono interazioni più o meno forti, le quali esplicano un effetto diretto sul tempo di attraversamento.

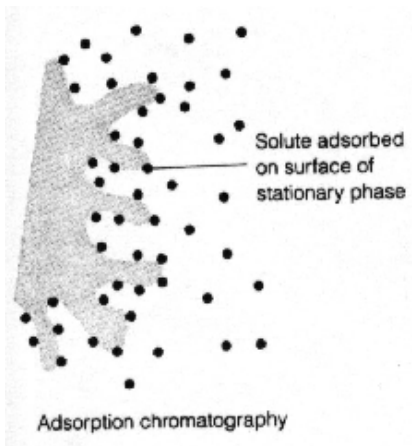
Molecole con basso grado di affinità per il materiale di rivestimento della colonna vengono quindi trascinate dalla fase mobile in tempi molto brevi, mentre altre molecole, più affini alle particelle che rivestono il cilindro, impiegheranno tempi maggiori; si sfrutta quindi una ripartizione dell'analita tra la fase mobile e la fase stazionaria, per far sì che le varie classi di composti giungano all'analizzatore (in questo caso lo spettrometro) in tempi diversi e caratteristici della categoria di appartenenza.

Inoltre, qualora non si operi in condizioni isocratiche (composizione della fase mobile immutata nel corso dell'analisi), le caratteristiche della fase mobile vengono variate ad opportuni intervalli di tempo (gradiente), aumentando la percentuale di solvente "forte" (molto affine alle particelle che instaurano legami intensi con la fase stazionaria), allo scopo di rimuovere gli analiti dalla colonna, "pulendo" la colonna da ciò che aderisce con maggiore vigore.

A titolo di nota storica, il termine cromatografia deriva dal suo pioniere, il botanico russo Michail Cvet, il quale realizzò una antesignana colonna cromatografica allo scopo di isolare la clorofilla da composti vegetali; la fase stazionaria era costituita da particelle di argilla polare, mentre la fase mobile da etere di petrolio apolare; le varie sostanze eluivano dalla colonna in tempi diversi, mostrando tipiche bande di colore (dal greco *chromos*).

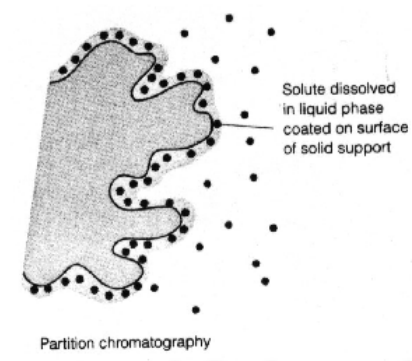
Le analisi oggetto del lavoro sono condotte da ormai un ventennio impiegando la tecnologia HPLC, la quale si è rivelata più indicata per misure di tipo quantitativo rispetto alla più diffusa GC (gas cromatografia), nella quale il campione è vaporizzato e la fase mobile è costituita da un gas carrier.

Mantenedosi nell'ambito della cromatografia liquida, esistono quindi varie tipologie di separazione:



- *cromatografia di adsorbimento*, nella quale la fase stazionaria è costituita da particelle solide che rivestono la colonna o da opportuni gruppi funzionali organici fatti aderire ad esse (fase legata);

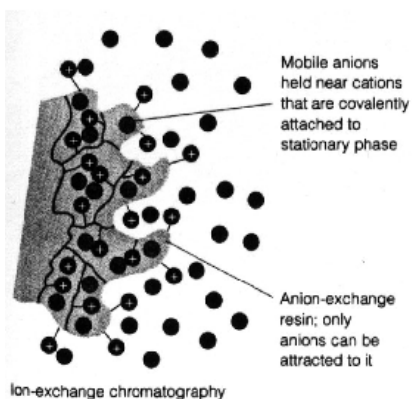
fig. 2.15: cromatografia di adsorbimento.



- *cromatografia di ripartizione*, dove la fase stazionaria è costituita invece da un liquido fatto aderire a particelle solide. In questo caso fase mobile e liquido adesivo devono essere immiscibili;

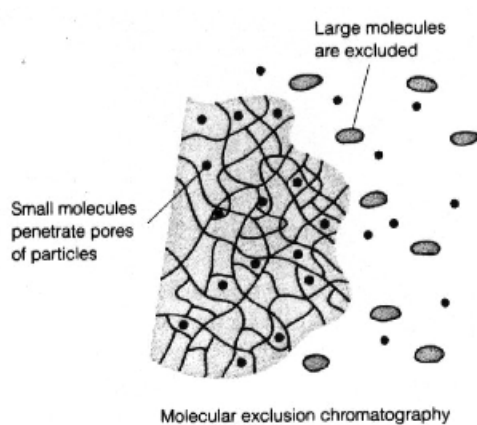
fig. 2.16: cromatografia di ripartizione.

Entrambe queste tipologie realizzano la separazione delle componenti in base alla diversa polarità delle molecole e, come nell'estrazione SPE, si può operare in *normal phase*, con fase mobile apolare e fase stazionaria polare, o, come nella quasi totalità dei casi, in *reversed phase*, il suo contrario.



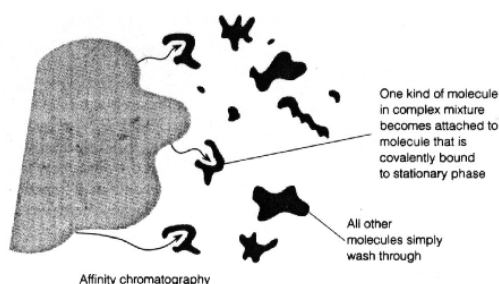
-*cromatografia a scambio ionico*, ove opportune resine ioniche che rivestono il condotto sono in grado di scambiare ioni con le sostanze di passaggio (anche in questo caso i gruppi funzionali e gli ioni legati alla trama molecolare sono i medesimi della SPE - ioni  $N^+$  nel caso di scambio anionico e ioni  $SO_3^-$  nel caso di scambio cationico);

fig. 2.17: cromatografia a scambio ionico.



- *cromatografia ad esclusione molecolare*, basata sulle dimensioni molecolari, nella quale la separazione avviene per il fatto che una trama porosa che riveste la colonna trattiene le particelle di diametro minore rispetto ai pori e viceversa;

fig. 2.18: cromatografia ad esclusione molecolare.



-*cromatografia in base all'affinità*, di gran lunga la più selettiva, in grado di trattenere e legare in colonna solamente le molecole estremamente affini ai gruppi funzionali di rivestimento.

fig. 2.19: cromatografia in base all'affinità molecolare.

Come accennato la tipologia più impiegata per l'analisi di residui di farmaci ambientali in matrice acquosa, e dunque polare, è la cromatografia di adsorbimento *reversed phase*, nella quale la colonna è rivestita da particelle di silice del diametro di qualche um, di

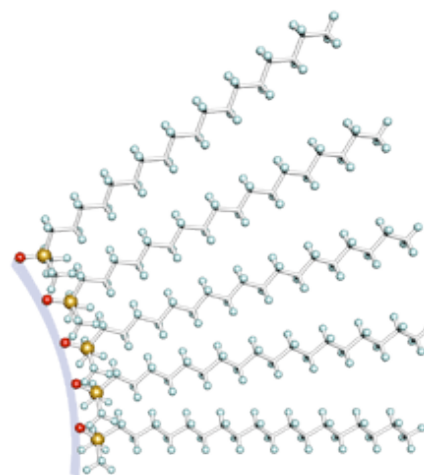


per sè polare, alle quali sono legati gruppi funzionali

a

apolari costituiti da lunghe catene di

HC C<sub>18</sub> o C<sub>8</sub>.



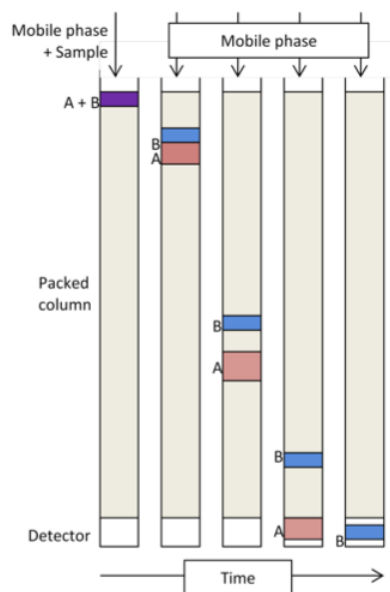
b

fig. 2.20 a + b: colonne cromatografiche di diversa lunghezza e trama molecolare reversed phase C<sub>18</sub>.

Tale tipologia si presta alla perfezione all'analisi di molecole organiche in matrice polare.

I solventi di fase mobile impiegati sono di norma rappresentati da due liquidi, immessi in colonna in percentuali diverse nel corso dell'analisi (eluizione a gradiente):

- *fase acquosa* (H<sub>2</sub>O MQ ad elevato grado di purezza con piccolissime percentuali di HCOOH, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub><sup>+</sup> o altri solventi);
- *fase organica* (solvente “forte”, ad esempio CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>OH, etc.).



Nel corso dell'analisi la percentuale di fase organica si innalza sempre più (ad esempio da percentuali intorno a zero alla quasi totalità), in modo da originare il desorbimento delle molecole maggiormente affini alla fase stazionaria, con rottura dei legami idrofobici, e la migrazione verso il rivelatore; si ha quindi che le molecole più polari attraversano la colonna in tempi brevissimi giungendo subito al rivelatore, mentre molecole più idrofobiche hanno tempi di ritenzione più lunghi, necessitando di alte percentuali di solvente “ forte ” per essere rimosse.

Come illustrato dalla figura, si ha quindi la scomposizione di matrici complesse in varie classi di interesse.

fig. 2.21: separazione cromatografica tra due sostanze con caratteristiche differenti di polarità.

Solitamente vengono iniettati volumi estremamente ridotti di campione ricostituito, dell'ordine di 10-20 µl, ad un flusso compreso tra 0,1 e 0,5 ml/min; ovviamente alte velocità di flusso rendono più rapida l'analisi, ma compromettono la capacità di separazione e assoggettano la colonna a pressioni molto elevate e critiche, fino a 300/400 bar.

Le colonne hanno lunghezze comprese tra i 5 ed i 25 cm e diametri tra 1,5 e 4 mm.

I parametri che possono quantificare la bontà della separazione che avviene in colonna, dei quali ora si darà una descrizione, sono la *selettività*, l'*efficienza* e la *risoluzione*.

E' ormai chiaro come l'efficacia di separazione, ovvero la capacità di distinguere tra una molecola ed un'altra, sia legata alla differente ripartizione tra fase mobile e stazionaria ed al conseguente diverso tempo di ritenzione tra le specie chimiche in transito.

Come prima cosa, è necessario presentare i parametri che descrivono la ripartizione di una specie tra fase stazionaria e fase mobile:

$$K_a = [X_a]_{\text{fase stazionaria}} / [X_a]_{\text{fase mobile}} = \text{coefficiente di ripartizione o di distribuzione di una sostanza tra}$$

fase stazionaria e fase mobile;

$$k'_a = K_a * V_{\text{fase stazionaria}} / V_{\text{fase mobile}} = (T_{ra} - T_m) / T_m = \text{fattore di capacit\`a},$$

dove  $V_{\text{fase stazionaria}}$  è il volume totale di fase stazionaria,  $V_{\text{fase mobile}}$  è il volume totale di fase mobile,  $T_{ra}$  è il tempo di ritenzione dell'analita, ovvero il tempo impiegato ad attraversare la colonna e  $T_m$  è il tempo morto, ovvero il tempo di ritenzione di una specie chimica che non viene minimamente trattenuta e fuoriesce subito insieme alla fase mobile.

Al crescere dell'affinità di una molecola per la fase stazionaria, aumenterà quindi il tempo di ritenzione e, conseguentemente, i parametri  $K_a$  e di  $k'_a$ .

La *selettività* è intesa come la capacità di distinguere tra due sostanze, la bontà della separazione effettuata, e affonda le sue radici nel diverso livello di affinità e dunque di interazione con la fase stazionaria tra di esse.

Considerando due sostanze a e b, si ha che:

$$\alpha = k'_a / k'_b = (T_{ra} - T_m) / (T_{rb} - T_m)$$

Quindi, a parità di sostanze a e b, la selettività è tanto maggiore quando più differiscono i tempi di ritenzione e, come output, quanto più distanti sono i picchi di un cromatogramma.

L'*efficienza* di separazione è invece espressa da  $n$  e HETP, rispettivamente il numero di piatti teorici e l'altezza equivalente dei piatti teorici.

Il termine piatto teorico deriva dalle torri di frazionamento, nelle quali miscele complesse vengono separate per distillazione frazionata (evaporazione e condensazione a diverse temperature ed altezze della torre); esso indica i punti della torre in cui si ha un equilibrio tra fase aeriforme e fase liquida.

Maggiore è il numero di piatti teorici, maggiore è il numero di componenti della miscela che possono essere separati, indice di elevata efficienza.

Dal momento che  $HETP = L$  (lunghezza colonna) /  $n$ , elevata efficienza corrisponde ad altezza limitata di ciascun piatto teorico.

In una colonna cromatografica in realtà si ha una successione continua, senza soluzione di continuità e quindi non discreta come nelle torri di frazionamento, di stati di equilibrio delle



molecole tra fase stazionaria e fase mobile ed il termine piatto teorico assume un'accezione puramente matematica.

Per meglio comprendere il significato di HETP in una colonna cromatografica, forse meno chiaro rispetto alle torri di frazionamento, occorre considerare le diverse velocità che particelle della stessa specie chimica assumono nel loro passaggio.

Il caso ideale vorrebbe che esse avessero tutte la medesima velocità ed impiegassero lo stesso tempo (picchi cromatografici molto ripidi e stretti); in realtà la distribuzione delle velocità segue un andamento gaussiano ed i tempi di ritenzione variano a parità di specie a causa di alcuni fattori:

- diverse traiettorie seguite dalle particelle;
- fenomeni di dispersione longitudinale originati dalla presenza di zone a maggiore concentrazione dalle quali le molecole tendono ad allontanarsi a maggiore velocità;
- trasferimento di massa da fase mobile a fase stazionaria che avviene in modo diverso e peculiare per ciascuna molecola.

Il risultato è che l'output del sistema HPLC - MS, ovvero il cromatogramma, sarà più o meno affetto da un allargamento dei picchi, il cosiddetto allargamento di banda.

Minore è l'HETP, minore sarà questo allargamento di banda e, a pari selettività, i picchi saranno maggiormente distinti.

L'equazione matematica di Van Deemter lega l'altezza equivalente dei piatti teorici alla velocità di flusso della fase mobile che, si accennava, non può superare un certo valore al fine di non compromettere l'efficienza.

$HETP = A + B/v + c \cdot V$ , dove A è un parametro fisico legato alle dimensioni delle particelle di fase stazionaria, B è un parametro cinetico legato alla dispersione longitudinale e C è un parametro termodinamico legato alla velocità di trasferimento di massa e quindi all'adsorbimento/desorbimento tra fase mobile e fase stazionaria.

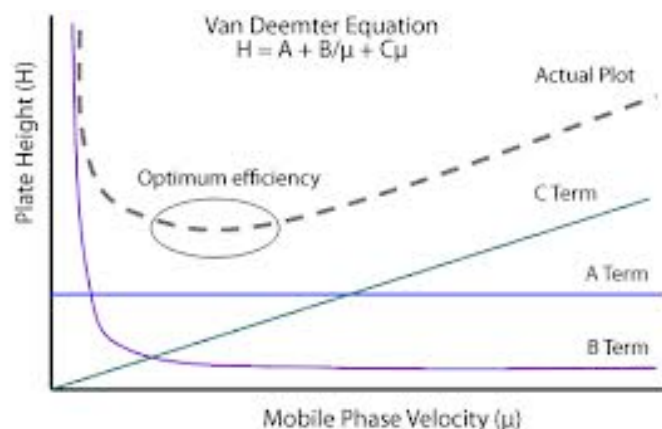


fig. 2.22: relazione di Van Deemter.

L'efficienza massima è raggiunta in corrispondenza della velocità ideale, la quale minimizza HETP. A velocità minori vi sarà un allargamento di banda dovuto alla dispersione longitudinale, la quale si riduce all'aumentare della velocità, mentre a velocità maggiori l'allargamento di banda è dovuto all'aumentare della disomogeneità da molecola a molecola nei trasferimenti di massa tra le fasi.

D'altro canto, anche la relazione  $n = 16 * (Tr/W)^2$ , dove W è la larghezza del picco cromatografico, indica come al diminuire del tempo di ritenzione, e dunque all'aumentare della velocità oltre determinate soglie (0,3 - 0,4 ml/min), il numero di piatti n cala e dunque HETP aumenta, minando l'efficienza.

Come risultato finale, si ha che la *risoluzione* di una colonna cromatografica, ovvero la capacità di distinguere tra picchi di diverse specie molecolari, sarà influenzata sia dalla *selettività* che dall'*efficienza*; a pari selettività, distanza tra picchi dovuta a diversi tempi di ritenzione, la risoluzione è incrementata dal fatto che tali picchi siano ripidi e stretti (alta efficienza), mentre a pari efficienza essa è incrementata dal fatto che i picchi possano essere più distanziati (alta selettività).

$$R = 2 * (Tr_a - Tr_b) / (Wa + Wb) = 0,25 * n^{0,5} * (\alpha - 1) / \alpha * k' / (k'+1)$$

Le equazioni sopra riportate spiegano chiaramente i contributi rispettivi di selettività, efficienza e fattore di capacità nei confronti della risoluzione.

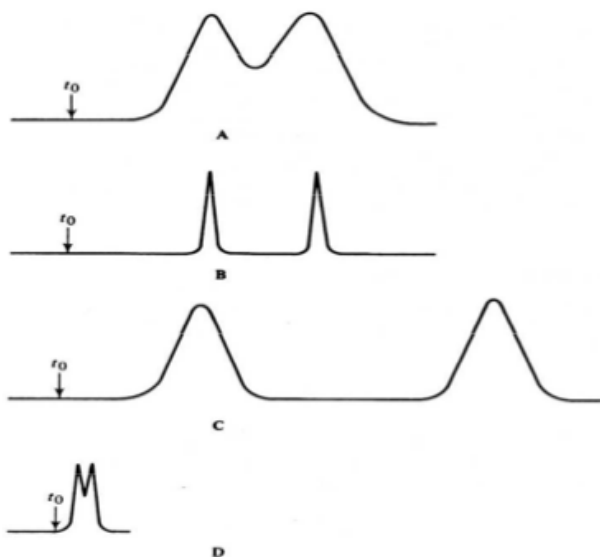


fig. 2.23: a = risoluzione scarsa dovuta a bassa efficienza del sistema; b = buona risoluzione garantita da buona efficienza del sistema; c = buona risoluzione garantita da buona selettività del sistema; d = scarsa risoluzione dovuta a bassa selettività e basso fattore di capacità di entrambi gli analiti.

I sistemi cromatografici di tipo UHPLC si svincolano in parte da queste considerazioni, in quanto sono in grado di garantire elevata capacità di risoluzione pur operando ad elevatissime velocità di flusso ( $> 0,5$  ml/min) ed in tempi estremamente contenuti, riducendo sensibilmente la durata di un'analisi (da 20/30 min a 2/3 minuti).

Le pressioni in gioco sono in questo caso dell'ordine delle migliaia di bar ( $> 7000$  bar) e le particelle che rivestono la colonna hanno diametro ridottissimo, consentendo anche per questo alte velocità.

Il rovescio della medaglia è senza dubbio un costo notevole dell'apparecchiatura e consumi energetici del tutto superiori alla normale HPLC.

In uscita dalla colonna deve essere presente un rivelatore o *detector*, il quale consenta di identificare qualitativamente le sostanze provenienti dal sistema (nella maggior parte dei casi in base alla lunghezza d'onda alla quale assorbe o al rapporto  $m/z$  se si effettua una ionizzazione) e di quantificarle; essi operano in base a diversi principi fisici, ma hanno caratteristiche comuni.

Devono infatti garantire:

- elevata sensibilità e selettività;
- stabilità operativa e riproducibilità;
- linearità di risposta per un range di concentrazioni di svariati ordini di grandezza;

- uniformità di risposta per analiti con le medesime caratteristiche;
- velocità di acquisizione;
- semplicità di utilizzo.

#### RIVELATORI UV - VIS

Prima dell'introduzione della spettrometria di massa, che potrebbe essere banalmente considerata un detector (l'ultimo anello della catena di un sistema HPLC), ma che per le sue straordinarie performance viene considerata uno strumento a sè stante, i rivelatori largamente più utilizzati erano costituiti da detector spettrofotometrici UV - Vis.

Il principio di funzionamento di uno spettrofotometro prevede l'eccitazione delle molecole in uscita dalla colonna facendo ricorso a radiazioni elettromagnetiche di opportune lunghezze d'onda (nel campo dell'ultravioletto o del visibile, molto più raramente nell'infrarosso); ogni specie chimica considerata assorbe in una regione caratteristica dello spettro elettromagnetico.

L'assorbimento di tale radiazione consente di eccitare gli elettroni  $\pi$  portandoli ad un livello energetico superiore.

La selezione della lunghezza d'onda con la quale eccitare le molecole in esame è resa possibile dalla scomposizione della luce proveniente da un sorgente luminosa (lampade a vapori di mercurio, lampade a filamento di tungsteno, lampade ad arco voltaico a gas xenon o deuterio) nelle singole  $\lambda$  mediante prismi o monocromatori a reticoli di diffrazione.

Secondo la legge di Lambert - Beer:

$T = \text{trasmittanza} = I_1 / I_0 = e^{(-\epsilon \cdot l \cdot M)}$ , dove  $I_1$  è l'intensità della radiazione riflessa,  $I_0$  è l'intensità della radiazione incidente,  $\epsilon$  il coefficiente di estinzione molare, mentre  $l$  il cammino ottico, ossia la lunghezza della regione dello spazio in cui è presente la specie che assorbe ed  $M$  la concentrazione molare.

$A = \text{assorbanza} = -\ln(T)$

Si ha quindi che tanto minore è l'intensità della radiazione riflessa, tanto maggiore è l'assorbanza da parte della specie considerata e dunque la sua abbondanza.

La radiazione riflessa è quantificata tramite opportuni fotomoltiplicatori, all'interno dei quali, sfruttando l'effetto fotoelettrico e le emissioni secondarie di una serie di elettrodi a voltaggio

crescente (intensificazione del segnale), viene generata una corrente elettrica da parte degli elettroni riflessi, il cui voltaggio varia in analogia con la quantità di radiazione riflessa (irradianza).

Moderni rivelatori DAD (Diod Array Detector) consentono di impiegare al contempo varie lunghezze d'onda (le più usate sono comunque nell'ultravioletto).

#### RIVELATORI A FLUORESCENZA

Questa tipologia di detector sfrutta il fatto che alcune molecole, una volta eccitate nel campo della radiazione ultravioletta, promuovono elettroni a livelli energetici superiori ed in seguito, contrariamente al normale fenomeno dell'assorbimento descritto poc'anzi, sono soggette a rilassamento, con ritorno degli elettroni eccitati al livello energetico basale ed emissione di radiazioni di lunghezza d'onda superiore, nel campo del visibile.

Ciò che viene quantificato non è quindi l'assorbanza, ovvero di quanto differisce la radiazione riflessa da quella incidente, ma la quota parte di radiazione emessa nel corso del rilassamento.

La tecnica risulta maggiormente selettiva, ma applicabile in un numero di casi più ristretto, in quanto le sostanze fluorescenti non sono numerose.

#### RIVELATORI A INDICE DI RIFRAZIONE

In questo caso si determina la variazione dell'indice di rifrazione ( $n = c/v$ , dove  $c$  è la velocità della luce nel vuoto, mentre  $v$  nel mezzo considerato), ad opera delle molecole presenti.

Il campo di applicabilità è estremamente vasto, ma le condizioni operative estremamente delicate, specie dal punto di vista della temperatura di esercizio, e la scarsa sensibilità ne hanno limitato la diffusione.

La categoria di rivelatori di più largo impiego nella determinazione di residui farmaceutici in matrici ambientali e biologiche, per le sue caratteristiche di sensibilità e selettività è quella degli spettrometri di massa; essi possono essere visti come macchine a sé stanti e se ne darà di seguito una descrizione dettagliata.

Indipendentemente dalla tipologia di detector, l'output, ovvero il risultato disponibile all'operatore, è nella totalità dei casi elaborato mediante software informatici, i quali restituiscono due tipologie fondamentali di grafici (oltre a numerosissime altre informazioni):

- *cromatogrammi*, ovvero grafici in cui l'asse delle ordinate rappresenta l'intensità di segnale rivelata dallo strumento e corrispondente o ad una determinata molecola (uno ione di un preciso rapporto  $m/z$ ), oppure ad un gruppo di molecole simili per comportamento (ad esempio quelle che assorbono ad una stessa lunghezza d'onda) o alla totalità delle specie chimiche rivelate in quell'istante (TIC - total ionic current - generata da tutti gli ioni con rapporti  $m/z$  che variano nel range considerato, o segnale relativo alla riflessione di tutte le lunghezze d'onda impiegate).

L'asse delle ascisse rappresenta il tempo di ritenzione in colonna.

Le unità di misura dell'intensità di segnale sono in funzione del rivelatore adottato e molto spesso corrispondono a voltaggi o intensità di corrente ottenute con fotomoltiplicatori o moltiplicatori elettronici dei quali la quasi totalità dei detector è dotata.

L'abbondanza della specie è proporzionale all'altezza e all'area sottesa dal picco.

- *spettri di massa o di radiazione elettromagnetica*, ovvero grafici in cui l'asse delle ordinate rappresenta l'intensità di segnale rilevata, mentre l'asse delle ascisse rappresenta o il rapporto  $m/z$  in caso di rivelatori che ionizzano le specie chimiche (spettrometria di massa) o  $\lambda$ , la lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica di una molecola, in caso di spettrofotometria.

Da notare che uno spettro è relativo ad un istante di tempo ben preciso ( $t = k$ ); ne consegue quindi che ad ogni istante di un cromatogramma, corrisponde uno spettro di massa o di radiazione elettromagnetica definito, mentre, come detto, un cromatogramma può riferirsi ad una singola lunghezza d'onda assorbita o ad un singolo ione  $m/z$ , ma anche al segnale generato dalla totalità

degli ioni dello spettro e dalla totalità delle lunghezze d'onda impiegate ed assorbite.

Formalmente, si tratta quindi di un problema in tre dimensioni; per unire le informazioni di un cromatogramma e di uno spettro si necessiterebbe di un grafico tridimensionale (intensità di segnale, tempo e  $m/z$  o  $\lambda$ ).

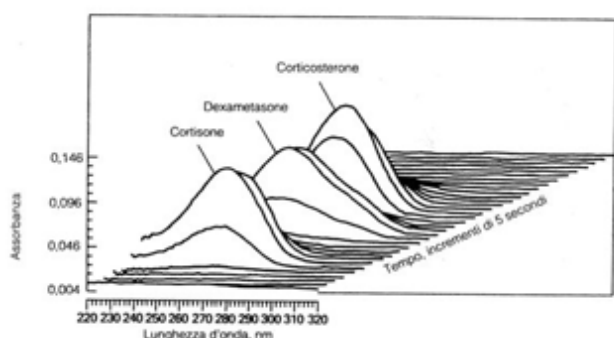


fig. 2.24: grafico 3D che evidenzia le abbondanze relative di varie specie chimiche (intensità di segnale) in funzione di tempo di ritenzione e lunghezza d'onda di assorbimento.

Ciò che si fa nella maggioranza dei casi è invece considerare grafici bidimensionali, nei

quali è rappresentato lo spettro di massa o di radiazione elettromagnetica ad un determinato istante, o il cromatogramma corrispondente a lunghezze d'onda fisse o rapporti m/z fissati o al segnale generato da tutte le lunghezze d'onda e i rapporti m/z considerati.

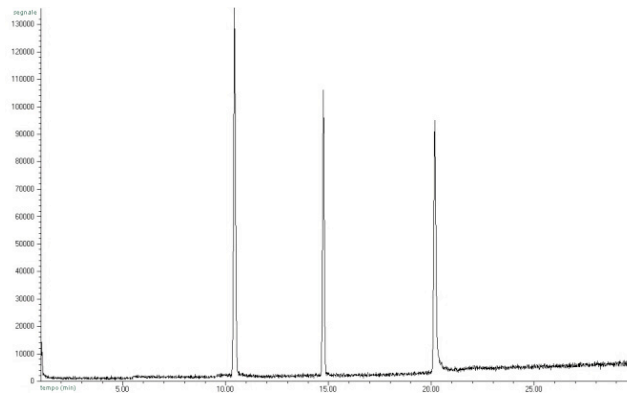


fig. 2.25: esempio di cromatogramma ottenuto dalla somma dei segnali relativi a ioni di diverso rapporto m/z o a varie lunghezze d'onda riflesse.

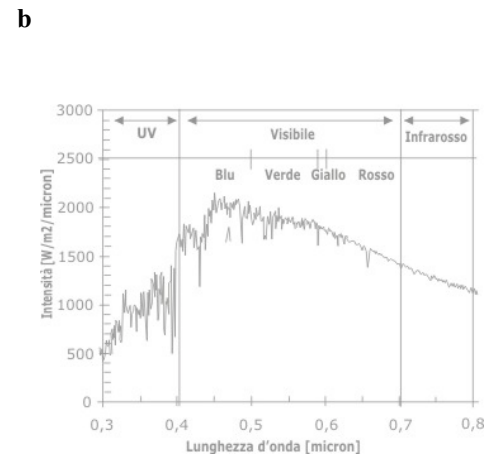
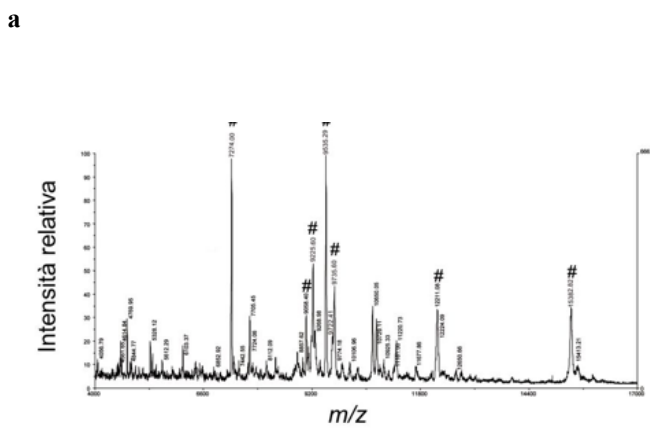


fig. 2.26 a + b: esempi di spettri in funzione del rapporto m/z e della lunghezza d'onda ad un tempo fissato.

## MS (MASS SPECTROMETRY)

Come accennato, i detector più all'avanguardia nel campo delle analisi di sostanze presenti in tracce, sono senza dubbio rappresentati dalla categoria degli spettrometri di massa.

