



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE**

*Direttore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana*

**INDIRIZZO IN: Sanità Pubblica ed Evidence Based Prevention**

**XXVII CICLO**

Sardinian Sheep Wool to Detect Environmental and Veterinary  
Chemical Compounds: Impact in the Assessment of Human Health  
Hazards.

***Direttore:***

Prof. Andrea Fausto Piana

***Tesi di dottorato di:***

Dott. ssa Paola Maria Lo Curto

***Tutor:***

Prof. Andrea Fausto Piana

***Co-Tutor:***

Dott.ssa Emanuela Azara

**Anno Accademico 2014 - 2015**

## Indice

<b>1 . INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>2 .LA LANA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Strutture delle fibre ed elementi istologici e cellulari</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Le proteine della lana</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3 La lanolina</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4 Il pH della lana</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 La filiera della lana</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6 Campi di impiego della lana</b> .....	<b>14</b>
<b>3. SOSTANZE INQUINANTI</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Inquinanti organici: farmaci per uso umano e veterinario</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Farmaci ectoparassitici e farmaci antelmintici per uso veterinario</b> .....	<b>19</b>
<b>4. AVERMECTINE</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Caratteristiche chimiche</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Meccanismo d'azione</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3 Tossicità</b> .....	<b>23</b>
<b>5. METALLI PESANTI</b> .....	<b>24</b>
<b>5.1 Metalli in traccia</b> .....	<b>24</b>
<b>5.2 Fonti di inquinamento da metalli pesanti</b> .....	<b>25</b>
<b>5.3 Effetti sull'organismo umano</b> .....	<b>26</b>
<b>5.4 ARSENICO</b> .....	<b>28</b>
<b>5.4.1. Meccanismo d'azione</b> .....	<b>28</b>
<b>5.4.2. Aspetti tossicologici</b> .....	<b>29</b>
<b>5.4.3. Impatto ambientale</b> .....	<b>29</b>
<b>5.5 CADMIO</b> .....	<b>30</b>
<b>5.5.1. Comportamento cinetico</b> .....	<b>31</b>
<b>5.5.2. Meccanismo d'azione</b> .....	<b>31</b>
<b>5.5.3. Aspetti tossicologici</b> .....	<b>32</b>
<b>5.5.4. Impatto ambientale</b> .....	<b>33</b>
<b>5.6 CROMO</b> .....	<b>34</b>

5.6.1.	Comportamento cinetico.....	34
5.6.2	Meccanismo d'azione.....	35
5.6.3.	Aspetti tossicologici .....	35
5.6.4.	Impatto ambientale .....	36
5.7	MERCURIO .....	36
5.7.1.	Comportamento cinetico.....	38
5.7.2.	Meccanismo d'azione.....	39
5.7.3.	Aspetti tossicologici .....	39
5.7.4.	Impatto ambientale .....	40
5.8	PIOMBO.....	40
5.8.1.	Comportamento cinetico.....	41
5.8.2.	Meccanismo d'azione.....	41
5.8.3.	Aspetti tossicologici .....	41
5.8.4.	Impatto ambientale .....	42
6.	BIOINDICATORI. ....	44
7.	SCOPO DEL LAVORO .....	46
8.	MATERIALI E METODI .....	48
8.1.	STRUMENTAZIONE ANALITICA .....	48
8.1.2.	Estrattore a microonde CEM MARS 6.....	48
8.1.3	Spettrometria di massa al plasma accoppiata induttivamente ( ICP-MS) .....	50
8.1.4	Spettrometria di massa ad alta risoluzione HRMS.....	52
8.1.5.	Q- Orbitrap .....	54
8.2	MESSA A PUNTO E OTTIMIZZAZIONE DEI METODI ANALITICI .....	55
8.1.2	Inquadramento del problema analitico .....	55
8.2.3	Sviluppo e ottimizzazione di un metodo interno LC-HRMS. ....	58
8.2.4	Validazione di un metodo analitico. ....	58
8.3	Campionamento .....	61
8.4	Materiali e solventi .....	65
8.5	Estrazione campioni per analisi Avermectine .....	66
8.5.1.	Purificazione dei campioni estratti.....	71
8.6	Condizioni strumentali .....	72

8.7	Preparazione soluzioni standard.....	77
8.8	Costruzione delle curve di calibrazione in solvente.....	78
8.9	Preparazione della curva in matrice e dei campioni di controllo.....	79
8.10	Estrazione dei metalli pesanti e degli elementi.....	80
9.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	81
9.1	Ottimizzazione del metodo LC-HRMS.....	81
9.2	Validazione metodo LC-HRMS.....	84
9.2.1	Selettività.....	85
9.2.3	Determinazione della Linearità.....	86
9.2.4	Determinazione del Limite di Rivelazione (LOD) e del Limite di Quantificazione (LOQ). ....	87
9.2.5	Determinazione di Precisione e Accuratezza.....	88
9.2.6	Effetto Matrice.....	89
9.2.7	Stabilità.....	91
9.2.8	Robustezza.....	91
9.3	Determinazione delle Avermectine in campioni di lana sarda.....	92
9.4	Determinazione degli elementi nella lana.....	99
9.5	Analisi statistica multivariata.....	104
10.	CONCLUSIONI.....	115
	BIBLIOGRAFIA.....	117

## 1. INTRODUZIONE

Come noto in letteratura, il biomonitoraggio, ovvero *“quell’attività sistematica condotta in continuum o ad intervalli regolari basata sulla raccolta di campioni biologici su cui determinare quantitativamente i livelli degli inquinanti o dei loro metaboliti, o gli effetti biologici provocati da tali inquinanti, al fine di valutare l’esposizione e i rischi per la salute dei soggetti esposti”*, mediante l’uso di bioindicatori e biomarcatori, può essere considerato un efficiente strumento di prevenzione per la salute umana, dei rischi di origine ambientale. L’esposizione della popolazione generale agli agenti xenobiotici attraverso l’ambiente, gli alimenti e i beni di consumo rappresenta infatti oggi una delle maggiori preoccupazioni per le istituzioni sanitarie [1].

Negli ultimi decenni infatti, i mercati globali si sono orientati sempre più verso la ricerca di risorse sostenibili. La lana grazie alla sua composizione chimico-fisica complessa e alla sua peculiare struttura, è divenuta una delle risorse ecosostenibili più ricercate. La matrice lana presente sull’ovino, mostra infatti una serie di caratteristiche che un bioindicatore deve possedere per essere ritenuto efficiente, quali l’essere facilmente misurabile, in modo tale da essere continuamente aggiornato; economico; scientificamente valido; rilevabile; sensibile a piccole variazioni di stress ambientale; quantificabile; applicabile in aree geografiche ampie e nel numero più ampio possibile di comunità e di ambienti ecologici. Un vantaggio fondamentale che questo potenziale bioindicatore potrebbe fornire, è la possibilità di poter valutare sia l’esposizione passata all’inquinante indagato che quella presente e avere quindi la possibilità di seguire e tracciare nel tempo l’evoluzione dell’esposizione all’inquinante stesso. Un ulteriore vantaggio di tale bioindicatore è rappresentato dalla possibilità di scegliere previamente il sito da indagare, ampliando sensibilmente il numero ed il tipo di siti da monitorare.

Il presente elaborato di tesi, alla conclusione del triennio formativo del Dottorato di Ricerca, ha come principale obiettivo la valorizzazione della matrice lana come possibile strumento di biomonitoraggio, nella fattispecie come bioindicatore ambientale di sostanze

potenzialmente rischiose per la salute umana, quali elementi chimici (metalli pesanti in modo particolare) e farmaci per uso veterinario (Avermectine). Ulteriore obiettivo è stata la validazione dei metodi analitici mediante LC-HRMS (cromatografia liquida interfacciata con la spettrometria–massa ad altissima risoluzione) per la determinazione delle Avermectine.

## **2 .LA LANA**

### **2.1 Strutture delle fibre ed elementi istologici e cellulari**

Le fibre di lana si sviluppano da una cavità tubulare, presente sull'epidermide, chiamata follicolo pilifero. I principali elementi caratterizzanti la struttura del follicolo pilifero sono:

- a) la ghiandola sebacea
- b) la ghiandola sudorifera
- c) il bulbo pilifero
- d) la papilla, che si origina da una protuberanza della base del bulbo [2].

La distribuzione percentuale dei principali componenti le fibre di lana è mostrata nella Tabella 1.

Dai dati in essa riportati si può affermare che, da un punto di vista chimico, la lana, nel suo insieme, è una fibra sostanzialmente proteica, le cui proteine principali appartengono alla famiglia delle cheratine [3].

TABELLA 1	
COMPOSIZIONE MEDIA DELLE FIBRE DI LANA (%)	
Proteine di natura cheratinica	> 80
Altre sostanze proteiche	~ 17
Sostanze lipidiche	~ 1
Sali minerali	~ 0,5

I principali elementi istologici costituenti la fibra di lana, sono rappresentati dalla ghiandola sebacea, dalla ghiandola sudorifera e dalla papilla (Figura 1).

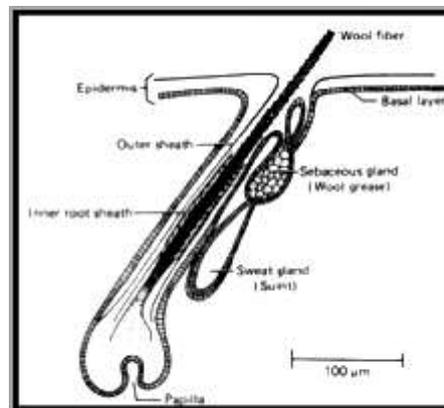


Figura 1. Principali elementi istologici costituenti la fibra di lana

Le fibre di lana possono essere classificate in fini, extrafini e spesse. Le prime due possiedono un diametro inferiore a 30 µm e sono costituite essenzialmente da due tipi di cellule: cuticulari e corticali.

Le cellule cuticulari formano la parete esterna delle fibre, dando vita ad una struttura scagliosa; la cuticola, andando dall'esterno della fibra verso l'interno, è costituita dall'esocuticola e dall'endocuticola, entrambe ricoperte da una sottile membrana idrofoba semipermeabile (Figura 2) [4].

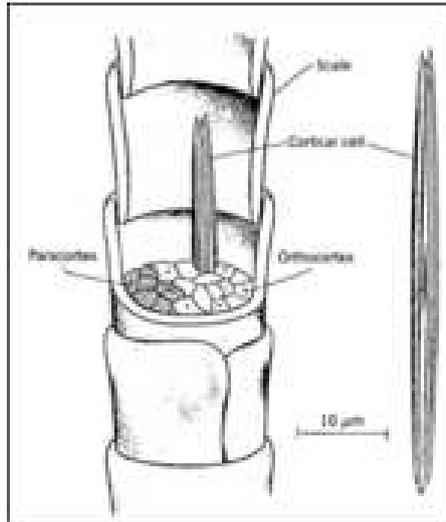


Figura 2. Fibra di lana

L'esocuticola è separata dalle cellule corticali da una sottile membrana cellulare complessa (spessa all'incirca 25 nm), la stessa che separa tra loro le singole cellule corticali assicurandone la coesione (cemento intracellulare). Le cellule corticali, nel loro insieme, vanno a costituire il *cortex* che è diviso in due parti, il *paracortex* e l'*ortocortex*, i quali si differenziano fra loro per la composizione chimica e per la conformazione delle macromolecole nella matrice e nelle zone amorfe.

Le cellule corticali, come evidenziato nello schema della figura 2, sono fusiformi, caratterizzate da una lunghezza compresa tra 80 e 110 µm e nel punto di massima ampiezza da una larghezza variabile tra 2 e 5 µm e da uno spessore di 1,2 – 2,6 µm.

Esse a loro volta sono costituite da un insieme di macrofibrille le quali sono più densamente impacchettate nella regione denominata *ortocortex* rispetto alla zona paracorticale.

Le macrofibrille sono la risultante dell'aggregazione di microfibrille, ciascuna delle quali, come sarà descritto in dettaglio nelle prossime pagine, è composta da protofibrille tenute insieme da una matrice meno densa e meno ordinata (Figura 3) [5].



Figura 3: Micrografia elettronica in scansione di fibre di lana, fratturate a bassa temperatura, dalle quali è possibile evidenziare le singole cellule corticali

Nelle fibre di lana più spesse, con un diametro maggiore di  $35\ \mu\text{m}$ , è presente nella parte centrale, un terzo aggregato cellulare, il midollo o cavità porosa costituito da cellule poligonali (che formano il materiale parietale), da residui nucleici e pigmenti [3]. Le caratteristiche morfologiche e strutturali delle fibre di lana (strutture a forma di scaglie superficiali, lunghezza e spessore, presenza o meno del midollo centrale), documentabili mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), dipendono fortemente dalla razza degli ovini e, nell'ambito della stessa razza, dall'età della pecora, dal tipo di allevamento, dalla natura dei pascoli e, quindi, dalla specificità dei nutrienti.

Inoltre, anche nel caso di una stessa pecora, è possibile riscontrare notevoli variazioni a seconda della parte del corpo da cui la fibra trae origine [6] (Figura 4).



Figura 4. Caratterizzazione morfologica e strutturale della fibra di lana di razza Sarda al SEM

## 2.2 Le proteine della lana

Le proteine naturali si distinguono in proteine fibrose e proteine globulari.

Le prime, rappresentate da  $\alpha$  e  $\beta$  cheratine, collagene ed elastina, sono insolubili in acqua ed alla base della struttura di numerosi tipi di tessuti animali.

Le seconde, sono insolubili in acqua e si trovano nella struttura di enzimi ed altre proteine funzionali, quali ad esempio le albumine.

Le proteine della lana sono tutte  $\alpha$ - cheratine e vengono classificate in base alla loro composizione in amminoacidi (Tabella2) [7].

TABELLA 2				
FRAZIONE PROTEICA	% MASSA	N° DI AMMINOACIDI	S % IN MASSA	PROPRIETA'
A basso zolfo	58	392-416	1,5-2	
Ad alto zolfo	18	4-6	4-6	16-24% in moli di Cys
Ad ultra-alto zolfo	8	8	8	33-37% in moli di Cys
Ad alto Gly-Tyr	6	0,5-2	0,5-2	35-60% in moli di Gly e Tyr

Le catene laterali rappresentano circa il 50% in massa del materiale proteico e interagiscono tra loro sia tramite legami di tipo covalente che con attrazioni polari di vario tipo.

I legami idrogeno sono essenziali per la stabilizzazione dell' $\alpha$ -elica; i ponti disolfuro sono responsabili della maggior parte della reticolazione nella lana e la rendono insolubile e relativamente tenace, ma vi sono anche molti altri tipi di legami trasversali, fra cui quello

isopeptidico, che è un legame ammidico tra un gruppo -COOH e un gruppo -NH<sub>2</sub> presenti sulle catene laterali [7].

Se la fibra è sotto tensione, i ponti disolfuro, stabili nella fibra secca, si riordinano velocemente, portando al rilassamento della tensione molecolare nella fibra.

La lana scaldata in acqua bollente mostra reticolazioni ulteriori con formazione di lantionina e lisinoalanina, soprattutto in ambiente basico.

Nella lana i gruppi acidi e basici sono approssimativamente bilanciati; un disturbo dell'equilibrio può portare a cambiamenti nel comportamento alla trazione.

La composizione % in amminoacidi della lana è riportata nella Tabella 3.

<b>TABELLA 3</b>			
<b>AMMINOACIDO</b>	<b>COMPOSIZIONE %</b>	<b>AMMINOACIDO</b>	<b>COMPOSIZIONE %</b>
<b>Acido glutammico</b>	15,22	Glicina	7,19
<b>Arginina</b>	9,79	Istidina	1,07
<b>Cistina</b>	11,34	Alanina	4,58
<b>Cistina SH</b>	0,14	Lisina	3,92
<b>Cistina SO<sub>3</sub>H</b>	0,6	Fenilalanina	3,51
<b>Isoleucina</b>	3,2	Acido aspartico	7,19
<b>Leucina</b>	9,06	Prolina	7,93
<b>Triptofano</b>	6,39	Tirosina	6,34
<b>Valina</b>	5,62	Serina	10,79

Si noti la presenza approssimativamente paritaria di gruppi acidi e basici, l'alta % di amminoacidi solforati e di serina, che forma legami idrogeno.

### 2.3 La lanolina

La lanolina è una cera che, secreta dalla pelle di pecora, si accumula sulla lana ( la sua funzione sul vello delle pecore, per la sua azione protettiva ed emolliente, è di mantenerlo soffice e protetto dagli agenti atmosferici) da cui viene estratta con sapone e solventi.

E' costituita da varie sostanze, tra cui essenzialmente steroidi esterificati con acidi grassi.

Ha un colore giallastro e consistenza morbida, per cui viene comunemente considerata un grasso; in realtà è una cera in quanto non contiene glicerina [8].

### 2.4 Il pH della lana

La lana ha un pH isoelettrico di 4,95; a pH inferiori al punto isoelettrico la fibra ha un comportamento cationico, ed in questo stato fissa gli anioni coloranti e viceversa.

In conseguenza della struttura orientata della fibra, il rigonfiamento per assorbimento di umidità è altamente anisotropo: l'incremento di diametro è molto maggiore di quello in lunghezza.

L'assorbimento di umidità da parte delle fibre è accompagnato da svolgimento di calore, mentre la perdita di umidità determina assorbimento di calore.

La struttura a scaglie della lana provoca una resistenza allo scorrimento contro fibra e dà luogo alla feltrabilità, che si manifesta a seguito di sollecitazioni meccaniche esercitate a umido: acqua e basi sollevano le squame, che così aderiscono meglio le une alle altre dando luogo alla formazione di feltri compatti. I trattamenti anti -infeltrenti prevedono la deposizione di resine sulla fibra che livellano le scaglie o di ossidanti chimici come l'ipoclorito, che le distruggono. I trattamenti alcalini con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hanno un forte effetto sul comportamento a tensione delle lane, specie di quelle fini, nelle quali diffondono più

rapidamente. In condizioni basiche il perossido d'idrogeno ossida i residui di cistina a residui di acido cisteico.

Lo stesso si verifica ossidando la lana con cloro o ipoclorito.

Trattamenti di questo genere conferiscono irrestringibilità (se non troppo approfonditi) e, dando luogo a erosione della cuticola con quasi totale eliminazione delle scaglie, rappresentano un trattamento antinfeltrente.

Il comportamento chimico della lana, la cui stabilità è connessa soprattutto alle condizioni di reattività dei ponti cistinici, è legato al punto isoelettrico: la fibra, avendo pH isoelettrico intorno a 5, resiste meglio ad acidi che a basi. In generale, comunque, finché si mantiene in un intervallo di pH compreso fra 5 e 7, la cheratina della lana subisce danni limitati [7]

## 2.5 La filiera della lana

Il sistema o ciclo laniero si distingue fundamentalmente in cardato e pettinato. La distinzione riguarda la materia prima che, per il ciclo pettinato, utilizza fibre più lunghe e di diametro più fine, destinate alla lavorazione di filatura e tessitura pettinate, e per il ciclo cardato fibre corte e di diametro più grosso, che vanno nel settore della filatura e tessitura cardata.

**1) Pettinatura:** In questa fase la lana grezza (lana sucida) viene sottoposta, in un primo momento, ad una serie di trattamenti a umido (lavaggi con acqua calda, tensioattivi e sostanze alcaline) per eliminare le impurità (residui organici, grasso, terra) presenti sulla stessa e quindi asciugata. Le fasi successive consistono nelle operazioni di cardatura e pettinatura. Le due operazioni prevedono la miscelazione intima delle fibre, l'eliminazione parziale dei materiali vegetali e delle fibre molto corte, la parallelizzazione e l'accoppiamento delle fibre per trasformarle in stoppino o nastro. I due cicli, cardato e pettinato, differiscono per la materia prima impiegata (fibre corte o lunghe), per il tipo di

operazioni meccaniche applicate, per il tipo e quantità Fdi ensimages impiegati (lubrificanti, antistatici). Le fibre, variamente separate nel processo, hanno destinazioni diverse, e solo frazioni minori di materia fibrosa non filabile vengono avviate verso usi alternativi. La sostanza grassa residua recuperata dai bagni esauriti di lavaggio del sucido, ha impieghi nell'industria cosmetica.

**2) Filatura.** Il ciclo di lavorazione di filatura è simile nei due settori lanieri, e parte da masse fibrose già lavate e pulite. Si basa su una tecnologia di tipo meccanico, mentre i principali trattamenti a umido sono quelli di tintura e di trattamento irrestingibile. Si aggiungono alla massa fibrosa, per facilitare la lavorazione delle fibre, sostanze emulsionanti e lubrificanti. Da notare che, per il ciclo laniero, la tintura delle fibre può essere anticipata valle della filatura (tintura in tops), a differenza di quanto avviene negli altri cicli, ma consistenti quantità di materiali vengono tinti in filato e in tessuto. Le frazioni di materia prima o di prodotto finale residue vengono riutilizzate per filati di titolo più grosso, e solo frazioni residuali escono dalla filiera.

**3) Tessitura .** Tale operazione, simile in tutte le filiere tessili, trasforma in tessuti i filati, ricorrendo a tecnologie meccaniche, mentre solo la preparazione degli orditi coinvolge processi chimico-fisici. I residui di tessitura sono, per un verso, parificabili a quelli di filatura, e, per un altro, sono sfridi di tessuti destinati al riciclaggio (stracci) [9].

## 2.6 Campi di impiego della lana

Dallo studio delle caratteristiche della lana, si può evincere che, oltre alla produzione di tessuti per il settore dell'abbigliamento, tale materiale può essere efficacemente impiegato anche in altri campi. Come verrà mostrato in questa relazione, esistono studi per l'applicazione della lana in diversi settori:

- in campo agricolo: soprattutto come elemento nutriente per colture e ammendante per il terreno [10];
- in campo ingegneristico: per la realizzazione di nano materiali, nelle tecnologie per la produzione di energia nella fase di trattamento dei gas di scarto, nella realizzazione di materiali da costruzione e nell'isolamento acustico degli edifici [11];
- nel campo del risparmio energetico, in particolar modo per l'isolamento termico degli edifici e conseguente riduzione dei consumi energetici [12];
- In campo biomedico: nella realizzazione di dispositivi biomedici [11].

### 3. SOSTANZE INQUINANTI

L'uomo, gli animali e le piante sono esposti ad un'enorme varietà di sostanze chimiche estranee all'organismo, o xenobiotici, che possono essere di origine naturale o antropogenica. Queste sostanze potenzialmente tossiche comprendono i metalli pesanti e altri composti inorganici ed un gran numero di complesse molecole organiche. L'uso di sostanze chimiche elaborate dall'uomo, e la loro immissione nell'ambiente, non è certo una pratica recente, tuttavia solo verso la metà del 1900 il fenomeno ha assunto dimensioni preoccupanti. Le principali fonti da cui provengono sono localizzate nel settore industriale, agricolo e domestico. Molte sostanze che l'uomo immette nell'ambiente possono essere lentamente trasformate dagli organismi viventi, specialmente dai de-compositori, sino ad essere completamente demolite e sono definite biodegradabili; altre sostanze invece non sono biodegradabili ( o lo sono molto lentamente). La maggior parte delle sostanze inquinanti sono in grado di accumularsi negli organismi perché sono prevalentemente idrofobiche e attraverso la catena trofica vengono trasferite da un organismo all'altro subendo un progressivo aumento di concentrazione mediante il processo di “amplificazione biologica” di una sostanza tossica, che, inizialmente presente nel terreno o nelle acque, si accumula prima nelle piante, successivamente negli erbivori che se ne nutrono e più tardi nei carnivori. L'accumulo delle sostanze inquinanti, che prende il nome di “bioaccumulo”, può avvenire attraverso due differenti meccanismi [13]:

- la bioconcentrazione: è un fenomeno di natura fisica che dipende unicamente dalla lipofilità del composto ( le sostanze liposolubili vengono assorbite più facilmente di quelle idrosolubili)
- la biomagnificazione: accumulo crescente di inquinanti, attraverso l'ingestione di cibo contaminato, che raggiunge in un organismo quantità più elevate rispetto agli organismi che lo precedono nella catena alimentare.

Una sostanza tossica è capace di produrre delle risposte dannose in un sistema biologico, alterandone seriamente le funzioni o producendone la morte.

Virtualmente ogni sostanza chimica, conosciuta e non, può produrre un danno o la morte se presente in concentrazioni sufficientemente elevate.

Tutte le sostanze perciò sono potenzialmente tossiche, la dose è un fattore discriminante per determinare quando una sostanza produce effetti indesiderati, danni severi o la morte.

Per produrre una manifestazione tossica, un agente chimico o un suo metabolita deve potere interagire con specifici siti dell'organismo ed essere presente in una appropriata concentrazione per un periodo sufficientemente lungo: perciò l'eventuale manifestazione tossica dipende dalle proprietà chimico-fisiche dell'agente chimico, dall'esposizione e dalla sensibilità del sistema biologico.

Particolarmente importante è anche la via di assunzione della sostanza. Le più importanti vie attraverso cui gli agenti tossici hanno accesso all'organismo animale sono: il tratto intestinale, la pelle ed i polmoni [14].

### **3.1 Inquinanti organici: farmaci per uso umano e veterinario**

I prodotti farmaceutici usati nella medicina umana e veterinaria comprendono approssimativamente 3000 composti differenti tra i quali antiinfiammatori (ibuprofene e aspirina), antibiotici (sulfonamidi e macrolidi), medicinali per la regolazione del colesterolo e dei lipidi (colifibrati e statine),  $\beta$ -bloccanti (propranololo), farmaci neuroattivi (caffeine, carbamazepina, fluoxetina e morfina), e molti altri [15] con grandi differenze nella struttura chimica, funzione e meccanismo d'azione [16]. I prodotti farmaceutici per usi umani sono escreti, o nella loro forma nativa o come metaboliti, negli scarichi urbani, sia domestici che ospedalieri [17] e raggiungono gli impianti di scarico nel quale queste sostanze, non vengono rimosse [18]. In seguito, lo smaltimento non corretto, porta al raggiungimento dei prodotti farmaceutici nel sistema acquatico naturale [19].

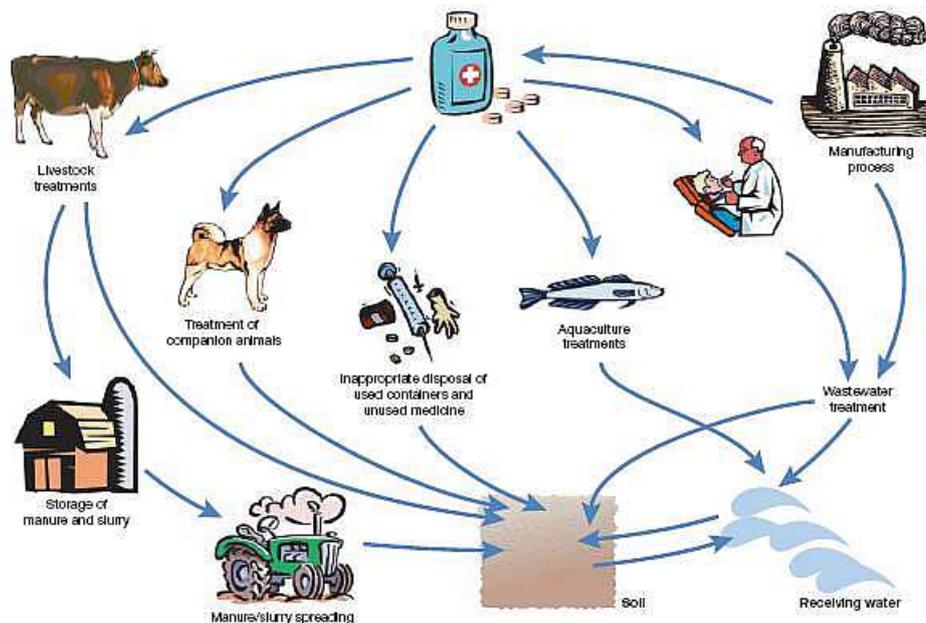


Figura 5. Ciclo ambientale dei farmaci veterinari e per uso umano

Tutto ciò provoca un rilascio continuo di farmaci nell'ambiente acquatico, aumentando la preoccupazione dell'opinione pubblica e scientifica in merito agli effetti di queste sostanze nell'ambiente [20]. Un'altra fonte di immissione è rappresentata dallo smaltimento dei liquami derivati da allevamenti e da effluenti di impianti di acquacoltura, in cui l'utilizzo di farmaci veterinari è molto elevato. I farmaci vengono continuamente riversati a basse concentrazioni (tra ng/L e µg/L) con la possibilità di indurre negli organismi marini una tossicità a lungo termine[21]. Queste concentrazioni basse sono state rilevate nelle matrici acquose come gli influenti ed effluenti da impianti di depurazione, nelle acque superficiali come laghi, fiumi, estuari ecc., nelle acque costiere, acque sotterranee e nelle acque potabili. Le informazioni geografiche esistenti sulle fonti di contaminazioni ambientale sono scarse e limitate. Paesi e regioni del mondo differiscono riguardo alla prevalenza di malattie, al diverso trattamento delle acque di scarico, dalle loro abitudini culturali o dai vincoli economici relative al mercato farmaceutico [22]. Tuttavia, sembra che le aree urbane siano le principali fonti di contaminazione a causa della prossimità di ospedali e di

depuratori. Inoltre, il contributo delle regioni rurali dove l'agricoltura, la zootecnia e acquacoltura rappresentano strumenti importanti per la vita, dovrebbe essere considerata altrettanto importante. Solitamente le acque reflue sono condotte negli impianti di depurazione che svolgono un ruolo chiave nell'ingresso dei prodotti farmaceutici nell'ambiente acquatico. La valutazione dell'efficienza di queste strutture è stata studiata in dettaglio mediante i tassi di rimozione dei farmaci che possono variare fino al 99%, confrontando gli affluenti e gli effluenti dei depuratori [23], [24]. Tuttavia, si deve essere consapevoli del fatto che se un farmaco particolare non viene rilevato in un effluente, non significa necessariamente che questo sia stato completamente rimosso. In alcune occasioni, potrebbe essere stato degradato dando origine a metaboliti che potrebbero successivamente contaminare le acque superficiali [25]. I prodotti farmaceutici sono sostanze esogene, organiche o inorganiche, capaci di indurre modificazioni funzionali in un organismo vivente attraverso un'azione fisica, chimica o fisico-chimica.

### 3.2 Farmaci ectoparassitici e farmaci antelmintici per uso veterinario

Con il termine di ectoparassitici si intende quella classe di farmaci o composti che vengono usati contro i parassiti esterni degli animali con lo scopo di limitarne la crescita, ucciderli o respingerli. Esistono oltre 700 principi attivi classificati come ectocidi [26], ripartiti in alcuni gruppi farmacologici principali (Tabella 4).

<b>ECTOPARASSITI</b>	<b>GRUPPO CHIMICO</b>
<b>Zecche, acari, pulci, pidocchi</b>	Piretrine e Piretroidi
	Organofosforati
	Carbamati
	Formamidine
	Fenilpirazolici
	Neonicotinoidi
	Cloronicotinici
	Avermectine

Tra essi, il gruppo chimico più comunemente usato nella pratica veterinaria nel trattamento di endoparassitosi ed ectoparassitosi, è quello dei lattoni macrociclici, che comprende la classe delle Avermectine [26].

## 4. AVERMECTINE.

### 4.1 Caratteristiche chimiche

Le avermectine rappresentano una famiglia di prodotti naturali con proprietà antiparassitarie isolate per la prima volta alla fine del 1970.

Questi composti macrolidi, di-L-oleandrosyl-derivati, originati dalla condensazione di 16 lattoni pentaciclici e isolati dall'actinomicete *Sreptomicies avermitilis*, mostrano un'attività molto elevata sia contro gli endo- che gli ecto- parassiti.

Tra le avermectine, il derivato più rilevante è probabilmente l'Ivermectina, una miscela degli omologhi 22,23-diidroavermectina B1a e 22,23-diidroavermectina B1b, che rappresentano le avermectine più comuni in natura (Figura 5) [27].

