

Università “Ca Foscari”
Venezia

Dottorato di ricerca in Scienze Ambientali, 21° ciclo
(A. A. 2005/2006 – A.A. 2007/2008)

**Caratterizzazione dei livelli analitici di alcuni inquinanti
organici persistenti in prodotti ittici di allevamento**

SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE DI AFFERENZA:
CHIM-12 Chimica dell’ambiente e dei beni culturali

Tesi di dottorato di **Anna Maria Ingelido**
Matricola 955178

Coordinatore del dottorato
Prof. Bruno Pavoni

Tutore del dottorando
Prof. Gabriele Capodaglio

Tutore del dottorando (Istituto Superiore di Sanità)
Dott. Roberto Miniero

*θάλασσα ὕδωρ καθαρώτατον καὶ μιαιώτατον,
ἰχθύσι μὲν πότιμον καὶ σωτήριον, ἀνθρώποις δὲ ἄποτον καὶ ὀλέθριον.*

(il mare è l'acqua più pura e più impura:
per i pesci potabile e fonte di vita, imbevibile e mortale per gli uomini.)

Eraclito, I Frammenti

INDICE

1. Introduzione	1
1.1 Analiti oggetto dello studio	6
1.1.2 Scelta degli analiti.....	6
1.1.3 Caratteristiche degli analiti.....	8
1.1.3.1 Policlorodibenzodiossine e policlorodibenzofurani	8
1.1.3.2 Policlorobifenili.....	11
1.1.3.3 Polibromodifenileteri	14
1.2 Trasferimento dei contaminanti nel pesce.....	16
1.2.1 PCDD, PCDF e DL-PCB.....	16
1.2.2 ND-L-PCB.....	17
1.2.3 PBDE.....	18
1.3 Fattori che influenzano il livello dei contaminanti organici persistenti nei pesci.....	19
1.3.1 Fattori di carattere generale	19
1.3.2 Fattori legati alla pratica dell'acquacoltura.....	21
1.4 Sparus aurata	23
1.4.1 Scelta della Sparus aurata.....	23
1.4.2 Caratteristiche della Sparus Aurata.....	24
1.4.2.1 Classificazione.....	24
1.4.2.2 Morfologia.....	26
1.4.2.3 Distribuzione geografica	26
1.4.2.4 Riproduzione	27
1.5 Impianti di allevamento	27
1.5.1 Caratteristiche degli impianti di allevamento	27
1.5.2 Impianto di Mattinata.....	28
1.5.2.1 Caratteristiche ambientali.....	29
1.5.2.2 Descrizione delle modalità di allevamento.....	29
1.5.3 Impianto di Giovinazzo.....	29
1.5.3.1 Caratteristiche ambientali.....	29
1.5.3.2 Descrizione delle modalità di allevamento.....	29
2. Scopo della tesi	29
3. Materiali e metodi	30
3.1 Procedure sperimentali	30
3.1.1 Campionamento.....	30
3.1.1.1 Campionamento di esemplari di Sparus Aurata.....	30
3.1.1.2 Campionamento di mangimi.....	31
3.1.2. Analisi.....	32
3.1.2.1 Principio del metodo	33
3.1.2.2 Interferenze e cause d'errore	34
3.1.2.3 Conservazione del campione	35
3.1.2.4 Procedura analitica.....	35
3.1.2.4.1 Composizione di pools.....	35
3.1.2.4.2 Preparazione del campione per analisi	36
3.1.2.4.3 Estrazione	36
3.1.2.4.4 Purificazione	37
3.1.2.4.5 Determinazione strumentale.....	37
3.1.2.5 Calcoli e risultati.....	39
3.2 Presentazione e analisi dati ed elaborazioni statistiche	44
3.2.1 Test statistici utilizzati	44
3.2.2 Campioni di filetto e visceri di pesce.....	45
3.2.3 Campioni di mangimi per acquacoltura.....	46
3.2.4 Correlazioni e confronti fra mangimi per acquacoltura e pesci	48
3.6.2.6 Verifica della qualità dei dati	42
4. Risultati e discussione	48
4.1 Normativa	48
4.1.1 Pesce.....	48
4.1.2 Mangimi	49
4.2. Risultati dell'analisi di filetto e visceri di pesce.....	50

4.2.1 Risultati cumulativi.....	50
4.2.2 Risultati congenere specifici.....	58
4.3 Risultati dell'analisi di mangimi per acquacoltura	75
4.3.1 Risultati cumulativi.....	75
4.3.2 Elaborazioni statistiche sui dati trimestrali	80
4.3.3 Risultati congenere specifici.....	83
4.4 Relazione fra concentrazioni di contaminanti determinate nei campioni di Sparus aurata e nei mangimi per acquacoltura.....	96
4.4.1 Risultati dell'analisi di correlazione fra concentrazioni di contaminanti determinate nei campioni di Sparus aurata e nei mangimi per acquacoltura	96
4.4.2 Stima dell'entità del trasferimento di contaminanti dai mangimi ai filetti di Sparus aurata	97
4.5 Confronto dei profili di contaminazione di pesce e mangimi per acquacoltura.....	99
5. Conclusioni	109
Ringraziamenti	111
Riferimenti bibliografici	112

1. Introduzione

L'acquacoltura è, fra i sistemi di produzione di cibo, il settore a crescita più veloce al mondo; dal 1970 in poi è cresciuta percentualmente del 8.8% all'anno contro il 1.2% della pesca e il 2.8% dell'allevamento di bestiame; il suo contributo alla fornitura globale di pesce è pure in continua crescita ed è passato dal 3.9% del 1970 al 27% nel 2000, al 32% nel 2004. Gran parte della produzione derivante dall'allevamento di pesce inoltre proviene dai paesi in via di sviluppo e rappresenta un'importante risorsa in termini di apporto di cibo di qualità e riduzione della povertà (FAO, 2006).

In Europa l'acquacoltura è un'importante risorsa nel campo della produzione di pesce (rappresenta circa il 18% del volume complessivo della produzione ittica) e riveste un ruolo importante per la creazione di opportunità di lavoro nella comunità rurali e costiere, specialmente nelle regioni in cui è in diminuzione la pesca. Infatti mentre la pratica della pesca in Europa negli ultimi anni è diminuita il consumo di pesce è aumentato dell'1% all'anno durante gli ultimi dieci anni. L'aumento della domanda di pesce da parte dei consumatori è stato soddisfatto principalmente dalla grande disponibilità di pesce di allevamento proveniente dalla stessa Europa o di importazione (EFSA 2005). La produzione acquicola dell'Unione Europea è di circa 1,2 milioni di tonnellate, con un valore prossimo a 2,8 miliardi di euro ed è aumentata di circa il 27% dal 1993 al 2005. Ciò rappresenta circa il 2% della produzione acquicola mondiale complessiva per volume (EC, 2008). Il principale produttore europeo è la Norvegia (che non fa parte dell'Unione Europea) che da sola produce l'1% del totale mondiale. Fra i paesi dell'Unione Europea nel 2005 quattro soli stati (Francia 20%, Italia 14%, Spagna 17%, Regno Unito 14%) fra i quali l'Italia coprivano il 66% del totale della produzione derivante da acquacoltura dell'intera Comunità Europea (EC, 2007). L'Unione Europea è il primo produttore al mondo di alcune specie: trote, cernie, sparidi, anguille, rombi e mitili; le specie più prodotte sono (nell'ordine) mitili, trota iridata, salmoni, ostriche, orate, carpe, vongole spigole e anguille (EC, 2008). Per quanto riguarda i Paesi dell'area del Mediterraneo nel 2004 la loro produzione ittica complessiva risultava pari all'1,6% di quella mondiale, con crescita dei prodotti allevati (42% della produzione acquicola complessiva) e riduzione dell'attività di pesca in mare (Ministero Politiche agricole, alimentari, forestali, 2007).

L'Italia pur essendo una penisola con forte vocazione marinara, bagnata per quasi

8.000 Km dal mare e ricca di bacini di acqua dolce, non è un grosso consumatore di prodotti ittici (secondo la FAO ha una disponibilità annua pro-capite intorno ai 22,2 Kg). Negli ultimi anni il consumo di pesce è cresciuto in modo considerevole, ma la domanda è stata soddisfatta principalmente con le importazioni poiché né la pesca né l'acquacoltura sono riuscite a mantenere i necessari ritmi di sviluppo. Tuttavia la situazione dei due comparti di produzione ha presentato negli ultimi anni andamenti diversi, riflettendo di fatto lo stesso scenario caratteristico dell'intera Unione Europea. La pesca infatti ha continuato a mostrare un andamento negativo caratterizzato principalmente dalla tendenza al deterioramento degli stock ittici (mitigata da episodici miglioramenti degli indici di abbondanza e densità per talune specie), dalla consistente riduzione della flotta da pesca e dell'occupazione, dalla diminuzione delle quantità sbarcate, dal consistente aumento dei costi di produzione (solo in parte mitigato dal positivo andamento dei prezzi) e dall'andamento negativo dei redditi degli operatori (Ministero Politiche agricole, alimentari, forestali, 2007). L'acquacoltura al contrario ha mostrato un'evoluzione positiva, diventando competitiva rispetto al pescato. In Italia infatti l'acquacoltura con una produzione di circa 180000 tonnellate (EC, 2008) rappresenta il 45% della produzione ittica e la quota dell'allevato sul pescato è in continuo aumento a parte un brusco calo registrato nel 2003 e dovuto principalmente alle avverse condizioni climatiche di quell'anno (scarsità di piogge ed elevate temperature). La produzione ittica proveniente dall'attività di acquacoltura è composta (dati 2005), per il 70% circa da prodotti della molluschicoltura e per il restante 30% da pesci di allevamento. Per quanto riguarda la piscicoltura l'allevamento è tuttora focalizzato su tre prodotti che incidono per oltre l'84% sulla produzione totale di pesci: le trote, le orate e le spigole. Le produzioni di orate e di spigole, che incidono entrambe per oltre il 13% sulla produzione totale di pesci, sono risultate pressoché stabili negli anni 2003 e 2004, mentre nel 2005 hanno evidenziato un andamento contrapposto: +5% la produzione di orate, -6,2% quella di spigole. Per questi due prodotti la sfida più importante è data dal prodotto importato che risulta più economico. La via che si sta percorrendo per ovviare a questo inconveniente è quella degli accordi di filiera per certificare e vendere prodotto proveniente esclusivamente da allevamenti italiani (ISMEA, 2008). L'Italia infatti come si è detto per soddisfare la domanda interna di pesce fa largo ricorso alle importazioni (5° paese nel mondo), circostanza che genera un forte disavanzo nella bilancia commerciale. L'acquacoltura, non è la soluzione dei problemi sopra esposti però ha in sé delle caratteristiche che la rendono compatibile con le esigenze dei consumatori e della moderna

commercializzazione.

La tecnica produttiva dell'acquacoltura, nonostante gli indubbi vantaggi che presenta, può presentare dei problemi in termini di impatto ambientale e sulla salute umana. Le ricadute negative sull'ambiente riguardano soprattutto l'uso di mangimi in maniera inappropriata e l'introduzione nell'ambiente di specie alloctone che può produrre un impatto negativo sugli ecosistemi e ridurre la biodiversità in misura significativa. Per quanto riguarda invece i rischi per la salute umana questi sono legati alla presenza di contaminanti ambientali nel prodotto ittico.

Il consumo di pesce può infatti contribuire in maniera significativa all'intake da parte dell'uomo di alcuni contaminanti ambientali come metilmercurio, Policlorodibenzodiossine (PCDD) e Policlorodibenzofurani (PCDF) e Policlorobifenili (PCB), Polibromodifenileteri (PBDE) e composti organostannici. La concentrazione di questi contaminanti nel pesce può variare con la natura del contaminante e il tipo di pesce. I contaminanti liposolubili (come PCDD, PCDF, PCB e PBDE) si ritrovano in particolare nel pesce grasso, ad esempio salmone o aringa. Al contrario la concentrazione del metilmercurio non è legata alla componente lipidica del pesce, ma principalmente al suo accumulo lungo la rete trofica, motivo per il quale il metilmercurio è presente soprattutto nei grandi predatori come il pescespadà e il tonno. I grandi consumatori di predatori al culmine della catena alimentare come luccio e tonno possono arrivare a superare il *provisionally tolerable weekly intake* (PTWI) per il metilmercurio, mentre i grandi consumatori di pesce grasso possono arrivare a superare il PTWI per diossine e composti diossina simili (EFSA, 2005). Naturalmente bisogna tenere presente che ci sono altre fonti alimentari di queste sostanze liposolubili oltre al pesce, come prodotti caseari o carni e che grandi consumatori di queste categorie di alimenti potrebbero ugualmente arrivare a superare i PTWI per diossine e composti diossina simili a prescindere dal loro livello di consumo di pesce (EFSA, 2005). Dunque sostituire il pesce nella dieta con altre categorie alimentari non necessariamente porterebbe a una diminuzione dell'esposizione alimentare a tali contaminanti ambientali e potrebbe rappresentare una potenziale fonte di squilibrio del corretto apporto di nutrienti. Il pesce infatti rappresenta un elemento importante per una sana alimentazione poiché fornisce proteine, acidi grassi (come gli acidi grassi polinsaturi a catena lunga) e alcune vitamine e minerali (vitamine A, B12 e D, iodio e selenio) (EFSA, 2005). Un *intake* alimentare importante di acidi grassi polinsaturi a catena lunga può essere

facilmente ottenuto mangiando in particolare pesce ad alta componente lipidica o grandi quantità di pesce più magro. Per questo motivo eliminare dalla dieta il pesce potrebbe creare difficoltà nel raggiungere le quantità di acidi grassi polinsaturi a lunga catena raccomandate con possibili conseguenze negative sul sistema cardiovascolare e nel caso di donne in gravidanza sullo sviluppo fetale.