Ad una elevatissima sensibilità, la quale può anche generare inconvenienti in caso di limitata esperienza, essi uniscono selettività, ovvero possibilità di ottenere risposte specifiche per la sostanza o le sostanze considerate, stabilità operativa, velocità di acquisizione, linearità di risposta

ed accoppiamento ottimale con le tecnologie cromatografiche HPLC.

Questo si traduce nella possibilità di condurre sostanzialmente due tipologie di analisi chimica con differenti obiettivi:

- *analisi qualitative*, nelle quali si è interessati ad identificare una o più specie molecolari attraverso il rapporto  $m/z$  al fine di monitorare sintesi di chimica organica, studiare metaboliti e prodotti di degradazione di una molecola parentale nota, o ottenere informazioni strutturali o di massa su miscele di composti;

- *analisi quantitative*, nelle quali lo scopo principale è la determinazione della quantità precisa di una o più molecole di interesse che ci si aspetta di rintracciare nella matrice indagata e le cui caratteristiche sono già note.

In questo caso è di fondamentale importanza ottenere elevati livelli di selettività, in modo da concentrare l'analisi sulle sole specie considerate.

Il principio generale di funzionamento consiste nell'effettuare una ionizzazione, ad opera di campi elettrici, delle specie chimiche provenienti dalla colonna cromatografica e dunque già soggette ad una efficace separazione.

Tali ioni, ciascuno contraddistinto da uno specifico rapporto  $m/z$ , sono convogliati attraverso un analizzatore che, tramite campi elettromagnetici, può selezionare quelli caratterizzati da uno preciso valore di tale rapporto o consentire il passaggio della totalità di essi verso il rivelatore elettronico.

In molti casi, negli strumenti più recenti e all'avanguardia, può anche essere operata una frammentazione, mediante bombardamento con molecole di gas, degli ioni ottenuti in ioni figli a minor peso molecolare, incrementando ulteriormente la selettività del processo.

Tale tipologia di strumenti è sempre più diffusa e prende il nome di MS tandem o MS/MS.

Il rivelatore elettronico, infine, converte gli ioni provenienti in elettroni che generano una corrente la cui intensità sarà il segnale finale associato ad una specie chimica.

Si darà ora una descrizione esauriente degli elementi costitutivi di uno spettrometro di massa:

- *ionizzatore*;

- *analizzatore*;

- *rivelatore*.



## IONIZZATORE

La ionizzazione delle molecole provenienti dal cromatografo, sia protonazione che deprotonazione, è operata nella grande maggioranza dei casi a pressione atmosferica (API - atmospheric pressure ionization); tale tipologia di ionizzatori, detti *soft ionizator*, è quella maggiormente diffusa ed è impiegata nella quasi totalità dei casi, ad eccezione dei casi in cui sono necessarie condizioni *hard - under vacuum*, in caso di molecole difficoltose da ionizzare.

Uno degli aspetti più difficoltosi del processo è senza dubbio il passaggio delle molecole, provenienti dalla colonna sottoforma di soluzione in fase liquida, ad uno stato gassoso mediante nebulizzazione.

Tale passaggio avviene contestualmente alla ionizzazione (ionizzazione + nebulizzazione) ed è associato alla necessità di rimuovere quanto più possibile le molecole di solvente (desolvatazione), mediante flusso di gas ad elevata temperatura, allo scopo di non avere interferenze nel rivelatore finale.

Due sono le tecnologie di più largo impiego nel campo della ionizzazione a pressione atmosferica:

### ESI (ELECTROSPRAY IONIZATION)

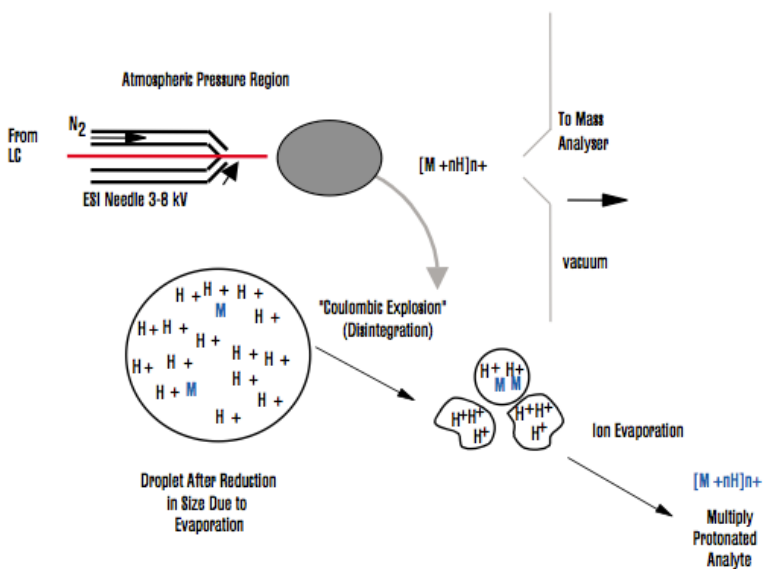
La ionizzazione elettrospray è realizzata convogliando la fase mobile in arrivo dalla colonna e contenente gli analiti, all'interno di un capillare metallico di dimensioni micrometriche, ad un flusso di pochi  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Tale capillare è mantenuto ad elevatissimo voltaggio elettrico (da 0,5 a 10 kV) e la differenza di potenziale rispetto alla piastra metallica - sampling cone, caratterizzata da potenziali di pochi V e posta più avanti sul cammino delle molecole, fa in modo che si abbia una ionizzazione contestuale alla nebulizzazione delle molecole.

Questa è facilitata comunque da un flusso di gas di nebulizzazione, quasi sempre  $\text{N}_2$ .

Esse passano dunque da fase liquida a fase gassosa mediante una serie di step che prevedono la progressiva riduzione dimensionale delle goccioline dello spray (da dimensioni micrometriche a nanometriche), ottenuta mediante desolvatazione, ovvero evaporazione del solvente con flusso di gas ad elevata temperatura (300 - 500°C).

Il gas di nebulizzazione e quello di desolvatazione, benchè spesso si tratti di azoto in entrambi i casi, raggiungono la camera di ionizzazione mediante condotti differenti poichè i flussi hanno caratteristiche di temperatura e di volume per unità di tempo tra loro diverse, entrambe più elevate per la desolvatazione.



Man mano che le gocce di spray si riducono di dimensioni, la densità di carica superficiale (positiva o negativa, a seconda che si operi in positive o negative voltage) aumenta e si verifica l'esplosione coulombica di esse con contestuale evaporazione completa degli ioni.

fig. 2.27: ESI (electrospray ionization).

Gli ioni sono infine convogliati mediante un percorso opportunamente congegnato all'analizzatore di massa.

#### APCI (ATMOSPHERICAL PRESSURE CHEMICAL IONIZATOR)

Tale alternativa è di impiego meno diffuso ed è adottata in caso di molecole caratterizzate da valori minori di polarità; la maggior parte degli strumenti in commercio consente comunque di sostituire l'apparato di ionizzazione a seconda delle necessità.

In questo caso l'introduzione in camera di ionizzazione di ciò che eluisce dalla colonna è ancora una volta realizzata mediante un capillare metallico o in vetro, ma in questo caso esso non è soggetto ad alto voltaggio.

La nebulizzazione è effettuata facendo ricorso ad un opportuno gas (quasi sempre N<sub>2</sub>).

Nelle sue immediate vicinanze è posto un ago ad elevatissima d.d.p. che genera un effetto corona nel suo intorno, ionizzando le molecole presenti.

Si verifica dapprima una ionizzazione delle molecole di solvente S e poi, mediante reazione chimica tra di esse e l'analita M, ionizzazione delle specie desiderate:



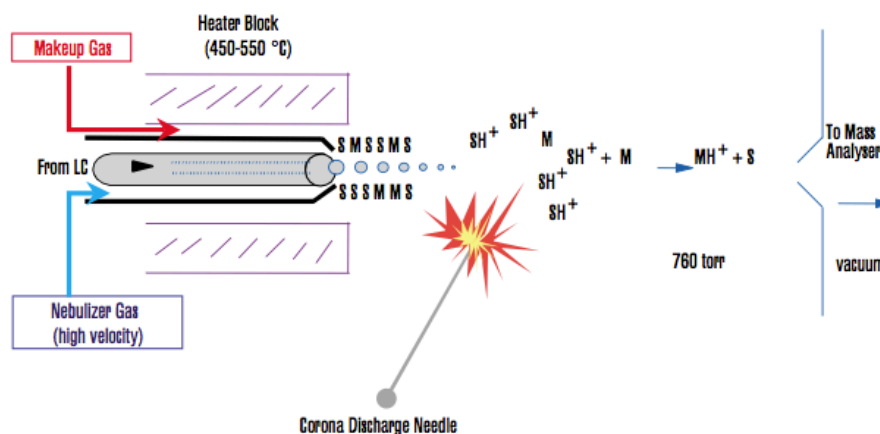


fig. 2.28: APCI (atmospherical pressure chemical ionization).

In questo caso le specie chimiche soggette all'analisi devono essere volatilizzabili e termicamente stabili, come del resto operando in ESI, ma devono presentare maggiore affinità protonica rispetto alle molecole di solvente in caso di ionizzazione positiva, o maggiore affinità elettronica in caso di ionizzazione negativa; in caso contrario si verifica il raggiungimento dell'analizzatore di massa sottoforma ionica solo da parte delle molecole di solvente.

Voltaggi, temperature e flussi vanno regolati in modo da consentire la migliore ionizzazione possibile per le molecole di interesse.

Entrambe le modalità di ionizzazione possono in certi casi essere affette da spiacevoli inconvenienti di cui bisogna tenere conto per dare una lettura attendibile dei risultati:

- formazione di *ioni addotti*, ovvero ioni formati sia dalla molecola di interesse (il normale ione molecolare che si desidera ottenere), sia da atomi di un'altra specie chimica (es:  $[M-Na]^+$ ,  $[M-K]^+$ ,  $[M-CH_3CN]^-$ ,  $[M-COO]^-$ , etc.); essi ovviamente differiranno nel rapporto  $m/z$  di un valore pari al peso molecolare del gruppo aggiunto);
- formazione di *ioni cluster*, ovvero ioni formati da più molecole di una stessa specie chimica (es:  $([M-H]^+)_n$ ) ed aventi dunque un rapporto  $m/z$  pari a  $n * m/z$ ;
- formazione di *ioni multicarica*, ovvero ioni protonati o deprotonati più di una volta in caso si

abbia a che fare con molecole dotate di molteplici punti di ionizzazione; in questo caso il rapporto  $m/z$  risulterà diviso per tante unità quante sono le cariche aggiunte o sottratte.

Un altro problema di notevole importanza in fase di ionizzazione, come si accennava nel secondo paragrafo del capitolo, è costituito dall'effetto matrice.

Esso è dovuto a molecole presenti nella matrice analizzata o nel solvente utilizzato e si traduce nella maggior parte dei casi in falsi negativi (rilevazione di una quantità inferiore rispetto a quella effettivamente presente).

Tali particelle sono spesso in competizione con la specie chimica considerata nel processo di ionizzazione e di nebulizzazione; si verifica quindi una *charge competition*, durante la quale le molecole competono per la protonazione o deprotonazione, contendendosi protoni ed elettroni disponibili, ed una *surface competition*, nel corso della quale esse competono per occupare la parte superficiale della gocciolina spray ed evaporare.

Il risultato è spesso una ionizzazione ed un'evaporazione incompleta.

Per ovviare a ciò è necessario determinare il tempo di eluizione maggiormente affetto dalla problematica (il problema, se presente, varia nel tempo), infondendo in continuo direttamente nel macchinario, senza passaggio in colonna, l'analita considerato e, al contempo, introducendo da colonna la matrice tal quale con i gradienti e le tempistiche scelte per l'analisi.

In caso non vi fosse effetto matrice il cromatogramma risultante sarebbe una linea piatta uniforme nel tempo, mentre un'eventuale disturbo ad opera delle molecole di matrice determinerebbe picchi negativi; questo consente di operare una valutazione qualitativa dell'effetto, cercando di regolare tempistiche e gradienti cromatografici in modo che la specie di interesse eluisca e raggiunga lo spettrometro in un momento non affetto da questo problema.

Per valutare quantitativamente l'effetto matrice, evitando di confonderlo con problematiche di recupero e di perdita di analita nel corso della preparazione del campione, è necessario invece confrontare i risultati dell'analisi relativa ad un campione con analita aggiunto dall'inizio a quelli relativi ad un campione con analita aggiunto al termine, prima di iniezione in HPLC-MS e quindi non soggetto ad alcuna perdita.

Le discrepanze tra di essi saranno unicamente dovute a recupero parziale.

## ANALIZZATORE

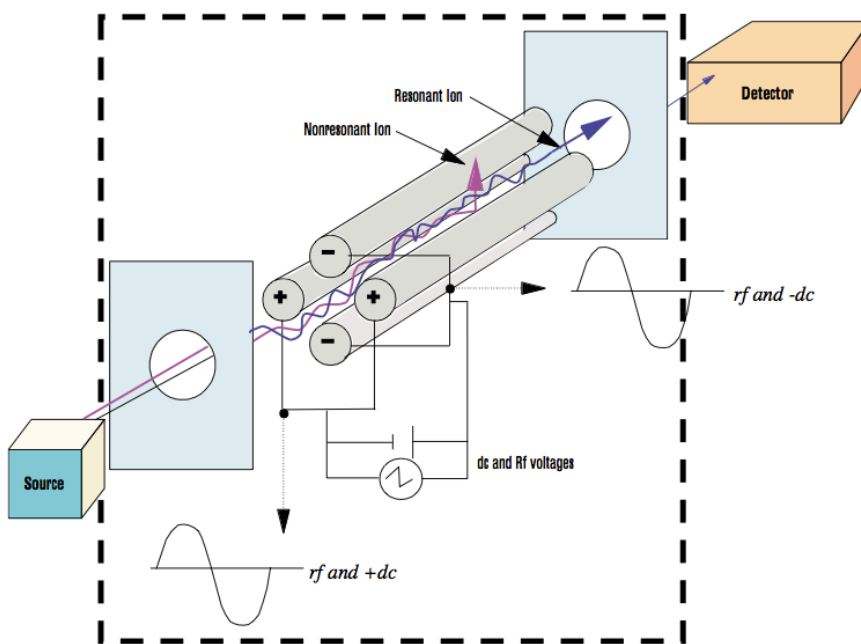
Scopo fondamentale dell'analizzatore è consentire il passaggio al rivelatore finale degli ioni con le

caratteristiche desiderate; si può infatti fare in modo che la totalità di essi giunga al detector oppure che solamente alcuni, con uno specifico rapporto  $m/z$ , vi giungano e siano analizzati.

Vi sono diverse tipologie di analizzatori, ma tutte operano sfruttando l'effetto di campi elettromagnetici sugli ioni; nella fattispecie correnti elettriche continue ed alternate vengono regolate in modo da deviare la traiettoria degli ioni indesiderati e far sì che impattino contro le pareti dell'analizzatore.

Le tre tipologie più diffuse sono le seguenti:

### QUADRUPOLE ANALYSER



Il termine quadrupolo deriva dal fatto che il campo elettromagnetico di caratteristiche desiderate è ottenuto mediante l'utilizzo di quattro barre metalliche a sezione cilindrica formanti un circuito elettrico; due di esse sono a potenziale positivo, mentre le altre a potenziale negativo.

Ciascuna coppia è

attraversata da una corrente elettrica scomponibile in una quota parte di corrente continua ed una quota

fig.2.29: quadrupole analyzer.

parte di corrente alternata:

$$V(t) = V_{dc} + V_{rf} * \cos\omega t \quad \text{e} \quad V(t) = -V_{dc} + V_{rf} * \cos\omega t$$

La traiettoria degli ioni è scomponibile su due assi: uno parallelo alle barre metalliche (Q) e l'altro ad esse perpendicolare (A).

$$A = (8 * z * DC) / (m * r^2 * \omega^2) \quad e \quad Q = (4 * z * RF) / (m * r^2 * \omega^2)$$

legge di Mathieu

(DC è il voltaggio della corrente continua, RF quello dell'alternata, m la massa dello ione, r lo spazio tra le barre e  $\omega$  la frequenza della corrente alternata).

Come si nota, la corrente continua è quella responsabile della deviazione rispetto al cammino lineare (qualora il suo contributo fosse assente vi sarebbe il trasferimento tal quale di tutti gli ioni al rivelatore, senza operare alcuna filtrazione).

Molto sofisticata e sempre più diffusa è la soluzione a triplo quadrupolo (MS/MS - tandem), la quale prevede la presenza in successione di un quadrupolo, una camera di collisione a gas argon ed un altro quadrupolo finale.

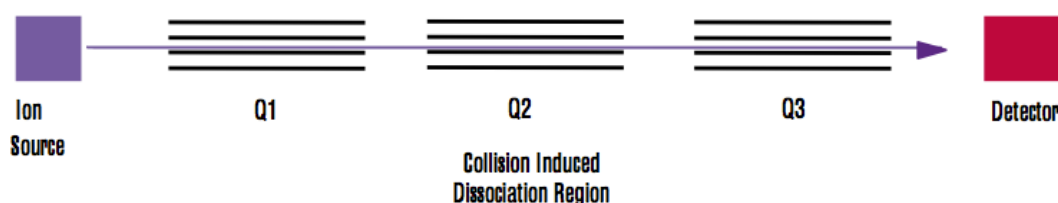


fig. 2.30: triple quadrupole analyzer.

Nella camera di collisione si opera una frantumazione degli ioni in arrivo (ioni padre - parental ions) mediante bombardamento con gas argon, ottenendo molecole di minore peso molecolare, le quali hanno perso gruppi funzionali ( $H_2O$ ,  $CHN$ ,  $COOH$ , etc.), gli ioni figli (daughters ions).

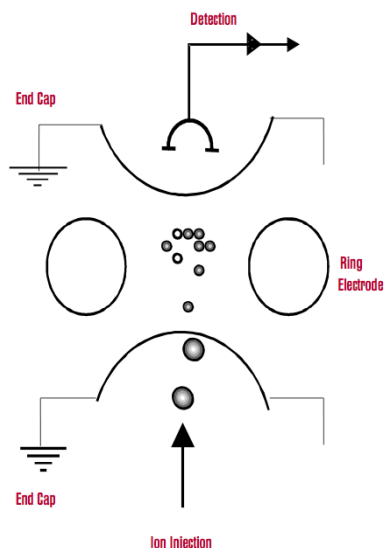
Nell'ultimo quadrupolo essi sono ulteriormente filtrati, incrementando la selettività dell'analisi.

#### ION TRAP ANALYSER

Soluzione invero meno diffusa è rappresentata dall'analizzatore a trappola ionica.

Come il nome suggerisce, esso agisce facendo sì che gli ioni in arrivo dalla sorgente vengano immobilizzati e stabilizzati all'interno di una cella a sezione quadrata.

In questo spazio sono presenti campi elettromagnetici generati da un elettrodo ad anello toroidale, attraversato da una corrente alternata, e da due elettrodi posti alle estremità della camera (end cap) ed attraversati da corrente continua.



Operando variazioni nei voltaggi delle correnti alternata o continua si può generare il progressivo rilascio della totalità degli ioni o del solo ione desiderato, caratterizzato da uno specifico rapporto  $m/z$ ; inoltre, come nella soluzione a triplo quadrupolo, si può effettuare una frammentazione ionica in tandem, originando ioni figli progressivamente espulsi dalla cella (MS/MS).

fig. 2.31: ion trap analyzer.

#### TIME OF FLIGHT ANALYSER

Un'altra soluzione atta ad operare un filtraggio degli ioni in cammino dalla sorgente di ionizzazione al rivelatore, è rappresentata dall'analizzatore TOF, il quale si basa sulle classiche equazioni fisiche della cinematica.

Gli ioni sono accelerati e convogliati entro un condotto, il "drift tube", grazie all'azione di campi elettromagnetici; il tempo impiegato da essi nell'attraversamento è inversamente proporzionale alla velocità e direttamente proporzionale alla radice quadrata del loro rapporto  $m/z$ .

$$s = v * t \quad t = s / v \quad v \propto 1 / (m/z)^{0,5} \quad t \propto (m/z)^{0,5}$$

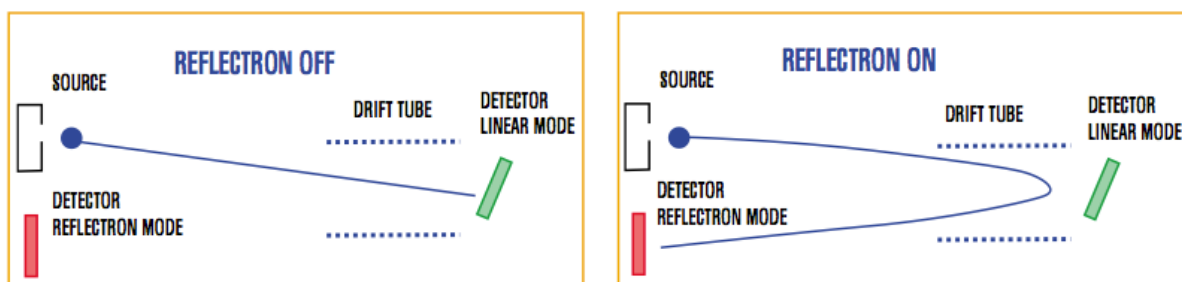


fig. 2.32: time of flight analyser.

In questo modo è possibile distinguere gli ioni in base al rapporto  $m/z$ .

Per incrementare la risoluzione il cammino ionico può essere prolungato tramite l'utilizzo di uno specchio "reflectron", il quale piega la traiettoria delle particelle rendendola a boomerang.

Un analizzatore di questo tipo non è in grado di consentire il passaggio dei soli ioni caratterizzati dal desiderato rapporto  $m/z$ , nè tantomeno di operare in tandem mediante frantumazione degli ioni precursori; pertanto, a tale scopo, esso va usato in combinazione con un sistema a triplo quadrupolo o a trappola ionica.

#### RIVELATORE (DETECTOR)

Ultimo step nel cammino ionico entro lo spettrometro di massa è costituito dal rivelatore o detector; scopo di questo elemento è creare una corrispondenza analogica tra una grandezza fisica leggibile dall'operatore e la quantità o concentrazione, dal momento che il volume introdotto nel sistema è noto, di ciascuna specie chimica considerata.

La grandezza fisica che varia in analogia alla concentrazione o quantità è nella totalità dei casi rappresentata dall'intensità di una corrente elettrica originata nel detector.

Gli ioni in arrivo possono generare una corrente elettrica secondo due principali soluzioni tecniche:

#### ELECTRON MULTIPLIER

Come mostra la figura, gli ioni provenienti dall'analizzatore sono convertiti in elettroni mediante un dinodo ad elevato voltaggio; in un tubo a forma di corno (channeltron), il moltiplicatore elettronico, la corrente elettrica è intensificata ed infine l'intensità è determinata e reso disponibile come output.

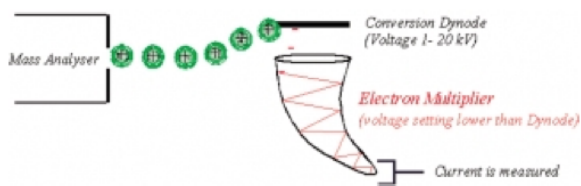


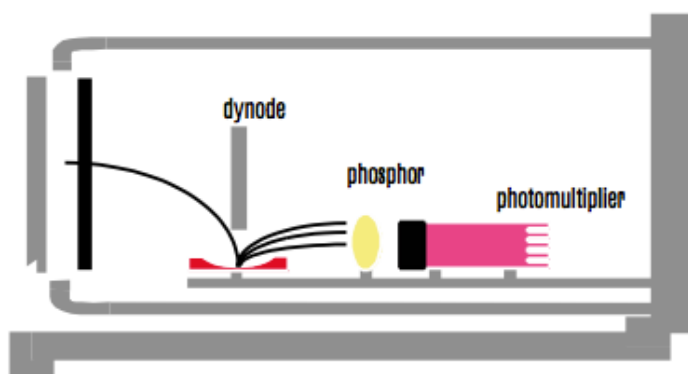
fig.2.33: moltiplicatore elettronico.

#### DYNOLYTE PHOTOMULTIPLIER

Soluzione più complessa è rappresentata dal tubo fotomoltiplicatore.

Anche in questo caso gli ioni in ingresso sono convertiti in un flusso di elettroni mediante un dinodo ad elevato voltaggio, ma in seguito impattano contro atomi di fosforo provocando il rilascio di fotoni.





Tali fotoni entrano in un tubo fotomoltiplicatore entro il quale, colpendo opportune lastre metalliche, per effetto fotoelettrico ed emissione indiretta di elettroni, si genera una corrente elettrica, anch'essa proporzionale alla concentrazione o quantità degli ioni presenti.

fig. 2.34: fotomoltiplicatore.

Indipendentemente dalle soluzioni tecniche adottate a livello di ionizzatore, analizzatore e rivelatore, i dati vengono forniti all'operatore mediante un'opportuna interfaccia software, tramite la quale gestire i parametri di funzionamento della cromatografia liquida (in particolare flussi iniettati, gradienti di fase mobile e tempistiche di analisi) e della spettrometria (voltaggi, temperature, flussi di gas, etc.).

Qualora si disponga di analizzatore in grado di operare in tandem MS/MS con frantumazione degli ioni precursori, è possibile editare funzioni di acquisizione secondo le seguenti modalità più diffuse:

FULL SCAN : in questo caso si agisce impedendo all'analizzatore di filtrare gli ioni in transito, in modo che la totalità di essi giungano al rivelatore venendo convertiti in impulso elettrico.

Il cromatogramma ad esso associato sarà in modalità TIC (total ionic current) e mostrerà in funzione del tempo la somma delle intensità di segnale della totalità degli ioni; per ogni istante di tempo saranno comunque disponibili spettri di massa in cui visualizzare i picchi relativi ai differenti ioni. Tale modalità trova un largo impiego nelle analisi di tipo qualitativo, in cui non sono note a priori sostanze da ricercare, ma si vuole verificare ed analizzare l'intero spettro di sostanze presenti in una matrice o di specie originate da una sintesi chimica o da un processo metabolico.

SIM / SIR (SELECTED ION MONITORING / RECORDING): operare selezionando uno ione da monitorare o registrare significa impostare i voltaggi di corrente e regolare i campi elettromagnetici dell'analizzatore in modo che una singola specie chimica, con  $m/z$  ben preciso, giunga al detector.

Negli strumenti più recenti si possono selezionare anche molteplici canali di acquisizione, ciascuno associato ad uno specifico ione, e dunque avere come output grafico un cromatogramma in funzione del tempo per ogni ione ed un cromatogramma TIC rappresentante la somma degli impulsi.

In questo caso l'informazione resa disponibile dallo spettro di massa non è particolarmente utile, in quanto gli ioni sono già stati selezionati a monte dall'operatore e si conosce già il rapporto  $m/z$  di quanto registrato dal detector.

Si tratta di una modalità operativa finalizzata all'analisi quantitativa, dal momento che si conosce già la specie chimica target su cui concentrarsi e quello che si desidera fare è evitare l'arrivo al detector da parte di tutti i possibili interferenti.

Le due modalità di acquisizione sopra citate sono relative al funzionamento del macchinario senza frantumazione degli ioni precursori e possono essere chiamate a singolo stadio.

Quanto descritto in seguito prevede invece la frantumazione con opportuna energia collisionale degli ioni precursori e la generazione di frammenti ionici figli.

SRM / MRM (SELECTED / MULTIPLE REACTION MONITORING): la modalità SRM prevede la selezione nel primo filtro di massa di uno ione con il rapporto  $m/z$  voluto, ione padre, il quale sarà poi frammentato nella CIDR (collision induced disassociation region) in ioni figli privi di specifici gruppi funzionali; tra di essi viene a sua volta selezionato nel secondo filtro di massa lo ione con il rapporto  $m/z$  scelto. In questo modo la selettività dell'analisi aumenta ulteriormente, in quanto il doppio stadio incrementa la sicurezza di determinare la sostanza indagata.

Anche in questo caso possono essere selezionati più ioni precursori al contempo o più ioni figli derivanti da uno stesso precursore, impiegando diversi canali (MRM).

Come output sarà disponibile un cromatogramma per ciascuna transizione ionica (salto di  $m/z$  tra precursore e figlio) ed un cromatogramma TIC relativo alla somma dei segnali generati dai diversi ioni; si tratta di quanto più avanzato per effettuare un'analisi quantitativa.

In questo caso la quantificazione è realizzata sullo ione figlio.

DAUGHTER SCAN: si tratta di una tecnica volta a selezionare nel primo filtro di massa un singolo ione, il quale verrà poi frammentato in modo da originare la gamma di ioni figli ad esso associati.

Il secondo filtro di massa è in questo caso inattivo e viene condotta una scansione completa degli ioni generati dalla collisione, un daughter scan.

Il cromatogramma ottenuto sarà in modalità TIC, ovvero la curva sarà relativa alla somma dei segnali relativi a tutti gli ioni figli; l'informazione più importante è in questo caso lo spettro di massa, il quale consente di verificare quale dei frammenti è il più abbondante, in modo da impostare un'analisi quantitativa SRM /MRM.

PARENT SCAN: questa modalità può essere concettualmente considerata l'inverso di quella sopra citata; il primo filtro di massa è in questo caso inattivo e si opera una frantumazione della totalità delle particelle in arrivo.

Il secondo filtro è invece impostato sullo ione figlio col rapporto m/z desiderato ed in questo modo si può verificare quali specie chimiche soggette a collisione generano tale molecola figlia.

