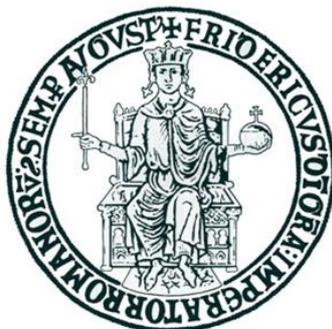


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**



**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
**DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SANITÀ PUBBLICA E MEDICINA PREVENTIVA**  
**XXXIV CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

**MIGLIORAMENTO DEL SISTEMA QUALITÀ DELL'INDUSTRIA AGRO-ALIMENTARE  
ATTRAVERSO L'IDENTIFICAZIONE E LA QUANTIFICAZIONE DEI DISTRUTTORI  
ENDOCRINI EMERGENTI NELLE ACQUE SUPERFICIALI E PROFONDE DELLA REGIONE  
CAMPANIA: I PRODOTTI DI TRASFORMAZIONE DEI PESTICIDI**

**Relatore:**

**Prof. Paolo Montuori**

**Candidata:**

**Dott.ssa Donatella Paola Provvvisiero**

**ANNO ACCADEMICO 2020/2021**

# INDICE

<b>Premessa</b> .....	pag. 4
-----------------------	--------

## **Capitolo 1**

### *Introduzione*

1.1 L'industria agroalimentare.....	pag. 5
1.2 I pesticidi.....	pag. 7
1.3 I prodotti di degradazione dei pesticidi.....	pag. 13
1.4 Gli interferenti endocrini.....	pag. 16

## **Capitolo 2**

<i>Obiettivi del Progetto</i> .....	pag. 20
2.1 Obiettivi generali.....	pag. 20
2.2 Obiettivi specifici.....	pag. 20

## **Capitolo 3**

### *Materiali e metodi*

3.1 Area di studio: la regione Campania.....	pag. 21
3.2: Campionamento acque di falda .....	pag. 23
3.3: Campionamento acque di superficie.....	pag. 26
3.4 Estrazione e determinazione quali-quantitativa dei Pesticidi e dei Prodotti di degradazione.....	pag. 27

3.5: Gascromatografia e spettrometria di massa.....pag. 27  
3.6: Cromatografia liquida- spettrometria di massa.....pag. 30

## **Capitolo 4**

*Risultati e Discussioni*..... pag. 31

4.1: Validazione dei metodi.....pag. 31

4.2: Concentrazione dei pesticidi e dei prodotti di degradazione nei campioni di acqua di falda.....pag. 32

4.3: Concentrazione dei pesticidi e dei prodotti di degradazione nei campioni di acqua di superficie.....pag. 34

## **Capitolo 5**

*Conclusioni*.....pag. 38

## **Capitolo 6**

*Bibliografia*.....pag. 39

## **PREMESSA**

Il contenuto di questo progetto di ricerca è incentrato sull'area tematica Agroalimentare. La complessità del sistema qualità del settore agro-alimentare rende necessario la ricerca di metodologie ed indicatori innovativi per la ricerca di inquinanti ambientali che stanno diventando sempre più complessi e difficili da rintracciare. Tra questi i pesticidi si distinguono per l'elevata tossicità, cancerogenicità e azione antiestrogenica e i dati del sesto Rapporto ISPRA "Monitoraggio nazionale dei pesticidi nelle acque" evidenziano chiaramente che fiumi e acque italiane sono piene di pesticidi anche se non si conoscono precisamente i dati di tutte le regioni circa l'utilizzo di pesticidi perché non tutte li trasmettono.

La Commissione Europea e altri organismi internazionali (OECD, WHO) indicano in particolare come prioritario l'incremento delle conoscenze sugli "Endocrine Disrupting Chemicals" (EDC), un eterogeneo gruppo di sostanze caratterizzate dalla capacità potenziale di interferire con il funzionamento del sistema endocrino. Recentemente è stato confermato il potenziale di interferenza endocrina di molti pesticidi e poco si conosce sui loro metaboliti (MdP) che, in alcuni casi, risultano avere tossicità più elevata di quella del principio attivo di partenza. Attualmente è diventato rilevante il problema rappresentato dai prodotti di degradazione o trasformazione dei pesticidi, comunemente definiti "metaboliti", che possono dar luogo ad episodi di contaminazione di acque superficiali, sotterranee e di acque potabili, allo stesso modo dei loro composti parentali. Ecco perché l'obiettivo principale del suddetto progetto di dottorato è quello di integrare il sistema qualità dell'industria agro-alimentare attraverso l'utilizzo di tecniche analitiche innovative per la ricerca di inquinanti emergenti ed in particolare i metaboliti dei pesticidi.

# CAPITOLO 1

## Introduzione

### 1.1 L'industria agroalimentare

L'industria agroalimentare è il secondo settore manifatturiero nazionale e copre il 13% della produzione industriale nazionale. Il settore agroalimentare italiano rappresenta un'eccellenza che primeggia sul piano della qualità, della sicurezza alimentare, dell'innovazione tecnologica, della sostenibilità, della biodiversità e del rispetto della tradizione. L'Italia è, infatti, un paese caratterizzato da grandi diversità territoriali e climatiche che si sono plasmate in culture, storie e tradizioni varie e uniche. Secondo l'ultimo censimento generale dell'agricoltura realizzato dall'Istat, in Italia risultano attive 1.630.420 aziende agricole e zootecniche. Dopo la Puglia, la Sicilia e la Calabria, troviamo la Campania con 137mila tra aziende agricole e industrie alimentari. La qualità e la sicurezza sono due aspetti che le aziende di produzione alimentare devono tenere sotto costante controllo al fine di garantire una corretta gestione aziendale e competere con successo sul mercato. Altro aspetto importante è che le industrie di trasformazione alimentare o di confezionamento di prodotti alimentari consumano grandi volumi di acqua nelle varie fasi dei processi produttivi, per il lavaggio delle materie prime dei prodotti, per la cottura degli alimenti o per il raffreddamento dopo la cottura o per la pulizia dei servizi igienico-sanitari. Infatti, nei processi di produzione, manipolazione e trasformazione degli alimenti, l'acqua rappresenta un elemento fondamentale, sia che sia utilizzata nei lavaggi o per la pulizia di locali e attrezzature sia che rappresenti un ingrediente del prodotto alimentare. Ecco perché la disponibilità di acqua con requisiti di potabilità è da considerarsi un fattore fondamentale e deve essere valutata attentamente nell'analisi dei pericoli e nella gestione del rischio delle procedure di autocontrollo. Dunque, è importante controllare che l'acqua impiegata nel ciclo produttivo non introduca contaminanti di natura microbiologica, chimica o fisica (*figura 1*). L'importanza della qualità dell'acqua non può essere presa sottogamba dai produttori alimentari. Ha un ruolo vitale, sia come ingrediente critico per la qualità degli alimenti, che come componente chiave per una produzione efficiente. Ad esempio, gli alimenti come zuppe e verdure in scatola contengono un'elevata percentuale d'acqua una volta cotti e confezionati. È importante che l'acqua non abbia alcun sapore o odore che potrebbero compromettere la qualità o

la consistenza del prodotto finale. La qualità dell'acqua impiegata in un processo produttivo concorre a determinare la qualità del prodotto finito, sicurezza per i consumatori, efficienza dei processi produttivi, durata degli impianti e delle attrezzature, costi di manutenzione. Dunque, valutare la qualità delle forniture idriche è un aspetto molto importante. La qualità dell'acqua costituisce un prerequisito igienico-sanitario fondamentale anche nel piano di autocontrollo HACCP; infatti, gli operatori del settore sanitario devono garantire che essa non rappresenti un fattore di rischio per la sicurezza dei prodotti alimentari e devono adottare specifiche procedure di controllo delle acque utilizzate, in relazione alla tipologia di approvvigionamento idrico, alla finalità di utilizzo dell'acqua e alle caratteristiche tecniche degli impianti della rete aziendale. I titolari di aziende alimentari sono chiamati ad accertarsi che l'acqua usata durante la preparazione di cibi e bevande, rispetti, nel punto di consegna, i valori di parametro fissati nell'allegato I del Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 – “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”, in seguito modificato e integrato dal Decreto Legislativo 2 febbraio 2002, n. 27 ([crea.gov.it/documents/20126/0/Campania\\_Conta\\_2017.pdf/cdf55058-6e29-645d-2da9-8393ebd8d8a2?t=1552309033426](http://crea.gov.it/documents/20126/0/Campania_Conta_2017.pdf/cdf55058-6e29-645d-2da9-8393ebd8d8a2?t=1552309033426)).



*Figura 1. Lavaggio alimenti presso industria agroalimentare.*

## 1.2 I pesticidi

Nel secondo dopoguerra i fertilizzanti chimici hanno dato vita ad una esplosione delle rese per ettaro in gran parte del mondo, insieme alla meccanizzazione, al miglioramento genetico, allo sviluppo dei sistemi di irrigazione, agli agro-farmaci a difesa delle coltivazioni. A queste tecnologie si sono aggiunte quelle che hanno aiutato l'industria alimentare a combattere lo spreco migliorando la qualità e la conservazione dei cibi. Per garantire la disponibilità, la sicurezza e la salubrità delle produzioni vegetali sono stati sviluppati prodotti in grado di fornire il nutrimento alle colture e limitare e respingere microrganismi, animali o vegetali nocivi, salvaguardando la salute della pianta e con essa la salute dell'uomo: i fertilizzanti e i pesticidi. I mezzi tecnici per la nutrizione e la difesa consentono di ottenere raccolti più abbondanti e, dunque, alimenti a minor costo e permettono produzioni maggiormente svincolate dalla stagionalità. I pesticidi svolgono un ruolo fondamentale anche nel garantire un'adeguata igiene alimentare evitando, ad esempio, le contaminazioni da ratti, topi, mosche o altri insetti dopo la raccolta. I fertilizzanti e i pesticidi, costituiscono una delle più importanti risposte alla crescente domanda mondiale di prodotti alimentari, senza cui non sarebbe oggi possibile fare agricoltura. È grazie al corretto impiego di queste sostanze che si è verificato un incremento della produttività e dell'efficienza agricola. Senza i pesticidi si presenterebbe il rischio di una riduzione della produzione agricola, a causa delle diverse malattie delle piante, con tutta una serie di conseguenze sulla salute dell'uomo, degli animali e sull'andamento dell'economia. Inoltre, i prodotti fitosanitari sono sostanze chimiche utilizzate al fine di proteggere le piante e conservarne i prodotti vegetali impedendo che le coltivazioni agricole vengano attaccate da vari agenti infestanti. Unitamente ai biocidi, applicati per la difesa della salute e la preservazione dei materiali, queste sostanze sono complessivamente note come pesticidi. Il termine pesticida, derivante dalla traduzione inglese "pesticide", non viene riconosciuto dalla legislazione europea o italiana, tuttavia, è entrato nel linguaggio comune, a causa dell'ampio utilizzo che ne è stato fatto da parte dei media.

Secondo la direttiva del Consiglio 91/414/CEE per "prodotti fitosanitari" si intendono le sostanze attive ed i preparati (contenenti una o più sostanze attive), nella forma in cui vengono forniti all'utilizzatore, destinati a: proteggere i vegetali o i prodotti vegetali da tutti gli organismi nocivi o a prevenirne gli effetti (anti -parassitari); favorire o regolare i processi vitali dei vegetali, con esclusione dei fertilizzanti (fitoregolatori); conservare i prodotti vegetali, (es. antigermoglianti della patata e della carota) con l'esclusione dei conservanti disciplinati da particolari disposizioni; eliminare le piante indesiderate (diserbanti). Se da un lato sono indiscussi l'utilità ed i benefici che i fitosanitari comportano, dall'altro, l'uso di queste sostanze è strettamente

legato a possibili effetti negativi sull'uomo e sull'ambiente. Proprio per questo motivo, la Comunità Europea si è impegnata per l'utilizzo "sostenibile" dei fitosanitari, nel giugno 2006. L'attenzione a livello europeo si è concentrata in particolare sulla fase intermedia del ciclo di vita dei prodotti fitosanitari, quella del loro impiego, finora non sufficientemente considerata dalla normativa. Obiettivi della strategia sono minimizzare i rischi derivanti dall'uso dei fitosanitari, migliorare i controlli sulla distribuzione e l'impiego, ridurre i livelli di sostanze attive pericolose e incentivare l'uso di buone pratiche agricole che portino a un impiego ridotto di queste sostanze. (G Cantelli Forti, 2005). Nella maggior parte dei casi, i fitosanitari vengono sintetizzati artificialmente, oppure elaborati a partire da sostanze organiche naturali come la nicotina e il piretro. La classificazione di tali prodotti viene fatta sulla base degli organismi bersaglio o del composto chimico che li caratterizza:

**Erbicidi:** possono essere selettivi o meno a seconda che uccidano indistintamente tutte le specie vegetali su cui vengono sparsi o soltanto alcune varietà specifiche. Tra gli erbicidi più diffusi, quelli di natura organica sono costituiti principalmente da solfati di rame, clorati e arsenicati di sodio; tra quelli di origine organica, ad esempio, il dinitrobutifenolo e il dinitrocresolo.

