



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

Analisi di Neonicotinoidi e Bisfenolo A in Acqua e
Sedimento della Laguna di Venezia

Relatore

Andrea Gambaro

Correlatore

Roberta Zangrando

Laureando

Sandro Dalla Barba

Matricola 840908

Anno Accademico

2019/2020

Sommario

Sommario	1
1.0 Scopo della Tesi.....	2
2.0 Introduzione	5
2.1 Neonicotinoidi.....	5
2.2 Bisfenolo A	10
3.0 Materiali e Metodi.....	13
3.1 Materiali	14
3.2 Campionamento	15
3.3 Preparazione del Campione	19
3.3.1 Procedura di Preparazione per i Neonicotinoidi in Acqua	19
3.3.2 Procedura di Preparazione per i Neonicotinoidi in Sedimento	20
3.3.3 Procedura di Preparazione per il BPA in Acqua	22
3.3.4 Procedura di Preparazione per il BPA in Sedimento	23
3.4 Metodo Analitico Strumentale per i Neonicotinoidi	23
3.5 Metodo Analitico Strumentale per il BPA.....	26
4.0 Risultati e Discussione	27
4.1 Validazione dei Metodi Analitici	27
4.1.1 Validazione del Metodo per la Quantificazione di Neonicotinoidi in Acqua di Mare	27
4.1.2 Validazione del Metodo per la Quantificazione di Neonicotinoidi in Sedimento..	29
4.1.3 Validazione del Metodo per la Quantificazione del BPA in Acqua di Mare	31
4.1.4 Validazione del Metodo per la Quantificazione di BPA in Sedimento	33

4.2 Applicazioni dei Metodi ai Campioni Reali di Acqua e Sedimento	34
4.2.1 Analisi di Neonicotinoidi nell'Acqua della Laguna di Venezia	34
4.2.2 Analisi di Neonicotinoidi nel Sedimento della Laguna di Venezia	37
4.2.3 Analisi di BPA nell'Acqua della Laguna di Venezia	39
4.2.4 Analisi di BPA nel Sedimento della Laguna di Venezia	41
5.0 Conclusioni	43
6.0 Bibliografia.....	45
7.0 Appendice.....	57
7.1 Dati Ecotossicologici di Neonicotinoidi su Specie Acquatiche	57
7.2 Dati Sui Tempi di Dimezzamento di Neonicotinoidi nei Terreni	60
7.3 Approfondimento sugli Standard di Qualita' della WCA	61
7.4 Dati Ecotossicologici di BPA su Specie Acquatiche	64
7.5 La Laguna di Venezia e la Marea.....	65
7.6 Lo Strumento	68
Ringraziamenti.....	76

1.0 Scopo della Tesi

Lo scopo della tesi è mettere a punto dei metodi analitici per analizzare in matrici ambientali alcuni contaminanti emergenti. I contaminanti emergenti sono molecole (sintetiche o naturali) o microrganismi che non vengono comunemente monitorati nell'ambiente ma che hanno la capacità di diffondersi all'interno dello stesso e causano possibili o conclamati effetti avversi per l'uomo e/o l'ecosistema (Rosenfeld & Feng 2011).

I contaminanti emergenti presi in considerazione sono neonicotinoidi e Bisfenolo A (BPA): essendo contaminanti emergenti i dati disponibili in letteratura per la Laguna di Venezia sono assenti (neonicotinoidi) o scarsi (Bisfenolo A).

I neonicotinoidi (Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid, Thiamethoxam) con la Decisione Di Esecuzione (UE) 2018/840 del 5 giugno 2018 sono stati inseriti nella Watch List della Water Framework Directive. Le sostanze inserite in questa lista potrebbero presentare un rischio significativo per l'ambiente acquatico o attraverso l'ambiente acquatico, ma per le quali l'insufficienza dei dati di monitoraggio non consente di giungere a una conclusione circa i rischi reali che esse presentano.

Per i neonicotinoidi lo scopo di questa tesi è sviluppare un metodo strumentale per l'analisi quantitativa in acqua salata e sedimento lagunare che soddisfi i requisiti della Water Framework Directive. Il metodo analitico potrà essere utilizzato per ampliare la conoscenza sulla presenza nell'ambiente di questi inquinanti emergenti, come auspicato dalla legislazione europea.

Il Bisfenolo A è un potenziale candidato per entrare nella lista delle Priority Substances della Water Framework Directive (WFD 2000/60/EC), ovvero una lista di sostanze considerate molto pericolose per l'ambiente. Il BPA è da considerarsi una SHVC, Substance of Very High Concern, secondo la European Chemicals Agency.

Per il BPA lo scopo di questa tesi è sviluppare un metodo analitico che permetta di misurare la concentrazione ambientale in acqua e sedimento della laguna di Venezia e fare un confronto con le PNEC redatte dall'agenzia WCA per conto dell'Unione Europea.

2.0 Introduzione

2.1 Neonicotinoidi

I neonicotinoidi sono tra i pesticidi più utilizzati a livello mondiale (Jeschke et al. 2011). Sono chiamati così per la somiglianza della loro struttura a quella della nicotina, fig. 1

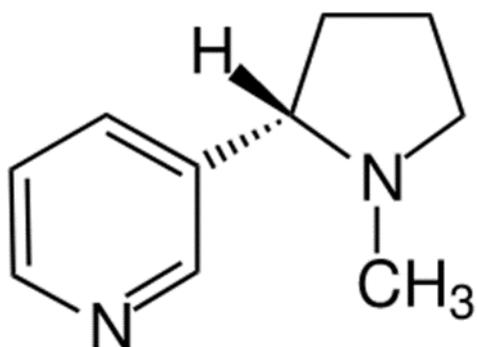
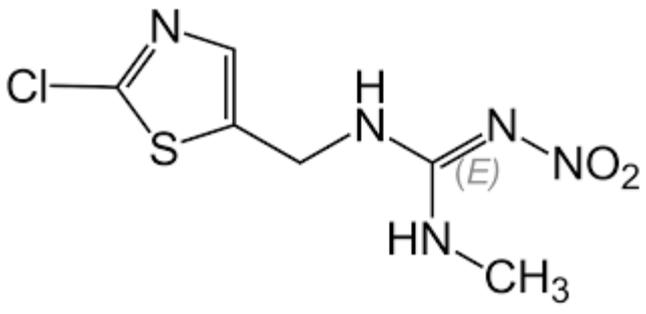
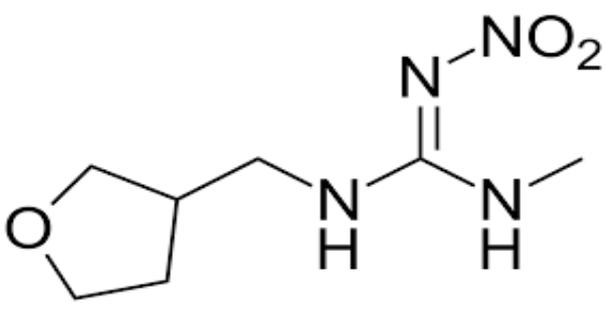
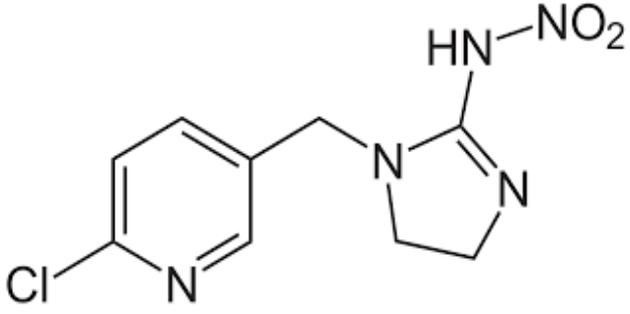
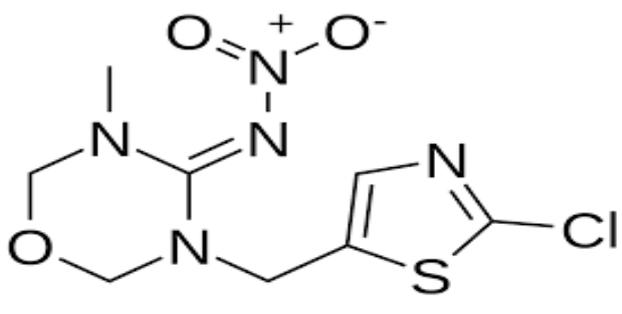
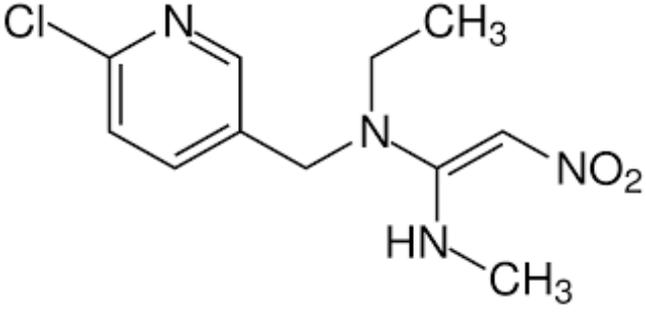


Figura 1 Nicotina

Esplcano azione insetticida a causa dell'attività agonista esercitata sui recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs), perciò si nota alterazione del normale impulso nervoso (Rose 2012). I recettori nAChRs dei mammiferi sono diversi da quelli degli invertebrati e questo spiega la selettività dei neonicotinoidi per quest'ultimi.

I neonicotinoidi hanno aperto una nuova era nel controllo degli insetti quando sono stati sviluppati negli anni 80 del 900; il primo composto commerciale, l'Imidacloprid, è disponibile dagli anni 90 (Kollmeyer et al. 1999). Possono essere classificati in 3 gruppi chimici: N-nitroguanidine (Imidacloprid, Thiamethoxam, Clothianidin e Dinotefuran), nitrometileni (Nitenpyram) e N-cianoammidine (Acetamiprid e Thiacloprid), tab. 1.

Gruppo chimico	Nome	Struttura
N-nitroguanidine	Clothianidin	
	Dinotefuran	
	Imidacloprid	
	Thiamethoxam	
Nitrometileni	Nitenpyram	

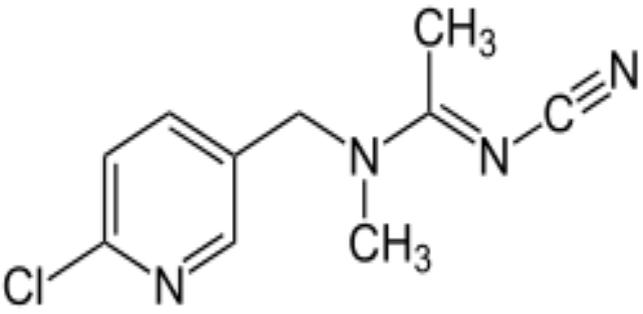
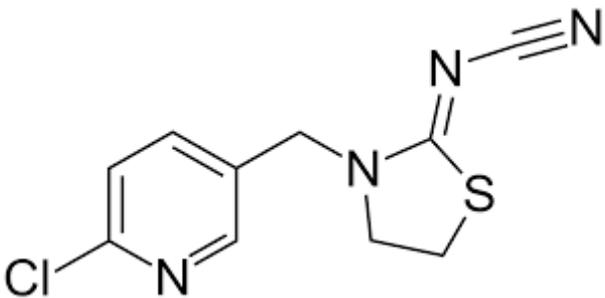
N-cianoammidine	Acetamiprid	
	Thiacloprid	

Tabella 1 I neonicotinoidi raggruppati in gruppi chimici

I neonicotinoidi sono insetticidi sistemici ovvero una volta entrati in contatto con la pianta si distribuiscono in tutti i tessuti, compresi quelli del fiore, del polline e del nettare. Ci sono molteplici vie d'applicazione alle colture ma la principale è l'uso di semi trattati in superficie (Bonmatin et al. 2014). Questo metodo si considerava inizialmente sicuro a livello ambientale (Ahmed et al. 2001) ma si è scoperto che solo l'1.6-20 % di principio attivo va al vegetale (Sur & Stork 2003). La parte rimanente va nel suolo e in parte minore anche in aria infatti le macchine seminatrici sviluppano una nube di polvere contaminata da neonicotinoidi che può essere letale direttamente o indirettamente per alcuni invertebrati non-target, primo fra tutti l'ape (Greatti et al. 2003) che essendo una specie impollinatrice è cruciale per la produzione di molti degli ortaggi più importanti a livello mondiale (Klein et al. 2007). La nube d'insetticida è il risultato dell'abrasione della patina dei semi trattati; sono stati sviluppati degli additivi da aggiungere alle sementi per ridurre al minimo lo sfregamento tra semi e quindi il rilascio in aria del principio attivo. Un altro accorgimento utilizzato è quello di munire le macchine agricole in questione con "deflettori" che dirigono

questa nube tossica in basso verso il terreno ma non si evita la moria di api (Tapparo et al. 2012).

Un altro metodo d'applicazione comune è il trattamento del terreno da coltivare. Si mette a rischio però la comunità d'invertebrati del suolo (Pisa et al. 2014) e di conseguenza l'ecosistema. Acque superficiali possono essere contaminate da applicazioni spray di pesticidi sistemici o anche da acqua entrata in contatto con piante ornamentali domestiche/colture agricole trattate con pesticidi sistemici (Hait 2010). I neonicotinoidi sono utilizzati anche nelle serre dove vengono aggiunti all'acqua d'irrigazione (Kreuger et al. 2010).

Per quanto riguarda la volatilità i neonicotinoidi hanno bassa pressione di vapore ($2.8 \cdot 10^{-8}$ - 0.002 mPa a 25 °C) e rimangono in forma gassosa per un breve periodo di tempo.

Maggiore è la solubilità di un pesticida maggiore sarà la sua attività sistemica in quanto il principio attivo si distribuisce in maniera più uniforme (Koltzenburg et al. 2010); sarà però maggiore anche la sua biodisponibilità (Pierobon et al. 2008). Per la solubilità e i tempi di fotolisi, tabella 2 (PPBD 2012).

Neonicotinoide	Solubilità in acqua a 20°C, pH 7 (mg/L)	Fotolisi: DT50 (giorni) a pH 7
Acetamiprid	2950 (alta)	34 (stabile)
Clothianidn	340 (moderata)	0.1 (alta)
Imidacloprid	610 (alta)	0.2 (alta)
Thiacloprid	184 (moderata)	stabile
Thiamethoxam	4100 (alta)	2.7 (moderatamente veloce)

Tabella 2 Solubilità e fotolisi dei neonicotinoidi

Hladik et al. (2018) riportano che i neonicotinoidi sono stabili in acqua con un tempo di dimezzamento di 4.7-40.3 giorni. In commercio si trovano formulazioni di neonicotinoidi con additivi che ne aumentano la solubilità (Gupta et al. 2002).

La solubilità e la persistenza dei neonicotinoidi sono un rischio per gli ambienti acquatici (Goulson 2013). Lo studio di Van Dijk et al. (2013) mostra che la preoccupazione sulle conseguenze derivanti dall'abbondante uso di Imidacloprid per l'ecosistema acquatico (acqua dolce) sono giustificate. Starner & Goh (2012) hanno rilevato Imidacloprid nell'89 % dei campioni acquosi prelevati in fiumi, ruscelli e fossati della California. L'aumento dell'uso di neonicotinoidi porta ad un aumento dell'inquinamento osservato negli ambienti acquatici (Overmyer et al. 2005).

Gli invertebrati acquatici sono essenziali per l'ecosistema in quanto ad esempio fungono da nutrimento per i vertebrati. I neonicotinoidi raggiungono l'acqua superficiale per deposizione atmosferica (drift) in seguito ad applicazione spray, per deflusso da superfici inquinate (runoff) e per infiltrazione di acqua sotterranea inquinata. Gli invertebrati acquatici di acqua dolce sono particolarmente sensibili ai pesticidi: infatti non possono evitare l'esposizione spostandosi in ambienti incontaminati come fanno gli invertebrati terrestri (Pisa et al. 2014). L'assimilazione di pesticida avviene attraverso l'epidermide, la respirazione e la nutrizione. Ad oggi gli studi tossicologici si sono concentrati principalmente su invertebrati d'acqua dolce e meno su quelli che vivono in ambienti costieri. Per quanto riguarda gli invertebrati che vivono in mare aperto non ci sono praticamente studi disponibili sull'interazione con neonicotinoidi. Per una panoramica degli studi ecotossicologici disponibili su vertebrati ed invertebrati acquatici si veda la sezione 7.1 di questa tesi. Si ricordi comunque che le informazioni riguardo l'ecotossicologia dei neonicotinoidi su organismi marini sono alquanto scarse (Pisa et al. 2015). Nonostante numerosi studi indichino che i neonicotinoidi sono pericolosi per gli invertebrati acquatici, solo per l'Imidacloprid sono stati valutati degli standard di qualità ambientale: invertebrati d'acqua dolce sono al riparo da tossicità acuta se la concentrazione è inferiore a 200 ng/L mentre per la tossicità cronica la concentrazione deve essere inferiore agli 8.3 ng/L (Hladik et al. 2018). Anche il Ministero per la Salute Pubblica e l'Ambiente olandese propone questi standard di qualità per l'Imidacloprid in acqua ambientale dolce (Smit 2014).