Il pesce è dunque un elemento essenziale per una dieta corretta e difficilmente sostituibile con alimenti di altra natura. Il pesce inoltre nonostante possa contenere vari contaminanti ambientali in generale può contribuire in maniera significativa all'*intake* di contaminanti organici persistenti e di metilmercurio mentre non rappresenta un argomento di interesse per la salute umana per contaminanti ambientali diversi da questi in quanto o non contribuisce in maniera significativa al loro *intake* o anche quando questo si verifica è improbabile che anche i grandi consumatori di pesce possano superare il *tolerable daily intake* (TDI) relativo ai vari contaminanti, ove questo esista (EFSA, 2005).

La contaminazione del pesce da contaminanti ambientali può riguardare sia il pescato che l'allevato. Riguardo al pescato, da un'ampia indagine condotta negli Stati Uniti negli anni 80, sono state individuate alcune aree marine all'interno delle quali i prodotti ittici presentavano livelli particolarmente elevati di metalli pesanti (arsenico, cadmio, mercurio, piombo, selenio) e contaminanti organici persistenti quali pesticidi organoclorurati, PCB, PCDD, e PCDF e altri contaminanti derivanti dal loro diretto uso in acquacoltura (Ahmed *et al.*, 1993). Da quest'indagine è risultato che i rischi di maggior rilievo per la salute dei consumatori erano quello sulla riproduzione dovuto a PCB e metilmercurio e quello cancerogeno dovuto a PCB, PCDD e PCDF, e pesticidi clorurati (Ferrara e Funari, 2004). Nel prodotto ittico di allevamento invece i contaminanti possono derivare dalla filiera produttiva e dal sito di allevamento. A questo proposito la letteratura scientifica internazionale (Hites *et al.*, 2004; Foran *et al.*, 2005) ha talvolta evidenziato un maggior livello di contaminazione da inquinanti organici persistenti nel pesce di allevamento rispetto al pescato. In particolare un articolo pubblicato sulla rivista Science nel 2004 (Hites *et al.*, 2004) ha aperto un ampio dibattito in Europa e negli Stati Uniti sulla differenza nei livelli di contaminazione da contaminanti organoclorurati nel pesce selvatico e di allevamento e sui relativi rischi associati alla salute umana. Lo studio era stato condotto su circa 700 esemplari di salmone selvaggio e allevato proveniente da vari paesi del mondo nei quali erano state determinate le concentrazioni di alcuni contaminanti

organoclorurati (PCDD, PCDF, PCB e alcuni pesticidi). Dai risultati delle analisi condotte risultava che i livelli di contaminazione del salmone di allevamento erano significativamente più alti di quelli del salmone selvatico e che le concentrazioni più elevate erano state riscontrate nei salmoni di provenienza europea piuttosto che in quelli provenienti da America del Nord e del Sud. Gli stessi autori avevano inoltre analizzato alcuni campioni di mangimi provenienti dai paesi coinvolti nello studio e concluso che la differenza nei livelli di contaminazione risultava sostanzialmente collegata alla dieta dei pesci (Hites *et al.*, 2004). In un articolo pubblicato due anni dopo (Mortimer *et al.*, 2006) altri autori riportando i risultati di una ricerca condotta su pesce selvatico e di allevamento campionato nei mercati del Regno Unito confermavano la differenza significativa nei livelli di contaminazione da PCDD, PCDF e PCB nel salmone di allevamento rispetto al selvatico (più alta nell'allevato), ma dall'analisi di altre specie di pesce selvatico e di allevamento non vedevano sempre confermata la contaminazione più alta dell'allevato sul pescato, al contrario le concentrazioni più alte riscontrate in assoluto appartenevano a campioni compositi di pesce selvatico. In effetti la specie, la stagione, il luogo di pesca o allevamento, la dieta e l'età del pesce influenzano in modo determinante il suo contenuto in contaminanti e in elementi nutritivi, che varia notevolmente non solo fra specie diverse, ma anche all'interno della stessa specie (EFSA, 2005). Tornando dunque al dibattito sui livelli di contaminazione di pesce selvatico e allevato, l'EFSA ha recentemente (2005) concluso che i dati disponibili alla data della stesura del documento non permettono un robusto confronto fra i livelli di contaminanti di pesce selvatico e allevato. I limitati dati disponibili indicano che non ci sono differenze consistenti fra pesce allevato e selvatico rispetto al livello di contaminanti (EFSA, 2005).

Da quanto esposto finora risulta evidente la necessità di raccogliere dati e informazioni sui livelli di contaminazione da contaminanti ambientali del prodotto ittico, in particolare su quelle categorie di contaminanti per le quali il consumo di pesce risulta un elemento importante dell'*intake* alimentare.

E' questo il caso degli inquinanti organici persistenti, a cui l'uomo e' esposto principalmente attraverso la dieta (rappresenta circa il 90% dell'*intake* totale) e in particolare attraverso il consumo di pesce. Questi contaminanti sono un insieme di inquinanti organici e famiglie di inquinanti organici di notevole significato tossicologico, caratterizzati da elevata persistenza nell'ambiente. Aspetti legati alla limitazione della loro

produzione e uso sono stati recentemente ridiscussi e formalizzati nell'ambito della Convenzione di Stoccolma sui POPs – UNEP POPs 2001 – (UNEP, 2001) e del Protocollo UNECE sui POPs, all'interno della Convenzione sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero, Long-Range Transboundary Air Pollution o LRTAP, 1998 (UNECE, 1998).

Tali contaminanti sono caratterizzati da emivite ambientali molto lunghe (fino ad alcuni anni) determinate da un'alta stabilità chimica. Questa alta stabilità associata a basse pressioni di vapore tende a favorire la diffusione nell'ambiente di tali composti ed è inoltre responsabile insieme alla lipofilità della loro persistenza ambientale; in particolare l'alta affinità per il materiale organico li porta a concentrarsi nei sedimenti diventando quindi scarsamente disponibili alla degradazione fotochimica. Elevata persistenza ambientale e lipofilità determinano inoltre la tendenza al bioaccumulo di questi composti, a sua volta responsabile di biomagnificazioni, ovvero di un aumento dei livelli di concentrazione attraverso le catene trofiche. Questo fenomeno produce livelli piuttosto elevati di tali contaminanti negli organismi marini come i pesci a causa della loro posizione nella catena alimentare.

La presenza di alti livelli di inquinanti organici persistenti nel prodotto ittico assume una notevole rilevanza alla luce del consumo di tale prodotto da parte dell'uomo. I dati relativi ai livelli di contaminazione associati a quelli riguardanti il consumo di pesce permettono infatti tramite la valutazione del rischio di stimare i possibili effetti sulla salute umana della presenza di tali inquinanti. È per questo motivo che diventa importante raccogliere informazioni sui livelli di contaminazione dei prodotti legati a pesca e acquacoltura. I prodotti ittici di allevamento in particolare costituiscono una quota notevole del mercato e non è dunque possibile prescindere dal considerare il loro contributo nel delineare un scenario espositivo generale.

Informazioni di questo genere risultano piuttosto soddisfacenti per quanto riguarda specie ittiche allevate nel Nord Europa e Nord America, mentre risultano scarsi studi analoghi compiuti su prodotto ittico mediterraneo.

1.1 Analiti oggetto dello studio

1.1.2 Scelta degli analiti

Per questo studio sono state selezionate le seguenti famiglie di analiti:

- Policlorodibenzodiossine (PCDD)
- Policlorodibenzofurani (PCDF)
- Policlorobifenili (PCB, *dioxin-like* (DL-PCB) e *non dioxin-like* (NDL-PCB))
- Polibromodifenileteri (PBDE)

Tutti gli analiti in questione sono contaminanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, POPs) e sono stati selezionati per lo studio in quanto le loro caratteristiche chimico-fisiche (Tabella 1) li portano a bioaccumulare nell'ambiente e bioconcentrare lungo le catene trofiche.

Tabella 1. Principali proprietà chimico-fisiche delle classi di analiti oggetto dello studio. ^a

Analiti	Pressione di vapore (Pa) a 25 °C	Log K _{ow} ^b	Solubilità in acqua (g/L) a 25 °C
PCDD/PCDF	$7.47 \times 10^{-10} - 5.33 \times 10^{-6}$ ^c	5.6-8.0 ^d	$19.3^f (7.9-483) \times 10^{-9}$
	1.2×10^{-3} (PCB 47)	6.3 (PCB 47)	48.6×10^{-6} (PCB 47)
PCB ^e	0.32×10^{-3} (PCB 99)	7.0 (PCB 99)	5.97×10^{-6} (PCB 99)
	0.83×10^{-4} (PCB 153)	7.6 (PCB 153)	1.28×10^{-6} (PCB 153)
PBDE			13.3×10^{-6} (pentaBDE),
(tetra e penta)	$(4.69 - 7.5) \times 10^{-5}$	5.9 - 7.0	10.9×10^{-6} (PBDE 47), 2.4×10^{-6} (PBDE 99)

(a) Tutti i dati riportati in tabella, eccetto quelli riferiti ai PCB, sono stati tratti da: WHO – *Health risks of Persistent Organic Pollutants from Long-Range Transboundary Air Pollution*. Copenhagen (Denmark), 2003. Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution 2003. <http://www.euro.who.int>

(b) Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua

(c) Valori riferiti ai congeneri tetra-, penta-, esa-, epta-, e ottasostituiti

(d) Valore riferito a 2,3,7,8-T₄CDD

(e) Hardy M.L. A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products. *Chemosphere* 2002; 46:717–728.

Per questa loro caratteristica raggiungono concentrazioni piuttosto alte negli organismi marini tanto che la principale fonte di esposizione per l'uomo è la dieta (90% circa) e un ruolo molto importante nell'*intake* alimentare è rappresentato dal consumo di prodotti ittici. Nelle diete onnivore il contributo di pesce e derivati alla esposizione

alimentare a PCCD, PCDF e DL-PCB è stimato intorno al 55% e può arrivare fino al 98% in diete carnivore (EC SCAN, 2000 in EFSA 2005).

Inoltre la letteratura scientifica internazionale (Hites *et al.*, 2004; Foran *et al.*, 2005) ha recentemente introdotto come elemento di discussione la possibile maggior contaminazione da questi analiti del pesce allevato rispetto al pescato, così da renderli dei candidati particolarmente adatti per questo tipo di studio.

1.1.3 Caratteristiche degli analiti

1.1.3.1 Policlorodibenzodiossine e policlorodibenzofurani

Le PCDD e i PCDF sono composti eteroaromatici tricyclici policlorurati a struttura quasi planare, nei quali il livello di clorosostituzione varia da uno a otto. Con l'eccezione degli ottacloroderivati, ad ogni livello di clorosostituzione corrispondono più isomeri posizionali: in totale, si distinguono 75 congeneri delle PCDD e 135 dei PCDF. Le caratteristiche chimico-fisiche variano con il grado di clorurazione: le molecole con quattro o più atomi di cloro hanno una solubilità in acqua molto bassa e, viceversa, un elevato grado di lipofilità. Questi composti hanno una bassa tensione di vapore, un alto punto di fusione, sono scarsamente biodegradati, e vengono fotodegradati dalla luce solare solamente in particolari condizioni. Hanno, inoltre, una lunga persistenza ambientale ed un'elevata tendenza al bioaccumulo nei vari livelli delle catene alimentari (WHO, 1989).

PCDD e PCDF non sono sostanze di produzione industriale ma sottoprodotti indesiderati di reazione. Tra le fonti che le introducono nell'ambiente ci sono i processi di combustione incontrollata, come l'incerimento dei rifiuti del giardinaggio e delle attività agricole, gli incendi boschivi o incendi di siti industriali e i fuochi dei caminetti.

In tutti questi casi, le quantità di diossine prodotte dipendono dalle caratteristiche della combustione, oltre che dalla dimensione e dalla durata del processo in sé. La formazione di diossine nella combustione incontrollata è agevolata anche in modo sensibile dalla presenza di certe sostanze chimiche contenenti cloro, i cosiddetti "precursori". Si tratta di sostanze di sintesi fra cui si evidenziano i PCB, il polivinilcloruro (PVC), il pentaclorofenolo (PCP) e i prodotti fitosanitari clorurati.

