



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie

Produzione, qualità e sicurezza alimentare XXXVI ciclo

Determinazione quali-quantitativa di tre antibiotici in *Mytilus galloprovincialis* raccolti nelle coste della Sardegna

Relatore

Prof.ssa Maria Vittoria Varoni

Tesi sperimentale di Dottorato di

Dott.ssa Filomena Dessì

Correlatore

Dott.ssa Elena Baralla

Coordinatore

Prof. Alberto Alberti

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

<i>Abstract</i>	1
<i>Capitolo I Introduzione</i>	3
1.1 <i>I farmaci come contaminanti emergenti</i>	4
1.2 <i>Gli antibiotici</i>	7
1.3 <i>Macrolidi e sulfamidici</i>	11
1.4 <i>Antibiotico resistenza</i>	14
1.5 <i>Metodi di rilevazione comunemente utilizzati</i>	17
1.6 <i>La mitilicoltura</i>	20
1.7 <i>Biomonitoraggio: “Mussel watch”</i>	22
1.8 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	24
1.9 <i>La Filiera dei molluschi</i>	28
<i>Capitolo II Scopo della tesi</i>	30
<i>Capitolo III Materiali e metodi</i>	34
3.1 <i>Sostanze utilizzate</i>	35
3.2 <i>Campionamento</i>	35
3.3 <i>Siti di campionamento</i>	37
3.3.1 <i>Golfo di Olbia:</i>	37
3.3.2 <i>Golfo di Oristano</i>	37
3.3.3 <i>Laguna di Cagliari</i>	38
3.3.4 <i>Stagno di Cirdu</i>	39
3.3.5 <i>Laguna di San Giovanni</i>	39
3.4 <i>Preparazione del campione</i>	40
3.5 <i>Metodo analitico</i>	42
3.6 <i>Validazione del metodo analitico</i>	47
<i>Capitolo IV Risultati e discussione</i>	53
<i>Capitolo V Conclusioni e prospettive future</i>	63

Bibliografia..... 65

Abstract

The health of humans, animals, and the environment are strictly interconnected. We can be infected by the same agents and treated with the same drugs, affecting each other's health.

Antibiotics are used for therapeutic and prophylactic purposes in both human and veterinary medicine and still in some countries as growth-promoting agents in livestock farms and aquaculture. They can accumulate in environmental matrices and the food chain, causing adverse effects in humans and animals, including the development of antibiotic resistance.

Moreover, antibiotics are considered among the most worrying 'emerging contaminants', both because their cumulative toxic effects on aquatic organisms are not well known, and because their continued presence in the environment leads to the development of antibiotic-resistant bacteria. Also, they can act at low concentrations by modifying the natural microbial diversity of aquatic ecosystems. For several years, the Pharmacology and Toxicology research group of the Department of Veterinary Medicine in Sassari has been working on the validation of new analytical methods for the identification and quantification of emerging contaminants in biological matrices. The aim of this thesis is to develop an analytical method for the simultaneous quantitative determination of antibiotics in a biological matrix. Specifically, the *Mytilus galloprovincialis* was used, a mussel species present and cultivated in Sardinia, and used as a “sentinel organism” in environmental monitoring programs.

The analytical method was validated for the simultaneous determination of erythromycin, azithromycin and sulfamethoxazole using liquid chromatography interfaced with the tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). None of the three investigated antibiotics were found in the samples analyzed at concentrations above the method's limits of determination (LODs). The results therefore demonstrate the healthiness of the mussels about food safety, and a negligible pollution factor for the antibiotics chosen in the studied areas.

Capitolo I
Introduzione

1.1 I farmaci come contaminanti emergenti

La forte crescita della popolazione mondiale, l'aumento della richiesta di cibo e il miglioramento del tenore di vita, hanno determinato un aumento del consumo di farmaci ad uso umano e veterinario per la cura e la prevenzione delle malattie. Oggi alcuni prodotti farmaceutici, tra cui i farmaci, sono riconosciuti come una minaccia per gli ecosistemi (Mezzelani et al., 2018). Da ciò ne consegue una maggiore attenzione per l'impatto che questi ultimi possono avere sull'ambiente, gli animali e l'uomo.

I farmaci presenti nell'ambiente sono numerosi, diversi e ubiquitari e sono raggruppati in classi secondo il loro uso o a seconda delle loro caratteristiche. Molti di essi sono considerati "*contaminati emergenti*", intendendo con il termine *emergenti* sostanze non necessariamente scoperte di recente ma anche sostanze già note per le quali i programmi di monitoraggio possono risultare insufficienti per valutare il rischio. Un'altra accezione del termine "*emergenti*" è la distinzione dai contaminanti classici come ad esempio i metalli pesanti e gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), di cui esiste un'ampia letteratura scientifica (Jebali et al., 2014; G & J, 1996; Kavun et al., 2002) e soprattutto regolamenti che ne stabiliscono i limiti massimi negli alimenti (Regolamento (UE) N. 2023/915, 2023). L'Agenzia statunitense per la Protezione dell'Ambiente (EPA) definisce gli inquinanti emergenti come sostanze chimiche prive di regolamento normativo e il cui impatto sull'ambiente, sulla salute umana e animale non è ancora noto. Diversi farmaci sono inseriti in una più grande categoria di prodotti definita

“*Pharmaceutical and Personal Care Products*” indicati dall’acronimo PPCPs. In questa categoria sono inseriti anche i prodotti per la cura della persona come sciampi, profumi, creme solari, eccipienti e tensioattivi (Daughton & Ternes, 1999). Ai PPCPs appartengono varie classi di farmaci e sostanze d’abuso, meglio schematizzati in **Tabella 1**.

La loro presenza è nota da molti anni, soprattutto negli ecosistemi acquatici (Cleuvers, 2003) e la preoccupazione è data dal fatto che poco si sa sul fenomeno di bioaccumulo e degli effetti a medio e lungo termine che queste sostanze possono indurre. Per tale ragione è stata creata la branca della farmacovigilanza nota come eco-farmacovigilanza. Il termine fu usato per la prima volta dal prof. Velo e ad oggi si usa per indicare le scienze e le attività associate all’individuazione, valutazione, comprensione e prevenzione degli effetti avversi dei prodotti farmaceutici nell’ambiente (Holm et al., 2013).

Tra i prodotti farmaceutici, gli antibiotici sono una delle categorie maggiormente utilizzate, con applicazioni in campo umano e veterinario, incluso l’allevamento e l’acquacoltura, nella profilassi e come promotori di crescita (permesso solo in alcune parti del mondo) (Binh et al., 2018; Van Boeckel et al., 2015).

Classi di PPCPs	Principio attivo
Penicilline	Amoxicillina
Tetracicline	Tetraciclina, clortetraciclina, ossitetraciclina
Chinoloni	Ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, enfloxacina
Macrolidi	Claritromicina, eritromicina, deidroeritromicina
Lincosamidi	Lincomicina, spiramicina, roxitromicina
Sulfamidici	Sulfametossazolo, sulfadimetossina, sulfasalazina, sulfatiazolo
Antiinfiammatori- Analgesici	Ibuprofene, paracetamolo, diclofenac, aminofenazone, codeina, fenopropene, idrocortone, indometacina, ketoprofene, acido mefenamico, naprossene, fenazone, propafenone, etc.
Cardiovascolari	Atenololo, Metoprololo, Propanololo, Betaxololo, Bisoprololo, Nadololo, Sotalolo, Enalapril, Nifedipina, Diltiazem
Ipolipemizzanti	Bezafibrato, acido clofibrico, gemfibrato, acido fenofibrico
Diuretici	Furosemide, idroclorotiazide
Antidiabetici	Glibenclamide, metformina, clorpropamide
Gastrointestinali	Omeprazolo, ranitidina, cimetidina
Farmaci per il SNC	Carbamazepina, Primidone, Diazepam, Fluoxetina, fenobarbital, fensuccimide
Broncodilatatori	Salbutamolo, Terbutalina, Clenbuterolo, Fenoterolo
Estrogeni, Ormoni	Etinilestradiolo, mestranolo
Antitumorali	Ciclofosfamide, ifosfamide
Mezzi di contrasto	Acido amidotrizoico, lopamidolo, ioexolo
Sostanze d'abuso	Cocaina, amfetamina, caffeina

Tabella 1. Principali “*Pharmaceutical and Personal Care Products*” (PPCPs) trovati nell’ambiente (Daughton & Ternes, 1999; Heberer, 2002; Pal et al., 2013)

1.2 Gli antibiotici

La parola antibiotico deriva dal greco, e più precisamente da *anti* (contro) e *bios* (vita), quindi il significato letterale è contro la vita.

Gli antibiotici sono in grado di interferire con la crescita e la moltiplicazione batterica. Un antibiotico ideale dovrebbe essere dotato di tossicità selettiva nei confronti dei microrganismi ma non nei confronti delle cellule eucariote. Maggiore è la selettività, minori saranno gli effetti collaterali per l'organismo ospite.

Gli antibatterici sono in genere distinti in batteriostatici quando rallentano e/o inibiscono la crescita e la replicazione batterica e battericidi quando sono in grado di determinarne la morte. Inoltre, possono essere classificati in base alla struttura chimica e distinti sulla base dei meccanismi d'azione e l'ampiezza dello spettro d'azione.

I principali meccanismi d'azione sono schematizzati in **Figura 1**.

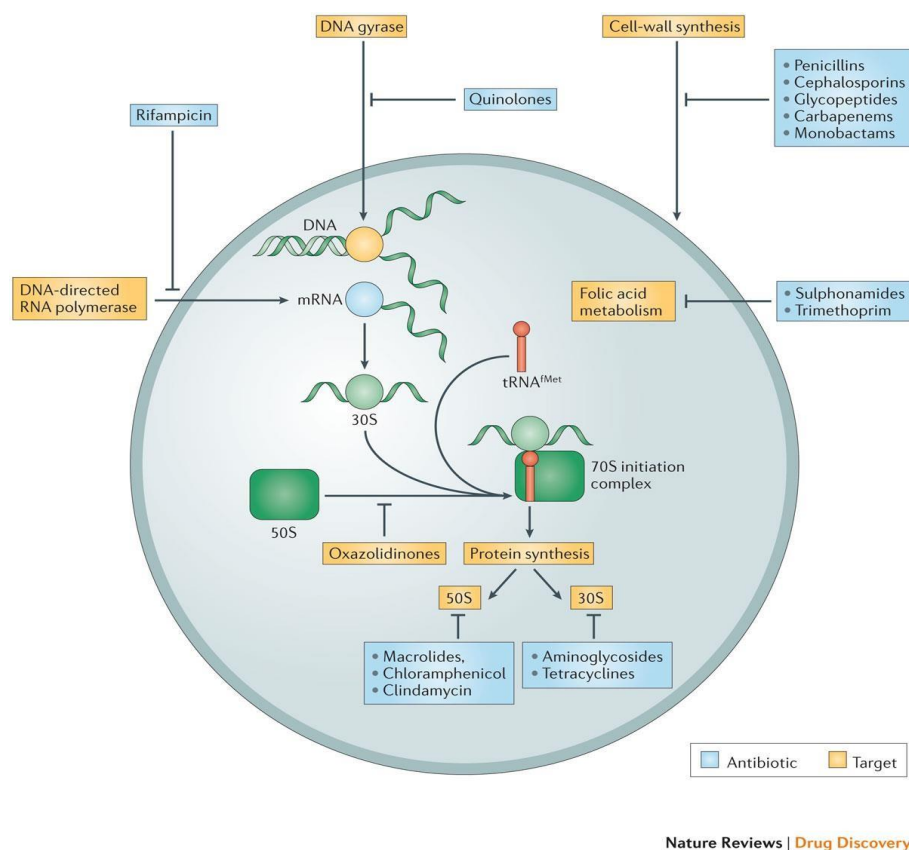


Figura 1. Principali siti d'azione degli antibiotici (Mayer et al., 2021)

Gli antibiotici sono diventati, oggi, fondamentali per la cura delle infezioni batteriche e indispensabili per la sopravvivenza umana e animale. Il loro uso negli ultimi decenni è aumentato a livello globale. Le ragioni di questo aumento possono essere ricondotte a due motivazioni principali: la prima è data dall'aumento della popolazione mondiale che ne determina un maggior utilizzo, la seconda è data da un aumento della richiesta di cibo di origine animale e quindi un aumento dell'utilizzo degli antibiotici nell'allevamento e nell'acquacoltura.

Un aumento del consumo globale in campo umano del 46% è stato notato dal 2000 al 2018 (Browne et al., 2021). Questo trend è destinato ad aumentare ulteriormente nei prossimi decenni soprattutto per l'enorme richiesta di questi farmaci in paesi con un'economia

emergente come Russia, Brasile, India, Cina e Sud Africa (Oharisi et al., 2023). Secondo il rapporto dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA, 2021), nel 2021 in Italia è stata riscontrata una riduzione del 3,3% del consumo di antibiotici rispetto al 2020, anche se i consumi risultano ancora superiori ad altri paesi europei. In questi ultimi il consumo medio pro capite era di 15,01 dosi ogni mille abitanti die (DDD), solo lo 0,4 % in più rispetto al 2020, dato che tra l'altro deve tenere in considerazione la copresenza dell'infezione Sars-Covid 19. L'Italia è al di sopra rispetto alla media europea con un consumo di 15,99 DDD, principalmente per il consumo di β -lattamici, penicilline, macrolidi, sulfamidici e trimetoprim (AIFA 2021). In un recente studio pubblicato nel 2023 è stato messo in luce l'incremento nell'utilizzo di antibiotici a livello globale durante la pandemia COVID 19, tra il 2020 e il 2022, soprattutto di cefalosporine, penicilline, macrolidi e tetracicline (Nandi et al., 2023).

Per quanto riguarda l'uso veterinario, il consumo di antibiotici a livello globale negli animali da allevamento superava, già nel 2013, quello umano, con un consumo di 118.940 tonnellate e con un aumento del 52% previsto entro il 2030. Si stima che i maggiori consumatori di antibiotici per animali da allevamento saranno entro il 2030 la Cina con il 30%, gli Stati Uniti con il 10 %, il Brasile con l'8%, l'India con il 4% e il Messico con il 2%.

Gli antibiotici maggiormente utilizzati in ambito veterinario sono le tetracicline (33,4%), le penicilline (25%), i sulfamidici (11%), i macrolidi (7,5%) i fluorchinoloni (1,9%) e le cefalosporine (0,2%) (Oberoi et al., 2019).

L' utilizzo in quest'ambito è normato da molti anni sia a livello nazionale che internazionale al fine di combattere e prevenire il fenomeno dell'antibiotico resistenza.

Tra le principali misure adottate dall'Italia, su indicazione delle norme Europee (Regolamento CE N.1831/2003), vi è il divieto nell'utilizzo di antibiotici come promotori di crescita negli animali destinati all'alimentazione umana, concetto che è stato ribadito nel (Regolamento (UE) 2019/6). Tale Regolamento stabilisce le norme per la vendita, la fabbricazione, l'importazione, l'esportazione, la fornitura, la distribuzione, il controllo e l'uso dei medicinali veterinari, con l'obiettivo principale di rafforzare la campagna dell'Unione Europea, adjuvata dalla concretizzazione degli Stati Membri, per fronteggiare la resistenza antimicrobica.

Infine, da gennaio 2024 tutti gli Stati Membri dell'Unione Europea devono comunicare ogni anno all'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) i propri dati sul volume delle vendite e sull'uso degli antibiotici negli animali. Il primo rapporto uscirà nel 2025 e riguarderà le vendite e l'utilizzo degli antibiotici in alcune specie destinate al consumo umano quali bovini, suini, polli e tacchini, mentre, per le restanti specie quali ovini, pesci, equini e qualsiasi altro animale destinato al consumo umano bisognerà attendere il 2027. L'Italia si è adeguata con il Decreto Legislativo del 7 dicembre 2023.