Esistono dati sugli invertebrati del suolo ma sono in maggior parte saggi di tossicità acuta che tengono conto solo della mortalità tralasciando gli effetti cronici (Pisa et al. 2015).

Questi effetti a lungo termine andrebbero valutati dato che i neonicotinoidi possono persistere nel suolo per mesi o addirittura anni (Bonmatin et al. 2014). Baylay et al. (2012) hanno osservato che l'EC50 per Imidacloprid e Thiacloprid sulla produzione di bozzoli di *Lumbricus rubellus* è di 1.5 e 1.3 ppm. Gomez-Eyles et al. (2009) hanno trovato che Imidacloprid e Thiacloprid a 1.4 e 0.9 ppm inibiscono la produzione di bozzoli di *E. fetida*. Alves et al. (2013) riportano un EC50 sulla riproduzione di *Eisenia andrei* di 4 ppm d'Imidacloprid con effetti avversi misurabili però già a 0.7 ppm. Kreutzweiser et al. (2008) mostrano che a 7 ppm l'Imidacloprid riduce la produzione di bozzoli di *Dendrobaena octaedra*. I neonicotinoidi possono legarsi al suolo, in particolare a terreni ad alto contenuto di materia organica (3.5 %). I neonicotinoidi hanno un tempo di dimezzamento nel suolo che varia a seconda del composto, del tipo di suolo e delle tecniche sperimentali: per i dettagli si veda la sezione 7.2 di questa tesi. Possono trasferirsi anche ai sedimenti di corpi idrici d'acqua dolce e d'acqua salata (Bobe et al. 1997).

La Decisione UE 2018/840 indica che per i neonicotinoidi il metodo analitico da preferire per l'acqua è del tipo LC-MS/MS e la preparazione del campione migliore è attraverso SPE (solid phase extraction). L'MDL massimo ammissibile è di 8.3 ng/L. La maggioranza dei metodi analitici in letteratura corrispondono a questi dettami (si veda Hladik et al. 2012, Zhang et al. 2019, Montiel-Lèon et al. 2018). Per quanto riguarda il sedimento numerosi sono i ricercatori che impiegano metodi analitici del tipo LC-MS/MS (Zhang et al. 2019, Chen et al. 2015, Radovic et al. 2014). Le procedure d'estrazione utilizzate negli articoli consultati sono la dispersive liquid-liquid microextraction (si veda Zhang et al. 2019), estrazione con solventi (Jones et al. 2014) e la QuEChERS che è stata usata in questo lavoro di tesi (si veda Masia' et al. 2015, Schaafsma et al. 2015).

2.2 Bisfenolo A

Il Bisfenolo A, fig. 2, è stato sintetizzato per la prima volta nel 1905 (Zincke 1905) e viene utilizzato nella sintesi di polimeri plastici ma anche come additivo antiossidante ad esempio nel PVC.

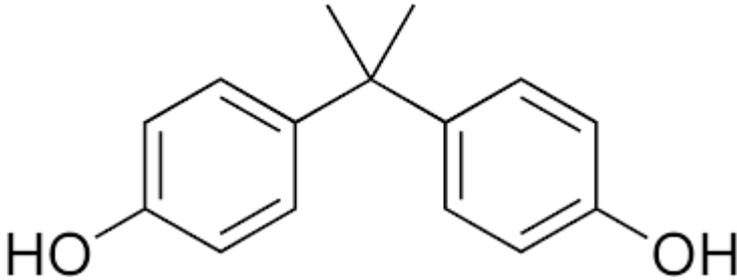


Figura 2 Bisfenolo A

Si usa per la sintesi di policarbonati e resine epossidiche. Quest'ultime hanno eccellenti proprietà meccaniche, resistenza chimica e termica, adesività: sono quindi utilizzate in numerose applicazioni come ad esempio nel packaging per rivestire contenitori metallici a contatto con gli alimenti. Le resine epossidiche si ricavano da risorse fossili e non sono riciclabili a causa della struttura a reticolo quindi sta aumentando l'interesse verso alternative rinnovabili.

Il Bisfenolo A è uno dei prodotti chimici più usati al mondo. Ha una solubilità di 120-300 mg/L a 25 °C in acqua e un tempo di dimezzamento pari a 38 giorni per l'acqua e 340 per i sedimenti (Corrales et al. 2015). La fotossidazione del BPA è rapida a differenza dell'idrolisi (USEPA 2010). L'ECHA (European Chemical Agency) il 16 Giugno 2017 ha stabilito che il BPA è un SVHC ovvero "substance of very high concern" (<https://echa.europa.eu/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>) a causa delle sue proprietà di interferente endocrino per gli umani. Inoltre è un potenziale candidato per entrare nella lista delle Priority Substances della Water Framework Directive (WFD 2000/60/EC), ovvero una lista di sostanze considerate molto pericolose per l'ambiente.

Il BPA arriva all'ecosistema acquatico (acqua salata o dolce) dalla migrazione da prodotti contenenti BPA, scarichi degli impianti di depurazione delle acque ma anche scarichi d'industrie e discariche. Le più alte concentrazioni di BPA in ambiente si trovano in vicinanza di

impianti di produzione di BPA, di resine epossidiche, di produzione e riciclo di carta termica, di produzione di articoli in PVC contenenti BPA (Fischer et al. 2014). Gli animali entrano in contatto col BPA ad esempio ingerendo la plastica dispersa in ambiente. Il BPA influisce negativamente sulla fauna acquatica (Oehlmann et al. 2009).

Bisogna considerare inoltre che il BPA in mare potrebbe degradarsi molto più lentamente rispetto che in acqua dolce con un rischio maggiore per l'ecosistema marino (Kang & Kondo 2005).

Secondo il report della German Federal Environmental Agency (UBA) (Fischer et al. 2014) in EU la concentrazione di BPA è:

- 1.25-42.3 ng/L nell'acqua marina
- 5.69-19.7 ng/g nel sedimento marino
- 9.4 ng/L-1057 ng/L (la concentrazione più alta è di un fiume in cui scarica il refluo di un impianto di depurazione dell'acqua italiano) nell'acqua dolce superficiale
- 10.43-14.1 ng/g-dry weight (dw) nel sedimento d'acqua dolce

Per quanto riguarda i dati ecotossicologici del BPA su specie acquatiche si veda la sezione 7.4 di questa tesi.

Gli invertebrati sono più sensibili al BPA. Si dovrebbero eseguire test su molte specie d'invertebrati e valutare soprattutto le esposizioni a lungo termine (Ohelmen et al. 2009).

La WCA è un'agenzia inglese di consulenza sull'impatto ambientale degli agenti chimici e nel 2014 ha stilato un report sul BPA per conto del Dipartimento Generale per l'Ambiente dell'Unione Europea. La WCA ha consultato i dati ecotossicologici disponibili in letteratura fino al 2014 e ha calcolato le PNEC (Predicted No Effect Concentration) utilizzati poi per gli EQS (Environmental Quality Standards) di acqua ambientale e sedimento seguendo la guida europea per gli EQS (EC 2011). Per i dettagli delle specie usate nei test ecotossicologici consultati dalla WCA e per i modelli statistici adottati si veda la sezione 7.3 di questa tesi.

Le PNEC ricavati dalla WCA sono mostrate in tabella 3.

Matrice ambientale	Tempo d'esposizione	PNEC
Acqua dolce	Lungo	10.3 µg/L (media annuale)
	Breve	56 µg/L (concentrazione massima)
Acqua salata	Lungo	10.3 µg/L (media annuale)
	Breve	56 µg/L (concentrazione massima)
Sedimento	Lungo	2200 µg/kg-dw (media annuale)

Tabella 3 PNEC ricavate dalla WCA

I metodi di estrazione più usati per il BPA in acqua sono Solid Phase Extraction, Solid Phase Micro Extraction, Liquid Liquid Extraction (Chang et al. 2009). L'SPE seguita da GC-MS è consigliata dallo U.S. Geological Survey National Water Quality laboratory (Zaugg et al. 2002). Sono comunque numerosi i ricercatori che scelgono un metodo HPLC-MS/MS (si veda ad esempio Laganà et al. 2004, Heisterkamp et al. 2004, Denier et al. 2008).

3.0 Materiali e Metodi

3.1 Materiali

Acetamiprid (ACE) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Acetamiprid-d3 (ACE*) (98%) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Acetone (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)

Acetonitrile (ACN) grado HPLC/MS (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)

Acido Formico Fluka (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Acqua ultrapura (18.2 M Ω cm, 0.01 TOC) prodotta da un sistema Purelab Flex II (ELGA, High Wycombe, U.K.)

Acqua ultrapura HPLC (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)

Bilancia analitica Kern ALT 220-4NM

Bisfenolo A (ring-13C12, 99%) 100 ug/uL in ACN (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA)

Bisfenolo A solido (Dr Eherenstorfer, Augsburg, Germany)

Cloruro di Sodio ($\geq 99\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Clothianidin (CLO) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Clothianidin-d3 (CLO*) ($\geq 97\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Discovery® DSC-18 SPE (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Imidacloprid (IMI) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Imidacloprid-d4 (IMI*) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

LC-Pak cartuccia (Merck Millipore, Burlington, USA)

Metanolo grado HPLC/MS (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Oasis HLB, 6 mL, 200 mg cartucce (Waters, Milford, Massachusetts, USA)

Oasis HLB, 6mL, 500 mg cartucce (Waters, Milford, Massachusetts, USA)

Synergy Hydro 50 mm \times 4.6 mm, 4 μ m (Phenomenex, Torrance, California, USA)

Sodio citrato dibasico sesquidrato ($\geq 99\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Solfato di Magnesio ($\geq 99.5\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Supelclean™ PSA SPE (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Thiaclopid (TCLO) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Thiamethoxam (TMX) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Thiamethoxam-d3 (TMX*) ($\geq 98\%$) (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland)

Turbovap Zymark evaporatore (Hopkinton, MA, USA)

3.2 Campionamento

In figura 3 la mappa (<http://geomap.arpa.veneto.it/maps/56/view>) fornita da ARPAV che indica la classe di qualità dei corpi idrici lagunari secondo l'indice MAMBI (macroinvertebrati bentonici) registrato nel 2011 per diverse stazioni: il blu indica una qualità elevata, il verde una buona, il giallo una sufficiente, l'arancione una scarsa e il rosso una cattiva.

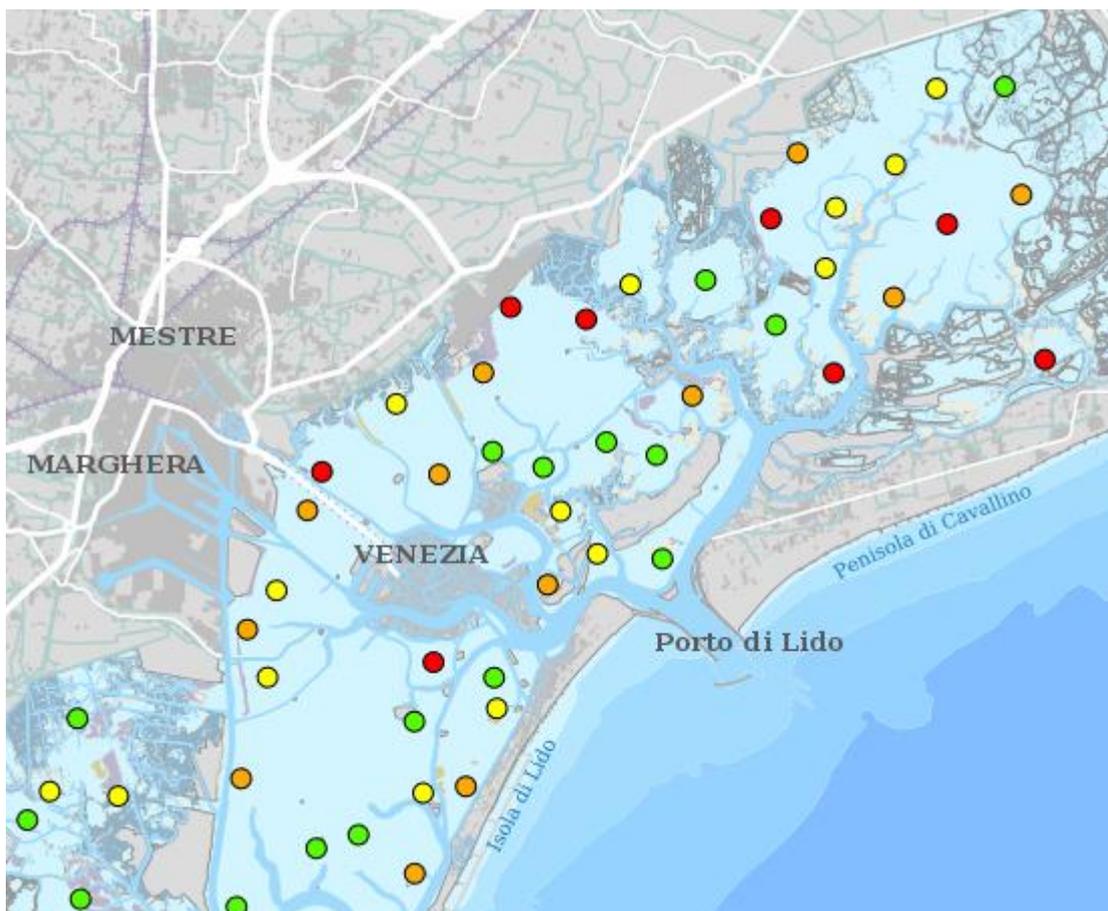


Figura 3 Mappa ARPAV della laguna con stazioni di campionamento colorate secondo l'indice MAMBI

ARPAV inoltre fornisce la mappa per l'indice MAMBI del 2011 a seconda del corpo idrico (<http://geomap.arpa.veneto.it/maps/56/view>). Si veda figura 4.

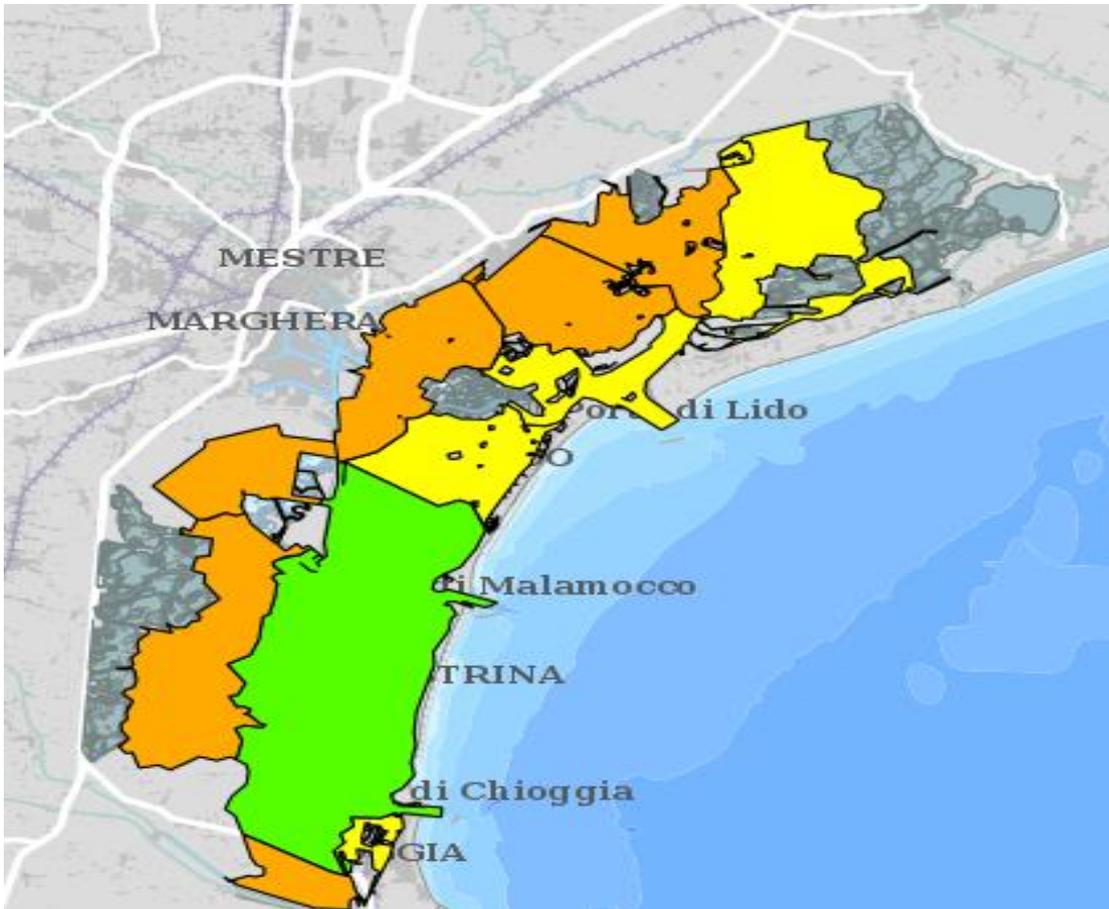


Figura 4 Mappa ARPAV della laguna con bacini idrici colorati secondo l'indice MAMBI

Per questa tesi sono stati scelti 6 siti di campionamento corrispondenti a due tipologie distinte: la prima comprende le zone in cui vengono emessi contaminanti emergenti mentre la seconda funge da panoramica sulla diffusione degli stessi nella laguna nord, centro e sud (fig. 5).