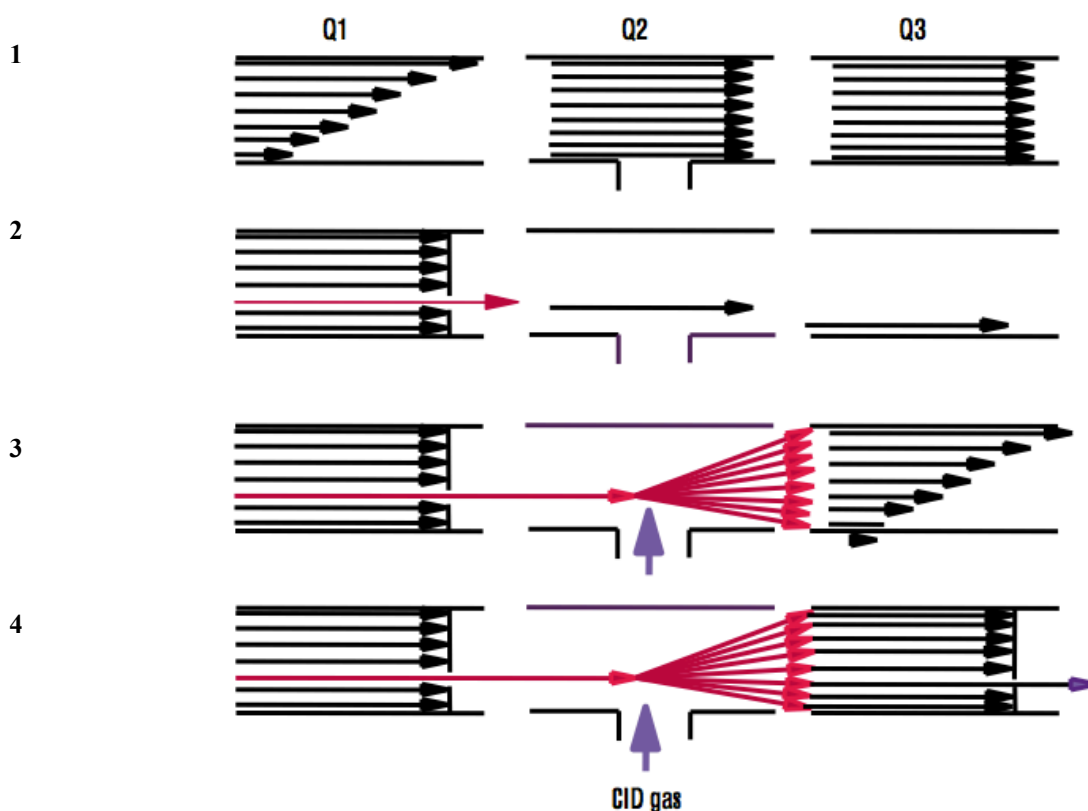


fig. 2.35: alcune delle principali modalità di acquisizione rese disponibili da uno spettrometro di massa tandem MS/MS a triplo quadrupolo: 1 - modalità FULL SCAN, 2 - modalità SIM / SIR, 3 - modalità DAUGHTER SCAN, 4 - modalità SRM.

## CAPITOLO III

# IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI CAFFEINA IN CAMPIONI SPERIMENTALI

### 3.1) PREMESSA

Il lavoro sperimentale sul quale la tesi è incentrata si colloca nel novero delle attività di biomonitoraggio condotte dal laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale dei Corsi di Laurea in Scienze Ambientali e Biologia Marina dell'Università di Bologna, sede di Ravenna.

Il gruppo di ricerca, impegnato in numerose attività di monitoraggio ambientale, orienta sempre più il proprio impegno verso una interdisciplinarietà dell'operato, realizzata integrando vari filoni di ricerca e linee di evidenza che, come si accennava nel corso del primo capitolo, devono essere mantenute quanto più vicine e convergenti possibili al fine di perfezionare i risultati ottenuti; secondo le più recenti disposizioni ed accordi internazionali infatti, non si può prescindere dalle informazioni ottenute da diverse linee di ricerca al fine di valutare la qualità ambientale e di predire eventuali effetti avversi di xenobiotici sull'ecosistema e sulla salute umana.

Per questo motivo quanto emerge da studi ecotossicologici necessita di integrazione mediante ricerche chimiche e, laddove possibile nonostante le tempistiche ed i costi significativi, da studi ecologici di popolazione e comunità, in quanto i test di tossicità ed i biomarker forniscono risposte a livello di singolo individuo, difficilmente traducibili ed estrapolabili a realtà più grandi.

In particolare, il laboratorio EPB sta conducendo nell'ultimo periodo studi di natura ecotossicologica inerenti farmaci ambientali (lo stimolante *caffèina*, l'antiepilettico *carbamazepina*, l'antidepressivo *fluoxetina* e l'antiaritmico *propranololo*) presenti in matrice acquosa.

Le ricerche sono condotte impiegando molluschi bivalvi, *Mytilus galloprovincialis*, come organismi sentinella sui quali analizzare varie batterie di biomarker, come raccomandato dal progetto internazionale di biomonitoraggio del Mediterraneo UNEP e dalla direttiva 2008/56/UE "Marine Framework Strategy Directive".

La scelta di tale specie come organismo sentinella è dovuta al fatto che questi esseri sono estremamente diffusi nell'ambiente considerato, la loro fisiologia è del tutto nota, sono rappresentativi del sito indagato in quanto sessili, presentano un ciclo di vita sufficientemente lungo per valutare variazioni indotte da stress esterni ed il tasso di riproduzione risulta elevato; inoltre sono caratterizzati da un ottimo equilibrio tra resistenza e responsività / sensibilità ad agenti di stress antropici.

I biomarker considerati appartengono a varie categorie e si dividono tra indicatori di *stress generale* (stabilità delle membrane lisosomiali, accumulo di lipofuscine, lipidi neutri e rapporto lisosomi / citoplasma, marcata espressione di geni relativi alle proteine HSP), indicatori di *stress ossidativo* (presenza di enzimi specifici come GST - Glutathione-S-Transferasi, CAT - catalasi e

malondialdeide), *neurotossicità* (test di inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi AChE), e *genotossicità* (test di Hoechst).

Parallelamente a questo, il lavoro di tesi svolto si è incentrato sulla linea di evidenza chimica, al fine di sviluppare una procedura analitica di laboratorio per identificare e quantificare, mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), accoppiata a spettrometria di massa (MS), la caffeina disciolta nella matrice liquida in cui i mitili erano immersi nel corso degli esperimenti, in modo da validare i dati e verificare che le concentrazioni predisposte fossero corrette.

L'obiettivo è stato dunque quello di sviluppare un procedimento quanto più sensibile, selettivo, affidabile e riproducibile, nonché economico in termini di costi e di tempo, il quale si adattasse alla matrice indagata: acqua di mare caratterizzata da alti valori di salinità.

Si tratta di una matrice estremamente complessa da esaminare, poiché i sali presenti nel mezzo causano seri problemi in colonna cromatografica ed in sede di ionizzazione, rendendo difficoltoso ottenere segnali e risposte significativi, chiaramente isolabili dal contesto e riproducibili, a causa di un elevato effetto matrice.

Lo studio di acque di mare è una branca del monitoraggio ambientale relativo ai farmaci, ambito di per sé, come visto, estremamente giovane, sviluppatasi nell'ultimo decennio; nel territorio italiano solo pochi laboratori di ricerca sono in grado di mettere a punto e sviluppare tali metodiche e tra di essi quello guidato dal Prof. Zuccato dell' Istituto Mario Negri di Milano è senza dubbio il riferimento nazionale.

La procedura analitica sviluppata, la quale verrà descritta con dovizia di particolari, è stata applicata non solo nell'ambito degli esperimenti realizzati dal laboratorio EPB, ma anche relativamente ad uno studio in campo, condotto con la collaborazione di HERA e dell'impianto di trattamento acque reflue di Cervia (RA), volto a determinare quali fossero i valori di concentrazione di caffeina all'ingresso e all'uscita dell'impianto, verificando l'efficacia di rimozione di tale specie chimica.

Inoltre sono stati analizzati campioni prelevati presso il canale consortile di bonifica Cupa, al quale afferiscono le acque dell'impianto sopracitato, in tre diversi punti posti tra l'immissione delle acque provenienti dal depuratore e lo sbocco in mare.

In seguito le attenzioni sono state poste sullo sviluppo di un'altra procedura analitica, la quale, impiegando anch'essa l'accoppiamento di strumenti HPLC - MS, consentisse di determinare la concentrazione di caffeina nell'emolinfa dei mitili impiegati nell'esperimento.

La matrice in questo caso è ancora una volta liquida, ma organica, presentando ulteriori difficoltà nell'approccio, tra le quali un effetto matrice ancora più marcato.

Da ultimo si è elaborata una procedura volta ad indagare un altro tipo di matrice biologica, di natura in questo caso solida (il tessuto degli organismi sopracitati) e pertanto soggetta a maggiori difficoltà di estrazione da fase solida a liquida.

Queste indagini finale si collocano ad un livello più avanzato nello schema TRIAD di cui si è parlato nel primo capitolo, consentendo di valutare una eventuale bioconcentrazione, rapportando il valore di concentrazione nell'organismo a quello relativo all'ambiente circostante.

Il seguente capitolo tocca quindi le tematiche relative all'attività sperimentale, fornendo inizialmente una descrizione dettagliata della caffeina (dati di consumo, caratteristiche fisico-chimiche, biosintesi, farmacocinetica e metabolismo nel corpo umano, effetti sul sistema nervoso centrale e sull'attività cardio - vascolare relativi alla farmacodinamica, dati di tossicità).

In seguito vengono analizzate le procedure analitiche messe a punto:

*acqua salata*: campionamento, filtrazione, estrazione in fase solida SPE, evaporazione con azoto gassoso, ricostituzione ed ulteriore filtrazione, HPLC - MS;

*emolinfa*: campionamento, agitazione, centrifugazione, evaporazione, ricostituzione, filtrazione, HPLC-MS ;

*tessuto*: campionamento, omogeneizzazione, estrazione da solido a liquido con soluzione buffer, agitazione e centrifugazione, estrazione in fase solida SPE, evaporazione con azoto gassoso, ricostituzione ed ulteriore filtrazione, HPLC - MS.

Da ultimo vengono presentati i risultati e le valutazioni emerse in seguito alla loro analisi.

## 3.2) CAFFEINA

Premessa doverosa ad una descrizione esaustiva della caffeina è il modo in cui essa nell'immaginario collettivo, alla stregua dell'alcool etilico contenuto nelle bevande in commercio, non desti alcuna preoccupazione, risultando un qualcosa di innocuo ed inoffensivo, un elemento cardine nella giornata abituale dal risveglio mattutino, alla pausa caffè lavorativa, al dopo pranzo in famiglia, fino alla tazza sorseggiata nella tranquillità del dopo cena.

La molecola della caffeina, chiamata anche teina o guaranina, a seconda della pianta dalla quale proviene, è contenuta in oltre sessanta specie vegetali.

Il consumo mondiale totale si aggira sulle 120.000 ton annue <sup>40</sup>, mentre quello pro capite giornaliero raggiunge nei paesi che sono i maggiori consumatori (Regno Unito, Stati Uniti d'America, Italia) i 400/500 mg, attestandosi su valori medi di 70 mg <sup>18</sup>.

I prodotti alimentari che contribuiscono maggiormente all'assimilazione di tale specie chimica sono il caffè (dai 50 ai 100 mg a seconda che il caffè sia solubile o espresso), il tè (circa 50 mg a tazza), energy drink (fino a 100 mg a lattina), bibite a base di cola (40 - 50 mg a lattina), tavolette di cioccolato (dai 10 ai 20 mg a porzione) e, nelle culture sudamericane ed asiatiche, prodotti come mate o guaranà <sup>18</sup>.

Si tratta di un alcaloide vegetale, nella fattispecie di una xantina, una molecola organica naturale contenente carbonio, azoto, ossigeno ed idrogeno e dalle proprietà basiche.

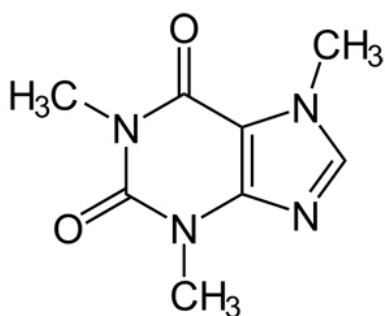


fig. 3.1: molecola di caffeina.

In natura, tale molecola,  $C_8H_{10}N_4O_2$ , è sintetizzata da numerose specie vegetali e contenuta in foglie, semi e frutti ed ha lo scopo di dissuadere alcuni insetti dal cibarsi della pianta, agendo, come del resto negli esseri umani, a livello del sistema nervoso centrale, fino a provocare tremori, scompenso motorio e paralisi dell'aggressore.

Recenti studi hanno inoltre dimostrato come essa sia in grado di inibire la germinazione di semi nell'intorno della pianta in grado di sprigionarla e disseminarla sul suolo.

Chimicamente essa risulta essere una sostanza moderatamente polare ( $\log K_{ow} = -0,091$ ), caratteristica imputabile alla presenza di atomi di ossigeno ed azoto, fortemente elettronegativi, i quali fanno sì che essa sia solubile in acqua ed in solventi organici polari come metanolo o acetonitrile; inoltre la molecola risulta essere una base debole ( $pK_b = 3,6$ ,  $pK_a = 10,4$ ,  $pK_a + pK_b = 14$ ), come la maggior parte delle molecole organiche farmaceutiche.

La biosintesi naturale prevede la successione di alcuni stadi che, a partire dalle basi azotate puriniche dei codici genetici (adenina e guanina), portano alla caffeina.

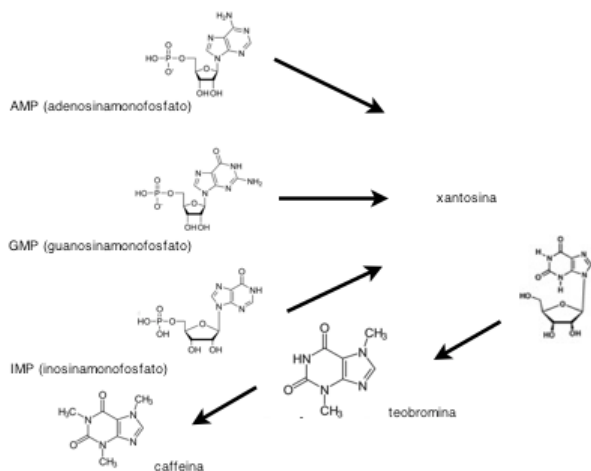


fig. 3.2: biosintesi della caffeina.

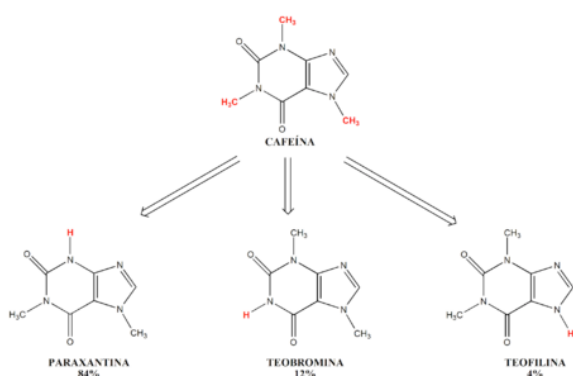


Il procedimento industriale prevede invece l'isolamento della molecola come prodotto della decaffeinizzazione a partire da materie prime vegetali.

Relativamente alla *farmacocinetica* o *tossicocinetica*, qualora si considerino rispettivamente le caratteristiche farmacologiche per le quali, come si vedrà, è commercializzata ed impiegata, o le caratteristiche tossiche, intese come effetti avversi sull'organismo che origina a partire da alcune concentrazioni soglia, essa è assunta per via orale tramite i prodotti alimentari sopracitati o per via rettale in formulazioni farmaceutiche specifiche come molecola coadiuvante l'azione di altri principi attivi medicinali.

La sostanza si distribuisce rapidamente attraverso i tessuti dell'organismo (picco plasmatico entro 1-2 h dall'assunzione), rivelandosi, in caso di gravidanze, in grado di attraversare anche la placenta e la barriera emato-encefalica fetale.

Gli enzimi epatici appartenenti alla superfamiglia del citocromo P 450 (CYP 450), nella fattispecie CYP 1a2, si occupano della sua metabolizzazione, la quale dà origine ad oltre 20 molecole diverse (dimetil - xantine, acidi urici, monometil e dimetil -uracili); solo un piccolo quantitativo (dallo 0,5 al 10 % viene escreto dal corpo tal quale).



I prodotti principali della degradazione, ciascuno con differenti implicazioni ed effetti sull'organismo, sono comunque costituiti dalle dimetil - xantine: *paraxantina*, *teobromina* e *teofilina*.

fig. 3.3: principali prodotti di degradazione della caffeina e rispettive percentuali relative alle dimetil - xantine.

Le interazioni con il corpo umano e la produzione dei vari effetti positivi e negativi associati, *farmacodinamica* o *tossicodinamica*, si articolano su vari livelli.

Si tratta della sostanza psicoattiva a maggiore diffusione mondiale e fin dai primordi, laddove la storia si confonde nella leggenda, quando il tè iniziò ad essere consumato 3000 anni prima della nascita di Cristo nella Cina del cosiddetto imperatore contadino Shen Nung, ci si rese conto di come questa molecola aiutasse l'uomo nel potenziamento dell'attività cognitiva (attenzione, concentrazione, coordinazione) e fisica (performance sotto sforzo).

A livello di stimolazione del sistema nervoso centrale questa specie chimica interferisce con il meccanismo di azione di tre molecole fondamentali:

- inibizione del neurotrasmettitore adenosina;
- inibizione del neurotrasmettitore GABA;
- potenziamento e prolungamento dell'effetto dell'ormone adrenalina / noradrenalina.

L'azione sul neurotrasmettitore adenosina si basa sul fatto che le due molecole sono estremamente simili e la caffeina è in grado di legarsi ai recettori propri di quest'ultima (antagonismo non selettivo), bloccando la loro attivazione.

L'adenosina ha la funzione fondamentale di inibire i livelli di attività neurale e di trasmissione nervosa, regolando i meccanismi sonno - veglia e spingendo l'organismo a riposarsi ed allentare l'attività nei momenti di stanchezza ed affaticamento.

Contrastando tale meccanismo naturale il corpo è in grado di mantenere viva l'attenzione e la concentrazione anche dopo avere accumulato grandi carichi di fatica, essendo privo quindi dei fisiologici segnali che lo spingerebbero al riposo.

Questo effetto è potenziato dall'azione analoga che la caffeina svolge, in caso venga assunta in quantitativi di maggior rilievo, sui recettori GABA A del neurotrasmettitore GABA (acido gamma - ammino - butirrico), altra molecola inibitrice della trasmissione nervosa; questo, oltre a potenziamento cognitivo, induce anche ansia, irrequietezza, tremori e malessere generale.

Fondamentale, da ultimo, è il potenziamento ed il prolungamento degli effetti indotti dall'ormone adrenalina e dalla variante priva del gruppo metile noradrenalina.

Si tratta di ormoni amminoacidici, originati dall'unione di molecole di tirosina, non in grado di penetrare all'interno dello spazio cellulare, i quali, senza un messaggero con il compito di veicolare l'informazione nelle regioni più interne della cellula e di attivare specifiche sequenze geniche, non potrebbero esplicare la propria azione.

I messaggeri coinvolti in questo iter sono molecole di AMP<sub>c</sub>, adenosinamonomofosfatociclico, originate a loro volta a partire da ATP grazie all'azione dell'enzima adenilatociclasasi e riconvertite in AMP tramite l'enzima fosfodiesterasi, qualora i livelli di AMP<sub>c</sub> in circolo risultino eccessivi.

La caffeina è in grado di ostacolare l'operato dell'inibitore naturale della adenilatociclasasi e di contrastare, per contro, la fosfodiesterasi, mantenendo quindi elevati i livelli di AMP<sub>c</sub> in grado di fare scaturire gli effetti propri dell'adrenalina: attenzione, concentrazione, stato vigile, agitazione, ansia, tremori, aumento del battito cardiaco, della pressione e del flusso sanguigno ai muscoli.

Da ultimo, relativamente agli effetti psicoattivi della sostanza, è doveroso sottolineare come essa inibisca il riassorbimento dei neurotrasmettitori dopamina e serotonina, sortendo riverberi positivi sull'umore, in maniera analoga, anche se in misura minore, ai farmaci antidepressivi che agiscono sul meccanismo della ricaptazione a feedback delle sostanze sopracitate.

Questi sono gli effetti, ritenuti positivi, per i quali si fa uso di tale sostanza, consumando prodotti alimentari nei quali è contenuta o acquistando, nelle farmacie di alcuni paesi, compresse ad uso orale assimilabili in tutto e per tutto ad altri farmaci.

Oltre all'azione sulle facoltà cognitive e fisiche, alcuni studi dimostrano come la caffeina favorisca e renda più rapida l'azione di alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei.

Ne deriva l'impiego nella formulazione di alcuni farmaci nel ruolo di coadiuvante, come nel caso di compresse e supposte antidolorifiche della categoria dei FANS:

- ergotamina + caffeina (*Cafergot, Viridex*);
- acido acetilsalicilico + caffeina (*Viamal*);
- indometacina + caffeina (*Difmetrè*)
- paracetamolo + caffeina (*Antireumina, Neocibalgina, Neonevral, Neonisidina, Tachicaf, Influmed, Raffreddoremed, Neoptalidon, Saridon*);
- propifenazone + caffeina (*Optalidon*).



fig. 3.4: principali farmaci in commercio contenenti caffeina.

Essa è inoltre impiegata come principio attivo broncodilatatore in caso di apnee neonatali e displasie broncopolmonari.

Recenti ricerche mediche <sup>41</sup> ne suggeriscono l'efficacia anche contro il morbo di Parkinson, malattie cardio - vascolari ed alcune forme di tumore, come il cancro dell'endometrio e delle cellule epatiche.

Numerosi effetti collaterali fanno però da contraltare a quanto di benefico la sostanza è in grado di conferire; l'associazione psichiatrica statunitense (APA - American Psychiatric Association) include la caffeina nel manuale DSM V <sup>42</sup> (diagnostic and statistical manual of mental disorders), articolando la dissertazione inerente l' indesiderata sovrastimolazione del sistema nervoso centrale, in quattro punti: I - intossicazione da caffeina, II - disordine del sonno da caffeina, III - ansia da caffeina, IV - altri disordini originati da caffeina.

L'intossicazione viene raggiunta per assunzioni che superano i 500 mg di sostanza, l'equivalente di cinque tazzine di caffè espresso o di 5 energy drink, in un'unica ingestione e dà luogo ad ansia, agitazione, tremori, tachicardia, insonnia, minzione frequente, movimenti scoordinati, difficoltà di concentrazione e di linguaggio; il superamento della soglia di 1 g in un'unica somministrazione può inoltre originare allucinazioni, psicosi e manie suicide <sup>43 - 44</sup>.

Vari studi <sup>45</sup> identificano in (150 - 200 mg) / (Kg di peso corporeo) la LD<sub>50</sub> per gli esseri umani (10 g per un adulto di 75 kg); tali valori sono estrapolati da test di laboratorio condotti su topi.

La U.K. Food Standards Agency, agenzia alimentare britannica, invita a non superare i 200 mg quotidiani di sostanza assunta <sup>46</sup>; stesse raccomandazioni vengono fornite anche dall'associazione statunitense di ostetricia e ginecologia <sup>47</sup>, rimarcando comunque l'assenza di evidenze che correlino il consumo di caffeina da parte di donne incinte ad eventuali malformazioni ed effetti negativi sui nascituri.

Alla pari di altre sostanze psicoattive, vi sono certezze relative agli effetti di dipendenza, tolleranza (necessità di assumere quantitativi maggiori per sortire gli stessi effetti psico - fisici) ed astinenza, anche in soggetti che ne praticano un consumo moderato (circa 200 mg al giorno), a partire dalle 48 ore successive all'ultima assunzione.

L'astinenza origina molti dei sintomi tipici di un sovradosaggio della sostanza, come agitazione, ansia, tremori, vertigini, difficoltà di coordinazione <sup>48</sup>.

Le forme più serie di dipendenza sfociano nel caffeinismo, lo stato di abuso dei soggetti che ne consumano quantitativi dell'ordine di 1 - 1,5 g per giorno, con gravissimi effetti collaterali e ripercussioni sulla vita sociale e lavorativa <sup>49</sup>.

Gli elevati tassi di consumo ai quali si faceva riferimento, fanno sì che la caffeina possa essere rintracciata in matrice liquida (acque interne - fiumi, laghi, falde sotterranee - acque di transizione ed acque marine) pressochè in tutto il mondo, comprese le acque dell'Antartide.

WWTPs, influent water	20–300 µg/L (Canada) 20 µg/L (USA)
WWTPs, effluent water	147 ± 76 µg/L (Germany) 0.06–0.08 µg/L (USA) 6.7 µg/L (USA) 0.19 ± 0.09 µg/L, up to 1.9 µg/L (Germany) 2 µg/L (Sweden)
rivers and lakes	10–100 ng/L (USA) 3–1440 ng/L, median 160 ng/L (USA) 13 ± 28 ng/L, up to 115 ng/L (USA) 10–47 ng/L (USA) median 81 ng/L, up to 6 µg/L (USA) 130–370 ng/L (USA) median 530 ng/L, up to 880 ng/L (Germany) <50–1270 ng/L (Germany) up to 171 ng/L (Netherlands) 160 ng/L (Greece)
groundwater	1.3–2.4 µg/L (river downstream a WWTP) 10–80 ng/L, median 30 ng/L (USA) <40 ng/L (wells deeper than 10 m, USA) up to 230 ng/L (in a shallow well)
seawater	2–16 ng/L (North Sea) 5–71 ng/L (Massachusetts Bay) 140–1600 ng/L (Boston Harbor)

fig. 3.5: alcuni esempi delle concentrazioni alle quali la caffeina è stata rintracciata in diverse matrici liquide (influenti ed effluenti di depurazione, fiumi e laghi, acque di falda ed acque marine) in vari studi <sup>18</sup>.

Due autori svizzeri, Buerge e Poiger, ricercatori presso la Swiss Federal Research Station, hanno suggerito recentemente il suo impiego come marker ideale per identificare contaminazioni di acque superficiali ad opera di reflui sversati (“ Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters “) <sup>18</sup>.

Un marker antropogenico di questo tipo deve essere in grado di identificare inequivocabilmente la sorgente e di quantificare le dimensioni della contaminazione; questo presuppone che il consumo della sostanza tracciante sia diffuso, costante e regolare, caratteristiche proprie della caffeina.

L'input principale, come esposto nel primo capitolo e come evidenziabile dai dati della tabella della pagina precedente, avviene mediante i reflui liquidi trattati dagli impianti di depurazione, ove presenti.

Lo studio di Buerge e Poiger ed altri articoli del settore, come la ricerca cinese relativa ai depuratori di Pechino (Sui e Huang) <sup>7</sup>, citata nel primo capitolo, evidenziano come un'ottima rimozione della sostanza avvenga grazie allo stadio secondario di depurazione delle acque, lo stadio biologico a fanghi attivi; nella fattispecie, si raggiungono, qualora l'età dei fanghi superi i 5 giorni ed il tempo di residenza del liquame allo stadio secondario raggiunga le 10 - 12 ore, tassi di rimozione compresi tra l'80 ed il 99,9 % <sup>18</sup>.

Questo alcaloide naturale è inoltre sensibile alla fotodegradazione (tempi di emivita dell'ordine di 12 ore in caso di irraggiamento naturale), riducendo la sua concentrazione secondo cinetiche del primo ordine ( $\rho = \rho_0 * e^{-Kt}$ ,  $\ln \rho = -K * t$ , con  $K = 0,056 \text{ d}^{-1}$ ) <sup>18</sup>; efficace risulta un trattamento terziario di atinizzazione a raggi ultravioletti.

Nel caso di questa sostanza, al contrario della quasi totalità dei PPCP's, costosi e complessi trattamenti terziari di ozonizzazione, micro - ultra filtrazione ed osmosi inversa, si rivelano inefficaci.

I buoni risultati raggiunti dalla depurazione delle acque fanno sì che in matrice ambientale la concentrazione si attesti su ordini di grandezza molto inferiori (ng/l - ppt) rispetto alla rete fognaria (µg/l - ppb); tali valori risultano però molto superiori a quelli di qualsiasi altra sostanza psicoattiva e non vi è luogo in cui sia stata testata la presenza della molecola che abbia dato responso negativo.

Alla luce di quanto esposto, soprattutto effetti collaterali sugli organismi viventi e presenza in ambiente diffusa su tutto il globo, è di fondamentale importanza annoverare la caffeina tra i farmaci ambientali per i quali sviluppare programmi di biomonitoraggio caratterizzati da specifici test di tossicità e batterie di biomarker, da procedure analitiche in grado di quantificare le concentrazioni presenti nelle varie matrici inorganiche ed organiche e, in un'ottica di scala superiore, da studi ecologici a livello di popolazione e di comunità.

### 3.2) PROCEDURA ANALITICA VOLTA ALLA IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI CAFFEINA IN ACQUE SUPERFICIALI

La procedura analitica cardine del lavoro sperimentale di tesi è stata elaborata mediante uno studio approfondito e di dettaglio della letteratura disponibile a riguardo e della sostanza oggetto dell'analisi, nonché della matrice in cui è stata ricercata; dalle proprietà fisico - chimiche della caffeina derivano infatti le scelte che hanno contraddistinto le varie fasi, dal campionamento, alla

filtrazione, all'estrazione in fase solida con opportuni materiali e solventi di estrazione, alla delicata fase di analisi cromatografica con rivelatore a spettrometria di massa.

Un mirato corso di formazione relativo al detector spettrometrico ha fatto sì che si potessero operare le giuste e più opportune scelte riguardo ai solventi cromatografici, alle tempistiche ed ai gradienti di analisi, nonché alle condizioni operative (voltaggi, temperature, flussi di gas).

Quanto detto ha reso l'analisi di laboratorio sensibile, selettiva, robusta, riproducibile e relativamente semplice e rapida nelle ripetizioni.

In questo paragrafo verrà esposta in maniera dettagliata l'intera procedura analitica volta alla determinazione di caffeina in acque superficiali; essa è stata messa a punto ed in seguito applicata a due differenti casi e tematiche di indagine.

Il primo obiettivo che ci si è posti è stato quello di validare dal punto di vista chimico il monitoraggio ecotossicologico svolto presso il laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale (EPB) dei C.D.L. in Biologia Marina e Scienze Ambientali dell'Università di Bologna, sede di Ravenna.

Tale studio sperimentale, della durata di otto giorni, è stato condotto su esemplari di *Mytilus galloprovincialis* provenienti dal mare antistante Cesenatico (FC) ed esposti a varie concentrazioni di caffeina aggiunta in laboratorio ad acque prelevate nel medesimo luogo, mediante la pompa di cattura a mare in uso da parte del Centro di Ricerche Marine.

Scopo dell'analisi chimica è stata la verifica della effettiva concentrazione alla quale gli organismi fossero esposti, valutando eventuali valori di fondo presenti nell'acqua di mare a seguito di input antropici e conseguenti scostamenti dalle concentrazioni previste per lo studio.

La seconda tematica indagata rappresenta un'applicazione al contesto ambientale di quanto messo a punto presso i laboratori; sono state infatti prelevate acque in cinque diversi siti posti nel comune di Cervia, tra Savio e Lido di Savio.

In particolare si è provveduto al prelievo di acque in entrata all'impianto di trattamento reflui comunale, gestito da HERA, e di acque depurate in uscita da quest'ultimo.

Inoltre si sono effettuati campionamenti in tre diversi punti, collocati lungo il canale consortile di bonifica Cupa, il quale raccoglie, tra l'altro, le acque provenienti dall'impianto di depurazione, convogliandole al mare.

In questo caso lo scopo è stata la verifica dei quantitativi di caffeina in arrivo al depuratore dalla rete delle acque nere, la capacità e bontà di rimozione da esso operata e le concentrazioni presenti nel canale ed in mare, concentrazioni alle quali gli organismi viventi sono esposti e da confrontare

con i valori soglia, per ora assenti, previsti in normativa o per i quali studi di laboratorio evidenziano effetti avversi sul biota.