Poiché le sorgenti in grado di emettere diossina sono molte e diverse, e la capacità

di questa classe di prodotti chimici di mantenersi a lungo nell'ambiente ne favorisce la ridistribuzione, oggi le diossine sono considerate contaminanti globali. Sia pure in bassissime dosi, infatti, sono praticamente presenti ovunque: sono ubiquitarie. Malgrado questa caratteristica, la loro presenza negli organismi viventi e nell'ambiente rivela però una grande variabilità. Poiché anche se in misura ridotta anche le combustioni naturali sono responsabili della presenza ambientale di PCDD e PCDF, tracce di diossine si trovano anche in reperti vecchi di secoli. Tuttavia è a partire dagli anni Quaranta che l'ambiente ha registrato un forte e veloce aumento dei livelli di diossine, con un picco nella seconda metà del secolo scorso. Un incremento paragonabile si è osservato parallelamente negli organismi viventi, essere umano incluso. La diffusione della chimica del cloro e l'attività umana nel suo complesso vengono indicate come la causa principale di questo aumento. Negli ultimi due decenni, i Paesi occidentali hanno messo in atto una serie di misure rigorose per la riduzione del rischio diossina soprattutto per quanto riguarda il controllo dell'incenerimento di rifiuti industriali, urbani, o ospedalieri, un tempo principale fonte di immissione di diossine nell'ambiente (Kjeller *et al.*, 1991). Si è arrivati così, seppure in misura diversa a seconda dell'efficienza da Paese a Paese, all'abbattimento dei livelli ambientali e delle concentrazioni rilevate nell'essere umano. Tuttavia, ancora oggi possono sussistere condizioni ambientali che portano a un accumulo significativo delle diossine negli organismi viventi, ai livelli più alti della catena alimentare naturale o nelle filiere della produzione alimentare, soprattutto d'origine animale. Per proteggere la salute della popolazione, l'attuale normativa dell'Unione europea sulla sicurezza alimentare contiene numerosi livelli massimi d'accettabilità e livelli d'azione per le diossine, che consentono di verificare che gli alimenti d'origine animale e vegetale siano in linea con quanto prescritto. Anche l'alimentazione animale è sottoposta a simili verifiche sperimentali (Commissariato di governo per l'emergenza rifiuti in Campania, 2008).

Poiché vari processi industriali e diverse forme di combustione producono differenti impronte di contaminazione, dall'esame di queste è possibile in alcuni casi, ed in particolare quando vi è un'unica fonte principale di rilascio, identificare la sorgente di un inquinamento ambientale. Ad esempio, le miscele di PCDD e PCDF presenti nelle emissioni sia da impianti di combustione industriali sia da motori a combustione interna per trasporto (inclusi quelli autoveicolari) sono caratterizzate da un profilo dai tetra- agli ottacloroderivati crescente per le PCDD e decrescente per i PCDF; il congenere nettamente

dominante è la O₈CDD; generalmente, il rapporto $[2,3,7,8\text{-PCDD}]/[2,3,7,8\text{-PCDF}] > 1$. Pertanto, non sorprende che la contaminazione dell'aria urbana presenti caratteristiche complessive in accordo con quelle sopra descritte (Ballschmiter *et al.*, 1986; Rappe, 1994). Anche i profili di contaminazione degli scarichi idrici civili e dei reflui fognari mostrano una chiara prevalenza della O₈CDD (Rappe & Andersson, 1992a; Rappe & Andersson, 1992b; Sewart *et al.*, 1995). Infine, in merito agli impianti di incenerimento per rifiuti urbani, i profili registrati alle emissioni appaiono in accordo con quanto sopra riportato; tuttavia, fra PCDD e PCDF, prevalgono questi ultimi ($[PCDD]/[PCDF] < 1$) (Ballschmiter *et al.*, 1986; Rappe, 1994).

I livelli di concentrazione dei PCDF, quali contaminanti ricorrenti delle miscele commerciali di PCB (fluidi dielettrici), sono nettamente superiori a quelli delle PCDD; questo fenomeno può venire fortemente esaltato se il fluido dielettrico subisce un incidente caratterizzato da shock termico o incendio in presenza di ossigeno (Rappe, 1994; De Felip *et al.*, 1994). I PCDF — in particolare, i componenti 2,3,7,8-clorosostituiti, prioritari in questo studio — si formano, ancora in modo preponderante rispetto alle PCDD, in processi industriali quali: produzione di cloro tramite elettrolisi del cloruro di sodio (impianti cloro-soda) (Rappe *et al.*, 1991), raffinazione del nichel e del magnesio (Oehme, 1989), produzione di acciaio e recupero di rame (Rappe, 1994), produzione di cloruro di vinile e di cloroderivati organici volatili (Stringer *et al.*, 1995). Come conseguenza di questi processi, possono prodursi contaminazioni di matrici ambientali caratterizzate dalla cosiddetta “impronta del cloro”.

Tra i duecentodieci congeneri che compongono il gruppo delle PCDD e dei PCDF, solo diciassette — quelli con i sostituenti nelle posizioni 2, 3, 7, e 8 — hanno interesse tossicologico a causa del loro potenziale cancerogeno e dei possibili effetti sulla riproduzione e sul sistema immunitario osservati negli animali da laboratorio (WHO, 1989). Tutti i 17 congeneri, come pure i PCB dioxin-like agiscono attraverso lo stesso meccanismo di azione che si esplica nel legame con lo stesso recettore, il recettore arilico (Ah receptor) e producono effetti qualitativamente simili, ma di intensità differente. Il più attivo tra tutti i congeneri è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-diossina (2,3,7,8-T₄CDD) i cui effetti tossici, su animali da laboratorio, si verificano anche a esposizioni molto basse; gli altri congeneri esercitano un'azione simile, ma di minore intensità a parità d'esposizione. Come già visto per i PCB diossina-simili, mediante fattori di tossicità

relativa o TEF (normalizzati rispetto al congenere più tossico, la 2,3,7,8-T₄CDD, il cui TEF è stato posto = 1) si possono esprimere i potenziali tossici di ciascun congenere rispetto alla 2,3,7,8-T₄CDD ed esprimere la tossicità di miscele complesse di PCDD e PCDF in unità tossicologiche o TEQ. I dati tossicologici disponibili sono per la maggior parte relativi alla 2,3,7,8-T₄CDD. L'esposizione a lungo termine a questi composti può portare a disordini dello sviluppo nei bambini e a cancro e altre patologie negli adulti (EFSA 2005).

Tra gli effetti non cancerogeni valutati su popolazioni adulte esposte a livello occupazionale o in seguito a incidenti (addetti alla produzione di clorofenoli e pesticidi clorofenossiacetici, popolazione di Seveso,) molti sono risultati transitori; la cloracne è risultata essere l'effetto correlabile in maniera più sistematica con l'esposizione ad alti livelli. Il risultato più rilevante degli studi epidemiologici sull'uomo è stato l'evidenza di un aumento di rischio di cancro per gli individui esposti a dosi molto alte. La IARC ha classificato la 2,3,7,8-T₄CDD come cancerogena per l'uomo (Gruppo 1) e le altre PCDD e i PCDF come non classificabili rispetto alla loro cancerogenicità per l'uomo (Gruppo 3) (IARC, 1997).

Studi su animali da laboratorio hanno dimostrato una serie di effetti tossici di PCDD e PCDF, tra cui effetti sullo sviluppo neurocomportamentale, sul sistema immunitario e sul sistema endocrino (WHO, 1989).

Lo Scientific Committee on food (SCF) e il Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) hanno stabilito nel 2001 i TDI per le diossine (EC SCF, 2001; WHO, 2001). Entrambi hanno concluso che il risk assessment debba essere basato sugli effetti della TCDD sul sistema riproduttivo maschile nella fase di sviluppo risultante dal body burden della madre. Il TDI ricavato è pari a 2 pg TCDD/kg b.w. Questo valore è stato poi esteso per includere altri PCDD, PCDF e DL-PCB e espresso su periodi di tempo più lunghi per tenere conto delle lunghe emivite di queste sostanze nell'uomo. Lo SCF ha stabilito un Provisional Tolerable Weekly intake di 14 pg WHO-TEQ/kg (EC, 2001); il JECFA un Provisional Tolerable Monthly Intake of 70 pg WHOTEQ/kg b.w. (WHO, 2001).

1.1.3.2 Policlorobifenili

I PCB, la cui produzione industriale è stata interrotta negli anni '70, sono ottenuti —

generalmente in miscele complesse — mediante clorurazione del bifenile con cloro gassoso in presenza di un catalizzatore (cloruro ferrico). Inclusi i monocloroderivati, essi costituiscono una famiglia di 209 composti, differenti a seconda del grado di clorurazione e, per uno stesso grado di clorurazione, della posizione degli atomi di cloro (isomeri posizionali o “congeneri”). Le varie miscele commerciali — Aroclor, Clophen, Fenclor, Kaneclor, ecc. — si distinguono in base alla percentuale in peso di cloro presente, a volte indicata nell’identificazione della miscela stessa: ad esempio, l’Aroclor 1254 contiene il 54 % in peso di cloro, mentre l’Aroclor 1260 ne contiene il 60 %. La diversa percentuale di cloro si riflette anche sullo stato fisico delle miscele, che aumentano la loro densità all’aumentare del grado di clorurazione. La solubilità in acqua, generalmente molto bassa, diminuisce ulteriormente all’aumentare del grado di clorurazione passando da frazioni di mg/L per le miscele meno clorate ad alcuni µg/L per quelle con alto contenuto di cloro (WHO, 1993).

Le miscele commerciali dei PCB sono costituite da un elevato numero di congeneri, di solito 50–80, di cui solo una frazione minore in concentrazioni >1 % in peso (Schulz *et al.*, 1989). Circa 80 dei 209 possibili congeneri risultano sistematicamente “assenti” (<0.05 %, p/p) nelle miscele più usate. Poiché la contaminazione delle matrici ambientali è di solito il risultato dell’esposizione a miscele di PCB diverse (con 20–30 componenti in concentrazioni >1 % in peso), l’“impronta” di contaminazione dei PCB in tali matrici è raramente in grado di fornire indicazioni determinanti per l’individuazione delle sorgenti d’inquinamento. Per quanto riguarda i sedimenti, tuttavia, in alcuni casi l’impronta predetta è in grado di mettere in evidenza il contributo della deposizione atmosferica: in questa, infatti, prevalgono i congeneri più volatili, caratterizzati da un basso grado di clorurazione. In generale, tale contributo è rilevabile in zone di mare aperto, scarsamente contaminate (fondo ambientale) e di fatto lontane dall’impatto antropico diretto (De Voogt *et al.*, 1990).

Per le loro doti di stabilità chimica e fisica — stabilità termica, resistenza agli acidi e alle basi, non infiammabilità, ecc. — i PCB sono stati ampiamente utilizzati come fluidi dielettrici nei trasformatori e nei condensatori elettrici; sono stati inoltre largamente impiegati come fluidi idraulici, veicolanti o diluenti sinergici dei pesticidi, plastificanti, ritardanti di fiamma, fungicidi, componenti di vernici. In conseguenza di un così vasto impiego, di un frequente improprio smaltimento, e della loro elevata persistenza ambientale, i PCB sono ormai contaminanti ambientali ubiquitari. A causa della loro

lipofilicità (i valori di log Kow per i 209 congeneri vanno da 4.46 a 8.18 (Hawker & Connell, 1988)), i PCB tendono a concentrarsi nei sedimenti, in particolare quelli marini, diventando quindi scarsamente disponibili alla degradazione fotochimica (Hansen, 1987; Safe *et al.*, 1987). Elevata persistenza ambientale e lipofilicità determinano inoltre la tendenza al bioaccumulo di questi composti .

La tossicità dei PCB, dimostrata su animali di laboratorio, e sull'uomo in seguito a esposizione occupazionale e accidentale, si manifesta con disordini cutanei, perdita di peso, danni epatici, disfunzioni endocrine e riproduttive. Studi sulla cancerogenicità dei PCB su modelli animali hanno messo in evidenza il loro scarso potere genotossico; pertanto essi vengono considerati cancerogeni promotori piuttosto che iniziatori (Safe, 1987; WHO, 1993). Non è stata ancora trovata una chiara evidenza che l'esposizione ai livelli ambientali di PCB sia correlabile ad un aumento di rischio cancerogeno nell'uomo; la IARC ha classificato i PCB come probabili cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2A) (IARC, 1987).

La tossicità dei PCB è correlata alla struttura dei singoli congeneri: un interesse particolare da un punto di vista tossicologico è legato a quei PCB approssimativamente stereoisomeri della 2,3,7,8-T₄CDD, i cosiddetti PCB diossina-simili, i cui anelli fenilici possono disporsi sullo stesso piano in quanto le posizioni orto sono non-sostituite o sostituite con uno o due atomi di cloro (PCB mono- e di-ortosostituiti). A causa di tale struttura, l'azione tossica di questi congeneri è simile a quella della 2,3,7,8-T₄CDD, ma di minore intensità; il rischio per la salute umana o animale derivante dall'esposizione a questo tipo di PCB viene dunque valutato sulla loro concentrazione totale espressa in equivalenti alla 2,3,7,8-T₄CDD (TEQ) calcolati moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun congenere per il corrispondente fattore di tossicità equivalente (TEF), così ottenendo la conversione del risultato analitico congenere-specifico in unità analitico-tossicologiche. Sommando i TEQ, si ottiene un solo dato che indica a quanta 2,3,7,8-T₄CDD equivalgano tutti i congeneri dosati. Questo approccio, basato sul comune meccanismo di azione dei PCB diossina-simili con PCDD e PCDF, presuppone che gli effetti tossici dei singoli congeneri siano additivi. Tali fattori vengono attribuiti sulla base della conoscenza di parametri biochimici e tossicologici (come la capacità induttrice di enzimi specifici, la tossicità acuta, il potenziale cancerogeno, gli effetti sulla riproduzione, ecc.) (US EPA, 1989). Valori di TEF sono stati determinati per i mammiferi e, più di recente, per uccelli e pesci; i TEF sono infatti specie-dipendenti (Giesy, 1998). Tra le varie

scale di tossicità relativa esistenti, la più utilizzata è attualmente quella stabilita dal WHO nel 1998 (Van den Berg *et al.*, 1998) per PCDD, PCDF e PCB. Nel 2005 i valori di TEF per i 29 composti diossina simili sono stati rivalutati durante un incontro di un gruppo di esperti a Ginevra e i nuovi TEF pubblicati (Van den Berg *et al.*, 2006). Nonostante ciò per esigenze legate soprattutto alla necessità di confrontare i risultati dei nuovi lavori con i dati già a disposizione nella letteratura scientifica allo scopo di ricavare i trend temporali e per le matrici i cui livelli sono normati per coerenza con i limiti di legge è prassi comune continuare a utilizzare i valori TEF stabiliti nel 1998. Inoltre uno studio del Federal Institute for Risk Assessment (BfR, 2006) ha evidenziato come l'uso dei TEF 2005 porti a concentrazioni in termini di equivalenti di tossicità più basse di circa il 10-20 % nella maggior parte degli alimenti, compreso il pesce e sottolineato come questo potrebbe portare a un minore livello di protezione del consumatore contro composti diossina simile nel cibo. In base a tali considerazioni in questo studio per la conversione dei dati analitici in unità analitico-tossicologiche sono state utilizzate le scale di tossicità relative ai mammiferi stabiliti dalla WHO nel 1998.