**Insetticidi:** sono caratterizzati da alta solubilità nei lipidi e da un'alta persistenza nell'ambiente. Sono i più discussi, a causa degli effetti negativi causati all'ambiente. Uno dei più noti, ormai quasi totalmente in disuso, è il DDT (diclorodifeniltricloroetano), ampiamente utilizzato negli anni '40 e '50 contro diversi insetti patogeni e dannosi, e poi abbandonato a causa dei gravissimi danni ecologici causati. Questo composto, infatti, assorbito dagli insetti a cui è destinato, contamina anche gli animali che si nutrono di insetti, e risale via via tutti i livelli trofici della rete alimentare, danneggiando numerose specie animali.

Altri insetticidi, ad esempio, quelli del gruppo degli esteri fosforici (Parathion e Malathion) si decompongono dopo un certo intervallo di tempo, impedendo che la loro tossicità si trasmetta a organismi diversi da quelli a cui erano destinati. Tuttavia, prima della decomposizione, sono altamente tossici, non solo per gli insetti, ma anche per l'uomo. Attualmente, gli strumenti più promettenti nella lotta antiparassitaria mirata agli insetti sono le nuove generazioni di biopesticidi. Statistiche comunitarie in materia di prodotti fitosanitari per il triennio 2011-2013 (Eurostat, 2018) mostrano che i maggior quantitativi di fitofarmaci vengono venduti in Francia, Spagna ed Italia. Dai dati si osserva come l'Italia, con i suoi 61.818.303 Kg costituisce circa un quinto del totale di fitofarmaci venduti in tutta la comunità europea. Il DPR 290/2001 (articolo 42, comma 3) stabilisce che in Italia, al fine di rendere possibile un monitoraggio sull'impiego

dei prodotti fitosanitari, gli acquirenti e gli utilizzatori sono obbligati a compilare e conservare in azienda un diario di campo (registro dei trattamenti o “quaderno di campagna”), dove annotare tutti i trattamenti effettuati nel corso della stagione di coltivazione.

L'utilizzo dei fitosanitari, reso finora indispensabile per migliorare la quantità e la qualità delle produzioni agricole, comporta allo stesso tempo problemi per l'ambiente e per l'uomo, in quanto può interagire con le sostanze xenobiotiche attraverso la pelle, l'apparato digerente e l'apparato respiratorio. L'effetto nocivo dell'assunzione involontaria di una certa quantità di fitosanitario può manifestarsi sotto forma di tossicità acuta, cioè a breve distanza di tempo, oppure sotto forma di tossicità cronica, nel caso in cui l'azione dannosa si manifesta a lunga data. Quest'ultimo caso è da attribuire all'accumulo graduale e costante di piccole quantità di veleno, singolarmente non letali, ma che con il tempo possono diventare tossiche. La tossicità acuta dei fitosanitari costituisce un rischio che riguarda principalmente gli addetti alla produzione e gli agricoltori in quanto il loro utilizzo può comportare un rischio chimico più o meno elevato per i lavoratori in funzione della tossicità e delle proprietà pericolose intrinseche del prodotto fitosanitario, dei livelli e della durata dell'esposizione, del grado di assorbimento, nonché delle modalità e della frequenza d'uso. Tutti gli acquirenti ed utilizzatori di prodotti fitosanitari devono adottare le misure preventive e protettive più avanzate al fine di tutelare la propria salute, la propria sicurezza e quella dei propri collaboratori. Risulta necessario ricordare che la pericolosità di un prodotto fitosanitario non dipende unicamente dalla sostanza attiva contenuta, in quanto nei formulati possono essere contenute altre sostanze pericolose, come ad es. alcune molecole solventi come lo xilene e il toluene. In particolare, l'impiego e quindi l'esposizione ripetuta e multipla a diversi prodotti fitosanitari possono comportare rischi per la salute e la sicurezza degli operatori agricoli, anche di natura sinergica. I pesticidi possono entrare in contatto con l'organismo sia per assorbimento cutaneo, grazie alla loro liposolubilità (organofosfati, carbammati, organoclorurati, DDT, lindano, aldrin e clordano) che per inalazione aerea o ingestione (piretroidi, erbicidi, clorofenoli). Età, sesso, stato nutrizionale, abitudini personali e variabilità genetica individuale influenzano grandemente la suscettibilità ai pesticidi. L'enzima paraoxonasi 1 (PON1) ha un ruolo fondamentale nella detossificazione di numerosi derivati dai pesticidi organofosforici e alcuni polimorfismi del gene PON1 possono aumentare la suscettibilità a tali pesticidi e influenzare il neurosviluppo in bambini in età scolare. È stato anche dimostrato che ridotte concentrazioni di enzima PON1 durante la gravidanza possono aumentare la suscettibilità di bambini alla neurotossicità da pesticidi organofosforici (Eskenazi et al., 2014). I pesticidi possono generare conseguenze negative per la salute della generazione successiva per esposizioni genitoriali (sia paterna che materna) anche avvenute prima del concepimento

(Kunkle, et al, 2014; Bailey et al 2014) Soprattutto nel caso delle esposizioni paterne, in particolare, il rischio può trasmettersi per alterazioni delle cellule germinali. Le principali modalità con cui può avvenire l'esposizione sono quindi: - esposizione professionale Può avvenire durante la produzione, il trasporto, la preparazione e l'applicazione di pesticidi. I principali fattori coinvolti in questo tipo di esposizione includono l'intensità di applicazione, la frequenza, la durata e il metodo, il rispetto delle norme di sicurezza, l'uso di dispositivi di protezione individuale, nonché i profili fisico-chimici e tossicologici dei pesticidi in uso. Anche membri della famiglia di coloro che utilizzano pesticidi possono avere notevoli rischi per sversamenti accidentali, perdite, usi non corretti di attrezzature e non rispetto della sicurezza e delle linee guida. - esposizione ambientale/residenziale È ampiamente documentato che vivere vicino ai luoghi in cui i pesticidi vengono utilizzati, fabbricati o smaltiti può aumentare in modo significativo l'esposizione umana per inalazione e contatto con aria, acqua e suolo. Di particolare rilievo è anche l'effetto "deriva": ovvero la dispersione aerea di particelle di miscela di pesticidi che non raggiungono il bersaglio, ma si diffondono nell'ambiente circostante. In presenza di coltivazioni intensive confinanti con residenze private o luoghi pubblici (scuole, asili, parchi ecc.) è possibile quindi la contaminazione dei residenti e della popolazione che vi si trova. Questo tipo di contaminazione è particolarmente importante se lo spargimento avviene con atomizzatori ed in condizioni di ventosità. L'ultimo rapporto "Pesticidi nelle acque" (ISPRA, 2016) evidenzia una "ampia diffusione della contaminazione" ed il rilevamento nelle acque superficiali e profonde di ben "224 sostanze diverse, un numero più elevato degli anni precedenti" con riscontro di ben 36 sostanze in unico campione. Il tema delle miscele di sostanze è particolarmente preoccupante in quanto: "la valutazione di rischio, infatti, nello schema tradizionale considera gli effetti delle singole sostanze, e non tiene conto dei possibili effetti delle miscele che possono essere presenti nell'ambiente. C'è la consapevolezza, sia a livello scientifico, sia nei consessi regolatori, che il rischio derivante dalle sostanze chimiche sia attualmente sottostimato". La situazione italiana- riportata nel rapporto di Legambiente "Pesticidi nel piatto" - mostra che in Italia il 36.4% dei campioni di frutta e verdura analizzati presenta residui e che sono in aumento (19,9%) i campioni con multiresiduo: addirittura 21 su un solo campione di the. Da queste ampie indagini emerge quindi che in oltre 1/3 degli alimenti che arrivano sulle nostre tavole sono presenti multipli residui di pesticidi e la presenza contemporanea di più sostanze - anche se ciascuna presente entro i "limiti di legge" - non può certo essere considerata scevra di rischi per la salute.

I pesticidi, da un punto di vista normativo, comprendono i prodotti fitosanitari (Reg. CE 1107/2009), utilizzati per la protezione delle piante e per la conservazione dei prodotti vegetali, e

i biocidi (Reg. UE 528/2012), impiegati in vari campi di attività (disinfettanti, preservanti, pesticidi per uso non agricolo, ecc.). In Italia, in agricoltura si utilizzano circa 130.000 tonnellate all'anno di prodotti fitosanitari come riportato sia dall'EUROSTAT che dall'Ispra nel 2018 (*figura 2*).

I pesticidi sono stati usati intensivamente per decine di anni portando ad una elevata persistenza ambientale e a capacità di bioaccumulo lungo le catene alimentari con effetti tossici ben documentati sul biota. I pesticidi rappresentano anche un potenziale pericolo per la salute dell'uomo; infatti, l'esposizione a livelli tossici di alcuni pesticidi può causare effetti negativi sul sistema nervoso centrale, sul sistema gastrointestinale, sul sistema riproduttivo, sul sistema immunitario, sul sistema respiratorio e sul sistema endocrino.

Tuttavia, ad oggi, è diventato ancor più rilevante il problema rappresentato dai prodotti di degradazione dei pesticidi, comunemente definiti "metaboliti", che possono dar luogo ad episodi di contaminazione di acque superficiali, sotterranee e di acque potabili, allo stesso modo dei loro composti parentali. Ciò che sembra evidente è che la contaminazione dovuta ai Metaboliti dei Pesticidi (MdP) mostra caratteristiche peculiari. Infatti, è stato rilevato che i MdP sono spesso presenti a livelli superiori alle Concentrazioni Massime Ammissibili (CMA) stabilite per i pesticidi, hanno spesso livelli superiori rispetto ai livelli dei composti parentali e soprattutto possono essere presenti in assenza dei composti parentali. Recenti studi in vitro hanno mostrato i potenziali effetti stimolanti o inibitori dei MdP sull'attività trascrizionale dei recettori nucleari, che sono i principali bersagli diretti degli Interferenti Endocrini. Gli interferenti endocrini sono sostanze in grado di interferire e alterare l'equilibrio ormonale. Questi composti possono provocare danni non trascurabili e spesso non evidenziabili nel breve termine. Essi, spesso, mimano l'azione degli ormoni e interagiscono con i loro recettori e sono classificati in tre categorie, a seconda della loro azione: alcuni mimano gli ormoni dando luogo a una stimolazione in eccesso; altri si legano a recettori all'interno di una cellula impedendo il legame con l'ormone endogeno; altri ancora interferiscono con la produzione o il controllo dell'uso di alcuni ormoni. Fino ad oggi è stato accertato, secondo una classificazione prodotta dall'Unione Europea, che sono 66 i MdP che interferiscono con il sistema endocrino mentre per altre 52 non esistono prove sufficienti per stabilire una classificazione adeguata. Nei processi di produzione, manipolazione e trasformazione degli alimenti, l'acqua rappresenta un elemento fondamentale e quindi la tutela della qualità delle acque destinate al consumo umano e di quelle utilizzate nelle industrie alimentari ha il fine di proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, garantendone la salubrità e la pulizia. La complessità del sistema qualità del settore agro-alimentare rende quindi necessario la ricerca di metodologie

ed indicatori innovativi per la ricerca di inquinanti ambientali che diventano sempre più complessi e di difficile rintracciabilità. Tra questi, si distinguono per l'elevata tossicità, cancerogenicità e azione antiestrogenica, i pesticidi e gli MdP.

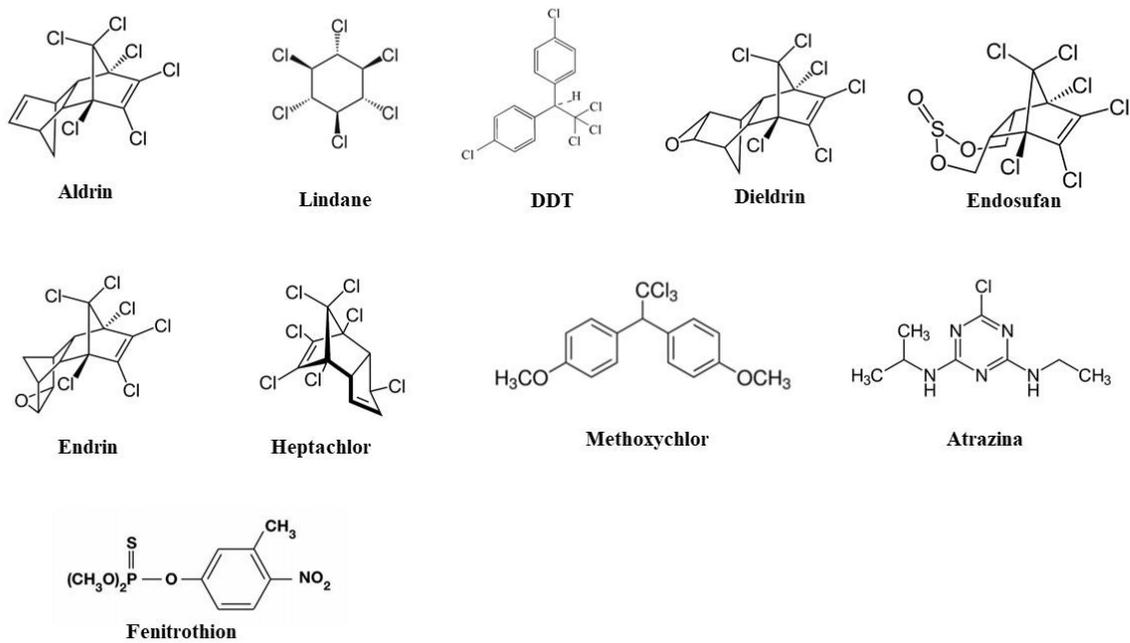


Figura 2. Alcuni tra i più importanti pesticidi studiati per la contaminazione delle acque.

