

INAIL
Quaderni di ricerca

**Nuove tecniche analitiche al servizio
della sicurezza dei lavoratori: sviluppo
di un metodo di analisi diretta
di fungicidi e insetticidi sulla superficie
delle foglie**

Juri Cecca, Nunziata L'Episcopo, Lucia Mainero Rocca

I *Quaderni di ricerca* dell'Inail sono lo strumento a disposizione dei ricercatori e dei ruoli professionali dell'Istituto per rendere pubblici i risultati più rilevanti delle loro attività; accolgono anche contributi di ricercatori esterni, che partecipano ai progetti dell'Inail.

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nei *Quaderni*, che non vanno intese come posizioni ufficiali dell'Inail.

I *Quaderni* sono disponibili online all'indirizzo www.inail.it.

Comitato di redazione: Paolo Bragatto, Franco Bettoni,
Benedetta Persechino, Patrizio Rossi

Segreteria di redazione: Toni Saracino

Inail - Piazzale Giulio Pastore, 6 | 00144 Roma

ISBN 978-88-7484-604-7

Stampato presso la Tipografia Inail - Milano, marzo 2020

Nuove tecniche analitiche al servizio della sicurezza dei lavoratori: sviluppo di un metodo di analisi diretta di fungicidi e insetticidi sulla superficie delle foglie

Juri Cecca, Nunziata L'Episcopo, Lucia Mainero Rocca

Sommario - L'analisi chimica è sempre stata al fianco di tutti gli attori coinvolti nella valutazione e nella prevenzione dei rischi derivanti dall'utilizzo di sostanze chimiche. Il continuo progredire della tecnica deve costituire la base su cui si fondano i principi della prevenzione a prescindere dal campo di applicazione.

Il Laboratorio Rischio Agenti Chimici del reparto ricerca di Inail è da molti anni impegnato nel miglioramento dei metodi storicamente consolidati per la valutazione e l'analisi dei composti a cui i lavoratori di molti comparti sono esposti. In particolar modo nel mondo dell'agricoltura dove le sostanze utilizzate sono molteplici così come gli scenari da considerare.

Da sempre i pesticidi hanno un ruolo di fondamentale importanza in agricoltura e sono diventati imprescindibili ed ubiquitari. I benefici derivanti dall'utilizzo di queste sostanze sono incontestabili, ma altrettanto lo sono i pericoli che si corrono inalando, ingerendo o venendo a contatto con questi agenti chimici. Bisogna ricordare, infatti, che il lavoro agricolo comprende tutta una serie di operazioni (come la potatura e la raccolta) che portano il lavoratore a venire a contatto con rami, foglie e frutti, contaminati dalle sostanze applicate e che potrebbero restare fuori dalla valutazione dell'esposizione.

Date queste premesse, nel quaderno di ricerca si vuole presentare la messa a punto e lo sviluppo di un metodo di analisi rapido ed efficace di quattro insetticidi e quattro fungicidi sulla superficie di alcuni tipi di foglie. Il metodo utilizza uno spettrometro di massa munito di sorgente Desorption Electrospray Ionization che presenta notevoli vantaggi rispetto alle classiche tecniche LC-MS e di cui costituisce un'evoluzione. Questa interfaccia infatti è in grado di lavorare a pressione atmosferica; ha consentito di sviluppare un metodo di analisi che non richiede alcun tipo di pretrattamento del campione; è in grado di analizzare diversi tipi di superfici; le risposte si ottengono in tempo reale e si può mappare la presenza dei *chemicals* nel tempo e nello spazio.

Conoscere, utilizzando una tecnica rapida e non invasiva, l'entità dell'esposizione a cui il lavoratore potrebbe essere esposto in caso di contatto può costituire un utile apporto e supporto alla consolidata tecnica del monitoraggio biologico.

Non va poi dimenticata la peculiarità di questa nuova tecnologia di inserirsi di diritto nel filone della Green Chemistry e di garantire una ridotta esposizione dei lavoratori addetti all'analisi grazie ad una minima manipolazione del campione ed un basso consumo di solventi.

Questo Quaderno fa riferimento a un progetto afferente al Piano triennale della Ricerca Inail 2016-2018 (Studio dell'esposizione occupazionale a pesticidi). Il progetto ha costituito la tesi di Laurea Magistrale in Chimica per l'autore Juri Cecca. Gli altri, Lucia Mainero Rocca e Nunziata L'Episcopo, svolgono la propria attività presso il Laboratorio Rischio Agenti Chimici del Dipartimento di Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro e Ambientale.

Eventuali commenti e informazioni possono essere richieste a Lucia Mainero Rocca all'indirizzo: l.mainerorocca@inail.it.

Indice degli argomenti

1	Premessa	7
1.1	Prodotti fitosanitari	8
1.1.1	Insetticidi	9
1.1.2	Fungicidi	9
1.2	Pericolosità per l'uomo	10
1.2.1	Effetti dannosi	11
1.3	Esposizione occupazionale	16
1.4	Desorption electrospray ionization (DESI)	18
1.5	Scopo del lavoro	19
2.	Parte sperimentale	21
2.1	Reagenti e prodotti chimici	21
2.2	Preparazione delle soluzioni standard	22
2.3	Preparazione del campione	22
2.4	DESI-mass spectrometry	23
2.5	Microscopia	25
3.	Risultati e discussioni	26
3.1	Ottimizzazione delle condizioni sperimentali	26
3.1.1	Studio della frammentazione e ottimizzazione delle condizioni impiegate in MS/MS	26
3.1.2	Ottimizzazione dei parametri DESI	34
3.1.3	Ottimizzazione dei campioni reali	38
3.2	Analisi qualitativa	43
3.2.1	Metodo analitico	43
3.2.2	Calcolo dei LODs e dei LOQs	43
3.3	Analisi quantitativa	44
3.3.1	Range di linearità	44
3.3.2	Effetto matrice	45
3.3.3	Performance del metodo quantitativo	48
3.3.4	Monitoraggio di campioni reali di ulivo	48
3.3.5	Valutazione dell'esposizione dermica potenziale	49
4.	Conclusioni e sviluppi futuri	52
	Riferimenti bibliografici	53

1 Premessa

La direttiva europea, recentemente rivisitata con la Direttiva 128/2009/CE [Dir. 2009/128/CE], sull'utilizzo sostenibile dei pesticidi, richiede la riduzione dei rischi e dell'impatto di queste sostanze sia sulla salute umana che sull'ambiente. Per questo fine la direttiva incoraggia l'introduzione della difesa integrata e di approcci o tecniche alternativi. Impone inoltre, agli stati membri europei, di sviluppare attività di formazione dedicate all'esposizione professionale a pesticidi e materiale di comunicazione mirato all'informazione dei residenti e degli astanti. In Italia la difesa integrata è applicata da tempo, i primi progetti furono avviati da alcune regioni nella prima metà degli anni 70 ed il "Piano Nazionale di Lotta Guidata" ha visto la luce nella seconda metà degli anni 80. Ciononostante, l'uso dei prodotti fitosanitari è ancora prevalente sia negli utilizzatori professionali che non. Dal rapporto di ISPRA del 2018 [ISPRA-016], infatti, si evidenzia come, dopo oltre dieci anni di diminuzione, siano tornate ad aumentare in Italia le vendite di pesticidi (136.055 tonnellate nel 2015 comunque inferiori alle 150.000 del 2002 in cui si è avuto il massimo) anche se si registra un calo del 36.7% delle vendite dei prodotti tossici e molto tossici. In generale, più di 450 pesticidi risultano approvati dalla Commissione Europea per l'uso in diverse colture [CE-016].

Poco si conosce sulla presenza e/o l'esatto quantitativo dei prodotti fitosanitari con i quali vengono in contatto i lavoratori; la comunità scientifica, infatti, è molto attenta alla valutazione della loro presenza nel cibo, ma ancora pochi lavori sono dedicati specificatamente all'esposizione occupazionale. Inoltre, la maggior parte dei dati disponibili riguarda la contaminazione durante le attività di esposizione diretta come ad esempio la miscelazione e l'applicazione o il lavaggio dell'equipaggiamento di sicurezza. Al contrario, il rischio di esposizione derivante dal contatto fisico con rami, foglie, frutti o vegetali responsabile del trasferimento di *chemicals* sulla pelle del lavoratore è meno studiato [BLBRK-BC-RG-014].

Altro scenario di rischio è dato dal rientro in campo ma solo pochi autori negli anni '90 si sono dedicati allo studio di questo caso [TLDBZH-999; SCKSBLF-999; SSHKMS-995]. Tali valutazioni hanno dimostrato che la contaminazione può avvenire anche a diversi giorni di distanza dall'applicazione e che il livello di contaminazione è relazionato alla quantità di sostanza presente sulle foglie mediante un coefficiente di trasferimento (TC) [EFSA-014]. Naturalmente esistono diversi fattori che possono influenzare questo trasferimento quali ad esempio: il tipo di lavorazione, le caratteristiche della coltura, le densità fogliare e l'abbigliamento del lavoratore; ma così tanti parametri implicano una notevole complessità nella valutazione della reale dose assorbita.

Storicamente l'esposizione dermica sui lavoratori agricoli viene condotta attraverso dosimetri passivi [Apr-012; L-FG-SLNB-012]. A questo scopo, pads di materiali differenti vengono posizionati sulla superficie esterna degli abiti da lavoro in aree del corpo che rappresentino zone di esposizione primaria. In generale comunque lo strumento principale per la valutazione del *pesticide risk assesment* sul campo è il monitoraggio biologico e ambientale [CRAABM-RMMMSTTV-012; LA-GR-SZH-HMCB-015; ABMMPSLS-016] e le tecniche di analisi di elezione sono la liquido massa e la gas massa (LC-MS, GC-MS).

Un aspetto altrettanto importante nella valutazione dell'effettivo rischio per i lavoratori del comparto agricolo, è l'attuale assenza di un approccio armonizzato per la stima dell'esposizione ai pesticidi richiesta dal regolamento 1107/2009 CE [Reg. CE 1107/2009]. I modelli sviluppati nel Regno Unito o in Germania vengono normalmente utilizzati per valutare le potenziali esposizioni degli operatori, ma i risultati possono essere differenti a parità di scenario. Questo è dovuto al fatto

che non esistono metodi standardizzati ed ogni stato membro segue un determinato modello di valutazione [EFSA-014].

Inoltre, parte dei lavoratori a contatto giornalmente con Prodotti per la Protezione della Pianta (PPPs), non è a conoscenza dei rischi che il loro utilizzo comporta, sottovaluta l'importanza delle apparecchiature protettive e viene quindi esposta a concentrazioni di pesticidi spesso superiori ai valori limite stabiliti [RBSPB-ECCCG-EMSGMDHF-015].

Ne segue un sempre più urgente bisogno di monitorare i rischi a cui le persone, ma soprattutto i lavoratori agricoli, vengono sottoposti, attraverso l'informazione e la formazione del personale e attraverso lo studio e la messa a punto di nuovi metodi per una rapida identificazione e quantificazione delle sostanze dannose.

1.1 Prodotti fitosanitari

I prodotti fitosanitari hanno un ruolo di particolare rilievo in agricoltura, anche nei paesi in via di sviluppo dove i parassiti provocano miliardi di dollari di diminuzione di reddito nazionale e le perdite di raccolto contribuiscono alla carestia e alla malnutrizione che uccide tra i 12 milioni e i 15 milioni di bambini ogni anno [Coo, Dob-007].

Un pesticida è definito come “qualsiasi sostanza o combinazione di sostanze utilizzate per prevenire o sradicare insetti indesiderati (inclusi portatori di malattie negli esseri umani e negli animali), erbacce, funghi o animali al fine di aumentare la produzione alimentare e aiutare il processo di produzione, lo stoccaggio, il trasporto, o la commercializzazione del cibo e delle materie prime agricole” [MKZTA-014]. Il regolamento CE 1107/2009 [Reg. CE 1107/2009] ne definisce un aspetto più specifico parlando di prodotti fitosanitari (o Prodotti per la Protezione della Pianta-PPPs) ovvero quei prodotti utilizzati per proteggere e conservare i vegetali; i PPPs comprendono erbicidi, antiparassitari (fungicidi, insetticidi, acaricidi, nematocidi, molluschicidi e rodenticidi), fitoregolatori, repellenti, fisiofarmaci e biotecnologici.

In commercio sono reperibili centinaia di formulati, anche contenenti lo stesso principio attivo, la maggior parte dei quali viene utilizzata in ambito agricolo.

Un “principio attivo” impedisce, distrugge, respinge, o mitiga un parassita, può svolgere funzioni regolatrici per la pianta, può essere un defoliante, essiccante, o stabilizzatore di azoto. Tutti gli altri ingredienti vengono chiamati “coadiuvanti” e sono importanti in termini di prestazioni e usabilità del prodotto. In sintesi, i PPPs contengono almeno un ingrediente attivo e altri ingredienti inerti, aggiunti intenzionalmente, che vanno a comporre il cosiddetto coadiuvante. Questi ingredienti possono essere sostanze chimiche, composti chimici o altri tipi di sostanze, compresi i prodotti alimentari comuni (ad esempio, alcuni oli commestibili) e alcuni materiali naturali (ad esempio, cera d'api, cellulosa).

I coadiuvanti giocano un ruolo chiave in termini di efficacia dei pesticidi e di prestazione del prodotto. Esempi delle loro funzioni includono:

- Agire come solvente per aiutare il principio attivo a penetrare o a rimanere sulla superficie fogliare di una pianta;
- Migliorare la facilità di applicazione, impedendo l'impaccamento o la formazione di schiuma;
- Migliorare la sicurezza per l'applicatore;
- Proteggere il principio attivo dalla degradazione causata dall'esposizione alla luce solare.

In ogni caso tutti i composti devono essere identificati per nome sull'etichetta del prodotto insieme alla loro percentuale in peso.

Esistono diverse categorie di ingredienti attivi [EPA-019]:

- Convenzionali, che comprendono tutti gli ingredienti diversi dai pesticidi biologici e dai pesticidi antimicrobici;
- Antimicrobici, che sono sostanze o miscele di sostanze utilizzate per distruggere o sopprimere la crescita di microrganismi dannosi come batteri, virus o funghi su oggetti inanimati e superfici;
- Biopesticidi, che sono ingredienti derivati da alcuni materiali di tipo naturale.

La parola “inerte” non significa non tossico. Infatti, tutti i componenti nei formulati devono essere approvati da enti specifici prima di poter essere inclusi in un pesticida. A tale scopo, prima dell'approvazione vengono esaminate le informazioni di sicurezza su ciascun ingrediente. Se il pesticida viene applicato sugli alimenti o sui mangimi, è richiesta una tolleranza alimentare per ciascuna sostanza compresa nel coadiuvante e si potrà decidere di limitare eventualmente la quantità di ogni ingrediente inerte nel prodotto.

1.1.1 Insetticidi

Gli insetticidi sono pesticidi utilizzati per controllare gli insetti impedendo loro di attuare comportamenti ritenuti indesiderabili o distruttivi e sono classificati in base alla loro struttura e modalità d'azione. Molti insetticidi agiscono sul sistema nervoso dell'insetto (ad esempio, inibiscono l'acetilcolinesterasi (AChE)), mentre altri agiscono come regolatori della crescita o come endotossine. Questi prodotti sono comunemente utilizzati in agricoltura, per la salute pubblica e per applicazioni industriali, oltre che per usi di tipo domestico e commerciali (ad esempio, per il controllo di scarafaggi e termiti). Gli insetticidi più utilizzati sono gli organofosfati, i piretroidi e i carbammati.

Generalmente vengono applicati in varie formulazioni e sistemi di erogazione (ad esempio spray, esche, o per diffusione) che influenzano il loro trasporto e la loro trasformazione chimica. La mobilitazione degli insetticidi può avvenire tramite deflusso (sia che siano sciolti o assorbiti dalle particelle del terreno), per deposizione atmosferica, o per deflusso sub-superficiale.

Le loro specifiche tecniche ed il sistema di erogazione ha dato origine anche ad un notevole problema di inquinamento. L'erosione del suolo causata dall'agricoltura ad alta intensità facilita il trasporto di insetticidi in corpi idrici dando luogo ad un'estesa contaminazione delle falde. Inoltre, alcuni vengono accumulati negli organismi acquatici e trasferiti ai loro predatori. Gli insetticidi infatti, essendo progettati per essere letali per gli insetti, rappresentano un rischio particolare per gli insetti acquatici, che interessa di conseguenza anche altri invertebrati e i pesci [EPA-009].

1.1.2 Fungicidi

Un fungicida è un tipo specifico di prodotto fitosanitario che controlla una malattia fungina inibendola specificamente o uccidendo il fungo che la causa.

I fungicidi sono ampiamente utilizzati nell'industria, nell'agricoltura, in alcune operazioni dome-

stiche e di giardinaggio [Rob, RouRei-013], ad esempio per:

- La protezione del grano da semina durante lo stoccaggio, la spedizione e la germinazione;
- La protezione di colture mature, frutti di bosco, piante, fiori ed erbe nel campo, in stoccaggio e durante la spedizione;
- La soppressione di muffe che attaccano le superfici verniciate e la protezione dei tappeti e dei tessuti di casa.

La maggior parte dei fungicidi viene applicata per gestire organismi patogeni fungini sulle coltivazioni o utilizzati come trattamento post-raccolta per evitare che funghi o muffe portino il cibo a marcire durante l'immagazzinamento o il trasporto. Essi sono diventati essenziali per la protezione degli alimenti così come per il mantenimento delle colture e per ottenere rese consistenti di prodotti di alta qualità. Infatti, fungicidi rappresentano oltre il 52% di tutti i prodotti fitosanitari impiegati nell'Unione Europea, con un consumo annuale stimato di circa 100.000 tonnellate.

Come altri pesticidi, i fungicidi sono ampiamente irrorati su terreni agricoli e quindi, dopo l'applicazione, sono in grado di migrare lontano dalla zona interessata provocando un potenziale rischio sanitario non solo per gli agricoltori, ma anche per i residenti (in particolar modo le categorie più a rischio come i bambini). Inoltre, residui di questi prodotti agrochimici rimangono sulle colture anche dopo il raccolto e perfino dopo alcune operazioni di trasformazione dei prodotti alimentari, rischiando di essere ingeriti dai consumatori [ROS-GS-015; PBZPRLC-015].

1.2 Pericolosità per l'uomo

Come molte invenzioni tecnologiche che migliorano la qualità della nostra vita, i pesticidi possono presentare notevoli rischi se non vengono utilizzati nel modo corretto. Questi rischi non dovrebbero mai essere ignorati e deve essere fatto tutto il possibile per minimizzarli attraverso una regolamentazione rigorosa e attraverso una formazione adeguata degli utenti [Coo, Dob-007].

L'utilizzo di pesticidi in agricoltura è una pratica comune già dalla seconda metà del ventesimo secolo, ma durante il decennio passato la società ha riconosciuto che un utilizzo sconsiderato di queste sostanze può avere ripercussioni sia sull'ambiente che sulla salute dell'uomo. L'impatto dovuto alla loro capacità di diffondersi dal luogo di utilizzo verso aree limitrofe attraverso l'aria, l'acqua e il terreno, così come nel cibo destinato ad essere consumato dall'uomo.

Sebbene durante l'ultimo decennio la tossicità e i rischi legati all'utilizzo dei pesticidi siano diminuiti, grazie allo sviluppo sia dell'industria chimica che del settore agricolo, le quantità utilizzate sui terreni sono comunque significative. Attualmente la relazione tra rischi per la salute e quantità di pesticidi, a cui si viene esposti, viene indagata attraverso studi di tipo tossicologico ed epidemiologico. È stato stimato che quasi 1844 prodotti fitosanitari sono disponibili sul mercato e quasi 750000 persone sono sottoposte alla loro esposizione ogni anno [MKZTA-014].

Le reazioni avverse possono manifestarsi immediatamente oppure dopo un determinato lasso di tempo e talvolta vengono trasmessi alle generazioni successive, sebbene il polimorfismo genetico giochi un ruolo importante in questo senso. Inoltre, gli effetti possono essere reversibili, permanenti, oltre che transgenerazionali. Nel caso di manifestazioni nella prole, si è studiato che tali risultati possano essere causati da un'esposizione durante la gravidanza e/o l'infanzia. Ma ormai i prodotti fitosanitari sono ubiquitari e contaminano l'ambiente, il suolo e i prodotti agricoli. Di

conseguenza, gli esseri umani sono esposti ai pesticidi attraverso il cibo, l'acqua, l'aria e, se lavorano nei campi, sia per via inalatoria che per contatto cutaneo.

I pesticidi possono variare a seconda della loro struttura chimica, il meccanismo di azione e la tossicità che esibiscono; inoltre, essendo ciascun pesticida composto da uno o più ingredienti attivi, oltre che da altre sostanze contenute nei coadiuvanti, gli individui sono spesso esposti ad una miscela di sostanze tossiche (che potrebbero esplicare effetti di tipo sinergico) e non ad un singolo agente.

Molti dei pesticidi utilizzati attualmente agiscono come interferenti endocrini (EDC, Endocrine Disrupting Chemicals). Questi ultimi sono definiti dall'agenzia per la protezione ambientale americana (EPA, Environmental Protection Agency) come "agenti esogeni potenzialmente capaci di sintetizzare, di secernere, di trasportare, di legare, di azionare e di eliminare ormoni naturali responsabili del mantenimento dell'omeostasi, della riproduzione e dello sviluppo dei processi biologici".

L'esposizione ai pesticidi ha incrementato la preoccupazione relativa ai potenziali rischi per la salute, sia per avvelenamenti di tipo acuto che cronico. In genere l'esposizione di tipo cronico rappresenta un problema per la salute soprattutto nelle popolazioni rurali, dove persone di tutte le età ed entrambi i sessi vivono e lavorano nei pressi dei campi su cui vengono applicati questi prodotti chimici. A questo proposito, sono stati identificati tre principali vie di esposizione ai pesticidi: esposizioni occupazionali, ambientali e alimentari.

1.2.1 Effetti dannosi

I prodotti fitosanitari sono progettati per prevenire, distruggere o respingere selettivamente organismi bersaglio; ma la maggior parte di essi è scarsamente selettiva e risulta quindi tossica anche per altri tipi di organismi, inclusi gli esseri umani. Inoltre, prima dell'applicazione diretta, i pesticidi vengono spesso miscelati con un'altra grande varietà di sostanze al fine di migliorarne le caratteristiche [SGKLASH-012]. Ne deriva, per l'uomo, un'esposizione incrociata ad un'elevata quantità e a differenti tipologie di agenti chimici che molto spesso risultano avere degli effetti negativi per la salute.