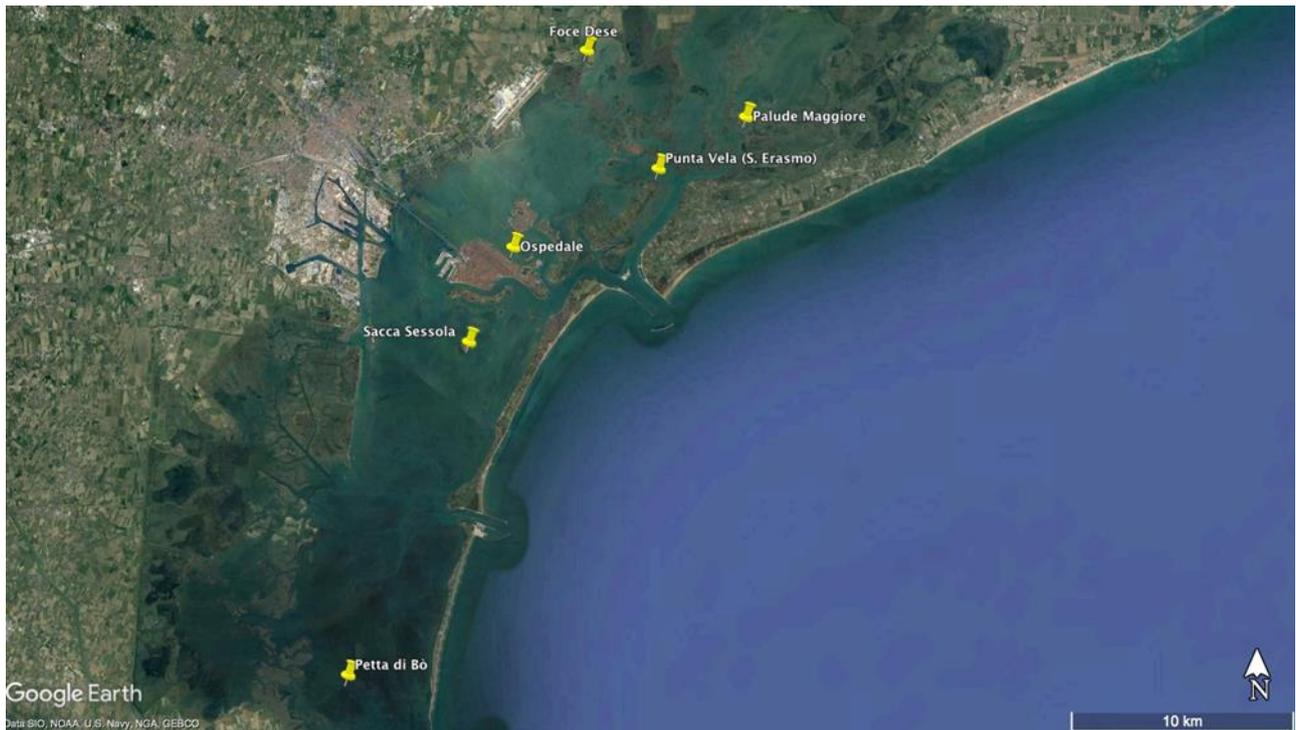


Figura 5 Mappa della laguna con i vari siti di campionamento

I siti di campionamento utili a monitorare le sorgenti di contaminazione sono:

- Foce del fiume Dese (DE)
- Venezia Ospedale (OS)
- Punta Vela a Sant'Erasmus (SE)

I siti che caratterizzeranno la diffusione in laguna delle molecole da controllare sono:

- Palude Maggiore, laguna nord (PM)
- Sacca Sessola, laguna centrale (SS)
- Petta di Bò, laguna sud (PB)

Per i dettagli dei singoli campionamenti si veda tabella 4.

Sito	Si- gla	Latitu- dine	Longitu- dine	Campionamento		Data fil- trazione acqua
				Data	Ora	
Sacca Sessola	SS	45° 24' 9.137" N	12° 19' 10.095" E	02/04/19	11:15	03/04/19
Petta di Bò	PB	45° 16' 1.65" N	12° 15' 0.32" E	02/04/19	12:30	03/04/19
S. Era- simo	SE	45° 28' 22.12" N	12° 25' 42.45" E	16/05/19	13:00	17/05/19
Palude Mag- giore	PM	45° 29' 37.47" N	12° 28' 44.00" E	16/05/19	12:00	17/05/19
Foce Dese	DE	45° 31' 15.04" N	12° 23' 14.30" E	16/05/19	10:30	17/05/19
Ospe- dale	OS	45° 26' 27.456 N	12° 20' 41.892" E	18/04/19	14:00	19/04/19

Tabella 4 Specifiche del campionamento di acqua e sedimento

Facendo un confronto delle zone campionate con la mappa fornita da ARPAV in figura 4 si può osservare che:

- la foce del fiume Dese presenta una qualità idrica scarsa (arancione)
- La zona Palude Maggiore presenta una qualità idrica sufficiente (giallo)

- La zona di Sant'Erasmus presenta una qualità idrica scarsa (arancione)
- La zona Ospedale presenta una qualità idrica sufficiente (giallo)
- La zona di Sacca Sessola presenta una qualità idrica sufficiente (giallo)
- La zona di Petta di Bò presenta una qualità idrica buona (verde)

Il campionamento dell'acqua avviene immergendo un bidone di acciaio da 20 litri direttamente in mare. Il prelievo, preceduto da tre avvinamenti dei contenitori stessi, si effettua tra i 10 e i 20 cm di profondità allo scopo di minimizzare eventuali effetti dovuti al micro-layer.

I sedimenti vengono campionati mediante utilizzo di una benna Van Veen. Ciascun campione viene riposto in un contenitore di alluminio.

Il giorno successivo al campionamento l'acqua si filtra utilizzando un sistema di filtrazione in acciaio inox Combisart (Sartorius, Goettingen, Germany). Il sistema, unitamente alla vetreria utilizzata per la preparazione del campione, viene precedentemente decontaminato con diclorometano e metanolo (Romil, Cambridge, U.K.) seguite da acqua ultrapura ELGA (High Wycombe, U.K.).

I Filtri GFF (Sartorius, Goettingen, Germany) porosità 0.7 μm , diametro 47 mm, si decontaminano in muffola per 4 ore a 400 °C.

3.3 Preparazione del Campione

3.3.1 Procedura di Preparazione per i Neonicotinoidi in Acqua

I campioni sono stati processati all'interno di una clean room ISO 4 (classe 10000). L'acqua viene filtrata su filtri GFF con porosità di 0.7 μm , diametro di 47 mm, con sistema ad imbuto in acciaio (Sartorius, Goettingen, Germany). Ad un litro d'acqua precedentemente filtrata sono stati aggiunti 10 mL di acido formico (concentrazione finale 1% v/v), sono stati aggiunti 10 ng assoluti (abs) di ACE*, CLO*, IMI*, e TMX*.

I neonicotinoidi sono stati preconcentrati utilizzando una cartuccia SPE OASIS HLB, 6mL, 500 mg, precedentemente condizionata con 10 mL di MeOH e con 10 mL di acqua ultrapura ELGA con 1% v/v di acido formico. Si carica il campione. Si lava con acqua all'1% di acido formico per eliminare il sale proveniente dall'acqua di mare. La cartuccia SPE si asciuga per 5 minuti. Si eluisce in vial da 15 mL con 10 mL di MeOH.

Si concentra la soluzione metanolica ottenuta con il Turbovap a 45 °C fino quasi a secchezza. Si riprende con 800 uL di acqua ultrapura ELGA. Il campione si filtra su filtri PTFE da 0.45 µm e si trasferisce in vial da HPLC e si sottopone ad analisi HPLC-MS/MS. I bianchi procedurali (5 repliche) sono stati ottenuti impiegando la procedura descritta dall'analisi di 1 L di acqua ultrapura Elga.

3.3.2 Procedura di Preparazione per i Neonicotinoidi in Sedimento

I sedimenti sono stati seccati a 105° C per 48 h per ottenere il peso secco. I risultati sono espressi in tabella 5.

Campione		Peso umido (g)	Peso secco (g)	Rapporto p.secco/p.umido	Rapporto p. secco/p.umido medio	DEV. STD	CV%
DE	1	12.534	7.1133	0.5675	0.5714	0.0034	0.5912
	7						
	2	9.7178	5.5743	0.5736			
	3	10.869	6.2281	0.5730			
	0						
SS	1	8.6626	5.3935	0.6226	0.6303	0.0067	1.0604
	2	10.637	6.7387	0.6335			
	2						

	3	11.090 1	7.0398	0.6348			
SE	1	11.300 6	8.4744	0.7499	0.7496	0.0019	0.2547
	2	12.082 5	9.0786	0.7514			
	3	10.588 2	7.9157	0.7476			
OS	1	10.294 5	7.5972	0.7380	0.7430	0.0068	0.9116
	2	10.146 0	7.6167	0.7507			
	3	8.4901	6.2854	0.7403			
PM	1	9.5948	5.8692	0.6117	0.6066	0.0089	1.4727
	2	12.900 2	7.8925	0.6118			
	3	12.139 3	7.2385	0.5963			
PB	1	13.433 8	10.061 7	0.7490	0.7472	0.0038	0.5079
	2	13.802 3	10.252 7	0.7428			
	3	14.026 6	10.516 4	0.7497			
Sedi- mento Pleisto- cene (SP)	1	10.039 4	8.1775	0.8145	0.812	0.0025	0.30788 2

2	10.157	8.2474	0.8120		
2					
3	10.166	8.2299	0.8095		
8					

Tabella 5 Rapporti tra peso secco e umido di ogni sedimento

La procedura utilizzata si avvale della tecnica di estrazione QuEChERS (Masià et al. 2015). In una provetta Falcon da 50 mL si pongono 2 g di sedimento umido reale. Si aggiungono 10 mL di ACN e 6.5 di acqua VWR, si pongono 6 g di MgSO₄, 1.5 g di NaCl, 1.5 g di trisodio citrato diidrato e 0.75 g di disodio citrato sesquidrato. Si mescola con vortex per 1 minuto e poi in centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti. Il liquido surnatante si versa in una provetta Falcon da 50 mL contenente 825 mg di PSA Silica, 825 mg di Discovery C-18 e 2.475 g di solfato di magnesio. Si mescola con il vortex per 1 minuto e poi in centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti.

Il campione si concentra utilizzando il Turbovap fino quasi a secchezza, si riprende con 800 µL di acqua VWR, si filtra con filtro in PTFE con porosità 0.45 µm e si trasferisce in vial da HPLC. I bianchi procedurali (5 repliche) sono stati ottenuti impiegando la procedura descritta senza però inserire alcun sedimento nella fase di estrazione QuEChERS.

3.3.3 Procedura di Preparazione per il BPA in Acqua

Come per i neonicotinoidi i campioni sono stati preparati in una clean room ISO 4. L'acqua si filtra su filtri GFF con porosità di 0.7 µm, diametro di 47 mm, con sistema ad imbuto in acciaio (Sartorius, Goettingen, Germany). Ogni filtro si usa per 1 L d'acqua. All'acqua precedentemente filtrata si aggiungono 25 ng abs di standard marcato.

A questo punto si concentra con cartucce SPE OASIS HLB da 200 mg, 6 cc. Si condiziona con 5 mL di acetone, 5 mL di MeOH e 10 mL di acqua ELGA precedentemente purificata con LC-Pak. Si carica il campione. Si lava con 10 mL di acqua ELGA purificata con cartuccia LC-Pak e

con 10 mL della stessa acqua al 5% v/v di MeOH. Si asciuga per 10 minuti. Si eluisce in vial da 15 mL con 5 mL di acetone. In una vial da HPLC si posiziona un inserto da 250 μ L. Si inseriscono nell'inserto 100 μ L di acqua ELGA purificata e 100 μ L dell'eluito in acetone. I bianchi procedurali (5 repliche) sono stati ottenuti impiegando la procedura descritta dall'analisi di 1 L di acqua Elga purificata con cartuccia LC-Pack.

3.3.4 Procedura di Preparazione per il BPA in Sedimento

La procedura impiegata per la preparazione del campione per l'analisi del BPA nei sedimenti è comune a quella usata per i neonicotinoidi (sezione 3.3.2). Lo standard interno BPA marcato aggiunto è di 25 ng abs. I bianchi procedurali (5 repliche) sono stati ottenuti impiegando la procedura descritta precedentemente per i composti neonicotinoidi.

3.4 Metodo Analitico Strumentale per i Neonicotinoidi

Per l'analisi strumentale dei neonicotinoidi si usa la tecnica HPLC-MS/MS utilizzando il sistema formato dall'accoppiamento fra il cromatografo liquido HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) con spettrometro di massa API 4000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Ontario, Canada) munito di sorgente Turbo V. La ionizzazione degli analiti condotta mediante la tecnica Electro Spray Ionization (ESI) avviene in modalità di ionizzazione positiva.

L'analisi degli ioni da parte del triplo quadrupolo dello spettrometro di massa avviene in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), durante la quale lo ione precursore isolato nel primo quadrupolo (q1), viene frammentato nella cella di collisione (q2) e gli ioni frammento generati sono rilevati nel terzo quadrupolo (q3). Le coppie di ioni formati dallo ione precursore/ione frammento sono dette transizioni e sono specifiche del composto analizzato. Ogni transizione si acquisisce per un tempo (dwell time) di 50 ms. I parametri relativi all'analizzatore sono declustering potential, entrance potential, collision energy e collision

cell exit potential e sono disponibili in tabella 6. Si scelgono le transizioni più intense e/o meno interferite (tab. 6). I parametri della sorgente di ionizzazione sono: Source Temperature 600 °C, Nebulizer gas 40.00 psi, Auxiliary gas 60.00 psi, Curtain gas 20 psi, Collision gas 6.00 psi, Ionization voltage 5500 V.

Ione precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
[ACE+H] ⁺	223.1	126.1	59	10	29	8
		90.2	59	10	47	10
[IMI+H] ⁺	256.1	209.2	56	12	21	5
		175.1	56	12	23	18
[TCLO+H] ⁺	253.1	126.1	70	9	31	8
		90	70	9	50	6
[TMX+H] ⁺	292.2	211.1	56	11	17	5
		181.2	56	11	32	4
[ACE*+H] ⁺	226.0	126.0	68	11	27	8
		90.0	68	11	46	6
[IMI*+H] ⁺	260.0	213.0	61	11	19	15
		79.0	61	11	24	12
[CLO*+H] ⁺	253.0	172.0	57	15	17	9
		132.0	57	15	21	12
[TMX*+H] ⁺	295.0	214.0	61	11	16	15
		184.0	61	11	30	13

Tabella 6 Transizioni analizzate per ogni neonicotinoide e parametri ottimizzati dello spettrometro. Le transizioni in grassetto si utilizzano per la quantificazione.

Per la quantificazione dell'Imidacloprid (IMI) nell'acqua marina si usa la transizione 256.1/209.2 poiché la transizione 256.1/175.1, benchè più intensa, risulta interferita. Per i sedimenti invece si usa la 256.1/175.1 poiché garantisce migliore accuratezza del metodo. Per la separazione cromatografica si utilizza la colonna Synergy Hydro 50 mm × 4.6 mm, 4 µm. Il volume d'iniezione è di 100 µL. Il flusso dell'HPLC è di 500 µL/min. Gli eluenti sono: eluente A = 0.1 % di acido formico in H₂O, eluente B = 0.1 % di acido formico in MeOH. Il programma d'eluizione binario è il seguente: 0–1 min 100% di A, 1-15 min gradiente a 30% di A, 15-16 min gradiente a 0% di A, 16–21 min lavaggio, da 21 a 22 gradiente a 100% di A ed equilibratura. La corsa dura 30 minuti in tutto. La separazione cromatografica è disponibile in figura 6.

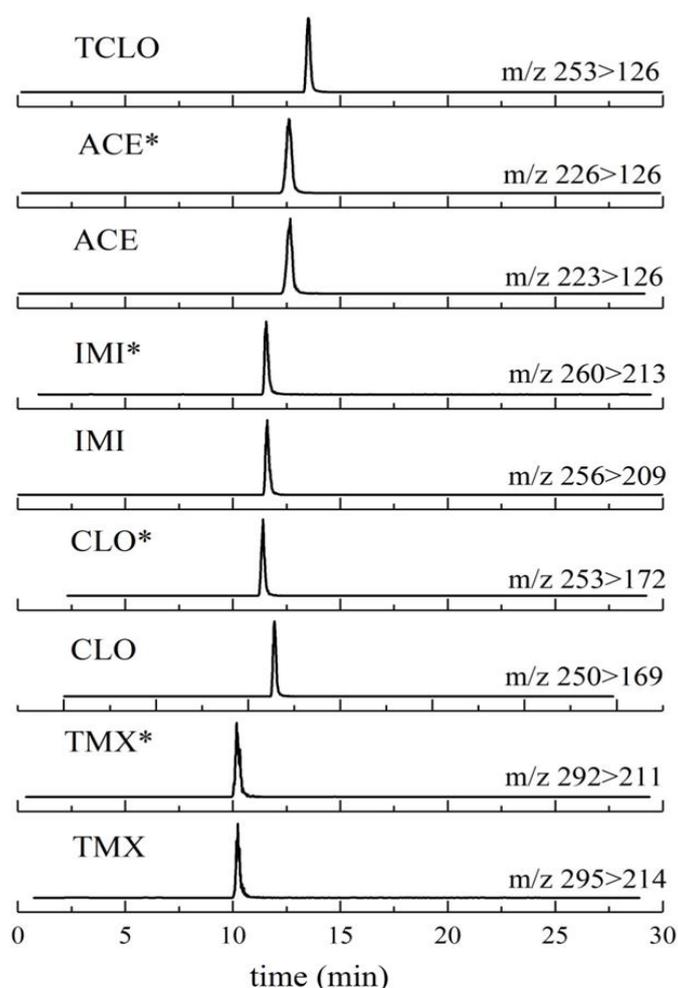


Figura 6 Separazione cromatografica di neonicotinoidi nativi e marcati.