1.3 Macrolidi e sulfamidici.

I macrolidi sono antibiotici di origine naturale ottenuti da colture di diverse specie di *Streptomyces*, anche se oggi vengono prodotti per semi sintesi. Tutti i macrolidi presentano nella loro struttura un anello lattonico più o meno esteso e sono caratterizzati da un'azione di tipo batteriostatica; hanno la capacità di legarsi alla subunità 50 S ribosomiale dei microorganismi e di inibire la sintesi proteica della cellula procariote. La loro attività a pH ambientali alcalini risulta superiore, dimostrando un'attività addirittura battericida. L'eritromicina è il capostipite della classe dei macrolidi, prodotta da *Streptomyces erythraeus*, ed utilizzata sia in medicina umana che veterinaria. Presenta un anello tetra-deca-atomico ed è caratterizzata da una scarsa idrosolubilità e poca stabilità in ambiente gastrico. A questa hanno fatto seguito macrolidi di seconda generazione, tra cui l'azitromicina che è un suo derivato semi-sintetico avente un anello penta-deca-atomico in cui è presente un atomo di azoto. L'azitromicina è maggiormente stabile in ambiente gastrico, presenta una maggiore emivita e uno spettro di attività significativamente maggiore rispetto all'eritromicina nei confronti degli organismi gram negativi, pur mantenendo una buona attività sui gram positivi (Foulds et al., 1990). È utilizzata per trattare una moltitudine di malattie, tra cui le infezioni del tratto respiratorio, nonché urogenitali, cutanee, enteriti e altre infezioni batteriche. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) l'ha inserita tra i farmaci di prima scelta per le infezioni a trasmissione sessuale causate da *Clamidia trachomonantis*, colera e gonorrea (OMS,

2019). L'azitromicina ha inoltre effetti antiinfiammatori e immunomodulatori, che la rendono utile nel trattamento di patologie infiammatorie delle vie respiratorie, tanto che è stata utilizzata nei pazienti affetti da Covid-19 (Heidary et al., 2022). A causa dell'ampio ed improprio utilizzo dei macrolidi, sia in medicina umana che veterinaria, sono stati osservati fenomeni di resistenza ed è stata riscontrata la loro presenza nell'ambiente (Li et al., 2023; Z. Lu et al., 2022a).

I sulfamidici sono, invece, farmaci di sintesi introdotti nella pratica medica negli anni 30. Il primo sulfamidico è stato il Prontosil rosso un colorante, che veniva bioattivato nell'organismo a para-amino-benzensulfonamide o sulfanilamide e che costituisce il precursore di tutti i sulfamidici.

Questi sono farmaci batteriostatici, che competono con l'acido para-amminobenzoico (PABA) nei confronti dell'enzima diidropteroato sintetasi (DHPS), verso il quale hanno una maggiore affinità. L'inibizione dell'enzima DHPS dei microorganismi determina la mancata sintesi di acido diidrofolic, necessario per la sintesi di proteine e basi di acido nucleico, impedendo quindi la moltiplicazione dei microorganismi.

Tra i sulfamidici, il sulfametossazolo è un antibiotico sistemico ad ampio spettro usato sia in medicina umana che veterinaria. Trova impiego nel trattamento di infezioni respiratorie, coccidiosi, infezioni intestinali e altre malattie infettive. Spesso per potenziare l'azione viene somministrato in combinazione con derivati pirimidinici come il trimetoprim. La stessa OMS fa riferimento al sulfametossazolo in

combinazione al trimetopim, come farmaci di prima scelta per il trattamento delle infezioni del tratto urinario inferiore (OMS, 2019).

Tra i sulfamidici, il sulfametossazolo è l'antibiotico più rilevato nelle acque sotterranee e nell'ambiente (Zainab et al., 2020).

Gli antibiotici come tali o sottoforma di metaboliti, possono giungere nell'ambiente tramite diversi percorsi (**Figura 2**).

I principali punti critici di rilascio nell'ambiente sono rappresentati da impianti di trattamento delle acque reflue, scarichi industriali e ospedalieri, impianti di acquacoltura, allevamento di animali e deflusso dei suoli (Klatte et al., 2017; Mezzelani et al., 2018). I sistemi convenzionali di trattamento dei reflui domestici non hanno una grossa efficienza nel trattamento dei prodotti farmaceutici, e per questo motivo causano il continuo rilascio di queste molecole negli ecosistemi acquatici (Kay et al., 2017).

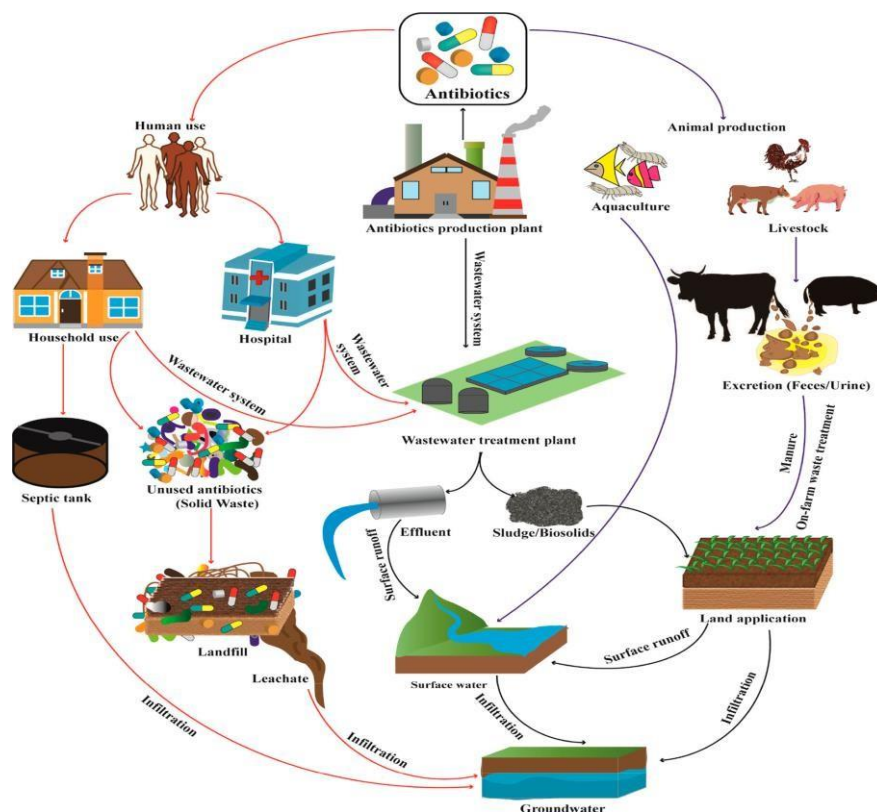


Figura 2. Potenziali fonti e destino degli antibiotici nell'ambiente (Oberoi et al., 2019)

Nella maggior parte dei casi, i depuratori non riescono a degradare le molecole complesse, che quindi vengono riversate direttamente nelle acque superficiali e costiere. Una volta nell'ambiente, un farmaco, a seconda delle sue caratteristiche chimico-fisiche può degradarsi o persistere a lungo e interagire con gli organismi acquatici.

1.4 Antibiotico resistenza

La resistenza agli antibiotici è un fenomeno naturale biologico di adattamento di alcuni microorganismi che acquisiscono la capacità di sopravvivere o di crescere in presenza di una concentrazione di un agente antibatterico che è generalmente sufficiente ad inibire o uccidere microorganismi della stessa specie (Piano Nazionale di contrasto

all'antibiotica resistenza 2022-25). La resistenza agli antibiotici può essere intrinseca o acquisita. Si parla di resistenza intrinseca quando si fa riferimento ai batteri che già prima dell'utilizzo di antibiotici da parte dell'uomo avevano espresso sui loro geni qualche meccanismo di resistenza naturale (Levy & Bonnie, 2004).

Tuttavia, il problema per la sanità pubblica si osserva quando un microorganismo precedentemente sensibile ad un determinato antibiotico, acquisisce insensibilità, modificando il proprio materiale genetico, meccanismo che si definisce resistenza acquisita. In particolare, i microrganismi ospitano geni di resistenza agli antibiotici inseriti in plasmidi, trasposomi, integroni, batteriofagi o altri elementi genetici mobili (Aleksun & Levy, 2007).

A giugno 2023 il Consiglio dell'Unione Europea si è espresso favorevole al potenziamento delle misure restrittive per combattere l'antibiotico resistenza. Infatti, ha definito la resistenza antimicrobica come una delle tre principali minacce prioritarie per la salute pubblica insieme alle malattie circolatorie e alle neoplasie. Si stima che oltre 35mila persone muoiano ogni anno nell'Unione Europea come conseguenza diretta di un'infezione dovuta a batteri resistenti agli antibiotici (Consiglio Unione Europea, 2023).

Sia a livello internazionale che nazionale sono presenti Piani per prevenire l'antibiotico resistenza e monitorare l'utilizzo improprio degli antibiotici, seguendo un approccio multidisciplinare e una visione "One Health". "One Health" è un approccio che mira a bilanciare e ottimizzare in modo sostenibile la salute delle persone, degli animali e dell'ambiente e riconosce che la salute degli esseri umani, degli

animali, delle piante e degli ecosistemi in generale sono strettamente connesse tra loro. L'approccio prevede la collaborazione di più settori, discipline e comunità che lavorino insieme per promuovere il benessere e affrontare le minacce alla salute e agli ecosistemi rispondendo allo stesso tempo al bisogno collettivo di acqua pulita, energia, cibo e agendo su uno sviluppo sostenibile (One Health High Level Expert Panel Annual Report, 2021). A livello nazionale è presente il Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR 2022-25). Quest'ultimo si articola su quattro aree orizzontali e tre pilastri verticali, meglio schematizzati in **Figura 3**.

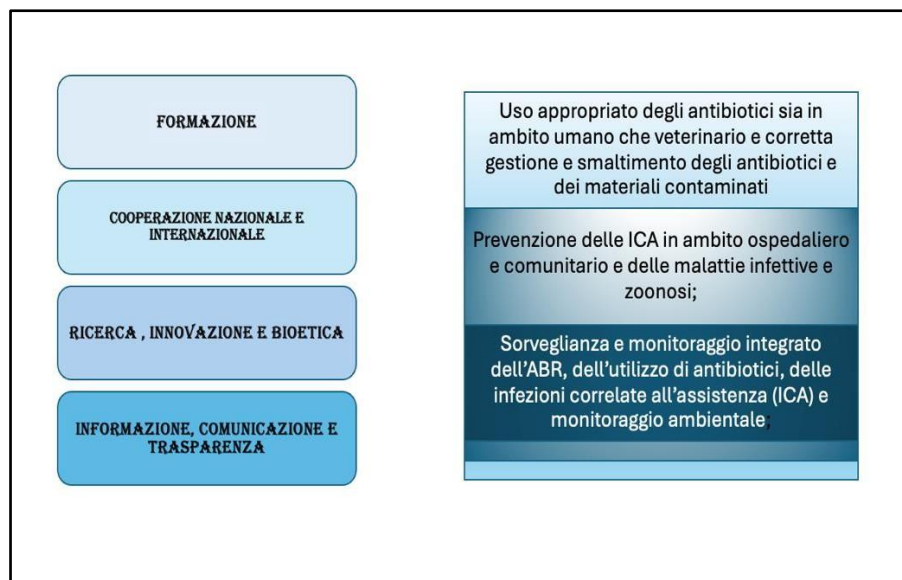


Figura 3. Punti cardine su cui si basa il Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR 2022-25).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità raggruppa gli antibiotici in tre categorie: *access*, *watch* e *reserve*. Questa divisione ha lo scopo di

fornire indicazioni al corretto uso degli antibiotici al fine di prevenire le resistenze. Al primo gruppo, *access*, appartengono gli antibiotici che dovrebbero essere utilizzati come trattamento di prima o seconda scelta, come le penicilline ad ampio spettro. Al gruppo *watch* appartengono gli antibiotici che presentano un maggior rischio di sviluppare resistenze e sono raccomandati solo in un numero limitato di casi come i macrolidi. Al terzo gruppo invece, *reserve*, appartengono gli antibiotici di ultima scelta, utilizzati nei casi più gravi (AIFA, 2023).

La presenza di residui di antibiotici è stata rilevata nelle acque sotterranee e superficiali, nel suolo e negli impianti di trattamento delle acque reflue con intervalli di concentrazioni da ng/l a µg/l (Chaturvedi et al., 2021).

Negli effluenti degli impianti di depurazione dei Paesi europei sono stati comunemente ritrovati: ofloxacina, ciprofloxacina, e sulfametossazolo, mentre eritromicina, sulfametossazolo e trimetropim sono stati riscontrati maggiormente nei Paesi Asiatici e nel nord America (Kovalakova et al., 2020). Data la loro presenza in maniera ubiquitaria, le matrici in cui vengono ricercati questi farmaci nell'ambiente acquatico sono diverse. Possono essere ricercati infatti direttamente nei campioni d'acqua o utilizzando delle specie animali e vegetali che in essa vi abitano (Bacanlı & Başaran, 2019; Fabregat- Safont et al., 2023).

1.5 Metodi di rilevazione comunemente utilizzati

La salubrità ambientale è interconnessa alla salute umana e a quella animale, e per questo motivo è regolamentata sia a livello nazionale che

internazionale. Questo assunto è valido anche per la quantificazione e il controllo dei residui di antibiotici che possono accumularsi nell'ambiente ed entrare nella catena alimentare, causando effetti avversi negli animali e nell'uomo, compreso lo sviluppo di antibiotico resistenza.

A tal proposito il Ministero della Salute, su indicazioni previste dalle norme europee, ha predisposto il Piano Nazionale dei Residui, un piano di monitoraggio e sorveglianza della presenza, negli alimenti di origine animale, di residui di sostanze farmacologicamente attive e di contaminanti chimici. Attraverso questo piano viene monitorata la presenza di residui di farmaci, e quindi di antibiotici, rappresentando anche uno strumento di notevole importanza nel contrasto del fenomeno dell'antibiotico resistenza. Inoltre, l'Unione Europea, al fine di aumentare il livello di sicurezza dei consumatori, ha fissato su scala comunitaria Livelli Massimi Residuali (LMR) per i prodotti di origine animale. Sono altresì normati i metodi di campionamento e le metodiche analitiche ufficiali. Nelle metodiche di conferma riportate si fa riferimento all'utilizzo in prima fase di una metodica di separazione come la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) o la gascromatografia (GC) che devono essere associate alla rilevazione tramite spettrometria di massa (MS). Qualora la spettrometria di massa non sia adeguata possono essere utilizzati altri metodi di conferma come HPLC-DAD (Rivelatore a serie di diodi) o FLD (Rivelatore a fluorescenza).

Tra le tecniche autorizzate vi è quindi la cromatografia liquida ad alte prestazioni associata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS).

La cromatografia liquida ad alta prestazione è una tecnica comunemente usata per separare e analizzare i diversi composti presenti in una miscela. Come per le altre tecniche cromatografiche, l'HPLC impiega una fase stazionaria e una fase mobile. La fase stazionaria è inserita all'interno di una colonna, in cui la fase mobile (o eluente) costituita da uno o più solventi puri in diverse percentuali scorre in colonna, spinta da alte pressioni, insieme al campione da analizzare. La separazione avviene sfruttando l'affinità del composto da analizzare per la fase stazionaria e la fase mobile. Un campione più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica, tempo noto come tempo di ritenzione. Alla fine del processo cromatografico è quindi presente un sistema di rilevazione e identificazione.

La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi di sostanze in tracce. È una tecnica fisica in grado di differenziare ioni gassosi in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Alla molecola viene fornita una certa quantità di energia in grado di ionizzarla, ovvero strappare un elettrone che in questo modo si trasforma in un radical catione. Lo ione molecolare così formato viene poi frammentato dando origine a specifici ioni figlio.