Gli effetti tossicologici di queste sostanze sull'uomo sono vari. Tra le conseguenze più pericolose legate ad un'esposizione prolungata a pesticidi vi sono disfunzioni del sistema riproduttivo, danni al sistema nervoso centrale e periferico e infine un'aumentata insorgenza di tumori.

1.2.1.1 Sistema Riproduttivo

Lo studio degli effetti nocivi dei pesticidi sul sistema riproduttivo umano risale a più di tre decenni fa; infatti, tra le cause note di infertilità vi sono le esposizioni occupazionali a fattori ambientali dannosi per l'uomo. Dal momento che molti di questi potenziali pericoli sono presenti anche nell'ambiente, le esposizioni professionali non sono sempre facili da provare. Tuttavia, il decremento del tasso di fertilità in certe occupazioni è molto più significativo rispetto a quello osservato per la popolazione generale [MKZTA-014].

Purtroppo non sempre vengono definiti livelli di esposizioni croniche/acute e ciò rende difficile determinare attraverso gli studi se, ad esempio, quantità inferiori rispetto a manifestazioni cliniche di avvelenamento acuto, abbiano un qualsiasi impatto negativo sulla fertilità, sulla crescita e sullo sviluppo.

Gli studi hanno suggerito che l'esposizione ad alcune classi, in particolare gli appartenenti alla famiglia degli organofosfati (OP) ha un impatto maggiore sulla crescita e lo sviluppo del feto e del neonato rispetto agli adulti (a parità di concentrazione). Ciononostante, gli stessi studi forniscono al contempo indicazioni rassicuranti sui livelli di esposizione attualmente considerati come soglia di sicurezza per le funzioni riproduttive umane.

L'esposizione occupazionale si verifica durante la miscelazione, la ricarica, lo spruzzo, e tutte quelle attività che prevedono l'utilizzo di PPPs. Ci sono diversi tipi di rischi professionali che interessano gli organi riproduttivi sia maschili che femminili. In particolare, l'attività riproduttiva maschile è molto sensibile a diverse sostanze chimiche commerciali e agenti fisici prodotti da attività agricole e industriali.

L'infertilità femminile o maschile è la causa della sterilità involontaria nel 39% e nel 20% dei casi (rispettivamente) e non si limita ad essere un problema dei paesi occidentali, ma si tratta di un fenomeno globale che coinvolge anche i paesi in via di sviluppo.

Gli effetti negativi dei pesticidi sul sistema riproduttivo maschile rappresentano un problema sanitario importante in tutto il mondo. Sono stati condotti diversi studi internazionali sugli interferenti endocrini (fra questi molti pesticidi) che hanno dimostrato l'esistenza di un legame tra l'esposizione a queste sostanze ed una diminuita qualità del seme. Uno dei primi avvenimenti che ha dato il via a questi studi risale al 1977, quando alcuni lavoratori di una ditta per la produzione di pesticidi in California furono esposti a dibromocloropropano (DBCP) e riportarono seri danni alla spermatogenesi. Fu quindi scoperto che l'esposizione a pesticidi interferisce danneggiando i testicoli attraverso percorsi ormonali o genotossici [MKZTA-014]. La gravità dell'effetto dipende dal livello di differenziazione, può essere reversibile o irreversibile e potrebbe temporaneamente portare ad una diminuzione della fertilità legata al numero e alla vitalità degli spermatozoi. Questi effetti sono transienti poiché la spermatogenesi è ripristinata da popolazioni di cellule staminali in seguito alla rimozione degli agenti nocivi.

Il meccanismo con cui i prodotti fitosanitari esplicano la loro azione diretta è dovuta alla loro similarità strutturale con gli ormoni steroidei del sistema riproduttivo. Sono, infatti, in grado di legarsi ad un recettore endocrino, agire come un ligando ormonale e intaccare la fertilità. Ad esempio, il parathion e il methyl parathion sono strutturalmente simili agli estrogeni e possono quindi interagire con i recettori ormonali e andare ad influenzare tutto il processo di trascrizione genica. Esistono anche meccanismi indiretti di tossicità, legati soprattutto alla zona testicolare e al sistema nervoso centrale. I pesticidi sono infatti in grado di interferire nella produzione e nel rilascio di testosterone agendo negativamente sulle gonadotropine. Ogni pesticida, in funzione dal suo potere tossico, può avere differenti effetti sulla fertilità e sul sistema riproduttivo maschile. Purtroppo, valutare tutte le tipologie di pesticidi è un lavoro molto costoso e che va oltre le possibilità della maggior parte dei laboratori chimici, indipendentemente dalla nazione.

Ad ogni modo, data l'impossibilità di eliminare l'utilizzo di pesticidi, i lavoratori agricoli dovrebbero indossare indumenti protettivi adeguati [Yar-018]. Molti studi hanno infatti dimostrato che i lavoratori ben protetti non hanno riscontrato nessuna disfunzione al livello dell'apparato riproduttivo.

1.2.1.2 Sistema nervoso centrale e periferico

Tra i prodotti fitosanitari, gli insetticidi sono quelli più pericolosi per il tessuto del sistema nervoso. È noto, infatti, che la loro esposizione può provocare danni neurologici acuti e cronici. Gli

effetti acuti più lievi includono mal di testa, vertigini, nausea, vomito e diarrea, mentre effetti di tossicità acuta maggiore possono manifestarsi attraverso disturbi del battito cardiaco, convulsioni, problemi respiratori e, in casi estremi, coma. Oltre alla tossicità clinica immediata, l'intossicazione acuta da organofosfati è stata associata ad effetti neurologici a lungo termine che includono una serie di sintomi tra cui deficit neuro-comportamentali [SGKLASH-012].

È presente inoltre una vasta parte di letteratura che suggerisce un collegamento tra l'esposizione a pesticidi ed un'aumentata insorgenza del Morbo di Parkinson.

Il Morbo di Parkinson è un disturbo del movimento extrapiramidale la cui eziologia è nella maggior parte dei casi incerta. Test tossicologici *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato, però, che l'esposizione a determinati pesticidi può causare specifici effetti neurodegenerativi ed alcuni casi di studio nell'uomo hanno suggerito che esista una relazione casuale tra l'insorgenza del morbo di Parkinson e l'esposizione a queste sostanze [HHGYLJ-006; CADMHA-018; Sae, Deh-016].

I pesticidi possono danneggiare il sistema nervoso in vari modi: alcuni lo attaccano direttamente, altri producono effetti neurologici avversi interferendo con i meccanismi cellulari necessari per supportare l'elevata attività metabolica del sistema nervoso.

Molte tipologie di pesticidi possono colpire sia il sistema nervoso centrale che periferico. Tra queste, le più importanti sono gli organoclorurati, i piretroidi e gli organofosfati.

Molte classi di pesticidi esercitano la loro funzione negativa alterando la permeabilità dei canali ionici. Il meccanismo tossico si basa su un'apertura forzata dei canali voltaggio dipendenti del sodio, che portano ad un'elevata concentrazione di questo ione nella cellula, oppure una chiusura forzata dei canali ligando dipendenti del cloro. Gli organoclorurati rappresentano un esempio eccellente di agenti tossici che provocano disfunzioni nei canali ionici, con conseguenti effetti neurologici, ed il composto più famoso di questa categoria è il DDT.

I piretroidi, quali la bifentrina, sono divisi in due gruppi, in base agli effetti collaterali mostrati durante studi su roditori: gruppo C-S, ovvero quelli che provocano aumentata salivazione e crisi epilettiche, e gruppo T, cioè quella parte di sostanze che provoca tremori.

Anche questi composti operano interagendo con canali del sodio e del cloro [Kei, Fir-015]. Un ulteriore effetto è a danno del sistema nervoso sensoriale: le persone colpite da esposizione cutanea hanno riscontrato un intorpidimento degli arti e delle mucose, in particolare nelle zone del viso. Ciò è probabilmente dovuto a scariche neuronali ripetute che vanno ad innescare le percezioni sensoriali. Ad oggi, nessun effetto sul sistema nervoso periferico cronico è stato associato ai piretroidi.

Gli inibitori della colinesterasi sono un gruppo di sostanze chimiche insetticide che include alcune delle sostanze più tossiche conosciute. Tra queste vi sono gli organofosfati, come ad esempio il dimetoato, e gli N-metil-carbammati. Questa tipologia di pesticidi induce effetti neurologici acuti inibendo l'enzima colinesterasi.

La colinesterasi svolge una funzione essenziale nella neurotrasmissione colinergica, in quanto è l'enzima che catalizza la reazione di degradazione dell'acetilcolina nella fessura sinaptica. Questa attività enzimatica è essenziale per la normale funzione colinergica in tutto il sistema nervoso centrale, simpatico e parasimpatico e per le componenti motorie del sistema nervoso periferico. Se l'enzima è inibito, spesso in modo permanente da organofosfati o temporaneamente da N-metil-carbammati, l'acetilcolina si accumula nello spazio sinaptico, portando a un eccesso di stimolazione delle ghiandole, dei nervi e dei muscoli.

Un'intossicazione acuta da organofosfati o carbammati include sintomi correlati ad un eccesso di

stimolazione del parasimpatico, tra cui salivazione eccessiva, lacrimazione, incontinenza urinaria, diarrea, crampi gastroenterici. Alcuni sintomi neurologici legati al sistema nervoso centrale possono includere: confusione, perdita di coscienza, problemi respiratori e convulsioni. Manifestazioni neurologiche legate al sistema periferico possono influenzare la funzione motoria, con fascicolazioni, debolezza, perdita del controllo muscolare e paralisi respiratoria.

Il sistema nervoso periferico è composto da due sottocategorie: il sistema sensoriale e motorio (quest'ultimo suddiviso in volontario e autonomo). Ognuna di queste componenti può essere danneggiata dall'esposizione ai pesticidi, anche se differenti tipi di sostanze vanno a colpire componenti specifiche.

Una delle manifestazioni legata agli effetti cronici causati dai pesticidi è la polineuropatia ritardata indotta dagli organofosfati (Organophosphate Induced Delayed Polyneuropathy, OPIDP). Questa neuropatia, prevalentemente motoria, può manifestarsi solo tramite esposizione ad un numero limitato di organofosfati. L'abilità di un organofosfato di indurre la OPIDP sembra dipendere dalla sua capacità di inibire una proteina neuronale associata alla membrana, nota come *neuropathy target esterase* (NET) [Kei, Fir-015]. L'OPIDP è di solito annunciato dalla comparsa di dolore e crampi agli arti inferiori, che inizia circa due settimane dopo l'intossicazione acuta da organofosfati. Modificazioni sensoriali sono generalmente minori in questi casi, ma alcuni disturbi motori possono manifestarsi in forma grave, come ad esempio una progressiva, ascendente, paralisi flaccida che può essere solo parzialmente reversibile.

Inoltre, associata con una grave intossicazione da organofosfati vi è una condizione poco conosciuta nota come "sindrome intermedia". Questa sindrome inizia uno o più giorni dopo l'intossicazione acuta ed è caratterizzata da debolezza muscolare prossimale. A volte questi sintomi possono essere sufficientemente gravi da provocare un'insufficienza respiratoria. Per fortuna, questa condizione sembra essere rara e colpisce esclusivamente i pazienti che hanno subito gravi intossicazioni acute.

I neonicotinoidi invece sono nuove sostanze chimiche appartenenti alla categoria degli insetticidi, che attivano selettivamente i recettori nicotinici. Negli esseri umani i recettori nicotinici sono abbondanti nelle cellule muscolari lisce, e sono i recettori predominanti del sistema nervoso simpatico. Le differenze strutturali tra recettori nicotinici di insetti e mammiferi conferiscono a queste sostanze tossicità selettiva esclusivamente per gli insetti, di conseguenza il rischio per l'uomo è veramente basso.

In conclusione, quando si parla di effetti neurologici acuti o cronici legati all'esposizione ai pesticidi, non bisogna mai dimenticare di sottolineare l'entità e la modalità dell'esposizione. Gli agricoltori, che rappresentano la categoria più a rischio, possono essere esposti direttamente o indirettamente. L'esposizione diretta può provocare avvelenamenti acuti che possono portare a conseguenze talvolta gravi.

1.2.1.3 Cancerogenicità

L'incremento delle evidenze di cancro negli scorsi 50-60 anni potrebbe essere attribuito non solo all'invecchiamento della popolazione, ma anche alla diffusione di agenti cancerogeni in ambito occupazionale. Un numero sempre crescente di dati epidemiologici, di biologia molecolare e prove tossicologiche ha dimostrato che l'esposizione a diversi inquinanti ambientali, compresi i pesticidi, è associata all'aumento di frequenza di tumori. Oltre ai fattori di rischio già noti come il fumare,

l'utilizzo eccessivo di alcool, l'esposizione solare, la mancanza di attività fisica e l'obesità, i tumori causati da un'esposizione involontaria (per esempio a pesticidi) hanno destato notevole preoccupazione tra la popolazione.

Alcune delle classi di pesticidi più diffuse (organofosfati, organoclorurati, N-metilcarbammati e piretroidi) hanno mostrato potenziale cancerogeno in varie forme. Inoltre, l'esposizione ad alcune di queste sostanze potrebbe interferire con altri agenti chimici e fattori genetici per aumentare i rischi di contrarre tali malattie [PRHA-013].

Ci sono infatti molti studi a supporto dell'evidenza che l'esposizione prolungata ad agenti cancerogeni, a cominciare dall'età dello sviluppo, produca un aumento complessivo di processi cancerogeni nell'organismo.

La maggior parte delle informazioni riguardo i rischi di tumori legati ad esposizioni ambientali deriva da studi epidemiologici occupazionali a lungo termine. I lavoratori sono una delle categorie più a rischio, in quanto manifestano un'esposizione cumulativa maggiore rispetto al resto della popolazione.

Anche i bambini risultano essere esposti, in quanto giocando all'aperto vengono continuamente a contatto con il terreno e con altre superfici potenzialmente contaminate [Haz, Haz-013]. Ma anche perché alcuni studi hanno constatato come la concentrazione di pesticidi nel sangue materno e nel cordone ombelicale, in seguito ad un'esposizione, risulti molto simile, evidenziando il fatto che il trasferimento di sostanze nocive dalla madre al feto è un rischio reale.

Esposizioni parentali possono incrementare l'insorgenza di tumori sia prima del concepimento che durante la gestazione, o addirittura dopo la nascita. Prima del concepimento, l'esposizione può causare mutazioni o alterazioni epigenetiche nell'espressione genica, come imprinting genomico o metilazioni del DNA, sia nello sperma che negli ovuli. L'esposizione dopo il concepimento (sia durante la gravidanza che dopo la nascita) può causare mutazioni cellulari somatiche, o alterazioni ormonali, che vanno ad aumentare il rischio di tumori [SMV-009; GKHRLCDSKCCQM-017].

Molti pesticidi sono stati identificati come mimi degli estrogeni, possono aumentare quindi il rischio di cancro al seno o interferire con le normali funzioni ormonali, e alcuni di essi hanno dimostrato di essere causa certa di tumori mammari negli animali [EHGPF-014]. Gran parte della ricerca epidemiologica su questo tema si è concentrata sull'esaminare la relazione tra cancro al seno e livelli nel corpo di insetticidi organoclorurati persistenti, misurati nel siero e nel tessuto adiposo. L'esposizione ai pesticidi può avvenire anche tra le mura casalinghe, attraverso l'utilizzo di prodotti antiparassitari da giardino, per il trattamento delle pulci di animali domestici, oppure di insetticidi per il debellamento di fastidiosi insetti. Ovviamente, le donne impegnate in lavori agricoli sono generalmente esposte a concentrazioni più elevate e diversi tipi di pesticidi rispetto alla popolazione generale.

Altre ricerche hanno dimostrato un'aumentata insorgenza di tumori alla prostata per gli agricoltori coinvolti nell'applicazione di pesticidi, rispetto al resto della popolazione, suggerendo un collegamento tra queste sostanze e l'eziologia del cancro della prostata [BKBAHSBYBLMZA-011]. Sebbene vada sottolineato che i meccanismi siano ancora sconosciuti, una grande parte di letteratura sostiene che alcune classi di pesticidi, tra cui organofosfati, organoclorurati, carbammati, piretroidi e alcuni erbicidi, possano indurre stress ossidativo [Jab-017; AMRKM-019]. Inoltre, diversi studi hanno osservato evidenze di danneggiamenti nel DNA dei lavoratori agricoli mediante l'utilizzo di una tecnica molto sensibile nota come "Comet Assay"; questa è in grado di osservare danneggiamenti indotti da specie reattive dell'ossigeno, come interruzioni a singolo filamento, così

come siti alcali-labili, che possono insorgere durante la riparazione delle lesioni ossidative di basi del DNA.

Gli studi hanno anche rilevato un aumento dei livelli di lesione ossidativa al DNA della 8-idrossi-2'-deossiguanosina nei lavoratori agricoli esposti a organofosfati rispetto alla popolazione non esposta [BKBAHSBYBLMZA-011]. Lo stress ossidativo cronico è stato proposto come un importante meccanismo per la carcinogenesi della prostata.

Studi epidemiologici hanno dimostrato inoltre, che l'esposizione a pesticidi può aumentare i rischi di carcinomi epatocellulari (hepatocellular carcinoma, HCC). Il cancro del fegato è il sesto tipo di cancro più comune nel mondo e la seconda causa di decessi da tumori. Tra il 70 e l'85% dei casi di cancro primario del fegato sono HCC.

È stato ipotizzato che i pesticidi contribuiscano alla carcinogenesi del fegato attraverso meccanismi di genotossicità, promozione tumorale, immunotossicità, e azioni ormonali. In particolare gli organoclorurati sono stati associati significativamente ad un incremento del rischio di contrarre l'HCC, specialmente tra gli uomini [PBYTRHCW-015].

1.3 Esposizione occupazionale

Il lavoro agricolo include un'ampia gamma di operazioni che sono più o meno specifiche per ogni tipo di terreno (campi, vigne, frutteti, ecc.) o bestiame.

Tra i vari pericoli occupazionali associati con queste mansioni, l'esposizione a pesticidi merita specifiche attenzioni poiché, come abbiamo appena visto, queste sostanze favoriscono l'insorgere di disordini neurologici, riproduttivi e cancerogeni.

INAIL rileva nel settore, sia pur con la difficoltà di isolare le sole malattie professionali connesse all'utilizzo di prodotti chimici, un'alta incidenza di patologie riconosciute e indennizzate negli anni 2015 e 2016 (21% del totale per la gestione Agricoltura) [INAIL-017A]. Più specificamente, l'istituto registra un costante incremento delle malattie professionali, superiore, negli ultimi due anni, rispetto alle altre gestioni (+10,2%, nel 2015 e +2,5%, nel 2016, a fronte di medie complessive pari a +2,7% e +2,3%) [MFBI-018].

Dati relativi all'esposizione a pesticidi sono stati raccolti per settore principalmente negli anni '90, ma quelli per fini legislativi non sono spesso disponibili pubblicamente così come i dati industriali nel fascicolo di autorizzazione. La maggior parte dei dati disponibili riguarda la contaminazione esterna durante le attività di esposizione dirette, come la miscelazione o l'applicazione dei pesticidi e operazioni di pulizia delle attrezzature di spruzzatura.

Sebbene i rischi da esposizione durante alcune pratiche come la raccolta, la potatura, il diradamento, il taglio o la cernita di frutta, verdura, cereali o piante precedentemente trattate con pesticidi, siano stati meno studiati, il contatto fisico con rami, foglie, frutta etc. è responsabile del trasferimento di sostanze chimiche sulla pelle del lavoratore, rendendo possibile il loro assorbimento cutaneo [BLBRK-BC-RG-014].

Alcuni studi hanno anche documentato i livelli di esposizione associati alle mansioni relative ai settori frutticoli, come ad esempio gli agrumi e le piantagioni di peschi in California e di mele nei Paesi Bassi [RBSPB-ECCCG-EMSGMDHF-015]. Questi studi hanno dimostrato che la contaminazione da parte di alcuni ingredienti attivi può verificarsi anche diversi giorni dopo il trattamento e hanno anche stabilito che il livello di contaminazione dipende dalla quantità di residui fogliari (che è correlata a sua volta alla dose di pesticida applicata per ettaro ed al tempo trascorso dall'ap-

plicazione) e da un coefficiente di trasferimento foglia-cute. Alcuni autori sostengono che anche altre caratteristiche come ritmo di lavoro, densità del fogliame, ventilazione del luogo di lavoro, condizioni meteorologiche e tipi di attività svolte, o il modo in cui vengono svolte, potrebbero giocare un ruolo significativo [BLBRK-BC-RG-014].

L'esposizione ai pesticidi in ambito lavorativo può essere minimizzata attraverso l'utilizzo di particolari equipaggiamenti protettivi rispettandone le corrette pratiche di utilizzo. Comunque, un malfunzionamento delle protezioni, una distrazione durante la fase di miscelazione o di applicazione o di manutenzione dell'attrezzatura, può portare ad un'esposizione ad alte concentrazioni di pesticida che può manifestarsi con o senza evidenze cliniche di tossicità acuta [SGKLASH-012].

Per quanto riguarda l'esposizione cronica, il numero di anni in cui si è stati esposti, il tempo passato nei campi, la frequenza e la quantità con cui sono stati spruzzati i pesticidi e le condizioni ambientali al momento dell'esposizione sono fattori decisivi. Ad esempio, nel caso di un'esposizione diretta, lavorare in un'area chiusa o aperta, oppure la corretta preparazione della miscela sono fattori determinanti nella valutazione del rischio che si corre e del livello di esposizione a cui si va incontro.

È stato dimostrato che esiste una relazione tra esposizione occupazionale e sintomi clinici, ma esistono ancora dei punti poco chiari. Lavoratori con le stesse mansioni, infatti, potrebbero svolgere nella pratica attività diverse, oppure utilizzare differenti attrezzature protettive e questo influenzerebbe enormemente l'entità dell'esposizione [MKZTA-014].

Poco si conosce circa la presenza e/o la quantità esatta di pesticidi con cui i lavoratori del comparto agricolo vengono a contatto. La comunità scientifica è infatti molto impegnata nella valutazione della loro presenza in matrici alimentari e ambientali ma pochi progetti sono dedicati specificamente ai luoghi di lavoro. L'argomento è sicuramente complicato sia dall'elevato numero di sostanze presenti sul mercato (e loro miscele) sia dalle oggettive difficoltà metodologiche.