3.5 Metodo Analitico Strumentale per il BPA

Per la determinazione del BPA si utilizza la tecnica analitica HPLC- MS/MS con accoppiamento tra HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) e spettrometro di massa API 4000 (Applied Biosystem/MSD SCIEX, Concord, Ontario, Canada) descritto precedentemente. La ionizzazione degli analiti nella sorgente ESI avviene in polarità negativa e l'acquisizione è condotta in modalità MRM con un dwell time di 100 ms per transizione. Le transizioni usate per la quantificazione e i parametri utilizzati sono riassunti in tab. 7.

Ione precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
[BPA-H] ⁻	227	132.8	-71	-10	-36	-10
[BPA*-H] ⁻	239	138.8	-74	-10	-35	-10

Tabella 7 Elenco delle transizioni analizzate per il BPA e parametri ottimizzati dello spettrometro

I parametri della sorgente utilizzati sono: temperatura sorgente 550°C, nebulizer gas 30.00 psi, auxiliary gas 50.00 psi, curtain gas 25 psi, collision gas 4.00 psi, -54.00 V, ionization voltage -4450.00 V.

L'analisi cromatografica è condotta utilizzando una colonna C18 Synergi Hydro-RP (50 mm lunghezza, 4.6 mm diametro interno, 4 µm di dimensione delle particelle) con un flusso d'eluizione di 500 µL /min, la corsa dura 15 minuti. Gli eluenti utilizzati sono: eluente A = acqua, eluente B = MeOH. Il programma d'eluizione binario è il seguente: a 0 min 50% di B, 0-2 min gradiente a 100% di B, 2-7 min eluizione isocratica di B, 7-9 min a 50% di B ed equilibratura a 50% di B da 9 a 15 min. Il volume d'iniezione è di 100 µL per i sedimenti e di 10 µL per le acque di mare.

4.0 Risultati e Discussione

4.1 Validazione dei Metodi Analitici

4.1.1 Validazione del Metodo per la Quantificazione di Neonicotinoidi in Acqua di Mare

La quantificazione si esegue con standard interni marcati isotopicamente: ACE*, IMI*, CLO* e TMX* si usano per la determinazione di ACE, IMI, CLO, TCLO e TMX. Per quantificare la concentrazione si compara l'area del picco del composto nativo con quella del marcato. I risultati si correggono per il fattore di risposta strumentale. Per i composti neonicotinoidi nativi è stata osservata una risposta lineare nel range compreso fra 5 pg/mL e 1200 ng/mL, i marcati sono ad una concentrazione fissa di 10 ng/mL. Una buona linearità è stata ottenuta per tutti i composti e i valori di R^2 sono generalmente sopra lo 0.99. Il limite di rilevabilità strumentale per i neonicotinoidi è compreso fra 2 pg/mL a 18 pg/mL, mentre il limite di quantificazione strumentale va da 5 pg/mL a 61 pg/mL (tab. 8).

Standard Nativo	Standard Marcato	Intervallo lineare	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	R^2
ACE	ACE*	8 pg/mL- 1000 ng/mL	2	8	0.9997
IMI	IMI*	22 pg/mL- 1100 ng/mL	6	22	0.9991
CLO	CLO*	49 pg/mL- 600 ng/mL	15	49	0.9857

TCLO	ACE*	5 pg/mL- 1050 ng/mL	2	5	0.9935
TMX	TMX*	61 pg/mL- 1200 ng/mL	18	61	0.9965

Tabella 8 Risultati relativi alla valutazione del range di linearità e sensibilità strumentale per i composti neonicotinoidi

L'acqua salata prelevata in mare aperto si usa come matrice reale per la validazione del metodo. A 1 L di acqua si aggiungono 10 ng abs degli standard interni ACE*, CLO*, IMI* e TMX* prima della concentrazione all'SPE. Si svolgono 5 repliche per avere i bianchi di validazione, i risultati sono riassunti nella tabella 9. Il Method Detection Limit (MDL) è stato calcolato come 3 volte la deviazione standard del bianco mentre il Method Quantification Limit (MQL) come 10 volte la stessa.

Per la stima dell'accuratezza e la riproducibilità della metodica analitica per la quantificazione nell'acqua di mare, 10 ng abs di standard nativo di ognuno dei neonicotinoidi e 10 ng abs di ACE*, IMI*, CLO* e TMX* sono stati aggiunti all'acqua salata filtrata. La quantificazione per l'IMI si ottiene usando la transizione 256.1/209.2. La riproducibilità (espressa come CV%) e l'accuratezza (come errore percentuale) si ottengono preparando 5 repliche: CV% ed errore percentuale sono in genere inferiori al 10 %. I dati della validazione e lo standard interno impiegato per la quantificazione di ciascun analita sono disponibili in tabella 9.

Standard Nativo	Standard Marcato	Bianco (ng abs)	Deviazione Standard (ng abs)	MDL (ng abs)	MQL (ng abs)	CV%	Errore accuratezza%
ACE	ACE*	0.52	0.05	0.18	0.46	7	4
IMI	IMI*	0.36	0.03	0.10	0.35	9	-2
CLO	CLO*	0.55	0.06	0.19	0.64	9	-3

TCLO	ACE*	0.17	0.04	0.11	0.38	1	7
TMX	TMX*	0.13	0.05	0.14	0.47	5	6

Tabella 9 Accuratezza e precisione del metodo per neonicotinoidi in acqua di mare

La concentrazione determinata nei campioni è stata considerata solo se la quantità assoluta risultava superiore all'MQL ottenuto da un bianco procedurale (5 repliche). Vedi sezione 3.3.1. L'MQL per i composti neonicotinoidi è disponibile in tabella 10.

	TMX (ng/L)	IMI (ng/L)	CLO (ng/L)	ACE (ng/L)	TCLO (ng/L)
MQL	0.01	0.01	0.007	0.006	0.003

Tabella 10 MQL ricavati dai bianchi procedurali di neonicotinoidi in acqua di mare

Mediamente l'MDL da noi ottenuto è pari a 0.0025 ng/L quindi ampiamente al di sotto dell'MDL di 8.2 ng/L consigliato dalla legislazione europea (Decisione UE 2018/840)

4.1.2 Validazione del Metodo per la Quantificazione di Neonicotinoidi in Sedimento

Per la linearità della risposta strumentale si veda la sezione 4.1.1.

Per la quantificazione dei composti neonicotinoidi nel sedimento marino a circa 2 g di sedimento (umido) si aggiunge 1 ng abs dei neonicotinoidi ACE*, IMI*, CLO* e TMX come standard interni marcati seguendo la procedura descritta precedentemente. Per la quantificazione si compara l'area del nativo con quella del marcato e il risultato si corregge per il fattore di risposta.

Per la validazione del metodo si utilizza una matrice di sedimento marino rappresentato da sedimento umido del Pleistocene campionato in laguna di Venezia a 10 m di profondità (Teatini et al. 2017). Il bianco per la validazione della metodica analitica si prepara aggiungendo 1 ng abs di neonicotinoidi marcati (5 repliche).

La validazione del metodo per i sedimenti si esegue a due livelli di concentrazione aggiungendo ad 1 g di sedimento umido rispettivamente 1 ng abs e 10 ng abs di standard nativi. In entrambi i casi si aggiunge 1 ng abs di ACE*, IMI*, CLO* e TMX*. La quantificazione dell'IMI si effettua con la transizione 256.1/175.1. La riproducibilità (espressa come CV%) e accuratezza (come errore percentuale) si valutano preparando il campione in 5 repliche e sono risultati generalmente inferiori al 10%. I dati della validazione per entrambi i livelli di concentrazione e lo standard interno impiegato per la quantificazione sono disponibili in tab. 11.

Standard Nativo	Standard Marcato	Bianco (pg/g)	Deviazione Standard (pg/g)	MDL (pg/g)	MQL (pg/g)	CV% (10 ng/g)	Errore accuratezza% (10 ng/g)	CV% (1 ng/g)	Errore accuratezza% (1 ng/g)
ACE	ACE*	8	1	4	12	8	9	5	-8
IMI	IMI*	199	38	114	381	6	-1	4	-10
CLO	CLO*	19	2	6	20	11	4	3	12
TCLO	ACE*	1	1	4	14	9	5	6	-9
TMX	TMX*	26	3	9	30	10	-1	11	-1

Tabella 11 Accuratezza e precisione del metodo per neonicotinoidi in sedimento

Nel corso della validazione del metodo sono state testate due diverse procedure per la preparazione del campione. Il surnatante derivante dall'estrazione QuEChERs è stato purificato seguendo le due diverse procedure sotto descritte:

1. 1 mL di surnatante si pone in una provetta Eppendorf da 1.5 mL contenente 50 mg di PSA Silica, 50 mg di Discovery DSC-18 e 150 mg di MgSO₄. Si porta al vortex per 1 minuto e poi in microcentrifuga Eppendorf a 3000 rpm per 5

minuti. Il surnatante si filtra con filtro PTFE da 0.2 μm . Si trasferisce in vial da HPLC.

2. 16.5 mL di surnatante si pongono in una provetta Falcon da 50 mL contenente 825 mg di PSA Silica, 825 mg di Discovery C-18 e 2.475 g di solfato di magnesio. Si mescola con il vortex per 1 minuto e poi in centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti. Si concentra in Turbovap fino quasi a secchezza, si riprende con 800 μL di acqua VWR, si filtra con filtri PTFE 0.45 μm e si trasferisce in vial da HPLC.

Il percorso 1 è stato scartato in quanto i picchi degli analiti risultavano scodati a causa dell'elevata quantità di solvente organico presente nell'estratto finale che portava ad una qualità cromatografica molto bassa.

Il volume di iniezione è di 100 μL al fine di avere una buona sensibilità strumentale.

I risultati delle analisi si considerano validi solo se superiori all'MQL ottenuto da un bianco procedurale in 4 repliche (si veda sezione 3.3.2) senza però alcuna aggiunta di sedimento.

L'MQL per i neonicotinoidi è disponibile in tabella 12.

	TMX (ng abs)	IMI (ng abs)	CLO (ng abs)	ACE (ng abs)	TCLO (ng abs)
MQL	0.005	0.1259	0.003	0.0008	0.0007

Tabella 12 MQL dei bianchi procedurali di neonicotinoidi in sedimenti

4.1.3 Validazione del Metodo per la Quantificazione del BPA in Acqua di Mare

Per quantificare il BPA come descritto in precedenza si relaziona l'area del picco del composto nativo con quella del BPA*. I risultati si correggono per il fattore di risposta strumentale che è costituito da una soluzione in acqua VWR di BPA* a 30 $\text{pg}/\mu\text{L}$ e BPA a 25 $\text{pg}/\mu\text{L}$. La linearità della risposta si ottiene preparando una serie di soluzioni standard con BPA e BPA* a concentrazioni comprese tra 0.015 e 150 $\text{pg}/\mu\text{L}$. In ciascuna soluzione standard,

BPA* come standard interno che si aggiunge ad una concentrazione costante di 25 pg/ μ L. Si ottiene una buona linearità della risposta: R^2 risulta essere pari a 0.998. La precisione strumentale ottenuta da tre iniezioni di ciascuna delle soluzioni standard si esprime con la deviazione standard relativa (RSD%) che è <10%. Il limite di rilevabilità strumentale (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono disponibili in tabella 13.

Standard Nativo	Standard Marcato	Intervallo linearità	LOD (pg/mL)	LOQ (pg/mL)	R^2
BPA	BPA*	0.015-150 pg/ μ L	3	10	0.998

Tabella 13 Risultati relativi al range di linearità e limiti di rivelabilità e quantificazione strumentali.

La riproducibilità e l'accuratezza sono state valutate su acqua salata prelevata in mare aperto (3 repliche). Ogni replica è costituita da 1 L di acqua salata a cui si aggiungono 25 ng abs di BPA* e 30 ng abs di BPA. I risultati della validazione del metodo sono disponibili in tabella 14.

Standard Nativo	Standard Marcato	Bianco (ng abs)	Deviazione Standard (ng abs)	MDL (ng abs)	MQL (ng abs)	CV%	Errore accuratezza%
BPA	BPA*	5.9	0.9	2.8	9.2	10	-4

Tabella 14 Risultati della validazione del metodo per il BPA in acqua di mare

La validazione del metodo non è stata immediata. Inizialmente una prima versione del metodo prevedeva la preparazione del campione con SPE Oasis HLB, usando come solvente di condizionamento ed eluizione MeOH (10 mL) e lavando con acqua VWR acidificata. Questa

procedura però non riusciva ad eliminare efficacemente la matrice che portava ad avere un rumore di fondo molto alto che copriva il picco del BPA*. Lo studio della letteratura (Liu et al. 2004) ha suggerito che il miglior eluente per il BPA è l'acetone. Per eliminare più efficacemente la matrice è stato inoltre aumentato il volume di lavaggio della cartuccia HLB con acqua ultrapura da 5 mL a 10 mL e si è aggiunto un lavaggio con acqua al 5% v/v di MeOH. Si è osservato inoltre che la contaminazione da parte del BPA era dovuta al solvente stesso, in quanto sia con il MeOH, sia con altri solventi sperimentati (acetato di etile, acetonitrile) tracce di BPA erano visibili nelle analisi del solvente stesso. Anche l'acqua VWR presentava contaminazione di BPA ed è per questo che nella procedura è stata usata acqua ultrapura ELGA purificata con cartuccia LC-Pak. Il volume d'iniezione del campione è di 10 µL. È stata valutata la possibilità di iniettare 100 µL di campione ma si osservava l'aumento del rumore di fondo dovuto alla maggior quantità di matrice iniettata. Come descritto precedentemente i valori di BPA analizzati sono stati considerati solo se superiori a quelli dell'MQL che per il BPA è di 3.6 ng assoluti.

Il BPA in acqua lagunare è stato estratto con una procedura (sez. 3.3.3) che richiede meno passaggi rispetto ad altre reperibili in letteratura per acqua estuarina/costiera/marina (si veda Basheer et al. 2004, Kawhata et al. 2004, Fu et al. 2007, Azevedo et al. 2001, Xu et al. 2014), ma nonostante ciò abbiamo ottenuti dei valori di LOD e MDL uguali se non più bassi.

4.1.4 Validazione del Metodo per la Quantificazione di BPA in Sedimento

Per la linearità della risposta strumentale si veda la sezione 4.1.3.

La procedura per la preparazione del campione è la stessa descritta precedentemente per i neonicotinoidi. Al sedimento umido in esame si aggiungono 25 ng abs di BPA* insieme ad acqua e ACN in una provetta Falcon da 50 mL.

Anche in questo caso la validazione del metodo si ottiene utilizzando come matrice esente da BPA un sedimento del Pleistocene campionato in laguna di Venezia a 10 m di profondità (Teatini et al. 2017). Il sedimento del Pleistocene rappresenta il bianco per la procedura di validazione. Per la valutazione della riproducibilità (espressa come CV%) e l'accuratezza (come errore percentuale) si preparano 5 repliche aggiungendo a 1 g di sedimento del Pleistocene 25 ng abs di BPA* e 30 ng abs di BPA. Sia il coefficiente di variazione che l'accuratezza sono risultati inferiori al 10%.

I risultati sono visibili in tabella 15.

Standard Nativo	Standard Marcato	Bianco (pg/g)	Deviazione Standard (pg/g)	MDL (pg/g)	MQL (pg/g)	CV%	Errore accuratezza %
BPA	BPA*	7	1.64	5	16	7	-8

Tabella 15 Accuratezza e precisione del metodo per BPA in sedimento

Il volume d'iniezione e' stato di 100 µL.

I valori analizzati si considerano validi se superiori all'MQL preparato come descritto in sezione 3.3.4. L'MQL risulta essere 0.66 ng abs (4 repliche).

4.2 Applicazioni dei Metodi ai Campioni Reali di Acqua e Sedimento

4.2.1 Analisi di Neonicotinoidi nell'Acqua della Laguna di Venezia

I risultati delle analisi sono esposti in tabella 16.

	TMX (ng/L)	IMI (ng/L)	CLO (ng/L)	ACE (ng/L)	TCLO (ng/L)
Dese	1.48	3.90	1.00	0.220	0.200
Ospedale	BQL	0.21	0.014	0.007	0.038
Palude Maggiore	BQL	0.30	0.380	0.13	0.017
Petta di Bò	BQL	BQL	0.033	BQL	0.016
S. Erasmo	0.07	9.20	0.200	0.094	0.011
Sacca Sessola	BQL	BQL	0.019	0.008	0.010

Tabella 16 Risultati delle analisi di neonicotinoidi in acqua di laguna. BQL Below Quantification Limit.