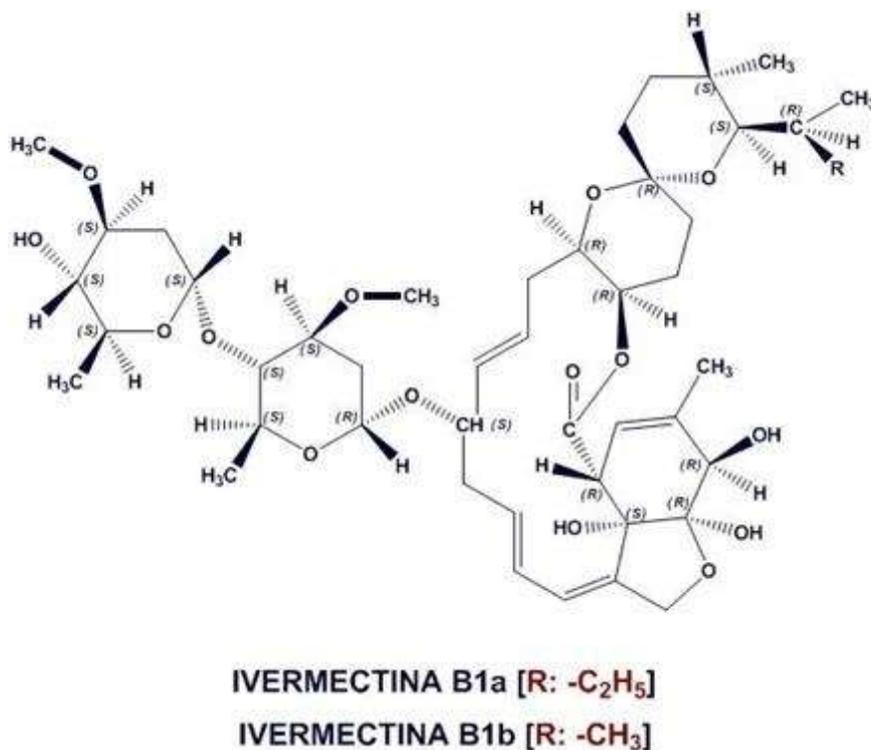


Figura 6. Struttura molecolare dell'ivermectina

Infatti, oltre ad essere impiegati nella terapia ectoparassiticida, sono impiegati anche come endectocidi, poiché dotati di elevata attività nei confronti di nematodi e di alcuni artropodi parassiti a dosi estremamente ridotte.

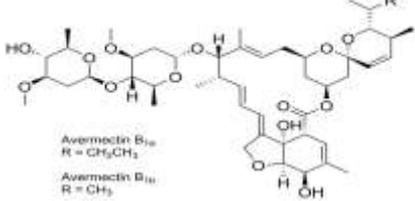
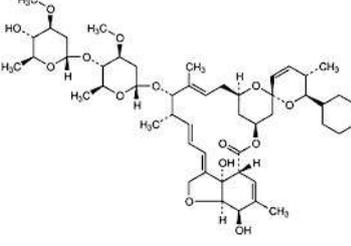
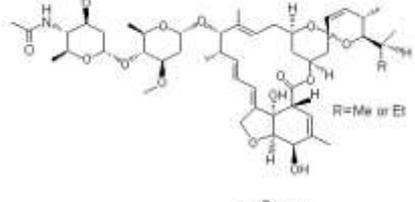
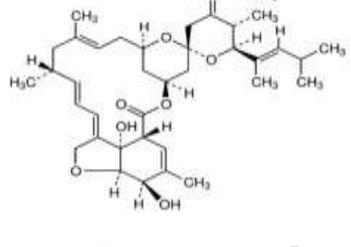
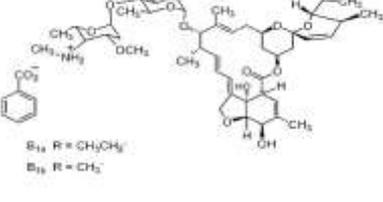
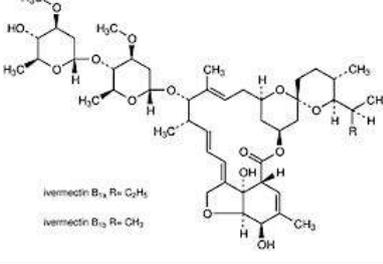
Un ulteriore vantaggio è che alcune di queste molecole sono in grado di esplicare la loro attività per almeno due settimane dopo la somministrazione grazie alla loro capacità di accumularsi nel grasso corporeo [26].

Alla classe farmacologica delle Avermectine appartengono anche i seguenti derivati:

- **ABAMECTINA (ABA)**: una miscela di avermectina B1a (>80%) e avermectina B1b (<20%);
- **EPRINOMECTINA (EPR)**: un derivato semi-sintetico costituito da eprinomectina B1b in rapporto 90/10;
- **EMAMECTINA (EMA)**: un derivato semi-sintetico strutturalmente simile all'eprinomectina;
- **MOXIDECTINA (MOX)** : appartiene alla famiglia delle milbemicine, che hanno struttura simile alle avermectine, ma manca del gruppo disaccaride;
- **DORAMECTINA (DOR)**: un prodotto di fermentazione ottenuto da ceppi selezionati di *Sreptomicies avermitilis*.

Ivermectina (IVER), l'Abamectina (ABA), la Doramectina (DOR), l'Eprinomectina (EPR), la Moximectina (MOX) e la Ememectina (EMA), comunemente impiegate nelle ectoparassitosi ed endoparassitosi degli ovini.

Nella seguente tabella (Tabella 5) sono riportate le strutture chimiche delle avermectine sopra elencate.

Avermectine	Struttura chimica
Abamectina	 <p>Avermectin B<sub>1a</sub> R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Avermectin B<sub>1b</sub> R = CH<sub>3</sub></p>
Doramectina	
Eprinometrina	 <p>R = Me or Et</p>
Moxidectina	
Emamectina	 <p>B<sub>1a</sub> R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> B<sub>1b</sub> R = CH<sub>3</sub></p>
Ivermectina	 <p>Ivermectin B<sub>1a</sub> R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> Ivermectin B<sub>1b</sub> R = CH<sub>3</sub></p>

## 4.2 Meccanismo d'azione.

I farmaci endectocidi producono il loro effetto antiparassitario aumentando la permeabilità delle membrane cellulari agli ioni cloruro (Cl<sup>-</sup>), con la conseguente iperpolarizzazione e paralisi dei muscoli faringei e somatici dei parassiti.

I dati attuali suggeriscono che l'azione antiparassitaria delle avermectine è data dall'interazione delle stesse con i canali di cloro legati ad un recettore nel parassita bersaglio, dando così origine al fenomeno descritto come iperpolarizzazione.

Questi canali sono in prossimità anatomica dei cancelli dei recettori GABA, e alte concentrazioni di lattoni macrociclici possono agire su questi siti potenziandoli.

I Lattoni macrociclici stimolano la conduttanza sensibile glutammato-mediata agli ioni cloruro e all'acido gamma-ammino butirrico (GABA).

I recettori GABA mediano la trasmissione dagli interneuroni ai motoneuroni nei nematodi e dei motoneuroni alle cellule muscolari negli artropodi. Inoltre interferiscono anche con la riproduzione di nematodi e artropodi, intervenendo nella formazione delle uova di nematodi [28].

## 4.3 Tossicità

Nei mammiferi la neurotrasmissione GABA-mediata si verifica solo nel sistema nervoso centrale e dato che lattoni macrociclici non attraversano la barriera emato-encefalica, hanno un ampio margine di sicurezza in queste specie; tuttavia, tale sicurezza può essere compromessa da tossicità dovuta a dosi eccessive in qualsiasi specie.

Segni clinici di tossicità acuta sono simili in diverse specie di mammiferi, e sono attribuiti alle azioni sul sistema nervoso centrale. Questi includono atassia, tremori, midriasi e oscurità seguita da morte [29].

## 5. METALLI PESANTI.

Non esiste una definizione universalmente accettata di metallo pesante basata sulle proprietà chimico-fisiche. Sono state proposte delle definizioni in base alla densità ( un metallo pesante sarebbe un elemento chimico la cui densità sia maggiore di 5 grammi per centimetro cubo) o in base al peso atomico ( un elemento il cui peso atomico sia maggiore di 20). D'altra parte, le principali caratteristiche chimiche dei metalli pesanti, ossia il carattere cationico con diversi stati di ossidazione e l'elevata attitudine a formare complessi molecolari nel citoplasma cellulare, fa includere nell'elenco dei metalli pesanti anche elementi come selenio ed arsenico, che non sono metalli, sebbene siano dotati di proprietà fisiche e chimiche simili a quelle dei metalli in senso stretto. Per questi motivi è stato proposto di abbandonare la classificazione in base alla densità o la peso atomico in favore di una classificazione tripartita degli elementi chimici a seconda che esibiscano una prevalente affinità per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo, o infine una combinazione tra le due precedenti categorie [30].

### 5.1 Metalli in traccia

Un sottogruppo particolarmente importante in biologia e medicina è costituito dai cosiddetti *metalli in traccia*, gli elementi chimici presenti nei fluidi biologici degli organismi viventi in concentrazioni inferiori ad 1µg per grammo di peso. In base agli effetti fisiologici e patologici, i metalli in traccia possono essere suddivisi in due gruppi:

1. Elementi essenziali per la vita, in quanto implicati in importanti processi metabolici
2. Elementi tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni.

Nel caso degli esseri umani sono noti 13 elementi in traccia essenziali: Cobalto (Co), Cromo (Cr), Rame (Cu), Fluoro (F), Ferro (Fe), Iodio (I), Manganese (Mn), Molibdeno (Mo), Selenio (Se), Silicio (Si), Stagno (Sg), Vanadio (V) e Zinco (Zn), Mentre il secondo gruppo

contiene Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Piombo (Pb), Antimonio (Sb), Arsenico (As) e Nickel (Ni) [31].

## 5.2 Fonti di inquinamento da metalli pesanti.

Le principali fonti di inquinamento da metalli pesanti possono essere riassunte come segue:

**L'agricoltura:** le trasformazioni più importanti dell'agricoltura europea si sono verificate a partire dal Settecento, e sono culminate nel corso degli ultimi 100 anni con l'impiego di sostanze concimanti chimiche, di fertilizzanti, di macchinari per dissodare e proteggere le terre dall'erosione. Molte sostanze di natura organica ed inorganica sono utilizzate e riversate direttamente, o indirettamente attraverso il terreno nei corsi di acqua.

**L'attività industriale:** le industrie che caratterizzano i paesi industrializzati più sviluppati, sono quelle energetica, estrattiva, siderurgica e chimica che favoriscono lo sviluppo di industrie come la metallurgica, la meccanica, la cementiera, la petrolchimica, la cartaria, l'elettrica e l'elettronica, quella delle materie plastiche, delle fibre sintetiche, la farmaceutica e molte altre. Questi tipi d'industrie favoriscono le immissioni di sostanze nocive nell'ambiente, in particolare metalli pesanti o sostanze organiche non biodegradabili.

**L'urbanizzazione:** le città in seguito all'industrializzazione, sono diventate il centro del sistema economico, richiamando buona parte della popolazione e dando vita al fenomeno dell'urbanizzazione. Questo processo ha cambiato radicalmente non solo le dimensioni delle città, ma, soprattutto, le funzioni e l'aspetto degli spazi urbani che sono diventati simbolo della civiltà contemporanea. Questo fenomeno assume grande importanza quando occorre valutare l'inquinamento, poiché la popolazione contribuisce ad immettere sostanze nocive, inorganiche ed organiche, nell'ambiente, non solo con le attività agricole e industriali, ma anche con quelle domestiche [14]

### 5.3 Effetti sull'organismo umano

I metalli possono avere un diverso effetto sull'organismo umano in funzione della quantità assunta ed in quanto tempo essa viene assunta: in caso di assunzione di elevata quantità in poco tempo si parla di intossicazione acuta, mentre se l'assorbimento avviene sul lungo periodo e riguarda piccole quantità, si parla di intossicazione cronica. I metalli pesanti (piombo, mercurio, nickel, cromo, cadmio, antimonio e arsenico) tendono ad accumularsi nell'organismo, dando luogo al fenomeno del "bioaccumulo". Tale meccanismo riguarda l'aumento della concentrazione nell'organismo biologico nel tempo. I residui di metalli pesanti si accumulano negli esseri viventi ogni volta che sono assimilati ed immagazzinati più velocemente di quanto siano metabolizzati od espulsi [32].

I metalli non hanno tutti lo stesso grado di tossicità (vedi tabella 6): il livello sopportabile dal corpo umano di un metallo è correlabile alla quantità che serve al metabolismo stesso per funzionare correttamente [33].

GRADO DI TOSSICITA'	ELEMENTO
ELEVATO	Antimonio, Arsenico, Cadmio, Cromo, Mercurio, Nickel, Piombo
MODESTO	Manganese, Rame, Selenio, Zinco
MOLTO BASSO	Alluminio, Argento, Stagno, Stronzio, Tallio

Tabella 6. Grado di tossicità dei metalli

Gli effetti a breve e lungo termine, variano a seconda del metallo ed, in particolare, arsenico, cadmio, mercurio e piombo sono maggiormente **tossici** per l'uomo. Possono causare **danni ai reni**, al **sistema nervoso** e al **sistema immunitario**, e in certi casi avere effetti **cancerogeni**. I sintomi più classici di intossicazione da metalli pesanti sono l'irritabilità ed instabilità dell'umore, depressione, cefalee, perdita di memoria, ridotte capacità visive come riportato nella tabella 6a. I limiti massimi assumibili per ingestione ad esempio, variano da un elemento all'altro come i loro effetti, in funzione di un'intossicazione cronica o acuta [33]. Di seguito verranno trattati in dettaglio i metalli considerati essere più rischiosi per la salute umana.

ELEMENTO	DOSE SETTIMANALE TORRELABILE mg kg per settimana	RIFERIMENTO	AVVELENAMENTO	
			ACUTO	CRONICO
Antimonio	0,6	National institute for public health and environment, Nederland	-Irritazione alle mucose	-Ulcere -Problemi cardiaci -Problemi Gastro-Intestinali
Arsenico	0,015	JECFA	-Dilatazione capillare con alterazione della funzionalità -Imitazione molecolare del fosfato e sua sostituzione nel metabolismo -inibizione dei sistemi enzimatici	-Perdita di appetito -Disturbi gastro-Intestinali -Neuriti periferiche -Alterazioni Cutanee -Cancro
Cadmio	0,007	JECFA	-Lesioni all'apparato riproduttivo maschile -Osteomalacia	-Lesioni ai tubuli prossimali del rene Frattura spontanea delle ossa Mialgia Accumulo a livello epatico
Cromo	0,35-1,4	National academy of science Washington, 1993	-irritante per gli occhi e le mucose	-Danni permanenti agli occhi -Cancro
Manganese	1,17	Comitato scientifico alimentazione umana, UE	-Allucinazioni, dimenticanza -Danni al sistema nervoso	-Morbo di Parkinson -Embolie polmonari -Impotenza -Cancro
Mercurio	0,005	JECFA	-Alterazione nello sviluppo cerebrale del feto -Distruzione del sistema nervoso -Aborto	-Alterazioni neurologiche che possono provocare una sintomatologia esattamente sovrapponibile alla sclerosi multipla impotenza -Danneggiamento del DNA
Nickel	2	EFSA	-	-Cancro -Malformazioni del feto -Disturbi cardiaci
Piombo	0,025	JECFA	-Insufficienza renale acuta -Danni cerebrali irreversibili -Anemia aplastica irreversibile -Crampi intestinali	-Blocco nella sintesi del gruppo eme -Deficit cognitivi nei bambini -Accumulo nelle ossa
Rame	3,5	JECFA	-Danni a fegato e reni	-Declino dell'intelligenza negli adolescenti
Stagno	14	JECFA	-Irritazione alla cute e agli occhi -Malessere generale e stordimento -Problemi di urinazione e respirazione -Forte sudorazione	-danni al fegato -Indebolimento del sistema immunitario -Danni ai cromosomi -Anemia -Danni al SNC
Zinco	7	JECFA	-Danni al pancreas -Disturbo del metabolismo delle proteine -Arteriosclerosi	-Spasmi allo stomaco, vomito -Irritazioni Cutanee -Trasmissione dalla mamma al bambino tramite latte o sangue

Tabella 6a. Grado di tossicità dei metalli potenzialmente rischiosi per la salute umana

## 5.4 ARSENICO

In genere, i mammiferi entrano in contatto con l'Arsenico ed i composti arsenicali per ingestione, inalazione o per via cutanea ; la sensibilità è influenzata da diversi fattori, come la forma in cui si trova l'arsenico, la via di somministrazione e la dose [34]. L'arsenico nelle forme in cui è normalmente presente nel cibo viene prontamente assorbito e rapidamente escreto forme sali arsenico. I composti arsenicali introdotti per via inalatoria vengono completamente assorbiti a livello polmonare e dalle superfici mucose di tutto l'apparato respiratorio [35], [36]. Anche la pelle risulta essere una via d'assorbimento dell'arsenico, che in tal caso risulta essere maggiore se i composti sono liposolubili [37]. Una volta assorbito l'arsenico si riversa nel torrente ematico dove si lega alle proteine plasmatiche, in particolare alle  $\alpha$ - globuline nonché alle globuline dell'emoglobina nei globuli rossi [37] e viene trasportato rapidamente a fegato, reni, polmoni, mucosa intestinale, milza, muscoli e a parte del tessuti nervosi. I composti arsenicali si accumulano normalmente a livello di pelle, unghie, capelli e, in maniera ridotta anche in ossa e muscoli. L'escrezione dell'arsenico avviene prevalentemente tramite le urine, a prescindere da come è stato assorbito e a questo livello si presenta sotto forma di arsenico inorganico, acido metilarsonico o dimetilarsonico. Una parte, meno del 10% delle forme solubili, può venire escreta con le feci in relazione sia ad un suo incompleto assorbimento che alla presenza della circolazione entero-epatica [37]

### 5.4.1. Meccanismo d'azione

L'azione tossica dei composti arsenicati trivalenti è dovuta al blocco dei gruppi sulfidrilici di alcuni enzimi, con conseguente alterazione di diversi processi metabolici d'importanza vitale, in particolare risultano alterati il metabolismo dei grassi e dei carboidrati e la respirazione cellulare. Gli arsenicali pentavalenti esercitano invece una forte inibizione, anche se reversibile, delle reazioni di fosforilazione ossidativa mitocondriale [38].

### **5.4.2. Aspetti tossicologici**

I sintomi dovuti ad una tossicità acuta si manifestano dai 30 minuti a diverse ore dopo l'ingestione. La forma iperacuta porta rapidamente alla morte dell'animale prima che i sintomi si manifestino. La forma acuta si manifesta inizialmente con un gusto metallico, una sensazione di secchezza e irritazione della bocca e della gola con difficoltà nella deglutizione; questi primi sintomi sono seguiti rapidamente da vomito o rigurgito di odore agliaceo, grave dolore addominale con rilevazione all'auscultazione di forti rumori borborigmici. Il soggetto si presenta cianotico con estremità fredde; a volte con dolori agli arti, convulsioni e debolezza muscolare segno di un coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Dopo 24 ore si ha diarrea acquosa, a volte emorragica accompagnata da tenesmo e forte disidratazione. Questa forte disidratazione porta a collasso cardiocircolatorio e morte entro 3 giorni [39]. Gli effetti di un'esposizione cronica all'arsenico non sono del tutto chiari e risultano piuttosto soggettivi. Si possono manifestare come sindrome simile all'osteomalacia, con polidipsia, dimagrimento fino alla cachessia, turbe digestive, mucose color rosso mattone, polso debole e irregolare [39]. Il coinvolgimento sia del sistema nervoso centrale che di quello periferico provoca cambiamenti sensoriali, debolezza muscolare progressiva fino ad atrofia e paralisi [40]. Le lesioni cutanee, dovute soprattutto all'assorbimento dell'arsenico per via cutanea (la pelle diviene arrossata, secca, simile a pergamena in seguito si screpola e sanguina) sono molto comuni nell'uomo [39].

### **5.4.3. Impatto ambientale**

L'arsenico è il maggiore costituente di almeno 245 tipi di minerali. Per quanto riguarda i terreni la concentrazione dell'arsenico nelle zone non contaminate sembra compreso tra 1 e 40 mg/Kg con concentrazioni minori in terreni sabbiosi e quelli derivanti da rocce granitiche, mentre le concentrazioni più alte si trovano nei terreni alluvionali e organici. I principali fattori che influenzano la concentrazione di arsenico nel terreno sono rappresentati dal tipo di roccia da cui il terreno ha origine e dalle attività umane ai quali si

aggiungono il clima, le componenti organiche e inorganiche del terreno ed il potere redox. [41],[42]. Un fattore che può influenzare la forma in cui l'arsenico è presente nel terreno è rappresentato dal pH. L'arsenico si trova in basse concentrazioni anche nelle acque. La concentrazione massima consentita nell'acqua da bere è di 50 µg/L e il valore raccomandato da EPA e WHO è di 10 µg/L [43].L'immissione di arsenico, inoltre, è notevolmente aumentata nel passato secolo, sia derivante da fonti naturali che come risultato dell'uso industriale e delle attività agricole e di deforestazione. E' anche vero, però, che solo una piccolissima quota dell'arsenico totale presente nei mari rimane disciolto nell'acqua, la maggior parte, infatti, si lega alle particelle di materiale in sospensione . Nell'aria l'arsenico viene adsorbito sulle particelle ed è presente come mescolanza di arseniti e arsenati, con una concentrazione totale compresa tra 0,4 e 30ng/m<sup>3</sup> [44].

## 5.5 CADMIO

Il cadmio risulta essere ampiamente distribuito sulla crosta terrestre ed , è un costituente di molte leghe e molto utilizzati sono anche i suoi composti (ossidi, solfati e cloruri). Alcuni di questi in passato hanno trovato impiego nella produzione di antielmintici come gli ascaricidi, i nematodocidi gli antisettici [37]. In qualità di metallo dotato di elevati effetti tossici, il cadmio non possiede alcun ruolo fisiologico, ed associa un accumulo preferenziale nei tessuti molli ed ha un'emivita prolungata in rapporto alla sua scarsa eliminazione dall'organismo. Il cadmio presenta una capacità di legame con ligandi tiolici inferiore solo a quella di piombo e mercurio e questo spiega, oltre che l'elevata affinità dell'elemento per proteine quali l'emoglobina e le metallotioneine, ricche di gruppi leganti. Una volta assorbito il cadmio passa in circolo legandosi alle proteine plasmatiche, per essere poi distribuito in tutti i tessuti molli, soprattutto fegato e rene. Diverse possono essere le conseguenze dell'azione del metallo a livello cellulare; tra queste ricordiamo l'inibizione delle ossidasi a funzione mista, le alterazioni di alcune attività del calcio e del suo trasporto transmembrana, il blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e le variazioni della

funzionalità di vari metalloenzimi, quali alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi, superossido dismutasi, ecc [45], [46]. La capacità del metallo di sostituirsi allo zinco spiega invece la sua azione sui metalloenzimi; carenze di zinco, infatti, comportano un aggravamento degli effetti tossici causati dal cadmio [47], [48].

### **5.5.1. Comportamento cinetico**

L'uomo e gli animali si intossicano principalmente per via inalatoria o per ingestione. Una volta assorbito il cadmio passa in circolo legandosi alle proteine plasmatiche, per essere poi distribuito in tutti i tessuti molli, soprattutto fegato e reni, nei quali è possibile rilevare circa il 50% del contenuto totale, e viene escreto con le feci o con l'urina [49], [50]

### **5.5.2. Meccanismo d'azione**

Il cadmio, essendo in grado di legarsi fortemente ai numerosi ligandi di molecole proteiche enzimatiche, ne provoca una conseguente alterazione della struttura e della funzionalità. Diverse possono essere le conseguenze dell'azione del metallo a livello cellulare, tra queste ricordiamo le alterazioni di alcune attività del calcio e del suo trasporto trans membrana e le variazioni della funzionalità di vari metalloenzimi (alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi, delta-ALA deidrasi, superossido dismutasi, ecc) [51],[52]. La sostituzione dello zinco da parte del cadmio spiega la sua azione sui metalloenzimi, ciò trova una controprova nel fatto che carenze di zinco comportano un aggravamento degli effetti tossici [48], [49].

### 5.5.3. Aspetti tossicologici

Data la sua azione su numerosi sistemi enzimatici, il cadmio può esplicare notevoli effetti tossici, variabili in funzione delle differenze nella via di assorbimento, nel dosaggio, nella specie e nel sesso [37]. La prima manifestazione di un'esposizione acuta al metallo è l'insorgere di fenomeni irritativi a carico del tessuto interessato (tratto gastrointestinale o polmone), seguiti da nausea, vomito, scialorrea, diarrea e dolori addominali, quadro questo particolarmente grave ed intenso nei roditori, in quanto incapaci di vomitare. Il suo assorbimento per via inalatoria comporta anche dolori toracici, dispnea, vertigini, con successivo instaurarsi di polmonite e di edema polmonare ad esito fatale [53]. L'organo target dopo assorbimento di dosi elevate di cadmio è rappresentato dal fegato, a carico del quale vengono descritti necrosi del tessuto, degenerazione del reticolo endoplasmatico rugoso e dei mitocondri e, ancora, proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio [54]. Osteomalacia e danni a carico dell'apparato polmonare caratterizzano sostanzialmente il quadro dell'intossicazione cronica da cadmio. Con un interessamento renale e disfunzioni a carico dei tubuli prossimali e un riscontro di proteinuria, aminoaciduria, glicosuria e fosfaturia. . A livello epatico si riscontra, per concentrazioni tissutali pari o superiori a 60 µg/g, aumento dell'attività delle aminotransferasi, decremento delle ossidasi a funzione . L'osteomalacia rilevabile a seguito di esposizioni protratte a basse quantità di cadmio viene attribuita alle alterazioni che il metallo può apportare nel metabolismo del calcio [55], [56],[54]. A carico dell'apparato respiratorio i principali rilievi sono dati da fenomeni infiammatori ed irritativi, con bronchite cronica ed edema, che può evolvere in polmonite ostruttiva per metaplasia dell'epitelio alveolare, proliferazione degli istiociti e distruzione alveolare, con enfisema normalmente letale [37]

#### 5.5.4. Impatto ambientale

Un'assunzione del metallo da parte degli organismi viventi può essere influenzata da numerosi fattori sia fisici che chimici: fra questi ricordiamo soprattutto la possibilità di adsorbimento e di rilascio da parte di componenti del terreno, il suo pH, il potenziale redox, la struttura chimica, ecc. In ambiente acquatico i fenomeni di adsorbimento e di conseguente concentrazione del metallo nei fondali sembrano strettamente legati alla loro natura. Un pH particolarmente acido ed un elevato potenziale redox possono aumentare, la mobilizzazione del metallo dai fanghi con conseguente maggior possibilità di assunzione [57]. La quantità di cadmio disciolto in forma ionica altamente biodisponibile sembra influenzato positivamente dalla quantità dell'ossigeno disciolto: una condizione di anaerobiosi riduce infatti tali livelli e determina un aumento della frazione legata alle particelle sospese, non biodisponibile. La biomagnificazione del cadmio è più importante, come già accennato, nei livelli inferiori delle catene trofiche [58]. Ai processi di accumulo, per sequestro nei tessuti sotto forma di complessi con la metallotioneina, portano concentrazioni crescenti fondamentalmente legati i livelli relativamente elevati che vengono riscontrati negli organismi posti ai livelli superiori delle catene alimentari. Tra le specie selvatiche i fenomeni tossici a seguito di esposizione a cadmio si riscontrano più frequentemente tra le specie acquatiche che non tra le specie aviarie o tra i mammiferi. Già a concentrazioni superiori a 10 µg/Kg si riscontra, infatti, elevata mortalità in insetti e crostacei: la mortalità è direttamente proporzionale alla durata dell'esposizione e inversamente proporzionale alla durezza dell'acqua e all'età dell'animale [59],[60],[61]. Gli organismi marini, generalmente, poiché vivono in acque più dure, presentano una maggior resistenza rispetto agli organismi d'acqua dolce: i sintomi di tossicità, infatti, compaiono per valori pari a 1.2-50 µg/Kg per i primi e a 4-470 parti per trilione (ppt) per i secondi [62]. Una certa resistenza al metallo si riscontra anche nelle specie aviarie: germani comuni e galline alimentate con diete contenenti 200 mg/Kg di cadmio sono sopravvissuti senza mostrare segni di tossicità, ad eccezione di una mancata ovoproduzione nelle galline [63]; si

riporta inoltre una concentrazione renale di 100 mg/Kg come valore soglia di tossicità per le specie marine, che scende a 30 mg/Kg per i mammiferi, anch'essi resistenti al metallo. Nelle specie selvatiche, in particolare in quelle acquatiche, a seguito di esposizione cronica al cadmio, si osserva una ridotta crescita e inibizione della riproduzione [63]

## **5.6 CROMO**

Il cromo è un elemento che, pur in grado di svolgere un ruolo essenziale in numerose specie animali, in quanto componente del fattore di tolleranza al glucosio, risulta caratterizzato da un'attività cancerogena e capace, per concentrazioni elevate, di indurre importanti effetti tossici.

### **5.6.1. Comportamento cinetico**

L'uomo e gli animali assumono il cromo principalmente per via gastroenterica e inalatoria, con un assorbimento che varia anche in funzione dello stato di ossidazione del metallo. Il cromo trivalente presenta una scarsa attitudine ad attraversare le membrane e per questo viene scarsamente assorbito sia a livello del tubo digerente che del polmone, cosicché la quantità rispettivamente assorbita dai due distretti è stimata tra meno dell'1% ed il 6% [64]. I composti del cromo esavalente, prima della loro riduzione a cromo trivalente si dimostrano, al contrario, ben assorbibili a livello polmonare in funzione della loro solubilità; a seguito di una massiva riduzione a cromo trivalente, nel tratto gastroenterico, il suo assorbimento, dopo ingestione, raggiunge normalmente solo il 6%, tale valore può, invece, aumentare al 20% nel caso in cui i sali di cromo vengano introdotti direttamente nell'intestino [65].

### **5.6.2 Meccanismo d'azione**

Il cromo rappresenta l'unico metallo di transizione per il quale non sia noto il meccanismo d'azione [66]. Mentre il cromo trivalente non sembra presentare particolari attività tossiche per gli organismi, lo ione esavalente si comporta, al contrario, da agente corrosivo locale: ciò è imputabile al suo elevato potere ossidante e alle sue caratteristiche acide, che possono portare ad irritazioni locali conseguenti ad esposizioni sia inalatorie che orali o dermiche. Fenomeni di sensibilizzazione e di dermatite allergica nell'uomo sono inoltre descritti in letteratura [67]. Nell'organismo il cromo riveste un ruolo essenziale per la normale attività dell'insulina, per il trasporto di metaboliti cellulari attraverso le membrane e per il metabolismo dei carboidrati [68]

### **5.6.3. Aspetti tossicologici**

Il cromo nella forma trivalente non possiede alcun potenziale tossico ed attualmente non è possibile reperire in letteratura dati significativi concernenti intossicazioni a seguito di un'assunzione orale di tale ione, tenendo anche conto della sua incapacità di attraversare le membrane [69]. Il cromo esavalente desta, invece, un maggiore interesse dal punto di vista prettamente tossicologico: questo ione, infatti, può indurre alterazioni alimentari e comportamentali e modificazioni delle attività enzimatiche e dei parametri ematochimici, oltre ad una minore resistenza agli agenti infettivi. Il cromo esavalente possiede un potere nefrotossico per l'uomo e gli animali, con danni sia glomerulari che tubulari ed è stato dimostrato essere in grado di svolgere embriotossicità ed effetti teratogeni dose-dipendenti [70].

#### 5.6.4. Impatto ambientale

Poiché la stessa quantità di cromo può risultare più o meno reattiva e mobile in funzione del tipo di ione presente nel composto, gli effetti del cromo sugli organismi viventi sono fortemente influenzati dallo stato fisico-chimico del metallo [71]. Tra i fattori che modificano la tossicità del cromo nell'ambiente acquatico vanno ricordati la durezza, la temperatura, il pH e il grado di salinità dell'acqua, oltre alla specie e allo stadio di sviluppo dell'organismo. Un ruolo decisamente rilevante nel determinare il destino e gli effetti del metallo viene esplicito dall'idrolisi e dalla precipitazione dei sali, mentre i fenomeni di adsorbimento e di bioaccumulo sembrano svolgerne uno piuttosto marginale [72]. Gli studi riguardanti le cause di un inquinamento ambientale attribuiscono la principale responsabilità dell'inquinamento idrico alle emissioni atmosferiche, tanto che nell'incremento dei livelli di cromo risultano addirittura più incisive dello scarico diretto di reflui liquidi nelle acque [72]. La disponibilità del metallo nell'ambiente terrestre può subire modificazioni ad opera del pH e del contenuto di materiale organico presente nel suolo, questo perché questi parametri si dimostrano in grado, rispettivamente, di influenzare la velocità di riduzione dello ione esavalente a trivalente ed il grado di solubilità dei composti del cromo: i complessi organici del cromo rimangono infatti solubilizzati nel suolo per almeno un anno, gli ioni trivalenti liberi vengono, al contrario, rapidamente adsorbiti dal terreno mentre i sali dello stesso metallo vanno incontro ad idrolisi e a precipitazione [73].