Negli ultimi anni, sono stati condotti numerosi studi per caratterizzare l'attività tossicologica dei PCB non diossina-simili, prevalenti nelle matrici ambientali e alimentari. I PCB che fanno parte di questo gruppo non si legano al recettore Ah e non mostrano gli effetti tossici tipici dei congeneri dioxin-like. Per molti di questi congeneri è stata dimostrata attività immunotossica e la capacità di interferire con l'omeostasi endocrina. In particolare per alcuni congeneri è stata dimostrata in vitro e in vivo un'azione simil-estrogenica e tireostatica (COM, 2001). I loro effetti tossici si manifestano soprattutto sul sistema nervoso in fase di sviluppo e sulle funzioni dei neurotrasmettitori. Attualmente per i NDL-PCB non esistono parametri di riferimento utilizzabili per il risk assessment (EFSA, 2005).

1.1.3.3 Polibromodifenileteri

I PBDE sono una famiglia di 209 congeneri differenti per numero e posizione degli atomi di bromo sui due anelli aromatici, prodotti dalla reazione di bromurazione del difenil ossido. Sono composti piuttosto stabili caratterizzati da temperature di ebollizione varianti tra 310 e 425 °C e da basse pressioni di vapore; sono inoltre sostanze molto lipofile la cui solubilità in acqua è estremamente bassa e diminuisce con l'aumentare del grado di

bromurazione. Il coefficiente di ripartizione n-ottanolo acqua (log Kow) varia tra 4.28 e 9.9 (WHO, 1994).

Il più importante uso industriale dei PBDE è come ritardanti di fiamma, in miscele contenenti principalmente congeneri tetra-, penta-, otta- e decabromosostituiti. Le miscele commerciali di PBDE sono tre: PentaBDE, decaBDE (DBDE) e ottaBDE (OBDE) (ATSDR, 2004). La più nota delle tre miscele è il PentaBDE e il tetrabromodifeniletere PBDE 47 è il suo maggior componente. Dati sul destino ambientale, sebbene limitati ai mono-, di- e decabromodifeniletere, suggeriscono che, più che la biodegradazione, è la fotodegradazione a giocare un ruolo rilevante nella degradazione dei PBDE; a ogni modo entrambi i processi sono piuttosto inefficaci nel rimuovere i PBDE dall'ambiente e in conseguenza della loro capacità di bioaccumulare nell'ambiente la produzione e l'uso delle miscele commerciali OBDE e PentaBDE sono state interrotte in EU sin dal 2004 e iniziative per diminuire e interrompere la loro produzione si stanno moltiplicando a livello globale (EFSA, 2005).

Informazioni limitate sono disponibili sull'esposizione della popolazione generale ai PBDE, che avviene essenzialmente attraverso la dieta (principalmente attraverso il consumo di pesce).

I dati di tossicità disponibili sui PBDE sono piuttosto scarsi e riguardano per lo più i congeneri presenti nelle miscele commerciali usate come ritardanti di fiamma. Negli studi di tossicità a breve termine eseguiti su animali da laboratorio non sono stati osservati effetti tossici rilevanti; test di teratogenicità, mutagenicità e genotossicità sono stati eseguiti solo su pochi congeneri e sono risultati negativi (WHO, 1994). La IARC ha stimato il decabromodifeniletere come non classificabile rispetto alla sua cancerogenicità per l'uomo (Gruppo 3) (IARC, 1999); nessuno degli altri PBDE è stato valutato dalla IARC. Test in vivo hanno evidenziato per i penta-, otta- e decabromobifenili una potenziale attività di distruttori endocrini per gli organismi viventi (COM, 2001). Il fegato è un organo bersaglio per i PBDE, soprattutto per il PentaBDE, mentre il DBDE è il meno tossico. Per l'OBDE sono stati evidenziati effetti tossici sul sistema riproduttivo. Alcuni congeneri sembrano avere effetti sullo sviluppo neurologico nei topi, ma per ora le informazioni disponibili sono assolutamente insufficienti per un risk assessment al riguardo. Lo Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER) ha concluso che c'è bisogno di

ulteriori studi sulla neurotossicità dei PBDE (EC, 2005). Per motivi analoghi relativi alla mancanza di informazioni adeguate il COT ha concluso che non è possibile ricavare dei TDI per i PBDE, e ha preferito utilizzare un approccio differente, ovvero il MoE (Margin of exposure). La JECFA ha valutato la tossicità dei PBDE nel 2005 e ha concluso che per i PBDE più tossici, effetti avversi non dovrebbero aver luogo nei roditori a dosi inferiori a 100 µg/kg b.w./day (WHO, 2005). Dividendo questo valore per il target MoE di 1000 raccomandato dal COT si ricava che non dovrebbero aver luogo effetti avversi per l'uomo a livelli di esposizione pari o inferiori a 0.1 µg/kg b.w./day.

1.2 Trasferimento dei contaminanti nel pesce

La dieta è la principale via espositiva per un ampio range di contaminanti nel pesce, sebbene l'*uptake* abbia luogo anche attraverso le branchie. Nel pesce di allevamento il livello di contaminanti nei mangimi può essere monitorato e tenuto sotto controllo, mentre nel pesce selvatico il livello espositivo rimane incontrollabile e poco conosciuto e può variare in modo considerevole in luoghi differenti (EFSA, 2005).

1.2.1 PCDD, PCDF e DL-PCB

Karl *et al.* (2003) riportano i risultati di uno studio sul trasferimento di PCDD e PCDF da mangime commerciale per pesci prodotto in Norvegia alle parti edibile della trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*). Nel tessuto muscolare la concentrazione di PCDD e PCDF ha continuato ad aumentare fino alla fine del periodo dell'esperimento (0.914 ng PCDD/F WHO-TEQ/kg meat). La velocità di trasferimento media variava da 11.1% raggiunto dopo 6 mesi al 30.7% dopo 19 mesi. Nelle femmine la velocità di trasferimento appariva più bassa, probabilmente come risultato della distribuzione nelle uova. È stata osservata una correlazione diretta ($r^2 = 0.98$) fra la concentrazione nella frazione lipidica del mangime e il pesce. In altri lavori è stato osservato che la capacità di trasferimento dei DL-PCB è più alta di quella di PCDD e PCDF nel Salmone atlantico (Isosaari *et al.*, 2004; Lundebye *et al.*, 2004), nella trota arcobaleno (Isosaari *et al.*, 2002) e nel rombo (Blanco *et al.*, 2007). I valori delle percentuali di trasferimento di PCDD e PCDF e di DL-PCB calcolate in questi studi sono di 40-65 % (PCDD e PCDF) e 78-93 % (DL-PCB) nel salmone atlantico (Berntssen *et al.*, 2005) e di 27-34 % (PCDD e PCDF) e 30-46 % (DL-PCB) nel rombo (Blanco *et al.*, 2007).

I valori del log Kow di PCDD e PCDF aumentano all'aumentare del numero di atomi di cloro e variano da 6.6 e 8.0 per i congeneri da tetra a otta clorurati (Ritter *et al.*, 1996). La correlazione fra i valori di Kow e la potenzialità di bioaccumulo mostra che i più alti fattori di bioconcentrazione e le emivite più lunghe appartengono ai congeneri con valori di log Kow intorno a 7 (Fisk *et al.*, 1998), ovvero per PCDD e PCDF tetra e penta clorurati.

A conferma di ciò è stato riscontrato che fra le PCDD e PCDF i congeneri tetra e penta clorurati sono quelli che preferenzialmente si accumulano nel salmone, mentre diossine epta e otta clorurate sono escrete con le feci (EFSA, 2005). Un andamento analogo si riscontra nel rombo per il quale le percentuali di trasferimento di tetra e penta clorurati sono intorno al 31 % mentre i congeneri con un numero più alto di atomi di cloro sugli anelli aromatici hanno valori inferiori al 22 % (Blanco *et al.*, 2007). In termini di equivalenti di tossicità le efficienze di accumulo sono più alte per i DL-PCB che per PCDD e PCDF e circa il 35 % dei TEQ ingeriti in totale rimane nell'organismo contro circa il 30 % di TEQ PCDD+PCDF (Blanco *et al.*, 2007).

I valori di log Kow per i PCB variano da 5.6-6.5 per tetra, 6.2-6.5 per i penta 6.7-7.3 per gli esa (Mackay *et al.*, 1992; Ritter *et al.*, 1996). In base alla considerazione che per molti composti lipofili il maggior potenziale di bioaccumulo si ha per quelli con valori di log Kow intorno a 7 (Fisk *et al.*, 1998) per i PCB sono gli esaclorosostituiti a bioaccumulare più facilmente.

Alcuni lavori sperimentali hanno tuttavia mostrato che fra i congeneri dei DL-PCB che i congeneri tetraclorosostituiti mostrano capacità di bioaccumulare e biomagnificare paragonabili a congeneri a più alto grado di clorurazione (Blanco *et al.*, 2007; Isosaari *et al.*, 2004). In particolare Isosaari e collaboratori hanno rilevato che nel salmone i congeneri non-orto tetracloro sono più facilmente accumulabili rispetto ad altri congeneri non-orto e mono-orto (Isosaari *et al.*, 2004).

1.2.2 NDL-PCB

Fra i NDL-PCB i congeneri ad alto grado di clorurazione, soprattutto gli esaclorosostituiti (PCB 138, 153, 150) mostrano una maggiore capacità di trasferimento dai mangimi al pesce rispetto ai congeneri a più basso grado di clorurazione (EFSA, 2005).

Questa circostanza è essenzialmente l'effetto dell'aumentare del grado di lipofilità dei congeneri di PCB con l'aumentare del grado di clorurazione; i valori di log P (coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua) infatti variano da circa 5 nei diclorobifenili a 7.5 negli esacloro fino a raggiungere il valore di 9,6 nel decaclorobifenile (Bruggeman et al, 1984). Nei PCB inoltre l'effetto limitante per l'assorbimento nel pesce dovuto all'ingombro sterico che aumenta all'aumentare del grado di clorosostituzione è meno sentito che nelle diossine e furani altoclorurati a causa della diversa posizione relativa assunta dagli anelli fenilici (Bruggeman et al, 1984).

1.2.3 PBDE

Il trasferimento di PBDE dai mangimi al pesce è stato studiato in alcune varietà di specie: salmone Atlantico (Isosaari *et al.*, 2005), danio rerio (Andersson *et al.*, 1999), carpa (Stapleton *et al.*, 2002, 2004a,b,c), luccio (Burreau *et al.*, 1997, 2000), trota iridea (Kierkegaard *et al.*, 1999) e trota comune (Tomy *et al.*, 2004).

Isosaari (2005) ha riportato che il salmone atlantico è in grado di accumulare i PBDE dal mangime allo stesso grado dei PCB non-*ortho* e in maniera più efficace degli altri PCB e di PCDD e PCDF (Isosaari *et al.*, 2004).

Gli studi sopra citati hanno riportato un ampio *range* di capacità di accumulo congenere-dipendente con valori di efficienza di trasferimento che variano da meno di 0.02 fino a 5.2 % per il PBDE 209 (Kierkegaard *et al.*, 1999; Stapleton *et al.*, 2002) fino a più di 90 % per il PBDE 47 (Burreau *et al.*, 1997, 2000; Stapleton *et al.*, 2004b). Nel luccio (pike) l'efficienza di trasferimento è del 42% per il PBDE 153, del 60% per il PBDE 99 e del 90% per il PBDE 47 (Burreau *et al.*, 1997); nessuna correlazione è stata trovata fra l'efficienza del trasferimento e il Kow o il peso molecolare, ma è stata osservata una correlazione negativa con il grado di alogenazione. L'ingombro sterico sembra in effetti essere il fattore limitante per l'assorbimento dei PBDE in quanto i congeneri ad alto grado di bromurazione sembrano avere difficoltà ad attraversare le membrane cellulari.

Per quanto riguarda la capacità metabolica sembra essere fortemente specie-dipendente (Johnson and Olson, 2001). Tuttavia in alcuni studi è stato evidenziato che il PBDE 47 oltre a essere un congenere con un'alta efficienza di trasferimento non viene metabolizzato facilmente, così che la sua concentrazione nei tessuti ad alto contenuto

lipidico tende a non diminuire in modo significativo nel tempo (Hakk and Letcher, 2003).

La biotrasformazione e/o la differente capacità di accumulo di alcuni congeneri di PBDE ha come conseguenza una certa differenza nel pattern che si riscontra nei mangimi rispetto a quello che si riscontra nei pesci (Isosaari *et al.*, 2005).