Una delle possibilità finora sfruttate per la valutazione della concentrazione di agrofarmaci è il campionamento dell'aria che può essere effettuato mediante pompe o mediante campionatori personali, [Apr-012; AYF-014; RFNABTM-015]. In questo caso il campionamento viene effettuato su filtri di materiali specifici o su fiale tipo XAD-2, come ad esempio riportato da Dos Santos nel 2011 [DLPPD-011].

Un altro sistema di controllo estremamente potente dell'esposizione risulta essere il monitoraggio biologico [Apr-012]. Il vantaggio di questo approccio è la sua capacità di controllare direttamente la quantità di sostanze che i lavoratori assorbono durante il loro turno di lavoro. Gli svantaggi, però, non sono trascurabili. Ad esempio, la dieta e la salute del lavoratore hanno una forte influenza sulla quantificazione e anche l'uso dei metaboliti talvolta risulta aspecifico. Inoltre, le tecniche di analisi ed estrazione sono più complesse a causa della natura della matrice da cui si ricavano le informazioni (sangue, urina, saliva, capelli). Anche il momento del campionamento (inizio/fine turno) e la sua invasività diventano fattori determinanti. Ciononostante il monitoraggio biologico resta a tutt'oggi il metodo di elezione per la valutazione della quantità di pesticidi che il lavoratore assorbe. La tecnica di pretrattamento ed estrazione da matrici biologiche più comune ed economica è sicuramente l'estrazione in fase solida (SPE) [ACMMM-002]. Moltissime sono le fasi adsorbenti attualmente in commercio e questo consente il recupero quantitativo di un grande numero di analiti anche da matrici non convenzionali come i capelli [SSBMA-012].

Altre possibilità sono rappresentate dai pads, ovvero dal campionamento passivo. Questi metodi prevedono il posizionamento di pezzette (in genere quadrate) di vario materiale sulla superficie

esterna degli abiti in vari punti del corpo considerati zone di esposizione primaria [Apr-012]. Altrimenti, è possibile utilizzare tamponi imbevuti di solvente e strusciati sulle mani degli addetti [BBMS-006]. In entrambi i casi l'estrazione degli analiti è poi condotta mediante estrazione liquida e successiva SPE.

Convenzionalmente, i pesticidi vengono analizzati combinando una fase di separazione solitamente gascromatografia (GC), o la cromatografia liquida (LC), con la spettrometria di massa (MS), preferibilmente spettrometria di massa tandem (MS/MS) [Bar, Nee-002; JGTZ-008; M-RRACNC-018].

La versatilità di metodi cromatografici e di massa, in combinazione con il veloce sviluppo tecnologico delle apparecchiature, rendono la LC-MS una tecnica analitica leader in questo campo. La tecnica di separazione LC più ampiamente utilizzata per pesticidi è la HPLC a fase inversa (RP) con colonna C18 [ACMMM-002]; le interfacce più usate sono l'ESI e l'APCI [BGET-011; CSLZXL-014]. Pesticidi neutri e basici (carbammati, triazine) mostrano una maggiore efficienza di ionizzazione in APCI (soprattutto in modalità ionica positiva), mentre i pesticidi cationici e anionici vengono ionizzati in maniera più efficace in ESI (soprattutto in modalità ionica negativa). Gli insetticidi organoclorurati invece non si ionizzano facilmente né in APCI né in ESI.

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) è un metodo che continua a svolgere un ruolo cruciale nel campo dell'analisi dei residui di pesticidi. Nonostante il predominio dei metodi basati sulla cromatografia liquida, la GC-MS è ancora uno strumento utile in questo campo, poiché alcuni pesticidi non sono così sensibili alle ionizzazioni API (come organoclorurati e piretrine). I due metodi di ionizzazione dominanti utilizzati per le analisi GC-MS sono ionizzazione elettronica (EI) e ionizzazione chimica (CI) [DLPPD-011; ACMMM-002; OSUINK-012].

La spettrometria di massa mediante desorbimento/ionizzazione a pressione atmosferica è diventata un campo di ricerca molto attivo e molte nuove tecniche sono state introdotte negli ultimi anni, come ad esempio la "desorption electrospray ionization" (DESI), la "desorption atmospheric pressure chemical ionization" (DAPCI), o la "direct analysis in real time" (DART). Molti passi in avanti sono stati fatti da alcuni gruppi di ricerca, che utilizzano l'interfaccia DESI combinata con uno spettrometro di massa portatile per analizzare direttamente i pesticidi sulle foglie o sulla frutta [Cra, Mus-012; VSKRHHKK-015].

Con questi metodi, non è necessario alcun pretrattamento del campione (estrazione, purificazione, pre-concentrazione), il che li rende molto validi per lo screening rapido. Il campo di studio delle prestazioni dei metodi sviluppati con queste tecniche è ancora aperto ed il nostro gruppo è molto impegnato soprattutto nello sviluppo di metodi quantitativi ed alla definizione di nuove regole.

Inoltre, per quanto è in nostra conoscenza, queste nuove tecniche non sono mai state applicate alla quantificazione dei pesticidi nel campo della sicurezza sul lavoro.

1.4 Desorption electrospray ionization (DESI)

La DESI è una sorgente di spettrometria di massa che consente il campionamento in condizioni ambientali ovvero a pressione atmosferica [TWGC-004; TWC-005]. Si applica principalmente a campioni solidi compresi materiali biologici molto complessi (esistono pochissimi lavori applicati a liquidi [Bal-006]) e può esser sfruttata anche per la cosiddetta imaging.

La tecnica presenta una buona sensibilità, nella maggior parte dei casi non richiede alcun tipo di

pretrattamento del campione ed il tempo di risposta è praticamente istantaneo. È inoltre utilizzabile per piccole molecole organiche così come per proteine ed altre molecole biologiche. Fatta eccezione per lo stato fisico del campione, i principi chimico-fisici di un esperimento DESI sono gli stessi di un normale esperimento ESI (ElectroSpray Ionization). Viene utilizzato un emettitore elettrospray per creare, da un solvente, ioni in fase gassosa, cluster ionici e microgocce cariche che sono poi indirizzati verso il campionatore (solitamente le soluzioni contenute nello spray sono simili alle fasi mobili usate in LC-MS [Bal-006]). Un potenziale elettrico di diversi kilovolt viene applicato alla soluzione dello spray, mentre viene impiegata una nebulizzazione pneumatica per favorire il processo di desolvatazione [TWC-005].

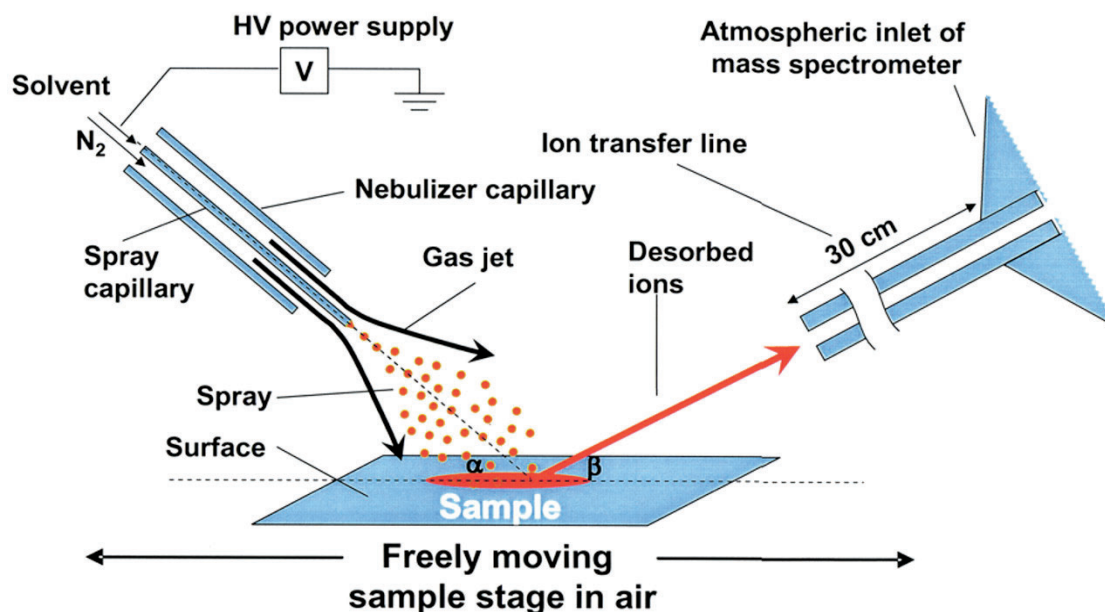


Figura 1 - Schema del funzionamento generale di una sorgente DESI [TWGC-004]

L'angolo di incidenza, così come la distanza tra ago e cannello, ed altri parametri geometrici, svolgono un ruolo fondamentale in questo tipo di analisi.

A seconda delle capacità dello spettrometro, è possibile effettuare misure di massa tandem, monitoraggio di ioni selezionati (selected ion monitoring, SIM), massa esatta e molte altre.

1.5 Scopo del lavoro

I pesticidi sono sostanze ubiquitarie e pericolose per la salute, con le quali gli esseri umani possono venire a contatto attraverso diverse modalità, molte delle quali sfuggono spesso ai normali controlli.

La categoria dei lavoratori agricoli risulta essere quella più a rischio, in quanto esposti a queste sostanze sia durante l'applicazione del pesticida stesso che nelle fasi successive del lavoro, come ad esempio nella fase di potatura o di raccolta.

Risulta quindi di notevole utilità riuscire a limitare e controllare la presenza di pesticidi là dove è più diffusa, ovvero nei luoghi di lavoro. Inoltre, è sempre opportuno avere a disposizione un metodo d'analisi rapido e affidabile per valutarne eventualmente l'esposizione.

Per questi motivi è stato messo a punto un nuovo metodo che, attraverso l'utilizzo della "Desorption Electropray Ionization", permetta la determinazione qualitativa e semi-quantitativa dei pesticidi presenti sulla superficie delle foglie.

L'uso di questa interfaccia ha consentito lo sviluppo e la messa a punto di un metodo le cui caratteristiche principali sono la velocità di analisi e la totale assenza di procedure di pretrattamento del campione. Per quanto è in nostra conoscenza, nessuno ha affrontato questo argomento nella cosiddetta fase di rientro in campo, o comunque una volta ultimata l'operazione di distribuzione con questa tecnica innovativa.

Oltre ai vantaggi che questa nuova metodologia apporta in ambito occupazionale, non bisogna trascurare il livello di sicurezza garantito per gli analisti di laboratorio, che, tramite questa interfaccia, utilizzano quantità ridotte di solvente e riescono a manipolare limitatamente il campione. Questi ultimi due aspetti rendono il metodo sviluppato innovativo e valido anche da un punto di vista ecologico.

2. Parte sperimentale

2.1 Reagenti e prodotti chimici

Gli otto prodotti fitosanitari selezionati per questo progetto sono stati acquistati presso la Chem Service (West Chester, USA), di seguito se ne riportano i nomi completi:

Tebuconazolo: 1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-3-pentanol,

Triadimefon: 1-(4-Chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-one,

Carbaril: 1-Naphthyl-N-methylcarbamate,

Dimetoato: O,O-dimethyl S-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] dithiophosphate,

Bifentrina: 3-[(1Z)-2-Chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid (2-methylbiphenyl-3-yl)methyl ester,

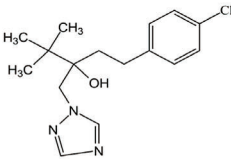
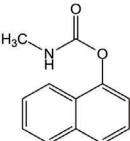
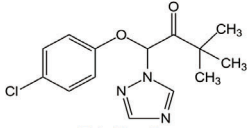
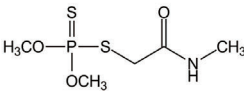
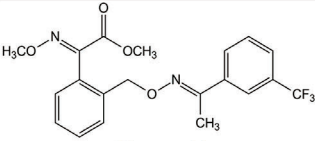
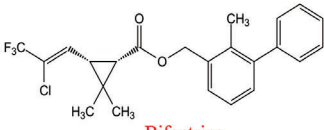
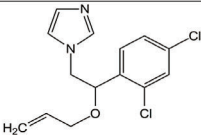
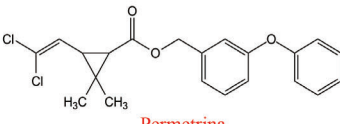
Trifloxystrobin: Methyl (E)- α -methoxyimino-2-[(E)-1-(3-trifluoromethylphenyl)ethylidenamino]oxyethyl]phenylacetate,

Imazalil: 1-[2-(Allyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]imidazole,

Permetrina: 3-Phenoxybenzyl (1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropane-carboxylate.

Tutti gli standard avevano una purezza superiore al 99.0 % e in tabella 1 sono riportati i nomi, le masse monoisotopiche e le strutture.

Tabella 1: Nomi, struttura e massa monoisotopica (MM) degli 8 pesticidi selezionati per questo progetto

FUNGICIDI	INSETTICIDI
 <p>Tebuconazolo MM=307.82 u</p>	 <p>Carbaril MM=201.22 u</p>
 <p>Triadimefon MM=293.75 u</p>	 <p>Dimetoato MM=229.26 u</p>
 <p>Trifloxystrobin MM=408.37 u</p>	 <p>Bifentrina MM=422.87 u</p>
 <p>Imazalil MM=297.18 u</p>	 <p>Permetrina MM=391.29 u</p>

Il metanolo, di grado RS per UHPLC-MS, utilizzato per la preparazione delle soluzioni standard e dello spray è stato acquistato dalla Carlo Erba reagenti (Milano, Italia). L'acetato d'ammonio, utilizzato per la preparazione dello spray, presenta un grado di purezza superiore al 99%, ed è stato acquistato dalla Fluka Analyticals (Hannover, Germania). Il Rogor L20° ed il Flint Max®, formulati utilizzati per l'analisi quantitativa, sono stati prodotti da Cheminova Agro Italia S.r.l. (Bergamo, Italia) e da Bayer Crop Science S.r.l. (Milano, Italia) rispettivamente ed acquistati presso i negozi specializzati locali. L'acqua distillata, utilizzata per la preparazione delle soluzioni e dello spray, è stata purificata e deionizzata mediante un apparecchio MilliQ Plus (Millipore, Bedford, MA, USA). Per la messa a punto del metodo sono state selezionate diverse tipologie di foglie in relazione ai vari pesticidi analizzati (ulivo, vite, limone, ciliegio); da analisi preliminari sono risultate tutte prive di qualsiasi trattamento.

2.2 Preparazione delle soluzioni standard

Le soluzioni standard individuali, alla concentrazione di 1 mg/mL, sono state preparate solubilizzando 10 mg di ciascuna sostanza in 10 mL di metanolo. Le soluzioni di lavoro, sono state ottenute per diluizione dalle soluzioni madri. Sia le soluzioni madri che le soluzioni di lavoro sono state conservate ad una temperatura di 4°C ed hanno resistito a processi degradativi per oltre 6 mesi.

2.3 Preparazione del campione

Le soluzioni standard sono state analizzate, utilizzando piastrine in vetro Prosolia (Prosolia Inc Indianapolis, IN, USA) specifiche per l'interfaccia DESI, stampate con placche in Teflon sulle quali è stato depositato un volume pari a 1 µL di soluzione di lavoro utilizzando una siringa Hamilton da 10 µL.

Le foglie sono state tagliate in sezioni quadrate della grandezza di circa 0,5x0,5 cm. In seguito sono state posizionate su una piastra in vetro, ed incollate ad essa tramite l'utilizzo di anelli autoadesivi in PVC (vedi Figura 2). Ai fini della valutazione dei limiti e della linearità del metodo, sulla superficie della foglia è stato depositato un volume, di soluzione di opportuna concentrazione, pari a 1 µL.

Lo spray, utilizzato nelle analisi di spettrometria di massa con interfaccia DESI, è stato preparato solubilizzando acetato d'ammonio in una soluzione 75:25 (v/v) di MeOH:H₂O in concentrazione finale 1mM.

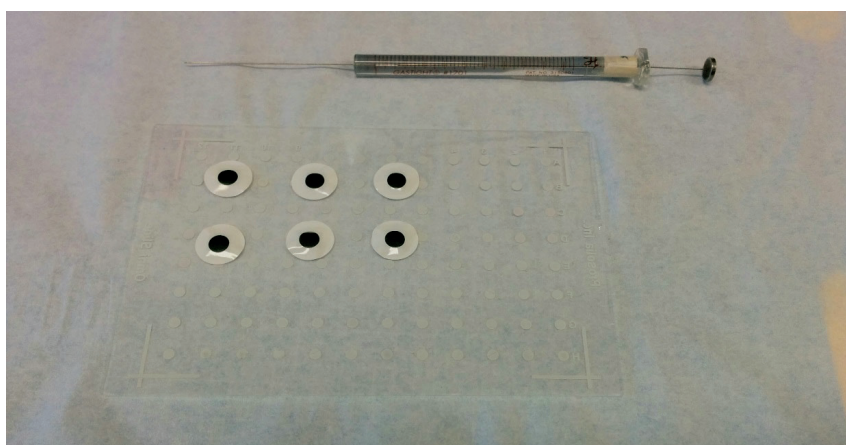


Figura 2 - Esempio di campioni di foglie di ulivo tagliati e immobilizzati su una piastrina attraverso anelli autoadesivi in PVC

2.4 DESI-mass spectrometry

Il metodo di acquisizione con l'interfaccia DESI consiste in una scansione continua della piastrina tramite il movimento di un sistema ago-cannello che spazza la superficie, da sinistra verso destra, ad una velocità scelta di $200 \mu\text{m s}^{-1}$. I risultati finali sono rappresentati da uno spettro SRM continuo. In figura 3 è riportata l'immagine dell'interfaccia e più nello specifico del blocco ago-cannello, dell'alloggiamento e della piastra utilizzata come supporto dei campioni di foglie.

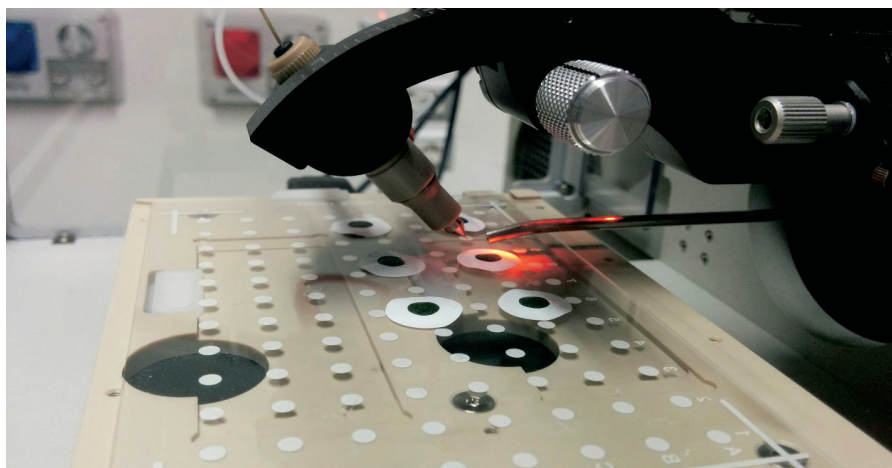


Figura 3 - Immagine dell'interfaccia DESI durante la scansione di alcuni campioni di foglia di ulivo

Gli esperimenti di spettrometria di massa sono stati effettuati su uno spettrometro ibrido a triplo quadrupolo/trappola ionica API 4000 QTRAP® (Applied Biosystems/MSD Sciex, Concorde, Ontario, Canada) equipaggiato con una sorgente di ioni automatizzata DESI OmniSpray® 2D disegnata da Prosofia Inc (Indianapolis, IN, USA).

La sorgente di ioni DESI è dotata di una piattaforma per il campione, dei posizionatori X, Y, Z per regolarne la geometria ed una videocamera collegata al computer che consente un preciso posizionamento dell'ago.

La sorgente DESI ha operato in modalità di ionizzazione positiva e i dati sono stati acquisiti in modalità SRM, selezionando uno ione precursore e due ioni frammento per ogni pesticida. Lo spray è stato infuso attraverso un capillare mediante una pompa a siringa Harvard (Bonaduz AG, Svizzera). I parametri ottimizzati per l'interfaccia DESI sono riepilogati in tabella 2.

Tabella 2: Parametri ottimizzati per l'interfaccia DESI

Parametro	Valore
Voltaggio Spray	+5,500 V
Velocità di flusso del solvente	2 $\mu\text{L}/\text{min}$
Solvente	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1mM in MeOH:H ₂ O 75:25
Pressione azoto	100 psi
Angolo tra ago e superficie	55°
Distanza ago-superficie	1,5 mm
Distanza cannello-superficie	1 mm
Distanza ago-cannello	4 mm

I parametri strumentali del triplo quadrupolo sono stati ottimizzati utilizzando l'interfaccia TURBO V™. Per ogni pesticida è stata infusa la corrispondente soluzione standard con una pompa a siringa (velocità di flusso, 10 µL/min), ad un range di concentrazione tra gli 0,001 e 1 mg/L. Azoto purissimo è stato utilizzato come curtain gas, come nebulizzatore e come gas di collisione (20,16, e “medium” rispettivamente; unità del costruttore) ed è stato applicato un voltaggio di 5,000 V al capillare.

È stata effettuata una preliminare calibrazione della massa di ciascun analizzatore di massa, Q1 e Q3, infondendo una soluzione di glicole propilenico ad una velocità di flusso di 10 µL/min. La risoluzione unitaria è stata stabilita, in ogni quadrupolo, mantenendo una larghezza a metà altezza di circa 0,7±0,1 Da. I dati sono stati acquisiti ed elaborati con Analyst 1.5.1 Software (Applied Biosystems/MSD Sciex).

I parametri strumentali principali per le acquisizioni SRM degli 8 pesticidi in esame sono riepilogati in tabella 3.

Tabella 3: Transizioni SRM e parametri ESI-MS/MS ottimizzati per l'identificazione dei pesticidi

ANALITI	Transizioni SRM Qualifier e quantifier ¹	DP (V) ²	CE (V) ³	CXP (V) ⁴
Tebuconazolo	308.0/116.0	76	59	4
	308.0/70.0		55	4
Trifloxystrobin	408.9/205.9	46	20	10
	408.9 144.9		65	6
Imazalil	296.9/158.9	69	25	10
	296.9/200.9		31	7
Dimetoato	246.7/170.9	25	25	8
	246.7/87.8		23	3
Triadimefon	293.7/197.0	64	22	10
	293.7/110.8		60	8
Carbaril	219.0/201.9	28	9	10
	219.0/117.0		41	9
Bifentrina	440.0/165.9	36	18	9
	440.0/181.0		57	7
Permetrina	407.9/168.0	39	24	9
	407.9/183.1		59	16

¹ La prima linea riporta la transizione SRM meno intensa (qualifier) e la seconda la più intensa (quantifier).