### 5.7 MERCURIO

Il mercurio e i suoi composti non posseggono alcuna funzione biologica o metabolica. La loro presenza nelle cellule degli organismi viventi rappresenta sempre una contaminazione che deve essere considerata come potenzialmente pericolosa. Le principali

nozioni riguardanti questo metallo sono:

- 1) il mercurio e i suoi composti non hanno una funzione biologica;
- 2) forme di mercurio con una tossicità relativamente bassa possono essere trasformate in forme più tossiche, come il metilmercurio, attraverso processi biologici;
- 3) il mercurio può essere bioaccumulato e bioamplificato tramite la catena alimentare;
- 4) il mercurio è mutageno, teratogeno, carcinogeno e provoca alterazioni istopatologiche;
- 5) gli alti livelli di mercurio trovati in alcune specie di pesci e di selvaggina provenienti da luoghi non contaminanti dalle attività umane dimostrano la complessità dei cicli naturali del mercurio e l'influenza umana su questi cicli;
- 6) l'uso del mercurio da parte dell'uomo deve essere ridotto poiché la differenza fra i livelli basali tollerabili e i livelli con effetti ambientali pericolosi è estremamente piccola [74], [75]. Viene usato come fungicida in agricoltura, come agente di controllo nell'industria della carta, nella produzione di apparecchi elettrici e di plastica. La conseguenza dell'aumento dell'uso del mercurio è un netto incremento del numero degli avvelenamenti con andamento epidemico riscontrato sia tra gli uomini che tra la selvaggina e gli organismi acquatici. Il mercurio proveniente dalle sorgenti naturali entra nella biosfera come gas (principalmente come vapori di mercurio), rilasciato soprattutto dall'evaporazione della crosta terrestre e dei corpi oceanici. L'emivita dei vapori di mercurio nell'atmosfera è relativamente breve (circa 11 giorni), mentre le sue forme di deposito presentano un'emivita di circa 1000 anni.[76]

Il mercurio può assumere diversi stati chimici, tre dei quali risultano essere particolarmente importanti per capirne il comportamento ambientale:

- **Mercurio metallico**: è liquido e volatilizza velocemente a temperatura ambiente;
- **Mercurio inorganico bivalente**: è il tipo chimico che forma sali con diversi anioni; tali sali sono moderatamente solubili in acqua.
- **Metilmercurio**: è la forma organica di mercurio ecologicamente più importante. Il monometilmercurio è solubile in acqua ed è molto stabile grazie al legame covalente tra il mercurio ed il carbonio. Il dimetilmercurio è meno stabile e meno idrosolubile. Tra i composti monovalenti quello tossicologicamente più rilevante è il cloruro mercurioso ( $HgCl$

o calomelano), mentre tra i bivalenti il più pericoloso è il cloruro mercurico ( $\text{HgCl}_2$  o sublimato corrosivo). Il metilmercurio è la specie più pericolosa a causa della sua alta stabilità, della sua solubilità nei grassi e delle sue qualità ioniche, che ne determinano la spiccata capacità di attraversare le membrane biologiche. Negli organismi al vertice della catena alimentare, come i pesci carnivori, la maggior parte del mercurio è accumulato in forma metilata, principalmente come risultato del consumo di prede che contengono metilmercurio, ma in piccola parte anche per processi di metilazione che avvengono a livello mucosale ed intestinale [76]

### **5.7.1. Comportamento cinetico**

La principale via di assimilazione del mercurio è rappresentata dal tratto gastroenterico, ma notevole importanza rivestono anche la via respiratoria, transcutanea e mucosale[77]. La distribuzione dei composti inorganici del mercurio tra i vari compartimenti e tessuti dell'organismo non risulta uniforme: le concentrazioni più elevate sono riscontrabili nel rene. Oltre che nel rene l'accumulo avviene anche, in ordine decrescente, in fegato, midollo osseo, milza, cute, muscoli, cervello e polmone. L'escrezione del metallo è affidata in buona parte al rene, anche se la quota principale di eliminazione dei composti inorganici è quella che si ha attraverso le feci. Il mercurio, a differenza di quanto si osserva per gli altri metalli, è in grado di provocare fenomeni di biomagnificazione, e il suo comportamento si dimostra particolarmente subdolo in quanto gli organismi ai livelli più bassi della catena alimentare sono quelli più resistenti ai suoi effetti tossici[73]

### 5.7.2. Meccanismo d'azione

Tutti i composti del mercurio, inorganici ed organici, si comportano come veleni protoplasmatici, poiché esercitano la loro azione tossica bloccando l'attività di vari sistemi enzimatici, determinando precipitazione delle proteine ed agendo come corrosivi diretti. Gli enzimi interessati dall'azione del mercurio sono quelli caratterizzati dalla presenza di gruppi sulfidrilici nella loro molecola, in quanto il metallo ha la capacità di sostituirsi all'atomo di idrogeno del gruppo -SH dando luogo alla formazione di mercaptidi X-Hg-SR o Hg(SR)<sub>2</sub> (dove X rappresenta un radicale elettronegativo ed R una proteina [77]).

### 5.7.3. Aspetti tossicologici

La forma di intossicazione acuta può conseguire o ad una singola dose letale, o a dosi sub-tossiche ripetute. I sintomi della forma acuta comprendono incoordinazione muscolare, letargia, agitazione, abbassamento delle palpebre, diarrea incoercibile, tachicardia, aumento della temperatura, dispnea e cianosi. La morte avviene per collasso cardiocircolatorio. I soggetti che sopravvivono a questa fase presentano dopo circa 3 giorni stomatite. La forma dovuta ad inalazione di vapori di mercurio è caratterizzata da irritazione delle vie aeree e da insorgenza di polmoniti associate ad edemi polmonari acuti. In questi casi l'evoluzione dell'avvelenamento è infausta e generalmente si risolve con la morte dell'animale per shock ed insufficienza respiratoria entro 24 ore dalla somministrazione.

La forma di intossicazione cronica si presenta nei mammiferi invece con sintomi ascrivibili a tossicità cronica con livelli nella dieta di 250 µg/Kg di peso corporeo assunti con la dieta. La sintomatologia ha un'insorgenza lenta e subdola, caratterizzata da dimagrimento progressivo (cachessia mercuriale), linfonodi ingrossati e non dolenti, mucose anemiche con

petecchie e tendenza ad emorragie capillari, disturbi della vista e dell'udito, disturbi locomotori con tremori, incoordinazione e paresi [34].

#### **5.7.4. Impatto ambientale**

Come già accennato l'utilizzazione industriale del mercurio in questi anni ha subito un notevole impulso dal momento che il metallo viene usato per molteplici scopi che vanno dall'industria chimica (preparazione elettrolitica di Cl<sub>2</sub> e soda) a quella elettrica, a quella farmaceutica ed anche a quella agro-zootecnica. Una tale diffusione di impieghi porta a maggiori rischi di inquinamento dell'ambiente. Il metallo, inoltre, può contaminare le acque per "fall out" di polveri provenienti dalla combustione del carbone e degli oli minerali. Studiando il ciclo biogeochimico del mercurio si è dimostrato che quest'elemento, sia come metallo che come composti organici, sedimenta in depositi acquatici e terrestri. Nei sedimenti acquatici e per azione di alcuni microrganismi, il mercurio può essere trasformato in composti inorganici o in composti organici. Il dimetilmercurio è un composto molto volatile e può evaporare dalle acque all'atmosfera, diffondendo la contaminazione anche a zone non immediatamente prossime alla sorgente di inquinamento. Il metilmercurio, invece, rimane nell'idrosfera e da qui passa nella catena alimentare, secondo linee tradizionali.

### **5.8 PIOMBO**

Il piombo è un elemento che può agire come veleno esplicando interferenza con svariati sistemi metabolici in particolar modo nelle forme di intossicazione ad andamento cronico e come agente mutageno, cancerogeno e teratogeno, mentre non esiste alcuna segnalazione, reperibile in letteratura, che ne indichi un ruolo fisiologico [34]

### **5.8.1. Comportamento cinetico**

Per l'uomo e gli animali, la principale via di assorbimento, attraverso la quale si realizzano la maggior parte delle intossicazioni, è rappresentata dall'apparato gastroenterico, nonostante l'assorbimento risulti incompleto a causa della formazione di composti insolubili nell'intestino [78].

### **5.8.2. Meccanismo d'azione**

Il piombo, lega fortemente i gruppi tiolici, fosforici e carbossilici di numerosi ligandi di natura proteica ed in particolare degli enzimi presenti nei globuli rossi, con conseguenti alterazioni funzionali e strutturali. Il piombo risulta in grado di inibire la funzione colinergica, inducendo così scompensi nella trasmissione neuronale degli impulsi. Gli studi eseguiti nell'uomo e in animali da laboratorio delineano come il cervello fetale o quello di soggetti giovani sia estremamente più sensibile rispetto all'adulto, in quanto le cellule endoteliali immature che formano i capillari della barriera emato-encefalica del cervello in via di sviluppo presentano una maggior sensibilità agli effetti lesivi del metallo il quale, a seguito anche della minor efficacia della barriera stessa, può raggiungere le cellule cerebrali in formazione in quantità più elevate, ed indurre pertanto danni più rilevanti [79].

### **5.8.3. Aspetti tossicologici**

La tossicità del piombo è nota da lunghissimo tempo e l'importanza tossicologica del metallo, a differenza di quanto riscontrato in passato, oggi giorno va riguardata prevalentemente da un punto di vista a lungo termine. La composizione della dieta viene segnalata tra i fattori che possono modificare il comportamento tossicologico del piombo,

41

Paola Maria Lo Curto

Sardinian Sheep Wool to Detect Environmental and Veterinary Chemical Compounds: Impact in the Assessment of Human Health Hazards.

**Tesi di dottorato in Scienze Biomediche**  
Università degli Studi di Sassari

infatti, quote elevate di proteine, di vitamina D, di acido ascorbico e nicotinico, di calcio e di fosfati risultano in grado di diminuire la sensibilità degli animali alle intossicazioni, al contrario, bassi tenori di ferro e calcio favoriscono la mobilizzazione del metallo e carenze di vitamina E si dimostrano in grado di potenziarne l'effetto emolitico [37]. La sintomatologia che caratterizza l'intossicazione acuta da piombo nei mammiferi è la risultante degli interessamenti espliciti a carico del sistema nervoso centrale, gastroenterico e muscolo-scheletrico. Il quadro dell'intossicazione cronica è essenzialmente caratterizzato da una riduzione operata a carico dell'attività di vari organi, dell'accrescimento e della durata della vita, nonché da alterazione della funzione renale, riproduttiva, del sistema emopoietico e dell'attività cerebrale. Il piombo a livello osseo può sostituirsi al calcio da parte comportando una demineralizzazione particolarmente evidente a carico della mandibola, fenomeno al quale viene attribuita la responsabilità della perdita prematura dei denti, come si osserva nel ratto intossicato [80]

#### **5.8.4. Impatto ambientale**

Nell'ambiente si rilevano concentrazioni di piombo molto più elevate nei sedimenti (47 mg/Kg), nel suolo (16 mg/Kg) e nelle acque interstiziali dei primi (36 µg/Kg) rispetto a quelle riscontrabili nell'atmosfera e nelle acque libere, per cui i sedimenti devono essere riguardati come i più importanti depositi ambientali [72] Nelle acque, dove il metallo può pervenire a seguito del dilavamento dei suoli o delle piante, oltre che per un inquinamento diretto, la presenza del piombo precipita rapidamente sotto forma di carbonati o idrossidi e come chelati con anioni diversi. Quando la corrente dell'acqua è lenta, l'entità di questa presenza raggiunge valori superiori, mentre un flusso elevato comporta un aumento di concentrazioni del metallo nel particolato o in forma libera. Il rilascio del metallo dai sedimenti è favorito da un acidità delle acque e dalla loro composizione ionica, mentre una temperatura elevata, un pH basso e una presenza di attività microbiche agevolano la sua

organizzazione che si rende responsabile di un'alchilazione che investe non più del 10% del piombo presente e non sembra dipendere dalla concentrazione del metallo [80]

## 6. BIOINDICATORI.

Il biomonitoraggio può essere definito come l'uso sistematico delle risposte biologiche per valutare cambiamenti nell'ambiente, con l'intento di usare queste informazioni in un programma di controllo della qualità. Il biomonitoraggio non valuta solo le concentrazioni e i tempi di esposizioni degli organismi biologici agli eventuali inquinanti, ma stima anche le reazioni che essi hanno a queste sostanze. A seconda della capacità che gli organismi hanno di accumulare le sostanze tossiche, si parla di bioindicazione o bioaccumulazione. Le tecniche di bioindicazione, avvalendosi di bioindicatori, valutano gli effetti di variazioni ambientali su componenti sensibili degli ecosistemi. La bioindicazione può essere condotta su vari livelli d'integrazione biologica purchè esista una relazione quantitativa tra la risposta del bioindicatore e le concentrazioni di esposizione ad un dato inquinante. Le tecniche di bioaccumulazione misurano, usando organismi bioaccumulatori, le concentrazioni dell'inquinante assorbito dall'ambiente ed accumulato nell'organismo. Il bioaccumulatore può essere sia un organismo animale che vegetale purchè sia tollerante agli inquinanti. Esso è in grado di sopravvivere alla presenza di un contaminante, assimilato dalle matrici ambientali (aria, acqua, suolo), accumulandolo proporzionalmente alle concentrazioni e ai tempi di esposizione e permettendone una quantificazione.

Negli ultimi anni l'interesse verso lo studio dei sistemi agricoli ha accresciuto la necessità di disporre di strumenti d'indagine che permettono la caratterizzazione di sistemi agro-ambientali dal punto di vista agronomico, economico ed ecologico [81]. A tal proposito nascono mezzi che forniscono indicazioni e valutazioni sui fenomeni in atto. Questi strumenti, prendono il nome di bioindicatori.

Con il termine "bioindicatore" si intende un "organismo o un sistema biologico usato per valutare una modificazione –generalmente degenerativa- della qualità dell'ambiente, qualunque sia il suo livello di organizzazione e l'uso che se ne fa" [82].

A seconda dei casi, il bioindicatore potrà essere rappresentato da una comunità, un gruppo di specie con comportamento analogo ( gruppo ecologico), una specie particolarmente

sensibile ( Specie indicatrice), oppure una porzione di organismo, come organi, tessuti e cellule, o anche una soluzione di estratti enzimatici.

Esso può mostrare variazioni evidenti nella fisiologia, morfologia o distribuzione a causa dell'inquinante presente nell'ambiente. Un bioindicatore per essere ritenuto efficiente deve possedere le seguenti caratteristiche:

- Rilevabile
- Facilmente misurabile, in modo tale da essere continuamente aggiornato;
- Scientificamente valido;
- Sensibile a piccole variazioni di stress ambientale;
- Applicabile in aree geografiche ampie e nel numero più ampio possibile di comunità e di ambienti ecologici;
- Quantificabile;
- Economico [82].

Non è semplice adempiere a tutti questi requisiti, infatti i vari bioindicatori o indicatori ecologici presenti in letteratura [83], sono più o meno specifici per un tipo di stress o applicabile ad un particolare tipo di comunità o scala d'osservazione.

## 7. SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi decenni i mercati globali si sono orientati sempre più verso la ricerca di risorse sostenibili. La lana grazie alla sua composizione chimico-fisica complessa e alla sua struttura, è divenuta una delle risorse biodegradabili più “appetibili” e con maggior valore aggiunto. Varie strade possono essere intraprese per la sua valorizzazione :

- L'utilizzo delle fibre native o leggermente modificate chimicamente, per la produzione di materiali isolanti per applicazioni termiche e acustiche
- Come ammendante agricolo
- Come fibra di rinforzo in materiali compositi a base di polimeri della cheratina
- Per applicazioni biomediche a base di cheratina rigenerata

Lo scopo principale della presente tesi è di valutare la presenza di sostanze potenzialmente tossiche per l'uomo, quali ad esempio i metalli pesanti o i farmaci veterinari, presenti nella lana di ovini di razza sarda che assumerebbe il ruolo di bioindicatore ambientale.

La lana e i suoi derivati come ad esempio la cheratina infatti potrebbero rappresentare un utile indicatore per la valutazione di possibili contaminazioni da varie sostanze sia sull'animale che nell'ambiente. Nonostante alcune di queste sostanze non siano applicate o ingerite direttamente dagli ovini, possono essere trovate nella lana per trasferimento indiretto. Inoltre, i residui di farmaci veterinari sono rintracciabili nel vello. Anche il trattamento conservativo con antimuffa e antitarne può portare alla contaminazione delle materie prime e delle fibre animali. Il materiale cheratinico inoltre, per le sue caratteristiche chimico-fisiche può assorbire facilmente sostanze tossiche e per trasferimento dopo il suo utilizzo per le varie applicazioni sopracitate, potrebbe venire a contatto con l'uomo o l'ambiente ad esempio domestico.

Il campionamento di lana sucida è stato focalizzato principalmente sulla lana di pecora di razza sarda e lo schema di campionamento è stato progettato tenendo conto di vari parametri quali: posizione degli allevamenti, la distanza di tali aziende da impianti industriali, il sistema di gestione di allevamento (intensivo, semi-intensivo ed estensivo), fase fisiologica e produttiva della pecora (secco e allattamento) e i siti di tosatura del corpo della pecora. Questo protocollo di campionamento garantirà la piena tracciabilità di ogni campione di lana.

Un ulteriore obiettivo di questa attività è la validazione metodi analitici LC-HRMS (cromatografia liquida interfacciata con la spettrometria–massa ad altissima risoluzione) per la determinazione delle Avermectine. Questi metodi dovranno essere semplici, specifici, accurati e precisi come regola la normativa europea Decisione 657/2002/CE [84]. Lo Spettrometro di massa accoppiato ad un'apparecchiatura di separazione cromatografica è una combinazione molto potente per l'identificazione di questi analiti negli estratti biologici e quindi anche nelle lane sucide e lavate e nei materiali cheratinici. Per i principi della Green Chemistry [85] sono stati utilizzati metodi di estrazione assistita da microonde (MAE) Queste tecniche hanno infatti diversi vantaggi rispetto agli altri metodi di estrazione, quali ad esempio le estrazioni liquido-liquido o con Soxlet, sono meno costose e permettono di ridurre i tempi di estrazione e consumo di energia in maniera ecocompatibile.

## 8. MATERIALI E METODI

### 8.1. STRUMENTAZIONE ANALITICA

#### 8.1.2. Estrattore a microonde CEM MARS 6

Per l'estrazione dei campioni è stata selezionata la digestione con solvente mediante microonde. Negli ultimi decenni l'impiego delle microonde come sorgente di energia termica ha trovato una vastissima applicazione. L'energia delle microonde copre uno spettro di frequenze varianti tra 300 e 300.000 MHz, mentre le frequenze normalmente usate in campo industriale e scientifico variano tra i 900 e i 5000 Mhz. [86]. L'energia a microonde è una radiazione non ionizzante che accentua il movimento molecolare per migrazione degli ioni o rotazione dei dipoli, senza necessariamente causare mutamenti nella struttura molecolare.



Figura 7. Estrattore a microonde Mars 6 CEM

Generalmente l'energia a microonde è assorbita dal campione mediante due meccanismi: la conduzione ionica e la rotazione dei dipoli. La conduzione ionica è la migrazione conduttiva degli ioni disciolti presenti nelle soluzioni sotto l'effetto di un campo elettromagnetico. Tale migrazione è influenzata da parametri quali la concentrazione, la mobilità degli ioni e la

48

Paola Maria Lo Curto

Sardinian Sheep Wool to Detect Environmental and Veterinary Chemical Compounds: Impact in the Assessment of Human Health Hazards.

**Tesi di dottorato in Scienze Biomediche**  
Università degli Studi di Sassari

temperatura della soluzione. La rotazione dei dipoli consiste invece nell'allineamento delle molecole che hanno momenti di dipolo non nulli, sotto l'effetto di un campo magnetico. Ambedue questi meccanismi avvengono nella maggior parte dei casi simultaneamente. Inoltre, rispetto al riscaldamento tradizionale per conduzione, le microonde riscaldano contemporaneamente tutto il campione, senza riscaldare i contenitori utilizzati che sono di materiali trasparenti alle microonde. In tal modo le soluzioni raggiungono molto più rapidamente il proprio punto di ebollizione e il riscaldamento è molto più veloce ed efficace del sistema tradizionale. Nei laboratori analitici, la possibilità di sviluppare calore controllabile in modo selettivo ha reso possibile l'applicazione delle microonde oltre che a trattamenti generali di riscaldamento, anche a processi di disidratazione rapida e alla determinazione analitica dell'umidità di campioni diversi, a reazioni chimiche delicate da condurre in breve tempo a temperatura controllata in modo riproducibile e a tecniche rapide per la preparazione dei campioni d'analisi. I campi di applicazione attuali sono notevolmente ampi, e comprendono la preparazione dei campioni per l'analisi mediante spettrometria atomica o al plasma, polarografia ed altri metodi elettrochimici, mediante processi di solubilizzazione dei materiali inorganici e di incenerimento e/o mineralizzazione umida delle sostanze organiche.

### 8.1.3 Spettrometria di massa al plasma accoppiata induttivamente ( ICP-MS)

Per la determinazione analitica dei metalli pesanti nei campioni di lana è stata selezionata la tecnica di spettrometria di emissione al plasma, accoppiando come rivelatore uno spettrometro di massa.

A differenza della spettrometria di emissione a fiamma, questa tecnica utilizza una sorgente di eccitazione che sfrutta le proprietà del plasma. Con questo termine si intende, in fisica, un gas elettricamente neutro, ma altamente ionizzato, in cui sono presenti elettroni e ioni in eguale numero ( oltre a particelle neutre); il plasma è quindi un ottimo conduttore elettrico.

In genere, per produrre il plasma si usa argon; le temperature massime sono dell'ordine di 9.000/10.000 K e quelle effettivamente operative, non sono inferiori a 5.000/6.0000 K.

Queste temperature di esercizio consentono di eccitare una notevole percentuale di atomi e quindi di ottenere emissioni molto intense [87].

Sul piano operativo, la spettrometria di emissione al plasma, non è dissimile dalla spettrometria di emissione a fiamma; anche in questo caso la soluzione del campione viene nebulizzata nella sorgente (il plasma) e le radiazioni emesse vengono raccolte da un monocromatore. Tuttavia, mentre la fiamma è alimentata dall'energia libera di una reazione chimica (la combustione), il plasma viene generato e poi mantenuto dal rapidissimo trasferimento di energia fra un campo elettromagnetico e un gas altamente ionizzato.

Comunque venga prodotto, il plasma presenta molte caratteristiche vantaggiose per l'analisi: elevata temperatura, possibilità di operare in atmosfera inerte, buona stabilità ottica, alta riproducibilità dei processi di eccitazione e ionizzazione, un eccellente rapporto segnale/disturbo. Inoltre il plasma è molto sottile e quindi, a differenza di ogni altra sorgente, non consente fenomeni di auto-assorbimento.

Per l'analisi quantitativa, la fotometria al plasma presenta, rispetto a quella con fornello di grafite, gli stessi limiti di rilevabilità, se non addirittura migliori. Inoltre, è possibile effettuare analisi simultanee di decine di elementi e anche analisi qualitative di più analisi contemporaneamente.

Esistono diversi metodi per produrre il plasma; quelli storicamente più usati sono tre, anche se il terzo ha oggi soppiantato i primi due:

- plasma a microonde
- plasma a corrente continua
- plasma ad accoppiamento induttivo.

Nel nostro caso, è stato scelto il terzo metodo di produzione del plasma [88]

Il plasma viene ottenuto innescando la formazione di ioni in un flusso di argon mediante scarica elettrica e accelerando questi ultimi con un campo magnetico oscillante generato da una bobina di induzione a radiofrequenza. Il continuo apporto di energia da parte della bobina consente di raggiungere temperature di esercizio molto elevate, dell'ordine di 6000/7000 K nella zona di eccitazione-osservazione. Il dispositivo è detto **torcia** perché il plasma assume visibilmente la forma di una fiammella.

La figura sottostante ( figura 8) illustra lo schema semplificato di uno spettrometro ICP.

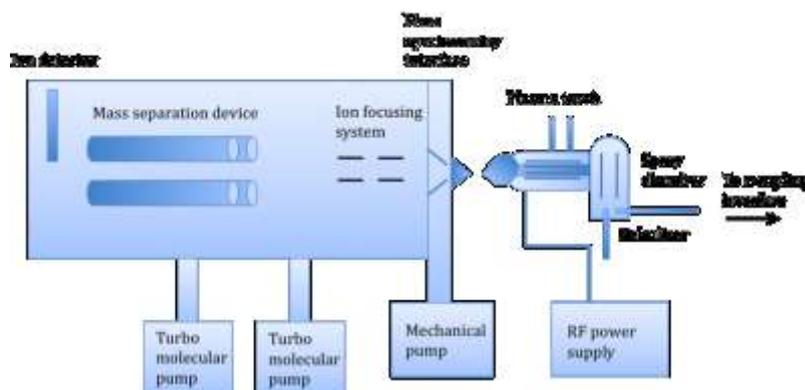


Figura 8. Schema semplificato spettrometro ICP

La soluzione di campione viene introdotta nel nebulizzatore da una pompa peristaltica; da qui un flusso di argon trasporta l'aerosol all'interno della torcia e del plasma. le radiazioni emesse vengono focalizzate su un monocromatore, che le invia al fotomoltiplicatore, e il segnale viene elaborato da un microprocessore.

Nel nostro caso, il rivelatore è rappresentato da uno spettrometro di massa (accoppiamento ICP-massa), che seleziona gli ioni in base al loro rapporto massa/carica. In pratica, la torcia ICP produce atomi e ioni per lo spettrometro di massa, che li separa e consente di identificarli.

Tra i maggiori vantaggi del sistema ricordiamo: grande sensibilità e quindi limiti di rivelabilità estremamente bassi, notevole rapidità di analisi (circa 1-3 minuti per dieci elementi, inclusi i tempi di pulizia del nebulizzatore); possibilità di determinare anche gli isotopi.

#### **8.1.4 Spettrometria di massa ad alta risoluzione HRMS**

La chimica bioanalitica quantitativa è stata rivoluzionata negli ultimi anni dallo sviluppo della spettrometria di massa associata a sistemi di cromatografia liquida HPLC, questi sistemi sono muniti di varie interfacce quali Atmospheric Pressure Tandem Mass Spectrometry – (APCI) ed Elettrospray (ESI). Queste robuste interfacce hanno il compito di trasferire i campioni dalla fase liquida allo spettrometro e sono sicuramente le più utilizzate nei moderni strumenti, che sono in grado di montarle entrambe.

In particolar modo l'elettrospray (ESI, figura 9) è adatto alla determinazione di composti ad alto peso molecolare quali peptidi e proteine, oppure per molecole ad alta polarità come ammine quaternarie, nucleotidi o fosfolipidi [89]. Un requisito fondamentale è che l'analita debba poter essere ionizzabile in soluzione; affinché questo accada è necessario che la fase mobile contenga una piccola quantità di acidi o basi volatili. Se questa aggiunta nell'eluente inficia la separazione cromatografica si possono utilizzare sistemi di arricchimento post colonna prima dell'ingresso delle soluzioni nell'interfaccia ESI. L'analisi della massa di sostanze ionizzate per mezzo di differenti interfacce può essere realizzata usando diversi analizzatori quali la trappola ionica, l'analizzatore a settori magnetici e, nella maggior parte dei casi, il quadrupolo e i sistemi ibridi quali QToF e Orbitrap. Questi strumenti possono operare in scansione completa (TIC), selezionando uno

specifico ione (SIM) o selezionando un frammento (SRM) in modalità Positiva o Negativa [90].

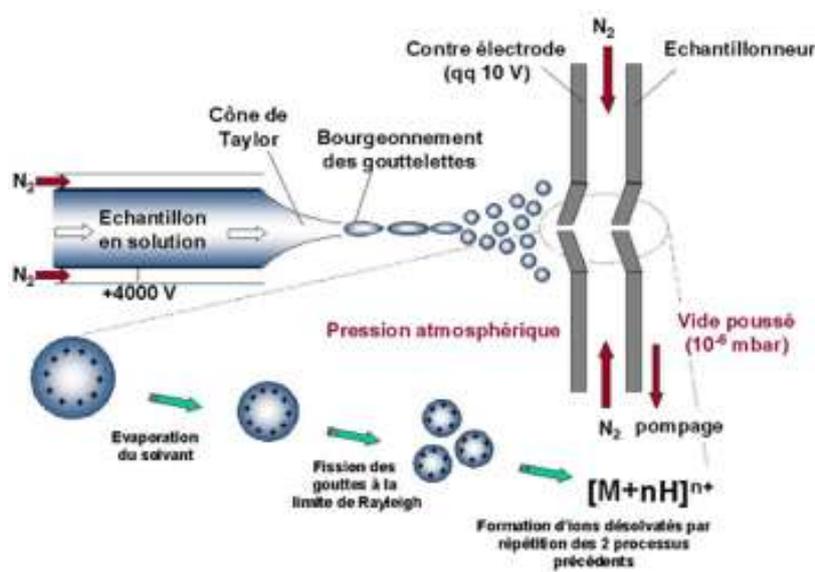


Figura 9: Schema a blocchi ESI

Durante l'ultimo decennio, la spettrometria di massa ad alta risoluzione HRMS accoppiata alla cromatografia liquida è diventata sempre più un potente strumento per l'identificazione di molecole biologicamente attive nei prodotti alimentari, nell'ambiente e nei campioni biologici [91]. La tecnica HRMS permette di determinare il peso molecolare di un composto, di delucidare la struttura molecolare, di identificare le componenti di una miscela e di condurre indagini [92]. La HRMS è in grado di fornire la massa esatta di ioni e frammenti con accuratezza inferiore a 5 ppm e da questa misura è in grado di calcolare la composizione elementare dell'analita. Le applicazioni di HRMS nella chimica analitica in generale e nella analitica tossicologica in particolare non sono certo una novità. Tuttavia la possibilità di sviluppare metodi in cromatografia liquida-HRMS (LC-HRMS) ed in LC-spettrometria di massa multipla-HRMS (LC-MS/MS-HRMS), che garantiscono elevatissima

specificità rispetto alle ormai "tradizionali" determinazioni LC-MS o LC-MS/MS, offre nuove potenzialità in ambito tossicologico. In particolare, la nuova tecnologia HRMS è adatta alla determinazione strutturale, nonché all'identificazione quali-quantitativa in fluidi biologici, di xenobiotici di interesse tossicologico e, pertanto, sono evidenti le sue potenzialità in ambito di general unknown screening, biomarker di uso e/o esposizione, residui in ambito veterinario e ambientale [93]

#### **8.1.5. Q- Orbitrap**

Lo spettrometro di massa ibrido Q Thermo Scientific Exactive Q-Orbitrap ( figura 10) combina l'azione di selezionatore di ioni del quadrupolo precursore alle prestazioni ad altissima risoluzione HRMS dell'analizzatore Orbitrap™. La qualità superiore dei dati forniti dal Q- Exactive può essere utilizzato per tutta una vasta gamma di applicazioni qualitativi e quantitativi in laboratori di sicurezza alimentare, ambientale e tossicologia.[94], [95]. La sua elevata velocità di scansione e le capacità di multiplexing spettrali lo rendono pienamente compatibile con le tecniche cromatografiche HPLC e UHPLC [96].

La sensibilità di un Q-Exactive è direttamente proporzionale al numero di ioni precursori generati ammessi nello strumento. Un parametro che influenza il flusso di ioni è la selettività ionica; essa dipende dall'elevata accuratezza di massa e la risoluzione dell' Orbitrap accoppiato con le capacità di isolamento del quadrupolo.

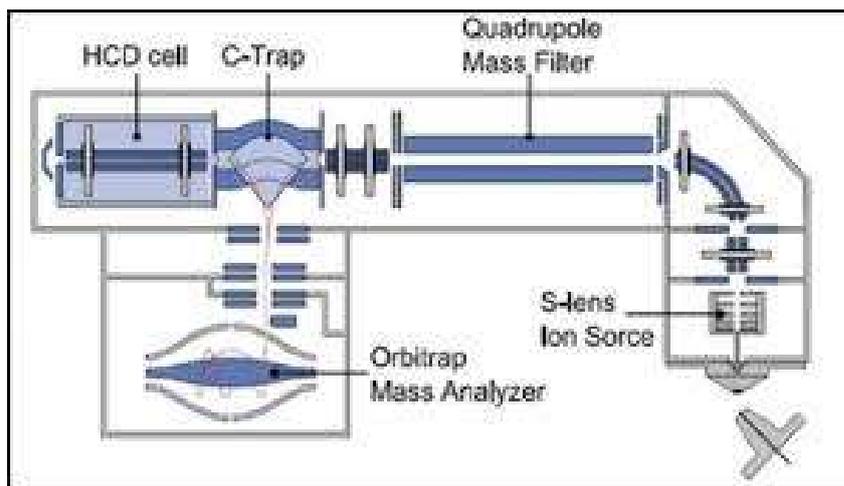


Figura 4. Schema a blocchi HRMS

## 8.2 MESSA A PUNTO E OTTIMIZZAZIONE DEI METODI ANALITICI

### 8.1.2 Inquadramento del problema analitico

Il monitoraggio biologico costituisce un ottimo strumento per la valutazione dell'esposizione a sostanze chimiche e ad altri agenti di rischio presenti nell'ambiente.