### 1.3 I prodotti di degradazione dei pesticidi

Anche se la vendita ufficiale di pesticidi risulta calata di quasi il 12% dal 2001 al 2014 (Rapporto ISPRA, 2016), lo stesso trend non si riscontra ancora nei risultati dei monitoraggi; la contaminazione continua ad essere diffusa e cumulata, soprattutto a causa della persistenza di alcune sostanze che, insieme alle dinamiche idrologiche lente, rende i fenomeni di contaminazione ambientale difficilmente reversibili.

I pesticidi sono una presenza costante nelle acque italiane, soprattutto nelle zone di pianura e collina. Nel 2014, secondo gli ultimi dati disponibili, nelle acque superficiali italiane sono stati trovati pesticidi nel 64 % dei punti di monitoraggio e nel 34 % del totale dei campioni (ISPRA, 2016). Nelle acque sotterranee, sono risultati contaminati circa il 32 % del totale dei punti di monitoraggio e il 25,5 % del totale dei campioni.

I prodotti di degradazione dei pesticidi, si formano attraverso la degradazione chimica (es. fotolisi, reazioni di ossidazione e riduzione) o la degradazione biologica attraverso l'azione di microrganismi solitamente distribuiti nei primi centimetri del suolo (Cardeal et al., 2011). Di solito, i prodotti di degradazione dei pesticidi sono più tossici dei composti da cui derivano, e a causa dell'elevata polarità e idrofilia, possono raggiungere facilmente gli ambienti acquatici attraverso lisciviazione dal suolo (Farlin et al., 2013; Sun et al., 2019). Questi prodotti di degradazione rappresentano un grave rischio per la salute umana e potrebbero causare l'insorgenza di malattie che colpiscono i sistemi dermatologico, gastrointestinale, neurologico, immunitario, respiratorio, riproduttivo ed endocrino.

Gli erbicidi (e i loro metaboliti) sono le sostanze più trovate nelle acque superficiali, con il 55,7 % delle misure positive (*figura 3*). Nel 2014, rispetto agli anni precedenti, è aumentata in modo significativo la presenza di fungicidi e insetticidi. L'incremento dei fungicidi, rispetto al 2012, è del 72 % nelle acque superficiali e del 11 % in quelle sotterranee; per quanto riguarda gli insetticidi, gli incrementi relativi sono del 53 % nelle acque superficiali e del 30 % in quelle sotterranee.

Nelle acque, queste sostanze, anche in piccole quantità, possono agire in sinergia e molte di esse sono interferenti ormonali e metabolici, cancerogeni e distruttivi per vari organismi alla base della catena alimentare, quali i componenti dello zoo e fitoplancton. L'alterazione della base delle catene trofiche può determinare un effetto a cascata sugli organismi di maggiori dimensioni.

Nel 2014 nelle acque superficiali il glifosato e il suo metabolita AMPA, al momento purtroppo cercati solo in Lombardia e Toscana, sono presenti con frequenze rispettive del 19,1 % e del 41 %, risultando il complesso di sostanze più diffuso. Gli erbicidi terbutilazina-desetil, terbutilazina e metolaclor sono stati rilevati con frequenze da circa il 12 % al 15,1 % dei campioni; l'insetticida imidacloprid, il cui rilevamento è in crescita rispetto agli anni passati, è ritrovato con una frequenza del 30,7 %. Si tratta di tutte sostanze tossiche o altamente tossiche per la vita acquatica. Nelle acque sotterranee, l'erbicida metolaclor esa è la sostanza più rinvenuta, con il 35,3 %, segue il fungicida fludioxonil con il 12,5 % di ritrovamenti nei campioni. L'insetticida imidacloprid, anche per questo compartimento idrico, è tra le sostanze più ritrovate con circa l'11,5 % dei campioni; superano il 9 % dei ritrovamenti le sostanze: ciproconazole, tiametoxan, tetraconazolo, oxadixil, carbendazim, terbutilazina-desetil, fluazifop e triadimenol, ciascuno dei quali tossico per almeno un comparto fondamentale dei sistemi ecologici. Nel corso dell'ultimo triennio, in 25 stazioni di monitoraggio si sono avute analisi con residui di fitofarmaci in concentrazione uguale o superiore a  $0,10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  (limite nelle acque potabili in base al D. Lgs. 31/2001). I casi più frequenti riguardano cinque fungicidi: dimetomorf, tebuconazolo, iprovalicarb, metalaxil, fluopicolide, utilizzati principalmente in viticoltura; gli erbicidi metolaclor e terbutilazina, noti da tempo per il loro spiccato potenziale di contaminazione delle acque e l'insetticida imidacloprid, un neonicotinoide il cui uso è stato sospeso per un certo periodo di tempo, a causa dei possibili effetti negativi nei confronti delle api. Le acque di superficie italiane risultano, inoltre, fortemente contaminate da prodotti che attualmente sono stati revocati a causa della loro tossicità e da numerosi loro metaboliti di cui, all'entrata in commercio di molti prodotti, ben poco si sapeva. Sono, ad esempio, molto diffusi i metaboliti dell'Atrazina, sostanza proibita dall'11/05/2004, il cui metabolita 2-Idrossi Atrazina è ancora presente nel 66,7 dei punti di monitoraggio delle acque superficiali e nel 33,8 di quelli delle acque sotterranee dove è stato cercato. Aldicarb, revocato il 22/10/2003, è segnalato nel 20,7 % dei punti di monitoraggio delle acque superficiali in cui è stato cercato e nell'8,8 di quelle sotterranee; ampiamente diffusi anche i metaboliti Aldicarb Sulfone (rispettivamente 18,5 % e 11,5 %) e Aldicarb sulfossido (14,8 % dei punti di monitoraggio delle acque superficiali). I limiti per i prodotti di degradazione sono uguali a quelli per i pesticidi, pari a  $0,1 \mu\text{g/l}$  e  $0,5 \mu\text{g/l}$ , rispettivamente per la singola sostanza e per la somma delle sostanze. Lo stato di qualità delle acque sotterranee viene stabilito confrontando le concentrazioni medie annue con i suddetti limiti.



*Figura 3. L'utilizzo di pesticidi in agricoltura ha causato aumento della concentrazione dei prodotti di degradazione.*

## 1.4 Gli interferenti endocrini

Gli interferenti endocrini sono un gruppo eterogeneo di sostanze potenzialmente in grado di causare gravi danni alla salute (*figura 4*). Proprio la loro numerosità e differenza rende complesso lo studio degli effetti sull'uomo. Oggetto di dibattito e controversie, sono analizzati alla luce del rapporto prodotto dal Comitato nazionale per la biosicurezza, le biotecnologie e le scienze della vita (CNBBSV) della Presidenza del Consiglio. Col termine di interferenti endocrini si indicano molti contaminanti ambientali, una vasta categoria di sostanze o miscele potenzialmente in grado di alterare la funzione del sistema endocrino e causare effetti avversi sulla salute di un organismo o della sua progenie. Gli interferenti endocrini sono in grado di legarsi come agonisti o antagonisti ai recettori di vari ormoni (cioè di mimarne o impedirne l'azione), per esempio ai recettori degli ormoni steroidei o degli ormoni tiroidei, o eventualmente interferire in vario modo e tramite differenti meccanismi con questi recettori, addirittura arrivando a eliminarli del tutto. L'Unione europea ha selezionato 564 sostanze sospettate di essere interferenti endocrini. Di queste, 147 possono essere persistenti nell'ambiente o prodotte in grandi volumi; solo di 66 sostanze è stato provato che possano agire davvero come interferenti endocrini, mentre di 52 c'è solo qualche prova che siano potenziali interferenti endocrini. Ecco una guida dei principali interferenti endocrini e delle possibili fonti a cui sono più spesso associati (fonte: «Interferenti endocrini, ambiente e malattie dell'uomo», Comitato nazionale per la biosicurezza, le biotecnologie e le scienze della vita).

**IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI:** gas di scarico, fumo di sigaretta ma anche carne alla griglia o alimenti affumicati; **BENZENE:** gas di scarico e sigarette, incendio di boschi e residui agricoli; **FTALATO:** PVC ma anche smalti per unghie, adesivi, vernici; **DIOSSINA:** combustione di rifiuti, soprattutto plastici; i prodotti alimentari più esposti al rischio di contaminazione con diossina sono il burro e i pesci grassi, come quello azzurro e il salmone, il latte e i suoi derivati; **POLICLOROBIFENILI:** prodotti da processi industriali, si trovano principalmente in latte, burro, uova, pesce; **PERFLUORATO:** plastiche, carta, fibre tessili e pellame, schiume antincendio, cosmetici, casalinghi; **BISFENOLO A:** giocattoli, bottiglie, attrezzature sportive, dispositivi medici e odontoiatrici, lenti per gli occhiali, supporti ottici, elettrodomestici, caschi di protezione e otturazioni dentarie, rivestimento di lattine per alimenti e bevande; **ACIDO PERFLUOROCTANICO:** teflon, pentole e padelle anti-aderenti; **OCTILFENOLO E NONIFENOLO:** ne sono state trovate tracce in 6 tipi di pesce pescato nel Mar Tirreno (pannocchia, polpo, acciuga, sgombro, sarago, mormora, triglia e

tonno); è poi presente nei detersivi per tessili, nei prodotti di pulizia eliminati con le acque di scarico, nei cosmetici; ALCHILFENOLI: shampoo, cosmetici, spermicidi, detersivi, prodotti ortofrutticoli o confezionati in plastiche e pellicole; TRIBUTILTINA: pesticidi, conservanti per il legno e i tessuti, sistemi di condizionamento dell'aria; DIETILESILFTALATO: cartoni per asporto delle pizze, prodotti plastici; ACIDO PERFLUOROCTANICO: teflon, pentole e padelle anti-aderenti; GENISTEINA: può considerarsi un alleato dell'essere umano, soprattutto nell'azione di contrasto agli effetti della menopausa (si trova nei semi di soia e in altri legumi, per esempio nei ceci, nelle lenticchie e nelle fave, nel trifoglio rosso, nei cereali integrali e nel finocchio).

È possibile suddividere l'intero panorama degli interferenti endocrini in tre ampie categorie:

**AGONISTI DEGLI ORMONI**, la cui assunzione comporta, direttamente o indirettamente, una iperstimolazione ormonale. I fitoestrogeni e le sostanze che stimolano la tiroide rientrano in questa categoria.

**ANTAGONISTI DEGLI ORMONI**, capaci di interagire con recettori ormonali impedendone, direttamente o indirettamente, la loro attivazione; appartengono a questo gruppo, per esempio, sostanze ad azione antiestrogenica e antiandrogenica.

**MODIFICATORI DEL METABOLISMO**, capaci di interferire con la normale secrezione ormonale endogena o con la normale azione degli ormoni, incluso il loro trasporto nel sangue, processamento e degradazione ed eliminazione. Possono essere incluse in questa le sostanze che stimolano il metabolismo epatico o capaci di legarsi agli ormoni circolanti.

Queste sostanze possono causare inquinamento del suolo, delle acque, dell'aria, del territorio e, naturalmente, coinvolgere anche la catena alimentare, con potenziali rischi per la salute dei cittadini proprio per la loro natura ubiquitaria. Le vie di esposizione sono quindi molteplici: possono essere inalate, assorbite con gli alimenti o persino attraverso la pelle. Tutti i composti elencati possono teoricamente provocare danni all'organismo, spesso non immediatamente percepibili, perché in dosi minime non producono effetti di tossicità acuta. Queste interferenze possono, sempre teoricamente, provocare difetti alla nascita e altri disturbi dello sviluppo, in particolare difficoltà di apprendimento, disturbo da deficit di attenzione, problemi cognitivi, problemi di sviluppo sessuale, femminilizzazione del sesso maschile. Gli studi su modelli animali supportano tali ipotesi ma i dati sull'uomo sono spesso ancora inconcludenti. Negli animali, gli interferenti endocrini possono agire sul sistema ormonale e compromettere la riproduzione. In alcuni casi è stato dimostrato un rapporto di causa-effetto nella fauna selvatica e anche in animali di laboratorio. Attualmente, non è ancora stato dimostrato che gli interferenti

endocrini presenti nell'ambiente possano compromettere la riproduzione negli animali selvatici. Un aumento dei casi di disturbi riproduttivi, di alcuni tipi di cancro, di malattie metaboliche come l'obesità e il diabete e le malattie cardiovascolari è stato messo in relazione alla presenza di interferenti endocrini. Nei fatti non è stato possibile documentare una relazione causale tra l'esposizione a una sostanza con attività endocrina e l'effetto sull'organismo umano. Occorrono ulteriori ricerche per eseguire una valutazione completa dei rischi, in particolare per quel che concerne gli effetti tossici a bassa concentrazione e l'effetto-«cocktail». Alcuni interferenti endocrini noti sono già disciplinati dalla legislazione per motivi che esulano dalla loro attività ormonale (tossicità generale, cancerogenicità, tossicità riproduttiva). La notevole eterogeneità dei composti inclusi tra gli interferenti endocrini contribuisce a ostacolare l'identificazione di un meccanismo d'azione comune.