Un esempio di sorgente ionizzante è la ionizzazione elettrospray (ESI) tramite la quale l'eluato in uscita dalla colonna cromatografica raggiunge lo spettrometro di massa sottovuoto e viene nebulizzato finemente e dalla quale il solvente può essere rapidamente rimosso.

Uno spettrometro di massa tandem largamente utilizzato è lo

spettrometro a triplo quadrupolo. Quest'ultimo è in grado di lavorare in diverse modalità:

-Single Ion Monitoring (SIM): viene analizzato lo ione molecolare dell'analita.

-Product Ion Scan: il primo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto m/z fisso, dopo la frammentazione il terzo quadrupolo effettua una scansione in un range di massa.

-Parent Ion Scan: il primo quadrupolo effettua una scansione in un range di massa mentre il terzo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto m/z fisso.

-Neutral Loss Scan: entrambi i quadrupoli lavorano in scansione.

-Multiple Reaction Monitoring (MRM): in questo caso l'identità della molecola è nota a priori e il primo quadrupolo è fissato su un determinato valore di m/z mentre il terzo su quello di un frammento.

Ad oggi la spettrometria di massa è un metodo consolidato che offre una serie di vantaggi come buona selettività, sensibilità e la possibilità di determinare contemporaneamente più analiti.

1.6 La mitilicoltura

In Italia la produzione acquicola è rappresentata da poche specie come i mitili, la vongola verace, la trota e l'orata. Questa produzione è caratterizzata da pratiche di allevamento legate alla tradizione. In tale ambito la molluschicoltura, ed in particolare la mitilicoltura, si configura il settore trainante a livello nazionale e regionale con una produzione al 2019 pari ai due terzi di quella europea (*Mytilus*

galloprovincialis) con 52.546.8 tonnellate prodotte a livello nazionale. Nel 2020 le produzioni hanno avuto un calo a causa della situazione pandemica (*Piano Nazionale Strategico*, 2021).

L'allevamento dei molluschi bivalvi in Sardegna rappresenta la parte più importante della produzione dell'acquacoltura sia dal punto di vista quantitativo che per numero di insediamenti produttivi. La produzione è concentrata nel Golfo di Olbia e Oristano, nello stagno di Santa Gilla (Cagliari), nello stagno di Cirdu (Carbonia-Iglesias), nello stagno di Tortoli e nella laguna di Porto Pozzo (Sassari). La tecnica d'allevamento può essere fissa o galleggiante (long-line), a doppia ventia o singola ventia (**Figura 4**). In Sardegna risulta predominante l'impianto a long-line che è costituito da una serie di filari composti da boe galleggianti collegate da funi ed ancorate al fondo (Scenari & Acquacoltura, 2018).



Figura 4. Golfo di Olbia in cui è presente la tecnica d'allevamento long-line con boe galleggianti.

I luoghi maggiormente interessati dall'allevamento e raccolta di molluschi sono le coste poco profonde, le lagune, gli stagni e gli estuari.

I molluschi bivalvi oltre a rappresentare un settore importante dell'economia sarda sono altresì importanti perché essendo degli organismi filtratori devono obbligatoriamente cibarsi filtrando un grande quantitativo d'acqua da cui prelevano le sostanze nutritive, cosicché sono esposti maggiormente all'inquinamento e risultano essere di conseguenza degli ottimi organismi sentinella. La direttiva quadro 2008/56/CE, nota in Italia come D.lgs 190/2010, ha dato avvio alla valutazione ambientale delle acque marine e all'impatto delle attività antropiche sull'ambiente marino, sviluppando il potenziale economico della fascia marino-costiera in armonia con l'ambiente.

1.7 Biomonitoraggio: “Mussel watch”

I molluschi bivalvi denominati anche lamellibranchi o più scientificamente pelecipodi, rivestono una notevole importanza non solo dal punto di vista economico, per la loro commercializzazione ad uso alimentare, ma rappresentano anche un'importante risorsa per l'ecologia marina (Bussani, 1983). Questi molluschi vengono utilizzati come organismi bioindicatori al fine di valutare la presenza di sostanze contaminanti e il loro impatto sulle condizioni ambientali, in quanto vivono, si nutrono e si riproducono nell'ambiente. Per organismo bioindicatore si intende un organismo in grado di fornire informazioni sulla qualità dell'ambiente e sui cambiamenti attraverso risposte identificabili in seguito a condizioni di stress (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.) La bioindicazione si basa su diverse scale d'intervento: dalla variazione di parametri biochimici, fisiologici e

comportamentali, al bioaccumulo di contaminanti, fino alla presenza/assenza di alcune specie. L'approccio comunemente utilizzato è la valutazione dei livelli di contaminanti presenti nell'organismo scelto come bioindicatore (Bargagli et al., 1998). Il *Mytilus galloprovincialis* è ampiamente utilizzato a tale scopo per la sua facilità nell'accumulare metalli e contaminanti organici, data la sua particolare struttura anatomico-fisiologica e per la sua limitata capacità di metabolizzare i contaminanti presenti nell'acqua marina filtrata per la captazione degli alimenti. Ciò lo rende un ottimo indicatore per la valutazione della salute dell'ambiente (O'Connor, 2002; Phillips, 1977).

Il professor Edward D. Goldberg nel 1975 afferma che la causa dell'inquinamento marino deriva dai rifiuti antropici sversati in mare. A tal proposito, Goldberg formulò l'approccio *World Mussel Watch*, con lo scopo di avere a disposizione dei dati di rilevazione continua sullo stato di alterazione della composizione degli oceani a causa dell'attività antropica (Goldberg, 1975).

Butler nel 1973 riporta che in America vi erano concentrazioni di pesticidi clorurati nei molluschi. Allo stesso modo, Holden nel 1973 registra concentrazioni di contaminanti chimici nella fauna marina, incluse le cozze campionate in dieci Paesi europei (Farrington et al., 2016). Pertanto, oggi sono presenti numerosi programmi di monitoraggio ambientale basati sull'approccio *mussel watch* a carattere nazionale e internazionale (Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, 2015; Sugiarto, 2016; Di, U).

1.8 Mytilus galloprovincialis

Diversi autori sostengono l'esistenza di due specie di mitili, quella mediterranea, diffusa lungo le coste italiane denominata *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1818) e quella atlantica *Mytilus edulis*.

Entrambe le specie appartengono alla seguente suddivisione tassonomica:

REGNO: Animalia

PHYLUM: Mollusca

CLASSE: Bivalvia

ORDINE: Mytiloida

FAMIGLIA: Mytilidae

GENERE: *Mytilus*

SPECIE: *Mytilus Galloprovincialis*

Il *Mytilus galloprovincialis* è oggi presente oltre che nel Mar Mediterraneo anche nel Mar Nero e nell'Oceano Atlantico. Vive in comunità molto numerose, su rocce o substrati duri, ai quali aderisce per mezzo del bisso (Bandiera, 2006). La salinità di crescita ottimale è intorno al 27/30‰ e l'optimum di temperatura è tra gli 8°C e i 25°C. Si trova in genere in zone infralitorali, fino a profondità di qualche metro. I bivalvi devono il loro nome alla forma caratteristica della conchiglia, formata appunto da due valve. La conchiglia contiene il corpo molle compresso lateralmente, privo di capo e ricoperto ai lati da due lembi del mantello che scendono dal dorso (Baccetti, 1994). Le valve sono nere, bluastre, costituite da una matrice organica formata da proteine mucopolisaccaridi e da cristalli di carbonato di calcio, generalmente

sotto forma di calcite e aragonite. Esse sono collegate tra loro da un legamento e una cerniera. Possiamo distinguere due zone, una parte appuntita identificata come parte anteriore e una parte posteriore arrotondata. Sulla parte esterna della conchiglia si osservano delle linee di accrescimento. Le valve sono incernierate tra loro mediante un legamento, questa zona è chiamata umbone. All'interno di ciascuna valva ci sono due muscoli, il grande muscolo adduttore posteriore e il muscolo adduttore anteriore; sono presenti anche i muscoli retrattori anteriore e posteriore che controllano il movimento del piede. Il piede secerne il bisso, un fascio di robusti fili di proteine conciate. Questi fili emergono attraverso la parte ventrale e vengono usati come ormeggio perché la cozza possa attaccarsi ai substrati o ad altre cozze (Gosling, 2003). Mentre la chiusura delle valve è attiva, dovuta alla contrazione dei muscoli adduttori, l'apertura della conchiglia è determinata passivamente dal legamento elastico, per cui dopo la morte le cozze rimangono a valve aperte (Bandiera, 2006).

Nei bivalvi il mantello è costituito da due lobi di tessuto che racchiudono l'animale all'interno del guscio (Gosling, 2003).

Altresì, il mantello svolge un ruolo importantissimo nel bioaccumulo di contaminanti metallici e organici nei mitili, sebbene i reni, le branchie e le ghiandole digestive rivestano un ruolo principale nel fenomeno (Fantuzzi, 2004).

Nei mitili, i margini del mantello danno origine alle aperture inalante ed esalante, note come sifoni. Nelle cozze l'apertura esalante è piccola, liscia e conica mentre quella inalante è più ampia, quest'ultima nelle femmine permette anche l'ingresso dello sperma (Fantuzzi, 2004;

Gosling, 2003). Un mitilo è in grado di filtrare 4/5 litri di acqua all'ora e di trattenere il 90 % delle particelle in esso contenute (Mengoli, 1998). Nei bivalvi le branchie hanno un ruolo respiratorio oltre che alimentare. Queste ultime sono deputate anche alla captazione delle particelle alimentari che entrano nella cavità palleale. Le branchie sono due grandi strutture per ogni lato del corpo, si trovano lungo il margine del mantello dorsale. Nei mitili hanno una struttura di tipo filamentoso e vengono chiamate filobranchie. I filamenti si diramano da un asse longitudinale e l'insieme di questi viene chiamata lamina branchiale. I filamenti branchiali sono rivestiti da epitelio cigliare, sulla superficie esterna, che ha il compito di far circolare l'acqua attraverso le branchie (Gaion, 2006). Le ciglia branchiali hanno funzioni specifiche, hanno infatti il compito di attirare l'acqua nella cavità del mantello e di farla passare attraverso i filamenti branchiali verso la camera esalante. Il movimento delle ciglia è sotto il controllo nervoso (Gosling, 2003). La superficie branchiale supera di tanto le necessità respiratorie, un mitilo infatti possiede una superficie branchiale di 100-110 cm² sebbene per la respirazione ne basterebbe il 5/10 % (Gaion, 2006).

L'apparato digerente dei molluschi è costituito dall'esofago che porta ad un ampio stomaco, caratterizzato da pareti pieghettate con la presenza di fori, che sono gli orifizi dei diverticoli digerenti. L'alimentazione è microfaga, ossia la dieta è costituita da plancton e da particelle organiche che si trovano sospese in acqua (Mengoli, 1998). Le particelle introdotte vengono trattenute dalle ciglia latero-frontali quelle comprese tra un massimo di 400-500 micron e un diametro minimo di 1-5 micron, per particelle più grandi l'ingresso è impedito dai

bordi del mantello. La raccolta delle particelle in sospensione nell'acqua è data dai filamenti branchiali e vengono agglutinate, all'interno di un cordone mucoso, attraverso l'esofago cigliato nello stomaco. Lo stomaco è formato da due regioni, una dorsale e una ventrale, nelle quale si trova lo stilo cristallino, di natura ghiandolare, secernente una serie di enzimi come amilasi, cellulasi e lipasi. Le feci contengono residui della digestione e particelle parzialmente digerite e poi respinte, si presentano abbastanza compatte, per cui sedimentano in acqua (Gosling, 2003; Gaion, 2006).

Il sistema riproduttivo dei bivalvi è estremamente semplice. I mitili sono dioici, cioè i sessi sono separati e le gonadi si sviluppano all'interno del mantello. Il mantello contenente i gameti è tipicamente arancione nelle femmine, bianco sporco nei maschi. La fecondazione è esterna e i gameti attraverso l'apertura esalante vengono rilasciati in acqua. La femmina provoca l'eiaculazione dei maschi vicini, che a loro volta, eiaculando in acqua scatenano nelle femmine la deposizione delle uova (Gosling, 2003; Gaion, 2006).

Le parti anatomiche principali sono riportate in **Figura 5**.



Figura 5. Parti anatomiche principali di *Mytilus Galloprovincialis*: 1. Valve; 2. Bisso; 3. Branchie; 4. Mantello; 5. Sifone esalante; 6. Visceri; 7. Muscolo adduttore; 8. Cerniera; 9. Piede; 10. Bocca; 11. Sifone inalante.

1.9 La Filiera dei molluschi

Il ciclo di mitilicoltura dura mediamente un anno. La filiera può essere distinta in due fasi principali:

- Produzione primaria che comprende:
 - la raccolta del seme (novellame);
 - la semina, durante la quale il novellame viene inserito in reti tubulari pendenti da una trave, ancorate al fondale mentre sulla superficie del mare viene posta una boa di segnalazione;
 - l'allevamento e la raccolta degli esemplari di tagli commerciali (5/7 cm)
- Produzione post-primaria che comprende:
 - la depurazione;
 - la rifinitura;
 - confezionamento e vendita.

La zona di produzione e raccolta è classificata dal regolamento CE

854/2004 e 882/2004 in base al livello di contaminazione microbiologica:

- Zona di classe A: i molluschi raccolti in queste zone possono essere destinati direttamente al consumo umano, senza ulteriori trattamenti.
- Zona di classe B: i molluschi raccolti in queste zone prima di essere destinati al consumo umano devono subire un trattamento in centri di depurazione o in stabilimenti di stabulazione autorizzati.
- Zona di classe C: i molluschi raccolti in queste zone prima di essere destinati al consumo umano devono essere stabulati per lunghi periodi; spesso questi vengono destinati a stabilimenti di trasformazione per la cottura e il congelamento.

Tutti i molluschi raccolti in zona B e C sono destinati ai centri di depurazione. I centri di depurazione sono organizzati con vasche alimentate da acqua marina pulita in cui i molluschi vivi sono lasciati per il tempo necessario affinché raggiungano i requisiti igienico sanitari per essere destinati al consumo umano (Regolamento (CE) N. 854/2004).

Capitolo II

Scopo della tesi

Gli antibiotici vengono ampiamente utilizzati, oltre che in medicina umana e veterinaria, nell'ingegneria genetica, nella ricerca scientifica e in ambito agricolo. A causa di questo ampio utilizzo è possibile riscontrare la presenza di residui in varie matrici. A livello globale il consumo di antibiotici è aumentato, e si prevede entro il 2030 un aumento del 200% rispetto al 2015. L'uso eccessivo ed improprio ha portato come conseguenza principale la comparsa di geni resistenti agli antibiotici nei batteri (Apreja et al., 2022).

Alcuni antibiotici fanno parte dei cosiddetti "contaminanti emergenti", anche noti come PPCPs, che raggruppano numerose sostanze chimiche, tra cui prodotti farmaceutici di uso comune, nonché prodotti per la cura della persona e alcune sostanze d'abuso (Kovalakova et al., 2020).