Esso si basa sulla misura della concentrazione di un determinante chimico presente nel materiale biologico dei soggetti esposti, che può essere costituito dalla sostanza stessa o da un suo metabolita e la cui concentrazione risulti correlata all'intensità dell'esposizione:

I campioni più utilizzati ai fini del monitoraggio sono, l'urina e il sangue, anche se alcune matrici alternative quali saliva, capelli e liquido di lavaggio nasale sono attualmente oggetto di studio. Noi abbiamo deciso di utilizzare nel nostro lavoro di dottorato come matrice la lana ovina [97].

La lana sucida contiene notevoli quantità di sostanze estranee, olii, cere, alcoli, polvere, sfridi vegetali -fino al 30% del fiocco tosato. Il lavaggio della lana ne permette l'eliminazione con il recupero di sottoprodotti importanti (lanolina, oleina). Il problema della determinazione analitica sulla lana è complicato dal fatto che le concentrazioni di analiti, sono molto più basse rispetto a quelle riscontrabili, ad esempio, nel plasma. Tuttavia

dalla letteratura più recente si evince che lana è una matrice molto interessante per il monitoraggio biologico ed ambientale, per cui è possibile adattare i metodi di controllo sui residui di varie sostanze utilizzando dei campionamenti *in vivo* sugli animali da prelievi minori di campione (pochi grammi) e con tecniche di purificazione più veloci [98]. Tutti i metodi di analisi riportati in letteratura descrivono procedure molto elaborate per la preparazione del campione all'analisi strumentale. Con il diffondersi nei laboratori di strumentazioni ad alta sensibilità, selettività e maggior semplicità d'uso, si è potuto passare alla determinazione di molecole biologicamente attive in concentrazioni molto basse, senza ricorrere a complesse procedure di preparazione del campione. Un notevole progresso è derivato dall'introduzione delle tecniche ICP-MS, LC-MS<sup>n</sup> ed LC-HRMS.

Dallo studio della letteratura corrente è risultata una buona presenza di metodi analitici per la determinazione delle Avermectine in varie matrici ma nessun lavoro indagava queste classe di molecole in combinazione con la matrice biologica di nostro interesse cioè la lana. Tra gli studi già pubblicati, abbiamo selezionato i lavori nei quali le Avermectine costituiscono gli analiti e quelle nei quali vengono proposti metodi analitici per la matrice biologica di nostro interesse [28]. Le avermectine, ed in particolare la capostipite Ivermectina, sono stati oggetto di studi approfonditi, data la loro importante attività farmacologica e biologica [29]. I lavori di letteratura si occupano generalmente della loro caratterizzazione e quantificazione nel fegato e plasma, nei prodotti alimentari veterinari e in alimenti per uso umano. Tutte le determinazioni sugli animali sono effettuate su matrici biologiche molto complesse (plasma, urine e fegato) e non possono dare comunque una visione del possibile accumulo di queste sostanze nel tempo senza sacrificare l'animale.

Per quanto riguarda i metalli sono oggi a disposizione, un ampio ventaglio di tecniche analitiche, che devono o possono essere utilizzate nella valutazione dei parametri tossicologici ed ecotossicologici. In molti casi, si tratta di metodiche che sono codificate da norme nazionali e europee; in altri casi le metodiche, sebbene standardizzate, non sono univoche, in altri casi ancora non sono disponibili metodiche ufficiali e pertanto i singoli laboratori applicano metodiche interne validate.

Sulla base di quanto sopra, è stato approntato un programma di lavoro comprendente, da un lato l'individuazione delle metodiche analitiche più idonee alla determinazione dei metalli pesanti e delle Avermectine nella lana e, dall'altro lato, la conduzione di una serie di determinazioni intra-laboratorio idonee a valutare la presenza e quantificazione di tali elementi nei campioni di lana sarda.

### **8.2.3 Sviluppo e ottimizzazione di un metodo interno LC-HRMS.**

Lo sviluppo di un metodo analitico per la determinazione di una molecola o di una miscela con uno spettrometro di massa consiste inizialmente nell'infusione di una soluzione standard dell'analita in esame e la ricerca dei migliori valori dei parametri strumentali (voltage del capillare, flusso del gas, lenti, etc ) legati ai diversi componenti dell'ottica ionica dell'analizzatore al fine di ottenere la maggior intensità del segnale. Questo approccio viene chiamato Tuning. Il Tuning deve essere effettuato tenendo conto del flusso degli eluenti LC con cui si intende lavorare nella separazione cromatografica e della sua composizione chimica. La seconda fase consisterà nello sviluppo e ottimizzazione della separazione cromatografica. In primis avremo la scelta della colonna cromatografica (in base dell'interazione tra gli analiti da separare e la fase stazionaria) e della fase mobile. L'eluizione si può condurre sia isocraticamente che in gradiente al fine di ottenere la migliore separazione fra le molecole di nostro interesse e la matrice. La scelta ricadrà su quelle condizioni che portano alla maggior risoluzione ed efficienza; questi parametri indicano la separazione del picco e l'ampiezza dello stesso rispettivamente: picchi ben separati, stretti ed intensità elevata rappresentano la condizione ideale [99]

### **8.2.4 Validazione di un metodo analitico.**

Il Laboratorio deve, ove possibile, utilizzare metodi e procedure di prova definiti da Norme, Regole Tecniche o Metodi ufficiali in vigore [100]. Se questi non sono disponibili il laboratorio procederà con la validazione e l'emissione di un metodo interno. Nella costruzione del metodo è bene sottolineare come le incertezze analitiche debbano essere compatibili con lo scopo per cui il dato è prodotto e non necessariamente le più basse tecnicamente raggiungibili in un'ottica di sostenibilità dei costi. [101], [102]

Uno degli scopi della Tesi di Dottorato è stato quello di sviluppare e validare un metodo interno per la determinazione qualitativa e quantitativa delle avermectine nella lana ovina,

seguendo il testo di riferimento della Comunità Europea per la validazione dei metodi interni riportati nella Decisione 657/2002/CE [84].

Il laboratorio deve quindi validare i metodi non normati, i metodi sviluppati/progettati dal laboratorio, i metodi normati utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione prefissato, come pure estensioni e modifiche di metodi normati per confermare che i metodi siano adatti all'impiego previsto [103],[104].

Un metodo validato deve contenere tutte le seguenti indicazioni:

- scopo;
- descrizione del tipo di oggetto da provare o tarare;
- parametri o grandezze e campi di misura da determinare;
- attrezzature e apparecchiature, compresi i requisiti tecnici di prestazione;
- campioni di riferimento e materiali di riferimento richiesti;
- condizioni ambientali;
- descrizione della procedura, dell'apparecchiatura e, se richiesto, taratura e messa a punto prima dell'utilizzo;
- incertezza o le procedure di stima dell'incertezza.

Per quanto riguarda la vera e propria valutazione delle caratteristiche analitiche, può essere distinta in due parti:

- la prima è quella di stabilire le caratteristiche qualitative soggettive che il nuovo metodo che si sta validando deve avere, in particolare sono caratteristiche scelte in modo soggettivo da ogni laboratorio in base al contributo positivo che apporta durante le decisioni scientifiche,
- la seconda è quella della determinazione delle performance analitiche e l'ultima è quella di giudicare l'accettabilità di queste performance sulla base del confronto con le caratteristiche qualitative precedentemente stabilite

Secondo le prescrizioni della Decisione 657/2002/CE la seconda parte corrisponde alla valutazione delle performance analitiche vera e propria con l'obiettivo di identificare e quantificare fonti e tipi di errore intrinseci ad ogni metodo o strumento diagnostico.[104] In

letteratura sono state pubblicate numerose linee guida per determinare le performance analitiche di un metodo,[103],[104], ma in linea generale la validazione di un metodo ha lo scopo di identificare le fonti di un potenziale errore analitico. In particolare l'errore analitico è costituito da due differenti tipi di errore: l'errore random e quello sistematico. L'errore random identifica la variabilità intrinseca al metodo stesso (precisione), mentre l'errore sistematico identifica quanto il valore misurato si discosta dal valore reale (accuratezza). Precisione e Accuratezza sono quindi i primi due requisiti del metodo da verificare. Nella parte sperimentale illustreremo le procedure analitiche necessarie a valutare la Precisione e l'Accuratezza e quelle per ottenere altre informazioni sulle performances quali Linearità, Specificità, Selettività, Robustezza, LOD ( Limite di rivelabilità), LOQ ( limite di quantificazione), Effetto matrice.

Alla fine di questo processo si procederà all'analisi dei campioni reali.

### 8.3 Campionamento

I campioni di lana sucida sono stati prelevati tra il mese di Maggio e il mese di Giugno 2015 (periodo della tosa), da tre allevamenti regolarmente iscritti ai Registri dell'ASL Veterinaria e ubicati rispettivamente a Sassari (Nurra - **S**), Nule (Goceano - **N**) e Ottana (Barbagia - **O**).

Le regioni della Nurra e della Barbagia sono state selezionate per l'elevato grado di antropizzazione, dovuto ai siti industriali presenti nell'area di Fiumesanto (Nurra) e nella piana di Ottana (Barbagia).

La regione del Goceano è stata selezionata per il basso grado di antropizzazione e quindi impiegato come "bianco".

La cartina sottostante mostra le aree di campionamento



Per ogni allevamento sono stati scelti 50 campioni di lana sucida, per un totale di 150 campioni. Questi sono stati suddivisi in due stock diversi:

**il primo stock** costituito da 120 campioni è stato destinato alla ricerca di avermectine con Orbitrap LC-MS, ed è stato suddiviso in due sotto gruppi da 60 campioni ciascuno.

Il primo costituito da campioni di lana sucida, il secondo da campioni di lana lavata a 30°C, per verificare l'eventuale eliminazione degli analiti ricercati dopo lavaggio.

**Il secondo stock** costituito da 30 campioni, previo lavaggio a 30°C, è stato destinato alla ricerca di 21 metalli pesanti con ICP-MS.

Le tabelle seguenti ( tabella7, tabella 8 e tabella 9) riportano la denominazione dei campioni, lo stato fisiologico dell'ovino al momento della tosa, l'età dell'ovino ed il punto anatomico da cui è stata tosata la lana.

SASSARI (NURRA)							
Campione	Punto prelievo	Fisiologia	Età	Campione	Punto prelievo	Fisiologia	Età
S1	Schiena	fine lattazione	2,5	S26	Schiena	fine lattazione	2,5
S2	Fianco	asciutta	2,5	S27	Fianco	asciutta	2,5
S3	Schiena	fine lattazione	3,5	S28	Schiena	fine lattazione	3,5
S4	Schiena	asciutta	3,5	S29	Schiena	asciutta	3,5
S5	Fianco	asciutta	6,5	S30	Fianco	asciutta	6,5
S6	Schiena	fine lattazione	1,5	S31	Schiena	fine lattazione	1,5
S7	Fianco	fine lattazione	2,5	S32	Fianco	fine lattazione	2,5
S8	Schiena	Asciutta	5,5	S33	Schiena	Asciutta	5,5
S9	Fianco	Asciutta	2,5	S34	Fianco	Asciutta	2,5
S10	Schiena	Asciutta	3,5	S35	Schiena	Asciutta	3,5
S11	Schiena	fine lattazione	2,5	S36	Schiena	fine lattazione	2,5
S12	Fianco	asciutta	2,5	S37	Fianco	asciutta	2,5
S13	Schiena	fine lattazione	3,5	S38	Schiena	fine lattazione	3,5
S14	Fianco	asciutta	3,5	S39	Fianco	asciutta	3,5
S15	Schiena	asciutta	6,5	S40	Schiena	asciutta	6,5
S16	Fianco	fine lattazione	1,5	S41	Fianco	fine lattazione	1,5
S17	Schiena	fine lattazione	2,5	S42	Schiena	fine lattazione	2,5
S18	Fianco	Asciutta	5,5	S43	Fianco	Asciutta	5,5
S19	Schiena	Asciutta	2,5	S44	Schiena	Asciutta	2,5
S20	Fianco	Asciutta	3,5	S45	Fianco	Asciutta	3,5
S21	Schiena	asciutta	2,5	S46	Schiena	Asciutta	2,5
S22	Fianco	asciutta	2,5	S47	Fianco	fine lattazione	2,5
S23	Schiena	fine lattazione	3,5	S48	Schiena	asciutta	3,5
S24	Fianco	fine lattazione	3,5	S49	Fianco	fine lattazione	3,5
S25	Schiena	Asciutta	6,5	S50	Schiena	asciutta	6,5

Tabella 7 Caratteristiche dei campioni prelevati nella Regione della Nurra

OTTANA (BARBAGIA)							
Campione	Punto prelievo	Fisiologia	Età	Campione	Puntoprelievo	Fisiologia	Età
O1	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O26	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O2	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O27	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O3	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-	O28	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-
O4	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O29	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O5	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O30	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O6	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-	O31	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-
O7	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O32	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O8	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O33	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O9	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O34	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O10	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O35	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O11	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O36	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O12	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O37	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O13	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-	O38	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-
O14	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O39	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O15	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O40	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O16	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-	O41	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-
O17	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O42	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O18	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O43	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O19	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O44	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O20	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O45	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O21	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O46	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-
O22	<i>dietro</i>	<i>lattazione</i>	-	O47	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-
O23	<i>totale</i>	<i>lattazione</i>	-	O48	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O24	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O49	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-
O25	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-	O50	<i>davanti</i>	<i>lattazione</i>	-

Tabella 9. Caratteristiche dei campioni prelevati nella regione della Barbagia

NULE (GOCEANO)							
Campione	Punto prelievo	Fisiologia	Età	Campione	Punto prelievo	Fisiologia	Età
N1	Schiena	lattazione	2	N26	Schiena	lattazione	2
N2	Schiena	lattazione	2	N27	Schiena	lattazione	2
N3	Schiena	lattazione	2	N28	Schiena	lattazione	2
N4	Schiena	lattazione	2	N29	Schiena	lattazione	2
N5	Schiena	lattazione	2	N30	Schiena	lattazione	2
N6	Schiena	lattazione	2	N31	Schiena	lattazione	2
N7	Schiena	lattazione	2	N32	Schiena	lattazione	2
N8	Schiena	lattazione	2	N33	Schiena	lattazione	2
N9	Schiena	lattazione	2	N34	Schiena	lattazione	2
N10	Schiena	lattazione	2	N35	Schiena	lattazione	2
N11	Schiena	lattazione	3	N36	Schiena	lattazione	3
N12	Schiena	lattazione	3	N37	Schiena	lattazione	3
N13	Schiena	lattazione	3	N38	Schiena	lattazione	3
N14	Schiena	lattazione	3	N39	Schiena	lattazione	3
N15	Schiena	lattazione	3	N40	Schiena	lattazione	3
N16	Schiena	lattazione	3	N41	Schiena	lattazione	3
N17	Schiena	lattazione	4	N42	Schiena	lattazione	4
N18	Schiena	lattazione	4	N43	Schiena	lattazione	4
N19	Schiena	lattazione	5	N44	Schiena	lattazione	5
N20	Schiena	lattazione	5	N45	Schiena	lattazione	5
N21	Schiena	lattazione	3	N46	Schiena	lattazione	3
N22	Schiena	lattazione	4	N47	Schiena	lattazione	4
N23	Schiena	lattazione	4	N48	Schiena	lattazione	4
N24	Schiena	lattazione	5	N49	Schiena	lattazione	5
N25	Schiena	lattazione	5	N50	Schiena	lattazione	5

Tabella 9. Caratteristiche dei campioni prelevati nella regione del Goceano

## 8.4 Materiali e solventi

Gli eluenti utilizzati per le determinazioni in cromatografia, sono stati metanolo e acetonitrile, LCMS grade, forniti dalla J.T. Baker (Italia).

- L'acido formico 98%, e il formiato di ammonio 99.8% sono reagenti per analisi spettrometriche e sono stati forniti da J.T. Baker (Italia).
- L'acido nitrico ultrapure al 70% è stato fornito dalla J.T. Baker, (Phillipsburg, USA).
- L'H<sub>2</sub>O MilliQ è stata purificata su un sistema MILLI-Q® system (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Colonnine SPE HLB Oasis per la purificazione del campione sono state acquistate dalla ditta Waters (Bedford, MA USA).
- I filtri per siringa, 0.45 µm diametro 17 mm in RC, sono stati forniti dalla Phenomenex.
- Vial Eppendorf da 0.5 e 1.5 mL *criovials* sono stati acquistati dalla ditta Millipore. (Bedford, MA USA).

## 8.5 Estrazione campioni per analisi Avermectine

L'estrazione dei campioni di lana è stata effettuata con solvente assistita da estrattore a microonde “Mars 6” CEM.

I campioni di lana sucida sono stati finemente tagliati (mediante l'uso di forbici sterilizzate) in modo da aumentare la superficie di contatto con il solvente di estrazione e pesati con bilancia analitica.

In questa fase, allo scopo di rendere più performante il processo di estrazione sono stati studiati:

- il solvente di estrazione più adatto alla matrice lana
- i parametri di processo per l'estrazione con estrattore a microonde.

La scelta del solvente di estrazione è stata intrapresa anzitutto nel rispetto dell'ambiente e applicando il 5° principio della Green Chemistry [85] secondo cui “ *L'uso di sostanze ausiliarie ( come solventi, agenti di separazione, ecc.) deve essere reso non necessario ove possibile, ed innocuo quando esse si rendono necessarie*”.

Sono stati quindi selezionati dei solventi appartenenti alla categoria dei “ solventi sostenibili”, a basso impatto ambientale.

La tabella sottostante ( tabella 10) riporta la classificazione dei solventi secondo la Green Chemistry, riportando in verde i solventi sostenibili, in giallo i solventi con medio impatto ambientale e in rosso i solventi indesiderabili, ad elevato impatto ambientale.

SOLVENTI SOSTENIBILI	SOLVENTI A BASSO IMPATTO AMBIENTALE	SOLVENTI AD ELEVATO IMPATTO AMBIENTALE
Acqua	Cicloesano	Pentano
Acetone	Metilcicloesano	Esano
Etanolo	Toluene	Di-isopropil etere
2-propanolo	Metil-butil-etere	Di etil etere
1-propanolo	Isoottano	Cloroformio
Etil-acetato	Acetonitrile	Dimetil- formemide
Isopropyl Acetate	2-metiltetraidrofurano	Piridina
Metanolo	Tetraidrofurano	Dimetil-acetamide
Metil-etil-chetone	Xilene	Diossano
1-butanolo	Dimetil sufossido	Benzene
T-butanolo	Acido acetico	Carbon-tetracloride

**Tabella 10. Classificazione dei solventi in Green Chemistry**

Tra i solventi ecosostenibili, sono stati selezionati:

- Etanolo
- Metanolo
- Isopropanolo
- Acqua

Il secondo criterio di scelta è stato la compatibilità dei solventi di estrazione con lo spettrometro di massa ad alta risoluzione impiegato per la determinazione delle Avermectine.

A tal proposito è stato aggiunto un quinto solvente di estrazione, l'acetonitrile, che rientra nel gruppo dei solventi a medio impatto ambientale, ed ampiamente usato come fase mobile per la determinazione di diverse molecole usando lo spettrometro di massa a elevata risoluzione.

Il terzo criterio di scelta è stato basato sulla natura chimico-fisica delle Avermectine, che essendo composti altamente lipofili, sono altamente solubili in solventi organici come etanolo, metanolo e isopropanolo.

La tabella sottostante ( tabella 11) riporta i 5 solventi di estrazione selezionati in base ai criteri sopra discussi.

<b>SOLVENTI DI ESTRAZIONE</b>
<b>Acetonitrile</b>
<b>Etanolo</b>
<b>Metanolo</b>
<b>Isopropanolo</b>
<b>Acqua</b>

Tabella 11. Solventi di estrazione selezionati

Per i primi 4 solventi elencati in tabella sono state effettuate 4 prove di estrazione, escludendo la possibilità di usare l'acqua tal quale a causa della scarsissima solubilità delle avermectine in questo solvente.

Le prime due prove di estrazione sono state effettuate impiegando i singoli solventi con una quantità di 5 ml.

Le ultime due prove sono state effettuate invece impiegando i solventi in miscela con acqua, nella quantità di 5 ml e in rapporto 50:50.

La tabella sottostante (tabella 12) e riassume le 4 prove di estrazione, riportando le quantità in ml e i rapporti in miscela.

<b>Solvente di estrazione</b>	<b>Quantità di solvente</b>	<b>Rapporto in miscela</b>
<b>Acetonitrile</b>	10 ml	
<b>Etanolo</b>	10 ml	
<b>Metanolo</b>	10 ml	
<b>Isopropanolo</b>	10 ml	
<b>Acetonitrile- Acqua</b>	10 ml	50:50
<b>Etanolo- Acqua</b>	10 ml	50:50
<b>Metanolo-Acqua</b>	10 ml	50:50
<b>Isopropanolo-Acqua</b>	10 ml	50:50

Tabella 12. Prove di estrazione

Le prove di estrazione sono state ripetute in doppio per ogni solvente e ogni miscela.

I risultati migliori sono stati ottenuti impiegando la miscela di acqua e metanolo.

Una volta scelto il solvente di estrazione, sono stati valutati i seguenti parametri preparativi, per ottimizzare il processo di estrazione:

- la quantità del solvente
- il rapporto in miscela dei solventi selezionati

La quantità di solvente da impiegare è stata valutata effettuando 3 prove di estrazione, ripetute in doppio.

La necessità di valutare la quantità di solvente di estrazione è motivata con le proprietà strutturali della matrice lana, che a contatto con i diversi solventi di estrazione tende ad assorbirli aumentando il proprio volume ed impedisce alla sonda dell'estrattore a microonde di rilevare la pressione e la temperatura all'interno dei vessel.

Sono state effettuate tre prove di estrazione con tre diverse quantità di miscela Acqua/Metanolo in rapporto 50:50, rispettivamente con 10 ml, 15 ml e 20 ml

Il miscela di estrazione CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, che ha mostrato i risultati migliori ha riportato la quantità di 20 ml.

La tabella sottostante (tabella 13) riassume le 3 prove di estrazione, riportando le quantità in ml e i rapporti in miscela.

<b>Solvente</b>	<b>Quantità di solvente (ml)</b>	<b>Rapporto CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>
<b>CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>	10	50:50
<b>CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>	15	50:50
<b>CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>	20	50:50

Tabella 13. Prove di estrazione

Il rapporto in miscela acqua e metanolo è stato valutato effettuando due prove, ripetute in doppio, impiegando la miscela di estrazione in rapporto 50:50 e 70:30.

Dalle prove di estrazione è risultata essere più performante la miscela in rapporto 50:50.

La tabella sottostante ( tabella 14) riassume le 2 prove di estrazione, riportando le quantità in ml e i rapporti in miscela.

<b>Solvente</b>	<b>Quantità di solvente (ml)</b>	<b>Rapporto CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>
<b>CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>	20	50:50
<b>CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O</b>	20	70:30

Tabella 14. Prove di estrazione

I parametri del processo di estrazione, sono invece:

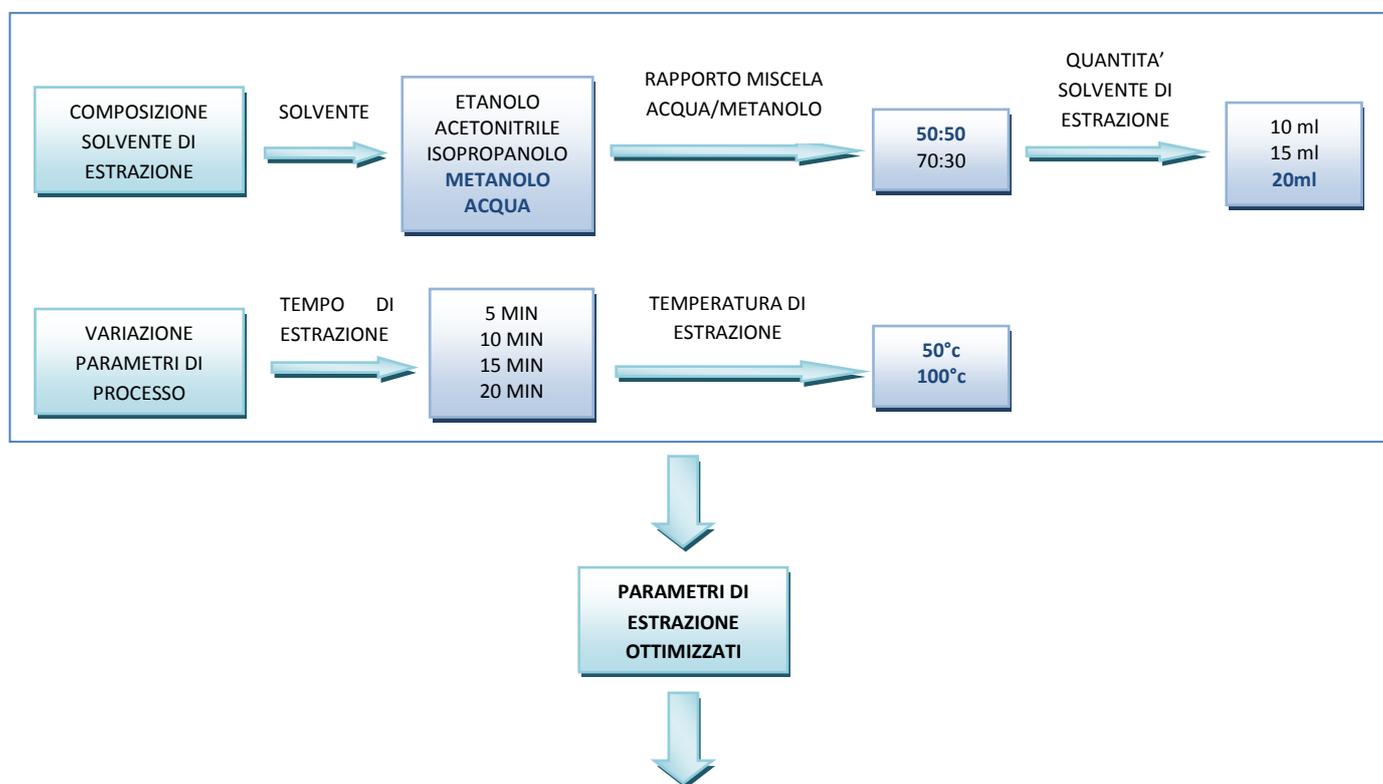
- Temperatura di estrazione
- Tempo di estrazione.

Sono state effettuate 4 diverse prove, ripetute in doppio, variando la temperatura e il tempo di estrazione come mostrato nella Tabella 15, impiegando il solvente di estrazione precedentemente selezionato.

Campione	Solvente di estrazione	Tempo (Min)	Temperatura
1	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O	5	50°C
			100°C
2	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O	10	50°C
			100°C
3	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O	15	50°C
			100°C
4	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O	20	50°C
			100°C

Tabella 15. Prove di estrazione relative ai parametri di processo da impiegare

I risultati migliori sono stati ottenuti con un tempo di 20 minuti ad una temperatura di 100°C. In figura 11 sono riportate in successione le fasi per l'ottimizzazione del processo estrattivo:



Solvente	Quantità	Rapporto in miscela	Temperatura	Tempo
CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O	20 ml	50:50	100°C	20 minuti

Figura 11. Schema riassuntivo delle fasi di ottimizzazione relative al processo di estrazione

20 ml di miscela CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O sono stati trasferiti nei vessel dell'estrattore a microonde, cui sono stati aggiunti successivamente i campioni di lana.

Terminato il ciclo di estrazione, i campioni di lana estratti sono stati trasferiti in provette Falcon da 50 ml e sottoposti a centrifugazione per 5 minuti a 3000 RPM.

I campioni centrifugati sono stati filtrati mediante filtro Büchner con beuta codata da vuoto per eliminare le impurità e sottoposti nuovamente ad un ciclo di centrifugazione ( 5 minuti a 3000 RPM).

### 8.5.1. Purificazione dei campioni estratti

Per la purificazione dei campioni estratti è stato selezionato il sistema Visisprep ( sistema vacuum per colonne S.P.E., figura 12).

Una volta montato il sistema, le colonnine (OASIS HLB CATRIDGE) sono state posizionate negli appositi alloggi.

Le colonnine sono state attivate con 1 ml di CH<sub>3</sub>OH ( condizionamento) e 1ml di H<sub>2</sub>O (equilibratura), regolando il flusso di estrazione ad 1 ml/min.

In ciascuna colonnina è stata introdotta un'aliquota da 3 ml dei campioni precedentemente estratti.

Si è proceduto con il lavaggio ( 1 ml di CH<sub>3</sub>OH in H<sub>2</sub>O al 5%) ed infine con l'eluizione con 1 ml di CH<sub>3</sub>OH.

I campioni purificati sono stati portati a secco in corrente d'azoto a 50°C e ripresi con 1 ml di CH<sub>3</sub>OH /H<sub>2</sub>O 50:50 per essere sottoposti ad analisi con LC/MS.



**Figura 5. Sistema Vacuum Visisprep**

## 8.6 Condizioni strumentali

I cromatogrammi sono stati ottenuti con un sistema Agilent Serie 1200 Lc system. Il strumento è costituito da una serie di moduli intercambiabili e addizionabili: nella configurazione classica è composto da un sistema di pompe a doppio pistone settato per un range di flusso che va da 0.001 mL/min a 5 mL/min con pressioni da 0 a 400 bar, una camera di miscelazione ad alta pressione e due canali per l'aspirazione degli eluenti.

Il modulo di rivelazione spettrometrica è costituito da un Diode Array Detector (DAD) equipaggiato di doppia lampada Tungsteno-Deuterio per acquisizioni in un range di lunghezze d'onda da 190 a 950 nm. Il controllo dello strumento e l'elaborazione dei dati sono stati effettuati tramite la Agilent Chemstation che in ambiente Windows gestisce tutto il sistema.

Il sistema è stato utilizzato per separazioni cromatografiche su colonna Phenomenex Gemini C18(2) 5x 2.1 mm 3µm con una precolonna Phenomenex gemini C18 3µm.

Eluente A: Metanolo- Acetonitrile 70/30 con Ammonio Formiato 1 mM

Eluente B: soluzione acquosa di Ammonio Formiato 1 mM allo 0.1% acido Formico con un Volume di iniezione di 5µL

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Flusso (ml/min)
0	60	40	0.3
1	60	40	0.3
12	75	25	0.3
18	85	15	0.3
20	60	40	0.3

Tabella 14. Condizioni strumentali

Le analisi HRMS e analisi MS<sub>n</sub> delle Avermectine sono state eseguite utilizzando uno spettrometro di massa Orbitrap ibrido Q Exactive (Thermo Scientific, Brema, Germania) in modalità ioni positivi. La frammentazione degli ioni è stata studiata mediante infusione diretta in sorgente ESI utilizzando una pompa per infusione ad una velocità di flusso di 5 ml / min, nel range di massa da m / z 100-1000. Alcuni parametri come *source voltage*, *sheath gas*, *auxiliary gas* e *capillary temperature*, sono stati in questo modo ottimizzati per ottenere la migliore risposta strumentale. Come mostrato dalla tabella sottostante la scelta dello ione precursore è stata fatta in base alla specie che ogni molecola più facilmente forma nell'interfaccia ESI.

Mass [m/z]	Formula [M]	Species	CS [z]	Polarity	COMPOSTO
<b>640,38439</b>	C37H53NO8	+ H	1	Positive	MOXIDECTINA
<b>914,52603</b>	C50H75NO14	+ H	1	Positive	EPRINOMECTINA
<b>916,54168</b>	C50H74O14	+ NH4	1	Positive	DORAMECTINA
<b>886,53112</b>	C49H75NO13	+ H	1	Positive	EMAMECTINA
<b>890,52603</b>	C48H72O14	+ NH4	1	Positive	ABAMECTINA B1A
<b>892,54168</b>	C48H74O14	+ NH4	1	Positive	IVERMECTINA

Tabella 15. Ioni precursori relativi alle molecole delle avermectine

Sono stati scelti valori di Spray voltage a 3,5 V e capillary voltage a 30 V mentre gli altri parametri sono stati lasciati con i valori di default. La risoluzione è stata fissata a 70.000 dopo l'accumulo di ioni per un valore target di  $1 \times 10^6$  (sulla base predittiva AGC dalla precedente scansione completa) e i dati sono stati acquisiti nella modalità Full Ms ddm<sup>2</sup>. Le acquisizioni MS / MS nelle modalità HCD e CID sono stati eseguiti per ciascun composto in un range NCE tra 10 -35%

- Q Exactive Plus mass spectrometer equipped with HESI-II probe.
- Polarity detection mode: Positive, Negative.