² Il *potenziale di declustering* (DP) è la differenza tra i voltaggi dell'orifizio e dello skimmer. Più alta è la differenza di potenziale maggiore è il declustering/frammentazione in sorgente.

³ Il *potenziale di collisione* (CE) è la differenza tra i voltaggi del quadrupolo di declustering, Q0=-10, e della cella di collisione R02: PC=(Q0-R02) V.

⁴ Il *potenziale in uscita dalla cella di collisione* (CXP) rappresenta la differenza di potenziale tra Q2 e Q3. È un indice della velocità di uscita degli ioni dalla cella di collisione.

2.5 Microscopia

Su tutte le tipologie di foglie è stata effettuata una prima indagine allo Stereomicroscopio (Leica, modello M205C) per analizzarne la morfologia superficiale. Successivamente, le foglie di ulivo, che presentavano una superficie particolare, sono state osservate al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM, modello LEO 440) completo di Spettrometria EDAX (Oxford Instrument INCA). Per la metallizzazione dei campioni si è utilizzato uno “sputtercoater” (Emitec 500) in grado di effettuare metallizzazioni sia in oro che in carbonio. Per le finalità di questo studio si è preferito utilizzare la metallizzazione in oro.

3. Risultati e discussioni

3.1 Ottimizzazione delle condizioni sperimentali

3.1.1 Studio della frammentazione e ottimizzazione delle condizioni impiegate in MS/MS

Lo studio preliminare di frammentazione dei pesticidi è stato condotto con lo scopo di:

- 1) studiare il comportamento di questi composti verso la frammentazione indotta da collisione (o frammentazione CID, Collision Induced Dissociation);
- 2) ottimizzare la trasmissione ionica per conseguire la massima sensibilità strumentale.

Lo studio di frammentazione dei pesticidi è stato condotto, in modalità Product Ion Scan (PIS), mediante sorgente TurboIonSpray, utilizzando le soluzioni standard dei singoli analiti ad una concentrazione variabile, tra i 100 pg/ μ L e 1 ng/ μ L in metanolo. Si è lavorato in infusione ad un flusso di 10 μ L/min mediante una pompa a siringa.

Le caratteristiche strutturali delle otto sostanze selezionate ne favorivano la risposta in ionizzazione positiva, sebbene due di queste, triadimefon e tebuconazolo, abbiano dato ottimi risultati anche in ionizzazione negativa.

Per tutti i pesticidi, fatta eccezione per l'imazalil, è stata osservata la presenza dello ione addotto col sodio $[M+Na]^+$ più o meno intenso. Per alcuni pesticidi, in particolare dimetoato, carbaril, bifentrina, e permetrina, il picco relativo all'addotto con il sodio era talmente intenso da annullare quasi completamente il picco relativo allo ione addotto con il protone $[M+H]^+$. Per queste quattro sostanze si è tentato in primo luogo di frammentare il picco relativo proprio all'addotto con il sodio; ma come prevedibile, Na tende ad attirare a sé la carica positiva impedendo la rivelazione dei frammenti della molecola.

Nel tentativo di aumentare l'intensità del segnale dell'addotto con il protone è stata preparata una soluzione di HCOOH 1mM in MeOH, con la quale sono state diluite le soluzioni madri. I risultati però non sono stati quelli sperati; infatti, per nessun analita si è osservato un incremento significativo dell'intensità del segnale di $[M+H]^+$.

Si è quindi pensato di aggiungere ammonio alle singole soluzioni di analita, al fine di favorire la formazione dell'addotto con l'ammonio ($[M+NH_4]^+$) a discapito dell'addotto con il sodio.

È stata quindi preparata una soluzione 1mM di $CH_3COO^- NH_4^+$ in metanolo, con la quale sono state diluite le nostre sostanze, e nuovamente analizzate in modalità Q1 scan. Aggiungendo ammonio, sono stati osservati 3 effetti, validi per tutte le sostanze:

- 1) Un aumento dell'intensità del picco relativo a $[M+NH_4]^+$;
- 2) Un aumento dell'intensità del picco relativo a $[M+H]^+$;
- 3) Una diminuzione dell'intensità del picco relativo a $[M+Na]^+$.

L'unica sostanza per la quale non si è verificato un aumento dell'intensità dello ione addotto con il protone, in seguito all'aggiunta di ioni ammonio in soluzione, è la bifentrina. Per questo pesticida si è proseguito all'ottimizzazione del solo addotto con l'ammonio.

A titolo di esempio, viene riportato in figura 4 lo spettro in full scan del carbaril, prima e dopo aggiunta di ammonio alla soluzione.

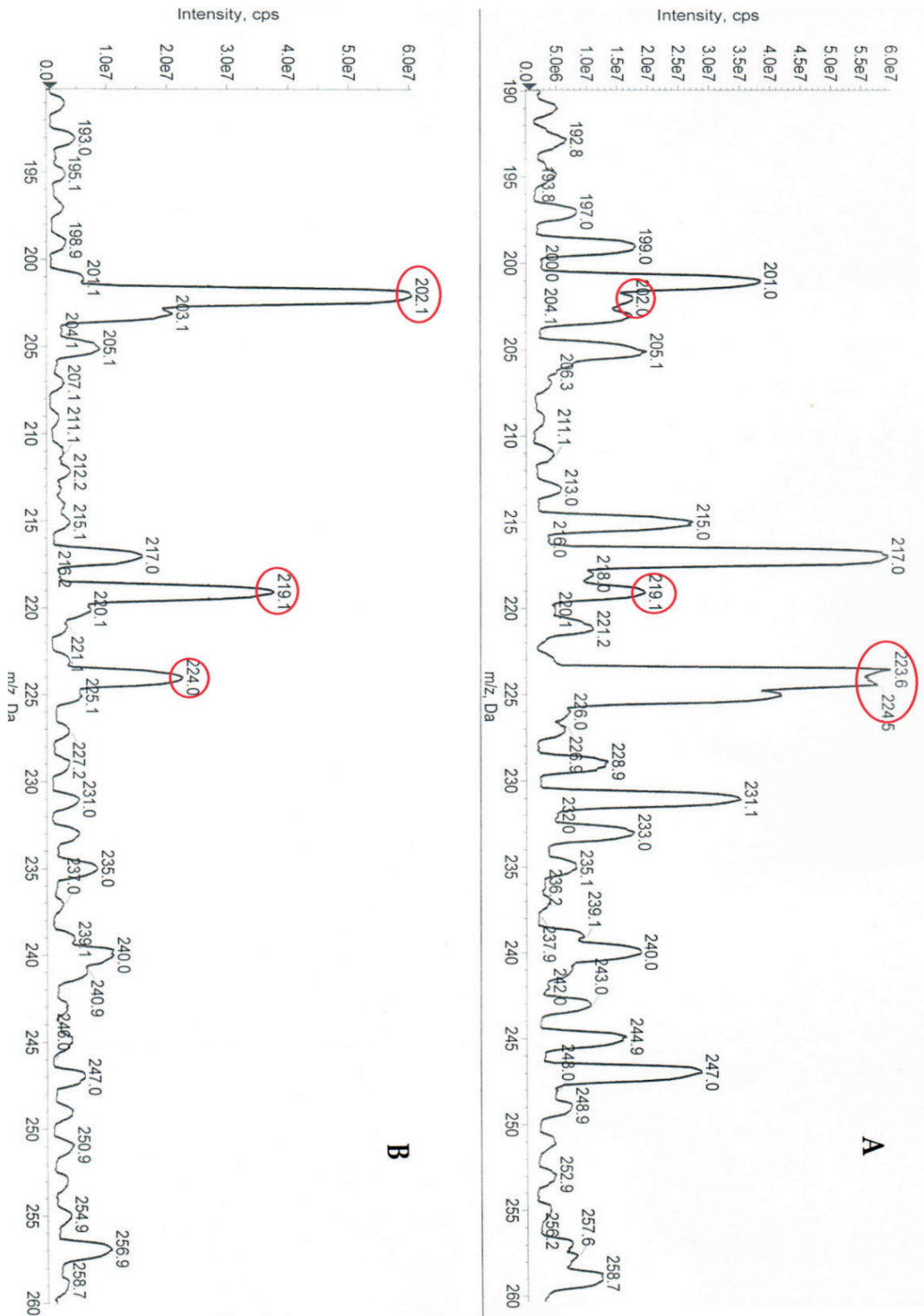


Figura 4 - Spettro Q1 scan di una soluzione di carbaril 500 pg/μL in MeOH, (A) senza NH₄⁺, (B) con NH₄⁺

Per dimetoato, carbaril, e permetrina, è stato possibile procedere al PIS sia dell'[M+H]⁺ che del l'[M+NH₄]⁺.

Per le restanti quattro sostanze invece, nonostante fosse presente il picco relativo all'addotto con il

sodio, il picco dell'addotto con il protone era sufficientemente intenso da poter essere frammentato, e non è stato quindi necessario aggiungere ammonio.

Dopo un'analisi preliminare in Q1 scan, le otto sostanze sono state frammentate in modalità product ion scan.

Per due sostanze, triadimefon e tebuconazolo, è stato eseguito sia un PIS in modalità negativa che positiva, rispettivamente degli ioni $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$.

In particolare, il triadimefon presentava una maggiore frammentazione lavorando in modalità positiva, mentre il tebuconazolo presentava scarsa frammentazione in entrambe le modalità. A titolo di esempio sono stati riportati in figura 5 e 6 gli spettri di frammentazione in modalità positiva e negativa del triadimefon, a varie energie di collisione.

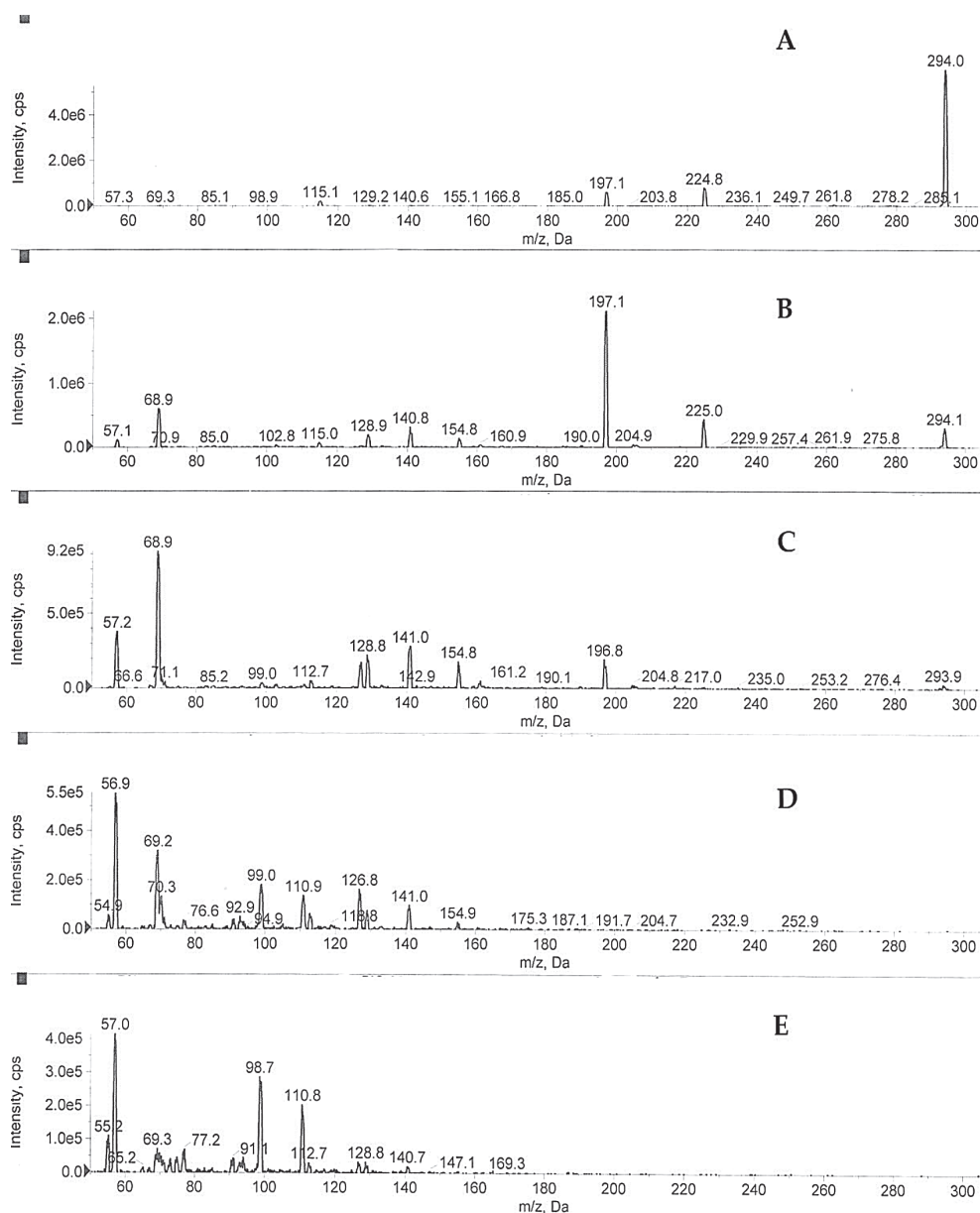


Figura 5 - Spettro di frammentazione in ESI + del triadimefon, a CE=15V (A), 25V (B), 35V (C), 50V (D), 65V (E)

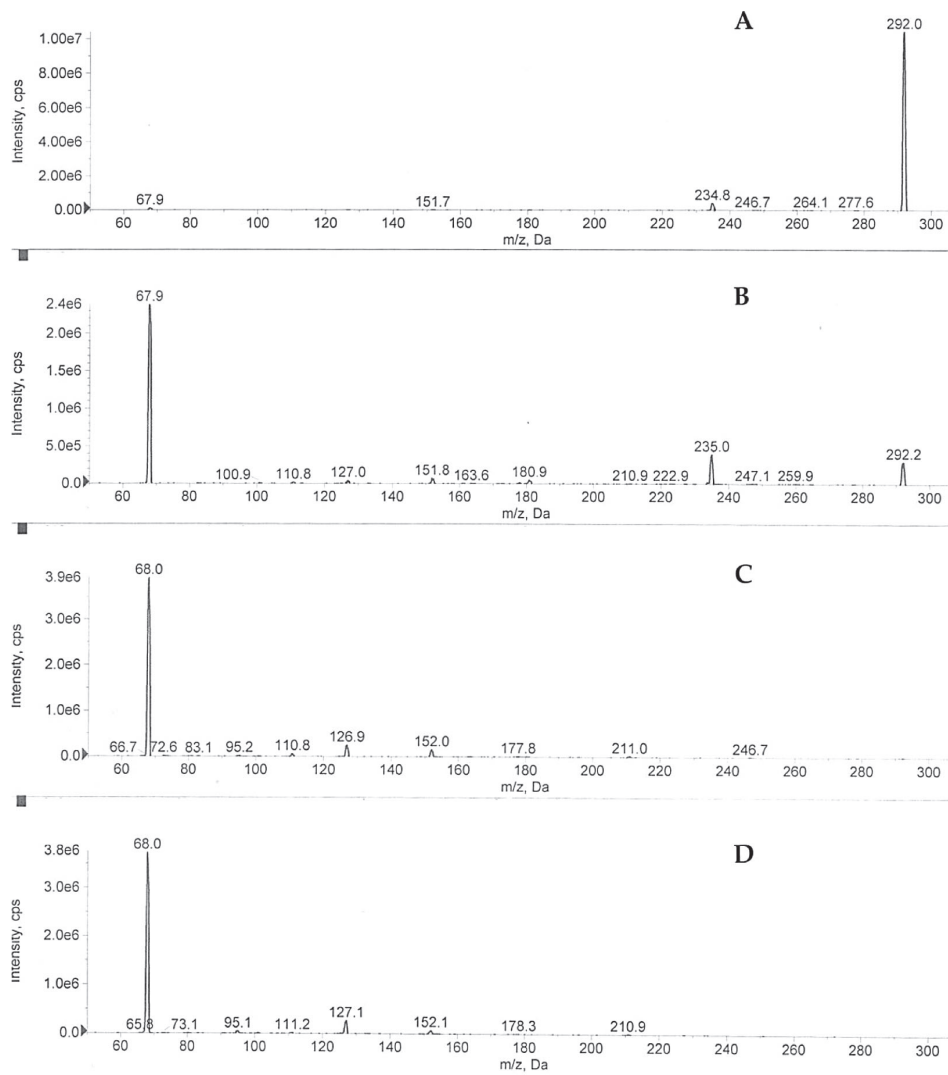


Figura 6 - Spettro di frammentazione in ionizzazione negativa del triadimefon, a CE=-10V (A), -20V (B), -30V (C), -40V (D)

Per quanto riguarda la modalità positiva, ad energie di collisioni (CE) basse, il triadimefon presentava due picchi, a 225 m/z e a 197 m/z, di intensità non trascurabile. Aumentando l'energia di collisione si producevano ulteriori frammenti a 141, 111, 99, 69 e 57 m/z. È possibile ipotizzare la struttura di alcuni di questi frammenti, come mostrato in figura 7.

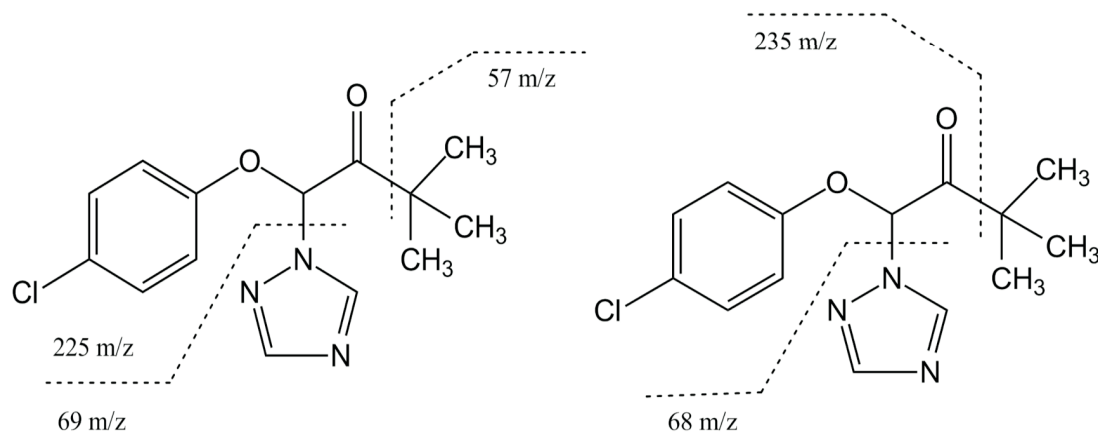


Figura 7 - Triadimefon, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo (a sinistra) e in PIS negativo (a destra)

In modalità negativa invece, la stessa sostanza ha presentato, a basse energie di collisione, un picco molto intenso a 223 m/z, a cui non è stata ancora attribuita una struttura definitiva, ma si ipotizza un riarrangiamento. Salendo con la CE sono apparsi frammenti a 111, 82 e 68 m/z, la cui struttura invece è stata ipotizzata (figura 7).

Il tebuconazolo in modalità di ionizzazione positiva ha dato origine a pochi frammenti di debole intensità. In particolare 151, 125 e 70 m/z sono quelli più visibili. Per quanto riguarda il frammento a 70 m/z, sono state ipotizzate due possibili strutture, come riportato in figura 8.

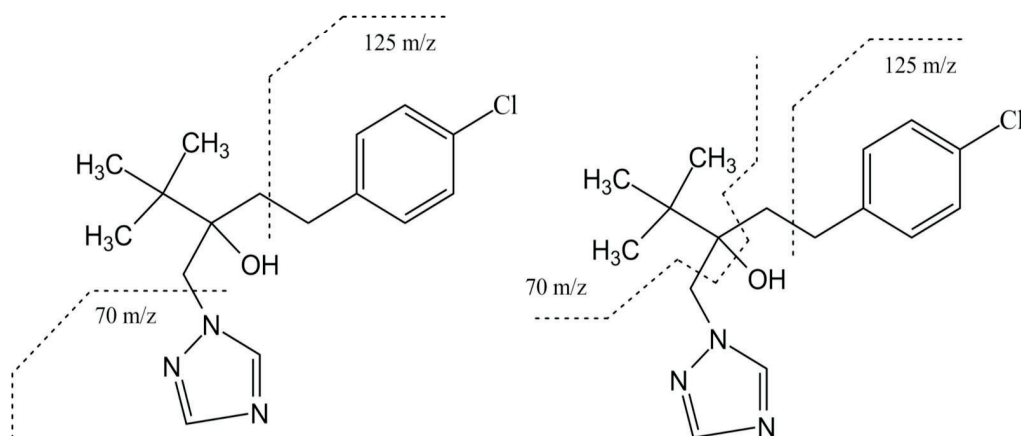


Figura 8 - Tebuconazolo, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

In modalità negativa invece, i frammenti più intensi sono quelli a 223, 165, 111, 82 e 68 m/z, molti dei quali sono facilmente interpretabili.

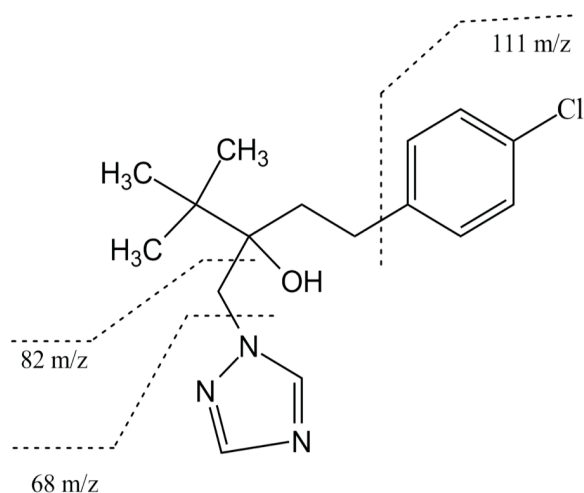


Figura 9 - Tebuconazolo, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

Per bifentrina, carbaril, dimetoato, imazalil, permetrina e trifloxystrobin, è stato eseguito il PIS esclusivamente in modalità positiva, dato che non risultavano ionizzabili in modalità negativa. Per imazalil e trifloxystrobin è stato eseguito uno studio della frammentazione dello ione addotto col protone $[M+H]^+$. I frammenti più intensi osservati sono 255, 201, 159 e 69 m/z per l'imazalil, e 206, 186, 145, 116 m/z per il trifloxystrobin. Anche in questo caso sono state formulate delle ipotesi riguardo alla struttura dei frammenti, per entrambe le sostanze, come osservabile in figura 10 e 11.