La determinazione della presenza di caffeina in ciascuna matrice indagata ha portato inoltre a chiedersi se essa fosse rintracciabile anche in acque di rubinetto, acque deionizzate ed acque minerali commercializzate; a tale scopo si sono preparati anche tre campioni relativi a tali matrici.

Prima di affrontare nel dettaglio i vari step della procedura viene data una breve descrizione dello studio condotto a Ravenna e dell'impianto di depurazione di acque reflue di Cervia (RA).

#### STUDIO ECOTOSSICOLOGICO SU *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LABORATORIO EPB

L'esperimento realizzato presso il laboratorio di fisiologia nel mese di Maggio 2014, come accennato, ha previsto l'esposizione di 48 esemplari di *Mytilus galloprovincialis*, mollusco bivalve estremamente diffuso lungo la costa romagnola, a varie concentrazioni di caffeina all'interno di vasche di acquario opportunamente dimensionate, riempite d'acqua ed ossigenate.

In particolare i bivalvi sono stati divisi in 8 vasche, riempite con 3 l di acqua, 0,5 l per ciascun individuo, in modo da condurre lo studio in doppio ( $n = 2$ ), a 4 diverse concentrazioni:

- $\rho_0$  : vasca di controllo priva di aggiunte di caffeina;
- $\rho_1$  : vasca con aggiunta di caffeina a concentrazione di 5 ng/l;
- $\rho_2$  : vasca con aggiunta di caffeina a concentrazione di 50 ng/l;
- $\rho_3$  : vasca con aggiunta di caffeina a concentrazione di 500 ng/l.

I molluschi sono stati nutriti quotidianamente con cibo liquido per filtratori a base di plankton SERA Coraliquids e soggetti a cambio d'acqua e ripristino delle concentrazioni di caffeina ogni 2 giorni (4 cambi d'acqua complessivi per una durata totale di 8 giorni).

Al termine del periodo di esposizione il personale di laboratorio ha provveduto ad effettuare diversi test, costituenti una completa batteria di biomarker:

- *biomarker di stress generale*: stabilità delle membrane lisosomiali in emociti dell'emolinfa mediante colorante rosso neutro e nella ghiandola digestiva tramite reagente esoamminidasi, accumulo di lipidi neutri e lipofuscine e valutazione del rapporto lisosomi / citoplasma nell'epatopancreas di mitilo;



- *biomarker di stress ossidativo*: aumento dell'espressione degli enzimi CAT (Catalasi) e GST (Glutathione - S -Transferasi) come risposta ad agenti ossidanti;
- *biomarker di neurotossicità*: ridotta attività dell'enzima AChE (Acetilcolinesterasi);
- biomarker di genotossicità: test con reagente di Hoechst.

Le prove condotte hanno dato esito negativo, eccezion fatta per la compromissione della stabilità delle membrane lisosomiali ad elevate concentrazioni di caffeina.

### IMPIANTO DI TRATTAMENTO ACQUE REFLUE DI CERVIA (RA)



L'impianto di trattamento reflui di Cervia (RA) è uno dei primi impianti realizzati nel territorio romagnolo; la costruzione del nucleo originario risale infatti ai primi anni settanta del secolo scorso.

In seguito è stato più volte ampliato e reso più efficace nel trattamento in modo da soddisfare le sempre più stringenti normative di tutela delle acque e da fare fronte ad un bacino di utenza sempre più ampio, in particolare nei mesi estivi, ed alle problematiche ambientali emerse sul finire degli anni ottanta e legate all'eutrofizzazione marina, le mucillagini.

fig 3.6: impianto di trattamento acque reflue di Cervia (RA).

L'impianto è oggi in grado di trattare i reflui provenienti da una popolazione equivalente di 80000 persone, in corrispondenza dei momenti di picco di presenze turistiche nei mesi estivi, accogliendo in media 27000 m<sup>3</sup>/giorno di liquami in ingresso, con portata massima di punta di 31104 m<sup>3</sup>/giorno.

La suddivisione in 5 distinte linee garantisce una flessibilità operativa tale da fare fronte alle fluttuazioni stagionali di presenze.

Il trattamento è realizzato mediante la successione di 3 stadi consecutivi, costituenti la linea acque:

- *trattamento primario*: grigliatura grossolana, disoleatura/dissabbiatura, pre - aerazione con O<sub>2</sub> e sedimentazione primaria;
- *trattamento secondario*: pre-denitrificazione in condizioni anossiche realizzata ricircolando fanghi provenienti dalla sedimentazione secondaria, ossidazione/nitrificazione, sedimentazione secondaria;
- *trattamento terziario*: microfiltrazione con dischi a membrana in materiale sintetico e disinfezione conclusiva con utilizzo di Cl.

Per ciò che concerne la linea fanghi, la quale accoglie materiale proveniente dagli stadi di sedimentazione primaria e di sedimentazione secondaria, invece si utilizza il seguente schema: ispessimento gravitativo seguito da digestione anaerobica in due stadi con produzione di biogas e da disidratazione finale dei fanghi con filtropressatura.

## PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

La fase di campionamento ha seguito logiche diverse nel caso dei due distinti oggetti di studio. Ogni campione, del volume complessivo di 250 ml, salvo alcune eccezioni in seguito menzionate, è stato raccolto in contenitori plastici in PE.

Come accennato, l'esperimento condotto in laboratorio è stato realizzato in doppio, ossia si sono allestite due vasche distinte (*prima serie* e *seconda serie*) per ogni condizione sperimentale (controllo, aggiunte di 5, 50 e 500 ng/l di caffeina), per un totale quindi di 8 vasche.

Per ognuna di esse sono stati effettuati campionamenti quotidiani, ad 1 e a 24 ore di distanza dal cambio di acqua e, ad eccezione del controllo, dall'aggiunta di caffeina, in modo da valutare eventuali variazioni nella concentrazione conseguenti all'azione filtrante dei mitili ed all'eventuale bioaccumulo nel loro organismo; il numero totale di campioni a disposizione è dunque 64 :

$4 p * 8 t * 2.$

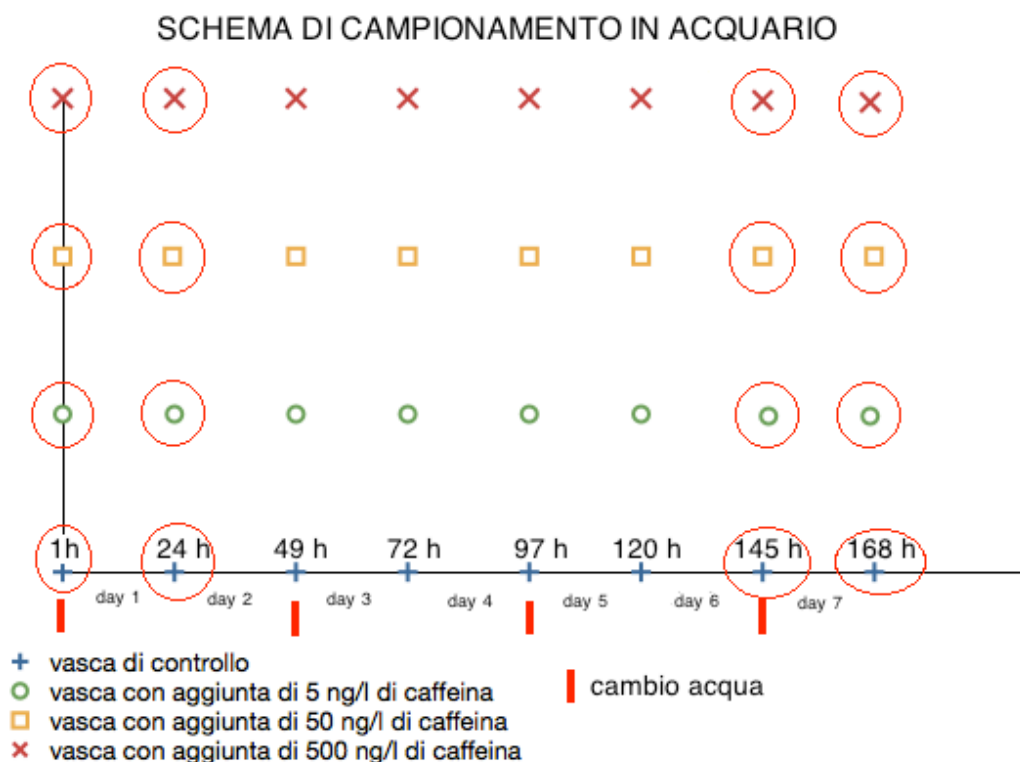


fig.3.7: schema di campionamento seguito per lo studio sui mitili in laboratorio (da notare che tale schema è in realtà effettuato in duplicato - prima e seconda serie) e campioni processati ed analizzati in HPLC - MS evidenziati col cerchio rosso.

In seguito al prelievo, avvenuto nel mese di Maggio 2014, i contenitori sono stati posti in freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  sino al momento del trattamento in vista dell'analisi, il quale ha avuto luogo nel Settembre successivo; tale modalità di conservazione ha avuto lo scopo di evitare eventuale fotodegradazione e termodegradazione della sostanza in esame.

Di tali campioni si è scelto di processare e leggere in triplicato (3 analisi HPLC - MS per ogni campione) quelli relativi al primo e all'ultimo cambio di acqua - aggiunta di caffeina, rispettivamente ad 1 e 24 ore in seguito all'aggiunta ( $4 \rho * 4 t = 16$  condizioni considerate).

Per ciascuna condizione sono stati processati ed analizzati i campioni di entrambe le serie, per un totale di 32 campioni.

Lo studio ambientale, come si accennava ha invece previsto la raccolta dei campioni presso il depuratore di Cervia (RA) e lungo il canale consortile di bonifica di via Cupa, il quale, oltre alle acque di drenaggio dei canali della pianura retrostante, convoglia le acque in uscita dall'impianto al mare Adriatico.

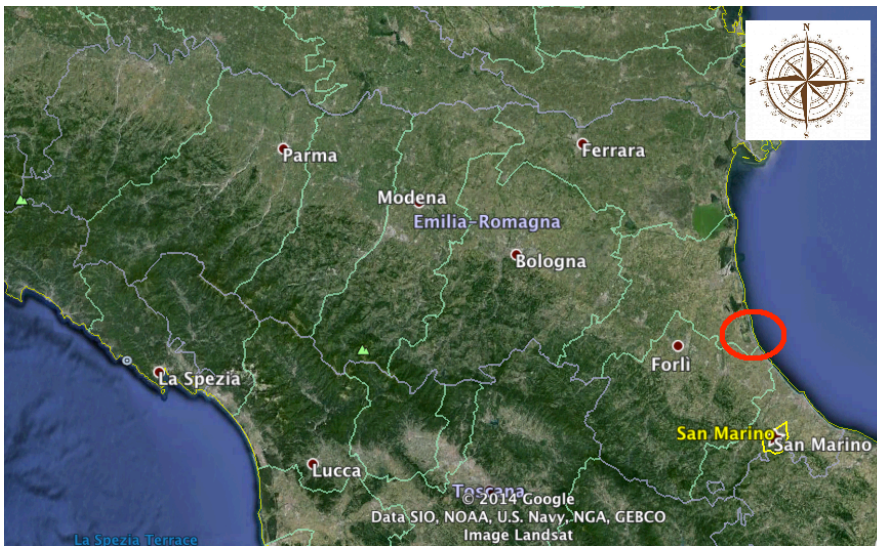


fig.3.8: localizzazione di Cervia con riferimento alla regione Emilia - Romagna.



fig. 3.9: localizzazione dell'impianto di depurazione con riferimento al comprensorio cervese.



fig 3.10: punti di prelievo dei campioni.



La raccolta ha avuto luogo in data 16/07/14 grazie alla collaborazione del personale di HERA. Per ognuno dei 5 siti di campionamento sono stati prelevati 4 campioni, per un totale di 20 campioni complessivi.

1) DEP IN	LAT: 44° 17' 18 ''	LON: 12° 18' 53''
2) DEP OUT	LAT: 44° 17' 18 ''	LON: 12° 18' 53''
3) CANALE LE SIEPI	LAT: 44° 17' 46 ''	LON: 12° 19' 26''
4) CANALE PINETA	LAT: 44° 17' 59 ''	LON: 12° 20' 23''
5) CANALE SBOCCO MARE	LAT: 44° 18' 01 ''	LON: 12° 20' 56''

Le matrici liquide in esame sono tra di loro molto differenti in quanto variano da acque nere di collettamento fognario ad elevatissimo carico organico e di inquinanti, ad acque chiarificate, acque dolci superficiali di canali ed infine acque di mare.

I contenitori sono stati posti in borsa termica opportunamente refrigerata e depositati in seguito in freezer a -20°C presso il laboratorio EPB di Ravenna.

Per questi ultimi si è proceduto al processamento completo in triplicato (3 campioni processati ed analizzati con HPLC - MS) per ciascuno dei siti; ogni campione processato è stato anche in questo caso letto 3 volte dallo strumento.

I campioni relativi alla validazione statistica del metodo di laboratorio (calcolo di recupero, effetto matrice ed efficienza totale del processo) sono stati preparati artificialmente aggiungendo un'aliquota nota di caffeina CRM (Sigma - Aldrich C53 ALDRICH Caffeine 99%) ad acqua di mare artificiale ASW; quest'ultima è stata ottenuta sciogliendo sali Instant Ocean® in acqua deionizzata proveniente dal deionizzatore ad osmosi inversa Millipore Elix in dotazione.

La caffeina, acquistata sotto forma di polvere cristallina con purezza del 99%, è stata disciolta in metanolo, solvente indicato per la conservazione ed impiegato in numerosi studi di letteratura, ottenendo una soluzione madre ad una concentrazione di 1 g/l opportunamente conservata in freezer a - 20°C.

Come si descriverà in seguito, l'aggiunta di un quantitativo noto di caffeina al campione tal quale, prima dell'intera procedura di trattamento del campione (aggiunta a priori) ed al campione trattato, dopo il trattamento ed immediatamente prima dell'analisi HPLC - MS (aggiunta a posteriori non affetta da perdite), ha consentito di valutare, confrontando tra di loro i due valori e tenendo conto

del valore di fondo di caffeina presente in ASW tal quale (l'enorme sensibilità dello strumento ha consentito di estrapolare questo sorprendente risultato), la bontà del metodo.

La determinazione di caffeina in ciascuna delle matrici indagate, ha portato a chiedersi se essa fosse presente effettivamente nella rete idrica di distribuzione, in quali quantitativi e se il macchinario di deionizzazione in dotazione fosse in grado di abbatterla o meno, analizzando a tale scopo un campione di acqua del rubinetto tal quale e ed un campione di acqua del rubinetto deionizzata; inoltre, a suggello dell'analisi, si è sottoposto a procedura analitica anche un campione relativo ad un' acqua minerale in commercio, con rilevazione di tracce di sostanza.

### AGGIUNTA DELLO STANDARD INTERNO E FILTRAZIONE PRIMARIA

La prima operazione, effettuata sui campioni estratti dal congelatore e posti a temperatura ambiente fino al loro completo scongelamento, è stata la misurazione precisa del volume di partenza (250 ml) mediante apposito cilindro graduato.

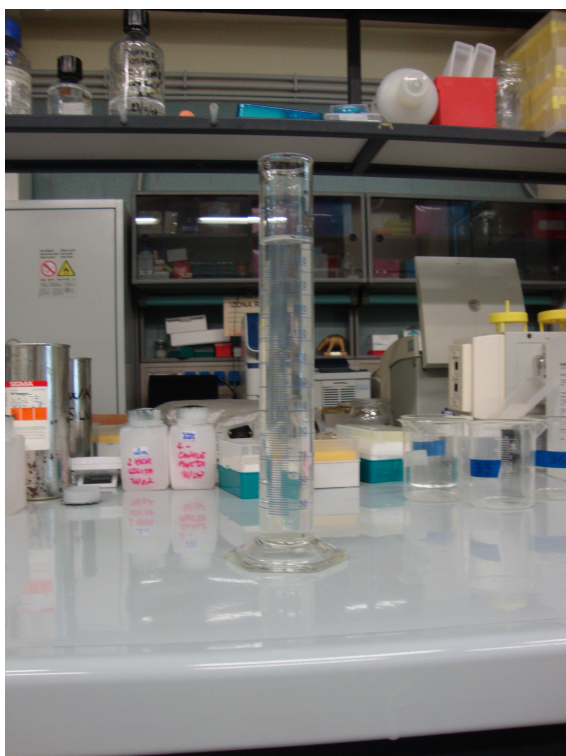


fig. 3.11: determinazione precisa del volume ed aggiunta dello standard interno.

opportunamente diluita in metanolo allo scopo di ottenere una soluzione madre con concentrazione pari a 2,4 mg/l conservata in freezer a -20°C.

Al suo interno è stata introdotta un'aliquota di 1 ml di standard interno alla concentrazione di 25,1  $\mu\text{g/l}$ , sostanza identica alla caffeina pura, ma contenente atomi di  $^{13}\text{C}$ , in modo da poterla distinguere dall'analita ricercato in sede di analisi spettrometrica. L'aggiunta dello standard all'inizio della procedura analitica, ad una concentrazione nota (100 ng/l), consente di determinare l'efficienza totale del processo (ETP), confrontando il segnale dello strumento spettrometrico a quello che ci si attenderebbe di ottenere qualora le perdite e l'effetto matrice di ostacolo fossero del tutto assenti.

Come detto, lo standard interno impiegato è caffeina isotopica della Cambridge Isotopes

Laboratories (CAFFEINE TRIMETHYL- $^{13}\text{C}$ 3, 99% 100 UG/ML IN METHANOL - CLM-514-1.2),

Il solo campione che ha avuto un differente trattamento è stato uno dei 3 campioni in ASW (acqua di mare artificiale) aventi lo scopo di determinare le perdite di analita e l'effetto matrice dai quali la procedura è affetta.

Essi, come si diceva, sono costituiti da un'aliquota di ASW tal quale, da un'aliquota di ASW alla quale è aggiunta caffeina a priori ad una concentrazione di 100 ng/l e da un'ultima aliquota di ASW alla quale è aggiunta caffeina a posteriori, prima dell'analisi HPLC - MS a concentrazione di 50 µg/l (corrispondente, se si considera un incremento di concentrazione di 500 volte nel corso della procedura, ad una concentrazione iniziale di 100 ng/l, identica a quella dell'altro campione).

In particolare, al campione al quale è stata aggiunta caffeina CRM all'inizio della procedura (aggiunta a priori), è stato asportato 1 ml dai 250 ml misurati nel cilindro; in seguito esso è stato riportato al volume di partenza con aggiunta di 1 ml di caffeina diluita anch'essa in ASW, in modo da non diminuire il quantitativo di caffeina eventualmente presente nella matrice di partenza ed in modo che la concentrazione nota di caffeina aggiunta fosse di 100 ng/l.

Rapportando il segnale dello strumento a quello previsto dalla retta di calibrazione alla concentrazione in esame si determina l'ETP (efficienza totale del processo), la quale tiene conto sia di perdite che di effetto matrice.



In seguito si è provveduto ad effettuare una filtrazione sotto vuoto del campione, impiegando allo scopo filtri in acetato di cellulosa (Acetate Plus Filter - Maine Manufacturing) con  $\varnothing = 47 \text{ mm}$  e  $\varnothing_{\text{pori}} = 0,45 \text{ }\mu\text{m}$ .

La vetreria impiegata (imbuto superiore Buchner, raccordo porta - filtro e beuta inferiore di raccolta) risulta essere a tenuta in modo da resistere alla depressione indotta per velocizzare il processo.

Ogni campione è stato trattato nel medesimo modo, fatta eccezione per le acque di ingresso al depuratore, estremamente torbide, le quali avrebbero reso impossibile la filtrazione senza previa centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti.

fig. 3.12: filtrazione sottovuoto.

Nonostante questa accortezza e la separazione della frazione solida sospesa sedimentata dal campione, la filtrazione è stata condotta in due stadi con l'impiego successivo di due filtri, a causa di indesiderati intasamenti.

La vetreria è stata opportunamente lavata con acqua di rubinetto ed acqua deionizzata tra il passaggio di un campione e l'altro onde evitare deleterie contaminazioni.

## ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA - SPE (SOLID PHASE EXTRACTION)

Procedura estremamente importante e delicata è stata l'estrazione in fase solida; come si sottolineava in precedenza, essa ha avuto le finalità fondamentali di semplificare la complessità della matrice, separando il composto di interesse da molteplici interferenti, e di operare una concentrazione elevata di esso in modo da rendere possibile l'analisi spettrometrica.

A tale scopo sono state impiegate cartucce di estrazione di materiali opportuni, solventi compatibili con le proprietà fisico - chimiche della caffeina e tempistiche di estrazione adeguate.

Numerose informazioni sono state ricavate dal protocollo pubblicato dal gruppo di ricerca dell'Università di Gran Canaria, guidato dalla Dottoressa Cristina Alfonso Olivares, relativo alla determinazione della presenza di sostanze farmaceutiche nelle acque costiere di Gran Canaria <sup>50</sup>.

La scelta delle cartucce di estrazione è ricaduta sul modello OASIS - HLB 6 cc, 200 mg, realizzate in speciale materiale composito, nel quale, su una matrice di DVB (divinilbenzene) sono inseriti gruppi polari idrofilici e gruppi apolari lipofilici.

Come si diceva, si tratta di un ottimo compromesso tra la tecnologia a *fase inversa*, indicata per composti apolari in matrice polare, e quella a *fase normale*, ottimale per composti polari in matrice organica apolare.

Tale scelta si rivelerebbe ancora più opportuna nel caso di estrazione di una moltitudine di analiti, ciascuno con proprietà differenti dal punto di vista della distribuzione della carica entro la molecola (polarità), ma diversi studi <sup>19 - 37 - 38 - 39 - 51</sup> hanno dimostrato come i recuperi fossero ottimali per la molecola di caffeina.

L'operazione di estrazione è stata condotta in 5 diverse sottofasi per ciascuna delle quali sono stati scelti solventi opportuni e flussi corrispondenti a tempistiche adeguate, resi possibili da condizioni operative sottovuoto.



*condizionamento:* l'attivazione dei siti di legame della cartuccia è stata effettuata tramite il passaggio di 5 ml di metanolo (METHANOL CHROMASOLV<sup>®</sup> for HPLC  $\geq$  99.9%, Sigma - Aldrich), lo stesso impiegato per l'eluizione finale, ad un flusso di 10 ml/min;

*equilibratura:* l'asportazione del quantitativo di solvente atto ad attivare i siti di legame è stata condotta mediante il passaggio di 5 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, proveniente dal deionizzatore a disposizione dei laboratori; anche in questo caso il flusso si è attestato sui 10 ml/min;

*passaggio del campione:* ciascun campione, del volume di 250 ml, è stato fatto fluire attraverso la cartuccia ad un flusso controllato di 5 ml/min; bisogna sottolineare come questa sottofase sia estremamente sensibile alla velocità di passaggio, la quale incide notevolmente sul trasferimento delle molecole di analita dalla matrice liquida al materiale solido.

Da sottolineare come il volume del campione, di notevole entità se rapportato a quello della cartuccia, ha comportato che si operasse una modifica mediante l'impiego di siringhe mediche da 60 ml rese solidali alla cartuccia tramite film plastico da laboratorio in modo da aumentare notevolmente il volume;

*risciacquo:* al fine di allontanare molecole e composti interferenti dalla cartuccia di estrazione si è provveduto a fare passare 5 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, un fluido polare, ad un flusso di 10 ml/min.

Tutto ciò che durante queste sottofasi viene fatto fluire ed evacuare dalla cartuccia SPE è stato allontanato e rimosso dal sistema.

*eluizione:* il solvente di eluizione impiegato è metanolo per HPLC dello stesso tipo di quello impiegato per il condizionamento, in volume di 2 ml.

La velocità di flusso è in questo caso estremamente bassa (1 ml/min) in quanto si ha a che fare con il delicato passaggio dell'analita dalla fase solida di estrazione al liquido di eluizione.

Il quantitativo di caffeina per unità di volume, salvo inevitabili perdite che influenzano il recupero, è in questo modo incrementato di 125 volte.



Da notare come la procedura analitica scelta abbia consentito, a differenza dell'operazione di filtrazione, per forza effettuata in serie, di condurre la simultanea estrazione di 4 campioni in

parallelo, grazie ad un *vacuum manifold*, collegato ad un sistema pneumatico di creazione del vuoto, in grado di accogliere sino a 12 cartucce al contempo.

Tra un'estrazione e la successiva si è lavato opportunamente il vacuum manifold con acqua di rubinetto e sapone e con acqua deionizzata.

fig. 3.13: SPE condotta sottovuoto tramite vacuum manifold (nel particolare è evidenziata la sottofase di eluizione).

## EVAPORAZIONE SOTTO FLUSSO DI AZOTO



I campioni eluiti in volume di 2 ml sono stati raccolti in opportune provette di vetro e posti ad evaporare sotto leggero flusso di azoto; in questo modo il metanolo, estremamente volatile, è stato separato dalle molecole di interesse, venendo allontanato dal sistema.

La procedura, la quale ha richiesto tempistiche di circa due ore per campione, è stata condotta in parallelo mediante raccordi a T e tubi di PE i quali hanno consentito di quadruplicare le uscite.

All'estremità terminale di ciascuno di essi una pipetta Pasteur consentiva di indirizzare il gas nella maniera più opportuna.

fig. 3.14: evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto.

## RICOSTITUZIONE IN SOLVENTE HPLC - MS E FILTRAZIONE FINALE

Quanto rimasto in seguito all'evaporazione del solvente, ovvero un film di particelle adese alla superficie vetrosa della provetta, è stato ricostituito in un volume finale di 0,5 ml mediante l'impiego dei medesimi solventi usati per le analisi cromatografiche e spettrometriche.

Da questo momento in avanti è doveroso garantire la purezza di ciò che viene iniettato in colonna cromatografica, onde evitare intasamenti e conseguenti problemi di sovrappressione del sistema; inoltre, adottando solventi grado massa (" suitable for HPLC - MS ") si riducono le possibilità di avere interferenze in sede di ionizzazione ed analisi spettrometrica, il cosiddetto effetto matrice.

In particolare si è scelto di ricostituire in 5 % di acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN - LC - MS CHROMASOLV<sup>®</sup> FLUKA - SIGMA-ALDRICH) contenente lo 0,1 % di acido formico (HCOOH - 56302 FLUKA Formic acid eluent additive for LC-MS), e 95 % di H<sub>2</sub>O MQ (LC - MS CHROMASOLV<sup>®</sup> FLUKA - SIGMA-ALDRICH) contenente lo 0,1 % di acido formico (HCOOH - 56302 FLUKA Formic acid eluent additive for LC-MS); queste percentuali di solvente corrispondono alla composizione della fase mobile propria dei minuti iniziali del gradiente messo a punto per l'analisi cromatografica, ovvero il momento in cui, come si vedrà, la polarità di essa è maggiore.

In questo modo ciò che si inietta e che viene introdotto nel sistema ha le medesime proprietà fisico-chimiche del medium dal quale sarà trasportato, riducendo al minimo le possibili perturbazioni.

Alla ricostituzione in 500 µl, corrispondente quindi ad una concentrazione dell'analita di 500 volte, se si considerano i 250 ml, segue un ulteriore step di filtrazione realizzato con filtri a siringa in PC (policarbonato) del diametro esterno di 30 mm e con pori di 0,2 mm.

Questo si rivela necessario in vista dell'introduzione nel sistema HPLC - MS, il quale, come mesi di lavoro ci hanno insegnato, è estremamente delicato e sensibile alle interferenze e, qualora non si adottino tali accortezze, difficile da riportare nelle condizioni di corretta operatività.

Il solo campione che a questo punto ha previsto un diverso trattamento è stato quello relativo alla verifica dell'effetto matrice mediante l'aggiunta a posteriori di caffeina CRM in ASW; per quest'ultimo si è provveduto ad aggiungere un quantitativo di sostanza tale che la concentrazione introdotta fosse di 50 µg/l.

Il confronto tra il segnale dello strumento e quello che ci si attenderebbe in assenza di effetto matrice (valore ricavato dalla calibrazione dello strumento con varie concentrazioni di analita) consentirà poi di valutare il quantitativo di sostanza che non viene rilevato dallo spettrometro a causa di interferenze.

## HPLC - MS

L'analisi effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione in abbinamento a rivelatore a spettrometria di massa è il vero e proprio cardine del lavoro sperimentale svolto.

La tecnologia cromatografica impiegata è tra le più recenti e all'avanguardia nel settore ed il suo accoppiamento con lo spettrometro di massa, come si è sottolineato più volte, è quanto di meglio possa aiutare un'operatore nella determinazione e quantificazione di sostanze in tracce.

La messa a punto delle condizioni operative ottimali ha richiesto l'impiego di un lungo arco di tempo, durante il quale sono stati effettuati molteplici tentativi finalizzati ad ottenere un metodo HPLC - MS quanto più sensibile, selettivo, affidabile, riproducibile e robusto possibile.



fig. 3.15: cromatografo HPLC - AGILENT 1200.

performance un'ampia gamma di altri composti e di mettere a punto in un secondo momento cicli di analisi multicomposto, finalizzati ad identificare e quantificare numerose molecole al contempo.

Nel nostro caso si è scelto di realizzare una fase mobile di trasporto in colonna di composizione variabile nel corso dei 25 minuti di durata del ciclo.

Il cromatografo HPLC impiegato, di marca AGILENT, serie 1200, è stato dotato di una colonna di analisi a cromatografia di adsorbimento di tipologia RP (Reversed phase - fase stazionaria apolare), indicata per la ritenzione selettiva ed efficiente di composti apolari o moderatamente polari.

Nella fattispecie la scelta è ricaduta sul modello XSELECT di marca Waters (L: 15 cm,  $\text{\O}_{\text{colonna}}$  : 2,1 mm,  $\text{\O}_{\text{fase stazionaria}}$  : 3,5  $\mu\text{m}$ ).

Benchè l'elevata polarità della caffeina potesse fare propendere per l'impiego di colonne cromatografiche NP (normal phase - fase stazionaria polare), l'enorme versatilità del prodotto scelto consentirà al gruppo di lavoro di potere analizzare con buone

Le caratteristiche di essa sono il risultato della miscela in differenti percentuali, secondo un gradiente temporale, di due solventi, la cosiddetta fase acquosa (A) e la fase organica (B); ad entrambe le fasi, come poc'anzi detto, è stato addizionato acido formico allo 0,1 % per evitare il deterioramento dei solventi a causa di fioriture algali e crescita di microrganismi, nonché per favorire la ionizzazione positiva.