- Scan Mode: Data-dependant MS/MS. Mass Range: 100-1000 amu for Full-MS.
- Ion source settings: Spray Voltage = 3 kV (both ESI pos. and neg.), Vaporizer = 320 °C, Ion Transfer Tube = 285 °C, S-Lens = 45 %, Sheath Gas = 60, Auxiliary gas = 20, Gas =1.
- Data acquisition settings: AGC (MS) = 1e6, AGC (MS2) = 1e5, Mass Range = 100 – 100 Da, Fixed First Mass = 75 Da, Apex Trigger = N/A,

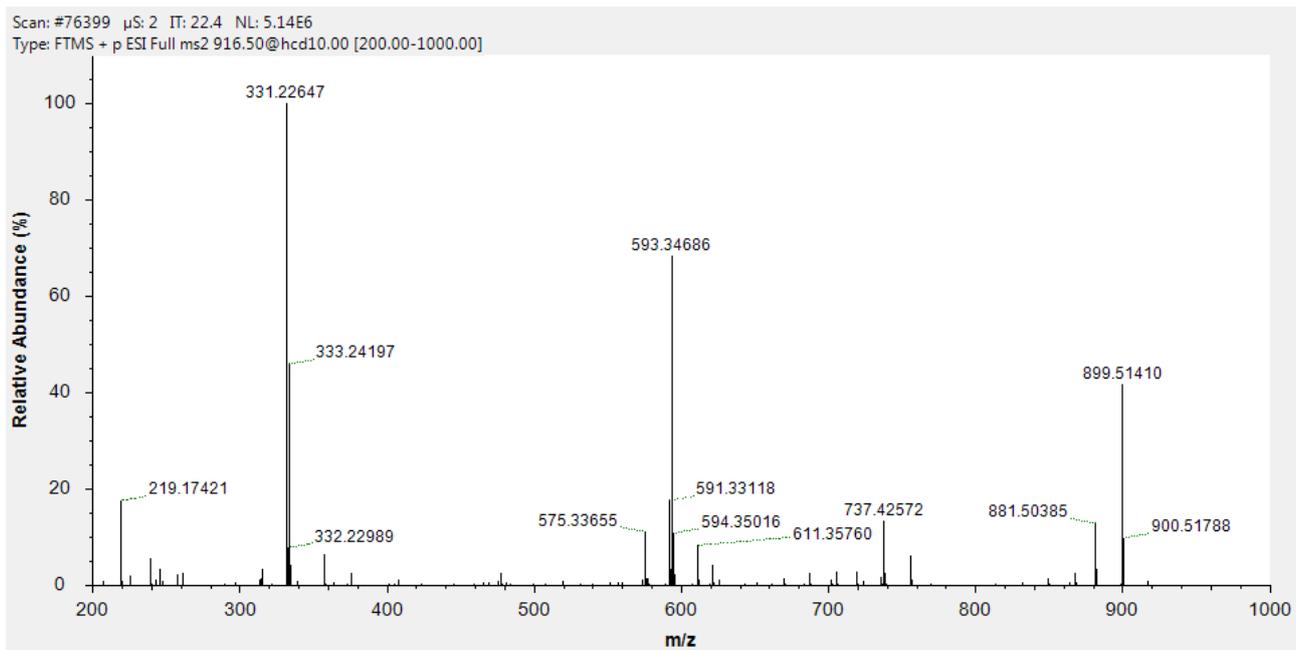


Figura 13. Full spectra of Doramectina

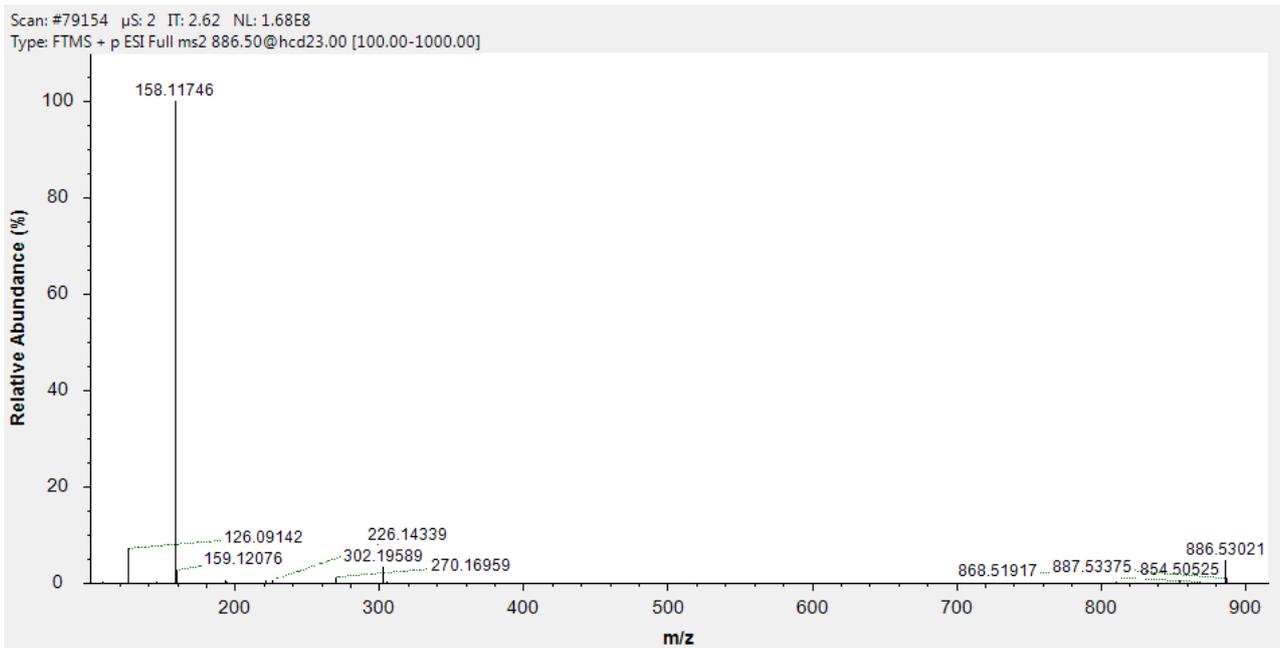


Figura 14. Full spectra off Emamectina

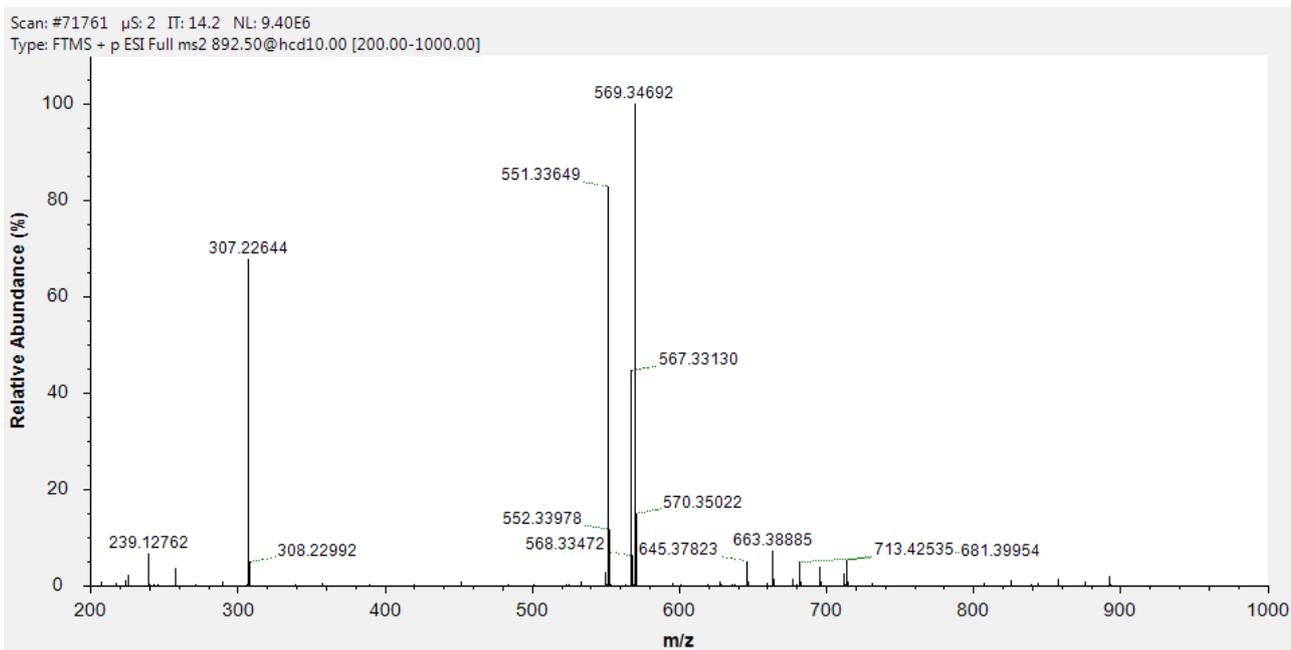


Figura 15. Full spectra of Ivermectina

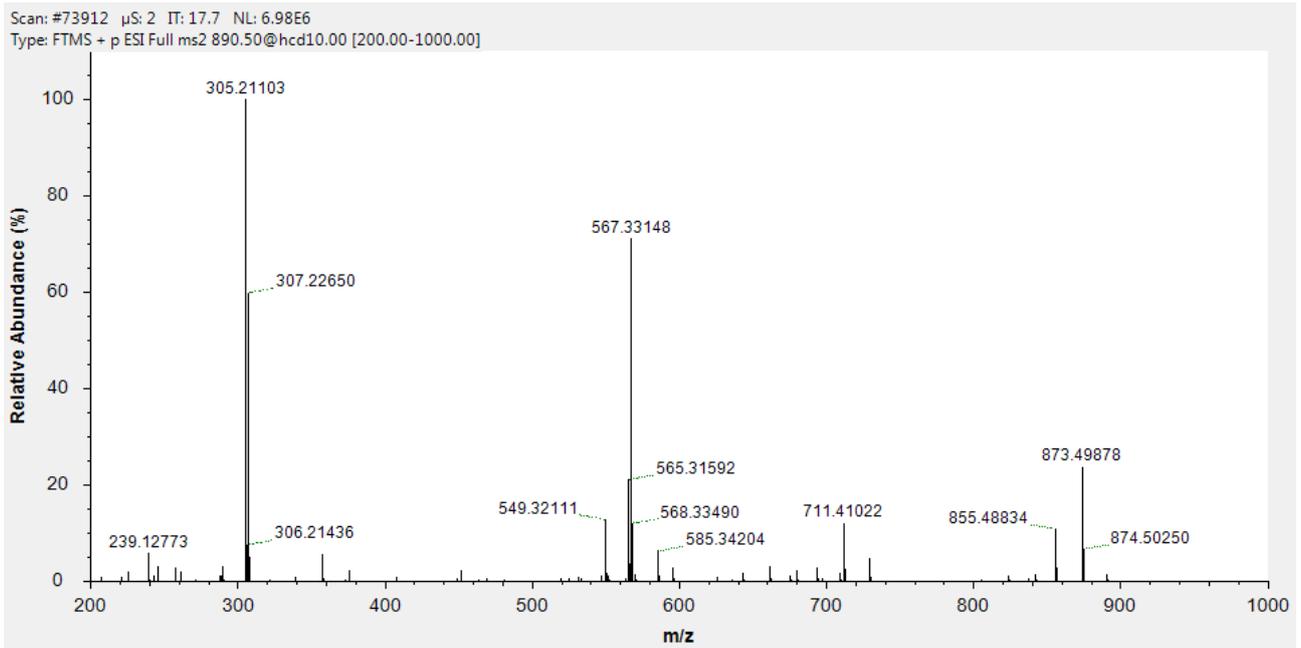


Figura 16. Full spectra of Abamectina

## 8.7 Preparazione soluzioni standard.

Le soluzioni madre di Avermectine sono stati preparate disciogliendo gli standard commerciali in 25 mL di metanolo LC-MS *grade*. Le soluzioni così preparate sono state aliquotate in cryovials di polietilene HDPE e conservate a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le concentrazioni sono descritte in tabella ( tabella 16)

MOLECOLE	PESATA	CONCENTRAZIONE Soluzione madre( $\mu\text{g/mL}$ )
Ivermectina	0,014	56
Abamectina	0,0033	13,2
Doramectina	0,0106	42,4
Emamectina	0,0114	45,6
Moxidectina	0,0102	40,8
Eprinomectina	0,0097	39,88

Tabella 16. Concentrazioni delle soluzioni madre per ogni avermectina

Una soluzione *stock* di Avermectine è stata preparata diluendo in 10 mL di metanolo LCMS *grade*. La soluzione così preparata è stata conservata a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (tabella 17)

STOCK SOLUTION		CONCENTRAZIONE ( $\mu\text{g/mL}$ )
50 $\mu\text{l}$ sol.ne 56 $\mu\text{g/ml}$	10 ml CH <sub>3</sub> OH	280
200 $\mu\text{l}$ sol.ne 13.2 $\mu\text{g/ml}$		264
50 $\mu\text{l}$ sol.ne 42.4 $\mu\text{g/ml}$		212
50 $\mu\text{l}$ sol.ne 45.6 $\mu\text{g/ml}$		228
50 $\mu\text{l}$ sol.ne 40,8 $\mu\text{g/ml}$		204
50 $\mu\text{l}$ sol.ne 39,88 $\mu\text{g/ml}$		199,4

Tabella 17. Stock solution

## 8.8 Costruzione delle curve di calibrazione in solvente

Le curve di calibrazione sono state ottenute con letture successive di soluzioni standard di Avermectine diluite come riportato in tabella seguente ( Tabella 18):

STOCK SOLUTION	MOLECOLA	LIVELLO	CONC.(ppb)	MISCELA
50µl	IVER	1	2,8	5 ml CH3OH/H2O
75µl	IVER	2	4,2	5 ml CH3OH/H2O
100µl	IVER	3	5,6	5 ml CH3OH/H2O
200µl	IVER	4	11,2	5 ml CH3OH/H2O
1000µl	IVER	5	28	10 ml CH3OH/H2O
1000µl	IVER	6	56	5 ml CH3OH/H2O
50µl	ABA	1	2,64	5 ml CH3OH/H2O
75µl	ABA	2	3,96	5 ml CH3OH/H2O
100µl	ABA	3	5,28	5 ml CH3OH/H2O
200µl	ABA	4	10,56	5 ml CH3OH/H2O
1000µl	ABA	5	26,4	10 ml CH3OH/H2O
1000µl	ABA	6	52,8	5 ml CH3OH/H2O
50µl	DORA	1	2,12	5 ml CH3OH/H2O
75µl	DORA	2	3,18	5 ml CH3OH/H2O
100µl	DORA	3	4,24	5 ml CH3OH/H2O
200µl	DORA	4	8,48	5 ml CH3OH/H2O
1000µl	DORA	5	21,08	10 ml CH3OH/H2O
1000µl	DORA	6	42,16	5 ml CH3OH/H2O
50µl	EMA	1	2,28	5 ml CH3OH/H2O
75µl	EMA	2	3,42	5 ml CH3OH/H2O
100µl	EMA	3	4,56	5 ml CH3OH/H2O
200µl	EMA	4	9,12	5 ml CH3OH/H2O
1000µl	EMA	5	22,8	10 ml CH3OH/H2O
1000µl	EMA	6	45,6	5 ml CH3OH/H2O
50µl	MOXI	1	2,04	5 ml CH3OH/H2O
75µl	MOXI	2	3,6	5 ml CH3OH/H2O
100µl	MOXI	3	4,08	5 ml CH3OH/H2O
200µl	MOXI	4	8,16	5 ml CH3OH/H2O
1000µl	MOXI	5	20,4	10 ml CH3OH/H2O
1000µl	MOXI	6	40,8	5 ml CH3OH/H2O
50µl	EPRI	1	1,99	5 ml CH3OH/H2O
75µl	EPRI	2	2,99	5 ml CH3OH/H2O
100µl	EPRI	3	3,98	5 ml CH3OH/H2O
200µl	EPRI	4	7,97	5 ml CH3OH/H2O
1000µl	EPRI	5	19,94	10 ml CH3OH/H2O
1000µl	EPRI	6	39,88	5 ml CH3OH/H2O

**Tabella 18. Soluzioni standard di Avermectine per la costruzione delle curve di calibrazione**

## 8.9 Preparazione della curva in matrice e dei campioni di controllo.

Le curve di calibrazione in matrice sono state costruite attraverso la lettura di soluzioni standard di Avermectine in matrice. Diverse quantità della stock solution sono state diluite con estratti di lana. Le concentrazioni finali delle soluzioni di Avermectine in matrice sono riportate nella tabella seguente ( tabella 19).

STOCK SOLUTION	MOLECOLA	LIVELLO	CONC.(ppb)	MISCELA
5µl	IVER	1	2,8	0.5 ml Estratto
7,5µl	IVER	2	4,2	0.5 ml Estratto
10µl	IVER	3	5,6	0.5 ml Estratto
20µl	IVER	4	11,2	0.5 ml Estratto
100µl	IVER	5	28	1 ml Estratto
100µl	IVER	6	56	0.5 ml Estratto
5µl	ABA	1	2,64	0.5 ml Estratto
7,5µl	ABA	2	3,96	0.5 ml Estratto
10µl	ABA	3	5,28	0.5 ml Estratto
20µl	ABA	4	10,56	0.5 ml Estratto
100µl	ABA	5	26,4	1 ml Estratto
100µl	ABA	6	52,8	0.5 ml Estratto
5µl	DORA	1	2,12	0.5 ml Estratto
7,5µl	DORA	2	3,18	0.5 ml Estratto
10µl	DORA	3	4,24	0.5 ml Estratto
20µl	DORA	4	8,48	0.5 ml Estratto
100µl	DORA	5	21,08	1 ml Estratto
100µl	DORA	6	42,16	0.5 ml Estratto
5µl	EMA	1	2,28	0.5 ml Estratto
7,5µl	EMA	2	3,42	0.5 ml Estratto
10µl	EMA	3	4,56	0.5 ml Estratto
20µl	EMA	4	9,12	0.5 ml Estratto
100µl	EMA	5	22,8	1 ml Estratto
100µl	EMA	6	45,6	0.5 ml Estratto
5µl	MOXI	1	2,04	0.5 ml Estratto
7,5µl	MOXI	2	3,6	0.5 ml Estratto
10µl	MOXI	3	4,08	0.5 ml Estratto
20µl	MOXI	4	8,16	0.5 ml Estratto
100µl	MOXI	5	20,4	1 ml Estratto
100µl	MOXI	6	40,8	0.5 ml Estratto
5µl	EPRI	1	1,99	0.5 ml Estratto
7,5µl	EPRI	2	2,99	0.5 ml Estratto
10µl	EPRI	3	3,98	0.5 ml Estratto
20µl	EPRI	4	7,97	0.5 ml Estratto
100µl	EPRI	5	19,94	1 ml Estratto
100µl	EPRI	6	39,88	0.5 ml Estratto

**Tabella 19.** Concentrazioni finali delle soluzioni di Avermectine in matrice

## 8.10 Estrazione dei metalli pesanti e degli elementi

Gli elementi chimici sono stati determinati con la tecnica dell'ICP-MS secondo il metodo EPA 6020b ( Spettrometria di massa al plasma accoppiata induttivamente) previa digestione della matrice lana in mineralizzatore a microonde CEM Discover SP-D (CEM Corp., USA) [106]

Sono stati pesati 0,2 g di campione di lana ed inseriti nei vessel di vetro del mineralizzatore contenenti 5 ml di HNO<sub>3</sub> ultra puro al 70% (JT Baker, Phillipsburg, USA).

Il programma di digestione per sistema a microonde è stato il seguente: 5 minuti di rampa per raggiungere la temperatura di 200 °C ( temperatura di mineralizzazione); la temperatura di 200 ° C è stata mantenuta per 5 minuti.

Dopo la digestione e il raffreddamento sotto cappa aspirante, i campioni sono stati diluiti a 50 ml di acqua ultra pura e analizzati. Ultra acqua pura, è stato ottenuto da un sistema ultrapura (Millipore, Bedford, MA, USA). L'analisi è stata effettuata su un Agilent 7500 CE con un sistema di reazione ottapolo plasma accoppiato induttivamente allo spettrometro di massa. Le Soluzioni standard sono state preparate in stock soluzione 10 mg L<sup>-1</sup> (Environmental Calibration Mix, Agilent) con acqua di diluizione ultra pura. La curva di calibrazione è stata verificata alla fine di ciascun lotto analitico mediante verifica della calibrazione continua (CCV) in prossimità o midrange.

## 9. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 9.1 Ottimizzazione del metodo LC-HRMS

La caratterizzazione e la quantificazione degli analiti è stata effettuata sulla base dei criteri stabiliti dalla guida 2002/657 / CE per le determinazioni LCMS per quanto riguarda il rapporto di ioni. Il pattern caratteristico di frammentazione degli analiti deve essere infatti usato per confermare ulteriormente i casi positivi. Oltre ai tempi di ritenzione, le conferme devono essere date dall'abbondanza relativa dei frammenti caratteristici generati durante l'analisi e dalle masse accurate dei picchi presenti nei campioni rispetto a quelli ottenuti da uno standard di riferimento. L'intensità degli ioni relativi non dovrebbero variare di oltre  $\pm 20\%$  per gli ioni con intensità relative  $> 50\%$ ,  $\pm 25\%$  per gli ioni con intensità relative tra il  $10\%$  e il  $50\%$  e  $\pm 50\%$  per gli ioni con intensità relative  $<10\%$ . Inoltre la precisione di massa degli ioni caratteristici non dovrebbero variare più di 5 ppm [107]

Lo spettrometro di massa tandem Q-Exactive™ ad alta risoluzione è stato utilizzato nel nostro lavoro di dottorato per l'identificazione e la quantificazione delle Avermectine come analiti target. Sono stati testati tutti una serie di esperimenti MS quali tra i più semplici sono stati il Full scan MS, targeted selected ion monitoring (targeted-SIM), tra quelli MS/MS con la frammentazione del picco precursore sono stati invece testati il full MS-dd-MS/MS, il full MS-AIF, infine il targeted-SIM-dd-MS/MS [108].

Come descritto nella parte sperimentale il metodo strumentale scelto è stato il Full Ms data depending scan (Full MS-dd-MS / MS). Le scansioni in Full MS sono servite per l'identificazione e la quantificazione e la dd MS / MS per la conferma. È stato creato un elenco di inclusione di tutti gli analiti target con le condizioni relative ai loro frammenti principali, ai valori esatti  $m/z$  degli ioni precursori, e tempi di ritenzione. Le informazioni sugli analiti i tempi di ritenzione e masse esatte  $m/z$  dello ione molecolare più abbondante e loro frammenti ionici sono riassunti nella sottostante tabella ( tabella 20) [109].

Compounds	RT (min)	Formula	Precursor ion	Product ion	NCE
EMA	8.26	$C_{49}H_{75}NO_{13}$	886.53112	158.11746	25
EPRI	12.87	$C_{50}H_{75}NO_{14}$	914.52603	186.11217	25
ABA	13.64	$C_{48}H_{72}O_{14}$	890.52603	305.21103	25
IVE	14.70	$C_{48}H_{74}O_{14}$	892.54168	307.22644	15
DORA	14.86	$C_{50}H_{74}O_{14}$	916.54168	331.22347	35
MOXI	15.56	$C_{37}H_{53}NO_8$	640.38439	199.11194	35

Tabelle 21. Caratteristiche degli ioni molecolari per ogni avermectina

Le Avermectine hanno una vasta gamma di proprietà chimico-fisiche, sia in termini di polarità complessiva che di tipo di gruppi funzionali ionizzabili, quindi una particolare attenzione è stata prestata alla scelta del sistema di separazione cromatografica ottimale. Al fine di consentire sufficiente capacità di ionizzazione, sono state provate varie combinazioni di eluenti quali ad esempio l'ammonio acetato 1 e 5 mM in combinazione con il solo metanolo oppure miscele a varie proporzioni di metanolo ed acetonitrile come fase organica. La combinazione di eluenti scelta è stata quella composta da metanolo-acetonitrile 70:30 con ammonio formiato 1 mM da una soluzione acquosa di ammonio formiato 1mM con lo 0.1% di acido formico [110],[111].

Come si può notare ad entrambe le fasi eluenti è stato aggiunto il formiato di ammonio perchè ad esempio la Doramectina, Abamectina e l'Ivermectina hanno segnali significativamente più intensi come addotti formiato.

Durante gli esperimenti sono state provate numerose colonne cromatografiche alla ricerca dei migliori parametri di separazione, di risoluzione e di simmetria dei picchi cromatografici. Tutte le colonne avevano in comune l'impaccaggio C18 ma differenti lunghezze, grandezze delle particelle e diametro interno. La scelta è ricaduta sulla Gemini C18 lunga 5 cm con diametro interno da 2.1 e particelle da 3 µ.

La scelta di tutti questi parametri ha consentito un guadagno di segnale, una generale diminuzione del rumore di fondo ed un'ottima separazione dei picchi anche a basse concentrazioni.

La figura mostra una soluzione standard mix delle sei avermectine alla concentrazione di 10 ng/mL. Con queste prove il processo di ottimizzazione del metodo è stato concluso e si è passati alla fase di verifica delle sue *performances* e alla validazione del metodo stesso.

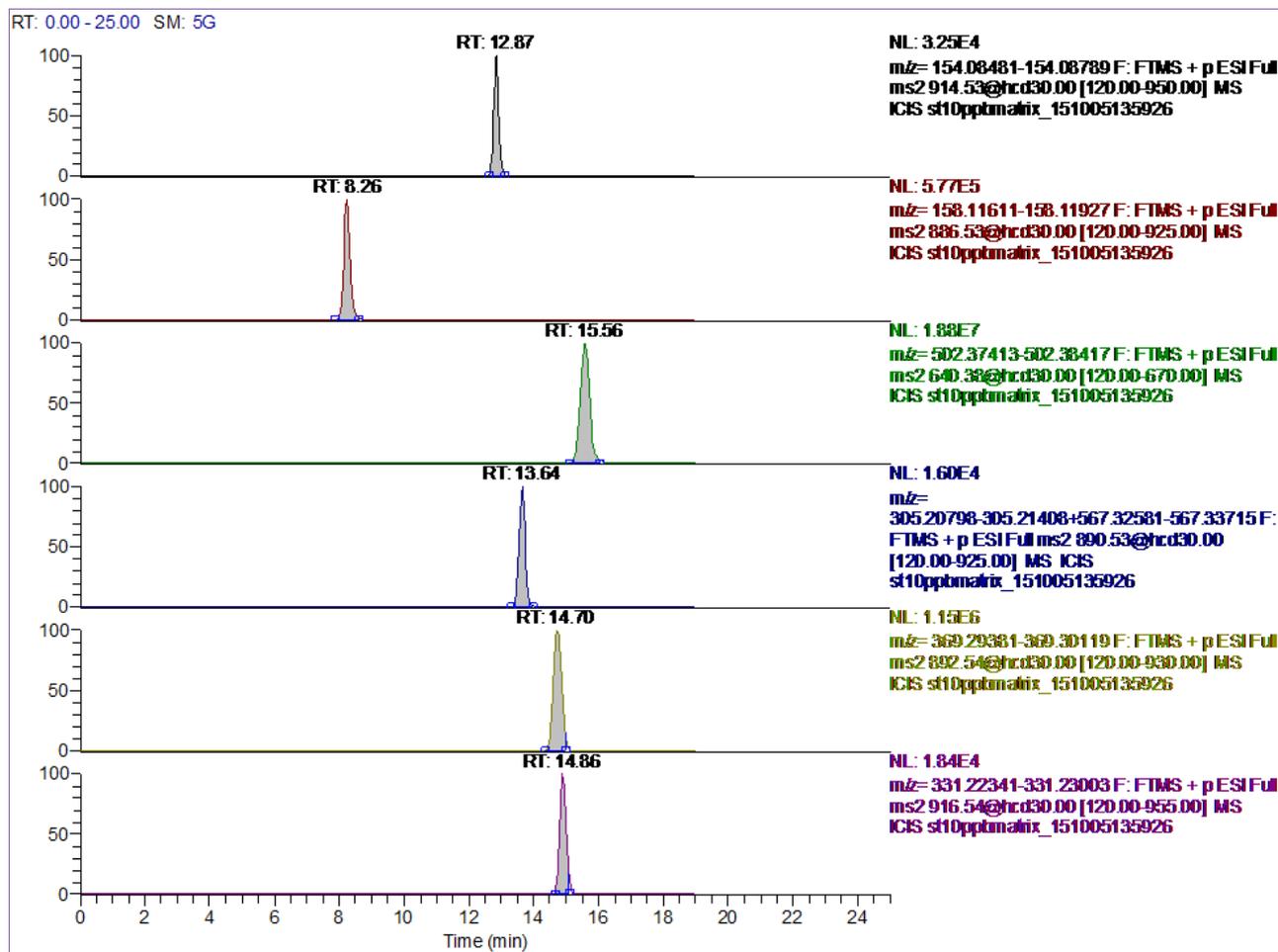


Figura 17. Cromatogrammi della soluzione standard per ogni Avermectina

## 9.2 Validazione metodo LC-HRMS

Il processo di validazione ha l'obiettivo di dimostrare la validità di un metodo, mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo (caratteristiche tecniche, applicabilità, performance analitiche, ecc.).

Come abbiamo in precedenza descritto, le matrici biologiche, contengono molte sostanze endogene che possono interferire con l'analisi della sostanza cercata, rischiando di co-eluire con essa o di generare uno ione-frammento isobarico, con conseguente alterazione (aumento o diminuzione) della risposta strumentale (effetto matrice). Tale fenomeno influisce negativamente sull'accuratezza del metodo analitico compromettendo l'affidabilità dei risultati. Un metodo interno risulta pertanto come il compendio di una progettazione di cui la validazione costituisce il passaggio finale [112],[113],[114],[115].

E' quindi stato preparato un piano di validazione del metodo che comprende la valutazione di:

- Selettività;
- Linearità;
- Limite di rilevabilità e Limite di quantificazione;
- Precisione (ripetibilità e riproducibilità);
- Accuratezza;
- Sensibilità;
- Robustezza;
- Recupero;
- Incertezza.

## 9.2.1 Selettività

Tutti i metodi analitici multi residuo prevedono una misura che è preceduta da un'estrazione preliminare e da una purificazione. E' necessario stabilire che il segnale registrato sia attribuibile in maniera univoca all'analita di interesse e non alla presenza contemporanea di un qualcosa di simile dal punto di vista chimico-fisico, che provochi un incremento anche casuale del segnale misurato. Se sono presenti interferenti e non si possono separare dall'analita, oppure se l'analista non si accorge della loro presenza, possono verificarsi una serie di inconvenienti a seconda di come viene identificato e quantizzato l'analita di interesse. Nel nostro lavoro di dottorato la selettività del metodo analitico è data dall'altissima specificità dello strumento LC-HRMS Orbitrap.