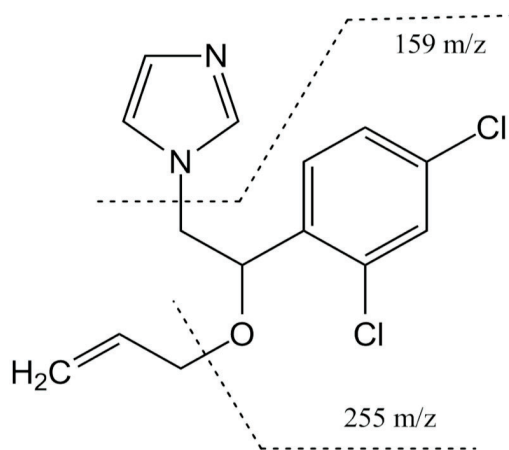


Figura 10 - Imazalil, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo.

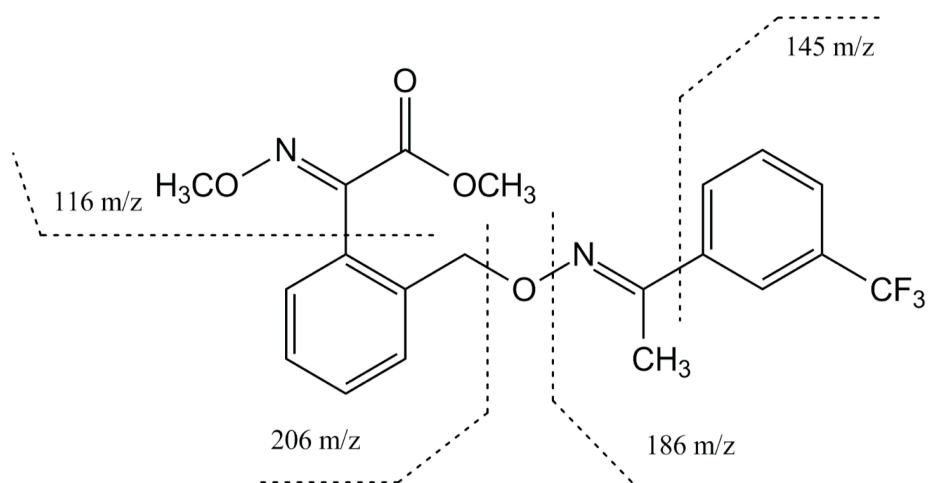


Figura 11 - Trifloxystrobin, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

Per carbaril, dimetoato e permetrina sono stati eseguiti PIS sia dello ione $[M+H]^+$ che dello ione addotto con l'ammonio $[M+NH_4]^+$, che ovviamente presentano uno spettro di frammentazione coincidente.

Il carbaril presentava dei frammenti molto intensi a 145, 127, 117, 115, 91 e 77 m/z.

I frammenti più intensi del dimetoato apparivano a 199, 171, 125, 88 e 79 m/z.

Per quanto riguarda la permetrina, 255, 183 e 168 m/z erano i frammenti più intensi.

Le ipotesi delle strutture dei frammenti sono riportate in figura 12, 13 e 14.

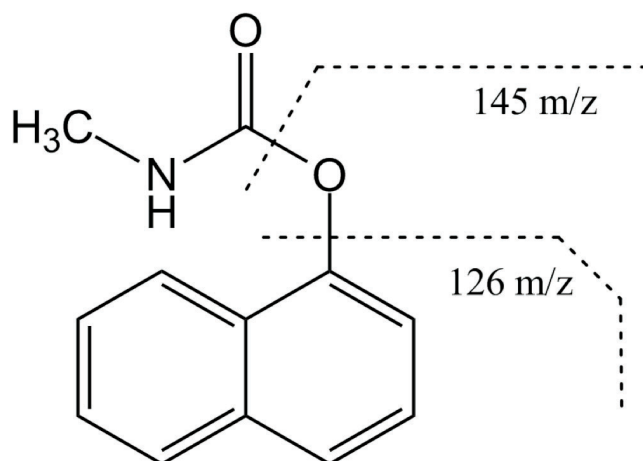


Figura 12 - Carbaril, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

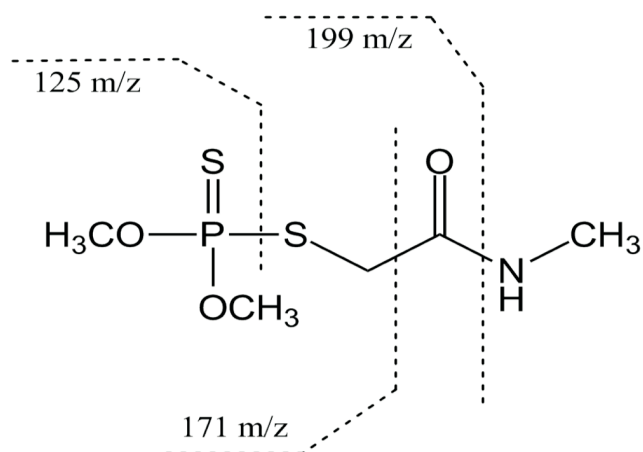


Figura 13 - Dimetoato, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

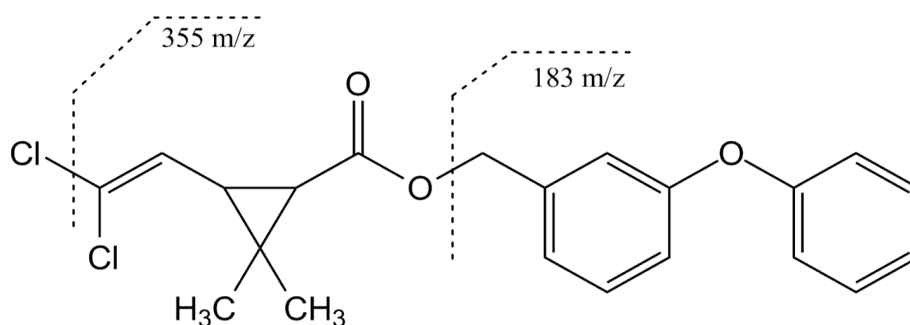


Figura 14 - Permetrina, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

Infine per la bifentrina è stato eseguito il PIS del solo addotto con l'ammonio $[M+NH_4]^+$, in quanto quello col protone presentava un'intensità estremamente bassa e di conseguenza una frammentazione scarsamente osservabile.

I frammenti più caratteristici di questa sostanza si presentavano a 181 e 166 m/z, le strutture relative a questi 2 frammenti sono facilmente spiegabili come si osserva in figura 15.

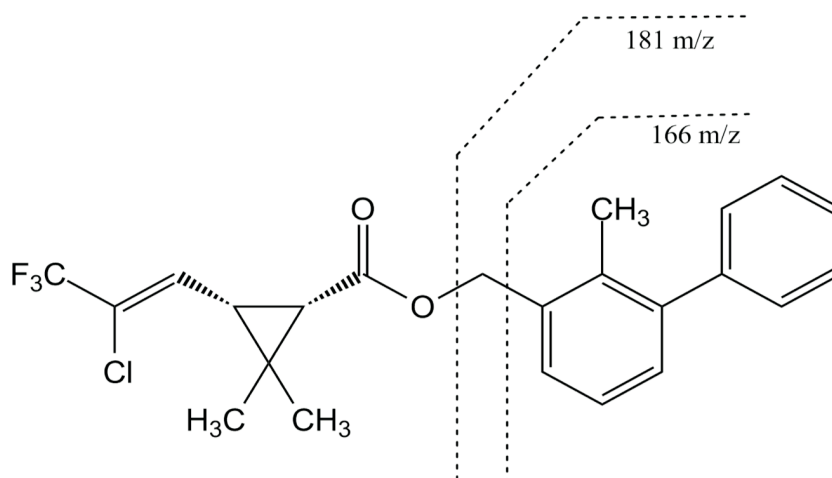


Figura 15 - Bifentrina, struttura dei frammenti ipotizzata in PIS positivo

Una volta individuati i frammenti delle otto sostanze in analisi, si è proceduto all'ottimizzazione dei parametri geometrici dell'interfaccia DESI. I test preliminari sono stati effettuati depositando un volume noto di soluzione degli standard sulle placche di teflon della piastra Prosolia. Una volta individuati i parametri definitivi sono stati confermati sui campioni reali.

3.1.2 Ottimizzazione dei parametri DESI

3.1.2.1 Scelta dello spray

La scelta dello spray di lavoro è fondamentale per l'ottimizzazione delle analisi quando si utilizza l'interfaccia DESI.

La funzione dello spray è quella di desorbire le sostanze dalla superficie analizzata e contestualmente ionizzarle. Inoltre, il gas coassiale allo spray ne favorisce l'ingresso verso l'interno dell'analizzatore. È facile dunque intuire che in base alla natura della sostanza e della superficie, spray diversi avranno diversa efficacia. Tutti gli esperimenti effettuati sono stati svolti utilizzando come supporto i "pozzetti" di teflon presenti sulla superficie delle piastrine in vetro apposite per la strumentazione DESI. I parametri così ottenuti sono stati traslati su campioni reali costituiti da foglie e la loro efficacia è stata controllata.

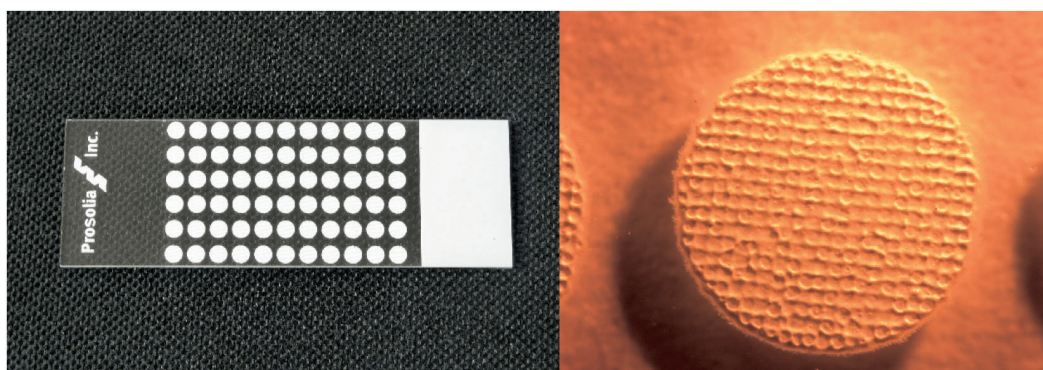


Figura 16 - Piastrina Prosolia per DESI (a sinistra); ingrandimento al microscopio di un pozzetto di teflon (a destra)

Inizialmente, studiando la letteratura, è emerso che gli spray utilizzati in questi tipi di esperimenti sono solitamente molto simili alle fasi mobili utilizzate in cromatografia a fase inversa [Bal-006], quindi miscele composte da solventi polari, quali metanolo, acqua o acetonitrile.

In secondo luogo, tenendo in considerazione che quattro delle nostre sostanze risultavano osservabili solamente in presenza di ioni ammonio, si è dovuto valutare se aggiungere ioni NH_4^+ direttamente alla singola soluzione di analita, oppure all'interno dello spray.

Sulla base di queste considerazioni sono stati quindi preparati sei differenti spray, quattro dei quali contenevano ioni NH_4^+ in concentrazione 1mM:

- 1) MeOH
- 2) $\text{CH}_3\text{CN} + \text{HCOOH}$ (1%)
- 3) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in MeOH:H₂O (25:75, v/v)
- 4) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in MeOH:H₂O (75:25, v/v)

- 5) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (95:5, v/v)
- 6) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (95:5, v/v)

Le prime analisi sono state condotte utilizzando come spray metanolo puro ed aggiungendo $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alle soluzioni di carbaril, dimetoato, permetrina e bifentrina, al fine di facilitare la formazione di addotti con l'ammonio e di addotti col protone a discapito di quelli col sodio. Sfortunatamente per queste quattro sostanze i risultati sono stati negativi, mentre la scelta si è rivelata efficace per tebuconazolo, imazalil e tryfloxystrobin, che presentavano già, in fase di ottimizzazione preliminare, uno ione addotto col protone molto intenso. In base a questi primi risultati si è stabilito di aggiungere $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ all'interno dello spray e non nelle singole soluzioni di lavoro. Il passaggio successivo quindi è stato quello di testare l'efficacia dell'acetonitrile. Il CH_3CN infatti è una molecola polare, molto leggera e si è pensato potesse svolgere un lavoro migliore del metanolo in termini di desorbimento. L'unico problema derivante dall'utilizzo di acetonitrile è la mancanza di protoni scambiabili per favorire la formazione di $[\text{M}+\text{H}]^+$ in soluzione. Per sopperire a questa mancanza è stato aggiunto allo spray l'1% in volume di acido formico (HCOOH).

Purtroppo anche questo spray non ha dato i risultati sperati, infatti non vi sono stati miglioramenti per nessuna delle otto sostanze.

Si è passati quindi alla preparazione di altri quattro spray contenenti ognuno ioni ammonio in concentrazione 1mM. L'acetato di ammonio è scarsamente solubile in metanolo e in acetonitrile, ma è solubile in acqua, per cui ad ogni spray è stata aggiunta una quantità variabile di acqua al fine di facilitare la solubilizzazione del $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

Da analisi preliminari, utilizzando questi nuovi spray è emerso subito un notevole miglioramento in termini di rivelabilità. Fatta eccezione per quello contenente $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (95:5), gli altri tre permettevano infatti la rivelazione di almeno metà delle sostanze. Questo ha fatto subito preferire l'utilizzo del metanolo a discapito dell'acetonitrile, ma anche la percentuale di metanolo nella miscela era un parametro che andava approfondito.

L'unico spray che rivelava tutti e otto gli analiti era infatti quello contenente $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (75:25), che è stato quindi scelto come spray di lavoro, seguito dal $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (95:5) che però rivelava solamente cinque sostanze su otto.

A titolo di esempio si riportano gli spettri di una soluzione 500 pg/ μL di imazalil, effettuati su pozzetti di teflon, utilizzando i sei differenti spray preparati.

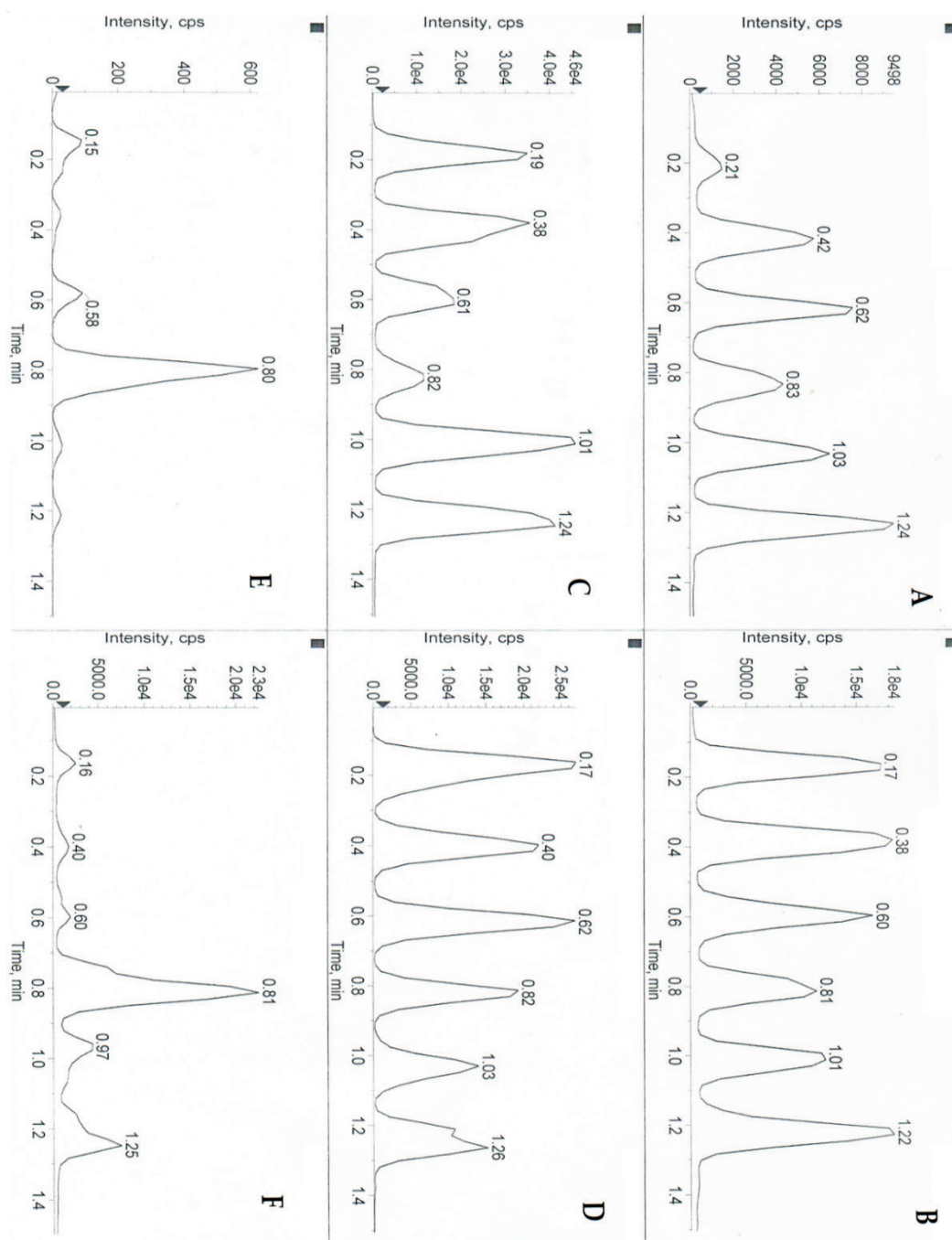


Figura 17 - Total ion currents di una soluzione 500 pg/μL di imazalil ottenuti utilizzando 6 differenti spray: MeOH (A); CH₃COONH₄ in MeOH:H₂O 95:5 (B); CH₃COONH₄ in MeOH:H₂O 75:25 (C); CH₃CN + HCOOH (1%) (D); CH₃COONH₄ in CH₃CN:H₂O 95:5 (E); CH₃COONH₄ in MeOH:H₂O 25:75 (F). Sono stati utilizzati 6 pozzetti di teflon per ogni analisi su ognuno dei quali sono stati depositati 2 μL di soluzione

Come facilmente osservabile dagli spettri riportati, lo spray selezionato per il resto delle analisi è stato quello che presentava il miglior compromesso tra numero delle sostanze rivelate e intensità dei segnali.

Un aspetto importante, evidente nella figura 17, è che i picchi relativi ai pozzetti di teflon sono diversi fra loro.

La non eccellente riproducibilità inter-campione è indipendente dalla costituzione geometrica dell'interfaccia. Al contrario è determinata da un ben noto fenomeno chimico-fisico per cui la deposizione dei soluti durante l'evaporazione dei solventi è randomica. Infatti, deponendo anche un volume infinitesimale di soluzione su una determinata superficie, non si otterrà un film omogeneo di analita ma un gradiente di concentrazione. Inoltre, la porzione di spazio che lo spray carico spazza è in proporzione molto più piccolo dell'area del pozzetto o della goccia depositata. Si viene così a creare una scansione quasi puntuale della superficie e di conseguenza segnali spesso diversi, da campione a campione, a parità di quantità depositata.

3.1.2.2 Geometria della sorgente

Le impostazioni geometriche dell'interfaccia DESI vanno ad influire enormemente sull'aspetto qualitativo e quantitativo di uno spettro. In particolare, una scorretta disposizione geometrica delle componenti può causare un malfunzionamento dell'interfaccia stessa provocando, ad esempio, un desorbimento inefficace dell'analita; un angolo di incidenza errato per il flusso dello spray può dar origine a spettri poco riproducibili, così come un cannello troppo alto non sarebbe in grado di catturare gli ioni formati.

Per effettuare l'ottimizzazione geometrica si sono preparati nuovi campioni nei pozzetti di PTFE e, utilizzando lo spray appena scelto, si è proceduto a modificare un parametro alla volta ed a registrare le variazioni nella forma e nell'intensità degli spettri.

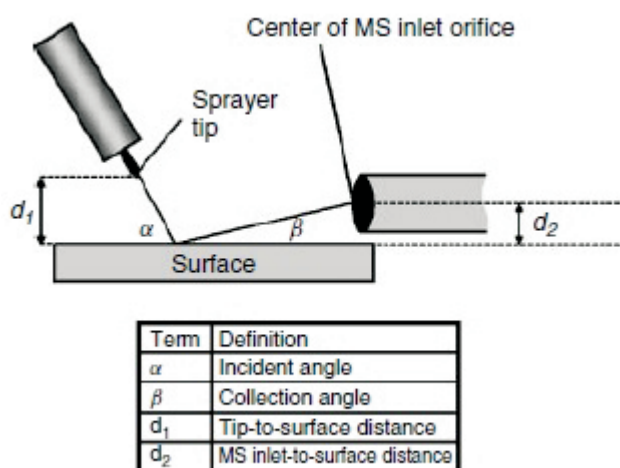


Figura 18 - Parametri geometrici di una sorgente DESI [TWC-005]

Il primo parametro analizzato è stato l'altezza dell'ago rispetto alla piastra o alla superficie del campione reale (d_1 , figura 18). Sono state effettuate alcune analisi con soluzioni 100 ng/ μ L a $d_1 = 1; 1,5; 2; 2,5; 3$ mm ed è stato osservato che già oltre i 2 mm lo spettro era molto meno intenso probabilmente a causa del fatto che il desorbimento della sostanza risultava meno efficace. È stata quindi scelta una distanza ottimale di 1,5 mm.

In seguito si è deciso di variare l'angolo α (figura 18) tra ago e superficie al fine di verificare se si

potessero avere dei miglioramenti in termini di intensità e qualità di segnale dovuti ad una maggiore entrata di ioni all'interno del cannello. Anche in questo caso si è utilizzata una miscela degli analiti a 100 ng/ μ L. Da queste prove è emerso come spostare l'angolo α a valori minori di 55-60° comportasse una notevole diminuzione di segnale, dovuta probabilmente ad una minore entrata di ioni all'interno dell'analizzatore. È stato quindi impostato l'angolo ottimale a 55°.