**CANCRO DELLA TIROIDE:** le prove scientifiche di associazione fra inquinamento ambientale e sviluppo dei tumori della tiroide sono ancora limitate. Esistono solo dati circa l'impatto dell'esposizione a determinate categorie di inquinanti sul profilo ormonale tiroideo e sullo sviluppo di tireopatia autoimmune. La dimostrazione di un probabile ruolo degli interferenti endocrini nello sviluppo del cancro tiroideo è invece ancora teorica e non supportata da prove sufficienti. **TUMORI IPOFISARI:** piccoli studi epidemiologici hanno ipotizzato un ruolo dell'inquinamento ambientale nei tumori ipofisari, ma anche in questo caso le prove non sono sufficientemente solide dal punto di vista scientifico. **OBESITÀ:** gli interferenti endocrini possono interferire con il metabolismo e favorire l'obesità che, a sua volta, è un fattore di rischio per lo sviluppo di tumori.

Bisfenolo A (BPA), tributilina (TBT), dietililftalato (DEHP), nonilfenolo (alchilfenolo di sintesi), genisteina, ftalato, composti perfluoroalchilici (PFC), acido perfluorottanico (PFOA) sono tra i principali prodotti chimici che svolgono un'azione come interferenti endocrini obesogeni. Sulla base dei dati presenti in letteratura, si ritiene che gli interferenti endocrini obesogeni possano predisporre gli individui ad aumento di peso, in particolare se l'esposizione si verifica durante periodi particolarmente sensibili quali i primi anni di vita. **FERTILITÀ:** è stato ampiamente dimostrato nel modello animale che l'esposizione agli interferenti endocrini in epoca prenatale può causare una serie di disturbi correlati come anomalie dello sviluppo cerebrale, del cuore, della mammella e degli organi sessuali, disordini di sviluppo del sistema nervoso centrale, disordini di sviluppo del sistema immunitario. Antiandrogeni, xenoestrogeni e diossine sono gli interferenti endocrini più analizzati nell'ambito della salute riproduttiva maschile, ma la lista delle sostanze che possono avere effetti sulla fertilità e sul tratto genitourinario è in costante aumento. I risultati di una recente metanalisi suggeriscono che il ruolo dei singoli interferenti

endocrini sia probabilmente minore di quanto supposto, mentre l'effetto «cocktail» derivante dall'esposizione di più agenti sia più verosimilmente causa di alterazioni significative. Gli studi sugli effetti degli interferenti endocrini sulla qualità dello sperma non sono conclusivi, anche se nel modello animale si nota una diminuzione della qualità dello sperma nei soggetti esposti a interferenti endocrini. Analoghe alterazioni sono state ipotizzate (ma non dimostrate in modo conclusivo) a carico della salute riproduttiva femminile. In sostanza, le conoscenze sul funzionamento dei sistemi ormonali maschili e femminili e sui meccanismi di azione dei più comuni interferenti endocrini supportano l'ipotesi che vi sia una interazione possibile, ma i dati ottenuti dagli studi sull'uomo sono ancora insufficienti per pronunciarsi.



*Figura 4. Molte sostanze di uso quotidiano si comportano come interferenti endocrini, compresi i pesticidi e i rispettivi prodotti di degradazione.*

# CAPITOLO 2

## Obiettivi del Progetto

### 2.1 Obiettivi generali

Il presente progetto di dottorato ha come obiettivo generale il miglioramento del sistema qualità dell'industria agroalimentare. L'attività di ricerca proposta è perfettamente coerente sia con la traiettoria di sviluppo individuata dalla Research and Innovation Strategies for Smart Specialisation (RIS3) Campania inerente l'agrifood, la sicurezza alimentare e lo sviluppo qualitativo delle filiere agroalimentari territoriali che con le traiettorie inerenti le tecnologie di analisi di laboratorio (biotecnologie) e protezione dell'ambiente, delle risorse e della salute umana.

### 2.2 Obiettivi specifici

- 1) Mettere a punto nuove e più sensibili tecnologie analitiche specifiche per la determinazione quali-quantitativa dei MDP nella matrice acqua.
- 2) Mappare questi inquinanti nelle acque superficiali e profonde della Regione Campania.
- 3) Integrare il sistema qualità dell'industria agro-alimentare campana attraverso l'utilizzo di tecniche analitiche innovative per la ricerca di inquinanti emergenti ed in particolare dei MDP.
- 4) Proporre aggiornamenti legislativi sui valori limite e sulle metodologie da utilizzare per valutare e incrementare il sistema qualità dell'industria agro-alimentare, allo scopo di adeguare gli schemi regionali alla normativa europea.

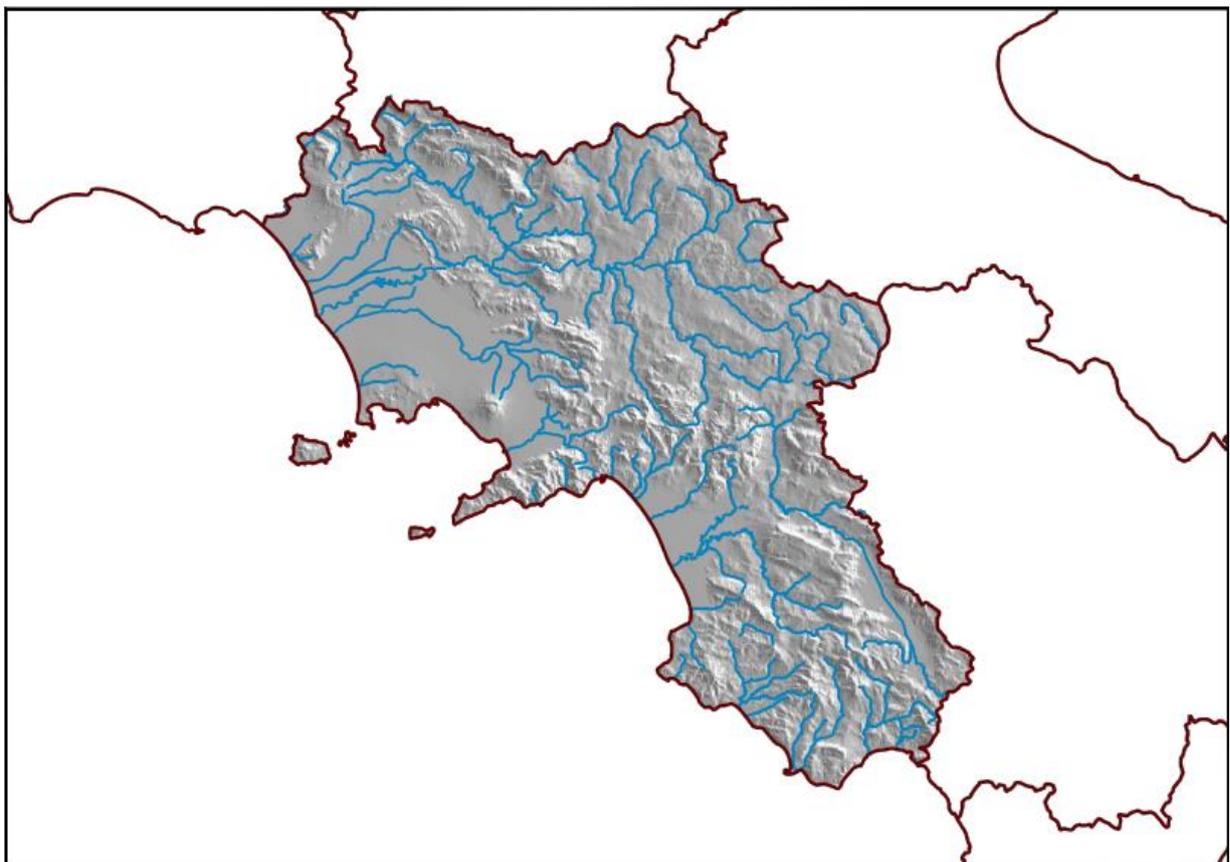
# CAPITOLO 3

## Materiali e metodi

### 3.1 Area di studio: la regione Campania

La regione Campania si trova nel Sud Italia e copre un'area di 13.590 km<sup>2</sup> (Eurostat, 2020). I dati risalenti al 31 agosto 2020 indicano che in Campania vivono circa 5 milioni e 800.000 persone con una densità abitativa di 429 abitanti per chilometro quadrato (Km<sup>2</sup>) (Eurostat, 2020). La Campania è caratterizzata da un clima mediterraneo con inverni freddi ed estati secche in quanto è circondata dall'Appennino a ovest e dal Mar Tirreno a est (Ducci e Tranfaglia, 2008). Le precipitazioni si verificano principalmente nel periodo compreso tra ottobre e maggio, con una piovosità media annua di 845 mm/anno. In particolare, nella parte centrale della dorsale appenninica si registrano le precipitazioni medie annue più elevate, con valori superiori a 1100 mm/anno (Minolfi et al., 2016), mentre le precipitazioni medie annue inferiori si registrano lungo le pianure costiere e nella parte nord-orientale con valori pari a 600–700 mm/anno (Minolfi et al., 2016). La regione Campania è caratterizzata principalmente da tre tipologie di scenari geografici: 1) l'Appennino, 2) le pianure costiere alluvionali e piroclastiche dei fiumi Garigliano, Volturno e Sele e 3) colline e valli prevalentemente costituite da sedimenti impervi e suoli vulcanici (Ducci et al., 2019; Ducci et al., 2020). Questa complessa struttura geologica influenza la circolazione delle acque sotterranee (Tufano et al., 2020). La Campania è la regione in cui l'agricoltura rappresenta una delle attività più importanti e i prodotti più coltivati sono l'ortofrutta, ipotizzando l'utilizzo di una grande quantità di pesticidi (Qu et al., 2016.) Secondo l'ultimo Rapporto ISPRA sullo stato di contaminazione delle acque superficiali e sotterranee derivante dall'uso di pesticidi, in Italia la vendita di pesticidi è diminuita nell'ultimo decennio (ISPRA, Rapporto Nazionale pesticidi nelle acque, 2020). Tuttavia, in alcune regioni le vendite di pesticidi superano la media nazionale di vendita di 4,3 kg/ha; tra queste regioni troviamo anche la Campania dove la distribuzione regionale dei pesticidi venduti per Superficie Agricola Utilizzata nel 2018 è stata pari a 7,6 kg/ha (ISPRA, Rapporto Nazionale pesticidi nelle acque, 2020). Per questo motivo è molto importante monitorare la qualità delle acque di questa regione. Tutto il territorio regionale della Campania trae vantaggio, oltre che dell'esposizione al mare, dalla presenza di ampie e profonde valli, che dalle pianure litoranee si incuneano fra le montagne, facilitando la penetrazione degli influssi di origine marittima. Il clima presente nel territorio consortile in linea

di massima ha caratteristiche mediterranee, con una fase estiva secca e un massimo delle precipitazioni in autunno, che vanno a scemare in primavera ed in inverno. Si segnala una temperatura media massima di circa 21°C con un picco massimo di circa 36,5°C ed una temperatura media minima di 11°C con un picco minimo di -2,2°C. All'interno di tale clima mediterraneo si possono individuare, secondo il sistema proposto da Thornwaite, tre fasce climatiche ben definite: una fascia costiera molto influenzata dalla presenza del mare; si rilevano le temperature in media più elevate (sia estive che annue) ed un clima da umido a subumido; una seconda fascia intermedia che comprende i rilievi oltre i 150 metri circa, gran parte della penisola sorrentina, le pianure interne, la zona pedemontana dei rilievi di Gragnano e Castellamare; tale fascia si caratterizza per la mitezza delle temperature e per il clima umido; un'ultima fascia (zona più elevata) dove si riscontrano temperature un po' più fresche e clima umido. Per quanto riguarda le precipitazioni sono riportate come somma mensile della quantità di acqua, sotto forma di pioggia, neve e grandine fuse in mm. Dai dati medi delle diverse stazioni si osserva che il clima è caratterizzato da valori di piovosità con media annuale di 884 mm. Il mese più piovoso è novembre con 126 mm, mentre il mese meno piovoso è luglio con 16 mm.