1.3 Fattori che influenzano il livello dei contaminanti organici persistenti nei pesci

1.3.1 Fattori di carattere generale

Il confronto fra i livelli di contaminanti riscontrati nel pesce è reso complicato dalle variazioni che possono essere indotte da parametri di varia natura fra cui la specie l'età e la fase di vita del pesce, l'origine geografica e la stagione in cui il pesce è raccolto o pescato. Inoltre, è generalmente accertato che la maggior parte dei contaminanti derivino dalla rete alimentare piuttosto che direttamente dall'acqua, giocano un ruolo rilevante sui livelli di accumulo di contaminanti anche l'ambiente e il sistema di allevamento.

Nell'ambiente selvatico i pesci più vecchi sono generalmente più grandi e mangeranno le specie di prede più grandi. In questo modo hanno più opportunità sul lungo periodo di accumulare più alte quantità di contaminanti rispetto a pesci più giovani o di coetanei più piccoli della stessa specie nella stessa popolazione.

La quantità di grasso (il principale tessuto di deposito per questo tipo di contaminanti nel pesce) e la sua distribuzione fra i vari organi e tessuti del pesce possono variare moltissimo non solo fra le specie, ma anche all'interno della stessa specie. Il pesce viene classificato come grasso (oily, blue) e magro (bianco) sulla base della percentuale di grasso presente nel muscolo, ovvero nella parte edibile del pesce. Il pesce grasso accumula il grasso nel muscolo, mentre il pesce magro (ad esempio il merluzzo) lo accumula prevalentemente nel fegato che normalmente non viene mangiato, ma è una buona fonte di olio. Inoltre, la distribuzione dei grassi di accumulo nel filetto non è uniforme: in generale il contenuto lipidico dei filetti diminuisce spostandosi dalla testa alla coda e dal dorso al ventre; il livello di grasso è più alto sotto la pelle e nel muscolo rosso (Bell *et al.*, 1998).

I valori di percentuale di grasso che definiscono le categorie "pesce grasso" e "pesce magro" differiscono fra i vari autori; l'FSA (FSA, 2004a) definisce "magro" il pesce con contenuto di grasso rispetto al peso corporeo compreso fra l'1 e il 2 % e "grasso" quello

con contenuto compreso fra il 5 e il 20 %.

Per quanto riguarda il tipo di grasso il livello di colesterolo nel pesce è simile a quello di agnello, manzo e maiale. Il contenuto assoluto di fosfolipidi rimane relativamente costante all'interno delle varie specie, ma i trigliceridi, la forma principale in cui si trovano i grassi di riserva, possono variare molto.

Le riserve di grasso cambiano molto al cambiare della stagione e della fase di vita; questo può portare a delle incongruenze nel registrare i livelli di contaminanti in base a specie, età e tessuto campionato. Ad esempio tutte le specie conservano i grassi prima dello sviluppo e in seguito trasferiscono i nutrienti per sviluppare le ovaie. Di conseguenza i pesci catturati o raccolti nei primi stadi dello sviluppo avranno maggiori livelli di grasso negli organi e tessuti, mentre quelli catturati dopo l'accoppiamento avranno livelli di lipidi più bassi in organi e tessuti. Un altro esempio della variabilità legata al contenuto di grasso è rappresentata dal fatto che specie diverse di pesce possono conservare le loro riserve di grasso in zone del corpo diverse. I merluzzi sono molto grassi in primavera ed estate quando i livelli di plankton e di prede sono alti e la maggior parte di questo grasso è contenuto nel fegato, mentre in inverno hanno livelli più bassi di grassi nel fegato. Nell'orata e nel salmone atlantico, il fegato risulta meno coinvolto nel processo di accumulo dei lipidi. In questo caso infatti l'accumulo dei lipidi avviene essenzialmente e pressochè equamente nel grasso periviscerale e nel muscolo scheletrico. Lo sgombro e il tonno conservano il grasso nella fascia muscolo scheletrica. Dunque i grassi e i livelli di contaminanti che devono essere registrate nei pesci dipendono in modo critico dal tessuto campionato e generalmente dal periodo dell'anno (EFSA, 2005).

Anche all'interno della stessa specie I confronti fra I livelli di contaminanti riscontrati possono essere complicati da differenze dovute alla fase di vita. Questo è vero ad esempio per i salmoni selvatici e allevati. I salmoni di allevamento sono generalmente raccolti molto prima di raggiungere la maturità sessuale, mentre quelli selvatici vengono catturati generalmente appena prima di risalire i fiumi per accoppiarsi. In questa fase i pesci selvatici hanno smesso di mangiare e molto del loro grasso è già stato trasferito dai muscoli alle gonadi. Questo può notevolmente influenzare il confronto fra i livelli di contaminanti nel tessuto edibile dei salmoni selvatici e di allevamento (EFSA, 2005).

Inoltre fra i salmoni la situazione è anche fortemente dipendente dalla specie di salmone. Alcune di queste infatti sono disponibili solo come selvatico, non vengono allevate. Inoltre specie differenti occupano talvolta livelli trofici differenti (sono onnivori o esclusivamente carnivori), o vivono in ambienti diversi e dunque mangiano prede diverse. L'interpretazione dei confronti fra i livelli riscontrati nei salmoni selvatici e di allevamento devono tenere in considerazione questi parametri; alcune delle specie di salmone del Pacifico in cui sono stati riscontrati livelli di contaminanti inferiori a quelli del salmone atlantico di allevamento (Hites *et al.*, 2004) ad esempio sono specie onnivore, e non possono essere paragonate con una specie carnivora al top della catena alimentare.

Da tutto ciò appare evidente la necessità di standardizzare le procedure di campionamento e i protocolli analitici se si vuole effettuare un confronto valido fra i livelli di contaminanti riscontrati in differenti specie di pesce e fra pesci selvatici e di allevamento (EFSA 2005).

1.3.2 Fattori legati alla pratica dell'acquacoltura

Il livello di contaminanti presenti nel pesce può essere notevolmente influenzato dalle pratiche di allevamento utilizzate.

Il termine acquacoltura infatti è piuttosto generico e comprende quell'insieme di attività umane, distinte dalla pesca, finalizzate alla produzione controllata di organismi acquatici. In tal senso, con riferimento al prodotto che se ne trae, si parla, più specificatamente, di piscicoltura, molluschicoltura, crostaceicoltura e algicoltura. Può essere praticata in acque dolci o in mare, nel qual caso prende il nome di maricoltura.

Si distinguono una forma estensiva e una forma intensiva. Nella forma estensiva l'intervento dell'uomo è minore e limitato per lo più alla protezione dai predatori; nella forma intensiva invece l'attività umana ha un ruolo determinante soprattutto per quel che riguarda la somministrazione di alimenti (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali, 2009).

L'allevamento estensivo è per definizione quello in cui l'allevatore non somministra alimenti dall'esterno. L'allevatore provvede alla "semina" degli esemplari giovani provenienti da centri di riproduzione o raccolti in natura e interviene nel controllo del flusso delle acque attraverso vari dispositivi installati generalmente su porzioni lagunari o

presso le foci a delta di grandi fiumi. Il limite dell'allevamento estensivo è costituito dalle rese piuttosto basse se rapportate all'alto immobilizzo fondiario (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali, 2009).

In Italia la diffusione dell'acquacoltura di tipo estensivo è piuttosto limitata (12,4%, Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali, 2009) e gran parte delle specie ittiche da allevamento (soprattutto trote, anguille, spigole, orate, pesci gatto e storioni) provengono da impianti intensivi. Si attua per lo più sulla terra ferma in vasche in terra o cemento, ma negli ultimi anni sta sempre più diffondendosi quello praticato in mare utilizzando gabbie e recinti. In Italia, prevalentemente, l'allevamento ittico intensivo è praticato in impianti a terra, con bacini artificiali di dimensioni relativamente ridotte (dai 100 ai 1.000 metri quadri). Gli allevamenti, in genere, sono altamente specializzati e solitamente monoculturali (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali, 2009). Nell'allevamento intensivo è di fondamentale importanza l'apporto umano per la somministrazione di alimenti agli animali allevati, con formulazioni differenti a seconda della specie. La produzione dei mangimi per pesci occupa un ruolo notevole nella produzione mondiale di pesce. Nel 2000 per la produzione di circa 15 milioni di tonnellate di mangimi sono state utilizzate circa 2.4 milioni di tonnellate di carne di pesce e 550000 tonnellate di olio di pesce prodotti ad hoc e non per il consumo umano diretto. Tutte le specie economicamente importanti allevate per il mercato occidentale sono predatori ai livelli più alti della catena trofica che nelle loro principali fasi di sviluppo consumano pesce. Derivano l'energia metabolica dal metabolismo delle proteine e di conseguenza i carboidrati svolgono un ruolo marginale nel fornire loro energia (Halver and Hardy, 2002). Inoltre molte specie hanno bisogno di livelli significanti di alcuni acidi grassi poliinsaturi a catena lunga, che nell'ambiente ricavano dalle prede che li concentrano dal plankton, ma che in allevamento devono essere loro somministrati con la dieta, generalmente con olio di pesce. Il contributo dei vari componenti dei mangimi varia con il tipo di pesce poiché dipende dal grado di adattamento del sistema digestivo del pesce ai substrati dei mangimi come amido fibre crude e grasso. In generale la maggior parte delle specie richiede diete miste. La dieta tipica di un pesce onnivoro generalmente contiene circa il 30% di cereali (grano e mais), il 56% di farina di soia, il 10% di farina di pesce, il 2% di olio di pesce e il 2% di premiscelato (una miscela di minerali, elementi in tracce, vitamine, proteine e altri additivi). Per i pesci carnivori invece la dieta prevede circa 11% di cereali, 7% di farina di

soia, 5% di farina di glutine di mais, 50% di farina di pesce, 25% di olio di pesce, 2% di premiscelato (EFSA, 2005).

1.4 Sparus aurata

1.4.1 Scelta della Sparus aurata

Per questo studio è stata selezionata come specie di pesce da analizzare per la determinazione di contaminanti organici persistenti l'orata (*Sparus Aurata*, Figura 1).

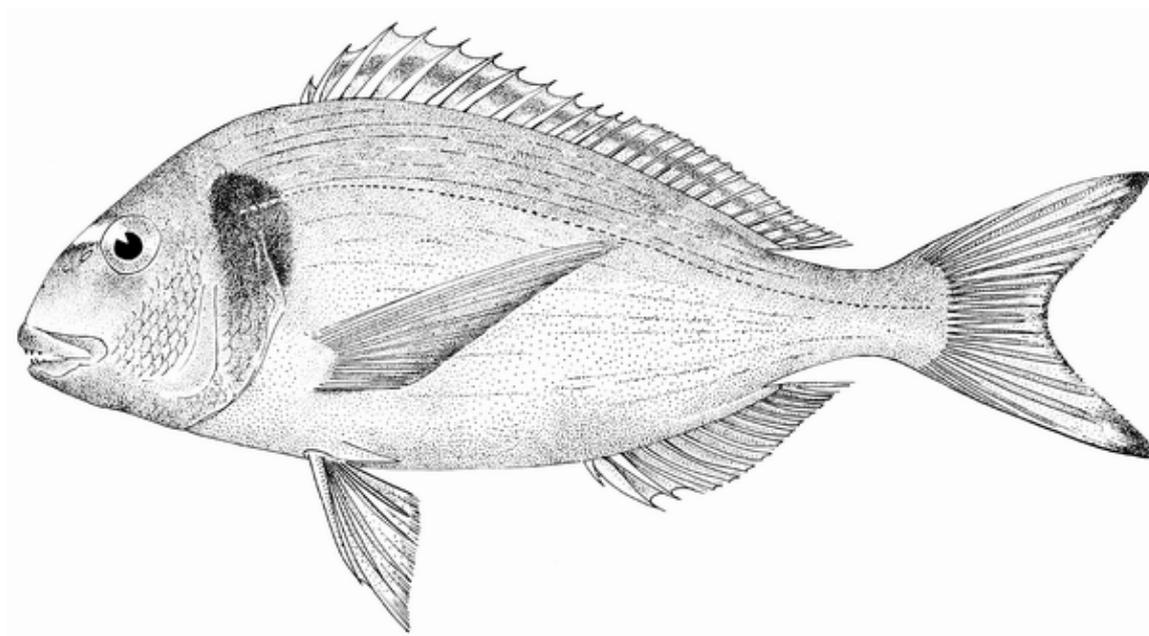


Figura 1. *Sparus aurata*

L'orata è stata scelta per la sua posizione rilevante nel panorama dell'acquacoltura italiana e mediterranea e l'alto (>4%) contenuto lipidico della sua parte edibile.