Infine, l'altezza del cannello dalla superficie (d_2 , figura 18) è stata settata ad 1 mm. Infatti, poiché questa distanza è strettamente collegata ai due parametri ottimizzati in precedenza, in particolare all'angolo β (che è direttamente dipendente dall'angolo α), la scelta era pressoché obbligata.

3.1.3 Ottimizzazione dei campioni reali

Dopo aver ottimizzato lo spray di lavoro ed i parametri geometrici, si è passati a testare il metodo direttamente sulle matrici reali: le foglie.

Nella fase iniziale dello studio si era pensato di usare solo la foglia di vite. L'ipotesi da noi formulata era che non ci sarebbero state differenze in termini di intensità di segnale ma che anzi questo avrebbe aiutato a ridurre la variabilità. I risultati ottenuti però, ci hanno indotto ad effettuare una differenziazione in base agli utilizzi commerciali dei singoli pesticidi.

Si è cercato fin da subito di trovare una configurazione fisica per i campioni che fosse il più riproducibile possibile, visto e considerato che, anche lavorando con matrici ideali, quali i pozzetti di teflon, i risultati non erano sempre uguali, sia in termini di forma che di intensità dei picchi. Questo ha portato a dover decidere la forma geometrica più idonea per i campioni e soprattutto un metodo di immobilizzazione che fosse più efficace e meno invasivo possibile.

È stato quindi effettuato un primo tentativo ritagliando striscioline di foglia dello spessore di circa 0,2-0,3 mm, e di lunghezza 2-3 cm, immobilizzandole verticalmente su una piastrina in vetro attraverso l'utilizzo del normale nastro adesivo. Sulle striscioline è stata depositata una quantità di sostanza compresa tra 1 e 2 μ L a diverse concentrazioni in base al tipo di misura. Come bianco, e linea di base, è stata ritagliata una sezione di foglia (non trattata) leggermente più grande, che è stata posizionata prima dei campioni da analizzare (figura 19).

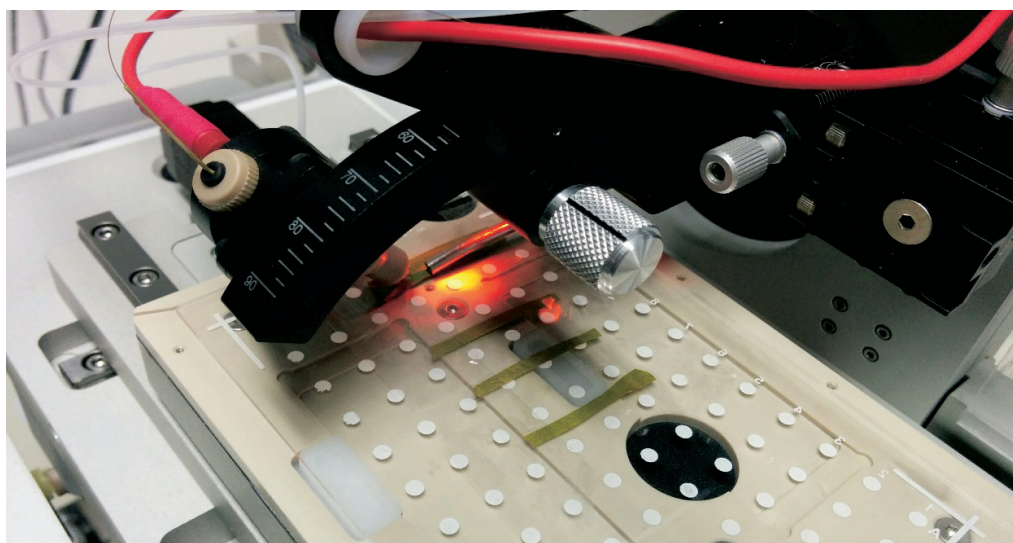


Figura 19 - Scansione in corso di striscioline di vite

Dopo diversi tentativi, questo tipo di geometria è stata abbandonata poiché si è notato che durante la fase di deposito della sostanza la soluzione tendeva a migrare verticalmente. Questo creava delle differenze di concentrazione in diverse zone della superficie della foglia, causando notevoli problemi di riproducibilità del metodo. Bisognava lavorare con una superficie più piccola, che potesse contenere il più possibile la migrazione superficiale della sostanza.

Si è quindi passati a delle sezioni quadrate di foglia, delle dimensioni di circa 0,5x0,5 cm, immobilizzate sulla piastrina sempre grazie all'utilizzo del nastro adesivo che si era rivelato un buon materiale di supporto. Anche in questo caso, una volta depositata la sostanza, essa veniva assorbita in modo casuale dalla superficie, creando ugualmente differenze di concentrazione tra un punto e l'altro. Questa volta però, trattandosi di una superficie meno diffusa, il fenomeno di migrazione era più contenuto. Settando l'ago più o meno al centro della sezione quadrata si riusciva a fornire una buona rappresentazione della quasi totalità del campione.

Questo tipo di geometria si presentò bene, inizialmente, dando ottimi risultati con tutti gli analiti in esame. La forma dei picchi però non era ottimale, infatti essi si presentavano molto spesso con degli "spike" laterali dovuti agli scalini formati dai bordi della foglia e generati dal passaggio del gas (figura 20).

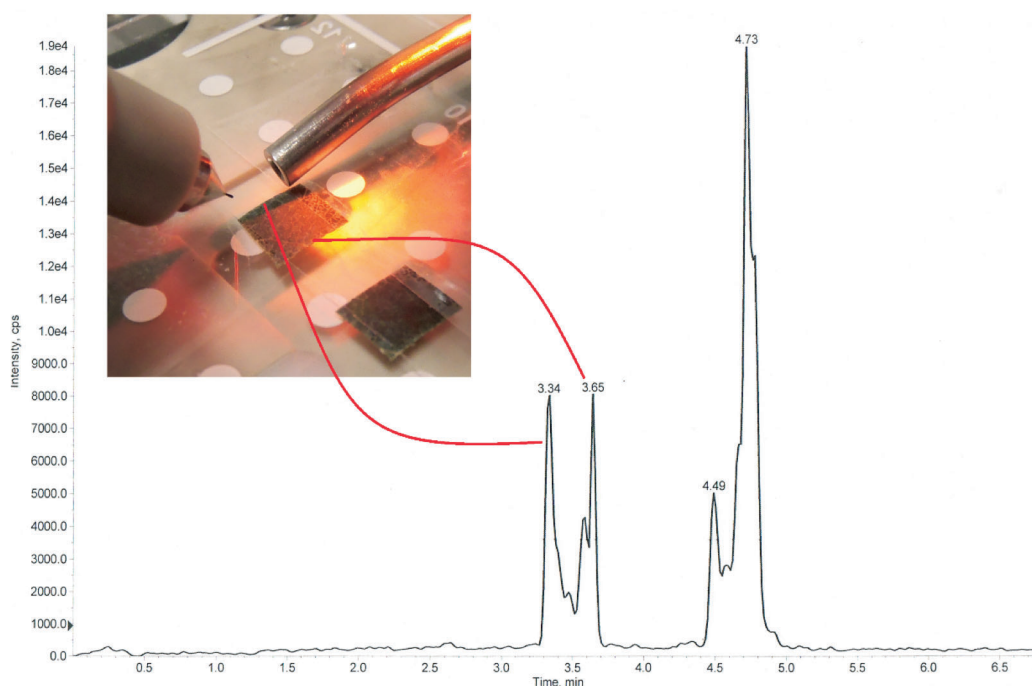


Figura 20 - Spettro di imazalil (500 ng/μL). In evidenza, la particolare forma dei picchi dovuta alla geometria dei campioni di foglia

Inoltre, essendo le sezioni ritagliate manualmente dall'operatore, si potevano venire a creare delle sottili differenze in termini di dimensioni e di superficie (venature, ingiallimento, ecc.) tra un campione e l'altro, che potevano andare ad inficiare in particolar modo analisi di tipo quantitativo. Si è iniziato quindi a preparare nuove sezioni di foglia, utilizzando uno strumento chiamato punzonatore. Questo metodo sembrò inizialmente il più riproducibile tra quelli provati, in quanto tutti i campioni generati punzonando la foglia erano perfettamente identici in termini di dimensioni (figura 21).

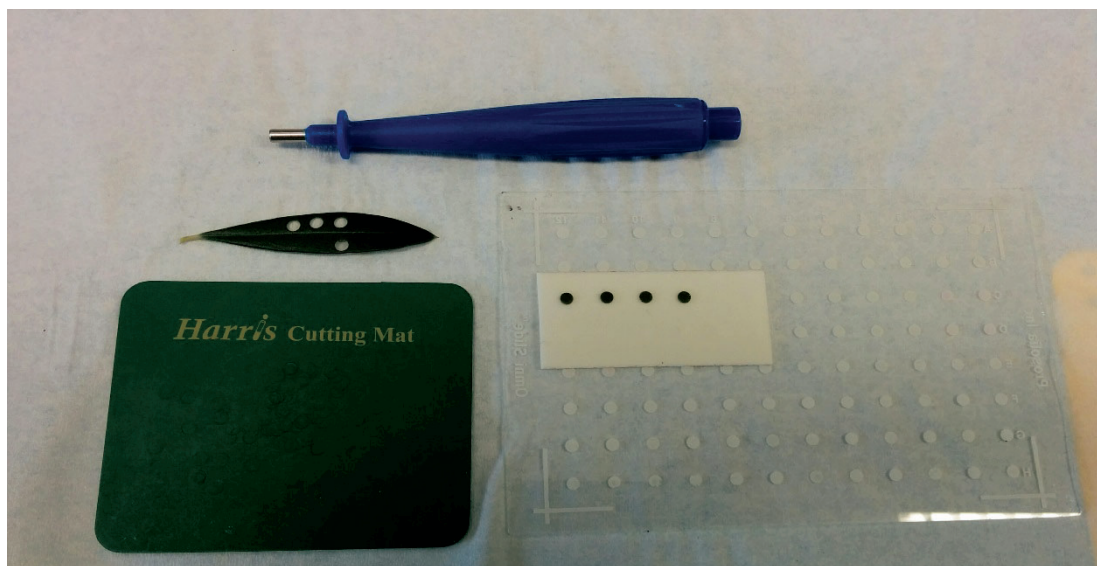


Figura 21 - Campioni di foglie di ulivo punzonati e immobilizzati su nastro adesivo

Inoltre, essendo la superficie punzonata estremamente piccola, paragonabile ad un pozzetto di teflon, non vi erano problemi di migrazione della sostanza, poiché era possibile scansionare quasi l'intera superficie. L'unico problema che si è presentato è stato quello di immobilizzare i campioni sulla piastrina. Non potendo infatti utilizzare il nastro adesivo classico, poiché avrebbe coperto l'intera superficie della foglia, si è optato per l'utilizzo del nastro biadesivo. Inizialmente i riscontri sono stati positivi, ma per alcuni analiti, come ad esempio tebuconazolo, imazalil e bifentrina si è fatto un notevole passo indietro in termini di intensità del segnale. I loro spettri infatti presentavano picchi molto deboli, che difficilmente si distaccavano dal rumore di fondo. È stato attribuito questo effetto al nastro biadesivo, sebbene non si riesca a spiegare con esattezza in quale modo esso impedisca un eventuale desorbimento della sostanza.

Si è deciso quindi di tornare alla geometria quadrata ma con un diverso ancoraggio della porzione di foglia sulla piastra. Sono state ritagliate delle sezioni di foglia delle dimensioni di circa 0,6x0,6 mm e sono state immobilizzate sulla piastrina con anelli adesivi in PVC (figura 2).

Già dalle prime analisi si è notato subito che i picchi si presentavano con una forma assimilabile ad una gaussiana. Il PVC infatti, delimitava la superficie quadrata al di sotto di esso in una sezione circolare poco più grande di un pozzetto di teflon, isolando il campione dal resto della piastrina. Proprio questo effetto ha dato origine ad uno spettro pulito e molto più riproducibile (figura 22).

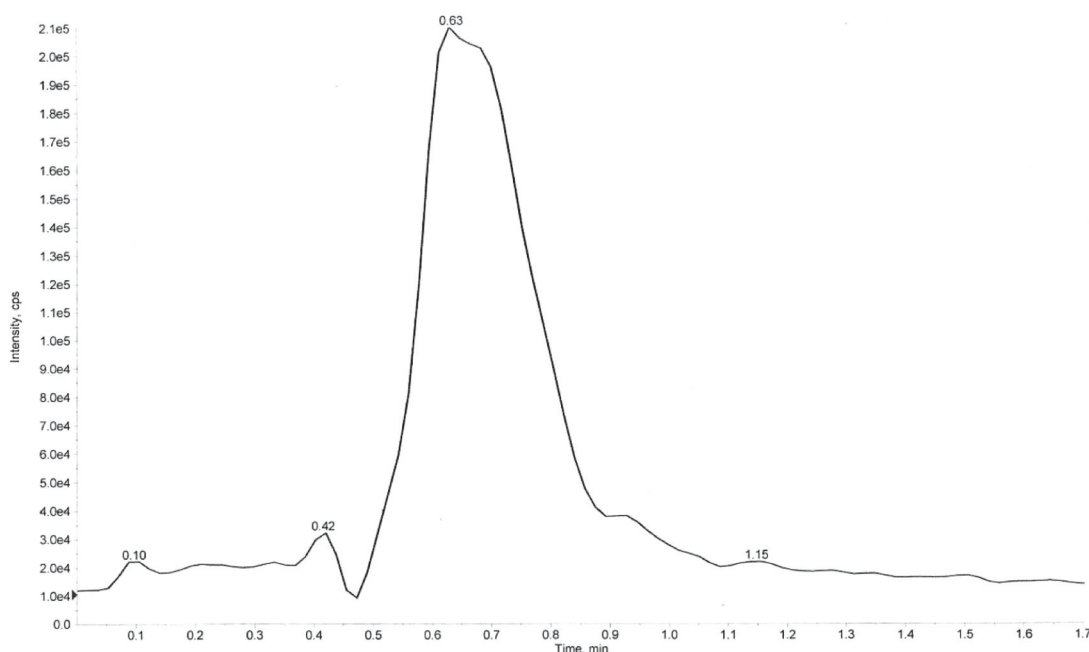


Figura 22 - Spettro del dimetoato su foglia (250 ng/ μ L) utilizzando anelli adesivi in PVC.

Una volta scelta la geometria dei campioni e il tipo di immobilizzazione, si è passati a differenziare le varie tipologie di foglie. In ambito agricolo infatti, non tutte le foglie vengono trattate con gli stessi pesticidi. L'imazalil, ad esempio, viene utilizzato principalmente sugli agrumi, come anche su alcuni frutti e verdure. Anche il carbaril ha come target gli agrumi, e viene utilizzato comunemente sui limoni, come insetticida. Il tebuconazolo invece è uno dei fungicidi più diffusi e utilizzati in viticoltura, mentre il dimetoato è un insetticida particolarmente efficace sulle coltivazioni di ulivo. Trifloxystrobin e bifentrina invece trovano il loro impiego primario nel settore frutticolo. Si è iniziato quindi ad analizzare, utilizzando tutti i parametri ottimizzati (geometria, metodo SRM, spray, immobilizzazione dei campioni, etc.), ogni singolo pesticida sulla sua matrice reale. Per alcuni pesticidi, come ad esempio il carbaril, si è notato un miglioramento dello spettro, soprattutto in termini di intensità, rispetto all'iniziale uso della foglia di vite. Per altri invece non si sono osservati cambiamenti significativi. Un riepilogo delle sostanze e delle matrici è riportato in tabella 4.

Tabella 4: Foglie utilizzate per l'analisi di ciascuna sostanza

SOSTANZE	FOGLIA
Tebuconazolo	Vite
Carbaril	Limone
Permetrina	Ciliegio
Imazalil	Limone
Bifentrina	Ciliegio
Dimetoato	Ulivo
Triadimefon	Vite
Trifloxystrobin	Vite

Al fine di evidenziare le differenze superficiali tra i diversi campioni di foglie, queste sono state sottoposte ad analisi di microscopia.

In primo luogo sono state effettuate delle foto al microscopio stereoscopico sui campioni di limone, vite, ulivo e ciliegio, agli ingrandimenti di 1x, 2x, 4x, 10x, 16x.

Le differenze tra un campione e l'altro sono state abbastanza visibili già dai primi ingrandimenti, e, osservando le superfici sempre più da vicino, sono risultate evidenti. A titolo d'esempio si riportano le foto dei quattro campioni ad un ingrandimento di 4x.

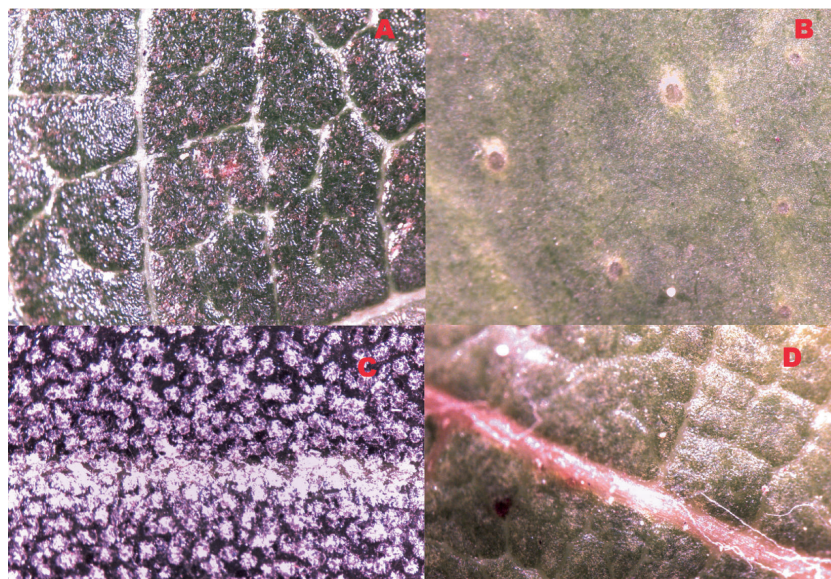


Figura 23 - Ingrandimenti 4x di ciliegio (A), limone (B), ulivo (C), vite (D).

L'ulivo, che presentava una superficie particolarmente caratteristica, è stato successivamente analizzato al microscopio elettronico (SEM, scanning electron microscope) che ne ha rivelato dei dettagli molto interessanti. La foglia presenta infatti delle strutture molto particolari, che sono state ipotizzate essere dei tricomi. Gli ulivi sono infatti piante millenarie che sopravvivono in ambienti estremamente asciutti, queste strutture particolari impediscono la perdita di acqua per evaporazione dalla foglia (figura 24).

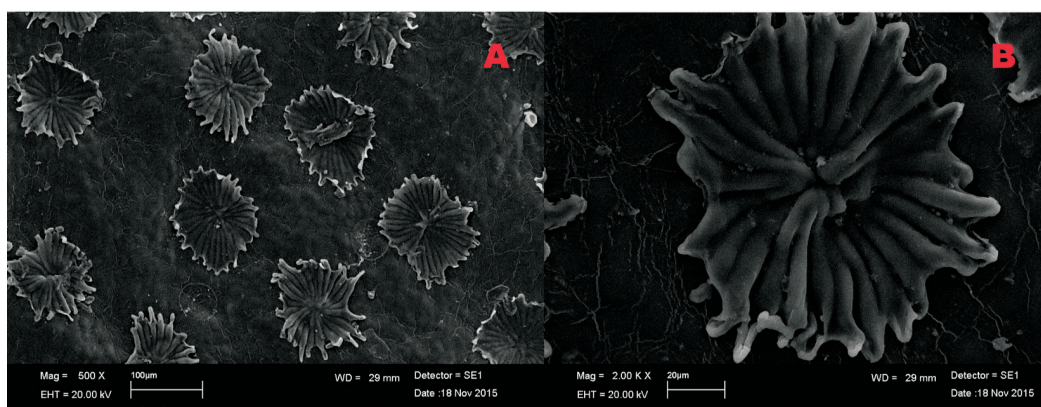


Figura 24 - Analisi SEM di una foglia di ulivo ad ingrandimenti: 500x (A); 2000x (B).

Dall'osservazione delle varie superfici è risultato evidente che ogni tipo di foglia può rispondere in modo differente ai fenomeni di assorbimento/desorbimento, e, quindi, influire direttamente sul meccanismo di funzionamento dell'interfaccia DESI.

3.2 Analisi qualitativa

3.2.1 Metodo analitico

La parte centrale del lavoro ha riguardato la preparazione di un metodo per l'analisi simultanea delle otto sostanze selezionate. È di fondamentale importanza infatti, che tutti gli analiti siano individuabili attraverso l'applicazione di un metodo unico, che sia quindi indipendente dal tipo di foglia e dal tipo di sostanza.

Per la preparazione di questo metodo si è deciso di selezionare, per ogni singolo pesticida, le due transizioni SRM con il maggior S/N (signal to noise). Sono state quindi effettuate alcune misure utilizzando per ogni pesticida le foglie riportate in tabella 4. Sono stati in seguito misurati i *signal to noise* per ogni transizione e tra questi sono stati selezionati i due valori più elevati (tabella 3).

3.2.2 Calcolo dei LODs e dei LOQs

Il calcolo dei LODs (limits of detection) e dei LOQs (limits of quantification) è essenziale per la validazione di un metodo, sia da un punto di vista quantitativo, ma soprattutto da un punto di vista qualitativo. Riuscire a dichiarare con certezza la presenza di una determinata sostanza è, infatti, di vitale importanza in una metodologia di screening come questa, soprattutto quando ci si ritrova ad analizzare sostanze dannose come i pesticidi, presenti talvolta in tracce.

Va inoltre ricordato che l'interfaccia DESI ha, a causa del suo meccanismo di funzionamento, una riproducibilità non molto elevata. Durante tutta la fase di ottimizzazione si è cercato di creare un metodo che fosse più riproducibile e meno dipendente dalla manualità dell'operatore possibile. Purtroppo però, al momento della deposizione, non è possibile stabilire a priori come la sostanza vada a distribuirsi sulla superficie della foglia e questo fenomeno provoca talvolta degli "spike" di concentrazione ben visibili sullo spettro. I LODs, quindi, sono soggetti a piccole variazioni causate appunto dalla distribuzione casuale dell'analita sulla superficie della foglia e sono naturalmente difficili da valutare. Al fine di fornire la stima migliore, i valori di seguito riportati sono una media di diversi campioni.