A: H<sub>2</sub>O MQ + 0,1 % HCOOH

B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1% HCOOH

0 - 6 min: 5 % B  
 6 - 6,5 min : 5 % → 48 % B  
 6,5 - 12,5 min : 48 % B  
 12,5 - 13 min : 48 % → 85 % B  
 13 - 19 min : 85 % B  
 19 - 19,5 min : 85 % → 5 % B  
 19,5 - 25 min : 5 % B

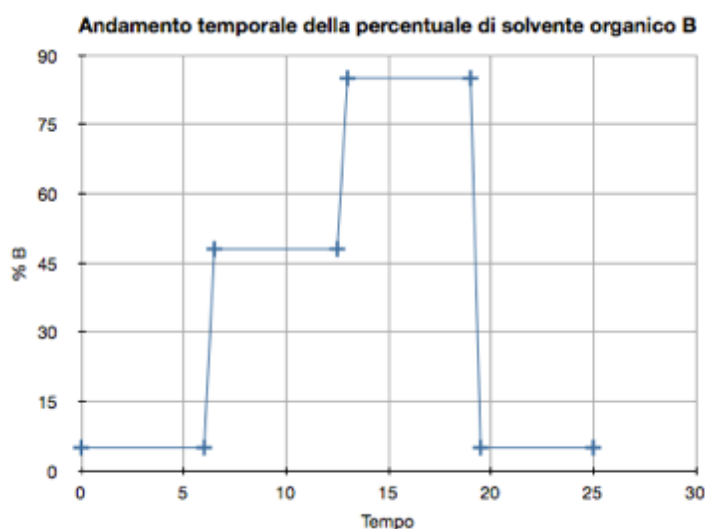


fig. 3.16: gradiente temporale di composizione della fase mobile.

La velocità di flusso tipica delle analisi è di 0,3 ml/min ed il volume di campione introdotto per ogni ciclo è di 20 µl (in realtà si introducono nel loop di ingresso alla colonna 150 µl tramite siringa HAMILTON<sup>®</sup>, dei quali la quantità eccedente è rimossa, in modo da sincerarsi che eventuali tracce relative a campioni precedenti siano del tutto asportate).

La variazione nel tempo delle proprietà fisico - chimiche del medium di trasporto consente l'arrivo al detector, lo spettrometro di massa, dei vari composti in momenti ben precisi e caratteristici, dipendenti dalla loro rispettive affinità per la fase stazionaria adesa alla colonna e per la fase mobile che fluisce.

Essendo la parete colonnare rivestita da particelle apolari, costituite da lunghe catene di C<sub>18</sub> legate ad una resina silicatica di base, le molecole maggiormente polari mettono in atto deboli interazioni con essa, attraversandone la lunghezza in breve tempo e giungendo rapidamente al detector.

Il loro distacco avverrà all'inizio della corsa cromatografica, quando la fase mobile risulta essere quasi integralmente costituita dal componente acquoso polare, H<sub>2</sub>O MQ.

Le molecole più apolari, per contro, instaurano legami di Van Der Waals di entità e forza molto più



significative ed il loro distacco e trasporto al detector si verifica in tempi più lunghi, in corrispondenza di una maggiore percentuale di solvente organico a minore polarità.

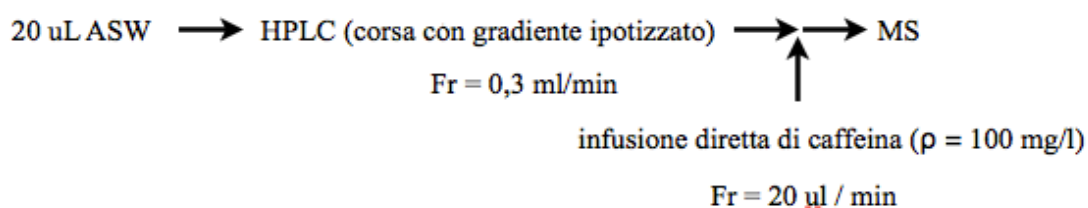
La caffeina, la quale presenta al contempo caratteristiche polari dovute alla presenza di atomi di O ed N, ad elevata elettronegatività, e caratteristiche apolari, dovute ai due anelli xantinici costitutivi (atomi di C e H) aderisce dapprima alla colonna e si distacca, dato ottenuto da numerose prove sperimentali, con percentuali di solvente organico intorno al 20 %.

Il gradiente e le tempistiche sopra riportate sono state scelte in modo da evitare quanto più possibile che si verificassero interferenze dovute all'effetto matrice nel momento in cui le molecole di caffeina giungono allo spettrometro di massa.

La prova sperimentale che ha consentito di determinare quali fossero i momenti maggiormente affetti da disturbo dovuto ad altre molecole presenti nella matrice è stata realizzata collegando l'HPLC allo spettrometro.

Si è provveduto ad avviare una corsa cromatografica il cui gradiente, precedentemente ipotizzato, fosse estremamente simile a quello definitivo, iniettando in colonna 20 µl di ASW - artificial sea water; un raccordo a T innestato sullo spettrometro ha consentito di infondere caffeina disciolta in solvente (5 % CH<sub>3</sub>CN, 95 % H<sub>2</sub>O MQ) a concentrazione di 100 mg/l direttamente nella macchina, ad un flusso di 20 µl/min.

I due flussi (campione di ASW proveniente dalla colonna e trasportato dalla fase mobile con il gradiente prescelto e caffeina disciolta in solvente direttamente infusa post colonna a 20 µl/min) potevano così giungere alla sorgente di ionizzazione simultaneamente.



Lo spettrometro di massa, settato su modalità MRM (multiple reaction monitoring) in modo da selezionare nel primo analizzatore lo ione di caffeina (m/z:195,01), frammentarlo in cella di collisione e selezionare nell'ultimo quadrupolo il solo ione figlio desiderato (m/z: 137,98), ha fornito come output grafico un cromatogramma in funzione del tempo dello ione m/z 137,98.

In caso di effetto matrice nullo il cromatogramma sarebbe stato orizzontale, ovvero intensità di segnale associata allo ione scelto costante nel tempo, dal momento che l'infusione era condotta in continuo nel tempo.

La prova ha invece evidenziato come fino a 4-5 minuti fossero presenti numerosi picchi negativi, ovvero momenti in cui molecole presenti nella matrice ASW ostacolavano significativamente la ionizzazione della caffeina infusa all'interno dello spettrometro, comportando un segnale di intensità minore rispetto all'andamento orizzontale tipico di tempi superiori a 5 minuti.

Si è fatto quindi in modo che le molecole di analita potessero giungere alla sorgente di ionizzazione intorno ai 10 minuti ( $T_r$  : 10,39 min.), senza incorrere in deleteri fenomeni di competizione messa in atto con altre molecole ai fini di una protonazione e volatilizzazione (*charge competition* e *surface competition*).

Altro grande vantaggio che affonda le radici in tempi di analisi così lunghi è l'elevato livello di pulizia della colonna cromatografica; i fastidiosi intasamenti con i quali si ha a che fare operando in condizioni isocratiche (composizione costante nel tempo) sono scongiurati allontanando in ciascuna corsa sia i composti polari che quelli apolari.

Si evitano inoltre sovrappressioni deleterie per la durata e l'affidabilità della colonna (è opportuno, per quanto si operi con HPLC, non superare i 200 bar).

Del tutto evidente è l'handicap che ne consegue: tempistiche di analisi molto rilevanti.

Il rivelatore MS accoppiato alla colonna cromatografica, WATERS - QUATTRO PREMIER XE, è stato utilizzato in condizioni di ionizzazione elettrospray (ESI) e, essendo in grado di operare in modalità tandem (MS/MS), ossia impiegando due analizzatori ionici fra i quali è posta una cella di collisione, se ne sono sfruttate appieno le potenzialità elaborando un'analisi a doppio stadio.

Per la descrizione in dettaglio del macchinario si rimanda al capitolo secondo; in questa sede si farà invece menzione ai principali parametri operativi del macchinario e al modo in cui sono stati scelti per l'analisi in questione.

Riassumendo brevemente il funzionamento, si rammenta che lo strumento mette in atto una ionizzazione a pressione atmosferica della miscela solvente - analita in arrivo dal sistema HPLC; questo sfruttando la differenza di potenziale elettrico tra un capillare a voltaggi elevatissimi (qualche KV) ed una piastra metallica a basso potenziale (sampling cone).

Un flusso di azoto consente la nebulizzazione della miscela in goccioline micrometriche (nebulizer gas), mentre un secondo flusso del medesimo gas (desolvation gas), a temperature molto più

elevate, consente la separazione e l'allontanamento del solvente dalla miscela in seguito a riduzione dimensionale delle goccioline e conseguente esplosione coulombica.

In seguito, un primo analizzatore a quadrupolo elettrico opera da primo filtro ionico, consentendo il passaggio degli ioni contraddistinti dal rapporto  $m/z$  desiderato o della totalità di essi mediante opportuni voltaggi degli elettrodi; una cella di collisione adiacente ad esso funzionante a gas argon, effettua la frammentazione degli ioni padri provenienti dal primo quadrupolo ed invia al secondo gli ioni figli, ulteriormente filtrati e convogliati al rivelatore vero e proprio.

Da ultimo gli ioni selezionati vengono convertiti in un flusso elettronico tramite dinodi e fotomoltiplicatori, generando una corrente elettrica proporzionale al quantitativo della sostanza in esame presente nel campione introdotto.

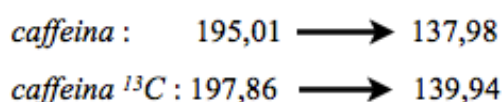
Lo scopo della nostra analisi è stata la quantificazione (analisi quantitativa) della caffeina presente in varie matrici liquide (da acqua salata, ad acqua di fiume, ad acque nere, a matrici biologiche come emolinfa di mitilo).

Questo ha fatto sì che ci si orientasse verso una selettività elevata, in modo da operare al meglio la determinazione di una sola sostanza.

A tale scopo si è impiegata la modalità doppio stadio del macchinario, selezionando nel primo analizzatore lo ione padre della molecola di caffeina ( $m/z$  : 195,01), frammentandolo nella cella di collisione e selezionando nell'ultimo analizzatore lo ione figlio più abbondante ( $m/z$  : 137,98).

Dal momento che per tenere conto di perdite che inficiano il recupero finale e di effetti matrice indesiderati si è fatto uso di standard interno di caffeina (caffeina  $^{13}C$ ) introdotta nel campione all'inizio della procedura in quantità nota, il primo analizzatore è stato impostato in modo da consentire anche il passaggio dell'isotopo ( $m/z$  : 197,86), successivamente frammentato in vari ioni dei quali è stato scelto il più abbondante ( $m/z$  : 139,94).

La modalità operativa è stata dunque MRM (multiple reaction monitoring), considerando le due transizioni ioniche seguenti:



Come output grafico, per ogni analisi effettuata, si è avuto a disposizione il tracciato cromatografico relativo alla caffeina, quello relativo allo standard interno e la somma delle intensità dei due segnali.



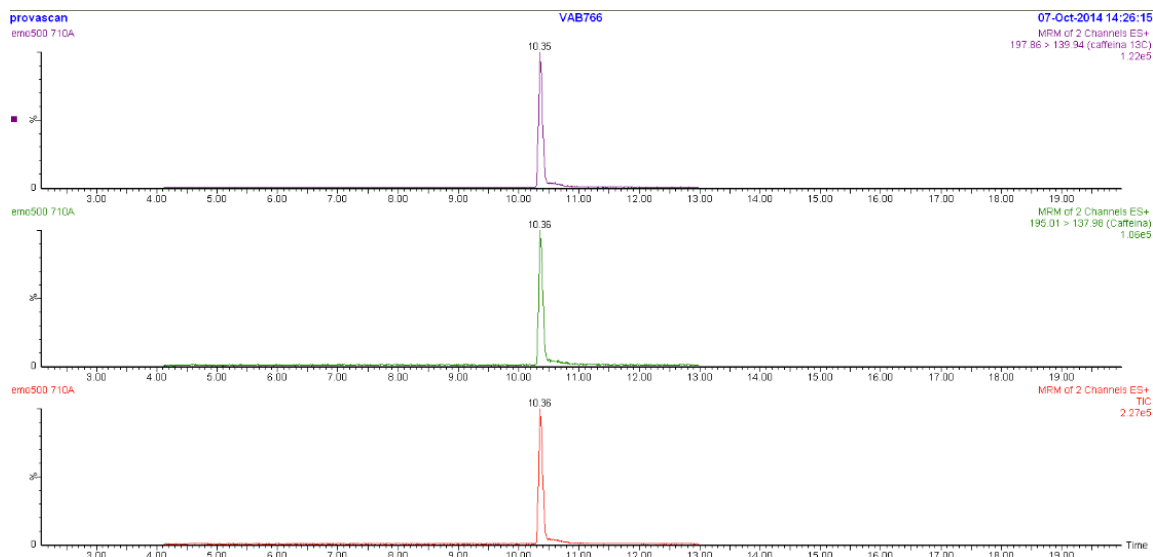
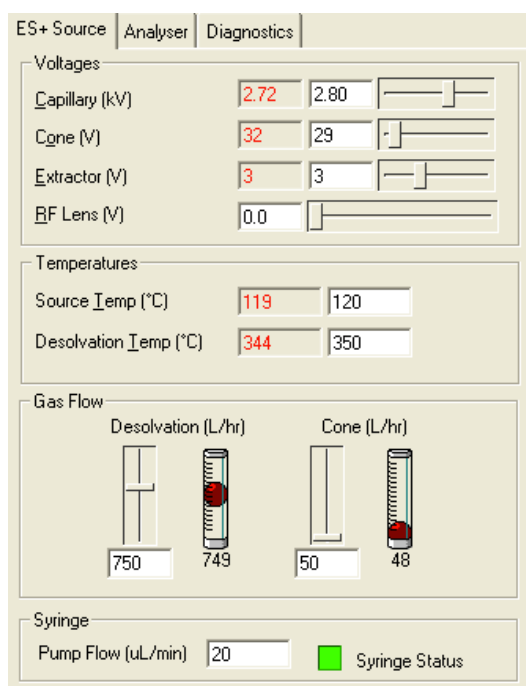


fig. 3.17: i tre diversi cromatogrammi a disposizione come output grafico di ogni analisi.



I voltaggi, le temperature di esercizio ed i flussi dei gas di nebulizzazione e desolvatazione sono stati ricavati mediante la modalità di settaggio automatico dello strumento (MS Autotune), introducendo caffeina disciolta in solvente (5 % CH<sub>3</sub>CN, 95 % H<sub>2</sub>O MQ) a concentrazione di 10 mg/l direttamente nella macchina, con un flusso di 20 µl/min.

fig. 3.18: principali parametri operativi dello strumento.

La parte di procedura analitica inerente l'HPLC - MS è del tutto identica per ogni analisi effettuata in sede di laboratorio, sia per la matrice inorganica che per quella biologica, fatta eccezione per l'analisi di tessuti, la quale ha richiesto l'elaborazione di un differente gradiente cromatografico. Essa si è comunque dimostrata del tutto robusta, affidabile ed applicabile a situazioni eterogenee.

### 3.4) PROCEDURA ANALITICA VOLTA ALLA IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI CAFFEINA IN EMOLINFA DI MITILO

Matrice alquanto diversa rispetto alle acque superficiali si è rivelata l'emolinfa di mitilo.

Il protocollo sperimentale in questo caso è stato elaborato raccogliendo informazioni bibliografiche inerenti analisi HPLC - MS relative a farmaci ambientali in emolinfa di vermi terricoli <sup>52</sup>, a PFOS / PFOA in sangue di pesce Tilapia <sup>53</sup>, a caffeina in plasma umano <sup>54 - 55</sup> ed in latte materno <sup>56</sup>.

L'eterogeneità degli studi ai quali ci si è riferiti sottolinea come la ricerca di caffeina nell'emolinfa di mitilo sia molto specifica e, stando alle conoscenze bibliografiche degli autori, non ancora indagata.

Ci si è dovuti dunque riferire a matrici simili (emolinfa di vermi terricoli, plasma di pesci ciclidi, plasma umano e latte materno) sulle quali fossero ricercate con analisi HPLC - MS sostanze farmaceutiche.

#### CAMPIONAMENTO

La procedura è stata condotta in questo caso sul tessuto fluido di trasporto prelevato dagli esemplari di mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) soggetti all'esperimento con uso di biomarker presso il laboratorio di fisiologia EPB.

Allo scopo di verificare l'eventuale biocencentrazione della caffeina disciolta nelle vasche in cui gli



organismi erano posti (controllo, 5 ng/l, 50 ng/l e 500 ng/l) si è provveduto a prelevare da ciascuno dei 48 mitili (6 per ciascuna condizione in due serie analoghe) un quantitativo di emolinfa dal muscolo adduttore.

fig. 3.19: *Mytilus galloprovincialis* (si osservi il muscolo adduttore con funzione di tenere serrate le due sezioni di guscio - nell'esemplare non ancora sezionato è evidente il muscolo con la sua forma cilindrica ed il colore madreperlaceo nella parte superiore dell'organismo, mentre nell'esemplare sezionato, il muscolo è stato reciso e se ne notano le superfici di attacco).

Il quantitativo prelevato inserendo una siringa da insulina all'interno degli esemplari vivi si aggirava su valori di circa 1 ml per organismo.

Il campionamento è stato effettuato al termine dell'esperimento in acquario, prima dello studio relativo ai biomarker svolto nel laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale.

Le aliquote prelevate sono state poste in provette da 1,5 ml e poste in freezer a -80 °C dal mese di Maggio 2014 al mese di Ottobre 2014.

#### AGGIUNTA SOLVENTE DI ESTRAZIONE E STANDARD INTERNO

In seguito allo scongelamento delle aliquote proprie di ogni organismo, è stato fatto un pool relativo a ciascuna concentrazione per ognuna delle due serie, unendo tra di loro le aliquote.

Sono stati dunque ottenuti 8 pool di emolinfa, dai quali sono stati prelevati 6 ml destinati alla procedura analitica.

Ad essi è stato aggiunto lo standard interno volto a valutare perdite procedurali ed effetto matrice (efficienza totale del processo); anche in questo caso la scelta è ricaduta sull'isotopo di caffeina contenente <sup>13</sup>C.

Sono stati aggiunti 5,2 µl di soluzione madre in metanolo a 2,4 mg/l, in modo da ottenere una concentrazione finale, nei 250 µl di ricostituzione, di 50 µg/l.

Ad ogni campione di 6 ml di emolinfa e standard interno aggiunto, sono stati addizionati 12 ml di solvente di estrazione (rapporto campione/solvente 1:2), metanolo - CH<sub>3</sub>OH, il tutto all'interno di una provetta da 50 ml.

#### MISCELAZIONE VORTEX E CENTRIFUGAZIONE

Al fine di assicurare un intimo contatto tra la matrice in esame ed il solvente di estrazione, la provetta contenente 18 ml di miscela è stata agitata per 30 secondi per mezzo di agitatore vortex.

Lo step seguente ha invece previsto la suddivisione del quantitativo totale in 10 aliquote da 1,8 ml poste in provette da 2 ml.

L'elevata velocità di centrifugazione prevista non consentiva l'introduzione diretta di una provetta da 50 ml e pertanto sono state caricate le aliquote di volume inferiore.

La separazione in centrifuga, realizzata con accelerazione di 13000 xg (≈ 12200 rpm), ha avuto una durata di 10 minuti, ad una temperatura di 4°C.

Il macchinario impiegato, di marca OPTO - LAB, è del tipo PK - 121R.

$xg = (1,12 * R) * (rpm)^2/1000$  , dove R è il raggio del rotore [mm] ed rpm i giri al minuto.

Al termine della centrifugazione si è ottenuta la separazione tra materiale precipitato (pellet), costituito prevalentemente dalla frazione cellulare (emociti - *preleucociti, leucociti, enocitoidi*), e surnatante o plasma, contenente proteine, lipidi, zuccheri, ormoni, enzimi e prodotti del metabolismo cellulare.

Del suddetto surnatante sono stati prelevati 12 ml per i quali la procedura prevedeva altri passaggi.

#### EVAPORAZIONE SOTTO FLUSSO DI AZOTO

Passaggio seguente è stata l'evaporazione sotto leggero flusso di azoto del volume prelevato dalla centrifugazione; le tempistiche sono state superiori rispetto alla procedura relativa alle acque in quanto in questo caso il liquido da evaporare non era costituito solamente da metanolo, ma anche da una frazione significativa di plasma, meno volatile del solvente.

#### RICOSTITUZIONE IN SOLVENTE HPLC - MS E FILTRAZIONE

Del tutto simile alla procedura messa a punto per le acque è la fase di ricostituzione finale e filtrazione; anche in questo caso il sottile film che riveste le pareti dei contenitori in vetro nei quali si svolge l'evaporazione è stato risospeso in un solvente costituito da 5 % di acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN - LC - MS CHROMASOLV<sup>®</sup> FLUKA - SIGMA-ALDRICH) contenente lo 0,1 % di acido formico (HCOOH - 56302 FLUKA Formic acid eluent additive for LC-MS), e 95 % di H<sub>2</sub>O MQ (LC - MS CHROMASOLV<sup>®</sup> FLUKA - SIGMA-ALDRICH) contenente lo 0,1 % di acido formico (HCOOH - 56302 FLUKA Formic acid eluent additive for LC-MS), corrispondente quindi alle percentuali iniziali del gradiente tipico HPLC - MS.

Il volume in cui si è ricostituito è di 250 µl e la concentrazione è stata dunque incrementata di 24 volte (da 6 ml a 0,25 ml).

Al fine di non intasare la colonna causando sovrappressioni, letture falsate ed altri inconvenienti, si è effettuata anche in questo caso una filtrazione con filtri in PC (policarbonato) del diametro esterno di 30 mm e diametro della maglia di 0,2 µm.

## HPLC - MS

Il campione era a questo punto pronto per essere iniettato nel sistema HPLC - MS, operante in condizioni in tutto e per tutto analoghe a quelle relative all'analisi delle acque.

### 3.5) PROCEDURA ANALITICA VOLTA ALLA IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI CAFFEINA IN TESSUTO DI MITILO

Ulteriore procedura analitica volta alla determinazione dei quantitativi di caffeina presente in matrice biologica è stata quella finalizzata ad indagarne la presenza in tessuto di mitilo.

In questo caso, oltre alla conoscenze pregresse derivanti dalla messa a punto delle metodiche precedentemente presentate, ci si è avvalsi della collaborazione del Dott. Fabrizio Rebasti, tecnico Waters, esperto di cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata a rivelatori a spettrometria di massa.

Il protocollo elaborato ha previsto infatti una fase preliminare aggiuntiva rispetto a quello relativo alle acque, da lui suggerita durante lo svolgimento di un corso di formazione presso i laboratori di chimica analitica di Scienze Ambientali e Biologia Marina.

Essa è finalizzata alla estrazione della sostanza indagata da fase solida, il tessuto di mitilo, ed al suo trasferimento in fase liquida inviata agli step successivi, del tutto simili a quelli relativi alla procedura applicata per le acque.

#### CAMPIONAMENTO

Il campionamento della matrice solida, come nel caso dell'emolinfa, ha avuto luogo al termine della procedura sperimentale di esposizione degli organismi a differenti concentrazioni di caffeina.

In seguito al prelievo del tessuto di trasporto di natura liquida ed alla rimozione del bisso, una secrezione filamentosa sintetizzata da un'apposita ghiandola allo scopo di fare aderire il mollusco ad un substrato fisso, i tessuti solidi sono stati prelevati mediante rescissione dal guscio carbonatico per mezzo di apposite forbici metalliche.

In seguito, per ciascuna delle 4 condizioni sperimentali realizzate in duplicato (4 p \* 2), sono stati fatti 2 pool, ciascuno contenente quindi i tessuti di tre individui, in contenitori plastici.

Essi sono stati poi posti in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  dal mese di Maggio al mese di Ottobre 2014, quando sono stati scongelati al fine dell'analisi.

#### ESTRAZIONE CON SOLUZIONE LIQUIDA APPOSITA E AGGIUNTA STANDARD INTERNO (OMOGENEIZZAZIONE, MISCELAZIONE VORTEX E CENTRIFUGAZIONE)

Necessità peculiare legata alla matrice in questione è stata l'estrazione dell'analita dal tessuto ed il suo trasferimento in fase liquida; come si diceva, la modalità impiegata è stata suggerita dal tecnico Waters che ha condotto il corso di formazione sullo strumento di analisi.

A differenza dei protocolli studiati (McEneff et al. <sup>57</sup>, Barron et al. <sup>19</sup>), i quali prevedevano l'estrazione degli analiti da fase solida ed il trasferimento in fase liquida mediante l'uso di appositi macchinari operanti ad elevata pressione (Pressurized Liquid Extraction) nei quali introdurre specifici solventi, in questo caso si è fatto uso di un vigoroso buffer di estrazione di caratteristiche opportune addizionato al materiale di partenza.

Una fase di miscelazione ed una di centrifugazione ha consentito di prescindere dall'impiego dell'estrattore in pressione.

La soluzione estrattiva è stata realizzata mediante la miscela di quattro solventi in quantitativi opportuni:

- 0,77 g di  $\text{CH}_3\text{CONH}_4$  (acetato di ammonio) addizionati a 900 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  deionizzata (pH della miscela aggiustato a 4 con  $\text{HCl}$ );
- 0,15 g di  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (etilendiamminotetracetato disodico);
- 5 g di  $\text{NaCl}$  (cloruro di sodio);
- 20 g di TCA (acido tricloroacetico).

Ai fini dell'estrazione, 6 g di tessuto di mitilo, il quantitativo di partenza della matrice indagata (quantità tale da avere a disposizione materiale rappresentativo di più individui e di varie parti degli organismi, svincolandosi dall'eventuale problema di bioaccumulo diverso in funzione degli individui e degli organi presi in considerazione), sono stati omogenati per mezzo di miscelatore ULTRA - TURRAX<sup>®</sup> T25 basic.

In seguito, all'omogenato sono stati addizionati 60 ml del buffer sopracitato, entro il quale era stato opportunamente disciolto lo standard interno (31,2  $\mu\text{l}$  a 2,4 mg/l); il volume risultante è stato diviso in due distinte provette plastiche.

Per ciascuna provetta si è operata una miscelazione vortex per 10 secondi, seguita da agitazione manuale della durata di 1 minuto e da centrifugazione con macchinario OPTO - LAB, tipo PK - 121R, a 4000 rpm per 5 minuti.

Giunti a tale punto si è provveduto al prelievo di 20 ml di surnatante (quantitativo corrispondente a 2 g di tessuto di mitilo), inviati all'estrazione solida SPE dopo avere aggiustato il pH a 6,5 con impiego di Na(OH) 1 N in quantitativo di 2,11 ml.

#### ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA - SPE (SOLID PHASE EXTRACTION)

Relativamente all'estrazione in fase solida, finalizzata a semplificare la complessità della matrice mediante rimozione di numerosi interferenti ed a concentrare notevolmente il campione, si è operato in modo in tutto e per tutto analogo alla procedura relativa alle acque: stesso materiale delle cartucce di estrazione (cartucce OASIS HLB 6 ml 200 mg in DVB - divinilbenzene con gruppi idrofilici e lipofilici), stessi solventi nei medesimi quantitativi per le fasi di condizionamento, equilibratura, risciacquo ed eluizione, stesse velocità di flusso adottate.

Ricapitolando:

*condizionamento:* l'attivazione dei siti di legame della cartuccia è stata effettuata tramite il passaggio di 5 ml di metanolo (METHANOL CHROMASOLV<sup>®</sup> for HPLC  $\geq$  99.9%, Sigma - Aldrich), lo stesso impiegato per l'eluizione finale, ad un flusso di 10 ml/min;

*equilibratura:* l'asportazione del quantitativo di solvente atto ad attivare i siti di legame è stata condotta mediante il passaggio di 5 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, proveniente dal deionizzatore a disposizione dei laboratori; anche in questo caso il flusso si è attestato sui 10 ml/min;

*passaggio del campione:* ciascun campione, del volume di 20 ml, è stato fatto fluire attraverso la cartuccia ad un flusso controllato di 5 ml/min.

*risciacquo:* al fine di allontanare molecole e composti interferenti dalla cartuccia di estrazione si è provveduto a fare passare 5 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, un fluido polare, ad un flusso di 10 ml/min.

Tutto ciò che durante queste sottofasi viene fatto fluire ed evacuare dalla cartuccia SPE è stato allontanato e rimosso dal sistema.

*eluizione*: il solvente di eluizione impiegato è metanolo per HPLC dello stesso tipo di quello impiegato per il condizionamento, in volume di 2 ml.

La velocità di flusso è in questo caso estremamente bassa (1 ml/min) in quanto si ha a che fare con il delicato passaggio dell'analita dalla fase solida di estrazione al liquido di eluizione.

Il quantitativo di caffeina per unità di volume, salvo inevitabili perdite che influenzano il recupero, è in questo modo incrementato di 10 volte.

#### EVAPORAZIONE SOTTO FLUSSO DI AZOTO

In modo analogo alla procedura relativa alle acque i 2 ml eluiti a conclusione dell'estrazione SPE sono stati evaporati sotto leggero flusso di azoto e portati a secco.

#### RICOSTITUZIONE IN SOLVENTE HPLC - MS E FILTRAZIONE

Anche in questo caso il sottile film che riveste le pareti dei contenitori in vetro al termine dell'evaporazione è stato risospeso in un solvente costituito da 5 % di acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN - LC - MS CHROMASOLV<sup>®</sup> FLUKA - SIGMA-ALDRICH) contenente lo 0,1 % di acido formico (HCOOH - 56302 FLUKA Formic acid eluent additive for LC-MS), e 95 % di H<sub>2</sub>O MQ (LC - MS CHROMASOLV<sup>®</sup> FLUKA - SIGMA-ALDRICH) contenente lo 0,1 % di acido formico (HCOOH - 56302 FLUKA Formic acid eluent additive for LC-MS), corrispondente quindi alle percentuali iniziali del gradiente tipico HPLC - MS.

Il volume in cui si è ricostituito è di 500 µl e la concentrazione è stata dunque incrementata di 40 volte (da 20 ml a 0,5 ml).

Al solito, al fine di preservare le corrette condizioni operative cromatografiche e spettrometriche, si è attuata una filtrazione con filtri in PC (policarbonato) del diametro esterno di 30 mm e diametro della maglia di 0,2 µm.

#### HPLC - MS

La procedura di analisi strumentale è stata del tutto simile a quella impiegata per le matrici liquide analizzate in precedenza (acque sperimentali, acque superficiali, acque della rete idrica di

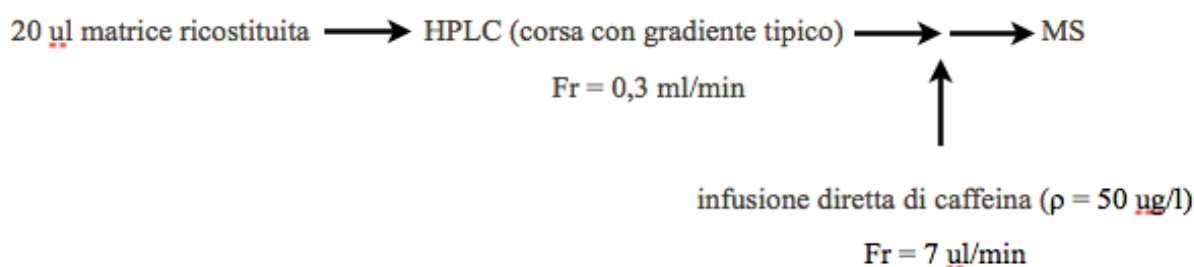


distribuzione ed acque minerali commercializzate, emolinfia di mitilo), con la sola eccezione del gradiente cromatografico messo a punto.