La *Sparus aurata* è infatti la specie marina più allevata in Italia e una delle cinque specie più prodotte in assoluto (EC, 2008). Fra i pesci è seconda per quantità prodotte solo alla trota (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali, 2007) e risulta essere la specie che negli ultimi anni ha avuto in Italia l'incremento maggiore in termini di quantità prodotta. Questa circostanza la rende un'ottima candidata per questo studio poichè in letteratura sono disponibili lavori su specie di acqua dolce allevate in Italia (prima fra tutte la trota (Brambilla et al., 2003; Brambilla et al., 2007)) mentre più rari sono i dati

disponibili su specie allevate in mare. L'orata riveste inoltre una notevole importanza commerciale. In Italia il suo consumo è molto alto (è fra le specie più consumate) e risulta presente fra le specie più esportate così come fra quelle più importate. Nel 2004 e nel 2005 le importazioni di orate fresche sono aumentate rispettivamente del 6,2% e del 10,1%. La Grecia si è confermata la principale fornitrice di questo prodotto, coprendo il 75% dell'import italiano di orate, ma in sensibile aumento, negli ultimi due anni, sono risultate le importazioni dalla Turchia, divenuto così il secondo paese fornitore dell'Italia. Dal lato delle esportazioni, dopo un lieve aumento nel 2004, il 2005 ha fatto registrare una diminuzione del 19% delle richieste estere di orate, soprattutto quelle di Slovenia (-49,1%), Spagna (-56%) e Paesi Bassi (-93,7%) (ISMEA, 2008).

Il secondo criterio di selezione è stato l'alto (relativamente alle altre specie più allevate e consumate in Italia) contenuto lipidico. Questo fattore è di particolare rilevanza nell'ambito di questo studio in quanto i contaminanti di interesse sono molto lipofili e si accumulano prevalentemente nei tessuti grassi raggiungendo le concentrazioni più elevate nelle specie acquatiche più ricche in grassi. A questo proposito anche la dieta prevalentemente carnivora della *Sparus aurata* la rende un ottimo candidato per questo studio per la capacità dei contaminanti organici persistenti di bioconcentrare lungo la rete trofica.

1.4.2 Caratteristiche della Sparus Aurata

1.4.2.1 Classificazione

Regno *Animalia* C. Linnaeus, 1758 - animals

Sottoregno *Bilateria* (Hatschek, 1888) Cavalier-Smith, 1983 - bilaterians

Branca *Deuterostomia* Grobben, 1908 - deuterostomes

Infraregno *Chordonia* (Haeckel, 1874) Cavalier-Smith, 1998

Phylum *Chordata* Bateson, 1885 - chordates

Subphylum *Vertebrata* Cuvier, 1812 - vertebrates

Infraphylum *Gnathostomata* auct. - jawed vertebrates

Classe *Osteichthyes* Huxley, 1880

Sottoclasse *Actinopterygii* - ray-finned fishes

Infraclasse *Actinopteri*

Superdivisione *Neopterygii*

Divisione *Halecostomi*

Subdivisione *Teleostei*

Infradivisione *Elopocephala*

Coorte *Clupeocephala*

Subcoorte *Euteleostei*

Infracoorte *Neognathi*

Divisione *Neoteleostei*

Subdivisione *Eurypterygii*

Infradivisione *Ctenosquamata*

Superordine *Acanthopterygii*

Serie *Percomorpha*

Ordine *Perciformes*

Subordine *Percoidei*

Familia *Sparidae* – Pagri e orate

Genere *Sparus* C. Linnaeus, 1758

Sparus aurata C. Linnaeus, 1758

(da *The Taxonomicon*, 2010)

1.4.2.2 Morfologia

L'orata è un pesce di taglia medio-grande con corpo ovale, compresso. Il profilo della testa è curvo, con occhi piccoli. Ha bocca piccola, obliqua, labbra spesse, guance squamose, preopercolo senza squame. In ogni mascella ci sono da 4 a 6 denti anteriori tipo canini, i denti posteriori sono distribuiti in 2 o 4 file e sono per la maggior parte molariformi, adatti a frantumare i gusci dei molluschi e dei crostacei, che costituiscono la dieta principale dell'orata allo stato selvatico. Ha da 11 a 13 raggi branchiali. La pinna dorsale ha 11 spine nella parte anteriore e da 13 a 14 raggi molli nella parte posteriore, quella caudale ha 3 spine e 11 o 12 raggi molli. Il colore è grigio argenteo con riflessi azzurri e dorati sul dorso, all'origine della linea laterale c'è una macchia scura molto evidente che si estende fino al margine superiore dell'opercolo, mentre il bordo esterno dell'opercolo presenta una chiazza scarlatta. Ai lati del corpo presenta spesso due linee nere longitudinali, una banda nera sulla pinna dorsale e le punte delle pinna caudale nere. La macchia dorata ornata ai bordi da due bande nere cui deve il nome è visibile fra gli occhi, non ben definita negli esemplari giovani tende a scomparire dopo la morte dell'animale. Può arrivare a una lunghezza di settanta centimetri e a 5 chili di peso (API, 2008; FAO, 2004).

1.4.2.3 Distribuzione geografica

L'orata è presente in tutto il bacino del Mediterraneo, meno frequente nella zona est e sud-est, molto rara nel Mar Nero. Vive inoltre anche nelle isole atlantiche e del Regno Unito, a Capo Verde e intorno alle Canarie (FAO, 2004).

Specie marina, è un pesce bentopelagico (vive o si nutre in prossimità del fondo) vive sui fondali sabbiosi e rocciosi in prossimità della costa, normalmente a profondità intorno ai 30 metri, anche se gli adulti possono trovarsi anche a profondità intorno ai 150 metri (FAO, 2004). Come la spigola, è molto eurialina (resiste a forti variazioni di salinità), per questa sua caratteristica si ritrova sia in ambienti marini che salmastri (lagune e aree d'estuario), in particolare durante la fase iniziale del suo ciclo vitale. Non tollera altrettanto bene gli abbassamenti termici; ha, infatti, una scarsa resistenza al freddo e la temperatura di 5°C costituisce il limite per la sua sopravvivenza (API, 2008). La nascita avviene in mare durante l'inverno, i giovanili migrano all'inizio della primavera verso acque costiere che offrono maggiore protezione, maggiore disponibilità di cibo e temperature più miti. Nel

tardo autunno ritorna in mare aperto, dove gli adulti si riproducono. È un pesce sedentario, vive solitario o in piccoli gruppi.

1.4.2.4 Riproduzione

È un ermafrodita proterandro: ogni individuo, durante la crescita, cambia sesso, per i primi due anni di vita è maschio, successivamente diventa femmina. La maturità sessuale viene raggiunta a uno-due anni dai maschi (20-30 cm) e a due-tre (33-40 cm) dalle femmine. Il periodo riproduttivo va da Ottobre a Dicembre, non si riproduce nel Mar Nero (FAO, 2004). Le uova, deposte in mare, sono piccole, trasparenti e galleggianti. Come per la spigola, alla temperatura di 13°C si schiudono rapidamente in circa 3 giorni. Le forme giovanili penetrano nelle lagune e nelle foci dei fiumi ove si accrescono molto bene, raggiungendo anche i 200 gr alla fine del primo anno di vita (API, 2008).

È prevalentemente carnivoro, occasionalmente erbivoro. Si ciba di molluschi (principalmente vongole, di cui spezza facilmente il guscio), crostacei e pesci (FAO, 2004).

L'orata è allevata in tutto il Mediterraneo, viene tradizionalmente coltivata in estensivo nelle lagune, nelle valli da pesca dell'Alto Adriatico, e negli stagni salmastri costieri. Il rapido accrescimento, la bontà delle carni bianche sode e saporite, ne fanno un prodotto commerciale di grande interesse economico. Come per la spigola, da alcuni anni se ne pratica l'allevamento intensivo a ciclo completo in numerosi impianti sia ubicati a terra con vasche, sia in mare con gabbie galleggianti, con ottimi risultati (API, 2008).

1.5 Impianti di allevamento

1.5.1 Caratteristiche degli impianti di allevamento

Gli impianti di allevamento utilizzati per il campionamento degli esemplari oggetto del presente studio sono due impianti di maricoltura dedicati all'allevamento intensivo di orate situati in Puglia (Figura 2).

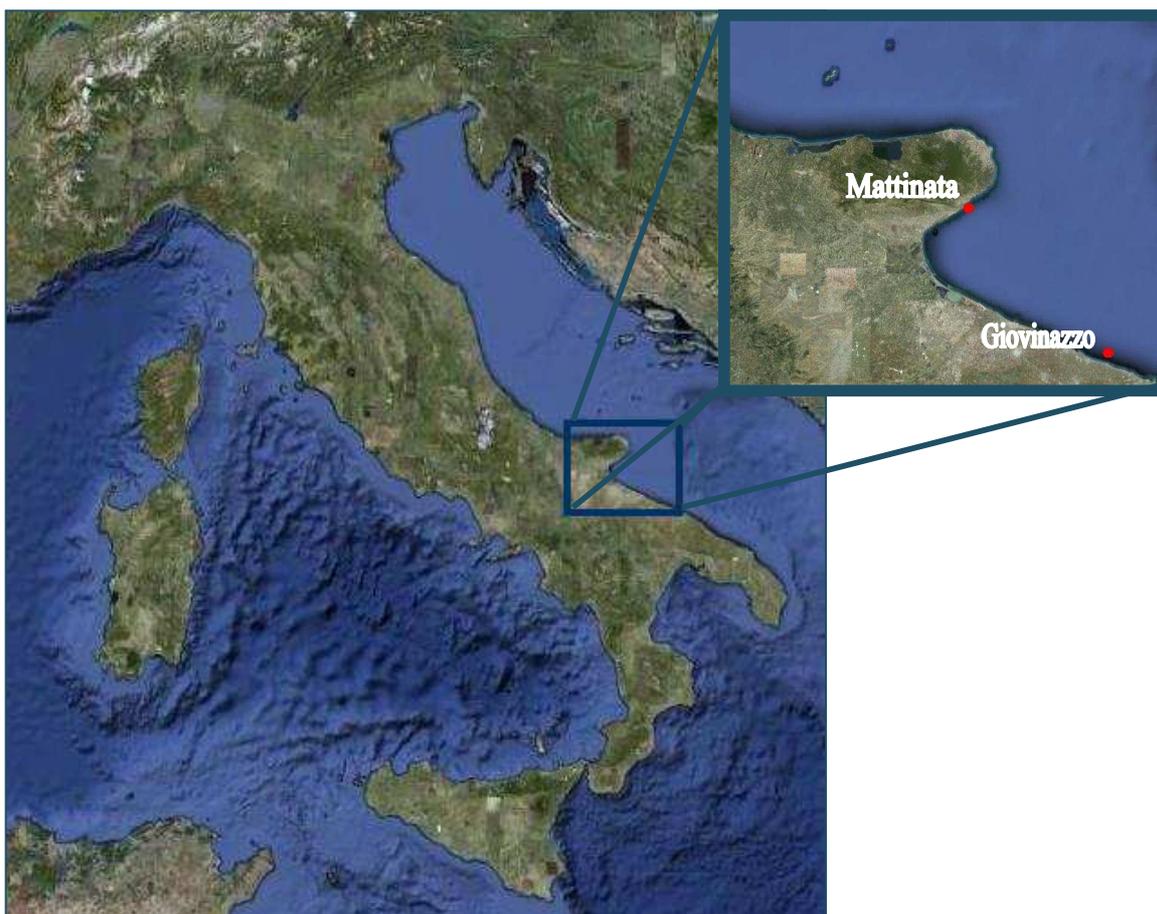


Figura 2. Collocazione geografica dei siti di campionamento

Il tipo di allevamento utilizzato nei due impianti è intensivo in gabbie a mare. Gli allevamenti di questo tipo non prevedono l'uso di sistemi di pompaggio, di l'aerazione e di trattamento delle acque. In tali impianti esemplari giovanili di 10 g raggiungono in media la taglia commerciale di 350-400 g in circa 1 anno, mentre giovanili di 5 g raggiungono la stessa taglia in un periodo di circa 16 mesi (FAO, 2008).

I due impianti sono situati nelle località di Mattinata in provincia di Foggia e di Giovinazzo in provincia di Bari. Gli impianti si caratterizzano per una differente distanza dalla costa e sono stati selezionati in base a questa caratteristica per studiare un'eventuale differenza nella concentrazione di contaminanti organici persistenti negli esemplari di *Sparus aurata* prelevati nei due differenti impianti dovuta al diverso livello di impatto antropico a cui sono sottoposti gli impianti in conseguenza della loro differente distanza dalla costa.

1.5.2 Impianto di Mattinata

1.5.2.1 Caratteristiche ambientali

L'impianto di Mattinata è situato a meno di un miglio dalla costa e si trova in zona riparata caratterizzata da basso fondale e da scarsa corrente.

1.5.2.2 Descrizione delle modalità di allevamento

L'impianto è a gabbie galleggianti (caratteristiche delle aree riparate e poco soggette alle condizioni del mare), la densità di allevamento è bassa (4-19 Kg/m³ durante il periodo delle sperimentazione).

1.5.3 Impianto di Giovinazzo

1.5.3.1 Caratteristiche ambientali

L'impianto di Giovinazzo è situato a circa tre miglia dalla costa e si trova in mare aperto in zona caratterizzata da forti correnti e profondità elevata.

1.5.3.2 Descrizione delle modalità di allevamento

L'impianto è a gabbie sommergibili, la densità di allevamento è elevata (8-28 Kg/m³ durante il periodo delle sperimentazione) e gli alimenti sono somministrati in modo non costante.

2. Scopo della tesi

Questo progetto si propone di valutare i livelli di contaminazione da Policlorodibenzodiossine (PCDD), Policlorodibenzofurani (PCDF), Policlorobifenili (PCB, *dioxin-like* (DL-PCB) e *non dioxin-like* (NDL-PCB)) e Polibromodifenileteri (PBDE) in pesce di allevamento (orata, *Sparus aurata*) in impianti *off shore* situati nel Sud Italia (Puglia), allo scopo primario di raccogliere dati sulle concentrazioni di inquinanti organici persistenti nei prodotti dell'acquacoltura italiani.