Il calcolo del LOD è stato valutato sperimentalmente partendo da soluzioni standard più concentrate e diminuendo progressivamente verso quelle meno concentrate di pesticida. Il LOQ, per ogni sostanza, è stato successivamente calcolato come tre volte il LOD ($LOQ=3 \times LOD$).

A partire dalla soluzione madre 1 mg/mL, per diluizione, sono state quindi preparate una serie di soluzioni:

- 1) 500 ng/ μ L
- 2) 200 ng/ μ L
- 3) 100 ng/ μ L
- 4) 50 ng/ μ L
- 5) 20 ng/ μ L

Su ogni campione di foglia è stato depositato 1 µL di sostanza utilizzando una siringa Hamilton. Inizialmente sono state eseguite due analisi preliminari utilizzando le concentrazioni 500 ng/µL e 200 ng/µL. Sei pesticidi su otto hanno risposto in maniera eccellente, indicando un LOD estremamente più basso rispetto alle concentrazioni utilizzate. I due pesticidi che invece hanno mostrato degli S/N molto bassi già da queste prime fasi sono permetrina e imazalil. Per quanto riguarda la permetrina già a 500 ng/µL è stato difficile osservare le transizioni rispetto al rumore di fondo. Per questa sostanza è quindi stato necessario utilizzare la soluzione madre da 1 mg/mL per l'identificazione del LOD. Per quanto riguarda l'imazalil invece, è stato attestato il limite di rivelabilità intorno ai 300 ng/µL.

Le restanti sei sostanze invece presentano LOD estremamente più bassi, come osservabile in tabella 5:

Tabella 5: Riepilogo dei LODs e dei LOQs delle otto sostanze selezionate

SOSTANZA	FOGLIA	LOD (ng/µL)	LOQ (ng/µL)
Tebuconazolo	Vite	50	150
Permetrina	Ciliegio	1000	3000
Bifentrina	Ciliegio	40	120
Dimetoato	Ulivo	15	50
Triadimefon	Vite	20	60
Trifloxystrobin	Vite	20	60
Carbaril	Limone	20	60
Imazalil	Limone	300	900

3.3 Analisi quantitativa

L'interfaccia DESI, pensata principalmente per analisi qualitative ed imaging, presenta molteplici problematiche quando si affrontano metodi di tipo quantitativo. Scarsa riproducibilità, differenze di concentrazione di analita tra un punto e l'altro della superficie rendono la quantificazione di una determinata sostanza molto difficoltosa, seppur possibile.

In questo lavoro si è cercato di effettuare un primo approccio verso un'analisi quantitativa, per una parte delle sostanze, utilizzando la strumentazione DESI-MS/MS direttamente sulle foglie.

3.3.1 Range di linearità

Dopo aver analizzato diverse strategie d'azione, si è deciso di procedere effettuando una retta di calibrazione utilizzando il fitofarmaco commerciale, il Rogor®, a base di dimetoato e con matrice foglie d'ulivo, e il tebuconazolo ed il trifloxystrobin, (Flint Max®) con matrice foglie di vite.

Il range dinamico lineare è stato testato sul PTFE e sulle foglie: il dimetoato fra 50 e 750 ng/µL; il trifloxystrobin fra 100 e 700 ng/µL ed il tebuconazolo 200 e 1400 ng/µL. Ogni retta era costituita da 5 punti ed ognuno di essi da 5 campioni indipendenti, dato che il primo punto era prossimo al LOQ si è seguita la transizione più intensa.

Inizialmente è stato valutato se convenisse eseguire una retta di calibrazione relativa alle altezze

dei picchi o alla loro area. La tecnica DESI però, proprio a causa delle differenze di concentrazione rilevate da un punto all'altro della superficie, rende il calcolo delle altezze molto complesso e poco riproducibile. Questo ha fatto optare per il calcolo delle aree. Sono stati analizzati i cinque campioni distinti per ogni concentrazione e per ogni tipo di foglia, se ne è calcolata l'area per ogni picco ed effettuata una media dei valori.

Il range di linearità è stato valutato anche in condizioni ideali, ovvero con soluzioni standard sui pozzetti di teflon. Sono state quindi preparate cinque soluzioni dei tre standard in MeOH, a concentrazioni identiche rispetto a quelle in matrice. Effettuando misure in solvente è emerso subito che a concentrazioni molto basse si mantiene una linearità ottimale e una riproducibilità molto buona. Analizzando le concentrazioni più elevate però si è verificata una perdita totale della linearità, a favore di un andamento di tipo logaritmico (figura 25).

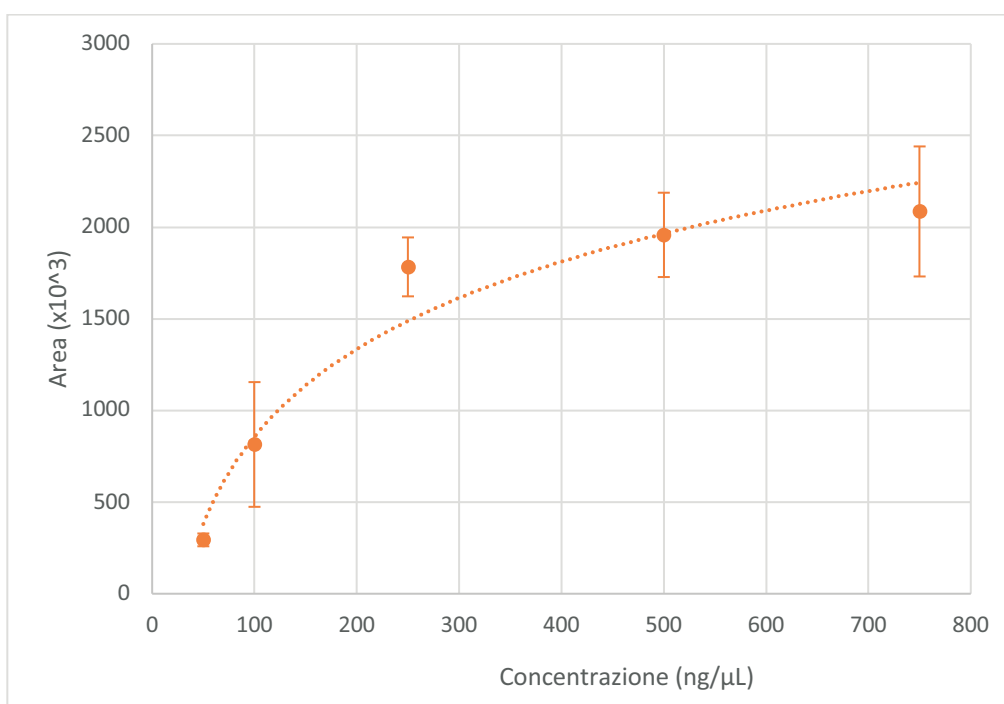


Figura 25 - Andamento logaritmico della retta di calibrazione del dimetoato in solvente su teflon

Come già citato nel paragrafo 3.2.2 l'interfaccia DESI ha dimostrato una non eccezionale riproducibilità. Per questo motivo per ogni punto di concentrazione è stata calcolata la deviazione standard relativa, che risultava compresa fra 9 e 40%.

In sintesi quindi, i range lineari in matrice ed in solvente sono differenti e nello specifico in solvente è inferiore. I risultati in termini di coefficienti di determinazione sono risultati tutto sommato accettabili ma va sottolineato che sulle foglie sono risultati migliori che sul PTFE (vedi tabella 6).

3.3.2 Effetto matrice

Dalla retta di calibrazione costruita su foglie è emerso un andamento lineare per tutto il range di concentrazioni preparate. Anche in questo caso, per ogni punto di concentrazione è stata calcolata la deviazione standard relativa, che risultava compresa fra 7 e 27%.

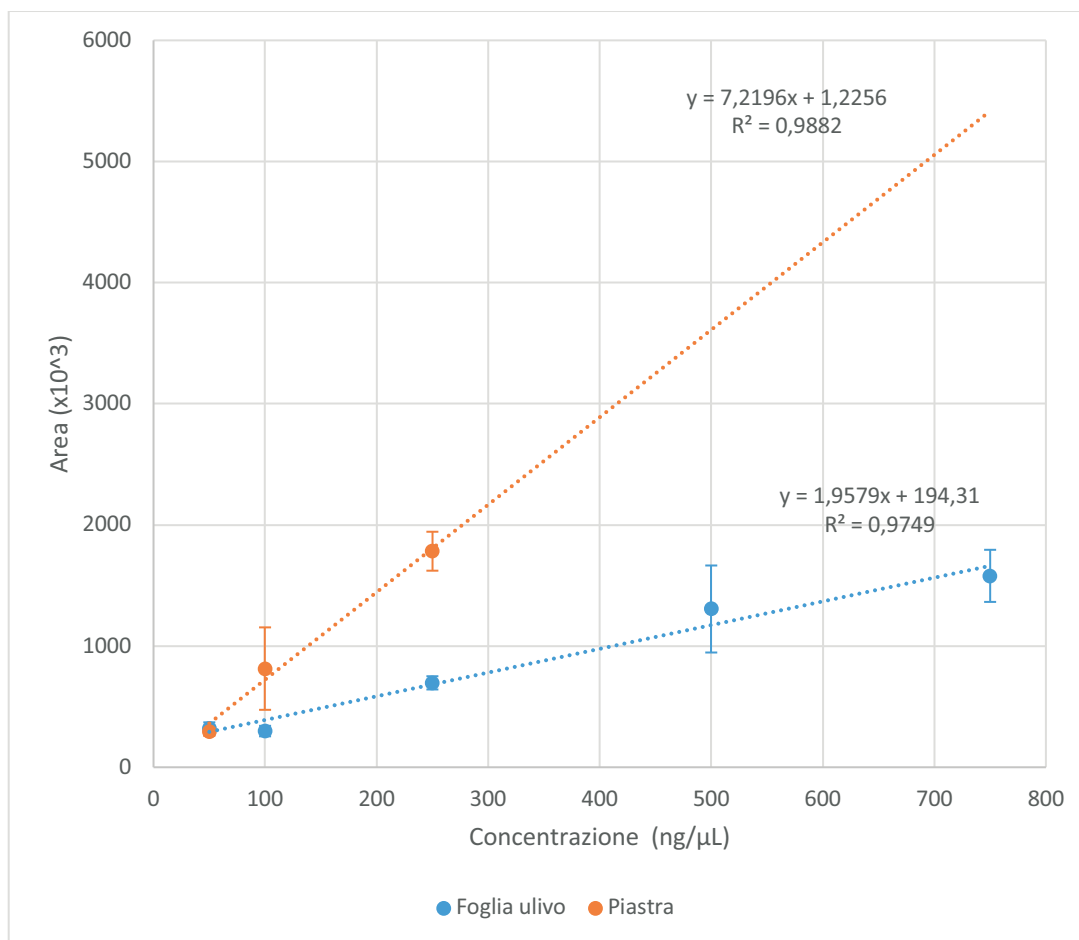


Figura 26 - Esempio di effetto matrice (dimetoato).

Questo andamento può essere attribuito a due fattori:

- 1) Differenze tra la superficie della foglia e quella dei pozzetti di teflon, che vanno ad influire sull'entità del desorbimento della sostanza;
- 2) Presenza dei coadiuvanti nel formulato che agiscono positivamente sul desorbimento del principio attivo.

Nonostante i range di linearità dei due metodi siano diversi, è stato calcolato ugualmente l'effetto matrice:

$$M = \frac{(a_f - a_p)}{a_p} = ME\%$$

Dove:

a_f = coefficiente angolare della retta di calibrazione sulla foglia

a_p = coefficiente angolare della retta di calibrazione su teflon

Come è facilmente osservabile dalla tabella 6 l'effetto matrice è elevato. L'andamento della retta su campioni di foglie ha però dato dei risultati estremamente positivi, che hanno fatto ben sperare per un successivo monitoraggio di campioni reali.

Tabella 6: Range dinamico lineare, coefficienti di determinazione ed effetto matrice per i tre pesticidi inseriti nell'analisi quantitativa

	Range dinamico lineare (ng/μL)	Coefficiente di determinazione* (R ²)	Effetto matrice** %
Dimetoato	50- 750	0.9752	81
Tebuconazolo	200-1400	0.9369	80
Trifloxystrobin	100-700	0.9711	52

* I coefficienti sono relativi al formulato sulla foglia

** Effetto matrice calcolato come decremento del coefficiente angolare della retta di calibrazione in solvente versus quella ottenuta aggiungendo il formulato alla foglia

Data l'assenza di informazioni circa l'effetto matrice nell'interfaccia DESI e più nello specifico quando questa viene applicata all'analisi dei pesticidi, si è pensato un esperimento addizionale per comprendere più a fondo le componenti che contribuiscono alla diminuzione del segnale.

A questo scopo è stata costruita una nuova retta di calibrazione (una per ciascun analita) spiccando il formulato sulle spots di PTFE e valutando quindi l'apporto al decremento dato dai soli componenti del formulato stesso. Un esempio delle singole componenti e dalla loro azione sul segnale è riportato per il dimetoato in figura 27.

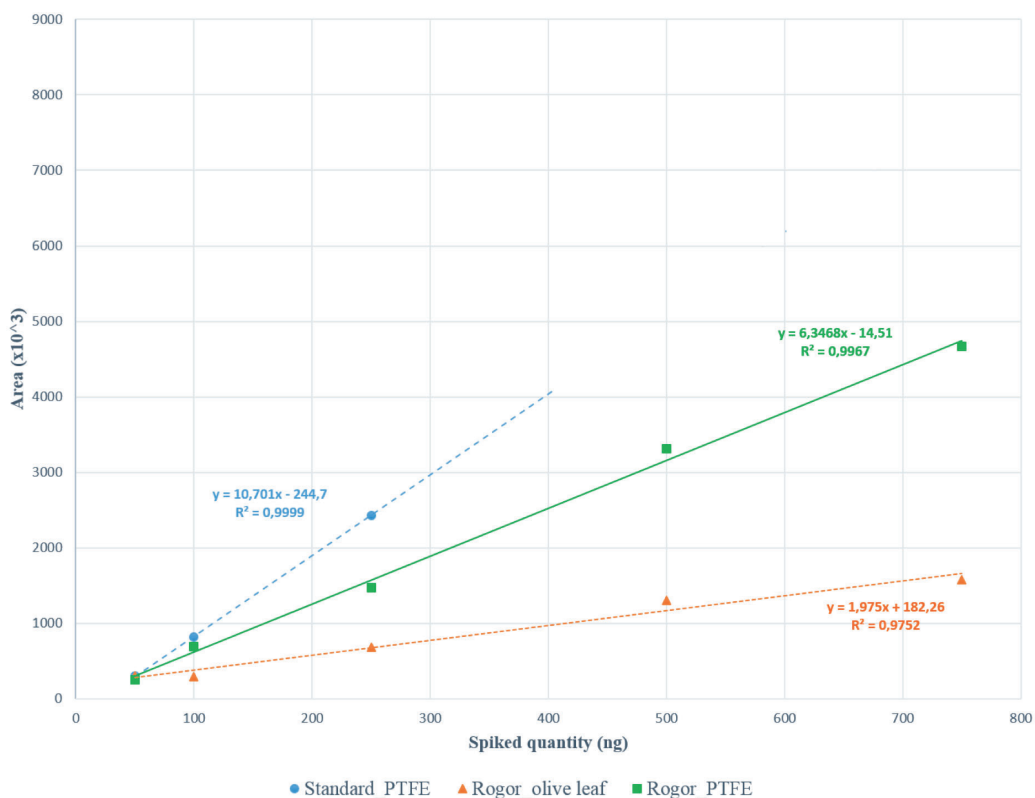


Figura 27 - Esempio di effetto matrice, per l'analita dimetoato, splittato nelle sue componenti ovvero il formulato e la foglia

I segnali risultati dalla combinazione Rogor-PTFE pur essendo maggiori di quella Rogor-Foglia di ulivo sono comunque inferiori alla condizione di “idealità” mostrando chiaramente come la foglia non sia l'unico componente dell'effetto matrice e quindi della diminuzione della sensibilità del metodo.

3.3.3 Performance del metodo quantitativo

I rimanenti parametri della valutazione della performance del metodo, ovvero la precisione intra-day ed inter-day e l'accuratezza, sono stati valutati seguendo la linea guida EURACHEM [Mag, Orn-014] ed i criteri della SANCO/12495/2011 [SANCO/12571/2013]. I controlli qualità (QC) per questo scopo sono stati preparati a tre livelli di concentrazione: basso QC₁, medio QC₂ e alto QC₃; per ogni livello di validazione sono state analizzati 5 campioni indipendenti. La precisione intra-day è stata espressa come deviazione standard relativa (RSD) dei 5 campioni di pesticida su foglia nella stessa sessione analitica. La precisione inter-day è stata ottenuta replicando la stessa tipologia di campioni in tre giornate diverse ed è espressa sempre come RSD. Infine, l'accuratezza è stata valutata confrontando il valore medio del misurando con il valore teorico di concentrazione del campione QC. I risultati di questi tre parametri di validazione sono riportati in tabella 7.

Tabella 7: Valori di accuratezza, precisione inter e intra-day espressi come deviazione standard relativa (RSD%) e esattezza (trueness %)

	Precisione intra-day (RSD%)			Precisione Inter-day (RSD%)			Esattezza (%)		
	QC ₁ *	QC ₂ *	QC ₃ *	QC ₁	QC ₂	QC ₃	QC ₁	QC ₂	QC ₃
Dimethoate	28	20	13	25	22	15	85	80	65
Tebuconazole	23	26	24	20	18	26	71	97	94
Trifloxystrobin	27	25	27	23	26	24	74	89	99

*QC₁: [dimetoato]=50 ng/μL; [tebuconazolo]=200 ng/μL; [trifloxystrobin]=100 ng/μL.

QC₂: [dimetoato]=250 ng/μL; [tebuconazolo]=700 ng/μL; [trifloxystrobin]= 350 ng/μL.

QC₃: [dimetoato]=750 ng/μL; [tebuconazolo]=1400 ng/μL; [trifloxystrobin]=700 ng/μL.

I risultati confermano che gli effetti “sweet spot” e “coffee ring” hanno un grande influenza sulla riproducibilità del metodo sviluppato; in diversi casi, infatti, le RSDs sono maggiori del 20% e in media si attestano sul 26%. Probabilmente l'impossibilità di usare uno standard interno e di replicare i campioni più volte ha un forte impatto su questi parametri.

In ogni caso tutte le deviazioni sono state largamente studiate e tenute sotto controllo aumentando il numero di campioni su cui calcolare i valori medi e, difatti, i valori di accuratezza provano che il metodo è in grado di fornire una stima valida del valore vero.

3.3.4 Monitoraggio di campioni reali di ulivo

Il Rogor® utilizzato per questo studio quantitativo è largamente diffuso in ambito agricolo, ed ha come target primario le coltivazioni d'ulivo.

La preparazione corretta di una sua soluzione, secondo la scheda tecnica, prevede la solubilizzazione di 250 mL di Rogor® in 100 L di acqua, per una concentrazione finale di dimetoato (presente in concentrazione pari a 214,7 g/L all'interno del formulato) di 540 ng/μL.

Sono stati reperiti alcuni campioni di foglie d'ulivo, trattati pochi giorni prima con Rogor®, sui quali è stata testata la validità del metodo precedentemente messo a punto.

Dalle foglie a disposizione sono state ritagliate 5 sezioni in modo completamente casuale, e sottoposte ad analisi DESI-MS/MS. Dai 5 spettri ottenuti sono state ricavate le aree dei picchi e inserite all'interno della retta di calibrazione. Le concentrazioni incognite calcolate sono state:

- 1) 1230 ng/μL
- 2) 925 ng/μL
- 3) 580 ng/μL
- 4) 538 ng/μL
- 5) 314 ng/μL

Due valori su cinque vanno oltre il range di linearità calcolato per il metodo, per cui siamo consapevoli di non poterli validare con certezza.

Successivamente, disponendo di alcune olive, anch'esse trattate, si è deciso, come ulteriore test, di scansionarne direttamente la superficie e calcolare la concentrazione incognita di dimetoato.

La geometria dell'oliva ha dato origine ad uno spettro particolare, in cui sono presenti due picchi, relativi ai due lati. Si è deciso di sommare i valori delle due aree e di calcolarne la concentrazione finale, pari a 1100 ng/μL.

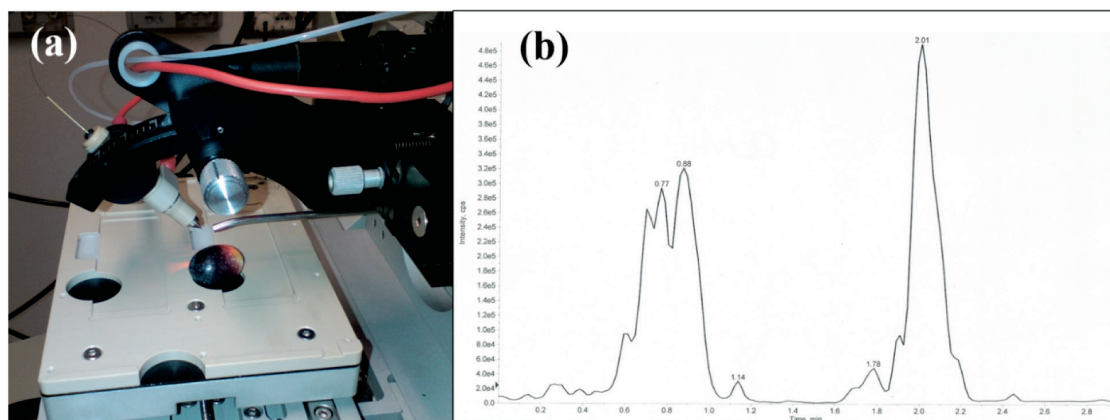


Figura 28 - Pannello (a) analisi diretta di un'oliva contaminata da Rogor®; Pannello (b) spettro DESI-MS/MS di dimetoato ottenuto dalla scansione.

Nonostante questo tipo di analisi esulasse dallo scopo del progetto, ci è servito a dimostrare che l'interfaccia DESI è applicabile con discreti risultati a diversi tipi di superficie ed a testare la sua efficacia in campi di applicazione non legati alla tutela del lavoratore.