Un notevole effetto matrice di ostacolo alla ionizzazione ha portato a variare le tempistiche proprie delle altre analisi.

La prova sperimentale che ne ha dato una dimostrazione concreta è stata la simultanea introduzione nello spettrometro di massa, con apposito raccordo T, di due flussi: un primo proveniente dalla colonna cromatografica (flusso di 0,3 ml/min), il quale mobilizzava con il gradiente tipico 20 µl di matrice ricostituita nel solvente prescelto, iniettati tramite il loop, ed un secondo rappresentato invece dall'infusione diretta, a valle della colonna, di caffeina disciolta in solvente a concentrazione di 50 µg/l.

Quest'ultima è stata realizzata per mezzo di una siringa HAMILTON® del volume di 250 µl ad una velocità di flusso di 7 µl/min.



La prova, del tutto analoga a quella che aveva consentito di mettere a punto il gradiente tipico usato per la totalità delle altre analisi, ha mostrato come esso fosse caratterizzato da un disturbo massimo nel momento in cui la caffeina viene ionizzata.

Il cromatogramma, il quale in caso di assenza di disturbo dovuto all'effetto matrice, avrebbe dovuto mostrare un andamento rettilineo, presentava invece notevoli abbassamenti, il più significativo dei quali in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'analita.

Altre prove hanno consentito di elaborare un gradiente un poco diverso, in seguito riportato, il quale consente un minore abbattimento del segnale della sostanza.

I solventi impiegati nella cromatografia in fase inversa (fase acquosa e fase organica) sono invece i medesimi:

A: H<sub>2</sub>O MQ + 0,1 % HCOOH

B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 % HCOOH

0 - 6 min : 5 % B

6 - 18 min : 5 % → 48 % B

18 - 18,5 min : 48 % → 85 % B

18,5 - 23,5 min : 85 % B

23,5 - 24 min : 85 % → 5 % B

24 - 28 min : 5 % B

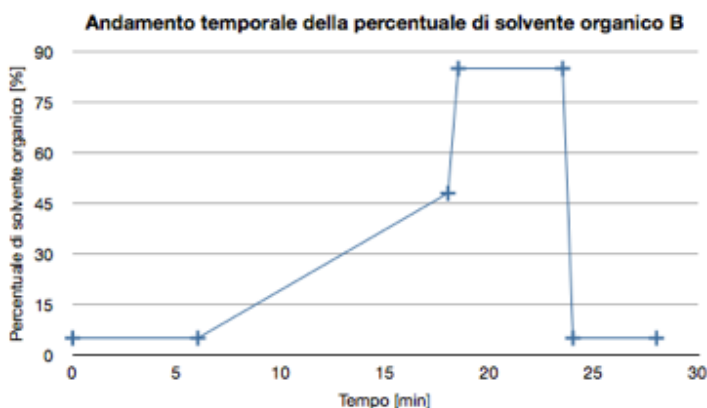


fig. 3.20: gradiente temporale di composizione della fase mobile.

All'ottima efficacia nel consentire la fuoriuscita dalla colonna degli interferenti polari nei primissimi minuti della corsa cromatografica, un tale gradiente fa in modo che le molecole di caffeina giungano allo ionizzatore con meno molecole collaterali che potrebbero arrecare disturbo. La percentuale di solvente organico passa da bassi a medi valori (dal 5 al 48 %) nell'arco di 12 minuti e non di soli 30 secondi, distribuendo l'arrivo delle molecole allo spettrometro di massa su di un arco temporale molto più lungo (se la totalità delle molecole eluite dalla colonna con percentuali di solvente dal 5 al 48 % giungevano in un arco di 30 secondi, ora lo fanno in 12 minuti).

Per ciò che concerne la spettrometria di massa invece tutto (voltage, temperature di esercizio e flussi di gas) è stato lasciato invariato rispetto alle analisi condotte in precedenza.

### 3.6) PRESENTAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI

#### CALIBRAZIONE DELLO STRUMENTO CON ANALITA E STANDARD INTERNO

Prima di riportare i risultati ottenuti, ovvero i valori di concentrazione di caffeina relativi all'esperimento in vasca, alle acque prelevate dai siti di campionamento ambientale ed all'emolinf e tessuto dei mitili esposti a concentrazioni diverse della sostanza in esame, è doveroso sottolineare

come il segnale dello strumento fornito dai cromatogrammi sia stato convertito in valore numerico corrispondente ad una concentrazione mediante opportuna calibrazione lineare.

In particolare è stata determinata la corrispondenza biunivoca presente tra le aree dei picchi cromatografici (integrazione eseguita automaticamente dal software in dotazione MassLynx) e le concentrazioni di calibrazione note introdotte in HPLC - MS.

La linearità nella variazione del segnale è stata riscontrata per l'intera estensione del range di concentrazioni entro il quale sarebbero ricadute quelle dei campioni analizzati (con la sola eccezione delle acque in ingresso al depuratore, per le quali è stata operata una estrapolazione).

Si è scelto di effettuare una calibrazione con standard interno (caffeinea <sup>13</sup>C - CAFFEINE TRIMETHYL-13C3, 99% 100 UG/ML IN METHANOL - CLM-514-1.2) presente in ogni campione a concentrazione costante di 50 µg/l, mentre le concentrazioni di caffeina (Sigma - Aldrich C53 ALDRICH Caffeine 99%) scelte sono state: 1 - 3,16 - 10 - 31,6 - 100 - 316 [µg/l] , rispettivamente  $10^0$  -  $10^{0,5}$  -  $10^1$  -  $10^{1,5}$  -  $10^2$  -  $10^{2,5}$  .

Si è proceduto in doppio (n = 2), ovvero per ogni concentrazione testata sono state fatte due letture strumentali nel corso delle quali si sono registrati i valori delle aree dei picchi relativi alla caffeina, allo standard interno e se ne è fatto il rapporto.

La quantificazione è stata poi realizzata utilizzando la retta di calibrazione costruita considerando la variazione del rapporto tra le aree del segnale relativo alla caffeina e quello relativo allo standard interno ( $Y_a / Y_{si}$ ) al variare della concentrazione di analita e mantenendo costante la concentrazione di standard interno.

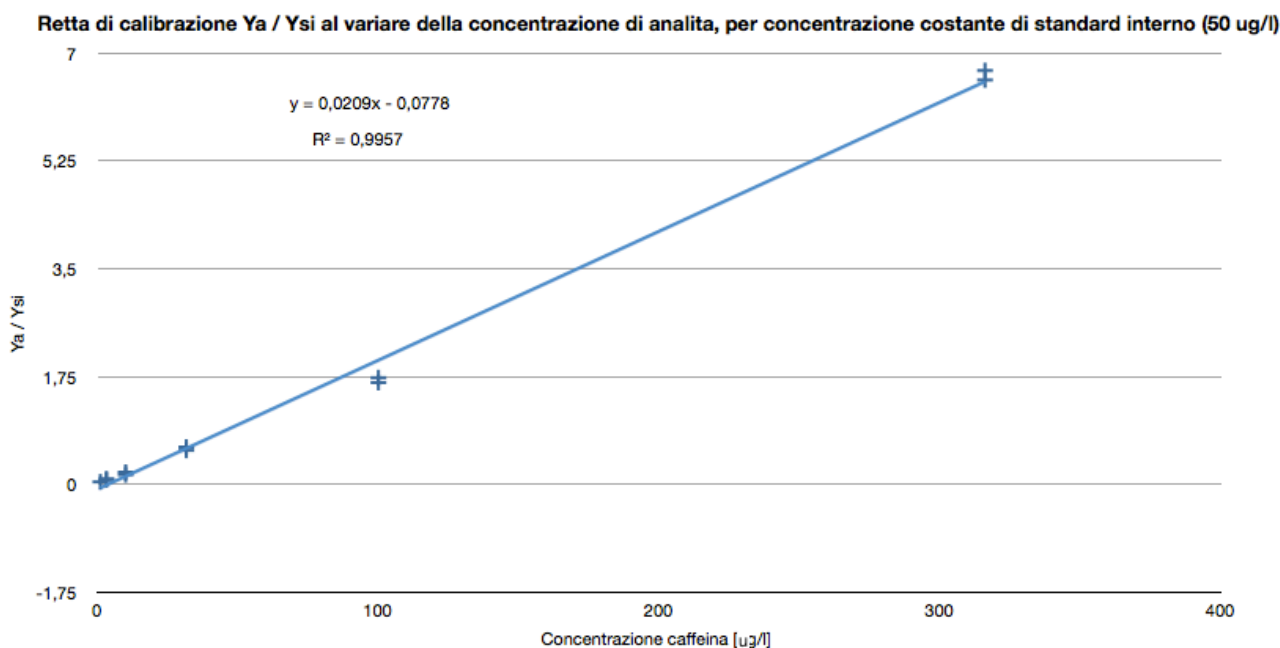


fig. 3.21: retta di calibrazione costruita con il metodo dei minimi quadrati OLS considerando il rapporto tra il segnale dell'analita e quello dello standard interno (si noti che il rapporto è unitario per concentrazioni di analita vicine a 50  $\mu\text{g/l}$  - questo poichè lo strumento rileva in modo pressochè identico la caffeina e la sua forma isotopica).

Tale calibrazione si basa sul presupposto che il comportamento della sostanza in esame e della sua forma isotopica, lo standard interno, sia in tutto e per tutto uguale (stesse perdite che inficiano il recupero iniziale, stessa affinità per i solventi, per le cartucce di estrazione, per le condizioni cromatografiche e stesso effetto matrice ad ostacolarne la ionizzazione) dalle fasi iniziali a quelle finali.

Questo è reso possibile dal fatto che le due molecole sono del tutto identiche, ad eccezione di 3 atomi di  $^{13}\text{C}$  al posto di  $^{12}\text{C}$ .

La retta costruita considerando il rapporto tra i due segnali non consente di quantificare l'efficienza totale del processo, ovvero le perdite di sostanza e la quota parte non letta dallo strumento per interferenze con la matrice; a tale scopo sono state costruite anche altre due rette di calibrazione, la prima mediante la corrispondenza biunivoca tra le aree dei picchi cromatografici relativi a varie concentrazioni di caffeina e le concentrazioni stesse (1 - 3,16 - 10 - 31,6 - 100 - 316 [ $\mu\text{g/l}$ ]), mentre la seconda sfruttando la corrispondenza biunivoca tra le aree dei picchi propri di due diverse concentrazioni di standard interno e le concentrazioni stesse (0 - 50 [ $\mu\text{g/l}$ ]).

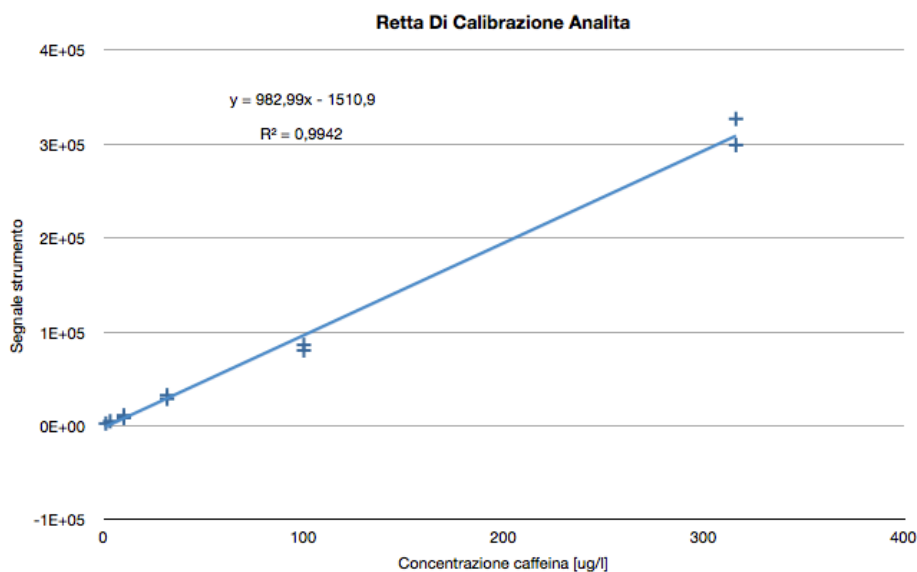


fig. 3.22: retta di calibrazione della caffeina costruita con il metodo dei minimi quadrati OLS.

Questa relazione è stata utilizzata nel corso dell'analisi HPLC - MS di campioni in ASW al fine di quantificare il *recupero* proprio della procedura analitica (rapporto tra il segnale dello strumento relativo a campione con aggiunta di quantità di caffeina nota *a priori*, prima di qualsiasi operazione, e campione con aggiunta della medesima quantità *a posteriori*, prima dell'iniezione in HPLC - MS e quindi senza alcun tipo di perdita) e *l'effetto matrice* di ostacolo alla ionizzazione in MS (rapporto tra il segnale dello strumento relativo al campione con aggiunta *a posteriori* ed il valore corrispondente alla medesima concentrazione estrapolato dalla retta di calibrazione).

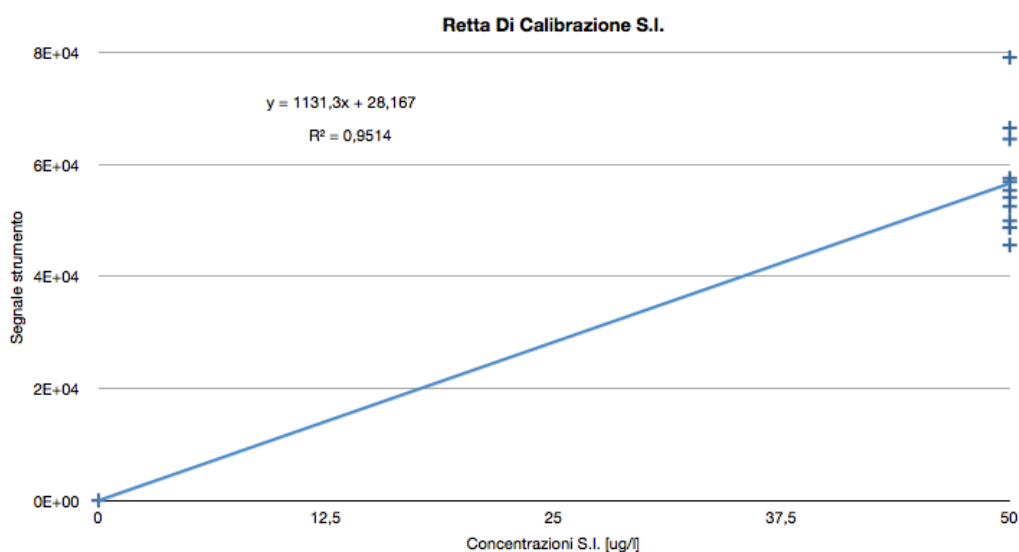


fig. 3.23: retta di calibrazione dello standard interno costruita con il metodo dei minimi quadrati OLS.

Quest'ultima relazione è stata invece impiegata per la determinazione dell'efficienza totale del processo durante l'analisi di ogni singolo campione; a tale scopo il segnale dello strumento relativo allo standard interno, presente nella totalità dei campioni alla stessa concentrazione, è stato rapportato a quello estrapolato dalla retta di calibrazione, consentendo di appurare le perdite e l'effetto matrice.

Come si nota, tutte le rette sono caratterizzate da elevati coefficienti di determinazione  $R^2$ , compresi tra 0,9514 e 0,9957, indicando un'ottima correlazione tra segnale e concentrazione.

Per ciò che concerne il LOD (limite di rivelabilità) ed il LOQ (limite di quantificazione) della caffeina, ovvero rispettivamente la minima quantità di analita ad originare un segnale significativamente diverso da quello del bianco (solvente senza analita) e la minima quantità per la quale è possibile effettuare una quantificazione, si è presa in considerazione la retta di calibrazione costruita per la caffeina e si è ipotizzata una distribuzione gaussiana dei segnali propri di ciascuna concentrazione.

Considerando i segnali dello strumento associati al bianco, i quali, a differenza di ciò che ci si potrebbe aspettare, non sono mai coincidenti con lo zero, se ne è fatta la media e si è addizionato un valore pari a 3 deviazioni standard e pari a 10 deviazioni standard per ottenere rispettivamente i segnali del LOD e del LOQ.

Questo indica, secondo la teoria gaussiana, che il LOD è la concentrazione di sostanza associata ad un segnale il quale ha una probabilità dello 0,15 % di essere generato da un'iniezione di bianco, mentre il LOQ è una concentrazione associata ad un segnale con una probabilità infinitesimale di essere generato dal bianco (per una spiegazione più esaustiva si rimanda al capitolo secondo).

In seguito le concentrazioni sono state determinate facendo uso della retta di calibrazione poc'anzi riportata.

$$\begin{array}{lcl} Y_{LOD} = \bar{Y}_B + 3 \sigma_B & \longrightarrow & X_{LOD} = (Y_{LOD} - q) / m \\ Y_{LOQ} = \bar{Y}_B + 10 \sigma_B & \longrightarrow & X_{LOQ} = (Y_{LOQ} - q) / m \end{array}$$

(dove  $Y_b$  è la media dei segnali relativi al bianco,  $\sigma_b$  la deviazione standard dei medesimi,  $m$  è il coefficiente angolare della relazione tra i segnali relativi all'analita e le concentrazioni relative e  $q$  l'intercetta nell'asse  $y$  di tale relazione).

$$LOD = 2,23 \mu\text{g/l} - LOQ = 2,42 \mu\text{g/l}$$

Per nessuno dei campioni per i quali è stato riportato un dato numerico si sono ottenuti segnali dello strumento inferiori a quelli tipici del limite di rivelabilità e di quantificazione.

VALUTAZIONE DI RECUPERO ED EFFETTO MATRICE IN ASW (ARTIFICIAL SEAWATER)  
E RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI DI ACQUE DI RUBINETTO E  
COMMERCIALIZZATE

Come anticipato, sono stati preparati tre campioni in acqua di mare artificiale allo scopo di quantificare il recupero medio della sostanza ottenuto tramite la procedura sperimentale e l'effetto matrice associato ad acqua di mare.

Il primo di essi consisteva in un bianco sperimentale, finalizzato ad appurare l'eventuale presenza di caffeina in acqua di mare artificiale tal quale (acqua deionizzata ottenuta dal macchinario di laboratorio con aggiunta di sali marini " Instant Ocean<sup>®</sup> "); a questo campione è stata addizionata anche caffeina in forma isotopica per ottenere una quantificazione precisa della sostanza.

Al secondo campione sono stati invece addizionati 100 ng/l di caffeina standard a priori (Sigma - Aldrich C53 ALDRICH Caffeine 99%), in modo da ottenere una concentrazione finale di 50 µg/l e valutare efficienza totale del processo e perdite di analita durante la procedura, mentre all'ultimo campione sono stati addizionati 50 µg/l a posteriori, scongiurando qualsiasi perdita di sostanza in modo da valutare il solo effetto matrice.

I campioni sono stati analizzati in triplicato strumentale, ovvero 3 letture per ciascun campione processato.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti:

ASW (bianco procedurale) -  $\rho_{caf}$  : 53,45 ± 2,19 ng/l (nel campione di partenza non concentrato)

ASW + 50 µg/l (a priori) -  $\rho_{caf}$  : 31,21 ± 3,95 µg/l (valore proprio del campione concentrato  
500 volte al quale è stato sottratto il  
contributo del livello di fondo)

ASW + 50 µg/l (a posteriori) -  $\rho_{caf}$  : 34,72 ± 3,60 µg/l (valore proprio del campione concentrato  
500 volte al quale è stato sottratto il  
contributo del livello di fondo)

tab. 3.1: valori relativi alla determinazione di recupero ed effetto matrice in campioni di acqua di mare artificiale.

Rispetto al valore di 50 µg/l che si sarebbe dovuto ottenere dall'analisi strumentale in condizioni ottimali si sono letti valori tali da avere:

ETP - efficienza totale del processo (rapporto tra la quantità rilevata dallo strumento processando il campione con aggiunta a priori e quella effettivamente addizionata)

$$= 31,21 / 50 * 100 = 62,42 \%$$

EM - effetto matrice (rapporto tra la quantità rilevata dallo strumento processando il campione con aggiunta a posteriori e quella effettivamente addizionata)

$$= 34,72 / 50 * 100 = 69,44 \%$$

REC - recupero (rapporto tra la quantità rilevata dallo strumento processando il campione con aggiunta a priori e quella rilevata processando il campione con aggiunta a posteriori)

$$= 31,21 / 34,72 * 100 = 89,89 \%$$

Da sottolineare come l'effetto matrice causato da molecole interferenti presenti nei campioni possa essere ritenuto pressochè identico per ogni campione nella matrice considerata (benchè per campioni ambientali in acque nere e di corsi d'acqua superficiali sia in realtà molto superiore); questo a differenza del recupero e dell'efficienza totale del processo, i quali non possono assumere un valore costante caratteristico della procedura, in quanto ogni processamento sperimentale ha storia a sè stante e presenta perdite diverse da ogni altro dovute alle operazioni materiali compiute dall'operatore.

La determinazione di quantitativi di caffeina presenti in ASW realizzata con aggiunta di sali marini ad acqua di rubinetto deionizzata ha fatto sorgere numerosi interrogativi, tra i quali alcuni legati all'effettiva presenza di essa in acque della rete idrica di distribuzione acquedottistica ed in acque minerali in commercio.

In seguito si sono quindi analizzate acque di rubinetto, acque di rubinetto deionizzate ed un'acqua minerale naturale in commercio, ricavando i seguenti risultati.

H <sub>2</sub> O RUBINETTO :	105,14 ± 0,26 ng/l
H <sub>2</sub> O RUBINETTO DEIONIZZATA :	42,65 ± 0,01 ng/l
H <sub>2</sub> O MINERALE NATURALE COMMERCIALIZZATA :	17,86 ± 0,25 ng/l

tab. 3.2: concentrazioni di caffeina in acque della rete idrica di distribuzione e acque minerali commercializzate.



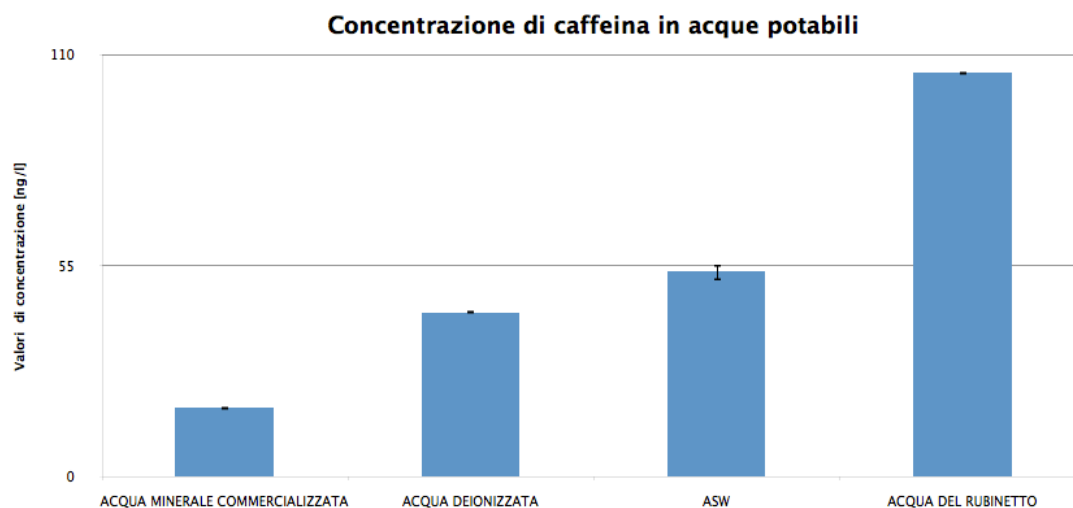


fig. 3.24: concentrazione di caffeina rilevata in acqua minerale commercializzata ed in acque della rete idrica di distribuzione tal quali, deionizzate e con aggiunta di sali marini (le deviazioni standard riportate sono riferite al triplicato strumentale).

## RISULTATI RELATIVI ALL'ESPERIMENTO CONDOTTO IN LABORATORIO

Si ricorda che l'esperimento realizzato presso il laboratorio EPB ha avuto una durata complessiva di 8 giorni ed ha previsto per ciascuna vasca il cambio di acqua ed il reintegro delle concentrazioni desiderate di caffeina ogni 48 ore (4 cambi di acqua e reintegri in totale).

Le 8 vasche sono state divise in 2 serie (SERIE A e SERIE B) - duplicato sperimentale - ciascuna caratterizzata da 4 diverse concentrazioni alle quali i mitili erano esposti (controllo, aggiunta di 5 ng/l, aggiunta di 50 ng/l, aggiunta di 500 ng/l).

I campioni di acqua analizzati sono relativi ad entrambe le serie ed al primo e ultimo cambio di acqua e reintegro di caffeina, rispettivamente a 1 ora e 24 ore dall'intervento ( $4 \rho * 4 t * 2 = 32$  campioni totali).

Ogni campione è stato analizzato in triplicato strumentale ( $n = 3$ ), ovvero un'unico processamento seguito da 3 letture successive da parte dello strumento HPLC - MS; la replicabilità in questo modo verificata, la quale tiene conto della variabilità strumentale, è ottima, in quanto i valori di RSD ( $RSD = \sigma / X_m$ ) sono tutti compresi tra 0,03 % e 21,23 % , con valori medi rispettivamente di 4,57 % e 4,51 % per l'analita e lo standard.

Per ciò che concerne invece l'efficienza totale del processo, data dal rapporto tra il segnale relativo allo standard interno effettivamente ottenuto e quello che ci si attenderebbe in caso di perdite nulle e

ionizzazione completa, essa si attesta su valori compresi tra 23,71 % e 70,23 %, con un valore medio di 48,66 %.

In seguito ad avere ottenuto i dati in duplicato sperimentale (SERIE A e SERIE B), per ciascuna condizione sperimentale (1\_1h, 1\_24h, 4\_1h, 4\_24h) sono stati calcolati i valori medi e le deviazioni standard, statistiche, queste ultime, che tengono conto della totalità di errori presenti (variabilità biologica dovuta alla presenza dei mitili, nelle concentrazioni predisposte, nel campionamento, procedurale e strumentale) riportate nell'istogramma di seguito.

	<i>controllo</i>	<i>5 ng/l</i>	<i>50 ng/l</i>	<i>500 ng/l</i>
1_1H	98,74 ± 16,79	123,75 ± 23,86	162,89 ± 23,26	457,18 ± 159,81
1_24 H	67,23 ± 10,60	76,25 ± 13,47	131,01 ± 12,10	428,02 ± 177,23
VALORI MEDI [ng/l]				
4_1H	42,93 ± 9,77	51,13 ± 7,64	93,87 ± 6,18	474,18 ± 39,41
4_24 H	33,72 ± 5,85	45,61 ± 3,10	60,56 ± 3,14	373,98 ± 16,96

tab. 3.3: concentrazioni di caffeina relative alle acque sperimentali di esposizione dei mitili (media tra le due serie).

	<i>controllo</i>	<i>5 ng/l</i>	<i>50 ng/l</i>	<i>500 ng/l</i>
1_1H	17,00	19,28	14,28	46,33
1_24 H	15,77	17,67	9,24	41,41
SPERIMENTAL RSD [%]				
4_1H	22,76	14,95	6,58	8,31
4_24 H	17,36	6,81	5,18	4,53

tab. 3.4: valori di RSD tra le due serie (A e B) di vasche di esposizione dei mitili .

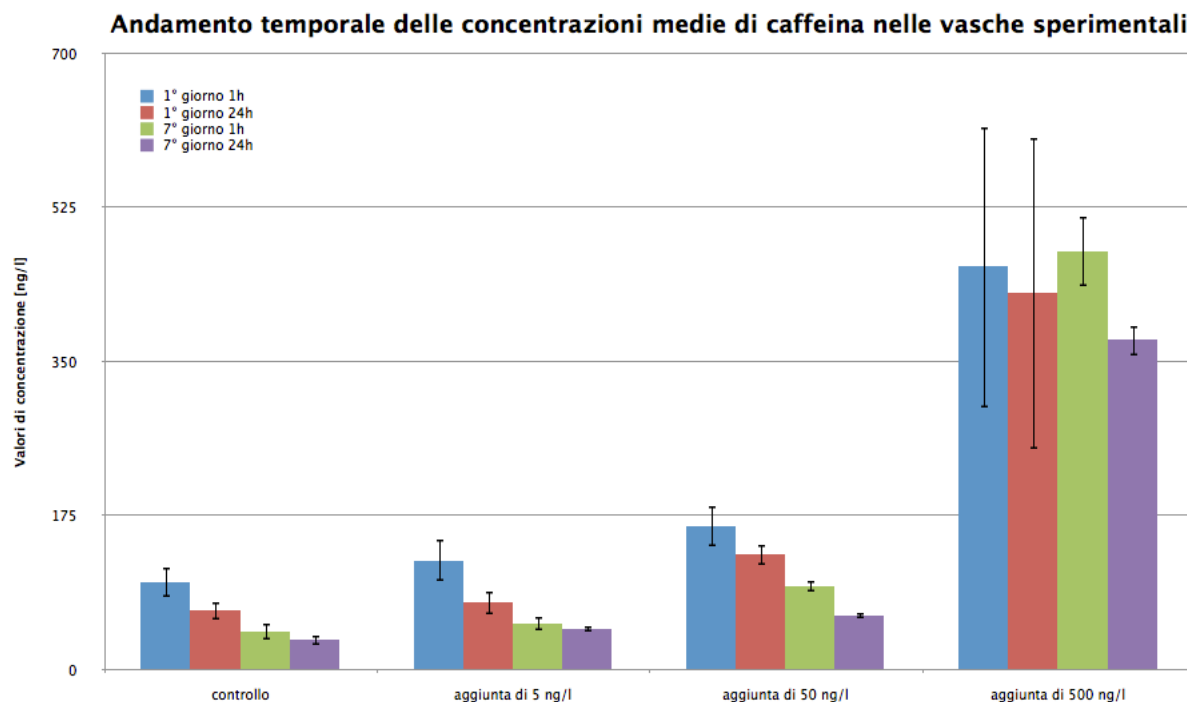


fig. 3.25: andamento temporale delle concentrazioni di caffeina nelle vasche - media tra le due serie (vengono riportate anche le deviazioni standard relative alla eterogeneità tra le due serie).

Nel successivo paragrafo si darà un'interpretazione di tali risultati e degli andamenti temporali evidenziati.

## RISULTATI RELATIVI AI SITI DI CAMPIONAMENTO AMBIENTALE

Per ciascuno dei cinque siti di campionamento ambientale (ingresso dell'impianto di depurazione di Cervia, uscita dell'impianto, canale di bonifica Cupa presso circolo Ippico " Le Siepi ", canale di bonifica Cupa in corrispondenza della pineta di Cervia e sbocco in mare del medesimo) sono stati prelevati tre campioni di acqua, ciascuno dei quali processato ed in seguito letto dallo strumento per tre volte consecutive.