Il progetto prevede inoltre la possibilità di identificare e stimare i contributi alla contaminazione da inquinanti organici persistenti riscontrata nel pesce provenienti dalle pratiche di allevamento utilizzate. Le caratteristiche delle pratiche di allevamento considerate a tal fine saranno la dieta e la posizione del sito di allevamento. I contributi all'esposizione dei pesci verranno indagati attraverso l'analisi dei mangimi (per la dieta) e

la raccolta dei campioni di pesce in due differenti siti di allevamento a differente distanza dalla costa e dunque sottoposti a influenze diverse rispetto alla presenza di attività antropiche (per la posizione del sito di allevamento).

I campioni verranno raccolti in differenti periodi dell'anno corrispondenti a diversi stadi di accrescimento dei pesci per poter valutare l'influenza di questi fattori sull'accumulo di contaminanti.

Le matrici oggetto di analisi sono filetto e visceri di pesce e mangimi per acquacoltura. L'analisi delle due differenti matrici di biota ha lo scopo di verificare la ripartizione dei contaminanti organici persistenti all'interno della specie esaminata. L'analisi del filetto, in particolare, ha la finalità di quantificare il contenuto di contaminanti della parte del pesce destinata al consumo umano. La scelta di analizzare i visceri è motivata invece dalla consuetudine dei produttori di mangimi di utilizzare le parti dei pesci di allevamento non destinate al consumo umano diretto per la produzione di oli e farine di pesce da utilizzare nei mangimi per animali di allevamento. Lo scopo principale dell'analisi delle tre matrici è dunque quello di stimare il loro contributo all'esposizione umana diretta o indiretta e valutare le possibilità di ridurre tale contributo.

Infine ci si propone di confrontare i risultati dello studio con i limiti di legge fissati dall'Unione Europea in materia e con dati analoghi rilevati in letteratura e relativi al bacino del Mediterraneo, allo scopo di verificare il ruolo e contributo dei mangimi e delle pratiche di acquacoltura che hanno luogo in Italia nel ridurre o aumentare il rischio espositivo della popolazione a tali contaminanti e di comparare il grado di esposizione del consumatore rispetto a quello relativo al consumo di pesce proveniente da differenti aree geografiche.

3. Materiali e metodi

3.1 Procedure sperimentali

3.1.1 Campionamento

3.1.1.1 Campionamento di esemplari di Sparus Aurata

I campioni di orate sono stati raccolti in Puglia in due differenti impianti di acquacoltura a diversa distanza dalla costa: Giovinazzo (Bari), a più di tre miglia dalla costa, e Mattinata (Foggia), a meno di un miglio.

Sono stati prelevati individui di grandezza diversa a diversi stadi della crescita (da un peso di 100 grammi fino alla taglia commerciale, ovvero un peso di circa 350 grammi). In ogni impianto sono stati prelevati 20 esemplari al mese prelevati in 4 mesi diversi (complessivamente 80 individui, 80 reperti di filetto e 80 di grasso periviscerale per ogni impianto); i campionamenti sono stati effettuati nei mesi di agosto e novembre 2006 e febbraio e aprile 2007.

Gli esemplari raccolti sono stati sezionati e filetto, fegato e grasso periviscerale sono stati congelati e conservati per l'analisi.

I singoli reperti sono stati raccolti in pools prima dell'analisi.

Lo schema di campionamento è riportato in Figura 3.

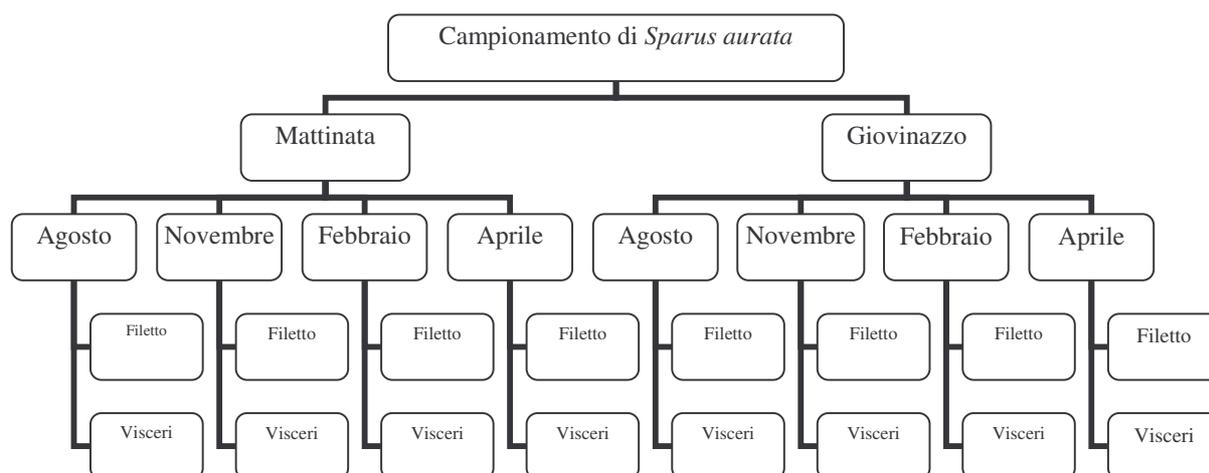


Figura 3. Schema di campionamento degli esemplari di *Sparus aurata*.

3.1.1.2 Campionamento di mangimi

Durante le campagne di campionamento del pesce sono stati raccolti anche campioni del mangime con cui tale pesce veniva alimentato. I mangimi sono stati campionati per 12 mesi da maggio 2006 ad aprile 2007, raccogliendo mangimi di marche differenti. Alcuni mangimi sono stati somministrati in entrambi gli impianti di acquacoltura

e/o nello stesso impianto in mesi differenti; di questi mangimi sono stati di conseguenza presi più campioni, uno per ogni mese di somministrazione in ogni impianto; viceversa in alcuni casi lo stesso mangime è stato somministrato per più mesi ed è stato campionato un'unica volta. La combinazione di tali fattori ha determinato una differenza nel numero di campioni prelevati e analizzati nei due impianti di allevamento: nell'impianto di Mattinata sono stati prelevati 7 campioni mentre in quello di Giovinazzo 5.

Lo schema di campionamento è riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Schema del campionamento di mangimi per acquacoltura.

ID Campione	Impianto di allevamento	Mese di somministrazione
1M	Mattinata	I metà maggio
2M	Mattinata	II metà maggio, giugno, luglio, agosto
3M	Mattinata	settembre, ottobre
4aM	Mattinata	novembre
5M	Mattinata	dicembre
4bM	Mattinata	gennaio, febbraio, marzo
6M	Mattinata	aprile
1G	Giovinazzo	I metà maggio
2G	Giovinazzo	II metà maggio, giugno, luglio, I metà agosto
3G	Giovinazzo	II metà agosto, settembre
4G	Giovinazzo	ottobre, novembre, dicembre, gennaio, febbraio, I metà aprile
5G	Giovinazzo	marzo, II metà aprile

3.1.2. Analisi

Il metodo analitico utilizzato per il presente studio è basato su esperienze dirette sviluppate nel reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità (Bayarri *et al.*, 2001; De Felip, 2003; di Domenico *et al.*, 1997, 1998, 2002; Ingelido, 2004, 2005) e in accordo con il metodo 1613 della US EPA (1994) sviluppato per la determinazione di PCDD e PCDF mediante HRGC-HRMS.

Ci si riferisce ad un unico metodo analitico in quanto il metodo di analisi dei campioni biologici (filetto e visceri di pesce) differisce dal metodo di analisi dei mangimi unicamente per la fase di omogeneizzazione effettuata con omogeneizzatore per i campioni biologici e in mortaio per i mangimi e per l'estrazione effettuata in Soxhlet per i campioni biologici e in ASE (Accelerated Solvent Extraction) per i mangimi.

3.1.2.1 Principio del metodo

In accordo con il Metodo 1613 della US EPA (1994), il rilevamento degli analiti di interesse è basato sull'impegno estensivo di standard interni (SI), o traccianti, completamente marcati con ^{13}C . Gli IS vengono aggiunti all'omogeneizzato prima di qualsiasi operazione analitica, ed eventualmente di passaggi analitici intermedi ritenuti critici.

La componente lipidica è estratta in Soxhlet per i campioni biologici e in ASE (Accelerated Solvent Extraction) per i mangimi con *n*-esano, così da rimuovere gli analiti altamente lipofili.

L'estratto è soggetto a una procedura di purificazione comprendente un trattamento con acido solforico concentrato per distruggere il carico organico co-estratto con gli analiti, seguito da passaggi su colonne cromatografiche in sequenza che permettono di concentrare gli analiti in forma purificata.

Dopo la purificazione, il campione è quantificato contro standard esterni (SE, tanti quanti sono gli analiti da dosare) mediante HRGC-LRMS (SIM) per la determinazione di PBDE, di NDL-PCB, e di mono-*orto*-DL-PCB e mediante HRGC-HRMS (SIM) per la determinazione di non-*orto*-DL-PCB e PCDD+PCDF.

Si fa presente che, a causa dell'ampio intervallo di pesi molecolari presentati dai PBDE (fra 480 e 970 Da), la spettrometria di massa a elevata risoluzione rappresenta il sistema di rilevamento di elezione, garantendo elevata selettività e sensibilità anche per i congeneri esa-deca-sostituiti. Tuttavia, si ritiene che la determinazione congenere-specifica possa essere effettuata con successo anche in bassa risoluzione. Al riguardo, si nota che i più recenti spettrometri di massa quadrupolari coprono un range di massa fino a 1050 Da, offrendo una potenziale alternativa all'uso di spettrometri ad alta risoluzione anche nella determinazione di PBDE con elevato grado di bromurazione.

Si evidenzia che il rilevamento strumentale dei PBDE è complicato dalla proprietà intrinseche di queste sostanze che presentano alti punti di ebollizione e moderata stabilità chimico-fisica (il congenere 209, per esempio, inizia a degradarsi a temperature prossime a 300 °C). Particolare attenzione deve essere posta, dunque, nella scelta del sistema d'iniezione e della colonna gascromatografica (Björklund, 2004).

A ciascun batch di campioni è abbinata l'analisi di un bianco procedurale per verificare l'eventuale contributo al fondo (*background*) procedurale.

Parallelamente alla quantificazione degli analiti di interesse una frazione dell'estratto, pari al 5 % in peso, viene utilizzata per la determinazione del contenuto lipidico.

3.1.2.2 *Interferenze e cause d'errore*

A causa delle minute quantità di analiti che devono essere identificate e quantificate, all'interno del laboratorio è stata mantenuta la massima pulizia, in pressione positiva per evitare apporti di contaminazione atmosferica dall'esterno. Gli operatori, tutti esperti, si sono attenuti rigorosamente ai protocolli di “buone pratiche” e alle procedure operative standard dedicate d'accreditamento in vigore nel laboratorio.

Poiché la vetreria, i solventi, i reagenti, e ogni tipo di strumentazione utilizzata durante l'analisi possono portare alla presenza di sostanze interferenti, sono stati utilizzati una serie di accorgimenti atti a dimostrare che tutti i materiali impiegati ne siano virtualmente privi. Il più importante fra questi accorgimenti è l'uso del bianco procedurale affiancato da analisi strumentali (HRGC-LRMS(SIM) e HRGC-HRMS(SIM)) frequenti delle soluzioni di standard interni, dello standard di iniezione e dei principali solventi utilizzati debitamente concentrati. Inoltre per verificare l'assenza di eventuali contaminazioni degli strumenti di misura sono state effettuate iniezioni di solventi ad alto grado di purezza alternate alle iniezioni utilizzate per la quantificazione degli analiti nei campioni.

La vetreria, tutta di Pyrex, è stata preventivamente lavata con detersivo e acqua, risciacquata accuratamente con acqua distillata, e poi tenuta in stufa a 170 °C per 12–24 h (la vetreria tarata, di Classe A, non viene sottoposta al trattamento termico). Prima dell'uso, la vetreria è stata ulteriormente e ripetutamente risciacquata con acetone seguito da *n*-esano, e fatta asciugare in zona protetta. L'ultimo risciacquo della vetreria con *n*-esano è stato raccolto quantitativamente e concentrato a piccolo volume — da 1/100 a 1/500 del volume di partenza — per verificarvi mediante rilevamento HRGC-LRMS(SIM) e HRGC-HRMS(SIM) l'eventuale presenza d'interferenze pregiudiziali sui segnali degli analiti d'interesse. Qualora questo *background* procedurale fosse troppo elevato, la vetreria

di cui trattasi è stata sottoposta a nuovo lavaggio oppure sostituita. Dopo l'uso la vetreria impiegata è stata recuperata dopo decontaminazione con lavaggi ripetuti con miscela equivolometrica di acetone e *n*-esano (eventualmente entrambi di grado tecnico), seguita dalla procedura di lavaggio precedentemente descritta.

Tutti i solventi utilizzati in quantità relativamente rilevanti, che subiscono sensibili processi di concentrazione durante il percorso dell'analisi, sono stati sottoposti a un controllo di congruità analitica preventiva per verificarne l'eventuale contributo al *background* procedurale. Per tale accertamento, volumi operativi dei solventi d'interesse, presi singolarmente, sono stati concentrati a piccolo volume secondo quanto si verifica nell'applicazione del metodo e sottoposti a rilevamento HRGC-LRMS(SIM) e HRGC-HRMS(SIM).