*Figura 5. La regione Campania presenta numerose riserve d'acqua di falda e di superficie.*

### 3.2 Campionamento acque di falda

Il campionamento è nell'insieme una procedura che annovera una serie di operazioni di campo volte a prelevare un'aliquota d'acqua che possa considerarsi rappresentativa dell'acquifero di cui si vuole conoscere lo stato di qualità chimico-fisico. Pertanto è essenziale che le procedure di prelievo, conservazione, trasporto, del campione siano idonee a mantenere intatta la sua rappresentatività sino al momento dell'analisi. Infatti, all'interno della falda, l'acqua stagnante potrebbe essere soggetta a fenomeni chimico-fisici che non riguardano l'acquifero. Inoltre, è possibile che si verifichino perdite di composti volatili dalla colonna d'acqua, miscele con l'ossigeno atmosferico, adsorbimento di sostanze sulle pareti della falda o sul dreno che alterando il campione inficerebbero la qualità delle analisi. Per ovviare a questi inconvenienti, ogni campionamento deve essere preceduto da uno spurgo che solitamente viene eseguito con pompe a bassa portata (qualche litro al minuto) poiché consentono di rimuovere l'acqua senza mobilizzare particelle di terreno che finirebbero per intorbidire il campione. Le consolidate tecniche d'idrogeologia applicata alle tematiche ambientali annoverano tre procedure di spurgo basate su altrettanti criteri: a) Metodo del volume del piezometro (volumetrico): rimozione di una quantità di acqua compresa tra 3 e 5 volte il volume di acqua presente all'interno del piezometro in condizioni statiche. Questa procedura è in genere quella più utilizzata. b) Metodo del monitoraggio dei principali parametri chimico-fisici dell'acqua di spurgo. Il monitoraggio deve essere effettuato direttamente nel piezometro mediante sonde multi parametriche o abbinando una cella di flusso. c) Metodo dello spurgo a basso flusso (low flow purging), dove il termine basso flusso si riferisce alla velocità con cui l'acqua entra nella pompa. L'applicazione di questo metodo consente di ridurre i volumi di spurgo, le perturbazioni al sistema acquifero, la mobilizzazione di particelle di terreno e lo strappaggio di sostanze contaminanti eventualmente presenti in falda. Al termine dello spurgo può avere inizio il campionamento, che sarà anch'esso del tipo a basso flusso. Un'analisi critica dei metodi sopra elencati evidenzia che allo stato attuale, la metodologia più comune di campionamento prevede di spurgare il pozzo con pompe dotate di portate relativamente elevate in modo da rimuovere dai 3 ai 5 volumi di acqua e di provvedere in seguito al prelievo dei campioni, proprio come è stato fatto per il prelievo dei campioni di falda considerati per questo progetto. L'applicazione di questa metodologia induce nel campione elevati livelli di torbidità rendendone obbligatoria la filtrazione in campo o in laboratorio (in funzione del grado di torbidità e dei volumi prelevati). Infatti l'inclusione di particelle interstiziali normalmente immobili, nel campione in esame può portare ad una

sovrastima della concentrazione di alcuni elementi (es. metalli). Tutti i problemi legati alla torbidità possono essere mitigati tramite l'utilizzo della tecnica di spurgo e campionamento "Low-Flow" (a basso flusso) che associa nella fase di spurgo l'emungimento dell'acqua con basse portate ed il monitoraggio sino alla stabilizzazione di alcuni parametri caratteristici dell'acquifero (pH, T°, Conducibilità, potenziale redox, ossigeno disciolto, torbidità). Una tecnica intermedia prevede lo spurgo con un flusso scelto a discrezione dell'operatore ed il monitoraggio sino alla stabilizzazione dei parametri caratteristici dell'acquifero (pH, T°, Conducibilità, potenziale redox, ossigeno disciolto, torbidità). Per realizzare lo spurgo si possono utilizzare pompe sommerse o bailer. I bailer sono campionatori puntuali costituiti da un recipiente cilindrico (in PEAD o PVC per la loro inerzia chimica) che viene calato nel piezometro tramite un cavo o una corda. In particolare questi campionatori manuali sono dotati di una valvola di fondo costituita da una sfera libera di scorrere all'interno del campionatore che permette l'ingresso dell'acqua dal basso in fase di immersione e garantisce la tenuta durante la fase di risalita. Per ciò che concerne le pompe sommerse, quelle più diffuse sono costituite da un corpo cilindrico in acciaio/plastica (PVC). Nella pratica per lo spurgo/campionamento delle acque sotterranee raramente vengono impiegati i bailer mentre sono di uso comune le pompe elettriche sommerse. In particolare tra queste le più evolute consentono di regolare il flusso ottenendo portate molto basse, adatte al campionamento "low flow". La profondità massima consentita per il campionamento dipende dalla prevalenza della pompa. Questi tipi di pompa sono quelle che meglio si prestano ai campionamenti ambientali (anche di composti volatili) ed a brevi spurghi pre-campionamento ma non sono adatte a spurghi di acque eccessivamente torbide poiché i sedimenti in sospensione potrebbero intasare la pompa danneggiando le parti interne. Il numero dei campioni da prelevare in ciascuna campagna di indagine va stabilito di volta in volta in base alle esigenze del lavoro e alla disponibilità di una rete di monitoraggio. Durante il prelievo del campione la portata deve rimanere la stessa utilizzata durante lo spurgo o può essere leggermente modificata in caso si debba minimizzare l'aerazione, la formazione di bolle, il riempimento troppo turbolento del contenitore o la perdita di volatili dovuti a lunghi tempi di prelievo. Le portate più adatte sono quelle inferiori a 0.5 l/min.

La campagna di campionamento deve partire dal pozzo meno contaminato e passare man mano a quelli con livelli di contaminazione superiori. Il contenitore del campione sarà preparato in precedenza e scelto in base agli analiti da ricercare ed includerà, quando necessario, le sostanze atte alla conservazione del campione. Il campione d'acqua deve essere versato direttamente nel contenitore dal tubo di mandata della pompa avendo cura di far scorrere l'acqua lungo le pareti del contenitore con la minima turbolenza possibile. Prima di iniziare il riempimento del

recipiente o dei recipienti destinati a ciascun campione, questi devono essere “avvinati”, ossia sciacquati con l'acqua proveniente dal piezometro (dopo lo spurgo). L'avviamento avviene di norma sciacquando energicamente il recipiente per tre volte. Questa operazione assicura che il campione non venga in contatto con sostanze estranee eventualmente presenti nel recipiente o non venga diluito dai liquidi di risciacquo utilizzati per la sua pulizia. Il contenitore, immediatamente dopo essere stato riempito, deve essere etichettato e conservato. Può essere necessario aggiungere stabilizzanti nel caso in cui le analisi vengano effettuate dopo le 24 ore dal prelievo. Gli stabilizzanti devono essere trasferiti dal loro contenitore al contenitore del campione utilizzando pipette usa e getta in polietilene. Alla fine delle operazioni di prelievo e confezionamento del campione quest'ultimo deve essere conservato refrigerato. Deve essere annotata la temperatura esterna di prelievo del campione (T° ambiente). Durante il prelievo, nel caso siano presenti sedimenti in sospensione nel campione, le operazioni devono essere sospese riposizionando la pompa ad una quota superiore per eliminare o ridurre tale inconveniente al fine di evitare, il trascinarsi di materiale fine e quindi un eccessivo l'intorbidamento dell'acqua. È buona pratica inoltre l'utilizzo di macchina fotografica digitale che consente di rappresentare il Campionamento eseguito.

Le cinque province della Regione Campania sono state considerate per i campionamenti delle acque di falda da analizzare. In seguito al campionamento, sono stati ottenuti 1092 campioni rappresentativi di diverse zone della Campania, suddivisi per le province di Napoli, Caserta, Benevento, Avellino e Salerno, come riportato in tabella1, dove sono stati riportati anche i pesticidi ritrovati in concentrazioni maggiori rispetto ad altri.

*Tabella 1. Numero di campioni di acqua di falda nelle province della Regione Campania.*

<b>PROVINCIA DI CAMPIONAMENTO</b>	<b>NUMERO DI CAMPIONI</b>	<b>PESTICIDI RISCONTRATI</b>
NAPOLI	117	<i>Chlorpyrifos</i>
SALERNO	345	<i>Chlorpyrifos, Dichlorvos, Fenitrothion, Lindano</i>
AVELLINO	173	<i>Fenitrothion</i>
BENEVENTO	138	<i>Endosulfan, Dimetoato</i>
CASERTA	319	<i>Dimetoato</i>

### 3.3 Campionamento delle acque superficiali

Per il campionamento delle acque superficiali, in ogni sito sono stati prelevati campioni di acque con bottiglie di vetro da 2,5 L pre-pulite e chiuse con un dispositivo preparato in laboratorio, (IOC, 1984; Gómez-Gutiérrez et al., 2006; Triassi et al., 2019), trasferite in laboratorio e conservate a 4°C fino all'analisi. I campioni di acqua sono stati filtrati attraverso un filtro in fibra di vetro GF/F (47 mm x 0,7 µm; Whatman, Maidstone, UK) tenuto in stufa a 400°C durante una notte: il filtrato corrisponde alla fase disciolta (WDP), mentre i solidi trattenuti sul filtro rappresenta il particolato sospeso (SPM).

I filtri sono stati mantenuti al buio a -20°C fino all'analisi, invece per i campioni filtrati, conservati al buio a 4°C, le analisi sono state eseguite a circa 3-6 h dal campionamento.

Il campionamento delle acque superficiali ha riguardato le acque del fiume Volturno e si è svolto durante quattro stagioni, tra il 2017 e il 2018, precisamente a novembre 2017, febbraio, aprile e luglio 2018. I campioni sono stati raccolti alla foce del fiume e in altri punti distanti rispettivamente 500, 1000 e 1500 metri dalla foce del fiume in direzione nord, sud e ovest in modo da avere un'idea corretta dell'evoluzione della contaminazione a valle (figura 6).



Figura 6. Punti di campionamento nelle acque superficiali del fiume Volturno.

### **3.4 Estrazione e determinazione quali-quantitativa dei Pesticidi e dei Prodotti di degradazione**

Per l'estrazione e la successiva determinazione delle concentrazioni dei pesticidi e dei rispettivi prodotti di degradazione, i campioni di acqua (500 mL) sono stati filtrati con filtri in fibra di vetro (0,45  $\mu\text{m}$ ) e i filtrati ottenuti sono stati pre-concentrati tre volte con una pompa peristaltica a flusso costante di 7 mL/min mediante cartucce SPE Oasis HLB, pre-condizionati con 5 mL di acetone, 5 mL di acetonitrile e 10 mL di acqua Milli-Q. Dopo questa fase di caricamento le cartucce sono state asciugate per 5 minuti sotto flusso d'aria ed è stata eseguita l'eluizione con 4 mL di acetone e 4 mL di acetonitrile. I campioni sono stati essiccati sotto flusso di azoto e ridisciolti in 500  $\mu\text{l}$  di metanolo/acqua (1:1) per l'analisi mediante LC-MS/MS.

Le colonne utilizzate sono state equilibrate con solventi al fine di inumidire il polimero. Successivamente la soluzione di caricamento, contenete l'analita, è stata fatta percolare attraverso il polimero. L'analita ed alcune impurità sono state trattenute in colonna.