Gli esseri umani e gli animali di solito non sono in grado di degradare completamente gli antibiotici, il che ne determina l'escrezione di una certa quantità attraverso le deiezioni. Questi arrivano nell'ambiente tramite vari percorsi a causa anche dell'inefficienza della maggior parte dei sistemi convenzionali di trattamento delle acque reflue (Klatte et al., 2017). L'ambiente acquatico può agire come fonte e mezzo di propagazione di antibiotici e geni di resistenza, favorendo lo sviluppo di agenti patogeni multi-resistenti (Wang et al., 2018). Inoltre, la diffusione degli agenti patogeni multi-resistenti è amplificata dalla mobilità internazionale delle persone, degli animali e dei prodotti alimentari, consentendo ad un ceppo resistente di diffondersi rapidamente, così come accaduto per la pandemia da Covid-19 (Nassri et al., 2023).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare e validare una metodica analitica semplice, veloce e poco onerosa per valutare la presenza nei molluschi bivalvi di due classi di antibiotici: macrolidi e sulfamidici. La scelta dei mitili come matrice ha una duplice finalità: valutare la sicurezza alimentare, essendo un alimento largamente consumato in tutto il mondo e la salubrità ambientale, in quanto utilizzati come indicatori biologici nei programmi “*mussels watch*” nazionali e internazionali. I mitili, infatti, sono presenti nelle acque costiere di tutto il mondo, il che permette un confronto dei dati su scala mondiale; sono sedentari e quindi efficaci nel fornire indicazioni sullo stato di inquinamento; hanno la capacità di accumulare gli inquinanti in maniera maggiore rispetto alle acque. Inoltre, i bivalvi vivono in comunità numerose, e per questo motivo il campionamento annuale non rappresenta una minaccia alla loro sopravvivenza. Essendo resistenti agli inquinanti possono essere facilmente trapiantati ed utilizzati in studi di vario genere (Goldberg, 1986).

Il criterio di scelta utilizzato per gli antibiotici oggetto di studio si è basato, a seguito di un’attenta ricerca bibliografica, sui dati relativi al loro consumo e sulla loro presenza nell’ambiente marino. In un lavoro in precedenza pubblicato dal nostro gruppo di ricerca era stato già evidenziato come i macrolidi, seguiti da sulfamidici e chinoloni fossero tra gli antibiotici maggiormente presenti nei bivalvi raccolti in tutto il mondo (Baralla et al., 2021). Stessa valutazione è stata riportata da Wang et al., che hanno evidenziato come i sulfamidici, le tetracicline, i fluorochinoloni e i macrolidi sono stati rilevati in organismi che vivono a vari livelli trofici (Wang et al., 2023). A tale proposito, sono

stati selezionati due macrolidi, l'eritromicina e l'azitromicina e un sulfamidico, il sulfametossazolo.

Per determinare la presenza di tracce di residui di antibiotici sia in matrice ambientale che animale vengono utilizzati vari metodi analitici. Tra questi, quello maggiormente utilizzato è l'HPLC-MS/MS (Desmarchelier et al., 2021; Fabregat-Safont et al., 2023; Guidi et al., 2018; Jadhav et al., 2019). In questo lavoro di tesi è stata quindi sviluppata e validata una metodica analitica in HPLC-MS/MS per la determinazione simultanea degli antibiotici scelti in *Mytilus galloprovincialis*. Tale metodo è stato applicato per investigare la presenza degli antibiotici target in *Mytilus galloprovincialis* raccolti lungo le coste della Sardegna. La scelta dei siti di prelievo è legata al loro importante ruolo dal punto di vista naturalistico e per la produzione e commercializzazione dei prodotti ittici a livello locale e regionale. Queste zone sono, infatti, sede di allevamenti intensivi di mitili con una produzione di circa 13000 tonnellate annue.

Capitolo III
Materiali e metodi

3.1 Sostanze utilizzate

Gli standard degli antibiotici eritromicina, azitromicina, sulfametossazolo, e lo standard interno (SI) eritromicina (n-metil d3) sono stati acquistati da Merck Life Science S.R.L. (Milano, Italia). Le soluzioni standard (1mg/ml) sono state preparate in metanolo e conservate a -20°C. I solventi al massimo grado di purezza sono stati acquistati da Fluka (Buchs, Germania). L'acqua ultra-pura è stata ottenuta utilizzando un sistema Milli-Q lab (Sartorius, Goettigen, Germania).

3.2 Campionamento

I campioni di molluschi (*Mytilus galloprovincialis*) utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati in parte acquistati da fornitori locali e in parte forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (IZS). Questi ultimi provenivano da un totale di 6 siti (5 punti di campionamento nel Golfo di Olbia e 1 nello Stagno di San Giovanni a Muravera) facenti parte di un piano regionale di controlli ufficiali che include le analisi microbiologiche per la classificazione e il monitoraggio delle aree di produzione dei mitili. I campionamenti sono stati effettuati ad una profondità media di 5 metri nell'estate ed autunno 2023. Tutti i campioni sono stati conservati in buste monouso e tenuti alla temperatura di refrigerazione fino all'arrivo in laboratorio.

I campioni di cozze acquistate da fornitori locali provenivano invece dal Golfo di Olbia, Stagno di Santa Gilla di Cagliari, Stagno di Cirdu,

dalla marina di Oristano e dalla marina di Arborea.

I siti di prelievo dei mitili lungo le coste della Sardegna sono indicati in

Figura 6.

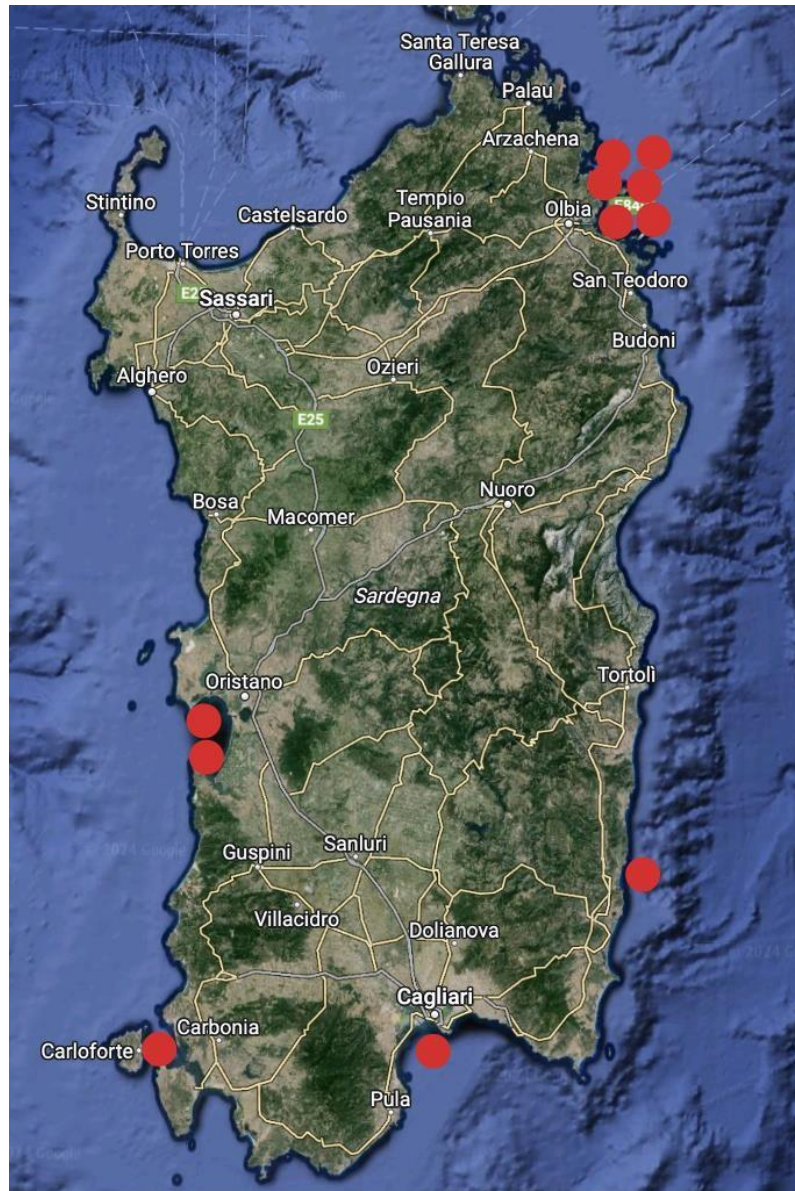


Figura 6. Siti di campionamento.

3.3 Siti di campionamento

3.3.1 Golfo di Olbia:

Il golfo di Olbia, caratterizzato da un grosso afflusso di turismo e attività antropiche durante l'estate, è un'insenatura naturale che si affaccia sul mar Tirreno, dove sono presenti la maggior parte degli impianti di mitilicoltura della Sardegna. I mitili provenivano da 6 punti di prelievo come indicato nella **Figure 7**.

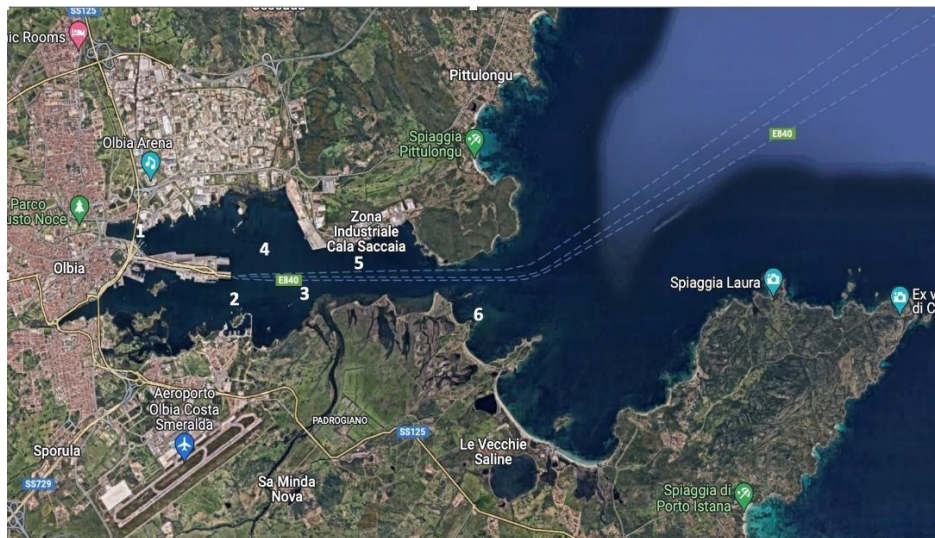


Figura 7. Siti di prelievo nel Golfo di Olbia: Porto di Olbia (1); Isola del Cavallo (2); Foce del Padrongianus (3); Mezzo Cammino (4); Cala Saccaia (5); Lido del Sole (6).

3.3.2 Golfo di Oristano

Il golfo di Oristano è un'insenatura della costa centro occidentale della Sardegna. In questa zona sono presenti diversi allevamenti di mitili. I mitili provenivano da 2 punti di prelievo come indicato nelle **Figura 8**.

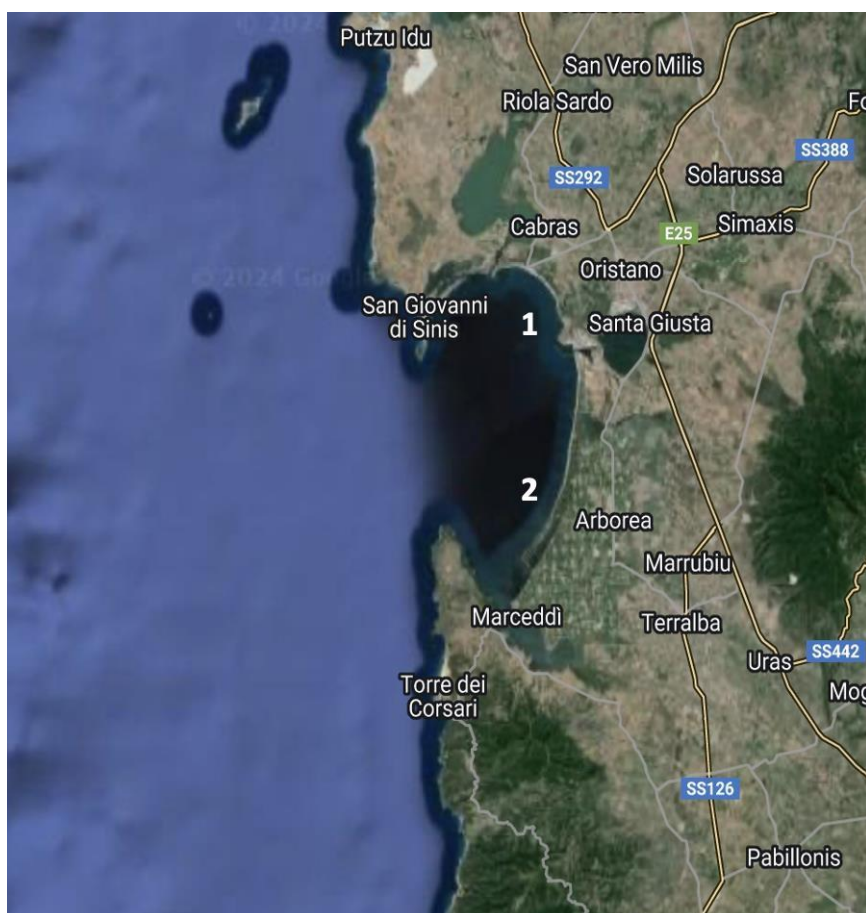


Figura 8. Siti di prelievo nel Golfo di Oristano: Marina di Oristano (1); Marina di Arborea (2).

3.3.3 Laguna di Cagliari

La Laguna di Santa Gilla, anche chiamata Stagno di Cagliari, si trova nella costa meridionale della Sardegna e rappresenta una delle zone umide più importanti d'Europa. Essa rappresenta un punto di incontro tra le acque dolci provenienti dai fiumi e l'acqua di mare. Il Consorzio che ha in gestione la laguna è costituito da diverse cooperative, alcune delle quali, svolgono attività di pesca in mare o si dedicano all'allevamento di mitili. È inoltre presente un centro di depurazione e spedizione molluschi.

I mitili provenivano da un impianto di acquacoltura presente in laguna meglio raffigurato in **Figura 9**.

3.3.4 Stagno di Cirdu

Lo Stagno di Cirdu è situato lungo la costa meridionale della Sardegna, tra i comuni di Calasetta e Sant'Antioco. Esso è caratterizzato da acqua salmastra ed è in comunicazione con il mare attraverso due canali. Il punto preciso è meglio raffigurato in **Figura 9**.

La Cooperativa, costituita nel 1981, esercita le attività di pesca nello stagno dove inoltre, viene svolto l'allevamento di mitili in cui è presente anche un impianto di depurazione per i molluschi. In passato lo stagno è stato sede di altre attività di acquacoltura estensiva e/o semi intensiva, tra cui l'allevamento sperimentale del *Penaeus japonicus* (Laore, 2016).

3.3.5 Laguna di San Giovanni

La laguna di San Giovanni è situata a sud della foce del Flumendosa ed è costituita da un canale parallelo al litorale. Nel canale di comunicazione col mare sono posizionati 2 moderni impianti per la cattura del pesce. La Cooperativa che ne ha la concessione si è costituita nel 1950 ed, oltre alle attività di pesca tradizionale, esercita l'allevamento dei mitili (Laore, 2016) (**Figura 9**).

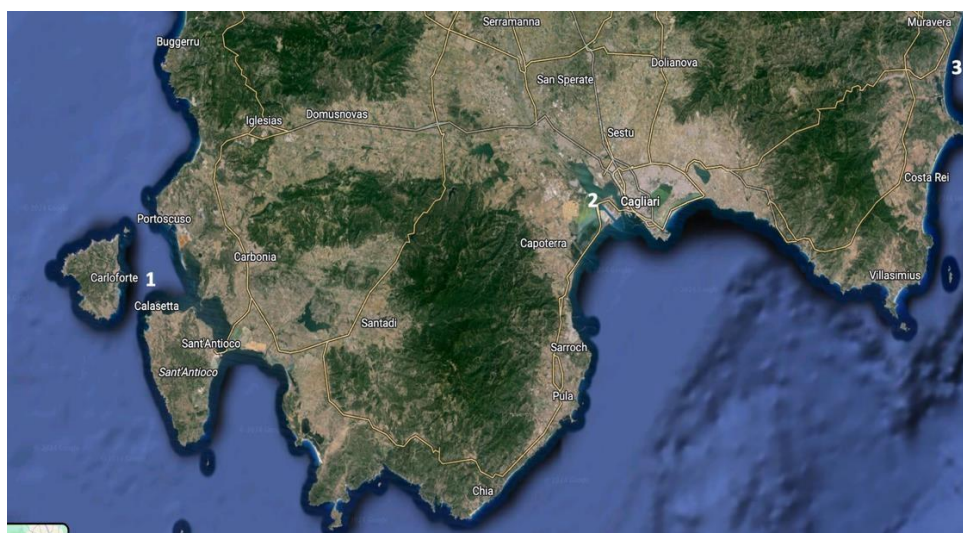


Figura 9. Siti di prelievo nel sud Sardegna: Stagno di Cirdu (1); Stagno di Santa Gilla (2); Stagno di San Giovanni (3).