Per i neonicotinoidi in acqua lagunare si trovano le seguenti concentrazioni medie:

TMX=1.09 ng/L, IMI=3.4 ng/L, CLO=0.27 ng/L, ACE=0.092 ng/L, TCLO=0.049 ng/L

Le zone di Dese e Ospedale sono le uniche in cui la concentrazione rilevata non è mai inferiore all'MQL ed in generale la zona alla foce del fiume Dese presenta sempre la maggiore concentrazione. Il Clothianidin è presente in tutti i siti di campionamento ma bisogna tenere presente che nonostante venga commercializzato, esso rappresenta anche un metabolita di degradazione del Thiamethoxam che si forma nel suolo, nei topi, negli insetti e nelle piante (Simon-Delso et al 2014). La concentrazione finale pertanto potrebbe essere dovuta sia all'utilizzo del composto Clothianidin che come prodotto di degradazione del Thiamethoxam.

In tabella 17 sono riassunte le concentrazioni rilevate in matrice acquosa ambientale trovate in letteratura. Per l'Acetamiprid, il Clothianidin e il Thiacloprid le concentrazioni rilevate in acqua di laguna sono in genere inferiori a quelle rilevate in acque superficiali, probabilmente perché le acque superficiali sono più vicine alla sorgente di contaminazione ossia campi coltivati e centri urbani. Questa spiegazione si presta anche all'interpretazione del dato relativo all' Imidacloprid. La concentrazione d'Imidacloprid rilevata a Sant'Erasmo sito in cui si concentra la presenza di orti all'interno della Laguna di Venezia, è di 9.2 ng/L ed eccede lo standard di qualità ambientale fissato da Hladik et al. (2018) e dal Ministero

per la Salute Pubblica e l’Ambiente olandese (Smit 2014): secondo queste fonti una concentrazione che superi gli 8.3 ng/L è da considerarsi pericolosa per gli effetti cronici sugli invertebrati d’acqua dolce. La concentrazione media d’Imidacloprid rilevata in Laguna è di 3.4 ng/L ovvero paragonabile a quella delle acque superficiali: Sant’Erasmus rappresenta una fonte di contaminazione d’Imidacloprid paragonabile a quelle che scaricano nelle acque superficiali dolci. La concentrazione media di TMX è 1.55 ng/L, inferiore alla concentrazione media di TMX pari a 2.07 ng/L rilevata sulle coste della penisola cinese del Liaodong (Xie et al 2019). Non sono riportati studi precedenti volti alla determinazione dei neonicotinoidei nella laguna di Venezia.

Neonicotinoide	Luogo	Concentrazione rilevata (ng/L)	Matrice ambientale acquosa	Fonte
Acetamiprid	Pearl river, China	3.13-67.6	Acqua di fiume	Zhang et al. 2019
	Spagna	2.0-8.4	Acqua di fiume	Rubirola et al. 2016
	Quebèc, Canada	0.6-2.5	Acqua di fiume	Montiel-Lèon et al. 2018
	Veneto, Italia	3	Acqua superficiale	De Liguoro et al. 2014
Clothianidin	Pearl river, China	0.55-103	Acqua di fiume	Zhang et al. 2019
	Veneto, Italia	3	Acqua superficiale	De Liguoro et al. 2014
Imidacloprid	Georgia, USA	4.3-35.3	Acqua di fiume	Hladik et al. 2012
	Pearl river, China	0.84-162	Acqua di fiume	Zhang et al. 2019

	Spagna	2.3-258	Acqua di fiume	Rubirola 2016
	Quebèc, Canada	0.8-38	Acqua di fiume	Montièl-Leon et al. 2018
	Veneto, Italia	3-14	Acqua superficiale	De Liguoro et al. 2014
	Veneto, Italia	10-250	Acqua superficiale	ARPAV 2017a
	Veneto, Italia	< 50	Acqua sotterranea	ARPAV 2017b
Thiacloprid	Pearl river, China	1.35-9.35	Acqua di fiume	Zhang et al. 2019
	Spagna	5.8-7.3	Acqua di fiume	Rubirola et al. 2016
	Quebèc, Canada	1	Acqua di fiume	Montièl-Leon et al. 2018
Thiamethoxam	Coste peninsola Liaodong, Cina	2.7	Acqua di mare	Xie et al. 2019
	Pearl river, China	6.21-145	Acqua di fiume	Zhang et al. 2019
	Quebèc, Canada	3-27	Acqua di fiume	Montièl-Leon et al. 2018

Tabella 17 Concentrazioni di neonicotinoidi trovate in letteratura per acqua ambientale

4.2.2 Analisi di Neonicotinoidi nel Sedimento della Laguna di Venezia

I risultati delle analisi sono riassunti in tabella 18.

	TMX (ng/g-dw)	IMI (ng/g-dw)	CLO (ng/g-dw)	ACE (ng/g-dw)	TCLO (ng/g-dw)
Dese	0.005	BQL	0.002	0.0023	0.0543
Ospedale	0.007	BQL	BQL	BQL	0.0006
Palude Maggiore	0.011	BQL	BQL	0.0007	BQL
Petta di Bò	0.003	BQL	BQL	BQL	BQL
S. Erasmo	0.008	BQL	BQL	0.0064	BQL
Sacca Sessola	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL

Tabella 18 Risultati delle analisi di neonicotinoidi in sedimento

Per i neonicotinoidi in sedimento lagunare si trovano le seguenti concentrazioni medie: TMX=0.007 ng/g-dw, IMI=BQL, CLO=0.002 ng/g-dw, ACE=0.0031 ng/g-dw, TCLO=0.02745 ng/g-dw.

Per il Thiamethoxam la concentrazione maggiore si rileva a Palude Maggiore alla concentrazione di 0.011 ng/g-dw. Il Clothianidin è stato rilevato solo alla foce del fiume Dese. La concentrazione maggiore rilevata per l'Acetamiprid si trova nei pressi di S. Erasmo, mentre per il Thiacloprid sul fiume Dese. Il Thiamethoxam risulta essere il più diffuso nei sedimenti lagunari a differenza dell'Imidacloprid che non è presente in nessuno degli stessi. Il tempo di dimezzamento dell'Imidacloprid in sedimenti costieri è estremamente basso se paragonato a quello degli altri neonicotinoidi (si veda la sezione 7.2). Questo potrebbe spiegare l'assenza d'Imidacloprid.

In generale le concentrazioni dei composti neonicotinoidi determinate nella Laguna di Venezia sono inferiori a quelle analizzate in sedimenti e suoli di altre parti del mondo (tabella 19). A nostra conoscenza questi sono i primi dati relativi ai neonicotinoidi nella laguna di Venezia.

Neonicotinoide	Luogo	Concentrazione rilevata (ng/g-dw)	Tipo di terreno	Fonte

Acetamiprid	Fujian, China	0.07-0.31	Sedimento flu- viale	Chen et al. 2015
	Pearl river, China	0.02-5.33	Sedimento flu- viale	Zhang et al. 2019
Clothianidin	UK	0.02-11.5	Suolo	Jones et al. 2014
	Pearl river, China	0.41-1.91	Sedimento flu- viale	Zhang et al. 2019
Imidacloprid	Fujian, China	0.06-0.43	Sedimento flu- viale	Chen et al. 2015
	UK	0.38-10.7	Suolo	Jones et al. 2014
	Pearl river, China	0.02-7.16	Sedimento flu- viale	Zhang et al. 2019
Thiacloprid	Pearl river, China	0.05-1.31	Sedimento flu- viale	Zhang et al. 2019
Thiamethoxam	UK	0.02-1.5	Suolo	Jones et al. 2014
	Pearl river, China	0.36-2.13	Sedimento flu- viale	Zhang et al. 2019

Tabella 19 Concentrazioni di neonicotinoidi trovate in letteratura per vari tipi di terreno

4.2.3 Analisi di BPA nell'Acqua della Laguna di Venezia

I risultati delle analisi sono disponibili in tabella 20.

	BPA (ng/L)
Dese	14.1

Ospedale	8.36
Palude Maggiore	BQL
Petta di Bò	BQL
S. Erasmo	46.9
Sacca Sessola	4.4

Tabella 20 Risultati delle analisi di BPA in acqua di laguna

La concentrazione media nella laguna di Venezia è di 18.45 ng/L. La concentrazione più elevata di BPA è stata trovata ancora una volta a Sant'Erasmus con una concentrazione di 46.9 ng/L. Probabilmente perché a Sant'Erasmus, in località Punta Vela, si trova un impianto di depurazione delle acque fognarie. In tutti i 6 siti di campionamento le concentrazioni rilevate rispettano gli standard di qualità ambientali della WCA ovvero 10.3 µg/L (lungo termine) e 56 µg/L (breve termine) (si veda sezione 2.2).

Le concentrazioni di BPA analizzate sono in linea con quelle trovate in letteratura per l'acqua di mare, si veda tabella 21. Uno studio precedente condotto nella laguna di Venezia riporta per il BPA una concentrazione media di 13 ng/L (Pojana et al. 2004)

Luogo	Concentrazione (ng/L)	Tipo di acqua ambientale	Fonte
Italia, Laguna di Venezia	1.4-52	Acqua di Laguna	Pojana et al. 2004
Germania, Mare del Nord	0.05-249	Acqua di mare	Heemken et al. 2001
Germania, fiume Elba	4-776	Acqua di fiume	Heemken et al. 2001
Germania, Mar Baltico	0.04-5.7	Acqua di mare	Beck et al. 2005
Germania, Sud ovest	50-272	Acqua di fiume	Bolz et al. 2001

UK, Sussex	5.3-24	Acqua di fiume	Liu et al. 2004
UK, Sussex Est	19.2, 1105	Scarico impianto di depurazione acqua	Hernando et al. 2004
Spagna, Granada	52.0-219 49.1-196 51.6-207	Acqua di fiume Acqua di mare Acqua di falda	Gonzalez-Casado et al. 1998
Spagna, Catalogna	10-20	Acqua di mare	Brossa et al. 2005
Spagna	10-2500	Acqua di scarico urbana	Zafra et al. 2003
Olanda	10-330	Acqua di mare	Belfroid et al. 2002

Tabella 21 Concentrazioni ambientali di BPA in matrici ambientali acquose della zona EU

Secondo il report della German Federal Environmental Agency (UBA) (Fischer et al. 2014) in EU la concentrazione di BPA nell'acqua marina è compresa fra 1.25 e 42.3 ng/L ovvero concentrazioni simili a quelle rilevate in questo studio.

4.2.4 Analisi di BPA nel Sedimento della Laguna di Venezia

I risultati delle analisi sono riassunti in tabella 22.

	BPA (ng/g-dw)
Dese	1.16
Ospedale	1.28
Palude Maggiore	0.99
Petta di Bò	1.51

S. Erasmo	2.18
Sacca Sessola	2.15

Tabella 22 risultati delle analisi di BPA in sedimento

La concentrazione media osservata nella laguna di Venezia è di 1.54 ng/g-dw. La concentrazione maggiore si rileva a Sant'Erasmus, così come si osservava nell'analisi dell'acqua lagunare probabilmente per la presenza di un impianto di depurazione delle acque reflue in località Punta Vela. Le concentrazioni rilevate rispettano gli standard di qualità ambientale redatti dalla WCA ovvero 2200 µg/kg-dw (lungo termine) (si veda sezione 2.2) e sono inferiori rispetto a quelle riportate per i sedimenti di fiume in letteratura, mentre sono paragonabili a quelle analizzate da Pojana et al. (2007) che riportano un range di concentrazione nei sedimenti lagunari veneziani che va da <2 a 118 ng/g-dw (tabella 23).

Luogo	Concentrazione (ng/g-dw)	Tipo di sedimento	Fonte
Italia, Laguna di Venezia	<2-118	Sedimento lagunare	Pojana et al. 2007
Germania, Baden-Württemberg	0.5-15 70-770	Sedimenti di fiume Sedimenti di impianto di depurazione	Bolz et al. 2001
Germania, fiume Elba	10-380	Sedimenti	Stachel et al. 2003
Germania, fiume Elba	7-1630	Sedimenti di fiume	Stachel et al. 2005
Germania	10-190	Sedimenti di fiume	Fromme et al. 2002

	4-1363	Liquami fangosi	
UK	3.4-9	Sedimenti di fiume	Liu et al. 2004b

Tabella 23 Concentrazioni ambientali di BPA in sedimenti della zona EU

Secondo il report della German Federal Environmental Agency (UBA) (Fischer et al. 2014) in EU la concentrazione di BPA nel sedimento marino e' compresa fra 5.69 e 19.7 ng/g-dw. I livelli di BPA rilevati in laguna sono quindi inferiori a quelli europei per sedimenti marini.

5.0 Conclusioni

Nel corso di questo lavoro di tesi sono stati sviluppati quattro metodi analitici volti alla determinazione di due classi di contaminanti emergenti cioe' neonicotinoidi e Bisfenolo A in acqua marina e in sedimento marino. Questi metodi sono stati poi applicati per la misura della concentrazione di questi analiti in acqua e sedimenti nella laguna di Venezia. Mentre per il Bisfenolo A sono noti studi condotti nelle acque della laguna di Venezia, i dati relativi ad acqua e sedimento lagunare dei neonicotinoidi a quanto ci risulta sono i primi riportati in quest'area.

L'MDL medio da noi ottenuto per l'analisi dei neonicotinoidi in acqua ambientale e' pari a 0.0025 ng/L quindi al di sotto l'MDL di 8.2 ng/L consigliato dalla legislazione europea (Decisione UE 2018/840). I neonicotinoidi in acqua lagunare sono stati rilevati in un range che va da 0.007 ng/L a 9.20 ng/L. Questi composti sono stati rilevati principalmente alla foce del fiume Dese. Interessante e' l'alta concentrazione dell'IMI determinata presso il sito di S. Erasmo probabilmente dovuta alle attivita' agricole che li' si svolgono. La concentrazione d'Imidacloprid pari a 9.2 ng/L rilevata a Sant'Erasmo potrebbe essere un rischio per la comunita' d'invertebrati (Hladik et al. 2018, Smit 2014) ma serve la messa a punto di standard di qualita' per l'ambiente marino e quindi di ulteriori dati ecotossicologici. Il range analizzato di neonicotinoidi in sedimento lagunare va da 0.0006 ng/g-dw a 0.0543 ng/g-

dw. E' stato osservato che il TMX ha concentrazioni superiori all' MQL in tutti i siti tranne Sacca Sessola.

Il BPA in acqua lagunare e' stato rilevato in un range che va da 4.4 ng/L a 46.9 ng/L, in tutti i siti di campionamento tranne Petta di Bò e Palude Maggiore, la concentrazione maggiore di 46.9 ng/L è stata misurata a S. Erasmo. Il range di BPA analizzato nei sedimenti lagunari va da 0.99 ng/g-dw a 2.18 ng/g-dw; il BPA è stato misurato in concentrazione maggiore presso il sito di S. Erasmo. Tutte le concentrazioni rilevate rispettano gli standard di qualità ambientale messi a punto dalla WCA (si veda sezione 2.2).