### **3.5 Gascromatografia e spettrometria di massa**

La gas cromatografia-spettrometria di massa, indicata con la sigla GC-MS, consiste in una tecnica analitica basata sull'utilizzo di un gascromatografo accoppiato a uno spettrometro di massa (*figura 7*). Il gascromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore. L'implementazione delle tecniche GC e MS richiede un adattamento delle caratteristiche della strumentazione cromatografica e spettrometrica per raggiungere un sufficiente grado di compatibilità. Le due tecniche associate possiedono quindi una capacità analitica notevolmente superiore rispetto alle singole metodologie usate separatamente. Il GC sfrutta le differenti proprietà delle varie specie chimiche presenti in una miscela gassosa per la loro separazione. Una volta che i singoli componenti della miscela sono stati separati, questi passano all'interno del MS dove vengono sottoposti a ionizzazione e conseguente frammentazione. Una rappresentazione schematica di un moderno GC/MS comprende: un cromatografo, uno spettrometro di massa e un sistema di raccolta ed analisi dei dati, il quale costituisce il sistema per l'analisi e la separazione (qualitativa e quantitativa) di miscele complesse. Il cromatografo consiste di un iniettore (auto-campionatore), un sistema per il controllo della temperatura della colonna e una linea di trasferimento che consente all'effluente della colonna di entrare nello spettrometro di massa. Lo spettrometro di massa consiste di una

camera di ionizzazione (sorgente di ioni), di un analizzatore di masse (analizzatore a quadrupolo) e di un rivelatore di ioni; il tutto viene mantenuto sotto vuoto mediante una pompa. Il gas di trasporto impiegato costituisce la fase mobile ed è solitamente un inerte (elio, argon, azoto); deve inoltre essere caratterizzato da purezza elevata e facilità di separazione. Il sistema di iniezione è finalizzato all'introduzione e alla vaporizzazione del campione, il quale viene trasportato in colonna dal carrier. La colonna capillare gascromatografica è il sito in cui avviene la separazione e consta di un tubo metallico o di vetro con diametro interno di 0,1 – 0,5 mm lungo decine di metri. È costituita da due fasi: una fase fissa, depositata lungo le pareti interne della colonna, e una fase mobile, ossia il carrier che attraversa la colonna. Lo spettrometro di massa è invece caratterizzato da un sistema di entrata, che conduce alla sorgente ionica, sede della ionizzazione delle molecole. Nell'analizzatore si ha la separazione degli ioni generati in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Segue poi il rivelatore, in cui gli ioni vengono raccolti ed i segnali inviati, dopo amplificazione, al registratore che converte le informazioni contenute nei segnali in uno spettro. Dalle analisi compiute al GC-MS si evincono due dati fondamentali per l'identificazione e la quantificazione di un composto incognito: 1) il tempo di ritenzione 2) lo spettro di massa. Si ottiene infatti un cromatogramma, ossia un istogramma che esprime l'abbondanza relativa delle specie in funzione del tempo di ritenzione. Ogni picco del cromatogramma corrisponde a un componente del campione iniettato, ed è contraddistinto da un'abbondanza relativa e da uno specifico valore del tempo di ritenzione. Quest'ultimo è un valore relativo, che dipende dal tipo di fase stazionaria, dalla lunghezza della colonna, dalla pressione del gas e dalla temperatura del forno. Utilizzando lo stesso sistema gascromatografico nelle stesse condizioni di analisi, il tempo di ritenzione rimane una caratteristica costante e fondamentale per l'identificazione di ogni molecola della miscela. L'analisi quantitativa viene effettuata integrando il picco risultante dalla corrente ionica totale di ogni analita identificato (TIC, Total Ionic Current). Il valore ottenuto viene confrontato con il valore dell'area del picco relativo allo standard interno oppure posto su una curva di taratura ottenuta dall'analisi di miscele gassose a concentrazione nota (standard). Nel gascromatografo utilizzato è installata una colonna capillare di 30 metri di lunghezza e diametro 0,25 micron. Sono installati due rivelatori, uno a caldo e uno a freddo per i basso bollenti. Il carrier utilizzato è elio. Il campione viene introdotto generalmente nella quantità di 0,5 microlitri con una siringa apposita (Hamilton, 5 $\mu$ L) e viene separato in colonna a seconda della temperatura e della compatibilità con la fase stazionaria (riempimento della colonna). La tecnica di iniezione usata è quella tradizionale: il campione viene introdotto nell'iniettore, dove viene vaporizzato (250°C) e ripartito in modo che solo una parte di esso vada nella colonna analitica mentre la restante parte viene eliminata dalla linea dello split. Il rapporto di split si

regola con la vite sinistra posta vicino all'iniettore e si misura con un flussimetro a bolle. Si sottolinea che più alto è il valore di splittaggio, meno campione iniettato va in colonna e migliore è la risoluzione dei picchi, col limite di non riuscire a rilevare un composto, se è presente in bassa concentrazione; nei vari test la quantità splittata è pari a 30 cc/min. Noi abbiamo affiancato il GC all'MS, che è, quindi, il nostro rivelatore: l'uscita della colonna va direttamente all'MS (attraverso la linea riscaldata che unisce le due unità). Il GC potrebbe comunque lavorare indipendentemente dall'MS; la programmata di temperatura del forno è comandata dal pannello di controllo digitale installato nella macchina stessa. Per la determinazione di tipologie di sostanze diverse è importante l'uso di programmate di temperatura opportune.



*Figura 7. Gascromatografia con spettometria di massa.*

### 3.6 Cromatografia liquida-spettrometria di massa

Le analisi sono state eseguite utilizzando Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000UHPLC accoppiato a TSQ Fortis Triple Quadrupole MS (figura 8). La separazione degli analiti è stata ottenuta mediante una colonna Acclaim C18 a fase inversa (granulometria 4  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4,6 mm). La fase mobile contiene acqua/metanolo (95:5) (grado LC-MS) come eluente A e metanolo/acqua (95:5) (grado LC-MS) come eluente B, ciascuno con 0,1% di acido formico/5 mM di formiato di ammonio. La temperatura della colonna è stata impostata su +25 °C, la portata a 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  e il volume di iniezione è pari a 2 ml. È stata eseguita un'eluizione in gradiente variando la proporzione del solvente A rispetto al solvente B: 0 min 2,0% B, 1 min 2% B, 2 min 50% B, 9 min 98% B, 12 min 98% B e 12,1 min 2% B. L'analisi totale per ciascun campione ha una durata di 17 minuti. Le impostazioni di ionizzazione e frammentazione sono state ottimizzate tramite iniezione diretta di soluzioni standard di pesticidi. La MS/MS è stata eseguita nella modalità di monitoraggio della reazione selezionata (SRM) con ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità positiva. Per ogni composto, due prodotti caratteristici sono stati monitorati gli ioni della molecola protonata  $[M + H]^+$ , il primo e quello più abbondante è stato utilizzato per la quantificazione (SRM1), mentre il secondo è stato utilizzato come qualificatore (SRM2). La validazione del metodo è stata eseguita al fine di valutare la qualità dei dati attraverso la determinazione di precisione, accuratezza, linearità, limite di rilevamento (LOD), limite di quantificazione (LOQ) e incertezza. Le stesse procedure di estrazione sono state applicate agli standard, ai bianchi e ai campioni per il controllo di sostanze interferenti. Lo standard surrogato utilizzato per l'analisi LC-MS/MS è la Terbutilazina (Dr. Ehrenstorfen). Questo standard è stato aggiunto ai campioni prima dell'estrazione per monitorare l'efficienza della procedura analitica. I LOD e i LOQ sono stati stimati come 3 e 10 volte il segnale/rapporto di rumore per ogni analita; in particolare, per i valori di LOD e LOQ sono compresi in range che vanno da 0,000375-0,000615 ng L<sup>-1</sup> e 0,00125- 0,00205 ng L<sup>-1</sup>, rispettivamente.



Figura 8. Cromatografia liquida-spettrometria di massa

# CAPITOLO 4

## Risultati e discussioni

### 4.1 Validazione dei metodi

La fase sperimentale è stata mirata principalmente all'ottimizzazione dell'estrazione, identificazione e quantificazione dei MdP. In particolare, il metodo di estrazione e determinazione quali-quantitativa è stato ottimizzato sulla base del fatto che gli MdP considerati presentano una complessa caratteristica ovvero essere quasi tutti composti idrossilati del pesticida parentale e quindi reagiscono con gli zuccheri presenti nelle matrici formando esteri che potrebbero portare ad una sottostima della quantità di MdP presenti. La suddetta fase sperimentale, è stata svolta presso i laboratori di chimica ambientale del Dipartimento di Sanità Pubblica (DSP) dell'Università "Federico II".

Sebbene altri metodi già noti in letteratura siano stati valutati, quelli descritti successivamente hanno mostrato una performance migliore (Climent et al., 2018; Poulier et al., 2015; Cruzeiro et al., 2016). Infatti, sono stati messi a punto metodi con i quali valutare le concentrazioni dei pesticidi e degli MdP attraverso l'utilizzo di Gascromatografia a spettrometria di massa (GC-MS) e Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC-MS). I metodi analizzati, sono stati validati in termini di precisione, accuratezza, linearità di risposta, LOD (Limite di determinazione), LOQ (Limite di quantificazione) e sensibilità. Attraverso opportune modifiche effettuate rispetto ai metodi trovati in letteratura, è stato possibile ottenere dei vantaggi dal punto di vista dell'utilizzo dei materiali con un abbassamento delle concentrazioni dei solventi utilizzati e quindi una diminuzione anche in termini di costi. Inoltre, un'ottimizzazione del set-up strumentale è stata effettuata per ottenere un metodo robusto ed affidabile.

Innanzitutto, è stato ottimizzato il metodo di estrazione: i campioni di acqua (2 L) precedentemente filtrati sono stati concentrati mediante estrazione in fase solida (SPE) utilizzando una cartuccia in fase polimerica da 100 mg dopo aver addizionato, come surrogato (50 µg/L) una soluzione di 1,3- dimetil-2-nitrobenzene (GC-MS) o metanolo (HPLC-MS). Dopo l'eluizione con 10 mL di etilacetato-esano (1:1) (GC-MS) o metanolo (HPLC-MS), l'estratto è stato sottoposto a tre sonicazioni da 15 minuti dopo aggiunta di 5 mL di diclorometano-metanolo (1:1) (GC-MS) o metanolo (HPLC-MS). Gli estratti recuperati, sono stati filtrati ulteriormente su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'eluato raccolto è stato fatto evaporare cautamente fino a secchezza in evaporatore rotante e/o sotto corrente di azoto a temperatura ≤ 40°C. Il residuo,

indicativamente, è stato ripreso con 0,5 mL di soluzione contenente lo standard interno (50 µg/L) e ed è stato iniettato al GC-MS o HPLC-MS a seconda del composto da rilevare. La quantificazione degli analiti è stata effettuata attraverso una retta di taratura per i pesticidi e i prodotti di degradazione che avesse un coefficiente di correlazione lineare  $R^2 > 0.995$  per tutti gli analiti stimati. Tale estrazione, ci ha permesso di ottenere i valori di LOD e di LOQ. Il calcolo del LOD, ovvero la minore concentrazione di un analita che può essere determinata ma non necessariamente quantificata, è stato effettuato utilizzando la deviazione standard e la pendenza della curva di calibrazione. In particolare, il valore è dato dalla media dei bianchi più 3 volte la deviazione standard ( $LOD = \mu_B + 3 \sigma_B$ ). Per quanto riguarda il GC-MS, sono stati ottenuti i seguenti valori: un range da 0,010 a 0,053 ng L<sup>-1</sup> nella fase del particolato sospeso e da 0,013 a 0,096 ng L<sup>-1</sup> nella fase disciolta. Per quanto riguarda l'HPLC-MS, sono stati ottenuti i seguenti valori: un range da 0,005 a 0,048 ng L<sup>-1</sup> nella fase del particolato sospeso; da 0,007 a 0,087 ng L<sup>-1</sup> nella fase disciolta. Il calcolo del LOQ, ovvero la minima concentrazione in cui l'analita può essere quantificato, è stato effettuato utilizzando la deviazione standard della risposta e la pendenza della curva di calibrazione. In particolare, il valore è dato dalla media dei bianchi più 10 volte la deviazione standard ( $LOQ = \mu_B + 10 \sigma_B$ ).

#### **4.1 Concentrazione dei Pesticidi e dei Prodotti di degradazione nelle acque di falda**

I campioni sono stati sottoposti ad un primo accertamento sulla presenza di fitofarmaci. Particolare attenzione è stata data ai seguenti pesticidi: Aldrin, a-BHC, b-BHC, d-BHC, g-BHC (Lindane), 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, Dieldrin, Endosulfan I, Endosulfan II, Endosulfansulphate, Endrin, Endrinaldehyde, Heptachlor, HeptachlorEpoxide (isomer B), Methoxychlor e ai pesticidi polari Atrazina e Fenitrothion, di cui è stato studiato il comportamento abiotico, valutando l'influenza di tutte le componenti, determinando i loro percorsi degradativi e identificandone i MdP.

Dei 1092 campioni di acqua di falda analizzati, non tutti hanno presentato la stessa percentuale di concentrazione di pesticidi e prodotti di degradazione. In particolare, in alcuni campioni i pesticidi e i rispettivi prodotti di degradazione erano totalmente assenti, in altri campioni invece erano presenti in tracce o al limite della concentrazione del valore di parametro riportato dal decreto 152/2006, pari a 0.1 µg/L. In particolare, dei 1092 campioni analizzati, 350 campioni di acqua di falda presentavano assenza di pesticidi, mentre negli altri campioni analizzati è stato possibile valutare la presenza di tutti i pesticidi, sebbene presenti in tracce.

In accordo con i dati relativi alle vendite dei pesticidi nelle diverse province della Regione Campania, i pesticidi maggiormente trovati, sebbene in tracce, sono stati Endosulfan, Fenitrothion e Lindano. Nello specifico, questi pesticidi sono stati riscontrati maggiormente nelle province di Salerno e Avellino.

I dati descritti sono stati riportati in un Box Plot (figura 9). Attraverso questo grafico è stato possibile capire il tipo di distribuzione e di identificare in modo rapido anomali e outliers. In particolare, il box plot permette di rappresentare sullo stesso grafico cinque tra le misure di posizione più utilizzate in statistica. La sintesi a cinque numeri di una variabile quantitativa costituisce infatti la struttura del box plot. Al suo interno vengono indicati il valore minimo (Q0), il primo quartile (Q1), la mediana (Q2), il terzo quartile (Q3) ed il valore massimo (Q4) di una variabile.