3.4 Preparazione del campione

In questo lavoro di tesi, per ogni sito (**Figura 6**), sono state utilizzate 30 cozze per unità campionaria. Le cozze di lunghezza media 7,5 cm, larghezza media 3,7 cm e peso umido medio di 29.7 g (ww) sono state sgusciate e i tessuti molli sono stati omogenati con un omogeneizzatore elettrico (Ultra Turrax T25). I campioni sono stati quindi congelati a -20°C fino alla successiva preparazione per le analisi.

Una delle principali sfide nell'analisi di un analita in matrice complessa come i mitili, è la preparazione del campione. È infatti necessario sottoporre il campione ad una fase preparativa, mediante la quale è possibile estrarre e/o concentrare gli analiti oggetto dello studio.

Le tecniche estrattive principali si basano sull'estrazione liquido-liquido o solido-liquido, spesso seguite da tecniche di purificazione quali l'estrazione in fase solida con l'utilizzo di colonnine (SPE).

Tuttavia, è necessario sviluppare un metodo di preparazione del campione che sia in grado di isolare l'analita di riferimento senza dover effettuare un numero eccessivo di passaggi che potrebbero inficiarne il recupero. In questo lavoro di tesi è stata effettuata una semplice estrazione solido-liquido. Nel dettaglio 0,5 g di omogenato sono stati scongelati e trasferiti in falcon da 15 mL. In seguito, venivano aggiunti 50 µl di EDTA e 2 ml di acetonitrile con 0,1% di acido formico. L'EDTA veniva utilizzato come agente chelante e l'acetonitrile per eliminare la componente lipidica della matrice. Dopo 30 s di vortex, i campioni venivano messi in agitatore per 10 minuti. I campioni sono stati quindi centrifugati a 2500 g, 4°C per 10 minuti e il surnatante raccolto è stato portato a secco sotto azoto. Il residuo secco è stato ripreso con 500 µl di fase mobile (acqua:acetonitrile; 50:50) contenente lo standard interno alla concentrazione di 200 ng/ml per la successiva analisi. Il processo estrattivo è schematizzato in **Figura 10**.

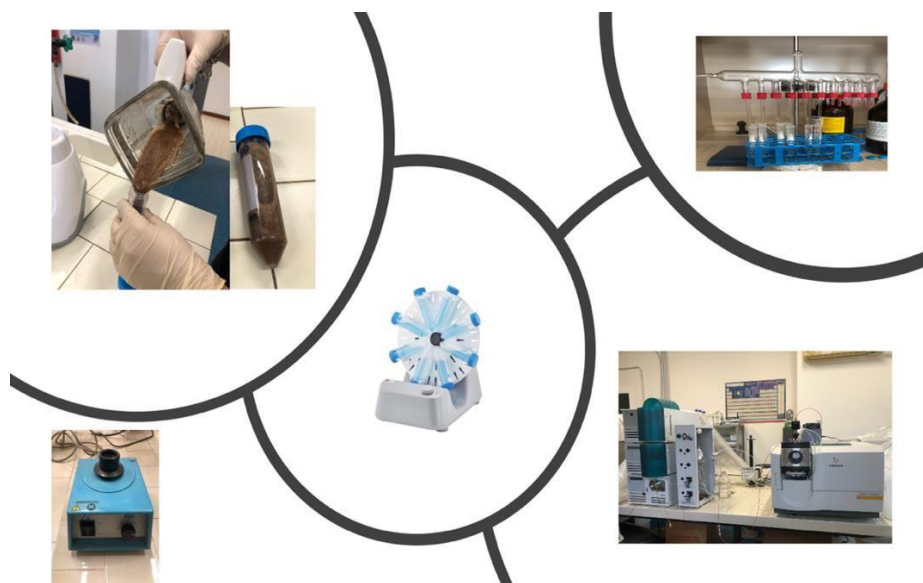


Figura 10. Immagini relative al metodo estrattivo utilizzato.

3.5 Metodo analitico

Fino a qualche decennio fa, la mancanza di metodi analitici per una quantificazione affidabile e capace di scendere a concentrazioni molto basse, ha limitato la generazione di dati sulla presenza di PPCPs nelle acque reflue, e in particolare nei sedimenti e nei tessuti (Klosterhaus et al., 2013).

Varie sono le tecniche analitiche che negli anni sono state utilizzate per la quantificazione di antibiotici in varie matrici quali acqua, alghe, pesci, molluschi etc.

L'HPLC-MS/MS è la tecnica maggiormente utilizzata per la quantificazione degli antibiotici in varie matrici (Chen et al., 2019; Mu et al., 2023; Wang*, 2008). Essa, infatti, è in grado di identificare e quantificare in maniera precisa, accurata e selettiva gli antibiotici anche a concentrazioni molto basse.



Figura 11. LC-MS/MS; HPLC Prostar TM 300 (Varian, Palo, CA, USA)

In questo lavoro di tesi le analisi LC-MS/MS sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC Prostar TM 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) rappresentato in **Figura 11**. I mitili sono stati utilizzati come matrice per la determinazione simultanea di tre antibiotici tra i più utilizzati sia in campo umano che veterinario. Gli analiti oggetto di studio sono l'eritromicina, l'azitromicina e il sulfametossazolo (**Figura 12**).

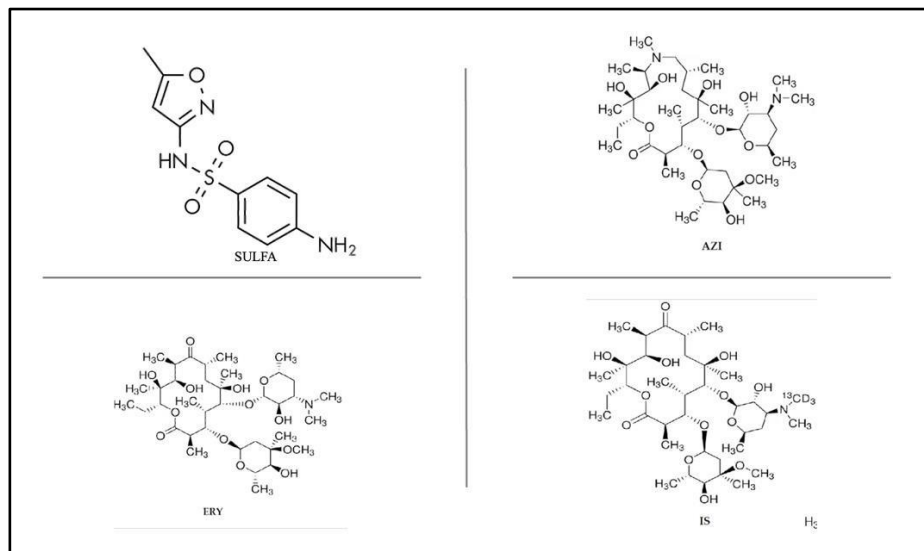


Figura 12. Molecole oggetto di studio Sulfametossazolo (SULFA), Azitromicina (AZI), Eritromicina (ERY) e Eritromicina (n-metil d3) (SI).

Nell'analisi quantitativa è preferibile usare SI deuterati per costruire la curva di calibrazione in matrice che verrà utilizzata per la determinazione dell'analita. Lo standard interno deve dare un picco cromatografico ben risolto, deve essere aggiunto ad una concentrazione simile a quella dell'analita e dare un segnale paragonabile ad esso.

In questo lavoro di tesi, l'eritromicina (n-metil d3) è stata usata come SI (**Figura 12**).

Nella fase preliminare è stato necessario ottimizzare i parametri strumentali per ciascun analita, in modo da individuare le migliori condizioni di acquisizione del segnale.

Per fare questo, sia SI che gli analiti sono stati iniettati singolarmente mediante infusione diretta nello spettrometro di massa alla concentrazione di 500 ng/ml in fase mobile contenente lo 0,1% di acido formico. Il tutto è stato fatto lavorando in modalità di ionizzazione positiva.

Una volta identificato lo ione molecolare ($[M+1]$), si selezionano gli ioni figli caratteristici. Questo esperimento consente di selezionare le transizioni caratteristiche della molecola, e di ottimizzarle nel passaggio successivo.

Nel nostro lavoro sono state prese in considerazione due transizioni sia per lo SI che per gli analiti.

Di queste, la più abbondante è stata utilizzata per la quantificazione e la meno abbondante come ulteriore conferma dell'identità della molecola.

I parametri strumentali ottimizzati sono riportati in **Tabella 2**.

Analita	Ione precursore (m/z)	Ione figlio (m/z)	Capillare (V)	Detector (V)	CE (V)
SI	739,2	162,3	65	1750	28
		83,3			18
ERY	735,3	158,2	65	1750	29
		577,5			19
AZI	750,2	158,2	65	1750	28
		592,1			36
SULFA	254,4	156	65	1750	-21,5

Tabella 2. Parametri strumentali LC-MS/MS

Successivamente sono state selezionate le condizioni cromatografiche

e il gradiente più opportuno per la separazione cromatografica. È stata utilizzata una colonna phenomenex Luna C18 (5 mm, 100 x 2 mm) equipaggiata con una pre-colonna Security guard C18 (4 x 2 mm). La fase mobile era costituita da una miscela di acqua (A) e acetonitrile (B), entrambi con lo 0,1% di acido formico. La corsa cromatografica è stata eseguita in gradiente con un flusso di 0,2 ml/min (**Tabella 3**).

Tempo (min)	Solvente A %	Solvente B %
0:00	95	5
1:00	95	5
1:30	5	95
2:30	20	80
2:31	95	5
8:00	95	5

Tabella 3. Gradiente cromatografico

La durata totale della corsa era di 8 minuti. I tempi di ritenzione degli analiti in queste condizioni sono riportati in **Tabella 4**.

La Figura 13 mostra i cromatogrammi della soluzione standard dei tre antibiotici e dello standard interno alla concentrazione di 200 ng/ml.

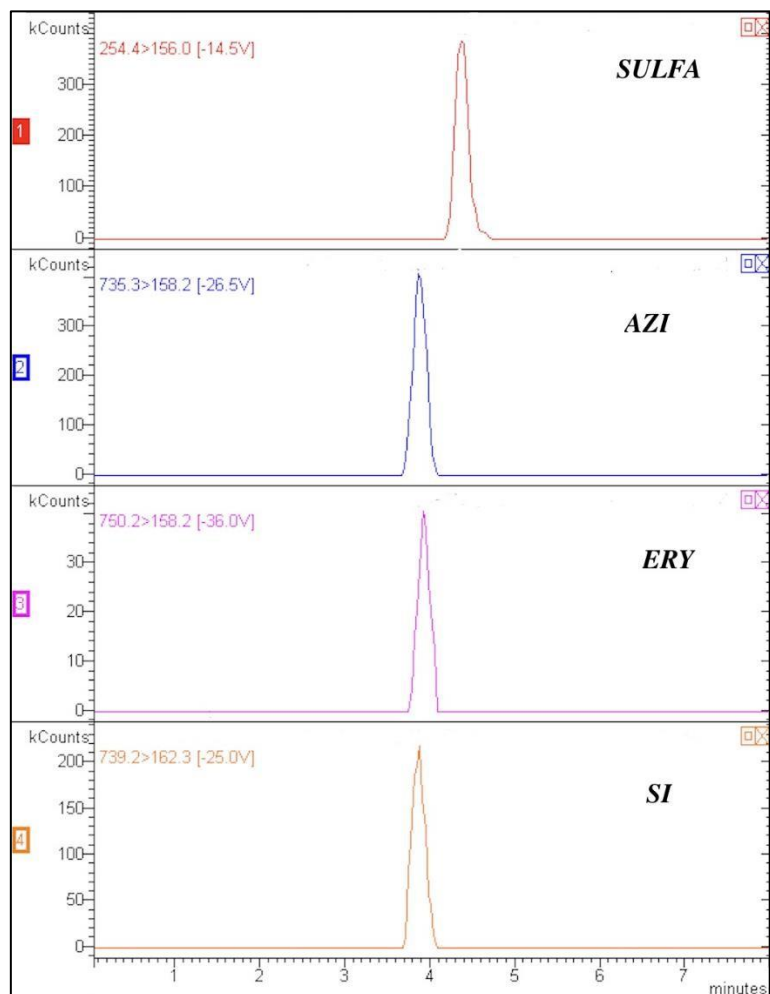


Figura 13. Cromatogramma di una soluzione standard di SULFA: sulfametossazolo; ERY: eritromicina; AZI: azitromicina; SI (200 ng/ml).

3.6 Validazione del metodo analitico

Il metodo analitico è stato validato secondo le linee guida internazionali (Peters et al., 2007; Taverniers et al., 2004). Per la validazione del metodo analitico sono stati analizzati i seguenti parametri: la selettività, la linearità, il limite di determinazione (LOD), il limite di quantificazione (LOQ), la precisione, il recupero e l'effetto matrice.

La selettività è definita come la capacità del metodo analitico di misurare l'analita in maniera selettiva rispetto alla presenza di altri

componenti che nella matrice possono essere presenti e dare interferenza con l'analisi. La selettività è stata valutata mediante l'analisi di dieci campioni di cozze analyte-free dopo l'estrazione (Figura 14).

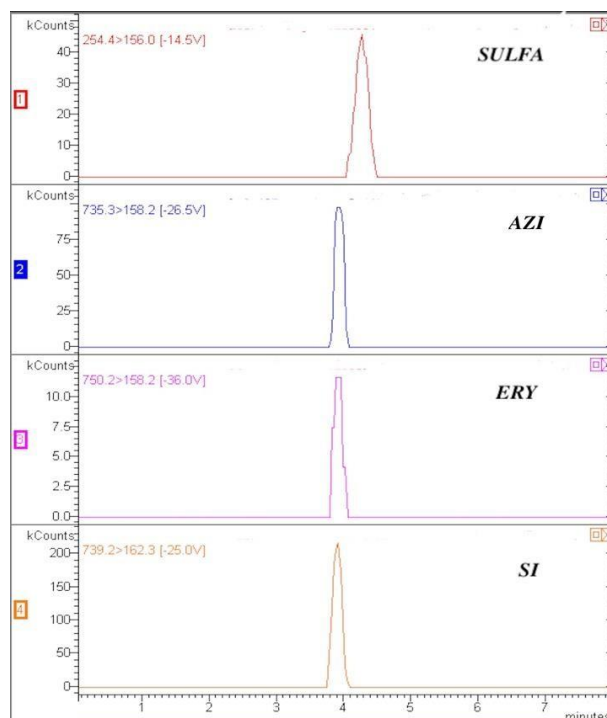


Figura 14. Cromatogramma di un campione di cozze con quantità note di SULFA: sulfametossazolo; ERY: eritromicina; AZI: azitromicina; SI: standard interno.

La linearità del metodo è stata determinata utilizzando curve di calibrazione preparate, utilizzando il metodo dello SI, mediante l'aggiunta di concentrazioni note di antibiotici agli estratti analyte-free di matrice (Figure 15-17).

Gli intervalli di calibrazione erano da 75 ng/g a 1000 ng/g per l'azitromicina, da 25 ng/g a 1000 ng/g per l'eritromicina e il sulfametossazolo.