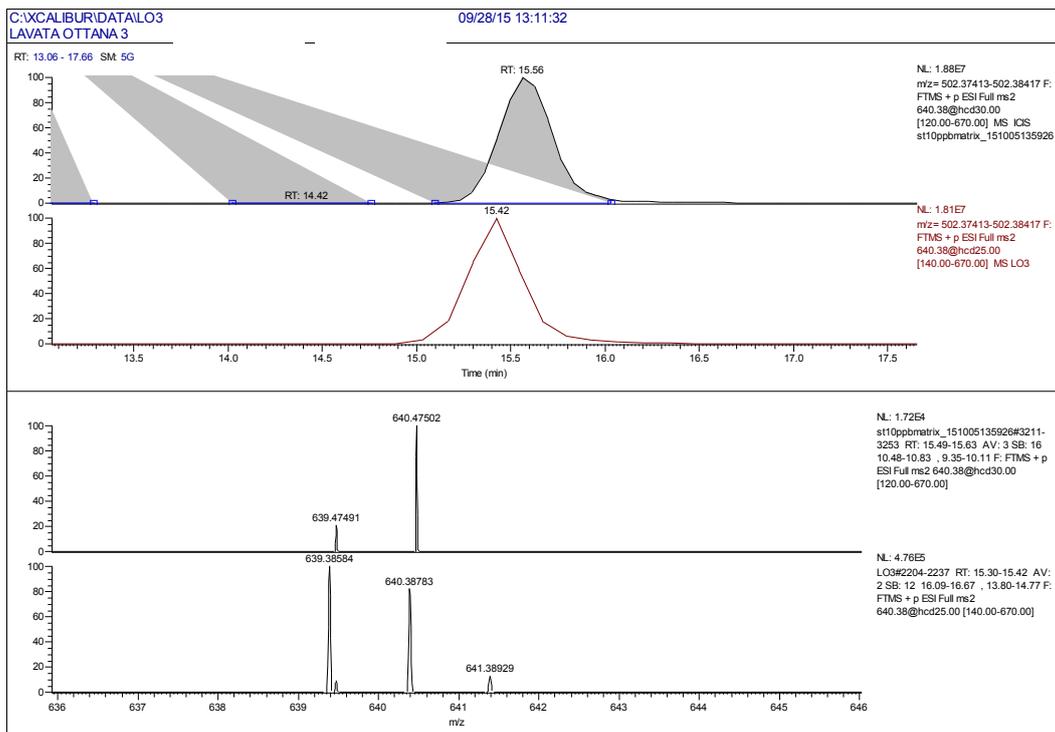


Figura18. Esempio di alta specificità ottenuto con LC-HRMS Orbitrap

### 9.2.3 Determinazione della Linearità.

La linearità di un metodo analitico è la capacità dello stesso di produrre risultati che siano direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita in un range determinato.

Essa viene determinata calcolando il coefficiente di correlazione  $R^2$  in una regressione lineare dei risultati ottenuti dall'analisi dei campioni contenenti differenti concentrazioni di analita sia lo scarto tipo dei residui della retta.

Per verificare tale caratteristica prestazionale, sei differenti concentrazioni di ogni avermectina (2, 6, 10, 30, 50, 200  $\mu\text{g/Kg}$ ) sono state preparate diluendo le soluzioni madre di ogni analita (preparate in Metanolo dagli standard analitici acquistati,) sia in matrice (campioni di lana estratta e purificata non contenenti residui), sia in fase mobile (**Fase mobile A:** Ammonio Formiato in Metanolo- Acetonitrile 70:30 (1 mM); **Fase mobile B:** Ammonio Formiato in acqua (1 mM)).

Queste soluzioni sono state lette all'LC-HRMS e sono state costruite le dodici curve di calibrazione. Nella tabella seguente sono riportati i Coefficienti di Correlazione ( $R^2$ ) delle curve di calibrazione ottenuti per ogni avermectina [116].

Composto	Coefficienti di correlazione $R^2$
Emamectina	$R^2 = 0.9966$
Abamectina	$R^2 = 0.9992$
Ivermectina	$R^2 = 0.9916$
Doramectina	$R^2 = 0.9965$
Moxidectina	$R^2 = 0.9913$
Eprinomectina	$R^2 = 0.9998$

Tabella 22. Coefficienti di correlazione delle curve di calibrazione per ogni avermectina

I criteri di accettabilità esistono quando  $R^2 > 0.990$ . Come si può osservare dai valori di  $R^2$  ottenuti, esiste una correlazione lineare positiva tra le due variabili quantitative, dal momento che tali valori tendono ad uno.

#### **9.2.4 Determinazione del Limite di Rivelazione (LOD) e del Limite di Quantificazione (LOQ).**

Il limite di rivelabilità (LOD) è la minima concentrazione misurata da cui si possa dedurre con ragionevole certezza statistica la presenza dell'analita tenendo conto dell'intera procedura analitica.

Il Limite di quantificazione (LOQ) è il più basso tenore di analita misurabile con ragionevole certezza statistica. Qualora sia l'accuratezza che la precisione siano costanti in un campo di concentrazione intorno al limite di rivelazione, l'LOQ sarà numericamente uguale a dieci volte la deviazione standard del valore medio della soluzione standard dell'analita più prossima al bianco, sottratto del bianco stesso.

Per la determinazione dei parametri LOD, LOQ, accuratezza e precisione, trenta campioni di Lana da fonti separate (pecore), sono stati analizzati in LC-Orbitrap MS per confermare la presenza o assenza di residui di avermectine.

Sei campioni negativi sono stati selezionati e ognuno di essi è stato aliquotato e arricchito con una soluzione Standard mix di Avermectine a tre diverse concentrazioni ( 2, 20,100 µg/Kg). Il valore di aggiunta più basso (2 µg/Kg) e' stato selezionato in quanto circa tre volte il valore di LOD stimato strumentalmente in precedenza, mentre le altre concentrazioni dovrebbero essere rappresentative dell'intervallo di quantificazione atteso (LOQ).

La fortificazione con standards commerciali di avermectine ( arricchimento della matrice necessario poiché non è presente in commercio una matrice lana certificate per tale analisi) è stata ripetuta nei giorni seguenti processando il set di sei campioni ogni giorno, con le tre diverse aggiunte (in modo tale che ciascun campione è rappresentato almeno una volta per ogni concentrazione). La quantificazione dei campioni preparati con questo schema sperimentale è stata effettuata contro le curve standard di calibrazione precedentemente preparate per il controllo della linearità

<b>Composto</b>	<b>LLOD</b>	<b>LLOQ</b>
<b>Emamectina</b>	1.6 µg/Kg	1.8 µg/Kg
<b>Abamectina</b>	5.2 µg/Kg	15.6 µg/Kg
<b>Ivermectina</b>	6.7 µg/Kg	20.1 µg/Kg
<b>Doramectina</b>	8.4 µg/Kg	25.2 µg/Kg
<b>Moxidectina</b>	13.1 µg/Kg	39.3 µg/Kg
<b>Eprinomectina</b>	7.5 µg/Kg	22.5 µg/Kg

Tabella 23. LLOD e LLOQ delle avermectine

### 9.2.5 Determinazione di Precisione e Accuratezza

Con lo stesso schema operativo adottato per il calcolo dell'LOD e LOQ, sono stati calcolate la precisione e l'accuratezza.[113],[114],[115].

La precisione è la misura di accordo fra misure ripetute della stessa proprietà nelle identiche circostanze o in circostanze sostanzialmente simili. Viene divisa in precisione in “Intraday”, ovvero le analisi dei campioni a vari livelli di fortificazione che vengono compiute nello stesso giorno e statisticamente elaborate e quella in “interday” che si sviluppa in giorni diversi secondo lo schema sperimentale scelto.

La Precisione Interday e Intraday si determinata calcolando la CV % per ogni campione ad una concentrazione valutata. La precisione e l'accuratezza sono stati determinati confrontando i risultati ottenuti per i livelli di fortificazione contro le curve di calibrazione sia in matrice che in fase mobile.

I valori ottenuti sono riportati di seguito.

Precisione (CV% interday)= per tutte le molecole <20%

Precisione (CV% intraday)= per tutte le molecole <15%.

L'accuratezza è una misura complessiva della precisione (errori statistici) e del bias (errori sistematici) durante l'esecuzione del metodo. Questa misura si esprime come % di recupero.

I valori ottenuti sono riportati si seguito:

Accuratezza (%) = Range 70-110%

### 9.2.6 Effetto Matrice

E' anche stato investigato il possibile effetto della matrice sulla determinazione LC-HRMS delle avermectine. La Lana, è infatti una matrice complessa per la presenza in particolare modo di grassi e proteine [116],[117]. L'effetto matrice è stato calcolato confrontando la risposta strumentale delle soluzioni standard mix diluita in matrice, contro la risposta degli stessi standard in fase mobile per LC-HRMS (% recovery = peak area slope of Avermectins standard curve/peak area slope of solvent system standard curve).

L'effetto matrice sembra influire sulla determinazione di alcune molecole come ad esempio l'Abamectina ed Ivermectina per cui tutte le curve di calibrazione sono state preparate con diluizione in matrice per minimizzare tale effetto ( figura 19).

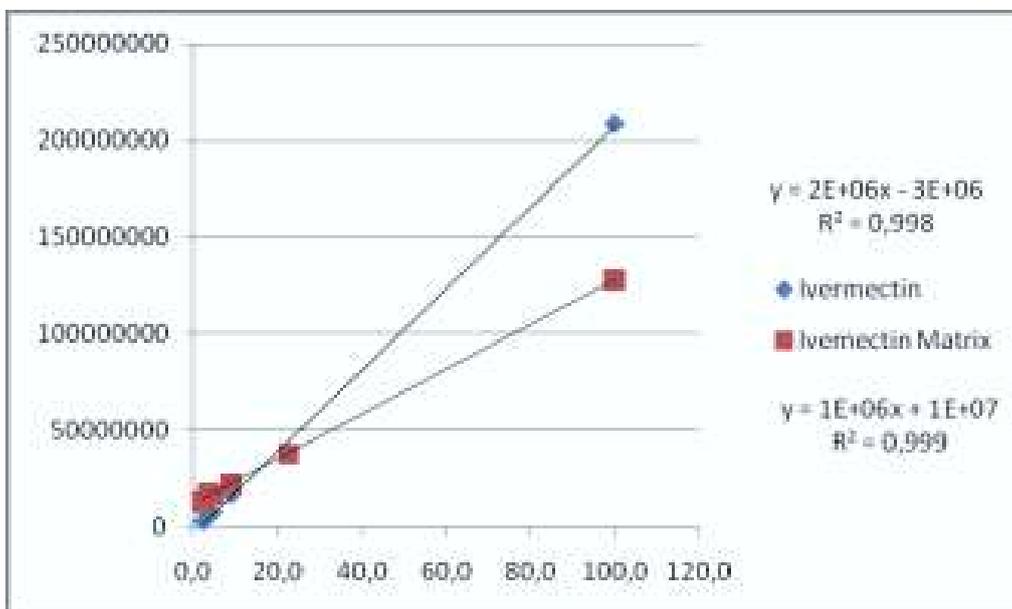
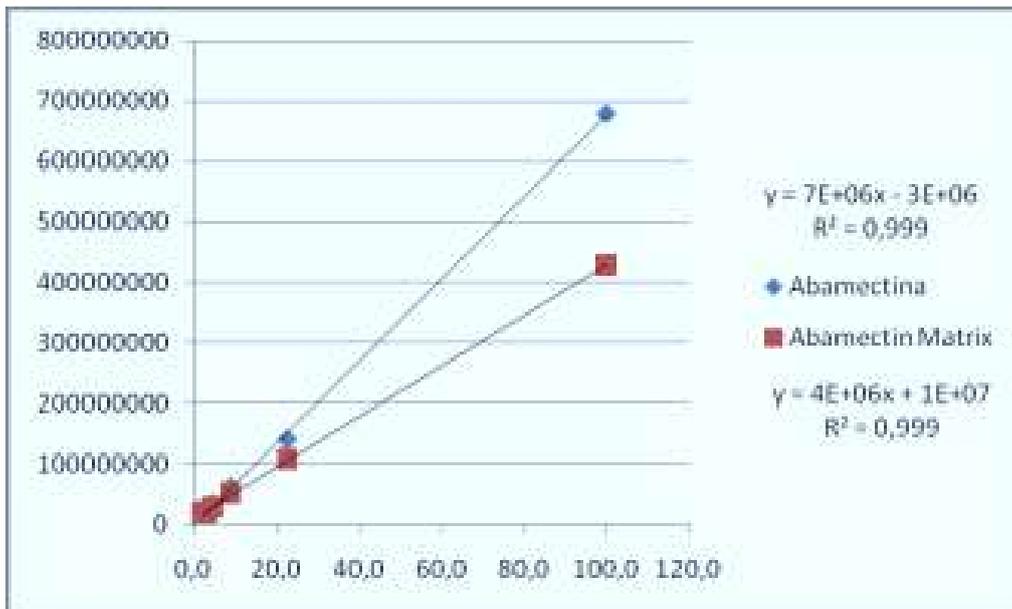


Figura 19. Esempi di effetto matrice per Abamectina ed Ivermectina.

### 9.2.7 Stabilità.

La stabilità è stata valutata per due diverse concentrazioni ( 20,200 µg/Kg) sia per i campioni che per le soluzioni standard in condizioni di refrigerazione (-20°C) e riscaldamento a temperatura ambiente (22°C). I campioni sono stabili per tre mesi a -20°C, mentre gli standard in solvente organico oltre i 6 mesi. Sia le soluzioni standard che i campioni estratti a temperatura ambiente hanno una stabilità massima di 24 ore, poi si ha un decremento delle concentrazioni rilevate.

### 9.2.8 Robustezza

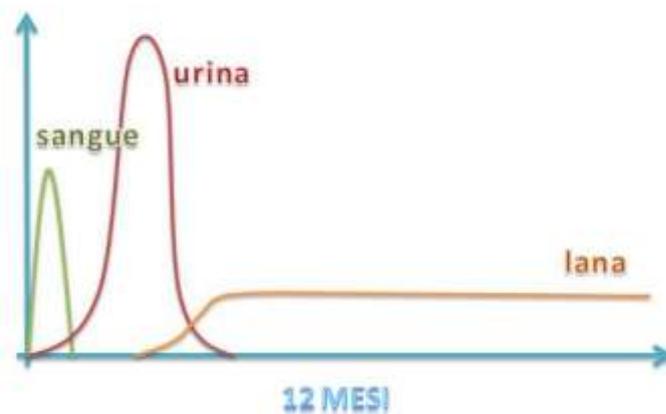
La robustezza, è la proprietà del metodo analitico di non lasciarsi influenzare da variazioni, piccole e deliberate, nei parametri operativi. La valutazione della robustezza avvenuta attraverso deliberate variazioni del metodo che possono effettivamente avvenire ( anche se con scarsa probabilità) durante l'esecuzione routiniana del metodo di prova. Se i risultati risultassero suscettibili a variazioni delle condizioni analitiche, queste dovranno essere controllate in modo idoneo, oppure deve essere inclusa una dichiarazione precauzionale nella procedura. Le variazioni da noi studiate hanno riguardato quei fattori che, dall'esame dei singoli stadi della procedura analitica, sono ritenuti più significativi quali le temperature di termostatazione della colonna cromatografica, dell'ambiente ed il cambio dell'operatore. La verifica è avvenuta per almeno 2 livelli diversi dei parametri critici individuati. Il metodo e' risultato robusto dal momento che i risultati ottenuti con i parametri variati sono congruenti con i parametri ottenuti dalle prove di validazione. Tutti i valori ottenuti nello studio della validazione del metodo analitico per le Avermectine messo a punto dal nostro laboratorio rientrano perfettamente nelle linee guida 2002/657/CE

### 9.3 Determinazione delle Avermectine in campioni di lana sarda.

L'industria, il mondo accademico e i governi sono stati incoraggiati a condurre studi in partnership per verificare che si stiano offrendo livelli adeguati di tutela ambientale. Alcune aziende farmaceutiche dell'Unione europea hanno utilizzato i piani di gestione del rischio ambientale come risorsa per la valutazione e la gestione dei rischi ambientali di un farmaco durante tutto il suo ciclo di vita. I piani includono informazioni di chimica-fisica, sul metabolismo umano, la farmacocinetica, la tossicologia preclinica e l'impatto ambientale del *principio attivo* e degli eccipienti del farmaco [118]

La valutazione di rischio ambientale viene condotta con un approccio a stadi, che prende il via con un iniziale screening, volto a identificare l'esposizione ambientale dei farmaci e dei metalli sulla base del loro potenziale di bioaccumulo e persistenza nell'ambiente [119]

I vantaggi della lana sulle matrici tradizionali, come l'urina e il sangue, sono evidenti: la raccolta non è invasiva, relativamente facile da eseguire e ci permette di investigare retrospettivamente la storia dell'esposizione dell'animale a sostanze potenzialmente tossiche come mostrato nello schema sottostante (figura 20) [120]



Finestra di sorveglianza

Figura 20. Finestra di sorveglianza

Componente primario della lana è la cheratina (65-95% in peso del totale) Il pH della cheratina è acido, quindi rispetto al sangue il capello accumula sostanze basiche nella fibra che cresce con velocità media di 1.0 cm/mese

La matrice cheratinica inoltre è più soggetta di altre a contaminazione ambientale e a deviazioni fisiologiche e non-fisiologiche quali partecipazione di sudore e sebo all'incorporazione della sostanza tossica, legame con la melanina, razza e colore della fibra.

I meccanismi di incorporazione di xeno biotici nella lana sono : il trasporto attraverso membrana, la grandezza e forma della molecola, il legame con le proteine plasmatiche , la polarità (carattere lipofilo o idrofilo) il pKa (carattere acido-basico) [121]

Durante le fasi di lavaggio e preparazione del campione è stato necessario

- eliminare le sostanze depositate nella parte esterna senza estrarre quelle incorporate all'interno (effetto della scelta del/dei solventi e del tempo di contatto),

- Triturare con forbici (1-3 mm.) o polverizzare con mulino a sfere

Con lo scopo di estrarre in maniera selettiva e quantitativa gli analiti di interesse dall'interno della matrice senza modificare chimicamente gli analiti stessi

In generale le fibre di lana sucida contengono un livello elevato di componenti naturali di tipo vegetale è stato essenziale includere ulteriori passi di clean-up per ridurre al minimo le interferenze analitiche cromatografiche e soppressione ionica.

Nel caso della fibra di lana i residui di antiparassitari vengono invece a concentrarsi nei grassi naturali della fibra stessa (lanolina). I dati invece sull'impatto ambientale dell'Ivermectina e della famiglia delle Avermectine non sono tantissimi [122],[123],[124],[125]. Le Avermectine, si trovano nell'ambiente naturale in concentrazioni molto basse, tuttavia, essendo il loro utilizzo nel settore agricolo in crescente aumento è notevolmente aumentata la loro presenza nell'ambiente. Queste molecole infatti dopo somministrazione agli animali e gli esseri umani sono escrete con le feci [126]. Studi sul metabolismo del bestiame di allevamento hanno dimostrato che le Avermectine non metabolizzate sono circa il 50% del prodotto somministrato e si trovano come residuo nelle feci durante i primi 7 giorni successivi alla dose. Gli ovini allevati al pascolo possono quindi essere non solo fonte di inquinamento da farmaci per l'ambiente ma venendo a contatto con il terreno e con le feci possono diventare *carrier* e attraverso l'utilizzo della lana come materia prima trasferire queste sostanze direttamente all'uomo [127].

Il metodo LC-HRMS proposto nel presente lavoro di tesi, precedentemente descritto, validato per la determinazione delle Avermectine nei campioni di lana, come mostrato dalle tabelle (tabella 24, tabella 25 e tabella 26), non ha evidenziato concentrazioni di Avermectine superiori al Limite di Rivelazione del metodo. Questo risultato non era atteso proprio a causa del massiccio utilizzo di questo farmaco negli allevamenti sardi e in Europa come mostrato dalla letteratura[128],[129]. Il fenomeno può essere spiegato proprio dalle caratteristiche chimico fisico di queste molecole. Tra le loro proprietà vediamo che esse hanno una costante di legame carbonio organico (K) elevata e questo si traduce in un forte

affinità al particolato nelle feci e nel suolo, come abbiamo illustrato precedentemente. Hanno una bassa tensione di vapore, quindi non vaporizzano nell'atmosfera in misura significativa, una solubilità in acqua di circa 4 mg / litro (poco solubile) e alta affinità per sistemi lipidici. La biodegradazione di ivermectina nel terreno varia considerevolmente e sembra essere particolarmente dipendenti dalla temperatura. Ad esempio, la perdita di residui di Ivermectina da un terreno argilloso varia da 1 a 2 settimane a temperature estive e fino a 52 settimane a temperature invernali. E' quindi probabile che le molecole anche nel terreno e nella lana possano degradare in metaboliti e composti più polari. Sono inoltre molto sensibili alla fotodegradazione con un valore stimato un'emivita di 12 ore e 39 ore in presenza di alti tassi di umidità [130].

NURRA			
Campione	LOD	Campione	LOD
S1	<LOD	LS1	<LOD
S2	<LOD	LS2	<LOD
S3	<LOD	LS3	<LOD
S4	<LOD	LS4	<LOD
S5	<LOD	LS5	<LOD
S6	<LOD	LS6	<LOD
S7	<LOD	LS7	<LOD
S8	<LOD	LS8	<LOD
S9	<LOD	LS9	<LOD
S10	<LOD	LS10	<LOD
S11	<LOD	LS11	<LOD
S12	<LOD	LS12	<LOD
S13	<LOD	LS13	<LOD
S14	<LOD	LS14	<LOD
S15	<LOD	LS15	<LOD
S16	<LOD	LS16	<LOD
S17	<LOD	LS17	<LOD
S18	<LOD	LS18	<LOD
S19	<LOD	LS19	<LOD
S20	<LOD	LS20	<LOD

Tabella 24. Risultati relativi alla determinazione delle Avermectine nei campioni di lana prelevati nella Regione della Nurra

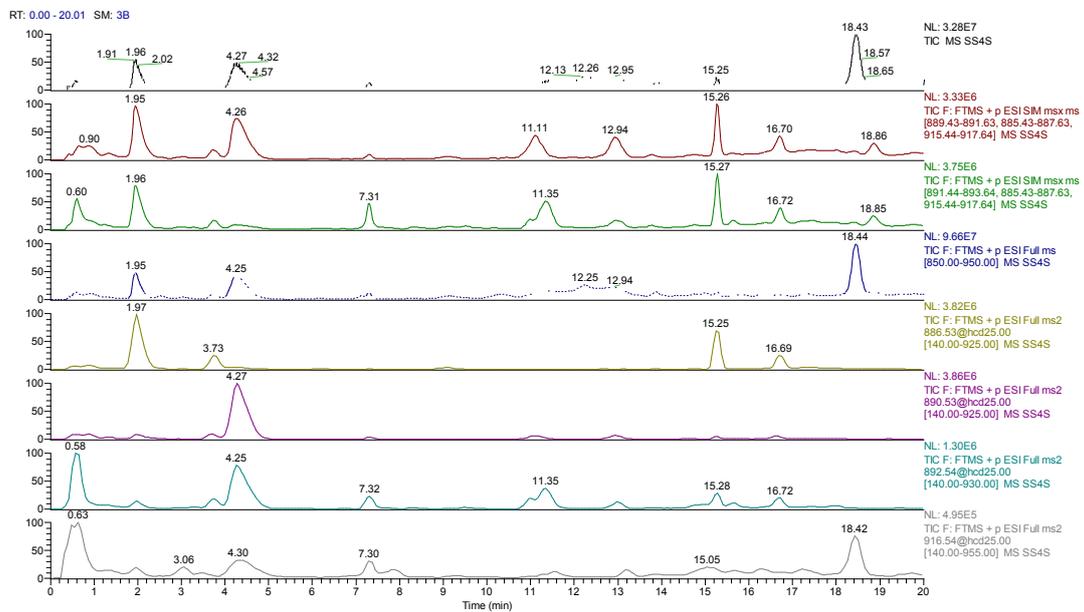


Figura 21.

GOCEANO			
Campione	LOD	Campione	LOD
N1	<LOD	LN1	<LOD
N2	<LOD	LN2	<LOD
N3	<LOD	LN3	<LOD
N4	<LOD	LN4	<LOD
N5	<LOD	LN5	<LOD
N6	<LOD	LN6	<LOD
N7	<LOD	LN7	<LOD
N8	<LOD	LN8	<LOD
N9	<LOD	LN9	<LOD
N10	<LOD	LN10	<LOD
N11	<LOD	LN11	<LOD
N12	<LOD	LN12	<LOD
N13	<LOD	LN13	<LOD
N14	<LOD	LN14	<LOD
N15	<LOD	LN15	<LOD
N16	<LOD	LN16	<LOD
N17	<LOD	LN17	<LOD
N18	<LOD	LN18	<LOD
N19	<LOD	LN19	<LOD
N20	<LOD	LN20	<LOD

Tabella 25. Risultati relativi alla determinazione delle Avermectine nei Campioni di lana prelevati nella Regione del Goceano

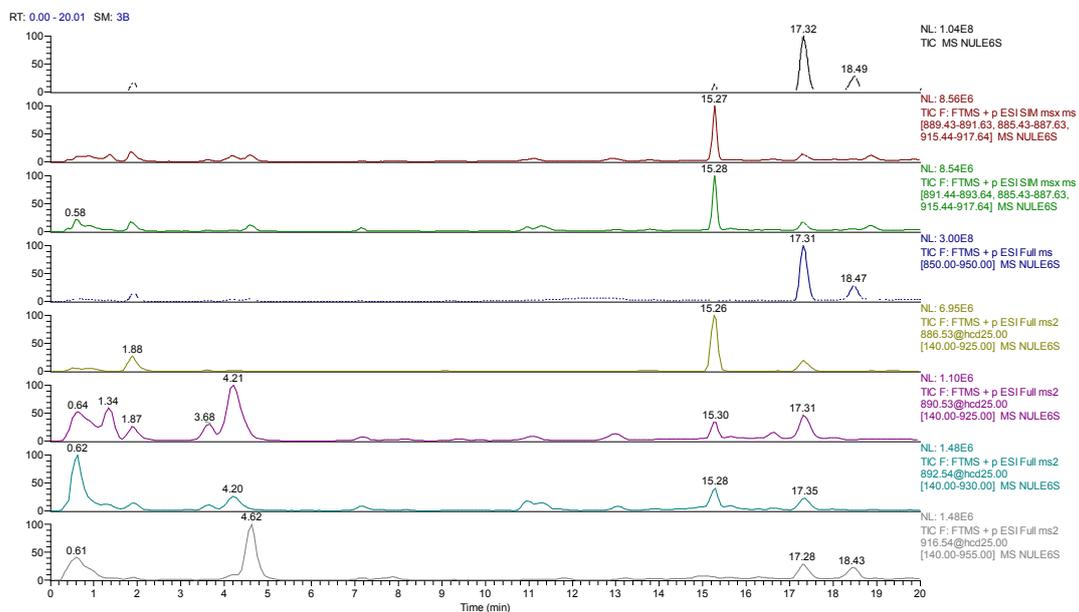


Figura 22.

BARBAGIA			
Campione	LOD	Campione	LOD
O1	<LOD	LO1	<LOD
O2	<LOD	LO2	<LOD
O3	<LOD	LO3	<LOD
O4	<LOD	LO4	<LOD
O5	<LOD	LO5	<LOD
O6	<LOD	LO6	<LOD
O7	<LOD	LO7	<LOD
O8	<LOD	LO8	<LOD
O9	<LOD	LO9	<LOD
O10	<LOD	LO10	<LOD
O11	<LOD	LO11	<LOD
O12	<LOD	LO12	<LOD
O13	<LOD	LO13	<LOD
O14	<LOD	LO14	<LOD
O15	<LOD	LO15	<LOD
O16	<LOD	LO16	<LOD
O17	<LOD	LO17	<LOD
O18	<LOD	LO18	<LOD
O19	<LOD	LO19	<LOD
O20	<LOD	LO20	<LOD

Tabella 26. Risultati relativi alla determinazione delle Avermectine nei Campioni di lana prelevati nella regione della Barbagia

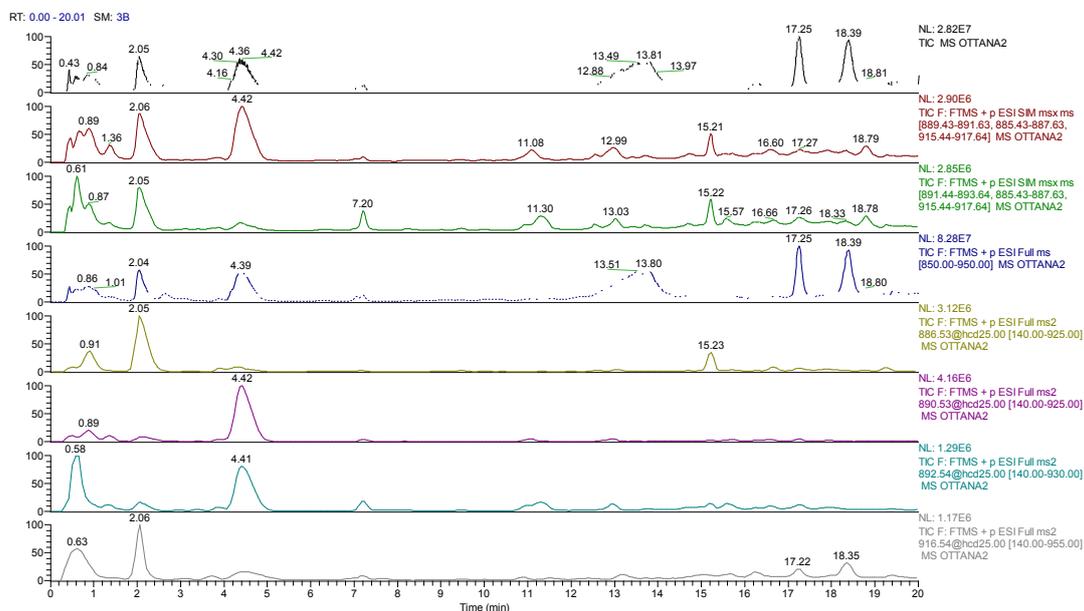


Figura 23.

## 9.4 Determinazione degli elementi nella lana

Durante i processi di combustione naturale (spesso presenti in Sardegna a causa dei numerosi incendi) o da processi di produzione industriale, gli elementi presenti nei combustibili o nelle materie prime possono essere rilasciati nell'ambiente o come composti volatili o associati alle ceneri [131]. La ricaduta dei metalli presenti in queste materie è quindi un aspetto importante da indagare specialmente nelle aree in prossimità di centrali termoelettriche o di agglomerati industriali [132]. In generale è difficile ottenere una stima esatta del grado di inquinamento a causa della sua variabilità nel tempo e nello spazio in relazione a molti fattori quali il tipo di sorgente inquinante direzione e velocità del vento precipitazioni etc. [133, 134]. I classici monitoraggi ambientali con stazioni fisse hanno alti costi perché necessitano di numerosi punti di rilevamento e lunghi periodi di tempo. L'utilizzo sempre più frequente di organismi viventi animali e vegetali come bioindicatori e bioaccumulatori della qualità dell'ambiente consentono tutta una serie di nuove ricerche.

Il mineralogramma (valutazione effettuata su un semplice campione di lana) consente di monitorare la carenza e l'eccesso dei più importanti oligoelementi e permette di valutare accumuli cronici di metalli tossici anche di minima entità. Il dosaggio dei minerali nella fibra di lana, a differenza di quello sul sangue e sulle urine, è poco soggetto a fluttuazioni e permette di stimare l'esposizione ai metalli tossici negli ultimi 3-4 mesi.

I metalli pesanti nei prodotti tessili e quindi nella lana e nei loro cicli produttivi, a causa della loro tossicità generalizzata e del pesante impatto ambientale, vengono monitorati con sempre maggiore attenzione, sia delle legislazioni che dai marchi di qualità ecologici [135],[136], [137].

La presenza dei metalli pesanti nei prodotti tessili viene generalmente affrontato con due diverse ottiche:

- valutazione della tendenza del prodotto tessile a cedere durante l'uso metalli pesanti ed in particolare modo il Nichel altamente allergenico;
- determinazione della presenza assoluta nelle fibre di metalli pesanti particolarmente

tossici, come ad esempio il cadmio (Cd); [138],[139],[140]

Lo scopo di questo studio era di sviluppare, per la prima volta, un metodo per l'analisi elementare di fibre di lana sarda con ICP-MS per studi ambientali.

I vantaggi di utilizzare la soluzione ICP-MS per analisi elementare includono la capacità di rivelazione multi-elemento, l'informazione isotopica, un'elevata produttività, un elevato range dinamico e limiti di rilevabilità bassi.

I campioni di lana sono stati digeriti con un metodo di estrazione assistito dal microonde prima di effettuare l'analisi ICP-MS.

I vantaggi di questo metodo di estrazione per questa matrice include una digestione più veloce, una ridotta contaminazione e una diminuzione sostanziale di uso di reagenti e di campione.

Le tabelle (Tabelle 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35) sottostanti mostrano i risultati ottenuti.