6.0 Bibliografia

- *Aarab N, Lemaire-Gony S., Unruh E., Hansen P D, Larsen B K, Andersen O K, Narbonne J F* (2006) Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenylether. *Aquat. Toxicol.* 78:86–92
- *Ahmed N, Kanan H, Inanaga S, Ma Y, Sugimoto Y* (2001) Impact of pesticide seed treatments on aphid control and yield of wheat in the Sudan. *Crop Prot* 20:929-934
- *Alexander A C, Culp J M, Liber K, Cessna A J* (2007) Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 1726–1732.
- *Alves P R L, Cardoso E J B N, Martines A M, Sousa J P, Pasini A* (2013) Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere* 90:2674–2682
- *Andersen H R, Wollenberger L, Halling-Sorensen B, Kusk K O* (2001) Development of copepod nauplii to copepodites—a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2821–2829
- *Anon* (2001) Evaluation of the New Active Thiacloprid in the New Product Calypso 480 SC Insecticide. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, Canberra, Australia.
- *ARPAV 2017a*, Stato delle Acque superficiali del Veneto – Anno 2017
- *ARPAV 2017b*, Qualità delle acque sotteranee- Anno 2017
- *Azevedo D A, Lacorte S, Viana P, Barceló D* (2001) Occurrence of Nonylphenol and Bisphenol-A in Surface Waters from Portugal. *J. Braz. Chem. Soc.* 12:532-537
- *Barbieri M V, Postigoa C, Guillem-Argiles N, Monllor-Alcaraz L S, Simionato J I, Stella E, Barceló D, López de Alda M* (2019) Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination *Science of the Total Environment* 653:958–967

- *Basheer C, Lee H K, Tan K S (2004) Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. Marine Pollution Bulletin 48:1145–1167*
- *Baylay A J, Spurgeon D J, Svendsen C, Griffin J L, Swain S C, Sturzenbaum S R, Jones O A H (2012) A metabolomics based test of independent action and concentration addition using the earthworm *Lumbricus rubellus*. Ecotoxicology 21:1436–1447*
- *Beck I C, Bruhn R, Gandrass J, Ruck W (2005) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. Journal of Chromatography 1090:98-106*
- *Beketov M A & Liess M (2008) Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. Environmental Toxicology and chemistry 27:461-470*
- *Belfroid A, Velzen M, Van der Horst B, Vethaak D (2002) Occurrence of bisphenol-A in Baltic Sea J Chromatogr A 1090:98-106.*
- *Biggers W J & Laufer H (2004) Identification of juvenile hormone-active alkylphenols in the lobster *Homarus americanus* and in marine sediments. Biol. Bull. 206:13–24*
- *Bobé A, Coste C M, Cooper J F (1997) Factors influencing the adsorption of fipronil in soils. J Agric Food Chem 45:4861–4865*
- *Bolz U, Hagenmaier H, Komer W (2001) Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments and sewage sludge from Baden-Wurttemberg, South-west Germany. Environ Pollut 115:291–301.*
- *Bonmatin J M, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser D P, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell E A D, Noome D A, Simon-Delso N, Tapparo A (2014) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. Environ Sci Pollut Res 22:35-67*

- *Brossa L, Marce R M, Borrull F, Pocurull E* (2005) Occurrence of twenty-six endocrine disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain *Environ Toxicol Chem* 24(2):261–7.
- *Brox S, Ritter A P, Küster E, Reemtsma T* (2014) A quantitative HPLC–MS/MS method for studying internal concentrations and toxicokinetics of 34 polar analytes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Anal Bioanal Chem* 406:4831–4840
- *Canesi L, Lorusso L C, Ciaccia C, Betti M, Rocchi M, Poiana G, Marcomini A* (2007) Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: in vitro and in vivo studies. *Aquat. Toxicol.* 81:36–44
- *Carvajal G, Mougabure G, Toloza A* (2012) Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans*. *Memorias do instituto Oswaldo Cruz*, 107, 675-679
- *Chang H, Chooa K, Leeb B, Choi S* (2009) The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials* 172:1–12
- *Chen M, Yi Q, Hong J, Zhang L, Lin K, Yuan D* (2015) Simultaneous determination of 32 antibiotics and 12 pesticides in sediment using ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 7:1896
- *Corrales J, Lauren A F, Steele W B, Yates B, Breed C S, Williams E S, Brooks B W* (2015) Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. DOI: 10.1177/1559325815598308
- *Cremonese S* (2014) Tesi di Laurea Magistrale: Diffusione di fragranze sintetiche nel sistema acquatico lagunare veneziano. Università Cà Foscari di Venezia.
- *De Cant J & Barrett M* (2010). Clothianidin registration of prosper T400 seed treatment on mustard seed (oilseed and condiment) and Poncho/Votivo seed treatment on cotton. United States Environmental Protection Agency report, 2 November 2010.

- *Decisione UE 2018/840*: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0840&from=EN>
- *De Liguoro M, Dalla Bona M, Gallina G, Capolongo F, Gallocchio F, Binato G, Di Leva V* (2014) Monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environ Sci Pollut Res* 21:3546–3557
- *Denier X, Couteau J, Baudrimont M, Hill E M, Rotchell J, Minier C* (2008) In vitro study of the effects of cadmium on the activation of the estrogen response element using the YES screen. *Mar. Environ. Res.* 66:108-110
- *Dujakovic N, Grujic S, Radisic M, Vasiljevic T, Lausevic M* (2010) Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 678:63–72
- *European Commission (EC)* (2011) Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC) Guidance document No. 27. Technical guidance for deriving environmental quality standards.
- *Fischer B, Milunov M, Floredo Y, Hofbauer P, Joas A* (2014) Identification of relevant emission pathways to the environment and quantification of environmental exposure for Bisphenol A. On behalf of the Federal Environment Agency (Germany) Umweltbundesamt. Report No. (UBA-FB) 001933/E
- *Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A* (2002) Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 36:1429–38
- *Fu M, Li Z, Gao H* (2007) Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers. *Chemosphere* 69:1009–1016
- *Gerhardt A* (2009) Screening the toxicity of Ni, Cd, Cu, Ivermectin and imidacloprid in a short term automated behavioural toxicity test with *Tubifex tubifex* (Muller 1774) (*Oligochaeta*). *Human and ecological risks assesment*, 15, 27-40

- *Gomez-Eyles J L, Svendsen C, Lister L, Martin H, Hodson M E, Spurgeon D J (2009) Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on Caenorhabditis elegans and Eisenia fetida. Ecotoxicol Environ Saf 72:71–79*
- *Gonzalez-Casado A, Navas N, del Olmo M, Vilchez J L (1998) Determination of bisphenol-A in water by micro liquid–liquid extraction followed by silylation and gas chromatography–mass spectrometry analysis. J Chromatogr Sci 36:565–9*
- *Goulson D (2013) An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J Appl Ecol 50:977–987*
- *Greatti M, Sabatini A G, Barbattini R, Rossi S, Stravisi A (2003) Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Risultati preliminari. Bull Insectol 56:69-72*
- *Gupta S, Gajbhiye V T, Agnihotri N P (2002) Leaching behavior of imidacloprid formulations in soil. Bull Environ Contam Toxicol 68:502–508*
- *Haith D A (2010) Ecological risk assessment of pesticide runoff from grass surfaces. Environ Sci Technol 44:6496–6502*
- *Hao C, Eng M L, Suna F, Morrissey C A (2018) Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. Science of the Total Environment 644:1080–1087*
- *Hao C, Morse D, Zhao X, Sui L (2015) Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoids in environmental water. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2225–2232*
- *Haroune L, Cassoulet R, Lafontaine M, Marc Belisle M, Garant D, Pelletier F, Cabana H, Bellenger J (2015) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination for multiclass pesticides from insect samples by microwave-assisted solvent extraction followed by a salt-out effect and micro-dispersion purification. Analytica Chimica Acta 891:160-170*
- *Heemken O P, Reincke H, Stachel B, Theobald N (2001) The occurrence of xenoestrogens in Elbe river and North sea. Chemosphere 45:245–59.*

- Heisterkamp I, Ganrass J, Ruck W (2004) Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC–MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples?. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:709-715
- *Hernando M D, Mezcuz M, Gomez M J, Malato O, Aguera A, Fernandez-Alba A R* (2004) Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *J Chromatogr A* 1047:129–35.
- *Hladik M L, Main A R, Goulson D* (2018) Environmental Risks and Challenges Associated with Neonicotinoid Insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 52:3329–3335
- *Hladik M L & Calhoun D L* (2012) Analysis of the herbicide diuron, three diuron degradates, and six neonicotinoid insecticides in water—Method details and application to two Georgia streams: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2012–5206, 10 p.
- *Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A* (2011) Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem* 59:2897-2908
- *Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Braunbeck T, Turner A P, Tyler C R* (2004) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 66:207–222
- *Jones A, Harrington P, Turnbull G* (2014) Neonicotinoid concentrations in arable soils after seed treatment applications in preceding years (wileyonlinelibrary.com) DOI10.1002/ps.3836
- *Kang J H & Kongo F* (2005) Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water. *Chemosphere* 60:1288–1292
- *Kawahata H, Ohta H, Inoue M, Suzuki A* (2004) Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan—within coral reefs and adjacent river mouths. *Chemosphere* 55:1519–1527

- Klein A M, Vaissie're B E, Cane J H, Steffan-Dewenter I, Cunningham S A, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc B* 274:303–313
- Kollmeyer W D, Flattum R F, Foster J P, Powell J E, Schroeder M E & Soloway S B (1999). Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* (eds I. Yamamoto & J. Casida), pp. 71–89. Springer-Verlag, Tokyo.
- Koltzenburg S, Dombo P, Oetter G, Bratz M (2010) Comb polymers and use thereof for the production of active or effective ingredient formulations. USA. <http://www.google.com/patents/US20100048655>
- Kreuger J, Graaf S, Patring J, Adielsson S (2010) Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008. pp. 49. http://www-mv.slu.se/webfiles/vv/CKB/Ekohydrologi_117_ENG.pdf
- Kreuzweiser D P, Good K P, Chartrand D T, Scarr T A, Thompson D G (2008) Are leaves that fall from imidacloprid-treated maple trees to control Asian longhorned beetles toxic to non-target decomposer organisms? *J Environ Qual* 37:639–646
- Laganà A, Bacalonia A, De Leva I, Faberia A, Fagoa G, Marino A (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 501:79–88
- Liu R, Zhou J L, Wilding A (2004) Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1022:179–189
- Liu R, Zhou J L, Wilding A (2004b) Microwave-assisted extraction by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *J Chromatogr A* 1038:19–26.
- Marcial H S, Hagiwara A, Snell T W (2003) Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:3025–3030

- *Masiá A, Vásquez K, Campo J, Picó Y* (2015) Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. *Journal of Chromatography A*, 1378:19–31
- *Montiel-León J M, Duy S V, Munoz G, Amyot M, Sébastien Sauvé S* (2018) Evaluation of on-line concentration coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of neonicotinoids and fipronil in surface water and tap water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410:2765–2779
- *Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R* (2001) Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* 57:577–586
- *Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk O* (2009) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Phil Trans R. Soc Lond.* 364:2047–62.
- *Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B* (2000) Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9:383–397
- *O'Sullivan G P, Scully N M, Glennon J D* (2010) Polar-Embedded and Polar-Endcapped Stationary Phases for LC. *Analytical Letters* 43:10-11
- *Overmyer J P, Mason B N, Armbrust K L* (2005) Acute toxicity of imidacloprid and fipronil to a nontarget aquatic insect, *Simulium vittatum* Zetterstedt cytospecies IS-7. *Bull Environ Contam Toxicol* 74:872–879
- *Pierobon M, Bouillo N, Lange R F M, Meyer K, Kolter K* (2008) Use of amphiphilic copolymers as solubilising agents. <http://www.google.com/patents/> US20080153925
- *Pisa L, Amaral-Rogers V, Belzunces L P, Bonmatin J M, Downs C, Goulson D, Kreuzweiser D, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey C, Noome D A, Settele J, Simon-Delso N, Stark J, Van der Sluijs, Van Dyck H, Wiemers M* (2014) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res* 22:35-67

- *Pojana G, Bonfa' A, Busetti F, Collarin A, Marcomini A (2004) Estrogenic Potential of the Venice, Italy, Lagoon Waters. Environmental Toxicology and Chemistry 23:1874–1880*
- *Pojana G, Gomiero A, Jonkers N, Marcomini A (2007) Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. Environment International 33:929–936*
- *PPDB (2012) Pesticide properties database.*
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>
- *Radović T, Svetlana Grujić S, Petković A, Dimkić M, Laušević M (2015) Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. Environ Monit Assess 187:4092*
- *Rose P H (2012) Nicotine and the neonicotinoids. In: Marrs TC editor. Mammalian Toxicology of Insecticides. 184–220.*
- *Rosenfeld P E, Feng L G H (2011) Risks of Hazardous Wastes. William Andrew Publishing 215-222*
- *Rubirola A, Rosa Boleda M R, Galceran M T (2017) Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters. Journal of Chromatography A, 1493:64–75*
- *Schaafsma A, Limay-Rios V, Baute T, Smith J, Xue Y (2015) Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario. PloS ONE 10(2): e0118139*
- *Seccia S, Fidente P, Barbini D A, Morrica P (2005) Multiresidue determination of neonicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 553:21–26*
- *Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces L P, Bonmatin J M, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons D W, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser D P, Krupke*

- C, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell E A D, Morrissey C A, Noome D A, Pisa L, Settele J, Stark J D, Tapparo A, Van Dyck H, van Praagh J, Van der Sluijs J P, Whitehorn P R, Wiemers M (2014) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. Environmental Science and Pollution Research 1:5-34*
- *Smit C E (2014) Water quality standards for imidacloprid. Proposal for an update according to the Water Framework Directive. RIVM Letter report 270006001/2014*
 - *Song M Y, Stark J D, Brown J J (1997) Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 2494-2500*
 - *Stachel B, Ehrhorn U, Heemken O P, Lepom P, Reincke H, Sawal W (2003) Spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. Environ Pollut 124:497–507.*
 - *Starner K & Goh K S (2012) Detection of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010–2011. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88, 316–321*
 - *Stoughton S J, Liber K, Culp J, Cessna A (2008) Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates Chironomus tentans and Hyalella azteca under constant – and pulse – exposure conditions. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 54, 662-673.*
 - *Sur R & Stork A (2003) Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. Bulletin of Insectology, 56, 35–40*
 - *Tapparo A, Marton D, Giorio C, Zanella A, Soldà L, Marzaro M, Vivan L, Girolami V (2012) Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. Environ Sci Technol 46:2592–2599*
 - *Teatini P, Isotton G, Nardean S, Ferronato M, Mazzia A, Da Lio C, Zaggia L, Bellafiore D, Zecchin M, Baradello L, Cellone F A, Corami F, Gambaro A, Libralato G, Morabito*

- E, Volpi Ghirardini A, Broglia R, Zaghi S, Tosi L (2017) Hydrogeological effects of dredging navigable canals through lagoon shallows. A case study in Venice Copernicus Publications; Hydrology And Earth System Sciences; 21; 11; 11-2017; 5627-5646*
- *USEPA (2010) Environmental fate and ecological risk assessment for the registration of clothianidin for use as a seed treatment on mustard seed (oilseed and condiment) and cotton*
 - *USEPA (2010) Bisphenol A Action Plan. (CASRN 80-05-7) CA Index Name: Phenol,4,4'-(1-methylethylidene) bis-. 2010-3-29*
 - *Van Dijk T C, Van Staalduinen M A, Van der Sluijs J P (2013) Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. Plos One 8(5):62374*
 - *Watts M M, Pascoe D, Carroll K (2001) Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A—effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). Aquat. Toxicol. 55:113–124*
 - *Xiao Z, Yanga Y, Li Y, Fana X, Shuangyang Dingb S (2013) Determination of neonicotinoid insecticides residues in eels using subcritical water extraction and ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 777:32– 40*
 - *Xie H, Wang X, Chen J, Li X, Jia G, Zou Y, Zhang Y, Cui Y (2019) Occurrence, distribution and ecological risks of antibiotics and pesticides in coastal waters around Liaodong Peninsula, China. Science of the Total Environment 656:946–951*
 - *Xu E G B, Liu S, Ying G, Gene J.S. Zheng G J S, Lee J H W, Leung K M Y (2014) The occurrence and ecological risks of endocrine disrupting chemicals in sewage effluents from three different sewage treatment plants, and in natural seawater from a marine reserve of Hong Kong. Marine Pollution Bulletin 85:352–362*
 - *Zaugg S D, Smith S G, Schroeder M P, Barber L B, Burkhardt M R (2002) Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality laboratory-Determination of Wastewater Compounds by Polystyrene–Divinylbenzene Solid-Phase*

Extraction and Capillary-Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Water-Resources Investigations Report 01-4186, US. Geological Survey, Denver, CO

- *Zewen L, Zhaojun H, Yinchang W, Lingchun Z, Hongwei Z, Chengjun L (2003) Selection for imidacloprid resistance in Nilaparvata lugens: cross-resistance patterns and possible mechanisms. Pest Management Science, 59, 1355-1359*
- *Zhang C, Tian D, Yi X, Zhang T, Ruan J, Wu R, Chen C, Huang M, Ying G (2019) Occurrence, distribution and seasonal variation of five neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Pearl Rivers, South China Chemosphere 217:437-446*
- *Zincke T (1905) Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium der Universitat Marburg. Justus Liebigs Annals Chemie 343:75–99.*

7.0 Appendice

7.1 Dati Ecotossicologici di Neonicotinoidi su Specie Acquatiche

Composto	Specie	Gruppo	Habitat	LD50	LC50	Fonte
Thiacloprid	Oncorhynchus mykiss	pesce	acqua dolce, USA		30.5 ppm (96h)	Anon 2001
Clothianidin	Oncorhynchus mykiss	pesce	acqua dolce, USA		106 ppm (96h)	De Cant & Barrett 2010
Thiacloprid	Lepomis macrochirus	pesce	acqua dolce, USA		16-28 ppm (96h)	Anon 2001b
Clothianidin	Lepomis macrochirus	pesce	Acqua dolce, USA		117 ppm (96h)	De Cant & Barrett 2010
Clothianidin	Cyprinodon variegatus	pesce	Acqua dolce, USA		93.6 ppm (96h)	De Cant & Barrett 2010
Imidacloprid	Triatoma infestans	insetto	Acqua dolce, tropici	5.2-9.2 ng/insetto		Carvayal et al. 2012
Imidacloprid	Nilaparvata lugens	insetto	Acqua dolce, Asia	0.82 ng/insetto		Zewen et al. 2003

Imidaclo- prid	Epeorus longima- nus	insetto	Acqua dolce, USA		2.1 ppb (24h)	Alexander et al. 2007
Imidaclo- prid	Chirono- mus ten- tans	insetto	Acqua dolce, cosmo- polita		5.7 ppb (96h)	Stoughton et al. 2008
Imidaclo- prid	Aedes taenio- rhynchus	insetto	Zone co- stiere, USA		13 ppb (48h) ov- vero 13000 ng/L	Song et al. 1997
Thiaclo- prid	Simpetrum striolatum	insetto	Acqua dolce, EU		31 ppb (24h)	Beketov & Liess 2008
Thiaclo- prid	Culex pi- piens	insetto	Acqua dolce, emi- sfero boreale		6.8 ppb (24h)	Beketov & Liess 2008
Clothia- nidin	Mysidopsis bahia	Crosta- ceo	Acqua dolce, USA		51 ppb (96h)	De Cant & Barrett 2010
Imidaclo- prid	Hyalella azteca	crosta- ceo	Acqua dolce, USA		65 ppb (96h)	Stoughton et al. 2008

					7.1 ppb (28 day)	
Imidaclo- prid	Daphnia Magna	Crosta- ceo	Acqua dolce, USA		17.4 ppm (48h)	Song et al. 1997
Thiaclo- prid	Daphnia Magna	Crosta- ceo	Acqua dolce, USA		4.4 ppm (24h)	Beketov & Liess 2008
Imidaclo- prid	Artemia sp.	Crosta- ceo	Zone co- stiere, cosmo- polita		361 ppm (48h)	Song et al. 1997
Thiaclo- prid	Asellus aquaticus	Crosta- ceo	Acqua dolce, EU		153 ppb (24h)	Beketov & Liess 2008
Thiaclo- prid	Gammarus pulex	Crosta- ceo	Acqua dolce, EU		190 ppb (24h)	Beketov & Liess 2008
Imidaclo- prid	Ceriodaph- nia dubia	Crosta- ceo	Acqua dolce, cosmo- polita		2.1 ppb	Pisa et al. 2014
Imidaclo- prid	Tubifex tu- bifex	anellide	Sedi- menti laghi e		300 ppb (24h)	Gerhardt 2009

			fiumi, cosmo- polita			
--	--	--	----------------------------	--	--	--

Tabella 24 Dati ecotossicologici di neonicotinoidi su specie acquatiche

7.2 Dati Sui Tempi di Dimezzamento di Neonicotinoidi nei Terreni

I seguenti dati sono riportati da Goulson (2013).