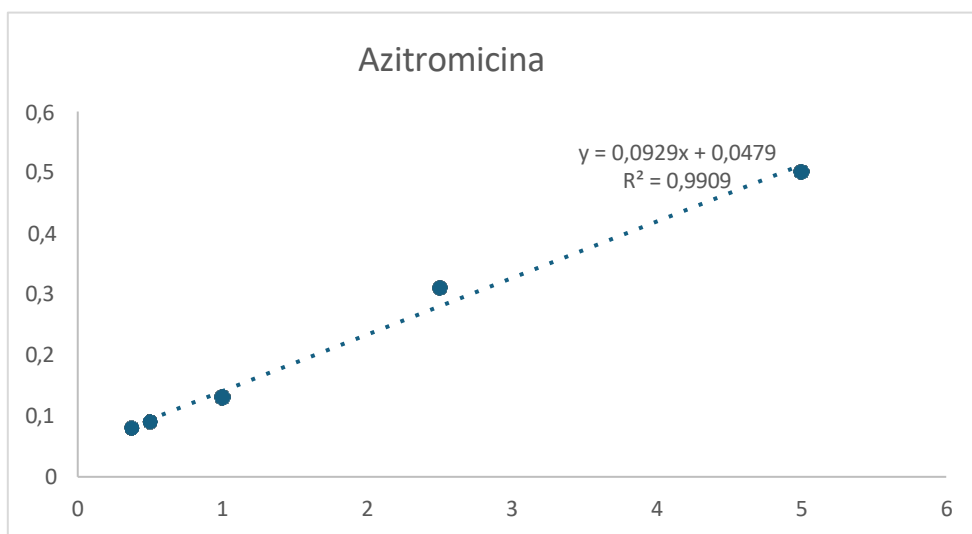


Figura 15. Curva di calibrazione dell'azitromicina nella matrice cozze

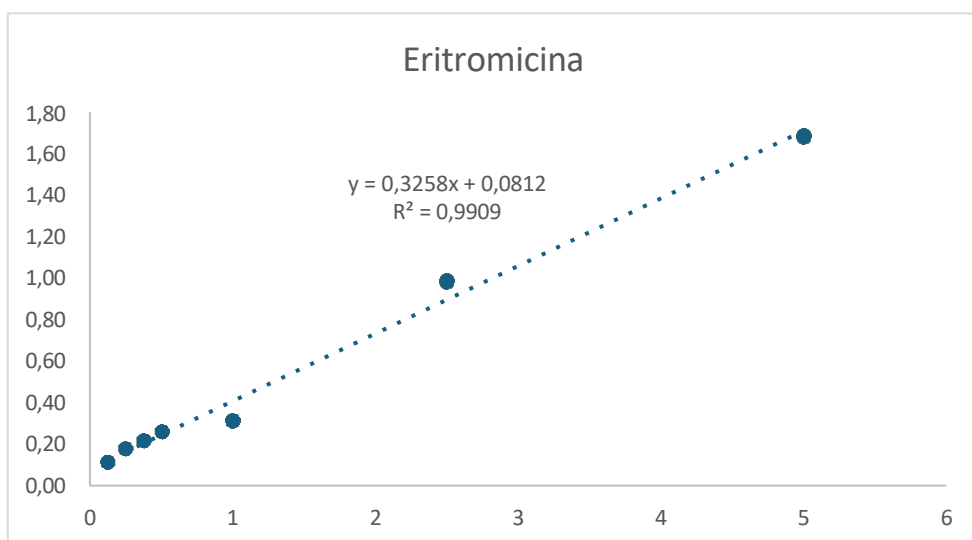


Figura 16. Curva di calibrazione dell'eritromicina nella matrice cozze

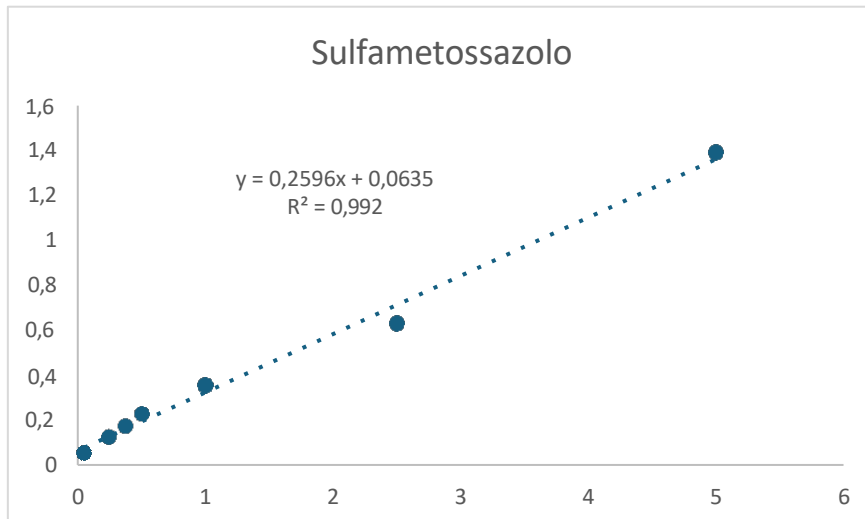


Figura 17. Curva di calibrazione del sulfametossazolo nella matrice cozze

Il LOD che è definito come la più bassa concentrazione di un analita in un campione che la procedura può differenziare dal rumore di fondo, e il LOQ che è definito come la minima quantità di un analita in un campione che può essere determinata quantitativamente con precisione ed accuratezza, sono stati determinati calcolando il rapporto segnale/rumore di fondo (S/N), moltiplicandoli rispettivamente per 3 e 10 e sono riportati in **tabella 4**.

$$\text{LOD} = 3 \times S/N \text{ e } \text{LOQ} = 10 \times S/N$$

In **Tabella 4** sono riportati anche i coefficienti di determinazione R^2 e le equazioni relative alle curve di calibrazione.

Analita	t _R (min)	R ²	y=ax+b	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)
SULFA	4,6	0,9925	y = 1,6506x + 0,1283	70	28
ERY	4,5	0,9942	y = 0,8593x + 0,0731	30	9
AZI	4,6	0,9995	y = 0,2614x - 0,0775	90	27

Tabella 4. Parametri della curva e limiti di determinazione e quantificazione. SULFA: sulfametossazolo; ERY: eritromicina; AZI: azitromicina; t_R: tempo di ritenzione; R²: coefficiente di determinazione; LOQ: limite di quantificazione; LOD: limite di determinazione.

La precisione del metodo, espressa come deviazione standard relativa (RSD), è stata valutata calcolando la ripetibilità intra-day e inter-day. La ripetibilità intraday è stata misurata analizzando la matrice dei mitili fortificata con tre concentrazioni degli antibiotici, scelte nell'intervallo di quelle attese (eritromicina e sulfametossazolo 100, 200 e 1000 ng/g e azitromicina 200, 500 e 1000 ng/g) ed estratta sei volte nell'arco della stessa giornata. Per la ripetibilità inter-day è stata seguita la stessa procedura per quattro giorni consecutivi. Le tre concentrazioni (bassa, media e alta) utilizzate per la valutazione della precisione del metodo sono state scelte facendo riferimento all'intervallo di calibrazione e i limiti di sensibilità per i tre antibiotici (**tabella 5**).

Il recupero è stato calcolato come la percentuale della risposta dell'analita dopo il trattamento del campione rispetto a quella di una soluzione standard che corrisponde al 100%. Il recupero è stato valutato quindi a tre concentrazioni per tutti e tre gli antibiotici (100, 200 e 1000

ng/g per l'eritromicina e il sulfametossazolo e 200, 500 e 1000 ng/g per l'azitromicina) ed è riportato in **tabella 5**. I campioni di cozze analyte-free sono stati fortificati con gli antibiotici alle concentrazioni sopra riportate ed estratti seguendo il metodo estrattivo descritto. Dopo l'analisi, sono stati confrontati con le stesse concentrazioni di soluzioni standard di antibiotico, che rappresentano il 100 % del recupero.

Infine, poiché la soppressione o il potenziamento della ionizzazione dell'analita da parte di altri composti presenti nel campione è un fenomeno conosciuto durante l'analisi LC-MS/MS, che dipende principalmente dalla matrice, dalla procedura di preparazione del campione, dalla qualità della separazione cromatografica e dal tipo di ionizzazione, è stato calcolato l'effetto matrice. L'effetto matrice è stato determinato secondo quanto segue:

$$EM\% = [(RM-RS) / RS] \times 100$$

Dove RM indica l'area media del picco dell'estratto ricostituito con 100, 200 e 1000 ng/g di eritromicina e sulfametossazolo e con 200, 500 e 1000 ng/g di azitromicina; RS invece, indica l'area media dei picchi della soluzione standard di riferimento alle stesse concentrazioni.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 6 (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA, USA).

Capitolo IV
Risultati e discussione

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un metodo di analisi LC-MS/MS in grado di rilevare contemporaneamente più antibiotici appartenenti alle classi dei macrolidi e dei sulfamidici. L' LC-MS/MS è il metodo d'analisi di elezione per rilevare residui di antibiotici in varie matrici quali acqua, latte, sangue, tessuti etc. (Chan et al., 2022; Lu et al., 2022b; Nunes et al., 2022). Il primo passo è stato quello di isolare l'analita dalla matrice cozze, che è caratterizzata da un alto contenuto di lipidi e proteine che possono interferire con l'analisi. Il metodo sviluppato ha permesso l'identificazione e la quantificazione di due antibiotici appartenenti alla classe dei macrolidi, l'eritromicina e l'azitromicina e di un sulfamidico, il sulfametossazolo. Una preliminare ricerca bibliografica ha fornito indicazioni sulle tecniche estrattive per ottenere un metodo veloce, libero da interferenze e che permettesse di ottenere dei buoni recuperi. Inizialmente sono stati provati dei metodi presenti in letteratura validati sulla matrice cozze. Per primo è stato utilizzato un metodo che prevede l'impiego di un buffer McIlvaine (pH 4) seguito da estrazione in fase solida (Chiesa et al., 2018). Il secondo tentativo è stato fatto utilizzando il cicloesano per eliminare la componente lipidica, seguito da estrazione in fase solida (Jayasinghe et al., 2023). Entrambi i metodi, anche con opportune modifiche, non hanno permesso di ottenere dei buoni recuperi. Infine, è stato applicato un metodo che era stato validato su un'altra matrice: il latte (Salis et al., 2022). Inizialmente il metodo è stato provato tale e quale e successivamente sono state apportate delle modifiche per rendere il metodo più semplice.

La procedura selezionata ed usata nel lavoro consiste in una semplice

estrazione solido-liquido che permette di eliminare la parte lipidica e proteica della matrice e avere dei buoni recuperi. Il metodo, quindi, è stato validato per la matrice mitili e si è dimostrato altamente selettivo, senza interferenze nelle transizioni selezionate a parità di tempo di ritenzione degli analiti. La linearità è stata valutata per tutti e tre gli antibiotici con curve di calibrazione in matrice con coefficienti di determinazione $> 0,99$ (**Tabella 4**). Per quanto riguarda la sensibilità del metodo, il LOD e LOQ erano rispettivamente 9 e 30 ng/g per l'eritromicina, 27 e 90 ng/g per l'azitromicina e 28 e 70 ng/g per il sulfametossazolo (**Tabella 4**). I valori di ripetibilità intra-day e inter-day, espressi come RSD%, erano inferiori al 15% per tutti e tre gli antibiotici a tutte e tre le concentrazioni prese in esame, come richiesto dalle linee guida internazionali (Peters et al., 2007) (Tabella 5).

Il recupero percentuale si è attestato su valori superiori al 60% per quanto riguarda i due macrolidi, eritromicina e azitromicina. Lo stesso discorso non può essere fatto per il sulfametossazolo per il quale si ha un recupero del 57,4% a 100 ng/g, del 44,38 % a 200 ng/g e del 23,71% a 1000 ng/g. Il sulfametossazolo aveva mostrato un recupero maggiore con l'utilizzo del tampone McIlvaine con successiva estrazione in fase solida, ma tale metodo non si è dimostrato riproducibile.

I valori dell'effetto matrice sono compresi tra -27,27 e 27,84% per l'eritromicina, tra -27,15 e -0,36% per l'azitromicina e -36,6 e -26,31% per il sulfametossazolo (**Tabella 5**).

Analita	Concentrazione (ng/g)	Effetto Matrice(%)	Recupero (%) ± SD	Ripetibilità (RSD%)	
				Intra- day	Inter- day
SULFA	100	-26,31	57,4±1,57	13,89	10,32
	200	-28,62	44,38±3,08	12,77	12,34
	1000	-36,6	23,71±1,98	8,93	14,74
ERY	100	15,55	67,12±5,03	8,11	13,92
	200	-27,27	73,55±2,61	10,97	12,51
	1000	27,84	62,93±2,92	14,75	11,89
AZI	100	-20	83,09±3,08	14,05	14,37
	500	-27,15	63,69±0,03	9,47	14,70
	1000	-0,36	60,53±3,43	7,76	14,93

Tabella 5. Precisione, accuratezza ed effetto matrice

Il metodo descritto in questo lavoro si è quindi rivelato adeguato al fine di quantificare l'eritromicina e l'azitromicina nella matrice mitili. Per quanto riguarda il sulfametossazolo, il recupero del metodo estrattivo è invece basso.

Le linee guida per la determinazione dei limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive nelle matrici animali destinate al consumo umano non fanno riferimento alla matrice molluschi, per cui è necessario fare riferimento agli LMR genericamente espressi per i pesci. Il valore LMR riportato dalla legislazione dell'Unione Europea (*Regolamento UE N. 37/2010*) per l'eritromicina nei pesci è di 200 ng/g, quindi molto al di sopra del LOD del metodo. Per quanto riguarda il sulfametossazolo, sempre facendo riferimento ai valori riportati per i pesci, la legislazione dell'Unione Europea riporta un LMR di 100 ng/g.

Anche in questo caso il LOD del metodo da noi utilizzato risulta più basso. Questo discorso non può essere fatto per l'azitromicina in quanto, nonostante venga ampiamente utilizzata sia in medicina umana che in medicina veterinaria, non è stato ancora introdotto alcun LMR nei pesci. La presenza di macrolidi e sulfamidici è stata appurata nelle acque di quasi tutto il mondo. In un lavoro fatto includendo alcuni dei più importanti bacini e acque lungo le coste dell'Asia orientale, dell'Europa e dell'America settentrionale è stata osservata come la concentrazione più alta era ascrivibile all'eritromicina con un valore di 3847 ng/L nella regione di Madrid, seguita dall'azitromicina trovata nelle acque di depurazione degli Stati Uniti e in Portogallo alla concentrazione di 2819 ng/L (Li et al., 2022).

Invece, Duan et al., hanno rilevato un valore di sulfametossazolo massimo di 142,6 µg/L in Machakos (Kenya) comparando studi fatti in diversi Paesi del mondo, compresa l'Europa (Duan et al., 2022).