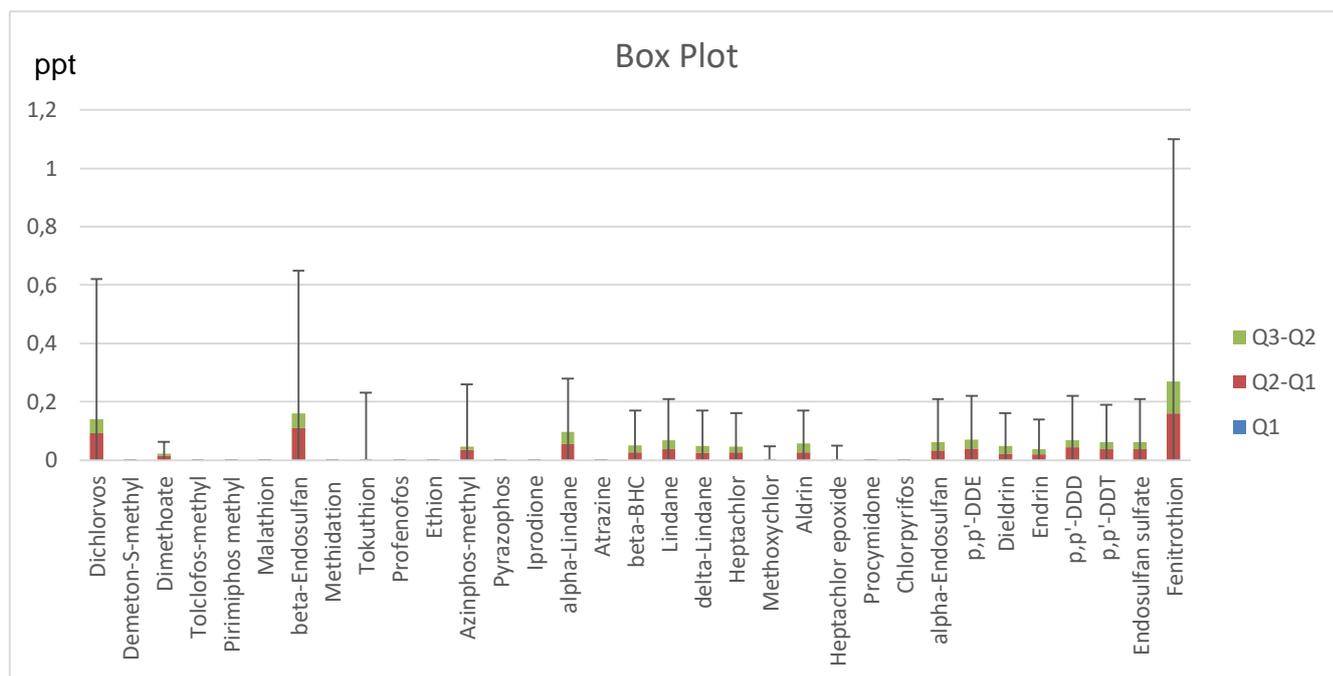


Figura 9. Box Plot delle concentrazioni dei pesticidi e dei prodotti di degradazione in campioni di acqua di falda della regione Campania.

### 4.3 Concentrazione dei Pesticidi e dei Prodotti di degradazione nelle acque di superficie

Per quanto riguarda le acque superficiali, ci si è soffermati sull'analisi delle acque del fiume Volturno andando a valutare le concentrazioni dell'atrazina e dei suoi prodotti di degradazione, ovvero desethylatrazine (DEA), desisopropylatrazine (DIA), hydroxyatrazine (HA), desethylhydroxyatrazine (DEHA) and desisopropylhydroxyatrazine (DIHA). La scelta di questo pesticida è stata fatta poichè agli inizi degli anni '90 l'Atrazina è stata bandita dalle vendite in Italia. Dunque, l'obiettivo è stato quello di valutare l'eventuale presenza del pesticida e dei suoi prodotti di degradazione, nonostante il divieto di vendita avvenuto circa 30 anni prima. Il Volturno è il fiume più importante dell'Italia Meridionale, per lunghezza e per portata d'acqua. 175 chilometri separano la sorgente di Rocchetta a Volturno dalla foce di Castel Volturno, il punto in cui il fiume si riversa nel Mar Tirreno. Le sue rive hanno favorito l'insediamento di numerosi popoli, a partire dall'antichità. Le sue acque hanno promosso lo sviluppo di una grande biodiversità, acquatica e terrestre, vegetale e animale. Il fiume ha una portata media elevata e abbastanza regolare di 82 m<sup>3</sup>/s, il valore più alto dei fiumi del Mezzogiorno. Il regime del Volturno può tuttavia subire in caso di abbondanti piogge invernali, brusche impennate di portata superiori anche ai 2.500 m<sup>3</sup>/s, soglia oltre la quale può dar luogo a estese inondazioni, tuttavia non molto frequenti. Nel corso dei secoli si sono ripetute ciclicamente delle piene; le più recenti si sono verificate nell'ottobre 1949, a novembre 1968 e a novembre 1979. Nel 1949 e nel 1968, le acque del Volturno superarono l'altezza di 4 metri. Le sue acque sono impiegate per la pesca, l'irrigazione, la nautica sportiva e la produzione di energia idroelettrica. La principale località attraversata è la città di Capua, anticamente attrezzata con un porto fluviale che la metteva in comunicazione con il Mar Tirreno e le altre città della costa.

Dati molto interessanti sono stati ottenuti dall'analisi dei campioni riguardo la concentrazione dell'atrazina e dei suoi prodotti di degradazione in tre matrici: acqua, particolato sospeso e sedimenti. Con questi dati, è stato possibile effettuare la pubblicazione di un articolo su una importante rivista scientifica, anche grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Chimica Ambientale del Consiglio Superiore d'Investigazione Scientifica Spagnolo (IDEA-CSIC) presieduto dal professor Sergi Diez.

Le maggiori concentrazioni in acqua sono probabilmente dovute a clorotriazine (ATR, DIA, DEA) che sono composti relativamente polari (valori log<sub>Kow</sub> tra 1 e 3) (Barchanska et al., 2017; Noppe et al., 2007), mentre la presenza di idrossiatrazine (HA, DIHA, DEHA) è presumibilmente dovuta all'idrolisi che si verifica in acqua (Takáts et al., 2001). I principali

prodotti di degradazione ritrovati in acqua formati tramite meccanismi biotici sono DEA e DIA, ma le concentrazioni più alte sono relative a HA, DIHA e DEHA, perché in acqua l'ATR è soggetto a processi di degradazione come l'idrolisi, che porta alla dealchilazione dei gruppi amminici, alla dechlorinazione e alla successiva idrossilazione (Benvenuto et al., 2010), e soprattutto perché le triazine idrossilate vengono trattenute e accumulate sia nell'acqua che nei sedimenti (Carafa et al., 2007). La presenza di atrazina nei campioni di acqua (figura 10) potrebbe essere dovuta alla sua moderata solubilità in acqua (33 mg/L a 20 °C) (Toledo-Jaldin et al., 2018). Nel lavoro in questione, sono state effettuate anche analisi sui sedimenti campionati. Nei sedimenti, l'adsorbimento è il processo principale che controlla la degradazione e la mobilità di un erbicida. La degradazione microbica di Atrazina che avviene ad opera di microorganismi, determina la N-dealchilazione per formare principalmente DEA e DIA. La DEA si forma in concentrazioni superiori a DIA probabilmente a causa della rimozione 2/3 volte più rapida del gruppo etilico da DEA rispetto al gruppo isopropilico di DIA (Vonberg et al., 2014). Inoltre, DEA è meno adsorbita, così come la DIA, sui sedimenti probabilmente a causa della loro maggiore mobilità rispetto ad ATR (Climent et al., 2019; Vonberg et al., 2014). I risultati hanno mostrato concentrazioni medie di ATR totale e prodotti di degradazione (Tabella 2) nell'ordine seguente: HA (3,33 ng g<sup>-1</sup>) > ATR (3,26 ng g<sup>-1</sup>) > DEA (1,93 ng g<sup>-1</sup>) > DEHA (1,75 ng g<sup>-1</sup>) > DIA (0,81 ng g<sup>-1</sup>) > DIHA (0,62 ng g<sup>-1</sup>).

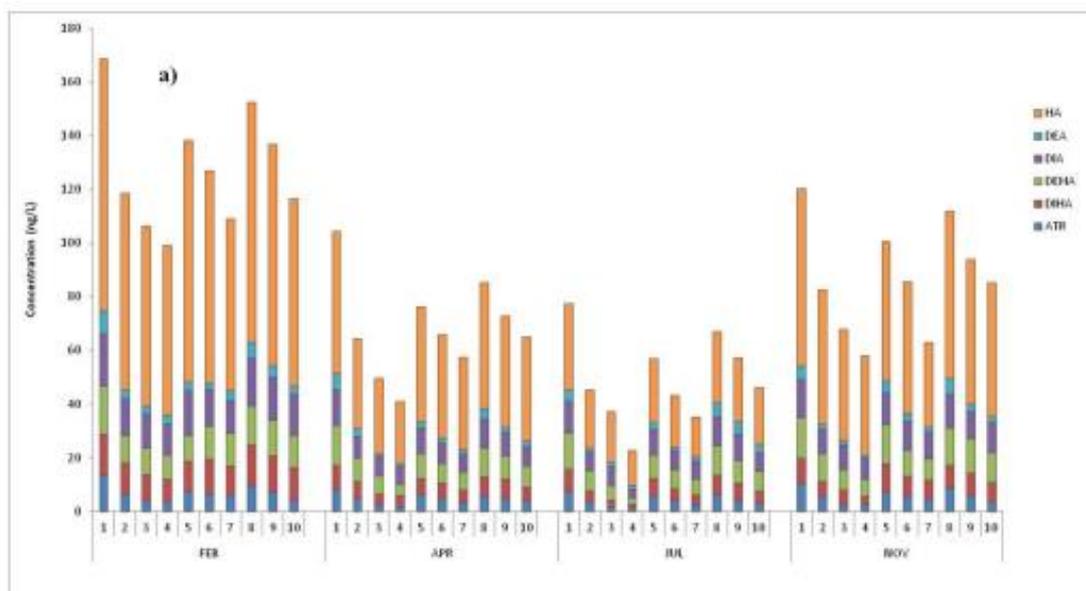


Figura 10. Concentrazione di Atrazina e suoi prodotti di degradazione nelle acque del fiume Volturno

Le concentrazioni di questi inquinanti sono diminuite dall'acqua al particolato sospeso al sedimento. Nei campioni di sedimenti le concentrazioni più elevate erano legate all'HA, che è più adsorbito di altri metaboliti a causa della sua solubilità in acqua relativamente bassa (3,9 mg/L), la sua più lunga emivita nel suolo (164 giorni) e il suo alto coefficiente di adsorbimento ( $K_f = 25 \mu\text{mol L}^{-1}\text{Kg}^{-1}$ ), seguito da ATR con coefficiente più basso ( $K_f = 3,7 \mu\text{mol L}^{-1} \text{kg}^{-1}$ ) (Barchanska et al., 2017; Mersie e Seybold, 1996). La persistenza dell'Atrazina nel suolo potrebbe essere dovuta sia all'elevata quantità applicata annualmente in passato e alla capacità di stabilire forti legami con i colloidi organici presenti nella frazione argillosa del suolo. Ciò determina il rilascio lento e continuo dell'erbicida e la sua presenza è stata addirittura rilevata nelle acque anche dopo anni di utilizzo. Un'altra ragione che contribuisce ad aumentare la persistenza ambientale dell'Atrazina è dovuta alla difficoltà degli organismi nel metabolizzare queste sostanze. Per studiare la relazione tra acqua, particolato e sedimento è stata eseguita una SEM (*figura 11*) ovvero un modello di equazione strutturale, un'utile tecnica di ricerca per analizzare le relazioni tra le variabili latenti. Il modello basato sulla covarianza (Jöreskog, 1970) e il metodo basato sulla varianza (Wold, 1975) sono due approcci per stimare le relazioni in una SEM. In questo lavoro è stato scelto l'approccio dei minimi quadrati parziali (PLS), eseguito da Smart-PLS (Versione 3), perché ha meno assunzioni stringenti per la distribuzione delle variabili e dei termini di errore (Wold, 1975). L'analisi delle componenti principali (PCA) (*figura 12*) è una tecnica multivariata per esaminare le relazioni tra più variabili quantitative (Pearson, 1901 e Hotelling, 1933). La PCA riduce la dimensionalità di un insieme di dati e provvede a preservarne la struttura. Il primo componente principale è la combinazione lineare delle variabili originarie che tiene conto della maggiore varianza possibile. Ogni successivo componente è la combinazione lineare delle variabili originali che hanno la maggiore varianza possibile ed sono correlate con la precedenti componenti definite.