In questo caso dunque, relativamente alla procedura di preparazione del campione, al duplicato sperimentale proprio dell'esperimento in acquario è stato preferito un triplicato sperimentale, il quale, al solito racchiude in sé la variabilità propria del campionamento, della procedura di preparazione del campione e dell'analisi strumentale, mentre, relativamente all'analisi HPLC - MS, si è ancora una volta effettuato un triplicato strumentale (triplice analisi per ciascun campione processato).

Anche in questo caso sono stati ottenuti valori estremamente soddisfacenti in merito alla ripetibilità

strumentale HPLC - MS, dal momento che le RSD relative alle tre letture sono per ciascun campione comprese tra 1,34 % e 17,28 % , con valori medi di 6,05 % e 5,15 % rispettivamente per l'analita e per lo standard interno.

Come ci si attendeva, l'efficienza totale del processo (ETP) in questo caso si è rivelata alquanto minore rispetto alle acque dell'esperimento in vasca; questo a causa di una matrice sostanzialmente più complessa, in particolare nel caso di acqua in ingresso all'impianto di trattamento reflui, la quale ha ostacolato una ionizzazione soddisfacente della specie indagata.

Si sono ottenuti valori compresi tra 7,09 % e 50,77 % , con valori medi di 11,56 % (ingresso impianto), 23,22 % (uscita impianto), 27,76 % (canale cupa - le siepi), 25,84 % (canale cupa - pineta) e 42,78 % (canale cupa - sbocco mare).

Di seguito si riportano i valori medi e le RSD sperimentali calcolati per ciascun sito e due grafici in grado di evidenziare l'andamento spaziale delle concentrazioni di caffeina dall'ingresso all'impianto di depurazione allo sbocco in mare.

	VALORE MEDIO [ng/l]
INGRESSO DEPURATORE	10688,10 ± 1214,66
USCITA DEPURATORE	114,34 ± 7,54
CANALE DI BONIFICA - LE SIEPI	103,51 ± 17,55
CANALE DI BONIFICA - PINETA	148,45 ± 3,28
CANALE DI BONIFICA - SBOCCO MARE	128,41 ± 33,34

tab. 3.5: concentrazioni di caffeina relative alle acque del campionamento ambientale (media tra le repliche).

	SPERIMENTAL RSD [%]
INGRESSO DEPURATORE	11,36
USCITA DEPURATORE	6,60
CANALE DI BONIFICA - LE SIEPI	16,96
CANALE DI BONIFICA - PINETA	2,21
CANALE DI BONIFICA - SBOCCO MARE	25,97

tab. 3.6: valori di RSD tra le repliche per ciascun sito del campionamento ambientale.

a



b

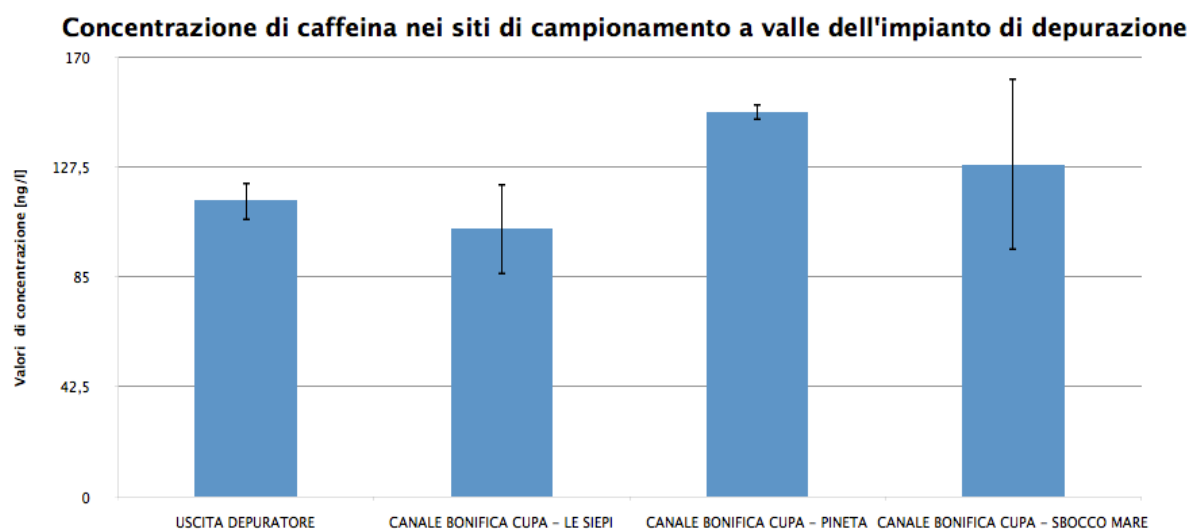


fig. 3.26 a + b: valori medi di concentrazione di caffeina nei siti di campionamento ambientale (a) e nei soli siti posti a valle dell'impianto di depurazione (b); sono riportate anche le rispettive deviazioni standard.

## RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI DI EMOLINFA

L'emolinfà prelevata al termine dell'esperimento condotto in laboratorio a ciascuno dei 48 mitili suddivisi nelle otto vasche ( $4 \rho * 2$ ) è stata in seguito raggruppata in 8 diversi pool, dai quali sono stati ottenuti i campioni analizzati.

Ad un duplicato sperimentale (SERIE A e SERIE B), il cui significato statistico è analogo all'analisi relativa alle acque di vasca, ha fatto seguito una duplice analisi HPLC - MS per ciascun campione, ovvero un duplicato strumentale.

In questo caso i valori provenienti dalla duplice analisi si sono rivelati più variabili, con RSD comprese tra 2,35 % e 43,44 % e valori medi di 21,35 % e 25,64 % per caffeina e caffeina isotopica; questo a discapito della replicabilità strumentale.

Anche in questo caso, come ci si aspettava, l'efficienza totale del processo si è attestata su valori inferiori rispetto alle acque campionate in vasca, con valori di ETP compresi tra 10,14 % e 23,96 % e valore medio pari a 14,15 %.

Mediando i valori relativi a ciascuna serie e calcolandone la RSD si ottiene quanti riportato di seguito:

	<i>controllo</i>	<i>5 ng/l</i>	<i>50 ng/l</i>	<i>500 ng/l</i>
VALORE MEDIO [ng/l]	920,60 ± 500,03	642,93 ± 83,25	1606,29 ± 1599,55	2076,76 ± 415,55
RSD [%]	54,31	12,95	99,58	20,01

tab. 3.7: concentrazioni di caffeina determinate nell'emolinfa dei mitili esposti alle differenti condizioni (media tra le due serie) e RSD del duplicato sperimentale.

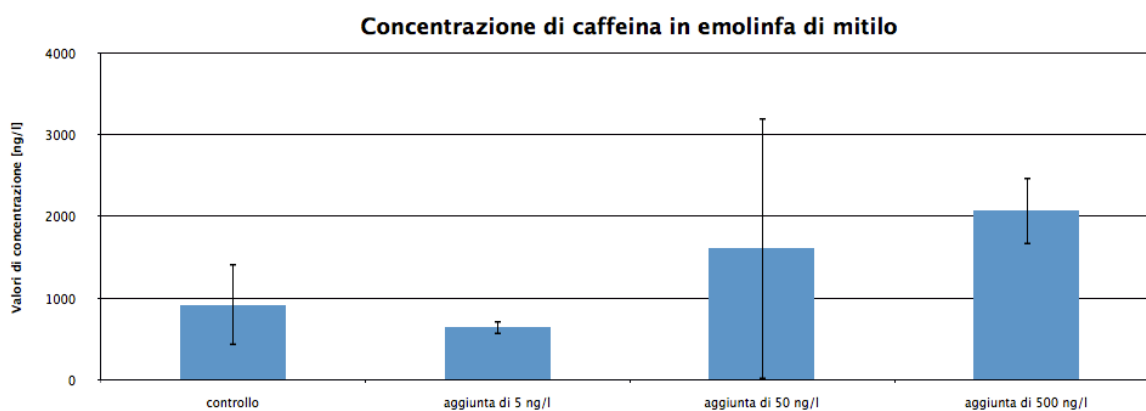


fig. 3.27: concentrazione di caffeina rilevata nell'emolinfa dei mitili esposti alle diverse concentrazioni di caffeina; sono riportate anche le rispettive deviazioni standard.

## RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI DI TESSUTO

Il tessuto prelevato dagli organismi al termine della procedura sperimentale è stato raggruppato in 16 distinti pool, 2 per ciascuna condizione in duplicato ( $4 \rho * 2 * 2$ ), ognuno dei quali rappresentativo di 3 individui.

Anche in questo caso, al pari delle analisi di emolinfa, ad un duplicato sperimentale (SERIE A e SERIE B) ha fatto seguito una duplice analisi HPLC - MS per ciascun campione, ovvero un duplicato strumentale.

Ottimi valori di ripetibilità delle letture sono stati ottenuti dal duplicato strumentale, con RSD comprese tra 0,39 % e 8,09 % e valori medi di 4,49 % e 1,8 % rispettivamente per l'analita e la sua forma isotopica.

Buoni valori, anche se inferiori rispetto a quelli relativi alle acque campionate dall'esperimento, sono stati ottenuti in merito all'efficienza totale del processo; essi sono infatti compresi tra 18,12 % e 36,81 %, con valore medio di 35,26 %.

Mediando i valori relativi a ciascuna serie e calcolandone la RSD si ottiene quanti riportato di seguito:

	<i>controllo</i>	<i>5 ng/l</i>	<i>50 ng/l</i>	<i>500 ng/l</i>
VALORE MEDIO [ng/g]	2,47 ± 0,21	2,50 ± 0,03	2,81 ± 0,35	2,64 ± 0,31
RSD [%]	8,32	1,13	12,58	11,79

tab. 3.8: concentrazioni di caffeina determinate nel tessuto dei mitili esposti alle differenti condizioni (media tra le due serie) e RSD del duplicato sperimentale.

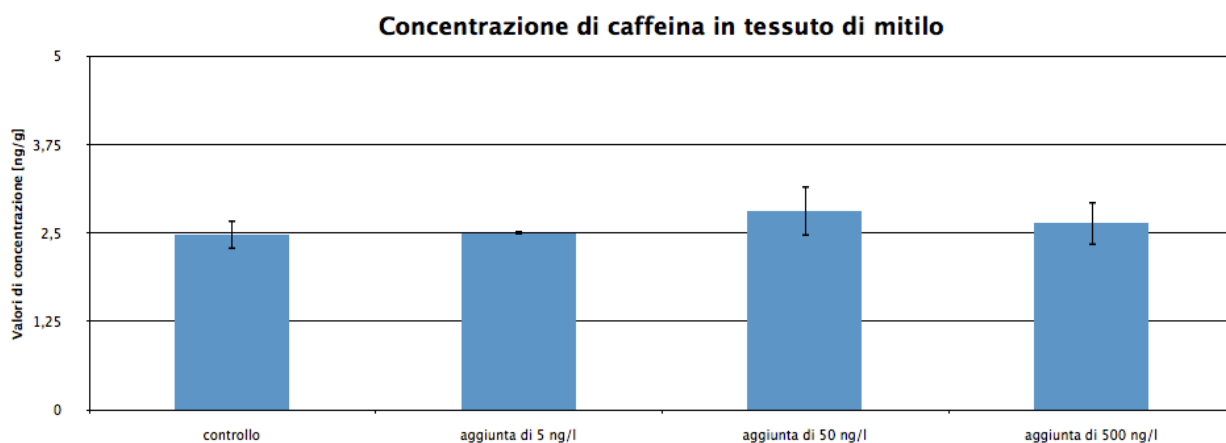


fig. 3.28: concentrazione di caffeina rilevata nel tessuto dei mitili esposti alle diverse concentrazioni di caffeina; sono riportate anche le rispettive deviazioni standard.

### 3.5) INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI OTTENUTI

L'interpretazione dei dati non può prescindere dalla considerazione che ogni campione per il quale è stato riportato un dato numerico risulta essere attendibile, dal momento che, per ciascuno di essi, lo standard interno introdotto all'inizio della procedura sperimentale è stato rivelato dallo strumento in sede di analisi spettrometrica, in quantitativi piuttosto omogenei e tipici per ogni matrice indagata.

Dal momento che la caffeina in forma isotopica  $^{13}\text{C}$  possiede le medesime proprietà fisico-chimiche, affinità per i solventi, per le cartucce di estrazione in fase solida e per le membrane sintetiche dei filtri impiegati, le eventuali ed inevitabili perdite che inficiano il recupero possono essere considerate uguali in percentuale per le due differenti molecole.

Esse possono avvenire a causa di errori di manipolazione da parte dell'operatore, parziale adesione alle pareti dei recipienti, parziale adesione ai filtri, incompleta adesione alla membrana di estrazione, incompleta eluizione o per tendenza ad evaporare sotto flusso di azoto.

Inoltre eventuali problematiche legate alla procedura cromatografica e spettrometrica con incompleto passaggio della sostanza attraverso la colonna o parziale e difficoltosa ionizzazione, ossia problemi di effetto matrice, sono del tutto identiche per caffeina e standard interno.

L'aggiunta della molecola in forma isotopica quindi, oltre a consentire una precisa quantificazione della sostanza indagata, assicura anche una robustezza ed affidabilità dell'intera procedura; ottenere segnali del tutto simili a parità di quantitativo aggiunto in partenza e di matrice indagata corrobora l'analisi.



Bisogna sottolineare anche come l'analisi HPLC - MS si sia rivelata per ciascuna matrice in esame estremamente robusta e replicabile, con letture in triplicato o duplicato del tutto simili per ogni campione; molto maggiori, per quanto non elevatissime, ad eccezione dell'emolinfa di mitilo, si sono rivelate le differenze tra campioni di medesime caratteristiche spazio - temporali o di concentrazione aggiunta, ma appartenenti a serie diverse.

Tale premessa consente al discorso di addentrarsi nella vera e propria interpretazione dei valori ottenuti.

#### VALUTAZIONE DI RECUPERO ED EFFETTO MATRICE IN ASW (ARTIFICIAL SEAWATER) E RISULTATI RELATIVI ALL' ANALISI DI ACQUE DI RUBINETTO E COMMERCIALIZZATE

Le considerazioni che hanno portato a valutare il recupero del processo, l'effetto matrice e l'efficienza totale della procedura tramite campioni realizzati in acqua di mare artificiale sono state molteplici: scopo fondamentale è stato comunque determinare quali fossero i contributi relativi, da un lato, di perdite della sostanza e, dall'altro, di incompleta ionizzazione dovuta all'effetto matrice, nel mancato ottenimento di un dato strumentale corrispondente all'effettiva quantità immessa.

Si è scelto di effettuare le prove in acqua di mare artificiale, ovvero H<sub>2</sub>O deionizzata ottenuta dallo strumento in dotazione nella quale sono stati disciolti sali “ Instant Ocean <sup>®</sup>”, in modo di disporre di un bianco procedurale, ovvero un campione soggetto all'intera procedura analitica per il quale fosse nullo il quantitativo di caffeina aggiunta.

Così facendo, secondo quanto ritenuto prima dell'esperimento, i campioni con aggiunta di caffeina in concentrazione nota *a priori* e *a posteriori* non sarebbero stati influenzati da un livello di fondo naturalmente presente.

Con non poca sorpresa, le analisi strumentali relative al bianco procedurale hanno però evidenziato in esso una concentrazione di caffeina notevole (53,45 ng/l), la quale, se da un lato può sembrare una quantità infinitesimale, dall'altro si discosta radicalmente dallo zero (“ blank is not blank! “).

Questo evidenzia come l'analita oggetto dello studio sia presente in quantitativi non certo trascurabili anche nelle acque potabili della rete idrica locale e come i sistemi di potabilizzazione e il deionizzatore utilizzato in laboratorio non si rivelino in grado di abbatte completamente i livelli.

A conferma di questo si sono sottoposti ad analisi ulteriori tre campioni, due dei quali relativi ad acque di rubinetto della rete idrica locale (uno di acqua tal quale ed uno di acqua deionizzata), mentre uno relativo ad un'acqua minerale naturale commercializzata.

Valori di caffeina notevoli (105,14 ng/l) sono stati rilevati in acqua di rubinetto e valori pressochè analoghi a quelli relativi ad ASW si sono riscontrati per acqua di rubinetto deionizzata (42,65 ng/l).

Sorprendente è stato anche notare la presenza, per il vero a valori alquanto modesti (17,86 ng/l), di un quantitativo di analita anche in un'acqua minerale in commercio.

La sorpresa iniziale ha portato a ricercare in letteratura conferme ed evidenze di quanto riscontrato, rintracciando articoli relativi a studi statunitensi che dimostrano come la caffeina sia presente in acquedotti, pozzi di falda ed acque potabili erogate a concentrazioni del tutto simili a quella determinata ( “ Pharmaceuticals found in Erie’s drinking water ” <sup>58</sup> , studio che evidenzia come oltre a caffeina nelle acque potabili a disposizione delle pubbliche utenze della comunità di Erie fossero presenti anche nicotina, ibuprofene, gemfibrozil e carbamazepina - “ Caffeine and pharmaceuticals as indicators of wastewater contamination in wells “ <sup>59</sup> dello U.S Geological Survey, ricerca che mostra come alcune falde freatiche di Reno dalle quali viene attinta acqua potabile siano caratterizzate, tra l'altro, da alti livelli di caffeina - inoltre una ricerca condotta dall'Associated Press statunitense <sup>60</sup> sottolinea come tracce di caffeina siano state trovate negli acquedotti di 24 aree metropolitane degli U.S.A.).

Per quanto riguarda invece acque minerali in commercio non è stato ancora, a nostra conoscenza, pubblicato niente a tal proposito.

Alla luce di quanto emerso, operativamente, nell'analisi dei campioni con aggiunte artificiali si è dovuta operare una sottrazione del segnale relativo al livello di fondo presente in origine, ovvero del valore medio ricavato dall'analisi di ASW tal quale, operazione formalmente non del tutto corretta, la quale ha richiesto un'approssimazione.

La procedura sperimentale condotta per ciascun campione ha infatti storia a sè stante, con perdite che inficiano il recupero diverse a parità di quantitativo presente in origine, e dunque sottrarre una quantità ricavata dal processamento di un altro campione, affetto da minori o maggiori perdite di analita, non si rivela corretto, benchè i risultati ottenuti possano essere considerati soddisfacenti.

Dal segnale epurato in questo modo della quota parte relativa al valore di fondo, applicando in seguito la retta di calibrazione costruita per l'analita, si sono ottenute le concentrazioni di caffeina relative al campione con aggiunta *a priori*, affetto da perdite procedurali e da effetto matrice, e quelle relative al campione con aggiunta *a posteriori*, affetto da solo effetto matrice.

Confrontando le concentrazioni ottenute con quella effettivamente immessa si è potuta ottenere una quantificazione soddisfacente dell'efficienza totale del processo (rapporto tra concentrazione del campione con aggiunta *a priori* e concentrazione immessa - 62,42 %), dell'effetto matrice (rapporto tra concentrazione del campione con aggiunta *a posteriori* e concentrazione immessa - 69,44 %) e del recupero (rapporto tra concentrazione del campione con aggiunta *a priori* e concentrazione del campione con aggiunta *a posteriori* - 89,89 %).

Da notare come, mentre il valore relativo all'effetto matrice può essere estrapolato e ritenuto valido per ogni campione in matrice analoga all'ASW (ovvero campioni propri dell'esperimento in laboratorio e campioni di acqua di mare), i valori relativi a recupero ed efficienza totale del processo hanno, come si sottolineava, valenza univoca e sono tipici di ciascun campione, poichè le perdite variano da un processamento all'altro; la prova ha comunque evidenziato come la procedura elaborata, qualora venga condotta con meticolosità, consenta di ottenere valori di recupero elevatissimi, perdendo una quantità trascurabile di analita.

## RISULTATI RELATIVI ALL'ESPERIMENTO CONDOTTO IN LABORATORIO

Estremamente interessante è quanto emerso dall'analisi delle acque provenienti dalle vasche relative all'esperimento condotto in laboratorio, il quale prevedeva l'esposizione per una durata complessiva di otto giorni di esemplari di mitilo esposti a differenti concentrazioni di caffeina.

Da sottolineare come risulti possibile notare trend temporali evidenti delle concentrazioni, simili per le due batterie di dati, per quanto esse risultino caratterizzate da una differenza della quale si tratterà.

La prima evidenza apprezzabile risulta essere la discrepanza tra le concentrazioni alle quali si riteneva di avere esposto gli organismi e le effettive concentrazioni delle vasche.

In particolare, dal primo campionamento (1\_1h - vasca di controllo) si è riscontrato un livello di caffeina di fondo presente in acqua di mare <sup>tab 3.3 - fig. 3.25</sup> ( $\approx 100$  ng/l), in linea con i valori riportati dai numerosi articoli esaminati (5 - 71 ng/l nella baia del Massachussets, 140 - 1600 ng/l <sup>18</sup> nel porto di Boston <sup>18</sup>, 10 - 80 ng/l nelle acque di Tromso <sup>36</sup>, etc.).

Le acque utilizzate sono state prelevate da un campionatore automatico al largo di Cesenatico (FC), ad una distanza dalla linea di costa di circa 3 km e dunque non possono essere ritenute acque di mare aperto, ma acque costiere, le quali risentono maggiormente degli apporti antropici provenienti dall'entroterra.

La caffeina è, alla pari di altre sostanze incluse nella categoria dei PPCP's, semi - persistente; il

tasso di immissione risulta essere pari o superiore al tasso di degradazione delle cinetiche tipiche ed a ciò consegue che le matrici ambientali sono caratterizzate dalla presenza di farmaci ambientali in quantitativi più o meno costanti nel tempo.

Il discorso vale in particolar modo per i bacini marini, i quali presentano una stabilità di condizioni fisico - chimiche molto maggiore rispetto a piccoli bacini o corsi d'acqua superficiali, non essendo pressochè influenzati da eventi meteorologici come precipitazioni, ma solamente da variazioni stagionali di lunga durata.

Tornando ai dati sperimentali, il valore riscontrato ha conseguentemente alterato la concentrazione di ciascuna vasca, innalzandone indesideratamente la concentrazione.

Le vasche che maggiormente ne hanno risentito sono quelle con aggiunta nulla (controllo) o con aggiunte modeste di sostanza indagata (5 ng/l - 50 ng/l); le vasche con aggiunte di 500 ng/l si attestavano su valori di concentrazione ben più alti, meno influenzati dai valori di fondo.

Da sottolineare è inoltre come, con lo scorrere del tempo, il contributo del valore di fondo diminuisse notevolmente di entità, anche questo in accordo con dati di letteratura.

Tra un cambio d'acqua e quello successivo le acque di mare non ancora utilizzate erano poste in taniche di materiale plastico, conservate a temperatura ambiente ed esposte a fonti di luce; le molecole di caffeina presenti sono quindi andate incontro a fotodegradazione e degradazione termica con una cinetica di tipo esponenziale ( $y = 88,57 * e^{-0,1319x}$ , dove y è la concentrazione di caffeina nelle vasche di controllo ed x il numero di giorni trascorsi).

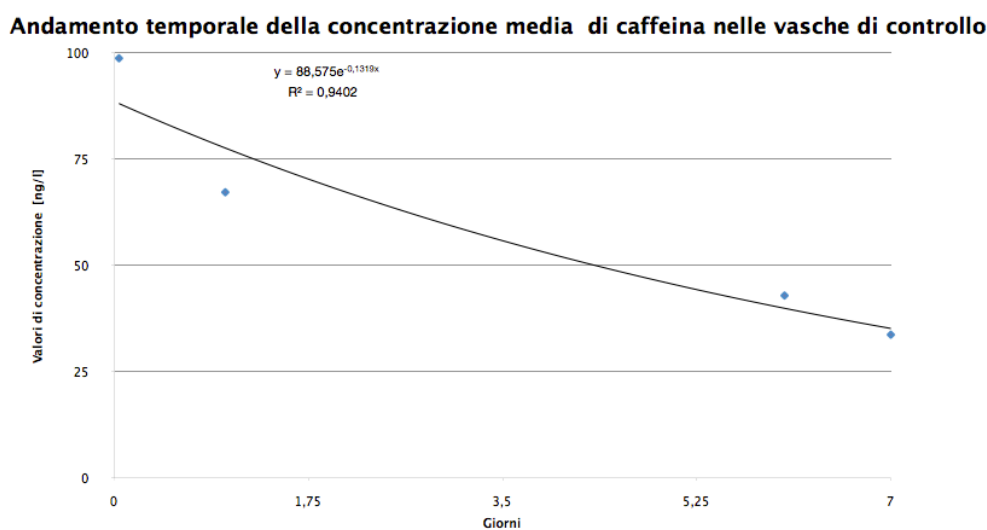


fig. 3.29: andamento temporale della concentrazione di caffeina nelle vasche di controllo (cinetica di degradazione esponenziale - media tra le due serie).

In particolare la velocità di degradazione è risultata alquanto maggiore rispetto a dati di letteratura ( $K = 0,1319 > 0,056$  derivante da uno studio condotto dallo Swiss Federal Research Station <sup>18</sup> per acque dolci ed emivita pari a 5,25 giorni contro i 12 giorni riportati dallo studio sopracitato).

I trend negativi nei valori medi tra le due serie sono riscontrati, oltre che nelle vasche di controllo, anche nelle vasche con aggiunta di 5 e 50 ng/l <sup>tab 3.3 - fig. 3.25</sup>, poichè la quantità aggiunta è modesta rispetto ad un valore di fondo che sfiora i 100 ng/l.

Andamenti negativi molto accentuati, di entità maggiore rispetto alla interpolazione sull'intero periodo, sono evidenti tra 1 h e 24 h dopo il cambio di acqua e l'aggiunta di caffeina; a tale proposito si osservi il grafico <sup>fig. 3.29</sup> notando come i valori relativi ad un'ora dal campionamento siano posti sopra la curva, mentre quelli relativi alle 24 ore successive siano al di sotto, suggerendo un calo evidente nell'arco della giornata successiva al reintegro e aggiunta.

Con ogni probabilità la relazione esponenziale determinata per le vasche di controllo, con una costante cinetica, come si accennava, più alta rispetto a quelle riportate in letteratura, è scindibile in un contributo dato dalle cinetiche di fotodegradazione e termodegradazione, le quali esplicano la loro azione sul lungo periodo nelle taniche in cui l'acqua è conservata, ed in un contributo più accentuato dato dall'attività di filtrazione e conseguente bioaccumulo dei mitili, evidente nell'arco delle 23 ore tra un campionamento e l'altro relativi al medesimo cambio d'acqua e reintegro di caffeina.

Le deviazioni standard misurate <sup>tab. 3.4</sup>, indice di eterogeneità tra le due serie di dati, sono dovute al fatto che i valori della SERIE B risultavano di poco maggiori rispetto a quelli della serie A, in particolare per le vasche di controllo e per quelle con aggiunta di 5 e 50 ng/l.

Si potrebbe ipotizzare una modesta contaminazione nel momento di riempimento delle vasche con concentrazione maggiore, ma l'entità delle RSD (deviazione standard rapportata alla media), al di sotto del 20 % per la quasi totalità dei casi, sottolineano come questa differenza non debba essere ritenuta statisticamente significativa <sup>61</sup>.

Questo ad eccezione del campionamento 4\_1h per le vasche di controllo (RSD pari a 22,76 %) e dei campionamenti relativi al primo cambio di acqua (1\_1h e 1\_24 h) per le vasche con aggiunta di 500 ng/l (RSD pari a 46,33 e 41,41 %); in quest'ultimo caso, la grande differenza tra le due serie sembra derivare dall'aggiunta di una minore quantità di caffeina nelle vasche della SERIE B.

Il fatto che nel quarto cambio di acqua nelle vasche con aggiunta di 500 ng/l la differenza si riporti entro limiti molto più contenuti, indice di aggiunta di una quantità corretta di sostanza, fa propendere per tale ipotesi.

Le vasche con aggiunta di caffeina risentivano quindi degli errori materiali nell'introduzione del corretto quantitativo della sostanza (più grandi, in valore assoluto, nel caso di somministrazione di grandi quantitativi) e dell'incompleto mescolamento della stessa; non sempre le aggiunte sono state infatti di 5, 50 e 500 ng/l oltre la soglia già presente (in molti casi infatti non si sono mai superati i 500 ng/l).

In conclusione, quanto riscontrato dalle analisi delle acque sperimentali può essere così riassunto:

- determinazione di livelli di fondo di caffeina presenti nelle acque di mare con le quali l'esperimento è stato allestito, i quali sfiorano i 100 ppt;
- valutazione di cinetiche di abbattimento della sostanza in esame di tipo esponenziale ma più rapide rispetto ai dati ottenuti da letteratura, si ipotizza per azione filtrante dei mitili;
- osservazione di differenze tra le due serie imputabili ad errori nell'aggiunta di sostanza o ad incompleto mescolamento, comunque contenuti entro margini statistici soddisfacenti<sup>61</sup>;

A conferma di quanto ipotizzato si necessiterebbe di ulteriori indagini sulle cinetiche di decadimento della caffeina in acqua dolce ed in acqua di mare, condotte analizzando agli stessi intervalli di tempo (1, 24, 145 e 168 ore) la concentrazione di sostanza presente in vasche contenenti acqua tal quale senza l'introduzione di mitili e soggette solamente a fotodegradazione e termodegradazione; a questi valori andrebbero poi confrontati quelli a disposizione, relativi alle vasche di controllo in cui erano esposti i mitili in modo da appurare l'effettiva presenza di un contributo all'abbattimento dovuto all'attività di filtrazione dei mitili ed eventuali differenze nelle cinetiche tra acque dolci e salate.

## RISULTATI RELATIVI AI SITI DI CAMPIONAMENTO AMBIENTALE

Osservando i grafici relativi alle concentrazioni medie di caffeina relative ai siti di campionamento ambientale <sup>fig. 3.26 a + b</sup> si nota da subito come i valori relativi all'ingresso all'impianto di depurazione siano elevatissimi rispetto a quelli dei siti posti a valle.

L'entità dei valori numerici propri delle acque nere di collettamento fognario (10688 ng/l) è in realtà in linea con quella dei dati disponibili in letteratura (da 5000 a 300000 ng/l<sup>7-18</sup>), attestandosi anzi su valori particolarmente bassi.

Va specificato che il giorno in cui il campionamento è stato effettuato è risultato caratterizzato da abbondanti precipitazioni e da conseguente diluizione del carico di inquinanti dovuta al contributo di acque meteoriche, le quali sono molto spesso convogliate insieme ai reflui e ai liquami domestici. Questo, secondo le linee guida di trattamento dei reflui, non dovrebbe in realtà avvenire, ma gli impianti fognari sono in numerose realtà inadeguati.