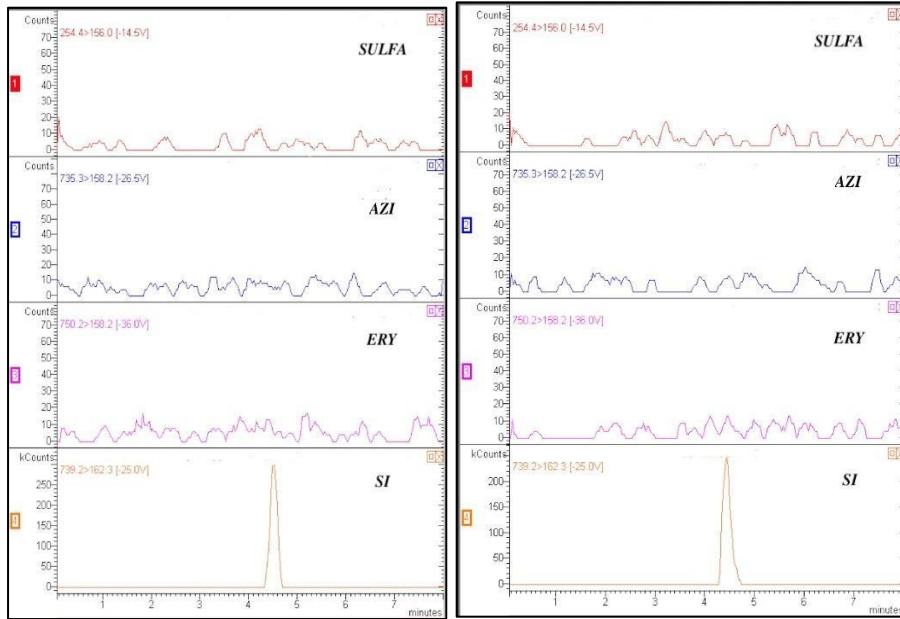
La presenza di macrolidi e sulfamidici negli ambienti acquatici ha evidenziato la necessità di programmi di monitoraggio ambientali più cospicui per ridurre le implicazioni tossicologiche per gli esseri umani, gli animali e l'ambiente, oltre alla propagazione dell'antibiotico resistenza. La presenza di macrolidi e sulfamidici nei bivalvi è stata segnalata in diversi paesi del mondo, in particolar modo in Cina, che oltre ad essere uno dei più grandi consumatori di antibiotici a livello mondiale, è anche il primo produttore al mondo in termini di acquacoltura (Chiesa et al., 2018; Serra-Compte et al., 2017; C. Wang et al., 2023; Zhang et al., 2018). In un lavoro precedente, fatto dal

nostro gruppo di ricerca, abbiamo analizzato diversi studi sulla presenza di antibiotici nei bivalvi raccolti in tutto il mondo, evidenziando che i macrolidi rappresentano la classe di antibiotici più frequentemente rilevata, seguita da sulfamidici e chinoloni (Baralla et al., 2021).

In un recente studio effettuato nel Sud della Cina la concentrazione di diverse classi di antibiotici, in alcuni organismi acquatici (pesci, gamberi, granchi e molluschi) variava da 15,2 a 182 ng/g di peso secco, con i sulfamidici e i macrolidi tra gli antibiotici più abbondanti. I molluschi inoltre presentavano un accumulo maggiore di antibiotici rispetto ai pesci e ai crostacei, implicando un bioaccumulo di antibiotici specie specifica (C. Wang et al., 2023).

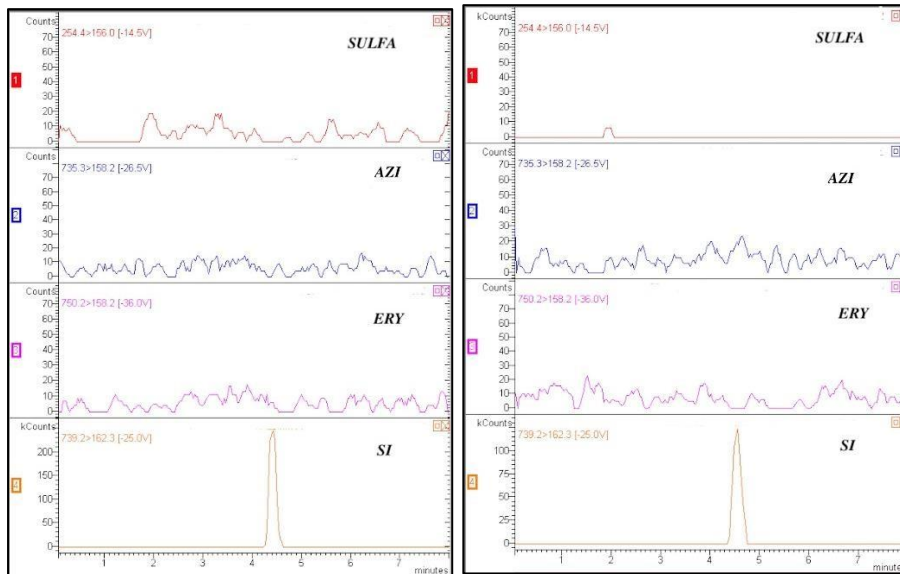
Questi dati suggeriscono che l'elevata domanda di alimenti di origine animale e programmi di acquacoltura intensivi favoriscono il marcato utilizzo di antibiotici, tra cui quelli da noi presi in considerazione.

Nessuno dei tre antibiotici ricercati è stato trovato nei campioni analizzati a concentrazioni superiori ai limiti di determinazione del metodo (**Figura 18**).



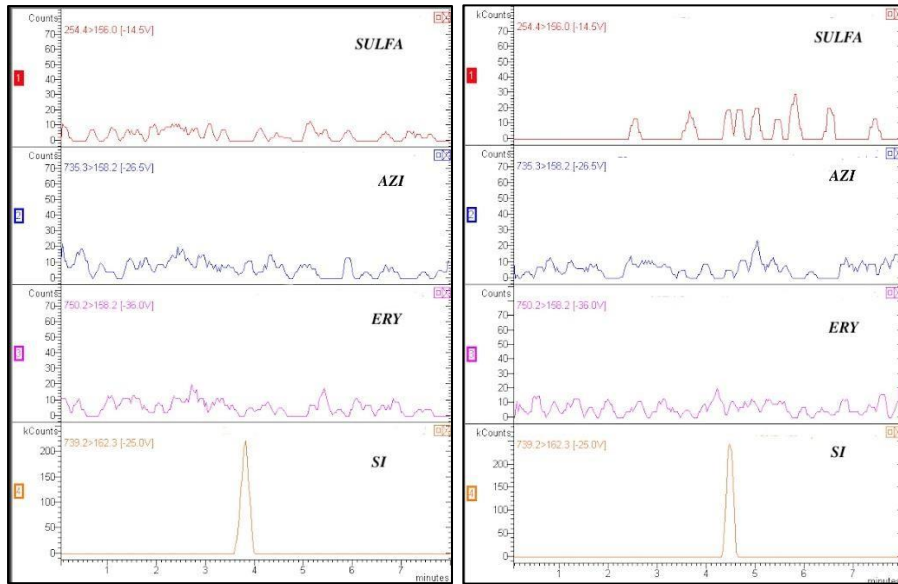
A

B



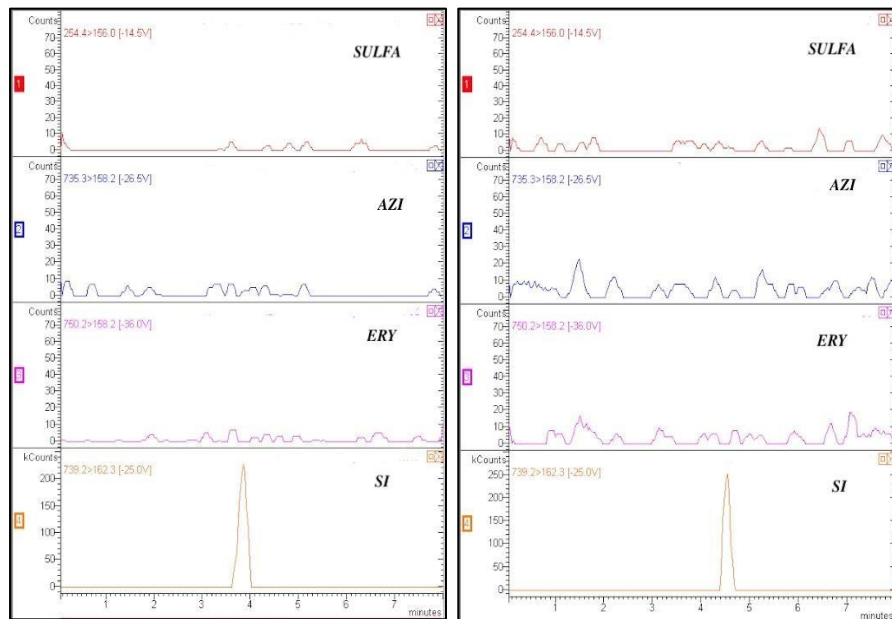
C

D



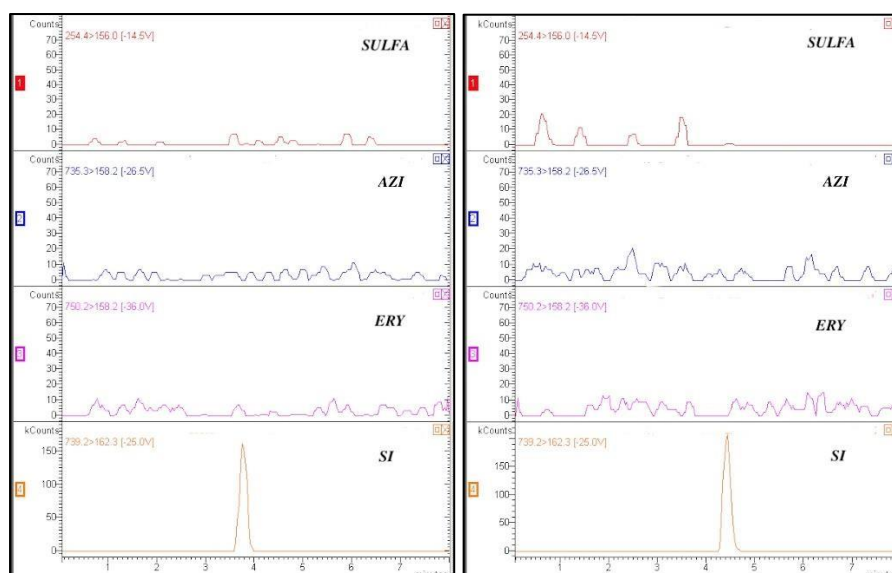
E

F



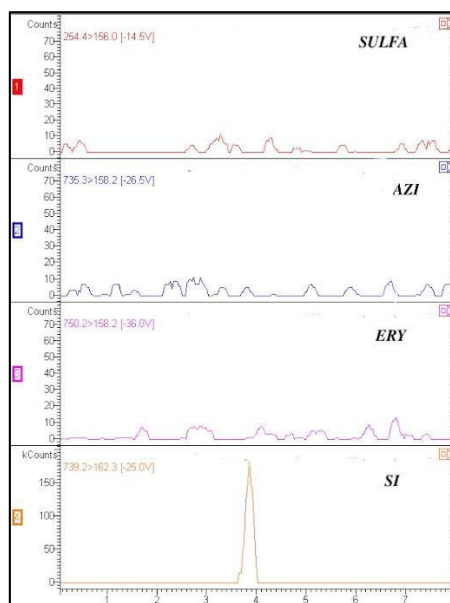
G

H



I

L



M

Figura 18. Cromatogrammi dei campioni analizzati alle transizioni principali per SULFA (sulfametossazolo), AZI (azitromicina), ERY (eritromicina) e SI (standard interno) negli undici siti (A. Cala Saccaia; B. Isola del cavallo; C. Lido del sole; D. Mezzo cammino; E. Porto di Olbia; F. Padrongianus; G. Stagno di Cirdu; H. Stagno di San Giovanni; I. Marina di Arborea; L. Marina di Oristano; M. Santa Gilla).

I risultati ottenuti in questo studio indicano che, rispetto agli antibiotici selezionati, il consumo di cozze raccolte nelle aree designate

non rappresenta al momento un rischio né per la salute umana ed animale né per l'ambiente.

Capitolo V
Conclusioni e
prospettive future

Questa tesi descrive un nuovo metodo analitico validato per la determinazione nei mitili di tre antibiotici appartenenti a due classi differenti: macrolidi e sulfamidici. A nostra conoscenza, questo è il primo studio per determinare la presenza di residui dei suddetti antibiotici in mitili raccolti nelle coste della Sardegna.

L'utilizzo delle cozze come organismo sentinella permette, altresì, di focalizzarci su due ordini di benefici, strettamente connessi: la sicurezza alimentare e la salubrità ambientale. Nessuno dei tre antibiotici ricercati è stato ritrovato nei campioni analizzati a concentrazioni superiori ai LOD del metodo. Tuttavia, è importante sottolineare che il LOD del metodo utilizzato è inferiore ai LMR per l'eritromicina e il sulfametossazolo indicati dal regolamento europeo (*Regolamento UE N. 37/2010*).

Nonostante lo studio non abbia evidenziato la presenza di contaminanti emergenti, il metodo potrebbe essere utilizzato dalle autorità competenti nei programmi di sicurezza alimentare e monitoraggio degli ambienti marini. Inoltre, data la presenza di antibiotici in diverse matrici in tutto il mondo, sarebbe utile includere tali farmaci nei programmi ufficiali di controllo sanitario a livello locale. Inoltre, date le caratteristiche dei mitili ed il loro elevato consumo, dovrebbero essere compiuti nuovi sforzi per stabilire gli LMR per i contaminanti emergenti nella matrice bivalvi, piuttosto che utilizzare quelli generici riferiti ad una popolazione eterogena che racchiude tutte le specie ittiche.

Bibliografia

AIFA. (n.d.). *L'uso degli antibiotici in Italia Rapporto Nazionale Anno 2021*.

AIFA. (2023). *Manuale antibiotici AWaRe Edizione italiana del "The WHO AWaRe Antibiotic Book" 2021*. 526.
https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1811463/Manuale_antibiotici_AWaRe.pdf

Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. In *Cell* (Vol. 128, Issue 6).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>

Apreja, M., Sharma, A., Balda, S., Kataria, K., Capalash, N., & Sharma, P. (2022). Antibiotic residues in environment: antimicrobial resistance development, ecological risks, and bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(3), 3355–3371.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-17374-w>

Bacanli, M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125(January), 462–466.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>

Baccetti B., et al. (1994). *Lineamenti di zoologia sistematica* (Vols. 200–212).

Bandiera. P. (2006). *Organismi acquatici e ambiente: meccanismi biochimici di interazione, risposta e adattamento*. .

Baralla, E., Demontis, M. P., Dessì, F., & Varoni, M. V. (2021). An overview of antibiotics as emerging contaminants: Occurrence in bivalves as biomonitoring organisms. *Animals*, 11 (11), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ani11113239>

Bargagli, R., Sanchez-Hernandez, J. C., Martella, L., & Monaci, F. (1998). Mercury, cadmium and lead accumulation in Antarctic mosses growing

- along nutrient and moisture gradients. *Polar Biology*, 19(5).
<https://doi.org/10.1007/s003000050252>
- Binh, V. N., Dang, N., Anh, N. T. K., Ky, L. X., & Thai, P. K. (2018). Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy. *Chemosphere*, 197, 438–450.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.061>
- Browne, A. J., Chipeta, M. G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E. P. A., Hamadani, B. H. K., Zarea, S., Henry, N. J., Deshpande, A., Reiner, R. C., Day, N. P. J., Lopez, A. D., Dunachie, S., Moore, C. E., Stergachis, A., Hay, S. I., & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet Planetary Health*, 5(12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1)
- Bussani, M. (1983). *Guida pratica alla mitilicoltura* .
- Chan, C. L., Wai, H. K. F., Wu, P., Lai, S. W., Chan, O. S. K., & Tun, H. M. (2022). A Universal LC-MS/MS Method for Simultaneous Detection of Antibiotic Residues in Animal and Environmental Samples. *Antibiotics*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070845>
- Chaturvedi, P., Shukla, P., Giri, B. S., Chowdhary, P., Chandra, R., Gupta, P., & Pandey, A. (2021). Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. In *Environmental Research* (Vol. 194). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110664>
- Chen, J., Ying, G. G., & Deng, W. J. (2019). Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 67(27), 7569–7586.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01334>
- Chiesa, L. M., Nobile, M., Malandra, R., Panseri, S., & Arioli, F. (2018). Occurrence of antibiotics in mussels and clams from various FAO areas. *Food Chemistry*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.072>
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3). [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Consiglio Unione Europea. (2023). *ST-9581-2023-INIT_it*.
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 107, Issue SUPPL. 6). <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>
- Desmarchelier, A., Bessaire, T., Savoy, M. C., Tarres, A., Mujahid, C., Beck, A., Mottier, P., & Delatour, T. (2021). Screening of 154 Veterinary Drug Residues in Foods of Animal Origin Using LC-MS/MS: First Action 2020.04. *Journal of AOAC International*, 104(3), 650–681. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa168>
- Di, U., Appartenenti, I., & Naturali, a P. (n.d.). *Utilizzo dei molluschi bivalvi nel programma di monitoraggio dell' ambiente costiero (Protocollo Mussel Watch)*. 1–3.
- Duan, W., Cui, H., Jia, X., & Huang, X. (2022). Occurrence and ecotoxicity of sulfonamides in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, 820, 153178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153178>
- Europeo, I. L. P., Dell, I. L. C., & Europea, U. (2020).