3.3.5 Valutazione dell'esposizione dermica potenziale

In considerazione del fatto che l'obiettivo del progetto è la comprensione del pericolo a cui i lavora-

tori del comparto agricolo sono sottoposti, dai valori ottenuti durante il monitoraggio reale è stata valutata l'eventuale esposizione dermica.

Il trasferimento di residui dalla pianta ai vestiti o alla pelle dei lavoratori è un fenomeno ben noto; a prescindere dal prodotto applicato, il livello di esposizione dipende prima di tutto dall'intensità e dalla durata del contatto. Ciononostante, organizzazioni quali ad esempio l'EFSA ha suggerito di utilizzare dei coefficienti di trasferimento di cui ha fornito anche dei valori in funzione del livello di copertura del lavoratore: senza indumenti protettivi, con il corpo coperto e le mani nude, con indumenti e guanti [EFSA-014].

L'esposizione dermica potenziale (PDE) risulta, quindi, funzione del residuo fogliare disponibile (dislodgeable foliar residue-DFR), di uno dei tre valori di coefficiente di trasferimento (TC) e della durata dell'operazione, secondo la seguente equazione:

$$\text{PDE (mg di sostanza attiva per giorno)} = (\text{DFR } (\mu\text{g cm}^{-2}) \times \text{TC (cm}^2 \text{ h}^{-1}) \times \text{T (h day}^{-1})) / 1000$$

Il valore di T nell'equazione è stato stabilito sulla base di un turno di lavoro di 8 ore.

I risultati calcolati per i tre scenari suggeriti da EFSA e in base ai quantitativi riscontrati sulle foglie sono riportati in tabella 8.

Tabella 8: Esposizione dermica potenziale per il dimetoato calcolata a partire dai residui fogliari trovati durante la campagna di monitoraggio reale

Residuo di dimetoato fogliare disponibile ($\mu\text{g cm}^{-2}$)*	Esposizione dermica potenziale (mg di sostanza attiva per giorno)		
	TC=22500 (esposizione potenziale totale)	TC=4500 (abiti da lavoro; mani nude)	TC=2250 (abiti da lavoro; guanti)
15	2611	522	261
13	2345	469	234
8	1470	294	147
7	1364	273	136
4	796	159	80

* I risultati sono stati trasformati, per effettuare il calcolo, in termini di quantità su superficie ovvero in $\mu\text{g/cm}^2$.

È interessante notare che nel caso di reale rientro in campo, date le quantità di dimetoato riscontrate, i lavoratori sarebbero potenzialmente sottoposti ad un'intensa esposizione (fra gli 80 mg e i 2g). Naturalmente, come prevedibile, fra un'esposizione senza indumenti di protezione e una copertura completa c'è una differenza di un ordine di grandezza; ma la situazione intermedia in cui i lavoratori rientrano in campo coperti ma senza guanti è purtroppo comunque a rischio e piuttosto frequente.

Le attività post applicazione sono indubbiamente una fonte di esposizione per i lavoratori di questo comparto e anche se la via principale resta l'inalazione, la via dermica attraverso il contatto con foglie, frutti, suolo etc. non va trascurata. Il rischio è generalmente sottostimato specie se questo fenomeno è contestualizzato nell'ambito della crisi economica che ha colpito tutti i settori lavorativi. Negli ultimi decenni, infatti, si è assistito al ritorno di diversi strati della società al lavoro agricolo in particolar modo in Asia, Europa e nord America.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

Lo scopo di questo lavoro è stato di sviluppare e mettere a punto un metodo che consentisse il controllo della presenza di quattro insetticidi e quattro fungicidi direttamente sulla superficie delle foglie.

L'obiettivo primario era di ottenere un valido strumento per la sicurezza dei lavoratori agricoli che al contempo fosse anche rapido, semplice e versatile. Il nostro progetto ha dimostrato come l'approccio DESI-MS può essere proposto come primo step per il riconoscimento e la quantificazione di pesticidi sulla superficie delle foglie.

La metodica ha dato ottimi risultati in ambito qualitativo, permettendo il riconoscimento di otto pesticidi su quattro differenti tipi di foglie. Per tre delle sostanze selezionate, il metodo è stato ulteriormente studiato in termini quantitativi con discreto successo.

La metodologia presentata possiede notevoli vantaggi rispetto alle metodologie standard in ambito di identificazione dei pesticidi. L'assenza di pretrattamento del campione e la velocità di analisi sono solamente alcuni dei vantaggi che permette anche la salvaguardia della salute degli operatori di laboratorio, dato lo scarso utilizzo di solvente che la tecnica richiede. Inoltre, considerata l'attuale attenzione della comunità scientifica verso l'ecologia ed il rispetto dell'ambiente, il metodo sviluppato può essere un primo passo verso la direzione della "green chemistry" essendo pressoché solvent free.

Il metodo è stato pensato e sviluppato nell'ambito dell'igiene occupazionale, ma può essere tranquillamente applicabile anche nella sicurezza alimentare. Ad esempio, dati i recenti enormi problemi dovuti alla mosca olearia, il metodo può essere utilizzato per un controllo veloce ed affidabile sia delle foglie che delle olive ancor prima di raggiungere il frantoio.

Non va trascurato poi, che l'interfaccia DESI è di recentissima costruzione e ancora non sono stati approfonditi del tutto i suoi vantaggi ed i suoi limiti. Con questo lavoro sperimentale si è quindi, indirettamente, contribuito allo studio di questa "nuova" interfaccia, dimostrando la sua utilità e validità nell'analisi di prodotti fitosanitari.

Riferimenti bibliografici

[Dir. 2009/128/CE] Direttiva 2009/128/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi.

[ISPRA-016] Rapporto 282/2018. Rapporto nazionale pesticidi nelle acque dati 2015-2016. http://www.isprambiente.gov.it/files2018/pubblicazioni/rapporti/Rapporto_282_2018.pdf

[CE-016]. EU pesticide database Ultimo aggiornamento 7 aprile 2016. Disponibile su: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>

[BLBRK-BC-RG-014] I. Baldi, P. Lebailly, G. Bouvier, V. Rondeau, V. Kientz-Bouchart, M. Canal-Raffin, A. Garrigou. Levels and determinants of pesticide exposure in re-entry workers in vineyards: Results of the PESTEXPO study. *Environmental Research* 132 (2014) 360–369..

[TLDBZH-999] E. Tielemans, E. Louwerse, J. DeCock, D. Brouwer, G. Zielhuis, D. Heederik. Exposure to fungicides in fruit growing: re-entry time as a predictor for dermal exposure. *American Industrial Hygiene Association Journal* 60 (1999) 789-793.

[SCKSBLF-999] N.J. Simcox, J. Camp, D. Kalman, A. Stebbins, G. Bellamy, I.C. Lee, R. Fenske. Farmworker exposure to organophosphorus pesticide residues during apple thinning in central Washington State. *American Industrial Hygiene Association Journal* 60 (1999) 752-761.

[SSHKMS-995] J.R. Spencer, J.R. Sanborn, B.Z. Hernandez, R.I. Krieger, S.S. Margetich, F.A. Schneider. Long vs short monitoring intervals for peach harvesters exposed to foliar azinphos-methyl residues. *Toxicology Letters* 78 (1995) 17-24.

[EFSA-014] European Food Safety Authority. Guidance on the assessment of exposure of operators, workers, residents and bystanders in risk assessment for plant protection products. *European Food Safety Authority Journal* 12:10 (2014) 3874.

[Apr-012] M.C. Aprea. Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides. *Toxicology Letters* 210 (2012) 110–118.

[L-FG-SLNB-012] C. Lesmes-Fabian, G. García-Santos, F. Leuenberger, D. Nuyttens, C.R. Binder. Dermal exposure assessment of pesticide use: the case of sprayers in potato farms in the Colombian highlands. *Science of the Total Environment* 430 (2012) 202-208.

[CRAABM-RMMMSTTV-012] C. Colosio, F.M. Rubino, A. Alegakis, E. Ariano, G. Brambilla, S. Mandic-Rajcevic, F. Metruccio, C. Minoia, A. Moretto, C. Somaruga, A. Tsatsaki, R. Turci, F. Vellere. Integration of biological monitoring, environmental monitoring and computational modelling into the interpretation of pesticide exposure data: Introduction to a proposed approach. *Toxicology Letters* 213 (2012) 49-56.

[LA-GR-SZH-HMCB-015] O.P. Luzardo, M. Almeida-González, N. Ruiz-Suárez, N. Ruiz-Suárez, M. Zumbado, L.A. Henríquez-Hernández, M.J. Meilan, M. Camacho, L.D. Boada. Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC-MS/MS and LC-ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Science & Justice* 55 (2015) 307-315.

[ABMMPSLS-016] M.C. Aprea, A. Bosi, M. Manara, B. Mazzocchi, A. Pompini, F. Sormani, L. Lunghini, G. Sciarra. Assessment of exposure to pesticides during mixing/loading and spraying of tomatoes in the open field. *Journal of occupational and environmental hygiene* 13 (2016) 476-489.

[Reg. CE 1107/2009] 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.

[RBSPB-ECCCG-EMSGMDHF-015] K. Remoundou, M. Brennana, G. Sacchettini, L. Panzone, M.C. Butler-Ellis, E. Capri, A. Charistou, E. Chaideftou, M.G. Gerritsen-Ebben, K. Machera, P. Spanoghe, R. Glass, A. Marchis, K. Doanngoc, A. Hart, L.J. Frewer. Perceptions of pesticides exposure risks by operators, workers, residents and bystanders in Greece, Italy and the UK. *Science of the Total Environment* 505 (2015) 1082-1092.

[Coo, Dob-007] J. Cooper, H. Dobson. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* 26 (2007) 1337-1348.

[MKZTA-014] O. Mehrpour, P. Karrari, N. Zamanid, A.M. Tsatsakis, M. Abdollahi. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: A review. *Toxicology Letters* 230 (2014) 146-156.

[EPA-019] EPA- United States Environmental Protection Agency. Basic Information about Pesticide Ingredients. Disponibile da: <http://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>

[EPA-009] EPA- United States Environmental Protection Agency. CADDIS Volume 2. Disponibili su: <https://www.epa.gov/caddis-vol2/insecticides#main-content>

[RobRouRei-013] J.R. Roberts, J. Routt Reigart. Recognition and management of pesticide poisonings. United States Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs (2013) Chapter 16.

[ROS-GS-015] J. Regueiro, N. Olguín, J. Simal-Gándara, C. Suñol. Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. *Environmental Research* 140 (2015) 37-44.

[PBZPRLC-015] A. Pivato, A. Barausse, F. Zecchinato, L. Palmeri, R. Raga, M.C. Lavagnolo, R. Cossu. An integrated model-based approach to the risk assessment of pesticide drift from vineyards. *Atmospheric Environment* 111 (2015) 136-150

[SGKLASH-012] S.E. Starks, F. Gerr, F. Kamel, C.F. Lynch, M.C. Alavanja, D.P. Sandler, J.A. Hopkin. High pesticide exposure events and central nervous system function among pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *International Archives of Occupational Environmental Health* 85 (2012) 505–515.

[Yar-018] N. Yarpuz-Bozdogan. The importance of personal protective equipment in pesticide applications in agriculture. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 4 (2018) 1–4.

[HHGYLJ-006] S.-Y. Hong, J.-R. Hong, H.-W. Gil, J.-O. Yang, E.-Y. Lee, D. Jeong. Effects of repeated pesticide exposure on the peripheral and central nervous systems. *Toxicological & Environmental Chemistry* 88:4 (2006) 595–601.

[CADMHA-018] M. Caballero, S. Amiri, J.T. Denney, P. Monsivais, P. Hystad, O. Amram. Estimated Residential Exposure to Agricultural Chemicals and Premature Mortality by Parkinson's Disease in Washington State. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (2018) 2885-2896.

[Sae, Deh-016] S.S. Saeedi Saravi, A. Reza Dehpour. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sciences* 145 (2016) 255–264.

[Kei, Fir-015] M.C. Keifer, J. Firestone. Neurotoxicity of Pesticides. *Journal of Agromedicine*, 12:1 (2015) 17-25

[PRHA-013] T. Parróna, M. Requenab, A.F. Hernándezc, R. Alarcónb. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicology Letters* 230 (2014) 157–165.

[Haz, Haz-013] M. Hazarika, R. Hazarika. Pesticide Exposure and Cancers in Barpeta District, Assam - A Case for Control Study. *Nature Environment and Pollution Technology* 12:3 (2013) 467-470.

[SMV-009] Y.K. Shim, S.P. Mlynarek, E. Van Wijngaarden. Parental Exposure to Pesticides and Childhood Brain Cancer: U.S. Atlantic Coast Childhood Brain Cancer Study. *Environmental Health Perspectives* 117:6 (2009) 1002-1006.

[GKHRLCDSKCCQM-017] R.B. Gunier, A. Kang, S.K. Hammond, K. Reinier, C.S. Lea, J.S. Chang, M. Does, G. Scelo, J. Kirsch, V. Crouse, R. Cooper, P. Quinlan, C. Metayer. A task-based assessment of parental occupational exposure to pesticides and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Environmental Research* 156 (2017) 57–62.

[EHGPF-014] S. El-Zaemeya, J. Heyworthb, D.C. Glassc, S. Peters, L. Fritschid. Household and occupational exposure to pesticides and risk of breast cancer. *International Journal of Environmental Health Research* 24:2 (2014) 91–102.

[BKBAHSBYBLMZA-011] K.H. Barry, S. Koutros, S.I. Berndt, G. Andreotti, J.A. Hoppin, D.P. Sandler, L.A. Burdette, M. Yeager, L.E. Beane Freeman, J.H. Lubin, X. Ma, T. Zheng, M.C.R. Alavanja. Genetic Variation in Base Excision Repair Pathway Genes, Pesticide Exposure, and Prostate Cancer Risk. *Environmental Health Perspectives* 119:12 (2011) 1726-1732.

[Jab-017] A. Jabłońska-Trypuć. Pesticides as Inducers of Oxidative Stress. *Reactive Oxygen Species* 3 (2017) 96-110.

[AMRKM-019] M. Ahmad Dar, A. Mehraj Khan, R. Raina, P. Kumar Verma, N. Manzoor Wani. Effect of bifenthrin on oxidative stress parameters in the liver, kidneys, and lungs of rats. *Environmental Science and Pollution Research* 26 (2019) 9365-9370.

[PBYTRHCW-015] T.V. Pham, M.M. Brooks, J.M. Yuan, E.O. Talbott, D. Ruddell, J.E. Hart, C.C.H. Chang, J.L. Weissfeld. Pesticide exposure and hepatocellular carcinoma risk: A case-control study using a geographic information system (GIS) to link SEER-Medicare and California pesticide data. *Environmental Research* 143 (2015) 68-82.

[INAIL-017A] Dati Inail. Andamento degli infortuni sul lavoro, numero 6, Inail 2017a, ISSN 2035-5645

[MFBI-018] E. Masciarelli, B. Ficociello, E. Bemporad, E. Incocciati. Uso in sicurezza dei prodotti fitosanitari. Schede tecnico-informative INAIL (2018). ISBN 978-88-7484-137-0. <https://www.inail.it/cs/internet/comunicazione/pubblicazioni/catalogo-generale/pubbl-uso-in-sicurezza-prodotti-fitosanitari.html>

[AYF-014] J.L. Armstrong, M.G. Yost, R.A. Fenske. Development of a passive air sampler to measure airborne organophosphorus pesticides and oxygen analogs in an agricultural Community. *Chemosphere* 111 (2014) 135-143.

[RFNABTM-015] C. Raepfel, M. Fabritius, M. Nief, B.M.R. Appenzeller, O. Briand, L. Tuduri, M. Millet. Analysis of airborne pesticides from different chemical classes adsorbed on Radiello® Tenax® passive tubes by thermal-desorption-GC/MS. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (2015) 2726-2734.

[DLPPD-011] L.G. Dos Santos, C. Lourencetti, A.A. Pinto, W.A. Pignati, E.F.G.C. Dores. Validation and application of an analytical method for determining pesticides in the gas phase of ambient air. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46:2 (2011) 150-151.

[ACMMM-002] C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia, M. Maroni. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *Journal of Chromatography B* 769 (2002) 191-219.

[SSBMA-012] C. Schummer, G. Salquère, O. Briand, M. Millet, B.M.R. Appenzeller. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxicology Letters* 210 (2012) 203-210.

[BBMS-006] G. Bouvier, O. Blanchard, I. Momas, N. Seta. Pesticide exposure of non-occupationally exposed subjects compared to some occupational exposure: A French pilot study. *Science of the Total Environment* 366 (2006) 74–91.

[Bar, Nee-002] D.B. Barr, L.L. Needham. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *J Chrom B* 778 (2002) 5–29.

[JGTZ-008] M.C. Jecklin, G. Gamez, D. Touboul, R. Zenobi. Atmospheric pressure glow discharge desorption mass spectrometry for rapid screening of pesticides in food. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (2008) 2791–2798.

[M-RRACNC-018] S. Mandic-Rajcevic, F.M. Rubino, E. Ariano, D. Cottica, S. Neri, C. Colosio. Environmental and biological monitoring for the identification of main exposure determinants in vineyard mancozeb applicators. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 28 (2018) 289–296.

[BGET-011] H.V. Botitsi, S.D. Garbis, A. Economou, D.F. Tsipi. Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices. *Mass Spectrometry Reviews* 30 (2011) 907–939.

[CSLZXL-014] L. Chen, F. Song, Z. Liu, Z. Zheng, J. Xing, S. Liu. Study of the ESI and APCI interfaces for the UPLC–MS/MS analysis of pesticides in traditional Chinese herbal medicine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 1481–1491.

[OSUINK-012] A. Okamura, I. Saito, J. Ueyama, Y. Ito, T. Nakajima, M. Kamijima. New analytical method for sensitive quantification of urinary 3-methyl-4-nitrophenol to assess fenitrothion exposure in general population and occupational sprayers. *Toxicology Letters* 210 (2012) 220–224.

[Cra, Mus-012] E. Crawford, B. Musselman. Evaluating a direct swabbing method for screening pesticides on fruit and vegetable surfaces using direct analysis in real time (DART) coupled to an Exactive benchtop orbitrap mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 2807–2812.

[VSKRHHKK-015] A. Vaikkinen, H.S. Schmidt, I. Kiiski, S. Rämö, K. Hakala, M. Haapala, R. Kostiainen, T.J. Kauppila. Analysis of neonicotinoids from plant material by desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29 (2015) 424–430.

[TWGC-004] Z. Takats, J.M. Wiseman, B. Gologan, R.G. Cooks. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306 (2004) 471–473.

[TWC-005] Z. Takats, J.M. Wiseman, R.G. Cooks. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry* 40 (2005) 1261–1275.

[Bal-006] M.P. Balogh. DESI, IMS, and Resurgent Challenges to HPLC-MS. LCGC North America 24:1 (2006) 46-52

[Mag, Orn-014] B. Magnusson, U. Ornemark (eds.) EURACHEM guide: the fitness for purpose of analytical methods-a laboratory guide to method validation and related topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Disponibile in: <https://www.eurachem.org/>

[SANCO/12571/2013] European Commission Health & Consumer Protection. EU reference laboratories for residues of pesticides. SANCO/12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Novembre 19, 2013 rev.0. Disponibile in: http://www.crl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727&LabID=100&Lang=EN

I Quaderni di ricerca

- 1 - G. Ciriello, M. De Felice, R. Mosca, M. Veltroni, *Infortuni sul lavoro. Un modello di lettura (della numerosità) su "open data" dell'Inail*
- 2 - L. Cortis, F. M. Fabiani, C. Ratti, L. Rossi, D. G. Svampa, C. Vitale, *Analisi e valutazione del comportamento dell'assorbitore di energia nei sistemi di arresto caduta con differenti masse di prova*
- 3 - P. Rossi, *Danno biologico: monitoraggio, criticità e prospettive d'interesse medico-legale a dieci anni dall'introduzione della nuova disciplina*
- 4 - M. De Felice, A. Goggiamani, R. Mosca, M. Veltroni, *Malattie professionali. Un modello di lettura (della numerosità) su "open data" dell'Inail*
- 5 - L. Cortis, F. M. Fabiani, L. Rossi, D. G. Svampa, *Nuovi strumenti per la valutazione dello scivolamento e ribaltamento delle scale portatili*
- 6 - L. Cortis, F. M. Fabiani, L. Rossi, D. G. Svampa, *Determinazione della resistenza caratteristica dei dispositivi di collegamento montante-traverso nei ponteggi metallici fissi di facciata*
- 7 - S. Carruba, R. Grimaldi, M. Sparro, S. Tomasini, *Vendor Rating: il modello di valutazione delle forniture IT dell'Inail*
- 8 - P. Agnello, S. M. Ansaldi, *Una proposta di ontologia per gli Open Data Inail sugli infortuni: dalla numerosità dei dati alla gestione della conoscenza*
- 9 - A. Alvino, A. Antonini, C. Delle Site, A. Di Loreto, F. Giacobbe, D. Lega, E. Pichini, M.A. Pierdominici, L. Ricciardi, A. Tonti, *Analisi delle cause di rottura di materiali metallici: esempi di Applicazione*
- 10 - L. Cortis, F. M. Fabiani, L. Rossi, D. G. Svampa, *Light workers e criticità dell'assorbitore di energia nei sistemi di arresto caduta*
- 11 - S. Carruba, R. Grimaldi, M. Sparro, S. Tomasini, *Vendor Rating: la valutazione delle forniture IT dell'Inail per il 2015*
- 12 - L. Cortis, F. M. Fabiani, L. Rossi, D. G. Svampa, *Metodologia per prove di rigidità e resistenza per i dispositivi di collegamento montante-traverso nei ponteggi metallici fissi di facciata*
- 13 - R. Giovinazzo, E. Guerrera, M. Mameli, D. Sarto, M. Veltroni, *Analisi della contaminazione microbiologica degli ambienti di lavoro. Valutazione della qualità del dato analitico nel conteggio microbico su piastra e nelle prestazioni dell'operatore*
- 14 - P. Agnello, F. Bracco, C. Brunel, M. Masini, T. F. Piccinno, A. Sedaoui, D. Tazi, *Promuovere la sicurezza nelle organizzazioni attraverso manager resilienti*
- 15 - L. Rossi, *Esecuzione in sicurezza dei lavori in copertura. Misure di prevenzione e protezione*
- 16 - F. Antonello, P. Bragatto, F. Di Maio, S. M. Hoseyni, E. Zio, *Stima adattiva del rischio di rottura di attrezzature in pressione, sulla base dei dati di monitoraggio*