Neonicotinoide	DT ₅₀ (giorni)	Tipo di terreno
Acetamiprid	450	Argilloso limoso
	388	Franco argilloso
Imidacloprid	990-1230	Sabbioso
	455-518	Sabbioso
	233-366	Argilloso limoso
	34-45	Alluvionale
	28-44	Lateritico
	36-46	Costiero
	1250	Argilloso
Clothianidn	6931	Sabbia argillosa
	1386	Franco argilloso
	1155	Terriccio
	990	Sabbioso
	693	Franco limoso
	578	Franco limoso
	533	Sabbioso
	533	Argilloso limoso

	495	Franco limoso
	365	Franco limoso
	315	Sabbioso
	277	Franco limoso
	239	Limoso
	148	Argilloso limoso
Thiacloprid	74	Sabbioso
Thiamethoxam	294, 353	Sabbioso
	34, 233	Franco argilloso

Tabella 25 Tempo di dimezzamento in giorni di neonicotinoidi in vari terreni.

7.3 Approfondimento sugli Standard di Qualita' della WCA

La WCA usa per le PNEC dell'acqua una derivazione probabilistica: la SSD ovvero Species Sensitivity Distribution (SSD). Si tratta di un modello statistico per valutare gli effetti di un singolo agente chimico su diverse specie. Dall'SSD si ricava l'HC5 ovvero la concentrazione a cui il 5% delle specie testate subiscono un effetto. L'HC5 si divide per un fattore di sicurezza che serve a compensare incognite come ad esempio l'incertezza dovuta al fatto che i

test ecotossicologici sono svolti in laboratorio e non in campo: così facendo si ottengono le PNEC.

Per il sedimento la PNEC si calcola in modo deterministico: si applica un fattore di sicurezza alla NOEC più bassa disponibile nei dati ecotossicologici.

Le PNEC per l'acqua dolce a breve termine si ricavano dai dati ecotossicologici di 13 differenti specie e 29 valori individuali di LC/EC50. I gruppi tassonomici considerati nei test sono:

- Alghe (1 specie)
- Cnidari (1 specie)
- Molluschi (1 specie)
- Crostacei (2 specie)
- Insetti (1 specie)
- Platelminti (1 specie)
- Pesci (3 specie)
- Anfibi (3 specie)

Le PNEC per l'acqua marina a breve termine si ricavano dai dati ecotossicologici di 13 differenti specie e 15 valori individuali di LC/EC50. I gruppi tassonomici considerati nei test sono:

- Alghe (3 specie)
- Molluschi (1 specie)
- Crostacei (4 specie)
- Echinodermi (2 specie)
- Ascidi (1 specie)
- Pesci (2 specie)

Le PNEC per l'acqua dolce a lungo termine si ricavano dai dati ecotossicologici di 21 differenti specie e 30 valori individuali di NOEC/EC10. I gruppi tassonomici considerati nei test sono:

- Microalghe (1 specie)
- Piante superiori (1 specie)
- Poriferi (1 specie)
- Cnidari (2 specie)
- Rotiferi (1 specie)
- Molluschi (3 specie)
- Crostacei (4 specie)
- Insetti (1 specie)
- Pesci (6 specie)
- Anfibi (1 specie)

Le PNEC per l'acqua marina a lungo termine si ricavano dai dati ecotossicologici di 8 differenti specie ed 8 valori individuali di NOEC/EC10. I gruppi tassonomici considerati nei test sono:

- Alghe (2 specie)
- Molluschi (1 specie)
- Crostacei (1 specie)
- Echinodermi (3 specie)
- Ascidi (1 specie)

La PNEC per il sedimento si ricavano dai dati ecotossicologici di 4 differenti specie e 4 valori individuali di NOEC. I gruppi tassonomici considerati nei test sono:

- Invertebrati (4 specie)

7.4 Dati Ecotossicologici di BPA su Specie Acquatiche

Specie	Gruppo	Habitat	Concentrazione testata	Fonte
Capitella capitata	Anellide	Sedimento marino, cosmopolita	11.4 µg/L	Biggers & Laufer 2004
Marisa Cornuarietis	Mollusco	Sedimento d'acqua dolce, cosmopolita	1 µg/L	Ohelmen et al. 2000
Potamopyrgus antipodarum	Mollusco	Sedimento d'acqua dolce, cosmopolita	5 µg/L	Jobling et al. 2004
Mytilus edulis	Mollusco	Sedimento marino, nord europa	50 µg/L (tre settimane)	Aarab et al. 2006
Mytilus galloprovincialis	Mollusco	Sedimento marino, mar Mediterraneo	5.7 µg/L	Canesi et al. 2007

Daphnia magna	Crosta- ceo	Acqua dolce, co- smopolita	240-1280 µg/L	Ohel- mann et al. 2009
Acartia tonsa	Crosta- ceo	Acqua sa- lata, co- smopolita	100 µg/L	Ander- sen et al. 2001
Tigriopus japonicus	Crosta- ceo	Acqua sa- lata, co- smopolita	0.1 µg/L	Marcial et al. 2003
Chronomus riparius	Insetto	Acqua dolce, eu- ropa	78 ng/L	Watts et al. 2001

Tabella 26 Dati ecotossicologici di BPA su specie acquatiche

7.5 La Laguna di Venezia e la Marea

La laguna di Venezia è localizzata a nord ovest del bacino settentrionale del Mar Adriatico; ha una superficie complessiva di circa 550 km² ed è compresa fra i fiumi Brenta a sud e Sile a nord. Della superficie lagunare totale, circa l'80% risulta coperto in maniera stabile da acqua, il 10% da barene e il 5% da isole.

La conformazione attuale è il risultato di un complesso di eventi naturali ed antropici.

La laguna di Venezia è delimitata dal mare da un cordone litoraneo costituito dai lidi di Sottomarina, Pellestrina, lido di Venezia e Cavallino. I lidi sono separati dalle bocche di porto di Chioggia, Malamocco e Lido.

L'ecosistema lagunare comprende un bacino scolante che si estende per oltre 2000 km² e che ospita la rete idrica superficiale di 108 comuni veneti (Cremonese 2014).

La laguna è costituita da una rete di canali che portano la marea fino alle parti più interne; quest'ultime sono caratterizzate da un ridotto ricambio idrico. Lo scambio mare-laguna condiziona lo stato delle acque e delle comunità biologiche.

La profondità media della colonna d'acqua è di circa 1 metro. La laguna centro-settentrionale risulta caratterizzata dalla presenza di sedimenti a granulometria più fine, di tipo limoso-argilloso, mentre i fondali meridionali vedono la prevalenza di sedimenti più grossolani di tipo limoso-sabbioso e sabbia limosa. In generale il gradiente granulometrico lagunare passa dai sedimenti più fini, presenti nelle aree più interne della laguna, a quelli più grossolani nelle aree più vicine alle bocche di porto a causa della maggiore forza erosiva delle correnti.

La laguna è caratterizzata da un'escursione di marea pari a circa $\pm 0,7$ m (relativamente ad un intero ciclo lunare) definita microtidale e da un ciclo semidiurno (<https://www.venezia.isprambiente.it/la-marea>). Le maree sono periodici movimenti di innalzamento e abbassamento della superficie del mare causati dall'attrazione del Sole e della Luna sulle masse d'acqua presenti sulla Terra; un altro fattore da tenere in considerazione sono le perturbazioni meteorologiche. La fase di innalzamento raggiunge il suo culmine nel momento di massima elevazione del livello marino, detta alta marea, mentre la fase di abbassamento termina con la minima elevazione della superficie marina, detta bassa marea. La differenza tra alta e bassa marea viene denominata escursione o ampiezza di marea. In base alla periodicità delle maree è possibile classificarle come:

- diurne quando si verifica una sola alta marea ed una sola bassa marea al giorno;
- semidiurne, quando si verificano due alte e due basse maree al giorno di ampiezza poco diversa
- maree miste, quando si verificano due alte e due basse maree al giorno di ampiezza molto diversa.

La marea registrata in una certa località è sempre data dalla somma di due fattori: la componente astronomica e quella meteorologica.

L'oscillazione quotidiana delle masse d'acqua marine sotto l'influenza della forza gravitazionale del sistema Terra-Luna-Sole, viene definita marea astronomica. All'interno del bacino del Mediterraneo, in particolare nell'Adriatico settentrionale, le escursioni mareali raggiungono un'altezza massima di un metro circa (maree microtidali); sulle coste del Canale della Manica l'escursione della marea può raggiungere i 10 metri circa (maree macrotidali). Il livello della marea viene influenzato anche da fattori meteorologici tra i quali i più rilevanti sono le variazioni di pressione atmosferica ed il vento.

L'onda di marea subisce un forte rallentamento all'entrata in laguna e raggiunge diverse località con ritardi differenti. L'altezza della marea viene smorzata all'interno della laguna, per effetto dell'attrito sviluppato dai bassi fondali e dall'andamento sinuoso dei canali più interni.

La capacità della laguna di opporre resistenza all'onda di marea può variare nel tempo, a seguito di modifiche morfologiche indotte sia da cause naturali che di origine antropica. Un importante intervento antropico è stato la diversione di vari alvei fluviali (Brenta, Bacchiglione, Piave, Sile) al fine di scongiurare il rischio di interrimento della laguna o delle bocche di porto. Altrettanto importante è stata la costruzione dei Murazzi, dighe costruite dalla Serenissima a rinforzo e protezione dei litorali. Dalla fine del XIX secolo in poi sono stati effettuati gli interventi più importanti: la costruzione delle dighe armate alle tre bocche di porto (Lido, Malamocco e Chioggia) e la costruzione dei canali commerciali (Vittorio Emanuele e Canale dei Petroli) a favore della zona industriale di Porto Marghera. Negli ultimi anni sono stati eseguiti i lavori alle bocche di porto per la costruzione delle paratoie mobili a protezione della laguna dagli eventi di acqua alta (MoSE - Modulo Sperimentale Elettromeccanico). Questi lavori hanno comportato la costruzione di una nuova isola artificiale all'interno della bocca di porto di Lido, il rinforzo delle dighe esistenti, la costruzione delle lunate a protezione dalle mareggiate provenienti da sud-est, lo scavo ed il dragaggio delle bocche di porto per l'alloggiamento dei cassoni che ospiteranno le paratoie mobili

7.6 Lo Strumento

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) si accoppia alla MS (Mass Spectrometry), in figura 9 un esempio di strumentazione di questo tipo.



Figura 9 Un cromatografo liquido accoppiato a spettrometro di massa con triplo quadrupolo

Lo spettrometro di massa diventa il rivelatore del cromatografo liquido. Il vantaggio di usarlo al posto di altri rivelatori cromatografici (spettrofotometro UV, fluorimetro ecc.) è l'ottenimento di una maggiore sensibilità e selettività della risposta strumentale.

L'analizzatore dell'MS usato in questo lavoro è un triplo quadrupolo, figura 10.

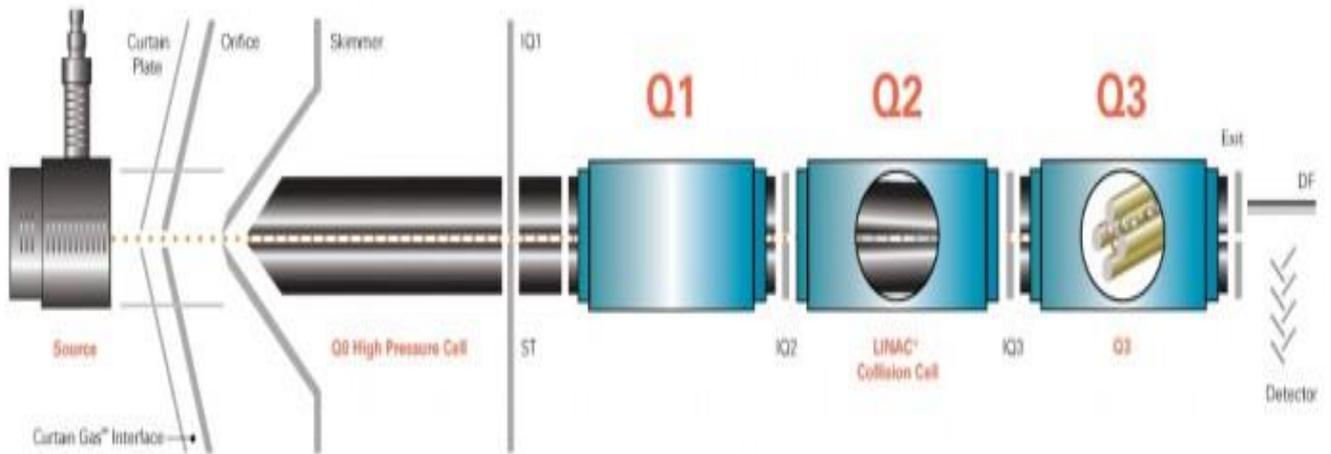


Figura 10 Schema del triplo quadrupolo

Il Q0 lavora per trasferire gli ioni, il Q2 come cella di collisione, Q1 e Q3 come filtri di massa.

In questa tesi il triplo è stato usato in modalità MRM ovvero Multiple Reaction Monitoring. Il Q1 si usa in SIM e si seleziona l' m/z a più alta intensità. In un secondo momento si usa il Q1 in SIM selezionando l' m/z selezionata, il Q2 frammenta, il Q3 si usa in SIM selezionando il frammento a più alta intensità di segnale. In figura 11 la differenza tra analisi in modalità di lavoro full scan, SIM e MRM.

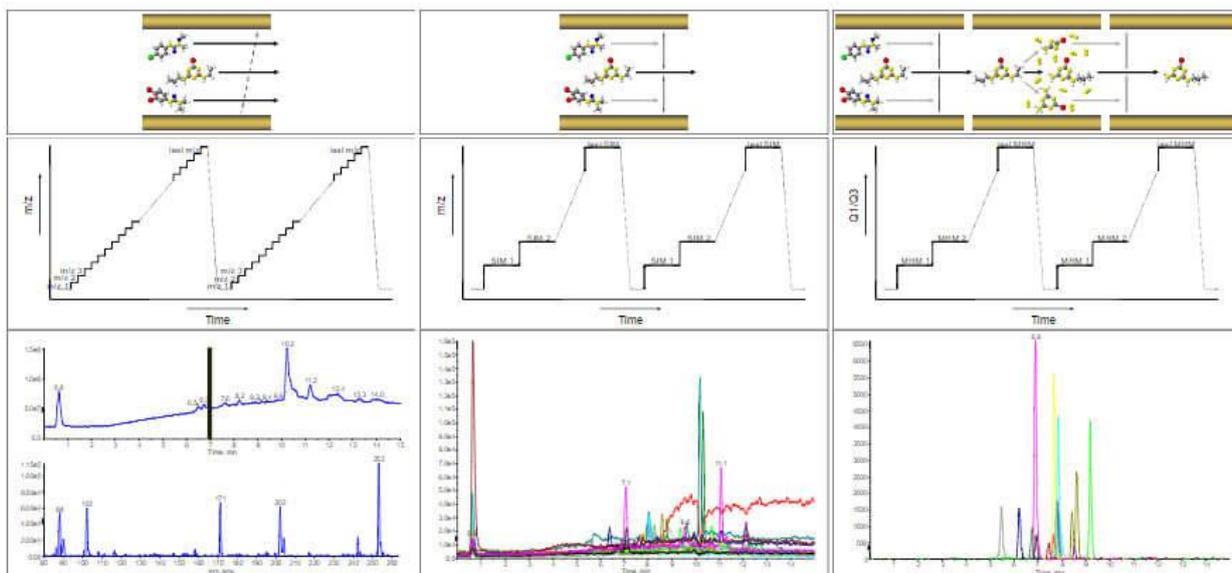


Figura 11 Pesticidi estratti da un campione di suolo (non di questa tesi) rilevati con differenti modalità di lavoro del triplo (da sx a dx): full scan con spettro MS (50 µg/kg), Selected Ion Monitoring (5 µg/kg), e Multiple Reaction Monitoring (5 µg/kg)

La modalità MRM garantisce migliore sensibilità, il rapporto S/N è maggiore permettendo LOQ più bassi (<https://sciex.com/x51131>) (fig. 12).