Campione	Berillio (ppb)	Boro (ppb)	Vanadio (ppb)	Cromo (ppb)	Manganese (ppb)	Ferro (ppb)	Cobalto (ppb)
Lana N1	< 10	6193	< 10	155	11910	37110	113
Lana N2	< 10	8655	< 10	229	11040	51560	149
Lana N3	< 10	6114	< 10	215	6676	34140	75
Lana N4	< 10	6195	< 10	436	6999	56110	189
Lana N5	< 10	7341	< 10	2504	10400	36520	5053
Lana N6	< 10	6601	< 10	162	5371	31630	257
Lana N7	< 10	7447	< 10	197	8059	28030	266
Lana N8	< 10	8786	< 10	1018	14520	42980	2716
Lana N9		5698	< 10	2610	10260	48880	1264
Lana N10	< 10	6991	< 10	1727	12310	72970	8307

Tabella27

Lana O1	< 10	7239	34	4879	16076	877424	1497
Lana O2	< 10	3962	< 10	559	5263	43102	50
Lana O3	< 10	6004	< 10	350	3262	56830	290
Lana O4	< 10	6088	< 10	248	6546	41880	163
Lana O5	< 10	8540	< 10	207	6614	34820	47
Lana O6	< 10	5171	< 10	449	3573	27760	1015
Lana O7	< 10	5298	< 10	88	5042	27070	151
Lana O8	< 10	5299	< 10	582	2279	25550	126
Lana O9	< 10	5731	< 10	21	3482	25630	129
Lana O10	< 10	5561	< 10	< 10	1220	32850	79

Tabella28

Lana S1	< 10	7266	< 10	255	7378	38030	47
Lana S2	< 10	6348	< 10	< 10	11640	43160	96
Lana S3	< 10	5527	< 10	< 10	4808	21960	21
Lana S4	< 10	8858	< 10	13	12600	63650	116
Lana S5	< 10	4115	< 10	974	7421	32200	1652
Lana S6	< 10	6572	< 10	< 10	9395	214700	126
Lana S7	< 10	6057	< 10	486	10110	56240	1530
Lana S8	< 10	6113	< 10	330	14020	166200	731
Lana S9	< 10	5385	< 10	652	10370	57130	583
Lana S10	< 10	6766	< 10	1595	7844	59740	2821

Tabella 29

Campione	Rame (ppb)	Zinco (ppb)	Arsenico (ppb)	Selenio (ppb)	Stronzio (ppb)	Molibdeno (ppb)	Cadmio (ppb)	Stagno (ppb)
Lana N1	4996	93960	< 10	264	6405	16	18	< 10
Lana N2	8439	88810	< 10	284	7740	27	14	< 10
Lana N3	4678	104600	< 10	215	3796	13	< 10	< 10
Lana N4	5256	117300	< 10	397	3291	34	10	< 10
Lana N5	4309	102300	< 10	174	6838	16	< 10	< 10
Lana N6	4206	111700	< 10	186	3325	15	< 10	< 10
Lana N7	5373	113100	< 10	190	4121	15	< 10	< 10
Lana N8	5761	80920	< 10	299	8351	23	32	< 10
Lana N9	14120	109700		601	6137	46	215	< 10
Lana N10	8462	108500	< 10	357	8411	22	22	< 10

Tabella30

Lana O1	8378	137438	41	339	13857	102	20	< 10
Lana O2	7332	118706	< 10	243	7186	30	< 10	< 10
Lana O3	9319	106100	< 10	200	4019	49	< 10	< 10
Lana O4	7243	167800	< 10	251	9214	32	21	< 10
Lana O5	7276	101600	< 10	269	9822	39	18	< 10
Lana O6	5598	101500	< 10	219	6426	16	< 10	< 10
Lana O7	5914	112500	< 10	268	8155	22	< 10	< 10
Lana O8	5497	104200	< 10	244	6465	18	< 10	< 10
Lana O9	5880	115800	< 10	174	5313	18	< 10	< 10
Lana O10	5576	110900	< 10	187	3038	20	< 10	< 10

Tabella31

Lana S1	5798	101100	< 10	104	5091	20	< 10	< 10
Lana S2	5419	102300	< 10	134	8335	23	19	< 10
Lana S3	5731	106000	< 10	124	3535	19	< 10	< 10
Lana S4	9781	86330	< 10	140	9876	40	24	< 10
Lana S5	4935	104300	< 10	105	5623	23	< 10	< 10
Lana S6	5617	106600	< 10	131	5515	26	< 10	< 10
Lana S7	6863	107100	< 10	95	6797	21	< 10	< 10
Lana S8	5986	111200	< 10	127	7747	28	13	< 10
Lana S9	5109	100200	< 10	108	7299	25	22	< 10
Lana S10	4872	109100	< 10	121	5998	21	< 10	< 10

Tabella 32

Campione	Antimonio (ppb)	Bario (ppb)	Mercurio (ppb)	Tallio (ppb)	Piombo (ppb)	Torio (ppb)	Uranio (ppb)
Lana N1	10	1604	36	< 10	122	15	10
Lana N2	16	1638	34	< 10	141	20	11
Lana N3	< 10	930	29	< 10	55	12	< 10
Lana N4	21	1133	22	< 10	215	27	12
Lana N5	18	1591	19	< 10	108	14	< 10
Lana N6	10	750	17	< 10	51	11	< 10
Lana N7	19	941	15	< 10	74	10	< 10
Lana N8	29	1892	17	< 10	213	17	17
Lana N9	54	1451	20		427	28	318
Lana N10	21	1841	17	< 10	196	16	12

Tabella33

Lana O1	47	6773	10	< 10	1463	37	13
Lana O2	18	2182	10	< 10	650	12	< 10
Lana O3	24	1290	6	< 10	254	10	< 10
Lana O4	30	2472	7	< 10	2701	10	10
Lana O5	19	2886	9	< 10	307	10	< 10
Lana O6	12	1831	7	< 10	85	< 10	< 10
Lana O7	22	2601	7	< 10	269	18	< 10
Lana O8	13	1900	7	< 10	157	< 10	< 10
Lana O9	< 10	1317	8	< 10	83	< 10	< 10
Lana O10	11	714	< 5	< 10	83	< 10	< 10

Tabella34

Lana S1	24	1936	5	< 10	125	15	< 10
Lana S2	14	1987	< 5	< 10	166	14	10
Lana S3	< 10	1045	< 5	< 10	65	< 10	< 10
Lana S4	22	2667	< 5	< 10	189	21	11
Lana S5	27	1950	< 5	< 10	108	12	14
Lana S6	111	1581	< 5	< 10	130	18	< 10
Lana S7	13	1829	< 5	< 10	148	69	10
Lana S8	16	2722	< 5	< 10	234	38	12
Lana S9	14	1897	< 5	< 10	180	18	< 10
Lana S10	< 10	1716	< 5	< 10	127	15	< 10

Tabella 35

## 9.5 Analisi statistica multivariata

Nel 1974, nacque ad opera di Wold e Kowalski, la chemiometria, ovvero un settore scientifico volto a comprendere tutte quelle tecniche matematiche rivolte a trattare, elaborare e modellare sistemi di dati chimici. La chemiometria oggi raccoglie al suo interno i metodi di modellamento di classificazione e di regressione, l'analisi di similarità, l'analisi delle componenti principali e i diversi metodi ad essa collegati, i sistemi esperti e i metodi di intelligenza artificiale, le strategie basate sulle reti neurali, i metodi di disegno sperimentale e di ottimizzazione. Tuttavia, pur nella sua ormai consolidata autonomia culturale, non si deve dimenticare che numerose metodologie chemiometriche si richiamano anche alla statistica applicata: anzi, possiamo dire che la chemiometria sia uno dei campi che consente maggiormente di effettuare test, verifiche e modifiche pratiche di molte tecniche proposte dagli statistici [141]

Fino a poco tempo fa, infatti, le indagini chimico-fisiche riguardavano essenzialmente una sola determinazione analitica o la misura di poche variabili che si determinavano una alla volta. Oggi, l'uso delle moderne strumentazioni analitiche, come ad esempio i vari tipi di tecniche cromatografiche e spettroscopiche, consente l'acquisizione in tempi brevi di un gran numero di determinazioni (informazioni) su un unico campione [141]. Un sistema complesso, quale è un sistema ambientale, per essere studiato richiede l'acquisizione e l'indagine di molti campioni, ed ognuno di essi, a sua volta, può essere descritto da molte informazioni (variabili). Di conseguenza, l'elaborazione e l'interpretazione dei dati da univariata è necessariamente diventata multivariata per poter utilizzare contemporaneamente tutte le informazioni disponibili.

Lo scopo finale è quello di contribuire in maniera determinante a risolvere i problemi ad alta complessità, semplicemente semplificandoli, estraendo l'informazione rilevante ai fini della comprensione dei problemi, e scartando la parte di informazione ridondante e rumorosa. [142].

Nel nostro lavoro di dottorato l'analisi statistica multivariata è stata effettuata utilizzando la tecnica OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures).[143][144]. Le funzioni discriminanti sono stati ricavate utilizzando il metodo progressivo. In questo caso, l'analisi è stata effettuata su tutti i campioni disponibili per scoprire se questo metodo è più efficiente della PCA per discriminare la zona di origine dei campioni.

Il numero massimo risultante di funzioni discriminanti ottenibile dopo aver eseguito l'analisi canonica, è o uguale al numero di variabili o al numero di gruppi meno uno, a seconda di quale numero è più piccolo. Nella figura 36 si mostra lo Score dell' OPLS-DA delle 3 classi in base al modello di discriminazione (figura 36 ).

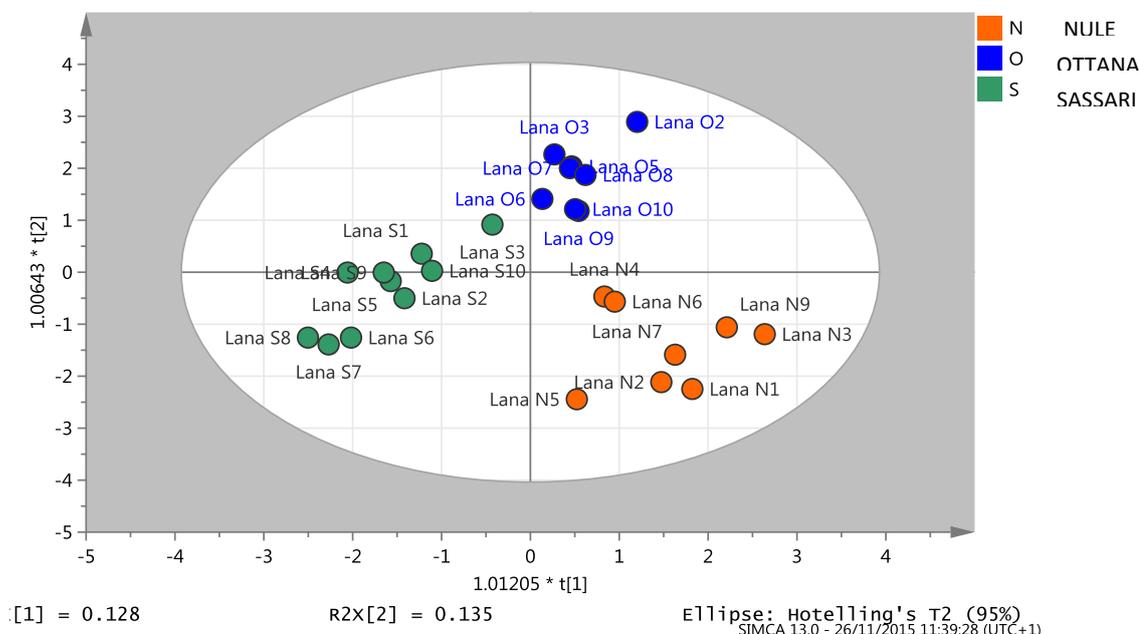


Figura 36. Score plot del modello statistico OPLS-DA

Lo score plot rappresenta il risultato visivo primo della statistica, dove si vede che i campioni si raggruppano nel piano delle componenti, rendendo valido il modello statistico applicato ai risultati ottenuti.

Questo metodo è stato usato perché semplifica il modello interpretativo escludendo la variazione dei dati di ingresso non correlati ai dati di risposta. I modelli OPLS-DA sono

stati valutati utilizzando il parametro di fitting ( $R^2Y$ ) e il parametro di capacità predittiva ( $Q^2Y$ ), che è stato calcolato dal cross fitting del parametro  $R^2Y$ .  $R^2Y$ , rappresenta la proporzione di varianza spiegata da un dato componente nel modello, mentre  $Q^2Y$  è definito come la percentuale della varianza nei dati prevedibili dal modello PLS-DA sotto cross convalidation. [145]

Come test aggiuntivo della validità del modello, sono stati effettuati dei test di permutazione (test in cui viene scambiato il parametro di classificazione di tre campioni per volta per 300 volte) per valutare se la classificazione specifica di due classi in un modello fosse significativamente migliore rispetto a qualsiasi altra classificazione casuale in due gruppi arbitrari (Fig 37. Plot con il fitting di 300 modelli di permutazione). Se il valore di  $Q^2$  ed  $R^2$  del nostro modello è il più alto ottenibile e se la linea tratteggiata incrocia l'asse delle y intorno a 0,4 per  $r^2$  e diventa negativa per  $q^2$  il nostro modello è stabile statisticamente.

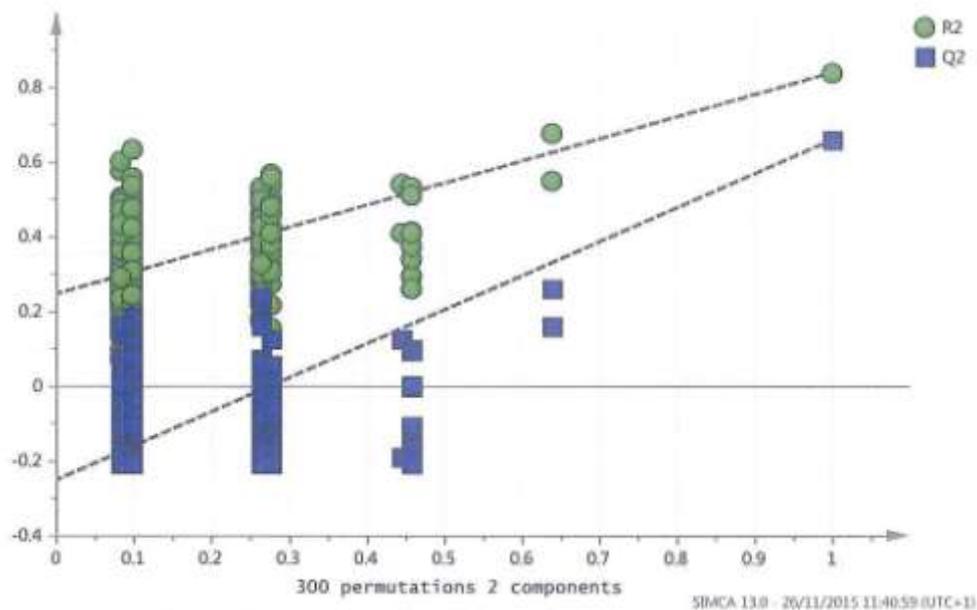


Figura 37. Test di permutazione. Plot con il fitting di 300 modelli di permutazione

Nella figura 38 vengono mostrati i risultati relativi alla Matrice di confusione, che consiste nel sottrarre un campione in modalità random dall'insieme dei dati per poi verificare se il

campione ricade nella categoria di provenienza. Dai risultati ottenuti si può evincere che i campioni analizzati con il metodo leave-in-leave-out, classificano correttamente il 96.15% dei campioni. La Matrice di confusione ottenuta permette di affermare ancora una volta che il modello statistico è performante.

	Members	Correct	N	O	S	No class (YPred < 0)
N	10	100%	10	0	0	0
O	8	100%	0	8	0	0
S	8	87.5%	0	1	7	0
No class	0		0	0	0	0
Total	26	96.15%	10	9	7	0
Fishers prob.	2.6e-010					

Figura 38. Matrice di confusione.

In figura 39 viene mostrato il loading plot dove si può osservare che rispetto al baricentro dei gruppi (pallini blu), il mercurio ha importanza maggiore nella classificazione del gruppo Nule, mentre non si ricavano analoghe informazioni per i gruppi Sassari e Ottana. Il riferimento (zero) in un modello a 3 classi è la media di 3 classi; questa ipotesi comporta difficoltà in una chiara interpretazione delle differenze tra le classi stesse.

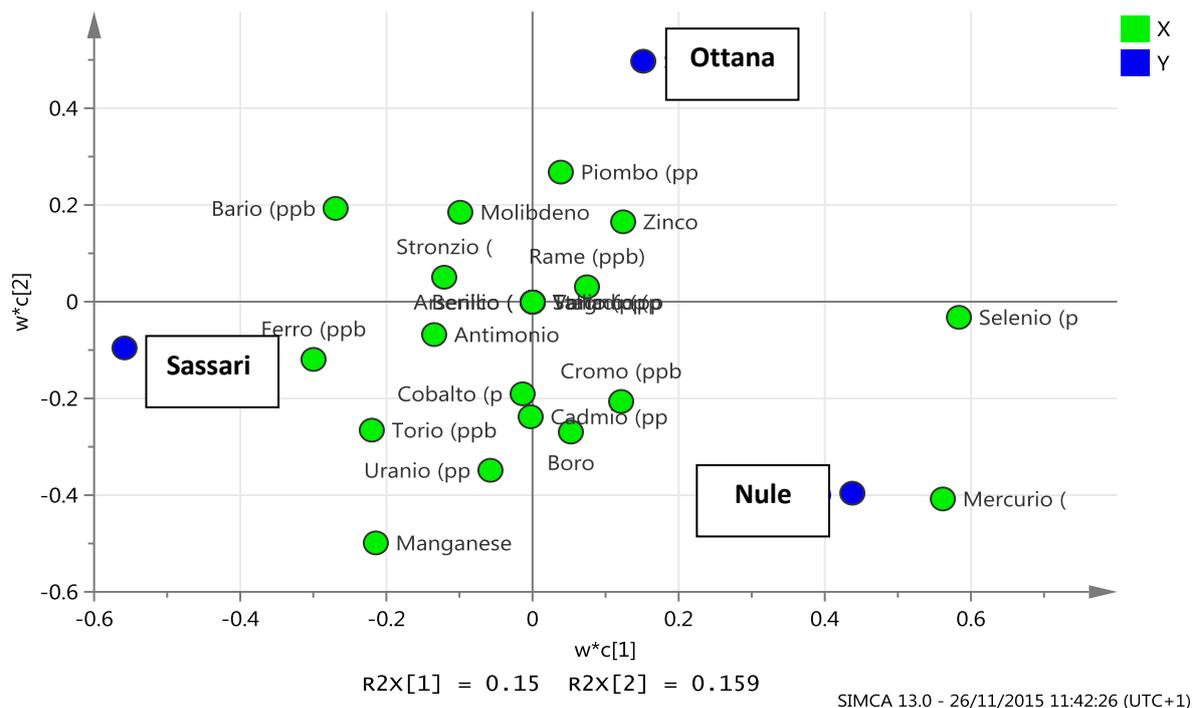


Figura 38

Una serie di 3 modelli a coppie OPLS-DA dei dati sono stati utilizzati per massimizzare la discriminazione delle aree di origine e di concentrarsi sulle variazioni delle concentrazioni dei metalli. Tutti i modelli sono stati convalidati impiegando il test di permutazione e cross validation. Il test permutazione può valutare se la specifica classificazione degli individui nei gruppi studiati è significativamente migliore rispetto a qualsiasi altra classificazione casuale in gruppi arbitrari. Nei nostri casi l'intercetta di Q2 è diventata negativa per ogni modello e R2 diminuito in modo significativo. I test di cross validation sono stati eseguiti 7 volte con una tecnica di validazione incrociata: 1/7 campioni originali sono tenuti fuori dal modello e classificati dal modello residuo, la procedura si ripete fino a quando tutti i campioni sono tenuti fuori almeno una volta.

**Il primo modello statistico a coppie OPLS-DA** è stato ottenuto confrontando il modello statico di Nule con quello rilevato nel gruppo di Sassari. Come è possibile osservare dallo score plot OPLS-DA (figura 40), il modello statistico è efficace, essendo le due classi ben separate.

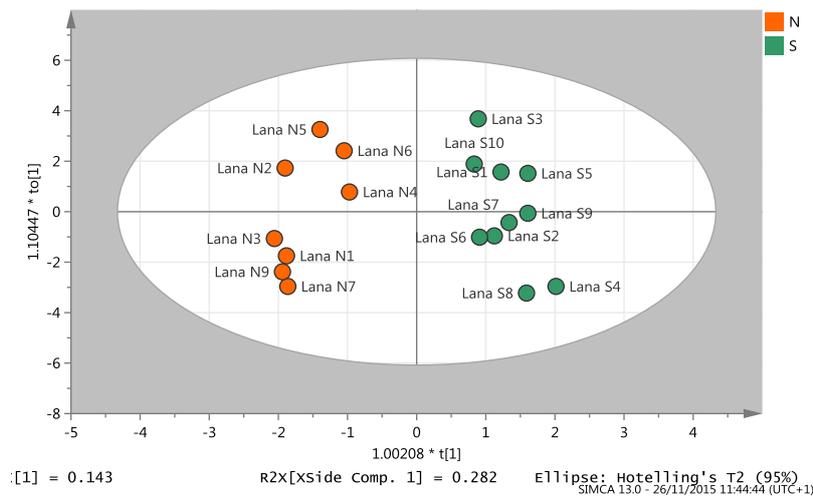


Figura 40 Score plot OPLS-DA della coppia Nule- Sassari.

Il plot loading (figura 41) indica una importanza maggiore delle variabili Mercurio e Selenio nella caratterizzazione del gruppo di Nule. Per il gruppo Sassari la variabile Bario ne influenza la classificazione.

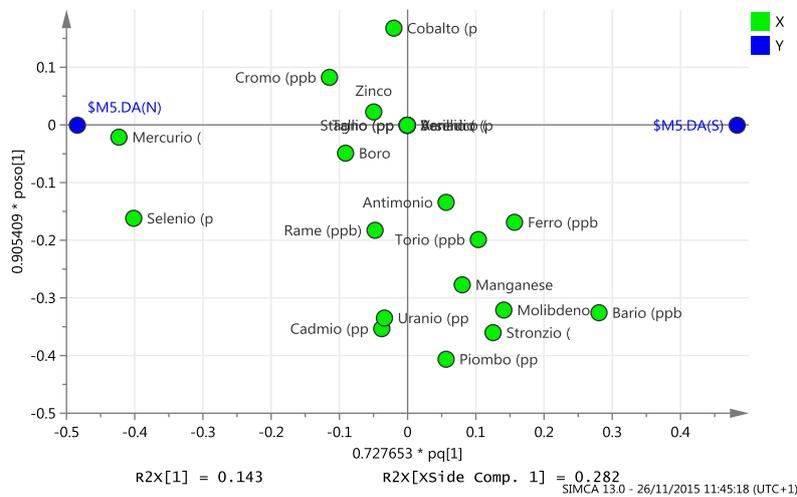


Figura 41. Loading Plot della coppia Nule Sassari.

Le permutazioni indicano che quello ottenuto, è il modello statistico migliore possibile (Intercetta R2 0.53 e Q2 -0.28) ( figura 42).

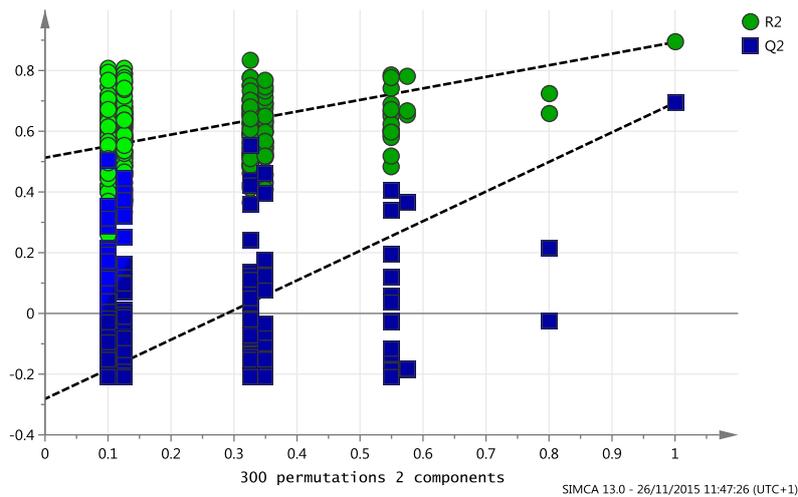


Figura 42. Test di permutazione per la componente Nule e per la componente Sassari.

Il secondo modello statistico a coppie OPLS-DA è stato ottenuto confrontando il modello statico di Nule con quello rilevato nel gruppo di Ottana. Come è possibile osservare dallo score plot OPLS-DA (figura 43), il modello statistico è efficace, essendo le due componenti bene separate.

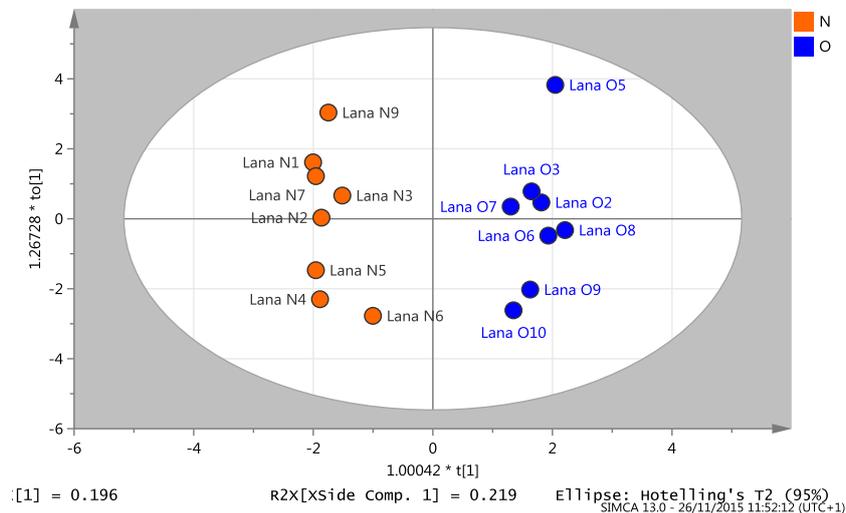


Figura 43 Score plot OPLS-DA della coppia Nule- Ottana.

Il plot loading (figura 44) indica una importanza maggiore delle variabili Mercurio nella caratterizzazione del gruppo di Nule. Per il gruppo di Ottana, la variabile Zinco ne influenza la classificazione.

Figura 41

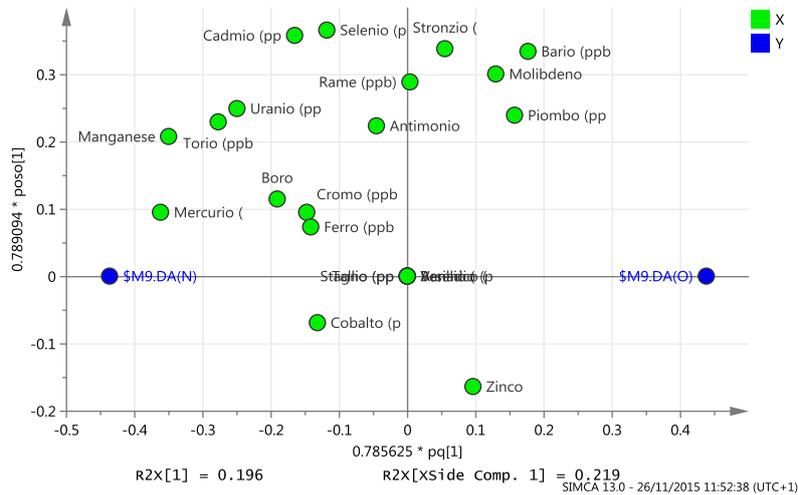


Figura 44 Loading plot OPLS-DA della coppia Nule- Ottana

Le permutazioni indicano che quello ottenuto, è il modello statistico migliore possibile (Intercetta R2 0.578 e Q2 -0.59) ( figura 45).

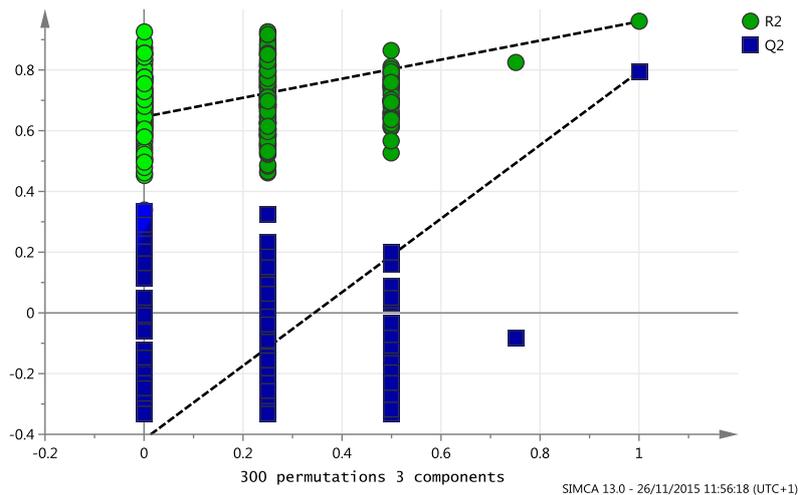
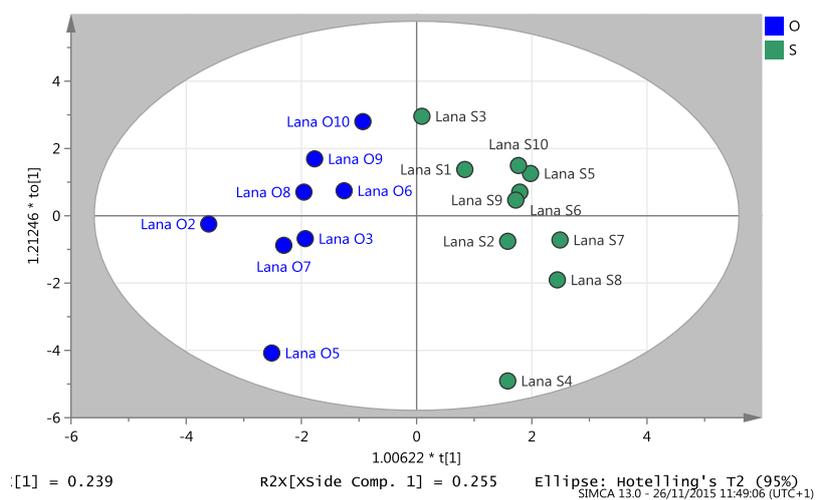


Figura 45. . Test di permutazione per la componente Nule e per la componente Ottana.

**Il terzo modello statistico a coppie OPLS-DA** è stato ottenuto confrontando il modello statico di Ottana con quello rilevato nel gruppo di Sassari. Come è possibile osservare dallo score plot OPLS-DA (figura 46), il modello statistico è efficace, essendo le due componenti bene separate



**Figura 46 Score plot OPLS-DA della coppia Ottana- Sassari.**

Il plot loading (figura 47) indica una importanza maggiore delle variabili Mercurio e Selenio nella caratterizzazione del gruppo di Ottana. Per il gruppo di Sassari, le variabili Ferro e Cobalto ne influenzano la classificazione.

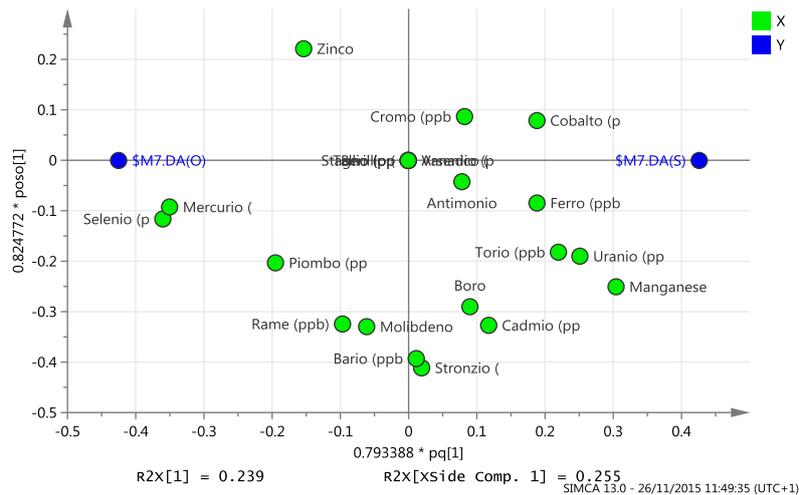


Figura 47. Loading plot OPLS-DA della coppia Ottana- Sassari

Le permutazioni indicano anche in questo caso che questo, è il miglior modello statistico possibile (Intercetta R2 0.453 e Q2 -0.32) ( figura 48).