Conseguenza ben più grave è infatti l'impossibilità nei periodi piovosi di trattare la totalità dell'effluente in arrivo, essendo costretti a convogliarne una quota parte non depurata nel corpo idrico recettore.

Nota positiva è invece la capacità di rimozione della caffeina da parte del depuratore di Cervia (RA), la quale, dai dati in possesso, si attesta su valori del 99 %.

Questo è ottenuto grazie ad un trattamento secondario biologico a fanghi attivi, ritenuto da molti studi (si veda il primo capitolo) eccellente nell'abbattere tale sostanza, seguito da una microfiltrazione effettuata con dischi a membrana rotante in materiale sintetico.

I siti di campionamento posti a valle dell'impianto sono caratterizzati da valori medi piuttosto uniformi compresi tra 103,51 e 148,45 ng/l; da notare anche come la deviazione standard relativa RSD tra le repliche sperimentali di ciascun sito sia del tutto soddisfacente, sempre al di sotto del 20 %, fatta eccezione per lo sbocco in mare (RSD pari a 25,97 %) <sup>tab. 3.6</sup>.

Il valore medio più elevato all'interno del canale di bonifica Cupa il quale convoglia, oltre ad acque irrigue provenienti dall'entroterra, le acque in uscita dall'impianto al mare, è stato rilevato in corrispondenza di ristoranti e strutture alberghiere per le quali è ipotizzabile un allacciamento parziale ed incompleto alla rete fognaria, oggetto in passato di proteste da parte di comitati cittadini. La caffeina potrebbe dunque giungere al canale insieme all'ipotetico quantitativo di reflui non correttamente evacuato dalla fognatura.

Per ciò che concerne il punto in cui il canale giunge in mare, punto assimilabile ad un campionamento effettuato in mare, si registrano valori un poco superiori rispetto agli altri punti di campionamento; questo, al di là di ipotetici sversamenti illeciti a monte, è dovuto al fatto che il mare può essere visto come un macrosistema per il quale le caratteristiche fisico - chimiche (temperatura, pH, salinità, concentrazione di inquinanti, carico organico, etc.)

si attestano su valori piuttosto stabili nel corso del tempo, i quali cambiano su orizzonti temporali lunghi, non relazionabili alle dinamiche proprie di repentine precipitazioni meteoriche.

Le fluttuazioni sono dunque meno accentuate e distribuite su tempistiche di maggiore entità.

Nel corso di giorni di pioggia quindi il sistema mare presenta concentrazioni di inquinanti più elevate rispetto ad un sistema molto più dinamico come il canale consortile in questione, il quale

risente invece di una diluizione nelle concentrazioni.

La totalità dei valori numerici ottenuti è comunque in linea con studi di repertorio.

Riassumendo, il campionamento ambientale ha fatto emergere che:

- la concentrazione di caffeina nelle acque in arrivo all'impianto di depurazione risulta essere un centinaio di volte superiore a quella propria dei punti a valle, benchè si attestino su valori piuttosto bassi, specie per una località turistica nel periodo di massima affluenza, si ipotizza a causa della piovosità notevole del periodo;
- ottimi rendimenti di abbattimento dell'impianto di depurazione nei confronti della caffeina ( $\approx 99\%$ );
- le concentrazioni di caffeina a valle del depuratore sono del tutto uniformi, fatta eccezione per un sito di campionamento nei pressi di strutture alberghiere e ristoranti, per il quale si ipotizza una quota parte di reflui non correttamente convogliati in fognatura;
- il sistema mare, dotato di una stabilità molto maggiore rispetto a corsi idrici dinamici presenta, nei giorni di pioggia una variazione molto più modesta nelle concentrazioni di inquinanti presenti.

A conferma di quanto ipotizzato si necessiterebbe di ulteriori campionamenti effettuati in giornate soleggiate ed in periodi diversi rispetto a quello estivo, coincidente con il maggiore afflusso turistico nella località balneare nel corso dell'anno, in modo da registrare eventuali differenze.

## RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI DI EMOLINFA

L'analisi relativa alla presenza di caffeina in emolinfa di mitilo è quella che si è rivelata affetta da maggiori incertezze; come sottolineato, il fatto che lo standard interno immesso si comportasse però in maniera omogenea tra i vari campioni analizzati ha fatto sì che i dati ottenuti siano considerati attendibili e robusti.

La totalità dei pool di emolinfa analizzati ha rilevato la chiara presenza di caffeina in concentrazioni notevoli (da 475,24 a 2737,34 ng/l) <sup>tab. 3.7 - fig. 3.27</sup>, ma grandi interrogativi emergono dal fatto che in molti casi la concentrazione rilevata all'interno della matrice biologica non si è rivelata chiaramente correlata alla concentrazione alla quale gli organismi erano esposti; se da un lato, considerando i



valori medi tra le due serie si può scorgere un trend piuttosto evidente, d'altro canto la differenza tra di esse è troppo elevata <sup>tab. 3.7</sup> per considerare i dati soddisfacenti dal punto di vista statistico <sup>61</sup>.

In particolare la variabilità tra le due serie risulta essere accettabile <sup>61</sup> solo per gli esemplari esposti a 5 e a 500 ng/l, anche se la variabilità biologica propria di ciascun individuo in parte giustifica ed attenua l'eterogeneità emersa.

Inoltre i valori più elevati non sono stati ottenuti analizzando tessuto di organismi esposti alle concentrazioni più elevate ed i valori più bassi non erano quelli dei mitili nelle vasche di controllo.

Si può solo affermare che esiste un meccanismo di bioaccumulo ( $V_{\text{uptake}} > V_{\text{escrezione}}$ ) per il quale si ipotizza un collegamento alle elevate velocità di abbattimento della sostanza nelle acque di vasca, ma questo non può essere quantificato e correlato con chiarezza alla concentrazione della matrice di residenza, nè tantomeno si è in grado di calcolare un  $BCF = C_{\text{organismo}} / C_{\text{matrice ambientale}}$ .

Riassumendo:

- esiste un chiaro meccanismo di bioaccumulo di caffeina nell'emolinfa di mitilo, per il quale si ipotizza un legame con le notevoli cinetiche di abbattimento nella concentrazione di caffeina presente nelle vasche sperimentali;

- non vi sono elementi che consentano di correlare tale bioaccumulo alla concentrazione propria dell'ambiente circostante o di calcolare un fattore di bioconcentrazione, in quanto la variabilità riscontrata tra le serie non è statisticamente accettabile <sup>61</sup>.

A suggello di quanto detto occorrerebbe effettuare ulteriori indagini su questa matrice, eventualmente su esemplari prelevati da ambiente marino e analizzati contestualmente, senza esposizioni a varie concentrazioni.

## RISULTATI RELATIVI ALL'ANALISI DI TESSUTO

Risultati alquanto positivi sono stati ottenuti dalle analisi relative alla presenza di caffeina in tessuto di mitilo; in particolare la procedura sperimentale seguita da analisi HPLC - MS ha consentito di determinare in ciascuno dei pool esaminati l'inequivocabile presenza dell'analita a valori ben superiori rispetto al limite di quantificazione (LOQ), segno evidente di bioconcentrazione.

Interrogativi emergono però dal fatto che i valori rilevati sono estremamente simili per ciascuna delle condizioni sperimentali, evidenziando solo una modesta correlazione con le concentrazioni di esposizione degli organismi.

In questo caso però la differenza tra le due serie sperimentali <sup>tab. 3.8</sup> è del tutto contenuta entro limiti di accettabilità statistica <sup>61</sup> (RSD sempre inferiore al 20 %), a vantaggio della robustezza della procedura elaborata.

Da sottolineare come i dati riportati <sup>tab. 3.8</sup> siano espressi in massa dell'analita rapportata a peso fresco del tessuto indagato, risultando quindi affetti dall'eventuale differente contenuto di acqua nei vari campioni ed attestandosi su valori assai più bassi a quelli relativi al peso secco.

La grande omogeneità dei valori riscontrati fa ipotizzare che ai fini del bioaccumulo in matrice solida, nella fattispecie tessuto, sia stato maggiore il contributo proprio del lungo tempo trascorso dagli organismi in ambiente acquatico (nel quale, come dimostrato dalle analisi su acqua di mare la concentrazione di caffeina è assai elevata) rispetto a quello dell'esposizione in laboratorio alle varie concentrazioni di sostanza.

D'altro canto è noto come le tempistiche necessarie all'immagazzinamento di una molecola in matrice solida (pelle, massa lipidica, organi) sono diverse rispetto a quelle tipiche di un tessuto di trasporto come il sangue, all'interno del quale le sostanze entrano in circolo in poche ore, rispondendo quindi in maniera assai più dinamica alle variazioni indotte dalle diverse condizioni di uptake (ingestione, inalazione, contatto dermico).

Un altro interrogativo deriva dal fatto che la bioconcentrazione nei tessuti è tipica di sostanze lipofile, a basso livello di polarità, a differenza della molecola in questione.

L'analisi non è purtroppo in grado di dimostrare in maniera inequivocabile che la caffeina riscontrata nelle analisi di tessuto fosse effettivamente presente nella matrice solida o nelle molecole di acqua contenute in esso.

Le ricerche bibliografiche svolte indicano come l'analisi in questione sia condotta per la prima volta, sia per ciò che concerne la frazione plasmatica dell'emolinfa che la matrice tissutale, non avendo quindi ulteriori riscontri ed appoggi a conferma di quanto ipotizzato.

Riassumendo:

- le analisi su matrice tissutale hanno evidenziato la presenza di caffeina all'interno dei campioni indagati, ma rimangono interrogativi circa la sua effettiva presenza all'interno del tessuto o della fase fluida contenuta al suo interno;

- qualora la sostanza fosse effettivamente contenuta nel tessuto, la grande omogeneità dei risultati pare suggerire un contributo alla bioconcentrazione derivante dalla vita degli organismi in ambiente marino maggiore rispetto a quello dell'esposizione in laboratorio.

A suggello di quanto detto occorrerebbe effettuare ulteriori indagini su questa matrice, eventualmente su esemplari prelevati da ambiente marino e analizzati contestualmente, senza esposizioni a varie concentrazioni.

Inoltre risulterebbe utile sottoporre ad essiccamento gli organismi analizzati, in modo da asportare completamente la fase fluida presente entro il tessuto e verificare l'effettivo bioaccumulo in matrice tissutale.

### 3.6) CONCLUSIONI

Il lavoro di Tesi, svolto presso i laboratori di Fisiologia e di Chimica Analitica dei C.D.L. in Biologia Marina e Scienze Ambientali, presso il polo scientifico didattico di Ravenna, ha dimostrato di avere raggiunto in maniera soddisfacente gli obiettivi che dal principio hanno guidato l'attività sperimentale.

In particolare, sono state messe a punto tre distinte procedure analitiche, rivelatesi del tutto valide, per l'identificazione e quantificazione della caffeina in diverse matrici, tramite tecnologia cromatografica ad alta pressione accoppiata a rivelazione con spettrometria di massa (HPLC - MS). La prima di esse è stata ideata per campioni di acque dolci e salate, nella fattispecie acque prelevate in mare nelle quali sono stati esposti, in vasche di laboratorio, esemplari di *Mytilus galloprovincialis* a varie concentrazioni di caffeina, acque di collettamento fognario, acque superficiali di un canale di bonifica, acque marine, acque della rete di distribuzione idrica ed acque minerali commercializzate.

Le altre due procedure elaborate sono state invece finalizzate allo studio di matrici biologiche, in fase liquida e solida, rispettivamente emolinfa e tessuto degli organismi esposti in laboratorio.

Nel corso del lavoro si è stati in grado così di determinare l'esatto quantitativo del farmaco ambientale in esame nei vari media considerati, fornendo inoltre utili riscontri chimici alla ricerca ecotossicologica parallelamente condotta da un altro gruppo di ricerca sui mitili esposti presso il laboratorio di fisiologia; in questo modo si è potuta realizzare l'integrazione tra linee di evidenza (chimica ed ecotossicologica) necessaria per ogni biomonitoraggio che punti ad essere all'avanguardia.

Elevati quantitativi di caffeina sono stati riscontrati in ciascun campione analizzato, dimostrando come in ambiente siano presenti valori di fondo di entità non trascurabile, i quali hanno alterato con un sensibile innalzamento le concentrazioni di esposizione dei mitili nel corso dell'esperimento.

Tali valori numerici, dell'ordine del centinaio di parti per trilione (ppt) nelle acque superficiali marine e del canale di bonifica, si sono dimostrati del tutto in linea con quelli riscontrati da studi analoghi citati nel corso del testo e nei riferimenti bibliografici.

Inoltre è stata dimostrata l'efficienza dei trattamenti di depurazione realizzati presso l'impianto di Cervia (RA) ai fini della rimozione della caffeina, molecola per la quale si è misurato un abbattimento di oltre il 99 % con semplice trattamento ad ossidazione biologica secondaria, come per altro sottolineato dagli articoli di letteratura.

La molecola è stata identificata e quantificata anche per ciò che concerne le acque della rete idrica di distribuzione, con valori del tutto simili alle acque superficiali, facendo ipotizzare l'assenza di un significativo abbattimento di essa nei potabilizzatori; il deionizzatore con filtri ad osmosi inversa di cui si dispone in laboratorio è invece risultato in grado di dimezzare tali quantitativi.

Da ultimo valori dell'ordine di qualche decina di ppt sono stati misurati anche per l'acqua minerale in commercio che si è deciso di sottoporre ad analisi.

Con riguardo alle matrici biologiche, si sono potuti rintracciare quantitativi di sostanza psicoattiva sia nell'emolinfa che nei tessuti campionati al termine della procedura sperimentale, facendo ipotizzare un fenomeno di bioaccumulo.

L'elevata variabilità riscontrata tra pool plasmatici relativi alle medesime condizioni di esposizione e la correlazione non del tutto soddisfacente tra concentrazioni misurate e concentrazioni presenti nelle vasche di esposizione, impongono però cautela nell'adozione di tali risultati.

L'elevata velocità di degradazione della molecola all'interno delle vasche sperimentali nelle quale erano presenti gli organismi filtratori, molto superiore a quelle riportate in letteratura, corrobora l'ipotesi di fenomeni di bioaccumulo che si sommerebbero ai contributi di fotodegradazione e termodegradazione nell'abbattimento della caffeina.

A differenza di ciò che concerne le matrici ambientali, analisi di questo tipo su emolinfa e tessuti di mitilo non erano ancora state condotte prima di questo studio e pertanto i risultati non possono essere confrontati con termini di paragone.

L'elevata complessità della tipologia di analisi condotta, specie per ciò che riguarda il rivelatore a spettrometria di massa e la sua difficile messa a punto, fanno sì che ad oggi il laboratorio di Ravenna dei C.D.L. in Scienze Ambientali e Biologia Marina sia uno dei pochi in Italia ad essere in grado di svolgere tali attività.

Il lavoro di Tesi si dimostra come un buon punto di partenza per estendere queste analisi ad altre molecole che ricadano tra i farmaci ambientali ed i prodotti per la cura personale, in modo da elaborare procedure multianalita (analisi contemporanea di varie molecole) al fine di verificare la presenza ed i quantitativi effettivi in varie matrici.

Questo con l'obiettivo di rendere disponibili dati che, uniti a quanto parallelamente emerge da studi tossicologici ed ecologici, si rivelano fondamentali per la gestione ambientale e che fornirebbero ai risk managers ed environmental managers, coloro che possono adoperarsi a livello politico nella gestione del rischio ambientale e nella salvaguardia ambientale, strumenti validi al fine di mettere a punto normative, per ora assenti, inerenti tale categoria di sostanze.

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> U.S. Census Bureau Web Site, Retail Prescription Drug Sales: 1995 to 2009.  
<http://www.census.gov> (2011).
- <sup>2</sup> IMB, Annual Report, 2005,  
<http://www.imb.ie/EN/Publications/About-Us/Annual-Report-2005>.
- <sup>3</sup> Heberer T , 2002.  
Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.  
*Toxicology Letters* 131: 5–17.
- <sup>4</sup> Kuspis DA, Krenzelok EP, 1996.  
What happens to expired medication? A survey of community medication disposal.  
*Vet Human Toxicol*; 38: 48-9.
- <sup>5</sup> Zuccato E, Castiglioni S, 2012.  
Consumi di sostanze stupefacenti nelle città europee  
*R&P* 28: 252-260.
- <sup>6</sup> Zuccato E, Castiglioni S, Mazzini R, 2009.  
L'inquinamento ambientale da farmaci e il depuratore di Milano Nosedo  
*Ingegneria Ambientale Anno XXXVIII numero 7/8*.
- <sup>7</sup> Sui Q, Huang J, Deng S, Yu G, Fan Q, 2009.  
Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China.  
*Water Research* 44: 417–426.
- <sup>8</sup> Gobel A, Mcardell CS, Joss A, Siegrist H, Giger W, 2007.  
Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies.  
*Science of the Total Environment* 372: 361–371.
- <sup>9</sup> Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H, 2006.  
Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment.  
*Water Research* 40: 3297–3303.
- <sup>10</sup> Nakada N, Shinohara H, Murata A, Kiri K, Managaki S, Sato N, Takada H, 2007.  
Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant.  
*Water Research* 41: 4372–4382.
- <sup>11</sup> Okuda, T, Kobayashi Y, Nagao R, Yamashita N, Tanaka H, Tanaka S, Fujii S, Konishi

- C, Houwa I, 2008.  
Removal efficiency of 66 pharmaceuticals during wastewater treatment process in Japan.  
*Water Science and Technology* 57: 65–71.
- <sup>12</sup> Ternes TA, Stuber J, Herrmann N, Mcdowell D, Ried A, Kampmann M, Teiser B, 2003.  
Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?  
*Water Research* 37: 1976–1982.
- <sup>13</sup> Yoon Y, Westerhoff P, Snyder SA, Wert EC, 2006.  
Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products.  
*Journal of Membrane Science* 270: 88–100.
- <sup>14</sup> Khan SJ, Wintgens T, Sherman P, Zaricky J, Schafer AI, 2004.  
Removal of hormones and pharmaceuticals in the advanced water recycling demonstration plant in Queensland, Australia.  
*Water Science and Technology* 50: 15–22.
- <sup>15</sup> Nghiem LD, Schafer AI, Elimelech M, 2005.  
Pharmaceutical retention mechanisms by nanofiltration membrane.  
*Environmental Science and Technology* 39: 7698–7705.
- <sup>16</sup> Drewes JE, Bellona C, Oekekoven M, Xu P, Kim TU, Amy G, 2005.  
Rejection of wastewater-derived micropollutants in high-pressure membrane applications leading to indirect potable reuse.  
*Environmental Progress* 24: 400–409.
- <sup>17</sup> Radjenovic J, Petrovic M, Ventura F, Barcelo D, 2008.  
Rejection of pharmaceuticals in nanofiltration and reverse osmosis membrane drinking water treatment.  
*Water Research* 42: 3601–3610.
- <sup>18</sup> Buerge I, Poiger T, Muller M, Buser HR, 2003.  
Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters.  
*Environ. Sci. Technol* 37: 691-700.
- <sup>19</sup> Barron L, Tobinb J, Paull B, 2008.  
Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry.  
*Environ. Monit* 10: 353–361.
- <sup>20</sup> Golet E, Strehler A, Alder A, Giger W, 2002.  
Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction.  
*Anal. Chem.* 74: 5455-5462.

- <sup>21</sup> Eckstein G, 2012.  
Alternative Strategies for Addressing the Presence and Effects of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Fresh Water Resources  
Denver Water Law Review 15: 369-445.
- <sup>22</sup> Kidd KA, Blanchfield PJ, 2007.  
Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen.  
Pnas 104: 8897.
- <sup>23</sup> Eades C, Waring C, 2009.  
The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab, *Carcinus maenas*. Marine Environmental Research, 69: 46-48.
- <sup>24</sup> Bienkowski B, 2013.  
Fish on Prozac: Anxious, anti-social, aggressive.  
Environmental Health News, June 12.
- <sup>25</sup> Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J, Arvidsson B, Tysklind M, Larsson DGJ, 2010.  
Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents.  
Environmental Science & Technology 44: 2661-2666.
- <sup>26</sup> Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT, 2003.  
A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish.  
Hum. Ecol. Risk Assess, 9, 1789–1799.
- <sup>27</sup> Fitzsimmons PN, Fernandez JD, Hoffman AD, Butterworth BC, Nichols JW, 2001.  
Branchial elimination of superhydrophobic organic compounds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).  
Aquat. Toxicol., 55, 23–34.
- <sup>28</sup> Kummerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann, 2000.  
Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test.  
Chemosphere 40: 701–710.
- <sup>29</sup> U.S. E.P.A.  
Inaction in Identifying Hazardous Waste Pharmaceuticals May Result in Unsafe Disposal  
Report No. 12-P-0508 May 25, 2012.
- <sup>30</sup> Kolpin DA, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT, 2002.  
Pharmaceuticals, hormones, and other wastewater organic contaminants in U.S. streams 1999–2000—a National reconnaissance.  
Environmental Science and Technology 36: 1202-1211.
- <sup>31</sup> United States Office of Water EPA-820-F-13-004 Environmental Protection Agency, September



2013.  
Contaminants of Emerging Concern (CECs) in Fish: Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs).  
[http://water.epa.gov/scitech/cec/upload/cec\\_ppcp.pdf](http://water.epa.gov/scitech/cec/upload/cec_ppcp.pdf)
- <sup>32</sup> Korytar P - European Commission DG Environment - Uppsala 11/11/2009  
Commission's communication: a renewed vision for the pharmaceutical sector.  
<http://ec.europa.eu/environment/>
- <sup>33</sup> Goleman D, 2009.  
Intelligenza Ecologica.  
BUR Biblioteca Universitaria Rizzoli.
- <sup>34</sup> Garrison A, Pope JD, Allen FR, 1976.  
GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters.  
KeithCH AnnArbor.
- <sup>35</sup> Hignite C, Azarnoff DL, 1977.  
Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chloro-phenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent.  
Life Sci 20:337-340.
- <sup>36</sup> Watts CD, Crathorn B, Fielding M, Steel CP, 1984.  
Identification of non-volatile organics in water using field desorption mass spectrometry and high performance and high performance liquid chromatography.  
Analysis of Organic Micropollutants in Water: Proceedings of the Third European Symposium. 1983 September 19-21: Oslo, Norway: 120-131.
- <sup>37</sup> Brosius C, 2011.  
Determination of a broad range of selected pharmaceuticals in the Southern Ocean by UPLC – TANDEM MASS SPECTROMETRY  
Departmental Honors Thesis University of Tennessee at Chattanooga Department of Chemistry
- <sup>38</sup> Weigel S, Berger U, Jensen E, Kallenborn R, Thoresen P, Huhnerfuss H, 2004.  
Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromso - Norway with emphasis on ibuprofene and its metabolites.  
Chemosphere 56: 583–592.
- <sup>39</sup> Anumol T, Merel S, Snyder S, 2011.  
High Sensitivity HPLC Analysis of Contaminants of Emerging Concern (CECs) in Water Using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System.  
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5991-1412EN.pdf>
- <sup>40</sup> Petracco M, 2005.  
Our Everyday Cup of Coffee: The Chemistry behind Its Magic  
Journal of Chemical Education, 82: 1161-1167.
- <sup>41</sup> Nkondjock A, 2009.

Coffee consumption and the risk of cancer: an overview.  
Cancer Lett. 277: 121–5.

<sup>42</sup> <http://www.dsm5.org/Pages/Default.aspx>.

<sup>43</sup> "Caffeine overdose".  
MedlinePlus. 4 April 2006.

<sup>44</sup> Verkhatsky A, 2005.  
Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons.  
Physiol. Rev. 85: 201–79.

<sup>45</sup> Peters JM, 1967.  
"Factors Affecting Caffeine Toxicity: A Review of the Literature".  
The Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs 7: 131–141.

<sup>46</sup> "Food Standards Agency publishes new caffeine advice for pregnant women".  
Retrieved 3 August 2009.

<sup>47</sup> American College of Obstetricians and Gynecologists , 2010.  
ACOG Committee Opinion No. 462: Moderate caffeine consumption during pregnancy.  
Obstet Gynecol 116: 467–8.

<sup>48</sup> Silverman K, Evans SM, Strain EC, Griffiths RR, 1992.  
Withdrawal syndrome after the double-blind cessation of caffeine consumption.  
N. Engl. J. Med. 327: 1109–1.

<sup>49</sup> Winston AP, Hardwick E, Jaber N, 2005.  
Neuropsychiatric effects of caffeine".  
Advances in Psychiatric Treatment 11: 432–439.

<sup>50</sup> Alfonso Olivares C, Torres-Padron E, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodriguez JJ, 2013.  
Assessment of the presence of pharmaceuticals compounds in seawater samples from coastal area of Gran Canaria.  
Antibiotics 2: 274-287.

<sup>51</sup> Nödler K, Licha T, Bester K, Sauter M, 2010.  
Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples.  
Journal of Chromatography A, 1217:6511–6521.

<sup>52</sup> Asami Y, Horie R, Hamamoto H, Sekimizu K, 2010.  
Use of silkworms for identification of drug candidates having appropriate pharmacokinetics from plant sources.  
BMC Pharmacology 2010: 7-10.

- <sup>53</sup> Han ZX, Zhang M , 2011.  
Toxicokinetic behaviors and modes of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctane acid (PFOA) on tilapia (*Oreochromis niloticus*).  
African Journal of Biotechnology 10: 12943-12950.
- <sup>54</sup> Moreno RA, Sverdlhoff CE, Oliveira RA, Oliveira SE, Borges DC, 2009.  
Comparative bioavailability and pharmacodynamic aspects of cyclobenzaprine and caffeine in healthy subjects and the effect on drowsiness intensity.  
J Bioequiv Availab 1: 086-092.
- <sup>55</sup> Alvi SN1, Hammami MM, 2011 .  
Validated HPLC method for determination of caffeine level in human plasma using synthetic plasma: application to bioavailability studies.  
J.Chromatogr Sci. 49:292-6.
- <sup>56</sup> Blanchard J1, Weber CW, Shearer LE, 1990.  
HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk.  
J.Chromatogr Sci. 28:640-2.
- <sup>57</sup> McEneff G , Barron L , Kelleher B , Paull B , Quinn B, 2013.  
A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves  
Science of the Total Environment 476–477:317–326.
- <sup>58</sup> Miller G, 2010.  
Pharmaceuticals found in Erie's drinking water.  
<http://www.goerie.com/apps/pbcs.dll/article? AID=/20081201/NEWS02/312019963>.
- <sup>59</sup> Pacheco-Ferreira A, 2005.  
Caffeine and pharmaceuticals as indicators of wastewater contamination in wells.  
Cad. Saúde Pública 21.
- <sup>60</sup> The Associated Press, 2009.  
PharmaWater-METROS-A TO Z - Pharmaceuticals found in drinking water of 24 major metro areas, 34 say no testing.  
[http://hosted.ap.org/specials/interactives/pharmawater\\_site/day1\\_04.html](http://hosted.ap.org/specials/interactives/pharmawater_site/day1_04.html).
- <sup>61</sup> European Commission, 2004.  
SANCO/825/00 - Guidance document on residue analytical methods.  
European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection.

## RINGRAZIAMENTI

A conclusione del lavoro di Tesi desidero esprimere un sentito ringraziamento alle persone che mi sono state accanto, aiutandomi sul piano personale e professionale.

Ringrazio la Professoressa Elena Fabbri, la quale a lezione è riuscita ad interessarmi alla fisiologia ed alla biologia, un ambito distante dal percorso di studi ingegneristico dal quale provenivo.

In seguito mi ha dato modo di accostarmi ad una tematica di ricerca così interessante, aprendomi le porte del laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale e mettendomi nelle condizioni di potere sviluppare procedure analitiche di elevato profilo.

Questo non sarebbe stato possibile senza la competenza, la professionalità, la dedizione al lavoro, unite a modestia, disponibilità e gentilezza di Paola Valbonesi; quest'ultima ha anche tentato, riuscendoci in qualche occasione, di farmi cambiare punto di vista, uscendo dal mio pessimismo cosmico, mostrando insospettite competenze da psicoterapeuta.

Grazie a lei ho anche potuto conoscere le dinamiche di un laboratorio di ricerca, da quanto di più semplice, come maneggiare un recipiente o una pipetta, ai meccanismi più complessi.

Ringrazio anche gli altri ragazzi che lavorano nel laboratorio di fisiologia: Alysar, che spero migliori in quanto a gusti musicali (vedi Radio 101!), Marco e Silvia.

Hanno avuto molta pazienza, conciliando le loro esigenze e attività con i miei impegni e chiarendomi numerosi dubbi.

Ringrazio i miei familiari, in primo luogo mio babbo Gianni, che con la sua sconfinata pazienza mi ha sostenuto in questi anni piuttosto complicati, passando molto tempo insieme a me, coinvolgendomi nei suoi lavori manuali di ingegnere tuttofare, ascoltando le mie farneticazioni ossessive inerenti sia l'ambito scolastico che la vita nel suo complesso, dispensando una mole sconfinata di consigli che gli sono costati fatica e sacrificio e soprattutto puntando in ogni momento su quel qualcosa di buono presente in me sotto tanto materiale da scavare e rimuovere.

Un grazie a mia mamma Milena, le cui doti di operosità, pazienza e pragmaticità sono indispensabili per l'equilibrio della famiglia, e i miei nonni Loris, che ora non c'è più, inguaribile ottimista e dotato di un'intelligenza sociale spiccatissima, e Meris, il cui carattere è, ahimè, più affine al mio, i quali mi hanno insegnato come l'attaccamento al concreto e al reale, anche alle cose più semplici, sia la base dalla quale costruire il tutto.

Un grazie agli amici ed in particolare ad una persona più unica che rara come Mauro Gorini, uno dei pochi che riescono a trasmettere il piacere di dedicare tempo ed impegno agli altri in maniera

disinteressata, cosa che a me non riesce, ma che, nonostante lui ne sia fermamente convinto, non riesce neppure ai suoi compagni di movimento.

Mauro mi ha anche trascinato in centinaia di avventure, qualcuna costata davvero cara, ma utile per misurarsi con problemi concreti e crescere tentando di uscire dalla nostra adulescenza.

Da ultimo un grazie speciale a Sara, che mi conosce ormai da tanti tanti anni e, nonostante io finora non mi sia rivelato un compagno all'altezza per le mie innumerevoli carenze, mi dimostra con ogni suo sguardo e suo gesto quanto tenga a me.

Dal lato umano mi ha mostrato ciò che significa stare insieme ad una persona ed amare e, nonostante lei abbia sempre centinaia di dubbi e interrogativi a tal proposito, per me in questo rimane una maestra di vita, così come nella dedizione e nell'impegno che riversa in ogni sfida che intraprende, riuscendo sempre a dimostrare il suo grande valore, di cui troppo spesso non è consapevole.

Spero che possa essere la mia compagna di avventure anche in futuro e questo rappresenta senza dubbio di più di quanto si possa formalizzare a livello di unioni civili o religiose.

Sono contento di avere conosciuto persone così sul mio cammino.