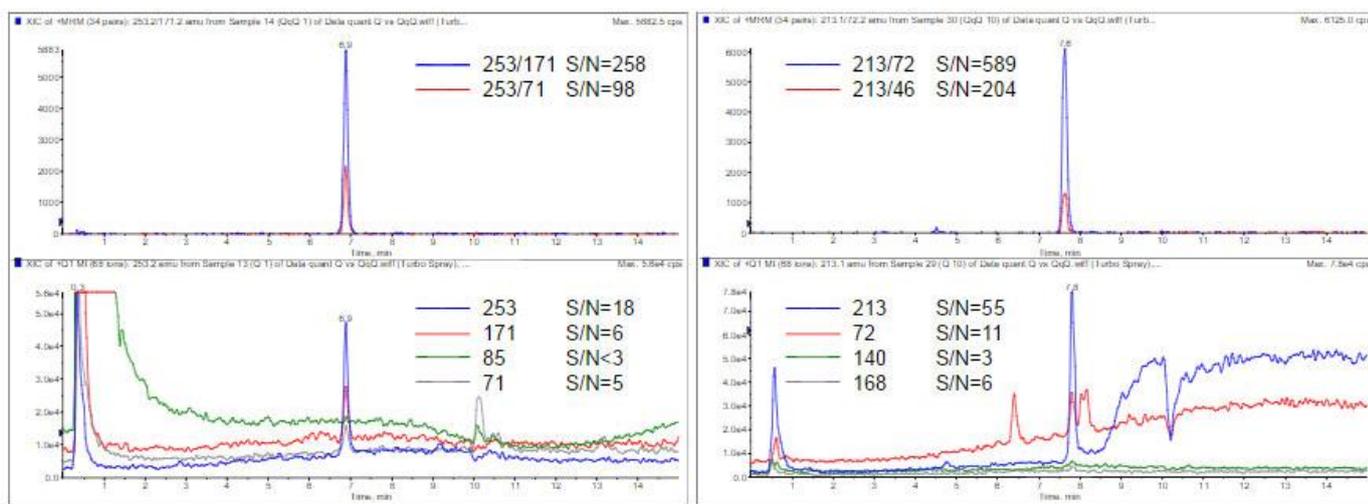


Figura 12 Paragone di sensibilità dell'analisi di Hexazone 1 µg/L (sx) e Chlartoluron 10 µg/L (dx) in acqua potabile in modalità MRM (sopra) e SIM (sotto)

I parametri del triplo da ottimizzare sono:

- dwell time
- declustering potential
- entrance potential
- collision energy
- collision cell exit potential
- collision gas

La sorgente dell'MS è la Turbo V in modalità ESI cioè electrospray ionization, fig. 13.

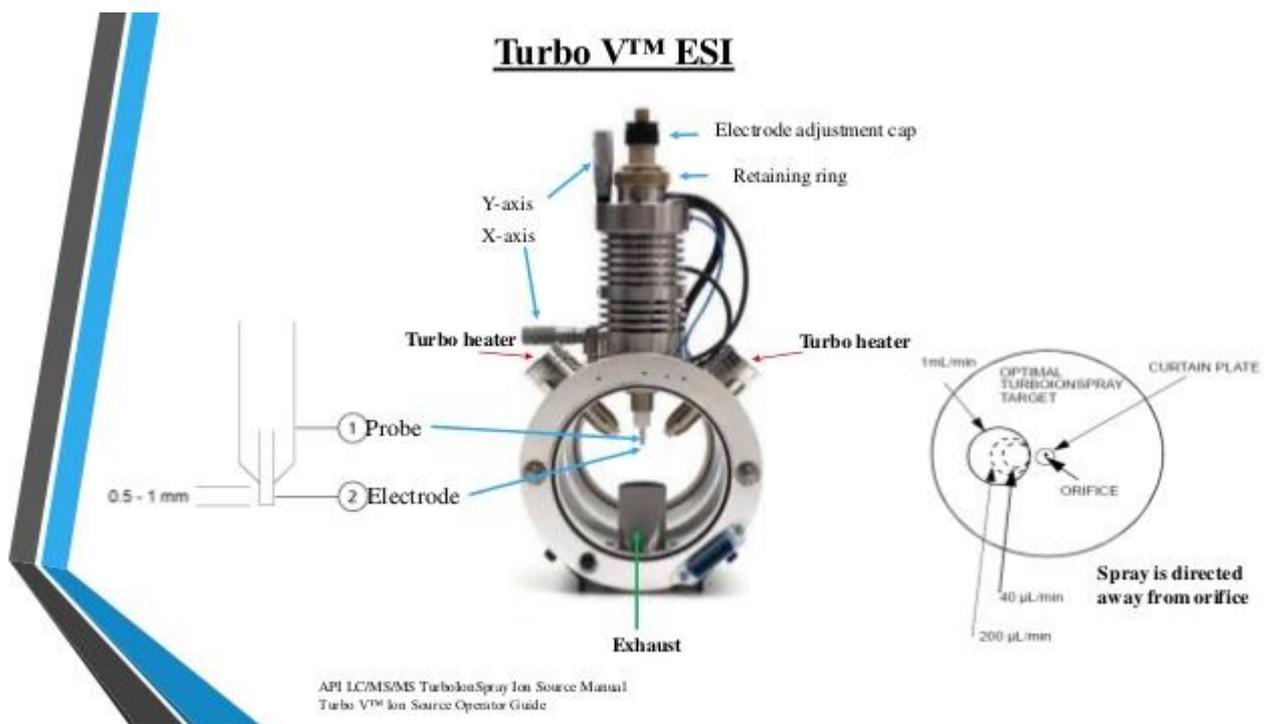


Figura 13 La sorgente Turbo V in modalità ESI

I parametri da ottimizzare della sorgente ESI sono:

- Source Temperature
- Nebulizer gas
- Auxiliary gas
- Curtain gas 20
- Ionization voltage

Il detector dello spettrometro di massa è un elettromoltiplicatore CEM (channel electron multiplier) composto da un dispositivo a dinodo continuo, fig. 14.

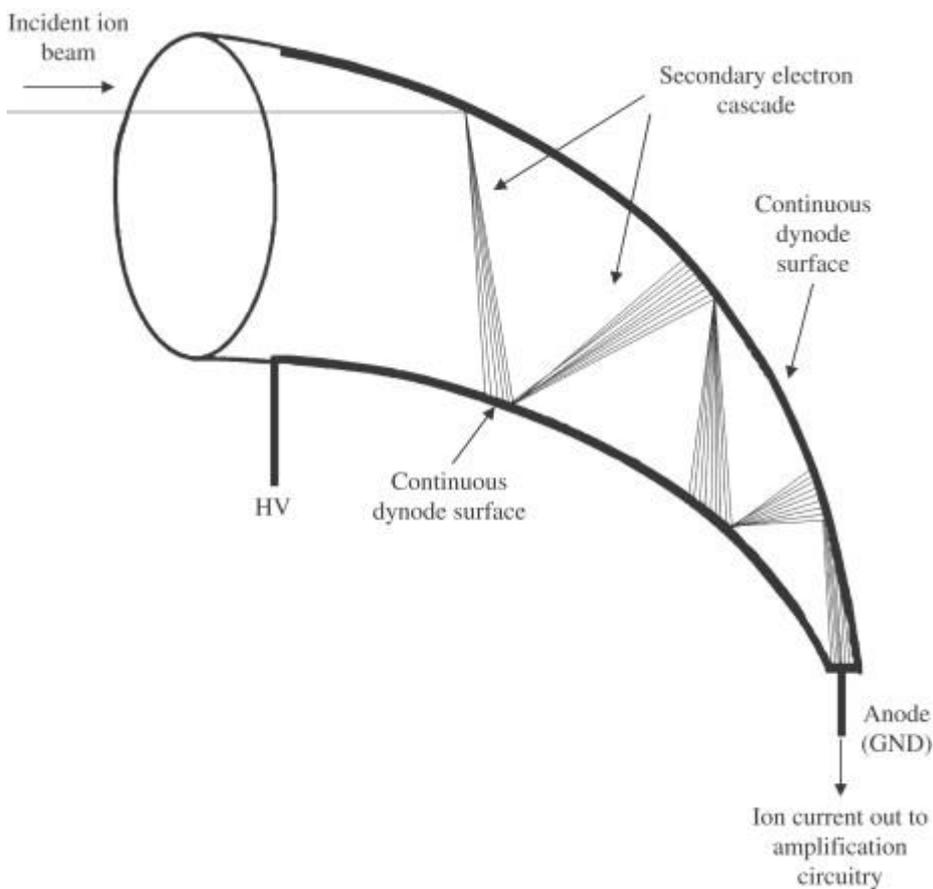


Figura 14 Schema di un elettromoltiplicatore CEM

Gli ioni in arrivo dal Q3, sono portati da un sistema di lenti focalizzatrici verso il detector che ha una struttura cilindrica curva. Quando una particella carica colpisce una superficie

metallica emissiva (dinodo) vengono rilasciati degli elettroni secondari dagli atomi della superficie stessa. Il numero di elettroni secondari dipende dalla particella incidente, la sua energia e dalle caratteristiche della superficie. Quando uno ione collide con la superficie del cilindro si ha il rilascio di numerosi elettroni che verranno moltiplicati nelle successive collisioni con le pareti. Per effetto del gradiente di potenziale presente, gli ioni sono convogliati verso l'uscita del cono dove il segnale elettrico viene tradotto in segnale digitale.

Per quanto riguarda l'HPLC (fig. 15) la separazione degli analiti si basa sulla ripartizione tra fase mobile e stazionaria.

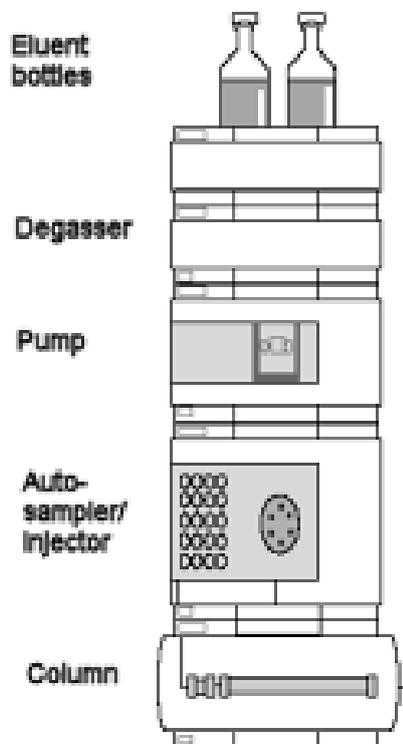


Figura 15 Schema di un HPLC

In questo lavoro la colonna analitica è stata una Hydro RP della Phenomenex. Si tratta di una colonna C18 a fase inversa con un rivestimento polare, fig. 16.

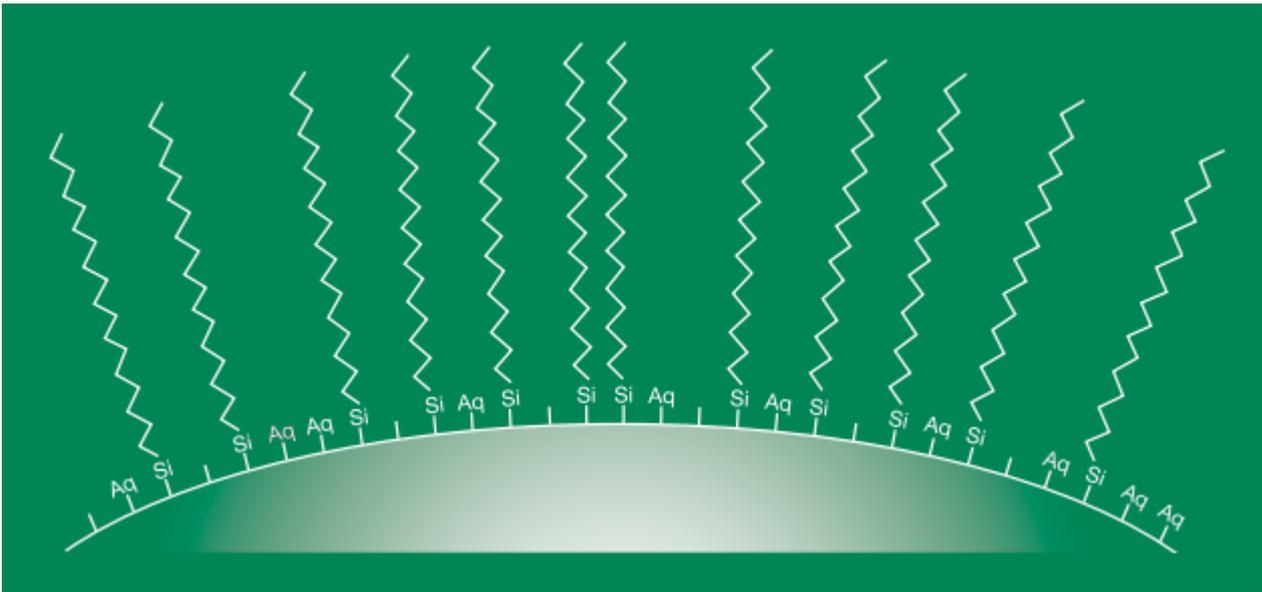


Figura 16 Fase stazionaria della colonna Hydro-RP Phenomenex

Una colonna a fase inversa possiede un rivestimento non polare legato al substrato di silice. Per funzionalizzare il substrato si fa reagire lo stesso con un silano. Rimangono dei silanoli che vengono fatti reagire ad esempio con il trimetilsililcloruro con formazione di $\text{Si-O-Si}(\text{CH}_3)_3$, figura 17. Così facendo si protegge la silice da eventuali reazioni indesiderate.

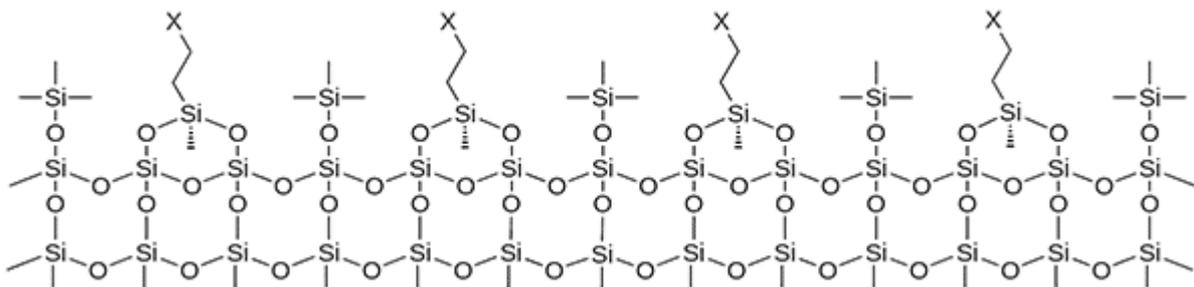


Figura 17 Substrato funzionalizzato senza silanoli liberi

La colonna Hydro-RP ha un rivestimento polare aggiuntivo infatti è del tipo “polar endcapped C18”, figura 18 (O’ Sullivan et al 2010).

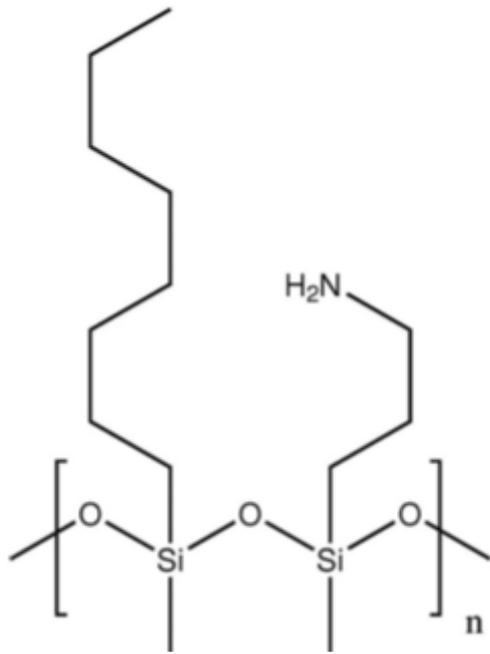


Figura 18 Fase stazionaria polar endcapped

Ringraziamenti

Ringrazio il Professore Andrea Gambaro che ha reso possibile lo svolgimento di questa esperienza.

Ringrazio Roberta Zangrando per avermi trasmesso una grande quantità d'informazioni tecniche e scientifiche durante il periodo di tirocinio.

Ringrazio Elena Barbaro per avermi aiutato nella fase di elaborazione dati.

Ringrazio Matteo Feltracco, Nicola Ceolotto, Gabriele Di Stefano, Carlo Bragato, Fabiana Corami e Marco Vecchiato.