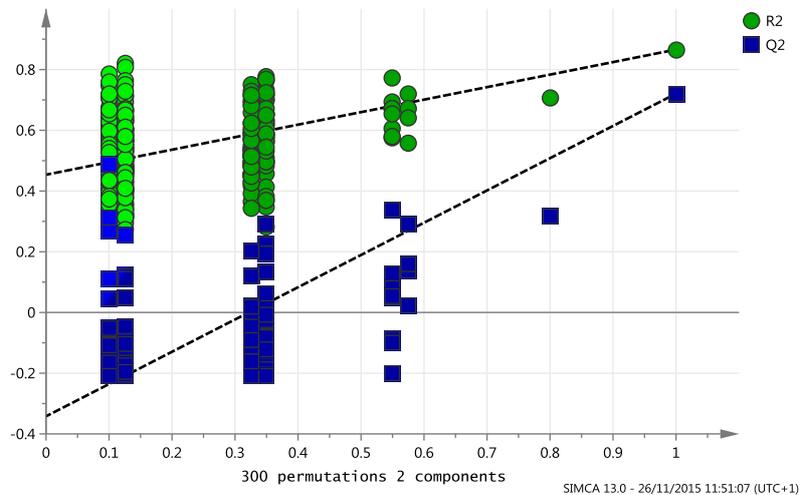


Figura 48. Test di permutazione per la componente Ottana e per la componente Sassari.

L'analisi statistica mostra chiare differenze nei tre gruppi, che vengono separati efficacemente, come evidenziato dai valori di fitting ottimali, quindi il modello regge i test statistici di controllo. I modelli a coppie mostrano ancora un'interessante separazione e ci

permettono di caratterizzare le variabili più importanti nella distinzione tra le zone di origine dei campioni.

Per quanto concerne la relazione tra concentrazione di elementi chimici e l'età delle pecore analizzate, i risultati di regressione logistica, seppur preliminari ed influenzati dal ridotto numero di campioni analizzati e di animali selezionati, evidenziano una relazione statisticamente significativa tra concentrazione dei metalli ed età dell'animale.

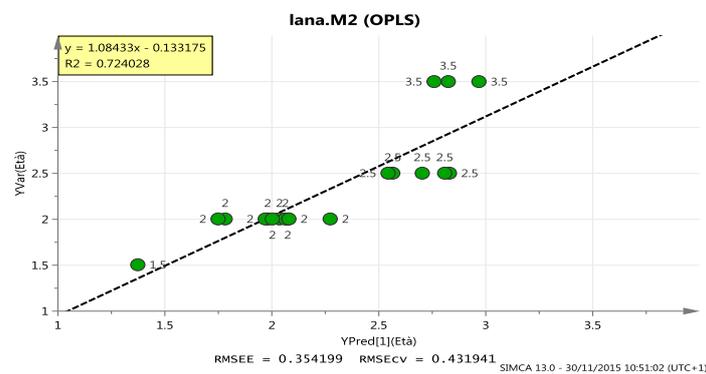


Figura 49. OPLS-DA della relazione tra concentrazione dei metalli ed età dell'animale.

## 10. CONCLUSIONI

In passato, la definizione del grado di inquinamento di un ecosistema era affidato esclusivamente all'analisi delle sue caratteristiche abiotiche, ovvero al monitoraggio chimico-fisico.

L'utilizzo sempre più frequente di organismi viventi, animali e vegetali, come bioindicatori e bioaccumulatori della qualità dell'ambiente, è basato sul principio secondo il quale, gli organismi che vivono in un determinato ecosistema sono adattati al loro ambiente. Pertanto, cambiamenti anche sensibili delle condizioni ambientali, determinano mutamenti negli organismi viventi.

Nuove fonti di sostanze potenzialmente tossiche per l'uomo arrivano sia dai trattamenti veterinari utilizzati sugli animali da allevamento, che dalle attività industriali ed antropiche. I farmaci possiedono una grossa rilevanza tra i residui che contaminano gli alimenti di origine animale; infatti, con l'aumento dell'uso di tali sostanze per la prevenzione, controllo ed il trattamento di malattie infettive e parassitarie, si calcola che ad oggi oltre l'80% degli animali da produzione subisca trattamenti farmacologici. In questa situazione generale, è ovvio che il rischio di residui farmacologici e/o dei loro metaboliti presenti nell'ambiente e nei prodotti di origine animale non ad uso alimentare, sia molto alto e che quindi essi possano costituire un potenziale rischio per la salute umana.

L'ipotesi iniziale del nostro studio, si basava sulla probabilità che la lana proprio per le sue caratteristiche intrinseche potesse venir utilizzata come bioindicatore da esposizione a sostanze potenzialmente tossiche e, a tale proposito, nel presente elaborato di tesi si è proposto e messo a punto un protocollo di campionamento ed analisi dei residui di Avermectine nella lana proveniente da allevamenti della Sardegna, oltre alla ricerca di elementi chimici caratterizzanti il livello di contaminazione ambientale.

I dati acquisiti non hanno mostrato, sia per le zone industrializzate (Nurra e Barbagia) che per quelle meno antropizzate (Goceano) livelli di accumulo di elementi chimici che possano essere preoccupanti per la salute umana [146]. E' altresì vero che i metalli legandosi alle

ceneri e alle polveri potrebbero subire l'influenza delle correnti e dei venti della Sardegna e quindi avere delle aree preferenziali di deposito e accumulo che non sono state incluse nel nostro progetto di campionamento [147].

Per quanto riguarda invece la ricerca di residui di farmaci veterinari ed in particolar modo le Avermectine, in assenza in letteratura di metodi normati o validati per la determinazione di queste classi di sostanze nella matrice lana, il metodo sperimentato è risultato particolarmente performante.

In particolare, per quanto riguarda la determinazione delle sei Avermectine il metodo analitico strumentale è stato convalidato mediante la valutazione della linearità della risposta strumentale, la valutazione dei bianchi, il calcolo del LOD, del LOQ strumentali, del limite di rivelabilità e di quantificazione della metodologia analitica, della resa, della precisione (ripetibilità) e dell'accuratezza.

Sono stati poi analizzati 150 campioni di lana sucida e lavata provenienti dalle tre zone di campionamento, raccolti nel periodo di tosa compreso fra maggio e giugno 2015.

Dai dati ottenuti si è avuta l'indicazione che nelle aree studiate il materiale raccolto sia libero da residui di questi farmaci a concentrazioni potenzialmente pericolose per la salute umana. È altresì vero, che a causa delle caratteristiche chimico-fisiche di questa classe di molecole, nel terreno e nella lana possano esse degradare in metaboliti e composti più polari, di cui è difficile determinarne la possibile tossicità.

Il bioindicatore lana può quindi essere ritenuto un'efficiente arma per lo studio di sostanze tossiche per l'ambiente e per l'uomo in quanto è facilmente misurabile, in modo tale da essere continuamente aggiornato, è sensibile a piccole variazioni di stress ambientale, può essere applicabile in aree geografiche ampie e in diversi ambienti ecologici oltre ad essere pratico ed economico e, quindi, particolarmente utile da utilizzare nell'ambito di studi ambientali.

Il lavoro del gruppo di ricerca continuerà con l'allargamento a nuove classi di molecole con potenziale e accertata tossicità e con la predisposizione di un protocollo di campionamento ancora più ampio e mirato.

## BIBLIOGRAFIA

1. A.Alimonti, B. Bocca, D. Mattei, A.Pino, Rapporti Istisan 10/22, I.S.S. Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1993-2009.
2. W.S. Boston, "Wool" in **Encyclopedia of textiles, fibres, and nonwoven fabrics**, Editor: M Grayson, pp.519-551, John Wiley and Sons, New York (1984)
3. A. Barbera, P.G. Albertazzi, **Il mondo dei tessili**, V. Giovannacci Editore, Biella (1995).
4. A. Virnich, H.Thomas, G. Blankenburg, H. Hocker, **Helliand Textilberichte**, 71, 886 (1990).
5. Ezio Martuscelli, **Relazioni, proprietà, struttura nelle fibre di lana**. Programma Nazionale di Ricerca, Beni Culturali (MIUR): La conservazione dei tessuti antichi. Volume primo. Collana di trasferimento e diffusione. pp 1-10
6. Ezio Martuscelli, **Relazioni, proprietà, struttura nelle fibre di lana**. Programma Nazionale di Ricerca, Beni Culturali (MIUR): La conservazione dei tessuti antichi. Volume primo. . Collana di trasferimento e diffusione. pp 1-10
7. Ezio Martuscelli, **Relazioni, proprietà, struttura nelle fibre di lana**. Programma Nazionale di Ricerca, Beni Culturali (MIUR): La conservazione dei tessuti antichi. Volume primo. . Collana di trasferimento e diffusione. pp 1-10
8. <http://gestis-en.itrust.de/>
9. Cinzia Tonetti **Messa a punto dei metodi per la determinazione di sostanze tossiche nei manufatti tessili**. Tesi finale Master in Tessile e Salute. 2005-2006.

10. Valtcho D.Zheljazkov, **Assessment of Wool Waste and Hair Waste as Soil Amendment and Nutrient Source**, Journal of Environmental Quality, 2005
11. A.A.Arshakuni, S.P.Gubin, **Nanomaterials Based on Natural Protein Fibers**, **Inorganic Materials**, Vol.46. No.7, pp734-742, 2010
12. Jiri Zach, Azra Korjenic, Vit Petrànek, Jitka Hroudová, Thomas Bednar, **Performance evaluation and research of alternative thermal insulations based on sheep wool**, Energy and Buildings, Elsevier 2012.
13. A.A.Arshakuni, S.P.Gubin, **Nanomaterials Based on Natural Protein Fibers**, **Inorganic Materials**, Vol.46. No.7, pp734-742, 2010
14. Fortunato La Rocca, **Biomarcatori e bioindicatori nella valutazione della qualità delle acque interne**, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali- Corso di Laurea in Scienze Naturali, Università degli studi di Milano, A.A. 2004/2005.
15. Daughton, C.G., Ternes, T.A., **Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes?** Environ. Health Perspect. 107, 907-938.1999.
16. Ternes, T.A., **Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples**. Trends. Anal. Chem. 20, 419-434, 2001.
17. Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review**, Chemosphere 36, 357-393, 1998.
18. Cooper E.R., Siewicki, T.C., Philips, K., **Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment**. Sci. Total. Environ. 398, 26-33, 2008.

19. Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelò, D., **Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments**. *Talanta*. 69,334–342, 2006
20. De Brabander, H.F., De Wulf, E., Janssen, C.R., Noppe, H., Van Caeter, P., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Verheyden, K., Wille, K., **Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater**. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1797-1808, 2010.
21. Glassmeyer, S.T., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Focazio, M.J., **Environmental presence and persistence of pharmaceuticals: an overview**, in: D.S. Aga (Ed.), *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, CRC Press, Taylor and Francis, pp. 3-52, 2008.
22. Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., Reitano, G., Bagnati, R., Chiabrando, C., Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., **Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control**, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13, 15-21, 2006.
23. Lindqvist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., **Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters**, *Water Res.* 39, 2219-2228, 2005.
24. Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.-D., Rodrigues, S.V., Baumann, W., **Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil**, *Sci. Total Environ.* 225, 135-141, 1999
25. Daughton, C.G., Ternes, T.A., **Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes?** *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938, 2010
26. Claudio Grenchi, Antonio Santaniello, Vincenzo Veneziano. **Antiparassitari a portata di mano**, Giugno 2008

27. Campbell, W.C.; Fisher, M.H.; Stapley, E.O.; Albers-Schonberg, G.; Jacob, T.A. **Ivermectin: a new antiparasitic agent.** *Science* 221: 823–828, 1983.
28. Louis A. Tremblay and Steve D. Wratten. **Effects of ivermectin in dairy discharges on terrestrial and aquatic invertebrates** DOC SCIENCE INTERNAL SERIES 67 Wellington, N.Z. : Dept. of Conservation, 2002.
29. Davies, I.M.; Gillibrand, P.A.; Mchenery, J.G.; Rae. G.H., **Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms.** *Aquaculture* 163: pp 29-46, 1998.
30. C.Michael Hogan. **Heavy metal. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment**, eds E.Monosson & C.Cleveland. Washington Dc,2010.
31. Templeton DM. **“The importance of trace element speciation in biomedical science”.** *Anal Bioanal Chem.*, Apr;375(8):1062-6, **PMID 12733018**, 2003.
32. Potenziamento della valutazione della presenza dei principali contaminanti ambientali che possono incidere nella catena alimentare dipartimento della sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare e degli organi collegiali per la tutela della salute. direzione generale degli organi collegiali per la tutela della salute. [www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)
33. Regolamento CEE 266/2001 e successive. [eur-lex.europa.eu](http://eur-lex.europa.eu)
34. Eisler R, **Lead hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review.** PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 14.
35. Coulson E.J., Remington R.E. and Lynch K.M. **Toxicity of naturally occurring arsenic in food** in *J. NUTRI.* 10: 255, 1936.
36. Overby L.R. and Frederickson R.L., **Metabolic stability of arsanilic acid in chickens** *J.Agric.Food Chem.* 11: 378, 1963

37. Buck, W. B., **Toxicity of heavy metals in the environment**, Oehme, F. W., ed, 1, 357-374, 1978.
38. Bottarelli F., "**Arsenico As**" in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 59-63, 1993
39. Thienes C.H. & Haley T.J., **Poisons with symptoms referable to the digestive Tract-Arsenic** in CLINICAL TOXICOLOGY cp 20, pag 171-175, 1972
40. Tang S.,in HUANJING KEXUE 6: pp 2, 1985
41. Tang S., in ACTA SCI. CIRCUMSTANTIAE 7: pp 245,1987
42. WHO, "**Arsenic Compounds**" in ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 2nd ed. World Health Organization 224, 2001
43. Mandal B.K. & Suzuki K.T., **Arsenic round the world: a review**, in TALANTA 58: pp 201-235, 2002
44. WHO, **Guidelines for drinking water qualità, recomandations** , 2°ed, 2° vol, World Health Organisation, Genere., 1996
45. Sporn A., Dinu I., Stoenescu L., Cirstea A., (1969) **Beitrage zur Ermittlung der Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Zink**". NAHRUNG, 13: 461, 1969
46. Webb M., **The chemistry, biochemistry and biology of cadmium**, ELSEVIER/NORTH HOLLAND BIOCHEMICAL, New York, 1979
47. Vallee B.L. e Ulmer D.D., **Biochemical effects of mercury, cadmium and lead**. ANNU. REV. BIOCHEM., 41: 91, 1972

48. Valle B.L. e Glades A., **The metallobiochemistry of zinc enzymes.** ADV. ENZYMOL., 56: 283, 1974
49. Friberg L., Kjellström T., Nordberg G.F.”**Cadmium**“. In: Friberg L., Nordber G.F., vouk V.B. Eds., HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS, Vol. 2, 2nd ed. Elsevier, New York, p.130, 1986
50. Nordberg G.F., Kjellström T., Nordberg M., **Kinetics and metabolism. In: cadmium and health**, VOL. I, EXPOSURE, DOSE AND METABOLISM, Friberg L., Elinder C.G., Kjellström T. e Nordber G.F. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.103, 1985
51. Webb M., **The chemistry, biochemistry and biology of cadmium.**, ELSEVIER/NORTH HOLLAND BIOCHEMICAL, New York, 1979.
52. Goering P.L., Waalkes M.P., Klaasen C.D., **Toxicology of cadmium.** In: TOXICOLOGY OF METALS, BIOCHEMICAL ASPECTS. Goyer R.A. e Cherian M.G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, london, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 189, 1995
53. Lucisano A. (1994) “**Cadmio**” in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C.Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 167-170
54. Dudley R.E., Gammal L.M., Klaassen C.D., **Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity**”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 77: 414, 1985
55. Cherian M.G., Goyer R.A., Delaquerriere-Richardson L., (1976) “**Cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity**”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 38: 399

56. Squibb K.S., Pritchard J.B., Fowler B.A., **Cadmium metallothionein nephropathy: ultrastructural/biochemical alterations and intracellular cadmium binding** JOURNAL PHARMACOL. EXP. Ther., 229: 311, 1985
57. Eisler R., **“Selenium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”**. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT, n.5., 1985.
58. Ferard J. F., J. M. Jouany, R. Truhaut, and P. Vasseur., **“Accumulation of cadmium in a freshwater food chain experimental model”**. ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY 7:43-52., 1983
59. EPA, **“Ambient water quality criteria for cadmium”**. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-025, 1980.
60. Anderson R.L., Walbridge C.T., Fiandt J.T., **“Survival and growth of Tanytarsus dissimilis (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc and lead”**. ARCH. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., 9: 329, 1980
61. Kumada H., Kimura S., Yokote M., **“Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout”**. BULL. JPN. SOC. SCI. FISH., 46: 97, 1980
62. Wayland M. **“Metals as threats to wildlife”** in Short course on wildlife toxicology. Canadian Cooperative Wildlife Centre. Saskatoon, 1-3 March 2000.
63. White D.H. e Finley M.T., **“Uptake and retention of dietary cadmium in mallard ducks”**. Environ. Res., 17: 53, 1978
64. Edel J. e Sabbioni E., **“Oathways of Cr(III) and Cr(VI) in the rat after intratracheal administration”**. HUMAN TOXICOL., 4: 409, 1985

65. MacKenzie R.D., Anwar R.A., Byerrum R.U., Hoppert C.A., **“Absorption and distribution of Cr51 in the albino rat”**. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 79: 200, 1959
66. Stoecker B., **“Essentials of chromium bioavailability”**. OFFICE OF DIETARY SUPPLEMENTS, CHROMIUM AND DIABETES WORKSHOP SUMMARY, Natcher Conference Center, National Institute of Health, 1999
67. O’Flaherty E.J.,**“Chromium toxicokinetics”**. In: TOXICOLOGY OF METALS, BIOCHEMICAL ASPECTS. Goyer R.A. e Cherian M.G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 215, 1995
68. Post M. A. e P. G. Campbell., **“Lead chromate pigments a literature survey on environmental and toxic effects”**. U.S. DEP. COMM. NAT. BUR. STAND. REP. NBSIR 80-1974. 38 pp, 1980
69. Chromium Information Bureau, Inc. **Reports That Chromium Supplements are Safe**. EVANSVILLE, Ind.--(BW HealthWire)--April 29, 1999
70. Eisler R., **“Chromium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”**. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 6., 1986
71. Steven J.D., Davies L.J., Stanley E.K., Abbott R.A., Ihnat M., Bidstrup L., Jaworski J.F., **“Effects of chromium in the Canadian environment2**. NAT. RES. COUN. Canada, NRCC No. 15017. 168 pp. Avail. from Publications, NRCC/CNRC, Ottawa, Canada, K1A 0R6, 1976
72. Ecological Analysts, Inc.,**“The sources, chemistry, fate, and effects of chromium in aquatic environments”**. AVAIL. FROM AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, 2101 L St., N.W., Washington, DC 20037. 207 pp, 1981

73. Eisler R. **“Lead hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review.** Patuxent wildlife research center, biological report n.14, 1988
74. Robinson J.B., Touvinen O.H., **“Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis”.** MICROBIOL. REV., 48:95-124, 1984
75. Wren C.D. **“A review of metal accumulation and toxicity in wild mammals. 1 Mercury”** ENVIRONMENTAL RESEARCH 40(1) PP 210-240, 1986
76. Boudou A., Ribeyre F **“Contamination of aquatic biocenoses by mercury compounds: an experimental toxicological approach”.** In J.O. Nriagu (ed.). AQUATIC TOXICOLOGY. John Wiley, New York, 73-116, 1983
77. Bottarelli F., **“Mercurio Hg”** in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA, T.P.E. veterinaria, pag 59-63, 1993
78. Skerfving S., **“Biological monitoring of exposure to inorganic lead”.** BIOLOGICAL MONITORING OF TOXIC METALS. Clarkson T.W.Friberg L., Nordberg G.F., Sager P.R. Eds., Plenum Press, New York, London,p. 169., 1988
79. Goyer R.A., **“Toxic effects of metals”.** In: *Casarett&Doull’s Toxicology; THE BASIC SCIENCE OF POISONS*, 5th edn., Klaassen C.D.(Ed.), McGraw-Hill, New York, pp.691-736, 1996
80. Goyer R.A. and Clarkson T.W. **“Toxic Effects Of Metals”**, in: TOXICOLOGY OF POISONS (ed. Klaassen, C.D.); McGraw-Hill, New York, 811-868., 2001
81. Bockstaller C., Girardin P., **Use of agro-ecological indicators on the evaluation of farming systems.** In: van Ittersum M. K., van de Geijn (eds.). Proc. 4th ESA Congress, Elsevier, Amsterdam, 414-415, 1996

82. Iserentant R., De Sloover J., **Le concept de bioindicateur**. Mem. Soc. Roy. Bot. Belg., 7: 15-24, 1976
83. Celli G., **L'ape come indicatore biologico**. Lettura all'Accademia Nazionale di Entomologia. Firenze, 27.02.1993
84. EU (2002). **Commission Decision 657/2002/CE** of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. Official Journal of the European Union, 17.8.2002,L221/8.
85. Anastas, P. T.; Warner, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford University Press: New York,, p.30. By permission of Oxford University Press.,1998.
86. CEM Corporation **Preparation of Mixed Food Samples for Trace Metals Analysis Using the CEM MARS 6 and Discover SP-D Systems**. Application Note 2015.
87. J. Nölte. **ICP Emission Spectrometry—A Practical Guide**. Wiley, Germany 18 p.,2003
88. Steve Wilbur and Craig Jones, **“Simple, Reliable Analysis of High Matrix Samples According to US-EPA Method 6020A using the Agilent 7700x CP-MS”**, Agilent Technologies publication 5990-5514EN, 2010
89. CS Ho, CWK Lam,\* MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, KF Ng, MWM Suen, and HL Tai **Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications** Clin Biochem Rev. 2003 Feb; 24(1): 3–12.
90. D. M. Higton. **A rapid, automated approach to optimisation of multiple reaction monitoring conditions for quantitative bioanalytical mass spectrometry**. Rapid Commun. Mass Spectrom.2001, 15, 1922.

91. Hugues Henry, Hamid Reza Sobhi, Olaf Scheibner, Maciej Bromirski, Subodh B. Nimkar and Bertrand Rochat, **Comparison between a high-resolution single-stage Orbitrap and a triple quadrupole mass spectrometer for quantitative analyses of drugs.** Rapid Commun. Mass Spectrom. 26, 499–509, 2012
92. N. R. Zhang, S. Yu, P. Tiller, S. Yeh, E. Mahan, W. B. Emary. **Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers - a different approach for analysis of biological samples.** Rapid Commun. Mass Spectrom., 23, 1085, 2009
93. Zhan J, Zhong YY, Yu XJ, Peng JF, Chen S, Yin JY, Zhang JJ, Zhu Y **Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Food Chem. Jun 1;138(2-3):827-34, 2013
94. K. P. Bateman, M. Kellmann, H. Muenster, R. Papp, L. Taylor. **Quantitative-qualitative data acquisition using a benchtop Orbitrap mass spectrometer.** J. Am. Soc. Mass Spectrom. , 81, 1881, 2009.
95. M. Scigelova, A. Makarov. **Advances in bioanalytical LC-MS using the Orbitrap™ mass analyzer.** Bioanalysis, 1, 741, 2009.
96. M. Jemal, Y.-Q. Xia. **The need for adequate chromatographic separation in the quantitative determination of drugs in biological samples by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.** Rapid Commun. Mass Spectrom., 13, 97, 1999.
97. Dirk Saseta. **Eco-Efficient Dry Wool Scouring with total by-products recovery LIFE11 ENV/ES/000588-2012**

98. J. Sneddon, M. Powell. **The use of washed sheep wool as a bio-indicator for lead and copper concentrations in upland areas of the UK** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 2007
99. Mark M. Kushnir, Alan L. Rockwood, Gordon J. Nelson, Bingfang Yue, Francis M. Urry. **Assessing analytical specificity in quantitative analysis using tandem mass spectrometry.** *Clin Biochem* ;38:319–27, 2005.
100. Gallerini S. **Seminari ALA- L'accreditamento: significato per i laboratori ed applicazioni nei controlli ARPAM** Pesaro 2013.
101. European commission health e consumer protection directorate general **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** SANCO/12571/ 2013
102. AOAC/FAO/IAEA/IUPAC - **“Guidelines for single laboratory validation of Analytical Methods for trace level concentrations of organic chemicals”**
103. Manuali ARPA – Accreditamento e Certificazione: **“Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell’incertezza di misura”** – Ed. settembre 2003
104. Norma UNI CEI ENV 13005:2000 **“Guida all’espressione dell’incertezza di misura”** **“Quantifying uncertainty in analytical measurement”** Eurachem, second Edition 2000.
105. Visconti A. **Applicazione di metodologie analitiche innovative per il miglioramento della sicurezza alimentare: il progetto S.I.Mi.S.A.** Integrazione sicurezza alimentare e nutizionale. Foggia 2015-11-26

106. **EPA Method 6020B Revision 2** July 2014 (from revision 1 2007)  
www2.epa.gov/sites/production/.../epa-6020a.pdf
107. Maria Careri, Alessandro Mangia. **Validation and qualification: the fitness for purpose of mass spectrometry-based analytical methods and analytical systems**. Anal Bioanal Chem ;386:38-45, 2006.
108. Coppi S. **Linee guida per un approccio semplificato alla validazione del metodo multi residuo**. 4°Convegno nazionale Fitofarmaci e Ambiente Napoli 2003
109. Mohammed Jemal and Yuan-Quing Xia. **LC-MS development strategies for quantitative bioanalysis**. Curr Drug Metab 2006;7:491-502
110. Li X, Zhang Y,Ai L,Wang X,Wang M,Xu H,Hao Y. **Determination of five avermectins in bovine liver by on-line solid-phase extraction with hydrophobic monolithic column coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Se Pu.2015 Jun;33(6):590-6
111. Wang F ,Chen J,Cheng H,Tang Z,Zhang G,Niu Z,Pang S,Wang X,Lee FS. **Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 627-39.2011
112. M. Thompson ”**Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing**” Analyst 125 385-387,2000.
113. Documento SINAL DT-0002 Rev.1 Febbraio “**Guida per la valutazione e l’espressione dell’incertezza di misura**”, 2000

114. Documento SINAL DT-0002/3 Rev.0 Aprile **“Avvertenze per la valutazione dell’incertezza nel campo dell’analisi chimica”**, 2000.
115. Documento SINAL DT-0002/4 Rev.0 Aprile **“Esempi applicativi di valutazione dell’incertezza nelle misurazioni chimica”**, 2000.
116. Paul J. Taylor. **Matrix effects: the achilles heel of quantitative high performance liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry**. Clin Biochem ;387:328–34, 2005.
117. Tranfo G., Marco A., Cialdella, E., Paci, Pignini D. **L’effetto matrice nella determinazione degli indicatori di esposizione professionale mediante HPLC/MS/MS**. Focus Vol. 3, n. 3, 61-69
118. **Environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products** — Phase I & II (CVMP/VICH/592/1998 - CVMP/VICH/790/2003).
119. **Environmental risk assessment of medicinal products for human use**. CPMP/SWP/4447/00 2006
120. Society of Hair Testing. **Recommendations for hair testing in forensic cases**. Forensic Sci Int. 145(2-3):83-4, 2004.
121. Feldmann J<sup>1</sup>, John K, Pengprecha P. **Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland**. Fresenius J Anal Chem. Sep;368(1):116-21, 2000.
122. Codling, I.D.; Mascarenhas, R.; Sutton, A. 1998: **Proposed environmental quality standards for avermectins (abamectin, ivermectin and doramectin) in water**. WRc (UK) Report no. DoE4197/1.

123. Foy, R.H.; Lennox, S.D.; Smith, R.V. **Assessing the effectiveness of regulatory controls on farm pollution using chemical and biological indices of water quality and pollution statistics.** *Water Research* 35: 3004–3012, 2001.
124. Halley, B.A.; Jacob, T.A.; Lu, A.Y.H. **The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate.** *Chemosphere* 18: 1543–1563, 1989.
125. Schindler, M.: **Environmental influence of chemicals used in the dairy industry which can enter dairy wastewater.** *Bulletin of the International Dairy Federation* 288:17–31, 1993.
126. Donnison, A.M.; Ross, C.M.: **Animal and human faecal pollution in New Zealand rivers.** *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 33: 119–128, 1999.
127. Sommer, C.; Steffansen, B.; Nielson, B.O.; Gronvold, J.Vagn Jensen K. –M; Jespersen; J.B. Springborg,J.; Nansen, P. **Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour on treatment: concentrations and impacts on dung fauna.** *Bulletin of Entomological Research* 82: 257–264, 1992.
128. Fengmei Wang, Junhui Chen, Hongyan Cheng, Zhixu Tang, Gang Zhang, Zengyuan Niu, Shiping Pang, Xiaoru Wang, Frank Sen-Chun Lee, **Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry,** *Food Additives & Contaminants: Part A*, **28**, 5, 627, 2011.
129. F. Wang, J. Chen, H. Cheng, Z. Tang, G. Zhang, Z. Niu, *et al.* **Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry** *Food Additives & Contaminants*, 28 (5) , pp. 627–639, 2011.

130. Halley BA<sup>1</sup>, VandenHeuvel WJ, Wislocki PG. **Environmental effects of the usage of avermectins in livestock** Vet Parasitol. Jun;48(1-4):109-25, 1993.
131. Bourcier L., Sellegri K., Masson O., Zangrando R., Barbante C., Gambaro A., Pichon J. M., Boulon J., Laj P. «**Experimental evidence of biomass burning as a source of atmospheric <sup>137</sup>Cs, puy de Dôme (1465 m a.s.l.), France.**» Atmospheric Environment 44, 2280-2286, 2010.
132. Dutton, S. J.; Rajagopalan, B.; Vedal, S.; Hannigan, M. P., **Temporal patterns in daily measurements of inorganic and organic speciated PM(2.5) in Denver.** Atmospheric Environment , 44, (7), 987-998, 2010
133. Faravelli T., A. Frassoldati S. Granata, A. Cuoci, E. Ranzi; **Fenomenologia della combustione di biomasse.** LEAP; pp 171-219, 2006.
134. Iinuma Y., Brüggemann E., Gnauk T., Müller K., Andreae O., Helas G., Parmar R., Herrmann H. «**Source characterization of biomass burning particles: The combustion of selected European conifers, African hardwood, savanna grass, and German and Indonesian peat.**» Journal of Geophysical Research 112, 2007.
135. F. Piunti, N. Mucci, R. Innocenti, G. Fornaro, G.M. Colonna, G. Bartolini , E. Marchesi. **QUALITÀ ECOTOSSICOLOGICA DI MANUFATTI TESSILI: studio interlaboratorio sul controllo di residui di metalli pesanti.** Prevenzione Oggi. Vol. 2, n. 3-4, 1-12
136. Starink RJ. Report IIS02A03X. **Results of proficiency test heavy metals and free formaldehyde in textile.** Dordrecht, the Netherlands: Institute for interlaboratory studies; . p. 1-25, 2003

137. P.Manini, R. Andreoli, A. Mutti. **Application of liquid chromatography-mass spectrometry to biomonitoring of exposure to industrial chemicals.** *Toxicol Lett* ;162:202–10, 2006.
138. British Standard Institution (BSI). **Determination of metals in textiles.** Standard BS-6810;. p. 1-15, 1987.
139. Innocenti R. **Sostanze chimiche nei materiali tessili: verifica e standardizzazione dei metodi analitici.** *Tintoria* ;8:21-6, 2005.
140. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. **Determination of nine hazardous elements in textiles by inductively coupled plasma optical emission spectrometer after microwave-assisted dilute nitric acid extraction.** *Jan*;32(1):239-43, 2012.
141. D.L. Massart et al.:"**Chemometrics:a Textbook**", Data Handling in Science and Technology, 2, ELSEVIER, Amsterdam
142. Roberto Todeschini: "**Introduzione alla Chemiometria**", EdiSES, Napoli
143. Santona, M., Filigheddu, M., Dettori, S., Deplano, G., Ligios, G., Motroni, A., Trygg, J., Wold, S.: **Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)**, *Journal of chemometrics.*, **16**, 119-128, 2002.
144. Cloarec, O., Dumas, M. E., Trygg, J., Craig, A., Barton, R. H., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E.: **Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1H NMR spectroscopic metabonomic studies**, *Analytical Chemistry.*, **77**, 517-526, 2005.

145. Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J., van Duijnhoven, J. P., van Dorsten, F. A.: **Assessment of PLSDA cross validation**, *Metabolomics.*, **4**, 81-89, 2008.
146. Canu, S., Rosati, L., Fiori, M., Motroni, A., Filigheddu, R., Farris, E.: **Bioclimate map of Sardinia (Italy)**, *Journal of Maps.*, 1-8, 2014.
147. Jacobson, M. C., Hansson, H.-C., Noone, K. J., & Charlson, R. J.. **Organic atmospheric aerosols: review and state of science**. *Reviews of Geophysics* , 38 (2), p. 267-294, 2000