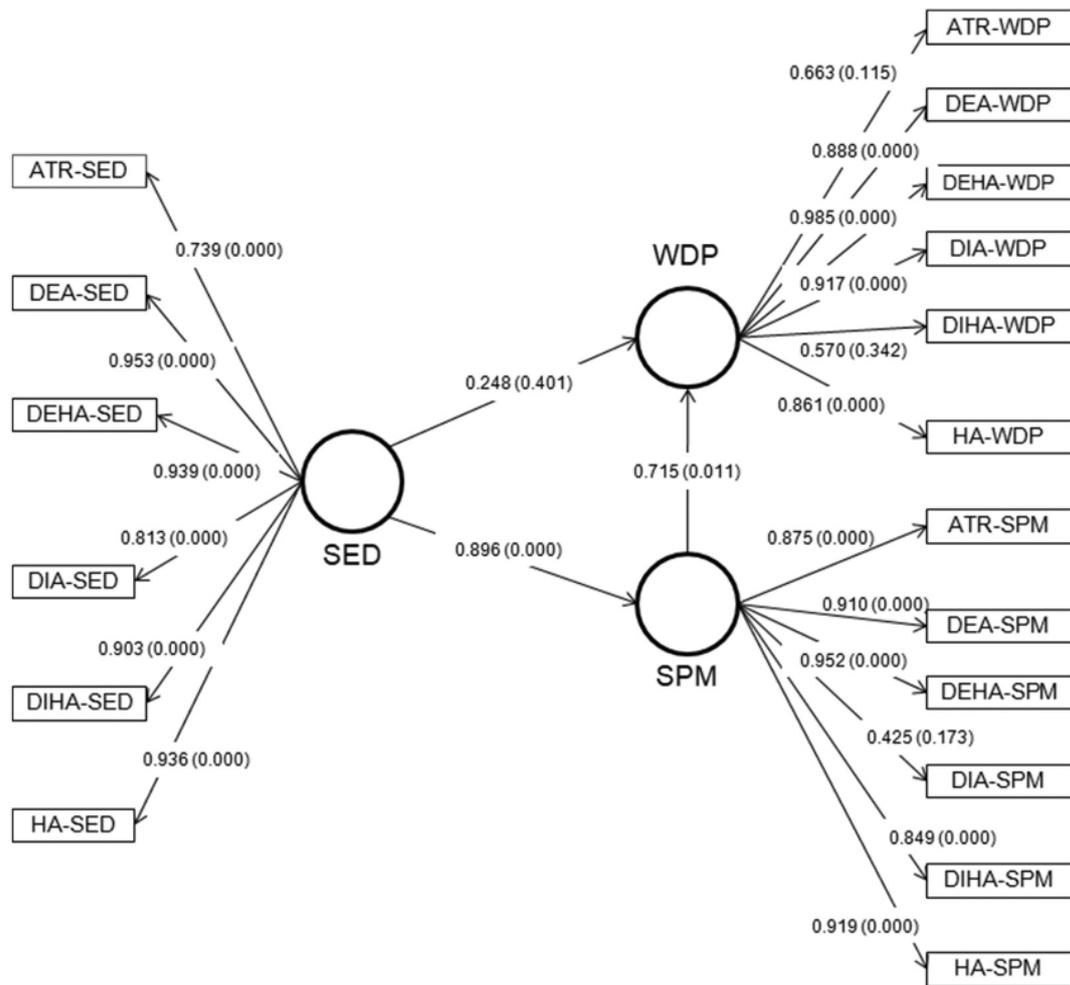


Figura 11. Modello di equazione strutturale

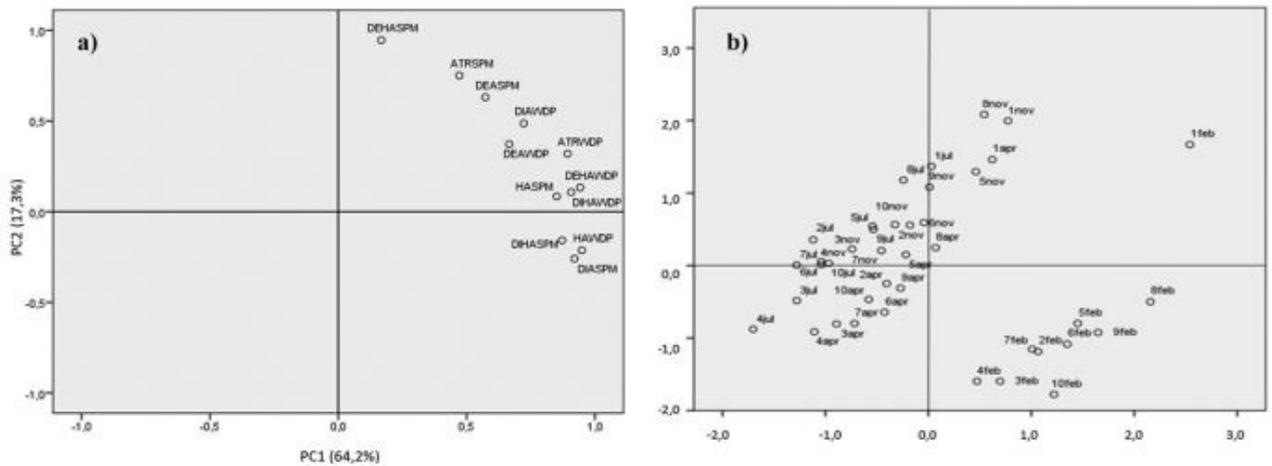


Figura 12. Principal Component Analysis (PCA)

# CAPITOLO 5

## Conclusioni

L'aspetto innovativo e rilevante dell'attività di ricerca del suddetto progetto è rappresentato da:

- 1) disponibilità di tecniche analitiche innovative per l'estrazione, l'identificazione e la quantificazione dei MdP che rappresentano, come suddetto, i futuri inquinanti chimici d'elezione presenti nelle acque; 2) disponibilità di dati sui MdP contenuti nelle acque della Regione Campania e valutazione tossicologia di esposizione; 3) disponibilità per il sistema qualità dell'Industria Agroalimentare della Regione Campania di protocolli operativi di tecniche analitiche innovative per la ricerca di inquinanti emergenti ed in particolare i prodotti di trasformazione di pesticidi; 4) proporre aggiornamenti legislativi sui valori limite e sulle metodologie da utilizzare per valutare il sistema qualità dell'industria agro-alimentare allo scopo di adeguare gli schemi regionali e nazionali alla normativa europea.

In particolare, la presenza di dati sui MdP contenuti nelle acque superficiali e profonde della Regione Campania permetterà la certificazione delle acque non contaminate (MdP-free) con conseguente incremento della competitività del prodotto campano sul mercato nazionale ed internazionale. Inoltre, la disponibilità di tecniche analitiche innovative per l'estrazione, l'identificazione e la quantificazione dei MdP, classe rilevante d'inquinanti chimici presenti nelle acque, avrà importanti ricadute sulle imprese nazionali ed europee ed in particolare, a livello locale, la disponibilità di tali tecniche innovative potranno essere utilizzate dall'Industria Agroalimentare della Regione Campania per integrare il proprio sistema qualità e sicurezza del prodotto. Le metodologie messe a punto nel progetto, più sensibili di quelle attualmente in uso per il controllo dei processi di produzione, coltivazione, trasformazione e confezionamento degli alimenti saranno utilizzabili a livello internazionale; ricaduta non trascurabile derivante dal progetto è rappresentata dalla proposta di nuovi valori limite, attualmente non presenti, per questa categoria di inquinanti emergenti e da nuove linee guida da utilizzare per valutare ed incrementare il sistema dell'industria agro-alimentare allo scopo di adeguare gli schemi regionali e nazionali alla normativa europea.

# CAPITOLO 6

## Bibliografia

- 1) Crea.gov.it/documents/20126/0/Campania\_Conta\_2017.pdf/cdf55058-6e29-645d-2da9-8393ebd8d8a2?t=1552309033426.
- 2) Direttiva del Consiglio relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari pubblicata nella G.U.C.E. 19 agosto 1991, n. L 230. Entrata in vigore il 26 luglio 1991.
- 3) G Cantelli Forti - Fitofarmaci e sicurezza degli alimenti, 2005
- 4) EUROSTAT, 2018. <https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/DDN-20181015-1>.
- 5) Eskenazi, B; Kogut, K.; Huen, K.; Harley, K. G.; Bouchard, M.; Bradman, A.; Boyd-Barr, D.; Johnson, C.; Holland, N. Organophosphate pesticide exposure, PON1, and neurodevelopment in school-age children from the CHAMACOS study.. Environmental Research Volume 134, 2014, Pages 149-157.
- 6) ISPRA 2016: <https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/rapporto-rifiuti-urbani-edizione-2016>.
- 7) REGOLAMENTO (CE) N. 1107/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE.
- 8) REGOLAMENTO (UE) n. 528/2012 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 maggio 2012 relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi.
- 9) Sun, X., Liu, F., Fan, Y., Shan, R., 2019. Spatiotemporal distributions of Cu, Zn, metribuzin, atrazine, and their transformation products in the surface water of a small plain stream in eastern China. Environ. Monit. Assess. 191, 433. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7556-3>.
- 10) Farlin, J., Gallé, T., Bayerle, M., Pittois, D., Braun, C., El Khabbaz, H., Weihermueller, L., 2013. Using the long-term memory effect of pesticide and metabolite soil residues to estimate field degradation half-life and test leaching predictions. Geoderma 207, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.04.028>.
- 11) European Commission Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.

- 12) Cardeal, Z.L., Souza, A.G., Amorim, L.C., 2011. Analytical Methods for Performing Pesticide Degradation Studies in Environmental Samples. IntechOpen.
- 13) Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualita' delle acque destinate al consumo umano”.
- 14) DUCCI D., TRANFAGLIA G. (2005) - L'impatto dei cambiamenti climatici sulle risorse idriche sotterranee in Campania. Geologi (Boll. Ordine Geologi Della Campania). 1-4, 13.
- 15) Tufano, R.; Allocca, V.; Coda, S.; Cusano, D.; Fusco, F.; Nicodemo, F.; Pizzolante, A.; De Vita, P. Groundwater vulnerability of principal aquifers of the Campania region (southern Italy). JOURNAL OF MAPS2020, VOL. 16, NO. 2, 565-576 <https://doi.org/10.1080/17445647.2020.1787887>.
- 16) Qu, M., Li, N., Li, H., Yang, T., Liu, W., Yan, Y., Zhu, D., 2018. Phytoextraction and biodegradation of atrazine by *Myriophyllum spicatum* and evaluation of bacterial communities involved in atrazine degradation in lake sediment. Chemosphere 209, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.055>.
- 17) Minolfi, G.; Albanese, S.; Lima, A.; Tarvainen, T. A regional approach to the environmental risk assessment - Human health risk assessment case study in the Campania region. December 2016 Journal of Geochemical Exploration. DOI:10.1016/j.gexplo.2016.12.010.
- 18) Climent, M.J., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., Pedreros, P., Urrutia, R., Herrero-Hernández, E., 2018. Determination of pesticides in river surface waters of Central Chile using SPE-GC-MS multi-residue method. J. Chil. Chem. Soc. 63 (2), 4023–4031. <https://doi.org/10.4067/s0717-97072018000204023>.
- 19) Triassi, M.; Montuori, P.; Provisiero, D.P.; De Rosa, E.; Di Duca, F.; Sarnacchiaro, P.; Díez, S. Occurrence and spatial-temporal distribution of atrazine and its metabolites in the aquatic environment of the Volturno River estuary, southern Italy. Science of the Total Environment 803 (2022) 149972.
- 20) Barchanska, H., Sajdak, M., Szczypka, K., Swientek, A., Tworek, M., Kurek, M., 2017. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 644–658. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7798-3>.
- 21) Noppe, H., Ghekiere, A., Verslycke, T., De Wulf, E., Verheyden, K., Monteyne, E., Polfliet, K., van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., 2007. Distribution and ecotoxicity of chlorotriazines in the Scheldt Estuary (B-NI). Environ. Pollut. 147, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.016>.

- 22) Takáts, Z., Vargha, M., Vékey, K., 2001. Investigation of atrazine metabolism in river sediment by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (18), 1735–1742. <https://doi.org/10.1002/rcm.425>.
- 23) Benvenuto, F., Marín, J.M., Sancho, J.V., Canobbio, S., Mezzanotte, V., Hernández, F., 2010. Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (7), 2791–2805. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3712-x>.
- 24) Carafa, R., Wollgast, J., Canuti, E., Ligthart, J., Dueri, S., Hanke, G., Eisenreich, S.J., Viaroli, P., Zaldívar, J.M., 2007. Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69, 1625–1637. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.060>.
- 25) Toledo-Jaldin, H.P., Blanco-Flores, A., Sánchez-Mendieta, V., Martín-Hernández, O., 2018. Influence of the chain length of surfactant in the modification of zeolites and clays. Removal of atrazine from water solutions. *Environ. Technol.* 39 (20), 2679–2690. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1365097>.
- 26) Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Pütz, T., Herbst, M., Vereecken, H., 2014. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Res.* 50, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.032>.
- 27) Climent, M.J., Herrero-Hernández, E., Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S., Pedreros, P., Urrutia, R., 2019. Residues of pesticides and some metabolites in dissolved and particulate phase in surface streamwater of Cachapoal River basin, central Chile. *Environ. Pollut.* 251, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.117>.
- 28) Jöreskog, K.G., 1970. A general method for estimating a linear structural equation system. *ETS Res. Rep. Ser.* 1970 (2). <https://doi.org/10.1002/j.2333-8504.1970.tb00783.x>.