Celex_32019R0006_It_Txt. 2018, 43–167.

- Fabregat-Safont, D., Gracia-Marín, E., Ibáñez, M., Pitarch, E., & Hernández, F. (2023). Analytical key issues and challenges in the LC-MS/MS determination of antibiotics in wastewater. *Analytica Chimica Acta*, 1239 (October 2022). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340739>
- Fantuzzi N. (2004). *Importanza della diagnosi istopatologica nei molluschi bivalvi marini.* .
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., & Knap, A. H. (2016). Edward D. Goldberg’s proposal of “the Mussel Watch”: Reflections after 40 years. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.074>
- Foulds, G., Shepard, R. M., & Johnson, R. B. (1990). The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25, 73–82. https://doi.org/10.1093/jac/25.suppl_A.73
- G, B., & J, M. C. (1996). Trace Metals in the Marine Bivalve *Macoma Balthica* in the Westerschelde Estuary, the Netherlands. Part 3. Variability of the Role of Cytosol in Metal Uptake by the Clams. *The Science of the Total Environment*, 180, 241–255.
- Gaion A. (2006). *Valutazione degli effetti biologici della movimentazione di sabbie marine mediante l'utilizzo di biomarker cellulari in Mytilus galloprovincialis.* .
- Goldberg, E. D. (1975). *The mussel watch: a first step in global marine monitoring.*
- Goldberg, E. D. (1986). The Mussel Watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment*, 7(1), 91–103.
- Gosling Elizabeth (2003). *Bivalve molluscs- Biology, ecology and culture.*

<https://doi.org/10.1007/BF00398031>

- Guidi, L. R., Santos, F. A., Ribeiro, A. C. S. R., Fernandes, C., Silva, L. H. M., & Gloria, M. B. A. (2018). Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Food Chemistry*, 245(August 2017), 1232–1238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.094>
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. In *Toxicology Letters* (Vol. 131). www.elsevier.com/locate/toxlet
- Heidary, M., Ebrahimi Samangani, A., Kargari, A., Kiani Nejad, A., Yashmi, I., Motahar, M., Taki, E., & Khoshnood, S. (2022). Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(6), 1–16. <https://doi.org/10.1002/jcla.24427>
- Holm, G., Snape, J. R., Murray-Smith, R., Talbot, J., Taylor, D., & Sörme, P. (2013). *Implementing Ecopharmacovigilance in Practice: Challenges and Potential Opportunities*. <https://doi.org/10.1007/s40264-013-0049-3>
- Jadhav, M. R., Pudale, A., Raut, P., Utture, S., Ahammed Shabeer, T. P., & Banerjee, K. (2019). A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 272(August 2018), 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.033>
- Jayasinghe, G. D. T. M., Szpunar, J., Lobinski, R., & Edirisinghe, E. M. R. K. B. (2023). Determination of Multi-Class Antibiotics Residues in

Farmed Fish and Shrimp from Sri Lanka by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Fishes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/fishes8030154>

Jebali, J., Chouba, L., Banni, M., & Boussetta, H. (2014). Comparative study of the bioaccumulation and elimination of trace metals (Cd, Pb, Zn, Mn and Fe) in the digestive gland, gills and muscle of bivalve *Pinna nobilis* during a field transplant experiment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.12.001>

Kavun, V. Y., Shulkin, V. M., & Khristoforova, N. K. (2002). Metal accumulation in mussels of the Kuril Islands, north-west Pacific Ocean. *Marine Environmental Research*, 53(3), 219–226. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00264-6](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00264-6)

Kay, P., Hughes, S. R., Ault, J. R., Ashcroft, A. E., & Brown, L. E. (2017). Widespread, routine occurrence of pharmaceuticals in sewage effluent, combined sewer overflows and receiving waters. *Environmental Pollution*, 220, 1447–1455. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.087>

Klatte, S., Schaefer, H. C., & Hempel, M. (2017a). Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2016.07.001>

Klosterhaus, S. L., Grace, R., Hamilton, M. C., & Yee, D. (2013). Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environment International*, 54, 92–99.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.009>

Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Marsalek, B., Feng, M., & Sharma, V. K. (2020a). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. In *Chemosphere* (Vol. 251). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>

Laore (2016). Stagni e lagune produttive della Sardegna.

<https://medium.com/>

<https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>

Levy, S. B., & Bonnie, M. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. In *Nature Medicine* (Vol. 10, Issue 12S). <https://doi.org/10.1038/nm1145>

Li, J., Li, W., Liu, K., Guo, Y., Ding, C., Han, J., & Li, P. (2022). Global review of macrolide antibiotics in the aquatic environment: Sources, occurrence, fate, ecotoxicity, and risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 439(April), 129628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129628>

Li, J., Liu, L., Zhang, H., Guo, J., Wei, X., Xue, M., & Ma, X. (2023). Severe problem of macrolides resistance to common pathogens in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1181633>

Lu, W., Pan, M., Ke, H., Liang, J., Liang, W., Yu, P., Zhang, P., & Wang, Q. (2022b). An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 18 antibacterial drugs in human plasma and its application in therapeutic drug monitoring. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1044234>

- Lu, Z., Abbasi, D., Fu, J., Azizian, K., & Kouhsari, E. (2022a). *Global status of Azithromycin and Erythromycin Resistance Rates in Neisseria gonorrhoeae : A Systematic Review and Meta- analysis*. 95, 465–478.
- Mayer, R. J., Hampel, N., & Ofial, A. R. (2021). Lewis Acidic Boranes, Lewis Bases, and Equilibrium Constants: A Reliable Scaffold for a Quantitative Lewis Acidity/Basicity Scale. *Chemistry - A European Journal*. <https://doi.org/10.1002/chem.202003916>
- Mengoli A. (1998). Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Asl Ferrara*.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., & Regoli, F. (2018). Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research*, 140, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>
- Ministero della salute. (n.d.). *Piano nazionale di contrasto dell'antibiotico-resistenza*. 1–80. https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?lingua=italiano&id=2660
- Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare. (2015). *Programmi di Monitoraggio per la Strategia Marina*. 2014, 1–7.
- Mu, X., Huang, Z., Ohore, O. E., Yang, J., Peng, K., Li, S., & Li, X. (2023). Impact of antibiotics on microbial community in aquatic environment and biodegradation mechanism: a review and bibliometric analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(25), 66431–66444. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27018-w>
- Nandi, A., Pecetta, S., & Bloom, D. E. (2023). Global antibiotic use during the COVID-19 pandemic: analysis of pharmaceutical sales data from 71 countries, 2020–2022. *EClinicalMedicine*, 57, 101848.

<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101848>

- Nassri, I., khatabi rifi, S., Sayerh, F., & Souabi, S. (2023). Occurrence, pollution sources, and mitigation prospects of Antibiotics, anti-inflammatory, and endocrine disruptors in the aquatic environment. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 20(August), 100878. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2023.100878>
- Nunes, M. J., Paz, V., Cordas, C. M., Noronha, J. P., & Branco, L. C. (2022). LC-MS/MS methodology development and validation for the screening and quantification of five antibiotics in water. *Analytical Methods : Advancing Methods and Applications*, 14(9). <https://doi.org/10.1039/d1ay01754c>
- Oberoi, A. S., Jia, Y., Zhang, H., Khanal, S. K., & Lu, H. (2019). Insights into the Fate and Removal of Antibiotics in Engineered Biological Treatment Systems: A Critical Review. *Environmental Science and Technology*, 53(13), 7234–7264. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01131>
- O'Connor, T. P. (2002). National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, 53(2). [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00116-7)
- Oharisi, O. Oke L., Ncube, S., Nyoni, H., Madikizela, M. L., Olowoyo, O. J., & Maseko, B. R. (2023). Occurrence and prevalence of antibiotics in wastewater treatment plants and effluent receiving rivers in South Africa using UHPLC-MS determination. *Journal of Environmental Management*, 345(February), 118621. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118621>
- OHHLEP. (2021). *One Health High Level Expert Panel Annual Report 2021*. 1–35. <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/one->

health/ohhlep/ohhlep-annual-report-

2021.pdf?sfvrsn=f2d61e40_10&download=true

- OMS. (2019). World health organization model list of essential medicines. *Mental and Holistic Health: Some International Perspectives*, 21, 65.
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K. P., & Naidu, R. (2013). Illicit drugs and the environment - A review. In *Science of the Total Environment* (Vols. 463–464, pp. 1079–1092). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.086>
- Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165(2–3), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>
- Phillips, D. J. H. (1977). The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments-a review. *Environmental Pollution* (1970), 13(4). [https://doi.org/10.1016/0013-9327\(77\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0013-9327(77)90047-7)
- Piano Nazionale Strategico. (2021). Decreto legislativo 13 ottobre 2010, n. 190. 1–19. Reg Ce 11692011. (n.d.). Regolamento ce n. 882/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004
- Regolamento (ce) n. 854/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004.
- Regolamento ue n. 37/2010 per la commissione del 22 dicembre 2009.
- Regolamento ue 2019/6 del parlamento europeo e del consiglio dell'11 dicembre 2018 relativo ai medicinali veterinari.
- Regolamento (ue) n. 2023/915 della commissione del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il

regolamento (ce) n. 1881/2006, 3.

- Salis, S., Rubattu, N., Rubattu, F., Cossu, M., Sanna, A., & Chessa, G. (2022). Analytical Approaches in Official Food Safety Control: An LC-Orbitrap-HRMS Screening Method for the Multiresidue Determination of Antibiotics in Cow, Sheep, and Goat Milk. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196162>
- Scenari, G. L. I., & Acquacoltura, D. (2018). *L'acquacoltura in Sardegna*.
- Serra-Compte, A., Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2017). Multi-residue method for the determination of antibiotics and some of their metabolites in seafood. *Food and Chemical Toxicology*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.031>
- Sugiarto. (2016). *Linee guida per il monitoraggio delle sostanze prioritarie (secondo D.LGS 172/2015)* (Vol. 4, Issue 1).
- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Wang, C., Lu, Y., Sun, B., Zhang, M., Wang, C., Xiu, C., Johnson, A. C., & Wang, P. (2023). Ecological and human health risks of antibiotics in marine species through mass transfer from sea to land in a coastal area: A case study in Qinzhou Bay, the South China sea. *Environmental*

Pollution, 316(P1), 120502.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120502>

Wang*, J. (2008). Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, i, 221–235. <https://doi.org/10.1002/mas>

Wang, Q., Wang, P., & Yang, Q. (2018). Occurrence and diversity of antibiotic resistance in untreated hospital wastewater. *Science of the Total Environment*, 621, 990–999.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.128>

Zainab, S. M., Junaid, M., Xu, N., & Malik, R. N. (2020). Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review on dissemination, sources, interactions, environmental and human health risks. *Water Research*, 187, 116455.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116455>

Zhang, R., Pei, J., Zhang, R., Wang, S., Zeng, W., Huang, D., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Yu, K. (2018). Occurrence and distribution of antibiotics in mariculture farms, estuaries and the coast of the Beibu Gulf, China: Bioconcentration and diet safety of seafood. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154 (November 2017), 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.006>

Lavoro svolto negli anni di dottorato:

Durante il primo anno di Dottorato, oltre ad un lavoro di ricerca bibliografica sull'argomento oggetto di studio, ho avuto modo di mettere a punto diverse metodiche estrattive su matrici biologiche e di validare un metodo analitico HPLC-MS/MS. Inoltre, ho partecipato settimanalmente su piattaforma online al journal club organizzato dal Prof. Mario Giorgi, docente dell'Università di Pisa.

Durante il secondo anno, oltre a mettere in pratica le metodiche acquisite nel primo anno e portare avanti il mio progetto di ricerca perfezionando il metodo di estrazione e i parametri analitici, ho messo a punto altre metodiche di estrazione da campioni biologici di oche (fegato, rene, cuore, cervello, stomaco e muscolo) morte per avvelenamento, che sono stati poi analizzati in HPLC/MS-MS per valutare un probabile avvelenamento da oleandrina. Su questo argomento è stato scritto un lavoro.

Sempre nel secondo anno ho svolto due soggiorni presso l'Università di Pisa, nella sede di San Piero a Grado sotto la supervisione del Professor Mario Giorgi con lo scopo di approfondire la messa a punto di metodiche analitiche su diversi farmaci, tra cui uno studio sulla farmacocinetica della tiamulina. I risultati di questo studio sono stati presentati ad un Congresso internazionale (vedi III anno) ed hanno portato alla pubblicazione di un lavoro scientifico.

Durante il terzo anno mi sono concentrata maggiormente sulla mia ricerca, ottimizzando il metodo estrattivo di antibiotici da mitili e perfezionando tutti i parametri analitici in HPLC-MS/MS. Lo studio ha

riguardato la ricerca di antibiotici con diversi metodi estrattivi su mitili provenienti da allevamenti presenti in diverse zone della Sardegna. Nel mese di luglio ho partecipato al Congresso Internazionale di Farmacologia e Tossicologia veterinaria tenutosi a Bruges (Belgio), dove, è stato presentato un poster dal titolo: "Pharmacokinetics of tiamulin in geese after single and multiple oral administrations and evaluation of drug effects on resistance in cloacal flora" al cui studio ho collaborato nel secondo anno. Questo stesso articolo verrà inoltre presentato al III Congresso sull'antibiotico resistenza che si terrà a maggio 2024 a Novi Sad (Serbia), a cui prenderò parte a seguito di una breve visita nei laboratori di Farmacologia della stessa Università.

In quest'ultimo anno, inoltre, ho coadiuvato il mio docente tutor nelle attività pratiche di laboratorio per gli studenti del Corso di Metodologie e Modelli Sperimentali Animali e del Corso di Chemioterapia Veterinaria. Negli ultimi due anni inoltre abbiamo iniziato a lavorare sulla blatta fischiante del Madagascar (*Gromphadorhina Portentosa*) di cui abbiamo valutato la risposta al dolore ed è attualmente oggetto di scrittura di un nuovo lavoro.

Publicazioni:

1. Baralla, E., Demontis, M. P., Dessì, F., & Varoni, M. V. (2021). An overview of antibiotics as emerging contaminants: Occurrence in bivalves as biomonitoring organisms. *Animals*, *11*, 3239. <https://doi.org/10.3390/ani11113239>.
2. Sartini, I., Vercelli, C., Lebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Fadel, C., Poapolathep, A., Dessì, F., & Giorgi, M. (2023).

Pharmacokinetics and antibacterial activity of tiamulin after single and multiple oral administrations in geese. *Veterinary and Animal Science*, 22(October), 100317. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100317>.

3. Pugliese, N., Tinelli, A., Crescenzo, G., Nieddu, M., Baralla, E., Schiavone, A., Zizzo, N., Samarelli, R., Dessì, F., Circella, E., Zizzadoro, C., Saleh, M. S., & Camarda, A. (2024). Poisoning by *Nerium oleander* L. in Franconia Geese. *Animals*, 14, 612. <https://doi.org/10.3390/ani14040612>.

4. Dessì, F., Varoni, M.V., Baralla, E., Nieddu, M., Pasciu, V., Piras, G., Lorenzoni, G., Demontis, M.P. (2024). Contaminants of emerging concern: antibiotics research in mussels from the coasts of the Tyrrhenian Sea (Sardinia, Italy). *Animals*, 14, 1205. <https://doi.org/10.3390/ani14081205>.