Tutti gli standard sono stati acquisiti da ditte specializzate, certificati all'origine in merito alle identità dei congeneri forniti, al grado della loro purezza, e al loro titolo effettivo. Le soluzioni di riferimento derivate dagli standard commerciali sono state preparate utilizzando solventi relativamente poco volatili (*n*-nonano, iso-ottano, o toluene) per le diluizioni: la loro stabilità nel tempo è stata verificata effettuando il controllo della stabilità del peso prima di ogni uso e tramite rilevamento HRGC-LRMS(SIM) e HRGC-HRMS(SIM).

I lipidi naturalmente presenti nel campione e co-estratti insieme agli analiti di interesse possono interferire con la loro determinazione. Pertanto, il contenuto lipidico deve essere ridotto o eliminato utilizzando la procedura di purificazione riportata.

3.1.2.3 Conservazione del campione

Il campione omogeneizzato è stato congelato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a tale temperatura conservato fino all'analisi.

3.1.2.4 Procedura analitica

3.1.2.4.1 Composizione di pools

I 160 reperti (80 di filetto e 80 di fegato e grasso periviscerale) ricavati dal sezionamento dei pesci e congelati in fase immediatamente successiva al campionamento sono stati riuniti in 16 pools (8 di filetto e 8 di fegato e grasso periviscerale) di 10 reperti

ciascuno, ogni pool essendo caratterizzato da reperti provenienti da esemplari allo stesso stadio di accrescimento e provenienti dallo stesso impianto.

L'omogeneizzazione è stata effettuata con omogeneizzatore per i reperti di filetto e grasso periviscerale e in mortaio per i mangimi.

Tutti i mangimi raccolti sono stati analizzati per la determinazione di contaminanti organici persistenti.

3.1.2.4.2 Preparazione del campione per analisi

La dimensione del campione da sottoporre all'analisi è funzione dei livelli di contaminazione presunti e del contenuto lipidico del campione in esame. In base a tale considerazione sono stati utilizzati sottocampioni per analisi di peso pari a circa 100 g per l'analisi dei filetti, 10g per quella dei visceri e 20g per l'analisi dei mangimi.

Sulla base dei livelli di contaminazione presunti, è stata stimata per ciascuna classe di analiti la quantità di SI da aggiungere al campione prima dell'estrazione.

Il campione omogeneizzato è pesato, mescolato con solfato di sodio, in genere aggiunto in quantità doppia rispetto al campione, e addizionato con gli SI. Il campione così preparato è lasciato riposare per 12–24 h prima dell'estrazione.

3.1.2.4.3 Estrazione

L'estrazione dei campioni biologici è stata condotta in Soxhlet per 18–24 ore con n-esano (circa 150 ricicli).

L'estrazione dei mangimi è stata condotta in ASE con n-esano in celle da 33cc per 20min a una temperatura di 100°C e a una pressione di 100atm.

Dopo questa prima fase gli estratti di campioni biologici e mangimi sono stati trattati in modo analogo come riportato nei paragrafi successivi.

L'estratto è stato concentrato a pressione ridotta e pesato per prelevare una quantità pari al 5 % in peso da destinare alla determinazione del contenuto lipidico. Questo è stato calcolato lasciando l'aliquota prelevata sotto leggero flusso di azoto fino a portarla a costanza di peso.

3.1.2.4.4 Purificazione

L'estratto esanico è stato concentrato fino al volume di 5–10 mL ed eluito con 350 mL di *n*-esano su colonna di Extrelut® (12 g) impregnato con 30 mL di acido solforico concentrato. Nei casi in cui il carico organico fosse ancora visibilmente presente dopo il trattamento acido, il campione concentrato a piccolo volume è stato eluito con 200 mL di *n*-esano o *n*-pentano su una colonna multistrato.

L'eluato ottenuto dall'Extrelut® o dalla colonna multistrato è stato concentrato fino al volume di 4–5 mL e sottoposto a frazionamento mediante Power-Prep™. Questo apparato, capace di prestazioni elevate, consente d'eseguire un cleanup automatizzato con un *kit* commerciale di tre colonne sequenziali impaccate, nell'ordine, con gel di silice, allumina, e carbone. Il campione è stato eluito sequenzialmente con approssimativamente 80 mL di *n*-esano, 150 mL di una miscela 50:1 di *n*-esano-diclorometano (Frazione I, contenente i NDL-PCB e i mono-*orto*-DL-PCB), 190 mL di una miscela 1:1 di *n*-esano-diclorometano (Frazione II, contenente i PBDE), e in ultimo 70 mL di toluene a flusso invertito (Frazione III, contenente PCDD+PCDF e i non-*orto*-DL-PCB). Aggiunto 1 µL di *n*-tetradecano, le frazioni di interesse sono concentrate sotto azoto fin quasi a secchezza e poi riprese con 50–100 µL di iso-ottano contenente gli standard d'iniezione (clordano ¹³C-marcato per le Frazioni I e II, e ¹³C-1,2,3,7,8,9-H₆CDF+¹³C-1,2,3,6,7,8-H₆CDD per la Frazione III).

3.1.2.4.5 Determinazione strumentale

I PBDE, i NDL-PCB, e i mono-*orto*-DL-PCB sono stati determinati tramite HRGC-LRMS (EI, 35 eV) in modalità SIM utilizzando le condizioni operative descritte di seguito:

HRGC-LRMS (EI, 35 eV)

- colonna gas cromatografia: HT-5 (5% phenyl (equiv) polysiloxane-carborane, 25 m × 0.22 mm Øi × 0.1 µm) o equivalente;
- gas di trasporto: He;
- iniettore PTV oppure on-column;
- programmata GC per la determinazione di congeneri di PBDE: 80 °C per 1 min, 30 °C/min fino a 240 °C, 10 °C/min fino 340 °C, 340 °C per 4 min;

- programmata GC per la determinazione di congeneri di NDL-PCBe di mono-orto-DL-PCB: 80 °C per 1 min, 30 °C/min fino a 150 °C, 5 °C/min fino a 255 °C, 120 °C/min fino a 340 °C per 3 min.

HRGC-HRMS, Waters VG Autospec;

- colonna gas cromatografica HT-5 (5% phenyl (equiv) polysiloxane-carborane, 25 m × 0.22 mm Øi × 0.1 µm) o equivalente;
- gas di trasporto, He;
- iniettore PTV oppure on-column;
- programmata GC, 80 °C per 1 min, 30 °C/min fino a 240 °C, 10 °C/min fino a 340 °C, 340 °C per 4 min.

CONGENERI ANALIZZATI

Per ogni famiglia di contaminanti sono stati analizzati i seguenti congeneri:

- PCDD: 2,3,7,8-T₄CDD; 1,2,3,7,8-P₅CDD; 1,2,3,4,7,8-H₆CDD; 1,2,3,6,7,8-H₆CDD; 1,2,3,7,8,9-H₆CDD; 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD; O₈CDD.
- PCDF: 2,3,7,8-T₄CDF; 1,2,3,7,8-P₅CDF; 2,3,4,7,8-P₅CDF; 1,2,3,4,7,8-H₆CDF; 1,2,3,6,7,8-H₆CDF; 1,2,3,7,8,9-H₆CDF; 2,3,4,6,7,8-H₆CDF; 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF; 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF; O₈CDF.
- PCB

DL-PCB:

non-orto: 3,3',4,4'-Tetra-CB (PCB 77); 3,4,4',5-Tetra-CB (PCB 81); 3,3',4,4',5-Penta-CB (PCB 126); 3,3',4,4',5,5'-Hexa-CB (PCB 169).

mono-orto: 2,3,3',4,4'-Penta-CB (PCB 105); 2,3,4,4',5-Penta-CB (PCB 114); 2,3',4,4',5-Penta-CB (PCB 118); 2',3,4,4',5-Penta-CB (PCB 123); 2,3,3',4,4',5,-Hexa-CB (PCB 156); 2,3,3',4,4',5'-Hexa-CB (PCB 157); 2,3',4,4',5,5'-Hexa-CB (PCB 167); 2,3,3',4,4',5,5'-Hepta-CB (PCB 189).

NDL-PCB: 28; 49; 52; 66; 70; 95; 99; 101; 110; 138; 146; 149; 151; 153; 170; 180; 187.

- PBDE: 28; 47; 99; 100; 153; 154; 183; 209.

In totale in ogni campione sono stati determinati 54 analiti (7 PCDD, 10 PCDF, 12 DL-PCB, 17 NDL-PCB e 8 PBDE).

I 17 congeneri di PCDD+PCDF e i 4 congeneri di non-orto-DL-PCB sono stati determinati mediante HRGC-HRMS VG Autospec (EI, 35 eV), operante alla risoluzione di 10000 in modalità SIM.

I congeneri nativi e quelli isotopicamente marcati sono stati quantificati utilizzando le due masse più intense dello spettro di massa nel caso dei PBDE e le due masse più intense di ciascun multipletto molecolare per PCB e PCDD+PCDF.

La quantificazione congenere-specifica è stata eseguita impiegando una miscela dei congeneri naturali d'interesse e di quelli isotopicamente marcati a concentrazione nota (standard di quantificazione). Nei casi in cui una determinazione risultasse interferita, è stata ripetuta dopo un'ulteriore purificazione dell'estratto mediante Power-Prep™.

3.1.2.5 Calcoli e risultati

La quantificazione dei congeneri di interesse è stata eseguita applicando l'Equazione 1, avendo determinato nello standard di quantificazione i fattori di risposta (FR) e i fattori di risposta relativi (FRR).

Questi sono stati stimati dalle aree dei segnali relativi alle due masse più abbondanti dei congeneri di PBDE e, per PCB e PCDD+PCDF, mediante le aree dei segnali più intensi presenti nei multipletti corrispondenti agli ioni molecolari dei vari omologhi.

$$X_{AN} = \frac{A_{AN}}{FRR_{AN}} \times \frac{Q_{SI}}{A_{SI}} \quad (1)$$

dove

X_{AN} è la quantità assoluta dell'analita nel campione;

A_{AN} è l'area del segnale analitico nel campione;

Q_{SI} è la quantità assoluta dello SI ^{13}C -marcato;

A_{SI} è l'area corrispondente al segnale dello IS ^{13}C -marcato;

FRR_{AN} è il fattore di risposta relativo calcolato mediante l'Equazione (2):

$$FRR_{AN} = \frac{FR_{AN}}{FR_{SI}} \quad (2)$$

dove

FR_{AN} e FR_{SI} sono rispettivamente i fattori di risposta determinati per l'analita e per lo standard interno nello standard di quantificazione utilizzando l'equazione (3):

$$FR_i = \frac{A_i}{Q_i} \quad (3)$$

dove

A_i è l'area del segnale analitico dell'analita o dello SI ^{13}C -marcato nello standard di quantificazione;

Q_i è la quantità assoluta dell'analita o dello SI ^{13}C -marcato nello standard di quantificazione;

La determinazione del recupero (%) dei congeneri marcati viene effettuata mediante l'Equazione (4):

$$\text{Recupero (\%)} = \frac{X_{SI}}{Q_{SI}} \times 100 \quad (4)$$

dove

Q_{SI} è la quantità assoluta di standard interno aggiunta al campione;

X_{SI} è la quantità assoluta di standard interno determinata nel campione utilizzando l'Equazione (5):

$$X_{SI} = \frac{A_{SI}}{FRR_{SI}} \times \frac{Q_{ING}}{A_{ING}} \quad (5)$$

dove

A_{SI} è l'area del segnale relativo allo standard interno nel campione;

FRR_{SI} è il fattore di risposta relativo dello standard interno rispetto allo standard di iniezione determinato nella soluzione calibrante;

Q_{ING} è la quantità assoluta di standard di iniezione nel campione;

A_{ING} è l'area del segnale relativo allo standard di iniezione nel campione.

I risultati analitici relativi a PBDE e NDL-PCB sono stati generalmente espressi in ng/g fw (peso fresco).

Come previsto dalla normativa attualmente vigente (Regolamento CE 1881, 2006; Raccomandazione CE 88, 2006; Direttiva 13 CE, 2006), i risultati analitici relativi a PCDD+PCDF e DL-PCB sono stati espressi in pg/g fw (peso fresco), e poi convertiti in unità TE, o TEQ, mediante opportuno sistema TEF.

Al fine di comparare i risultati analitici con altri dati di letteratura, è stato ritenuto opportuno riportare le concentrazioni stimate anche in termini di ng/g grasso e pg/g grasso.

La somma dei congeneri quantificati per ciascuna delle classi di analiti considerati è stata eseguita come stime cumulative *upper bound*. Tali stime prevedono un trattamento dei dati non quantificabili come $LOQ \times 1$ nel calcolo dei valori cumulativi.

La scelta dell'approccio upper bound è stata effettuata per analogia con la normativa in materia di livelli di questi contaminanti nei pesci e nei mangimi ((Regolamento CE 1881, 2006; Raccomandazione CE 88, 2006; Direttiva 13 CE, 2006) e per mantenere un atteggiamento più conservativo ai fini della valutazione del rischio.

Per completezza di informazione i valori cumulativi TEQ sono stati riportati anche in *medium bound* ovvero trattando i dati non quantificabili come $LOQ \times 0.5$ nel calcolo dei valori cumulativi.

I valori cumulativi *medium* o *upper bound* possono includere il contributo “virtuale” di dati congenere-specifici al disotto del limite di determinazione (es., $<LOQ$). Pertanto, è lecito chiedersi quanto un valore cumulativo sia rappresentativo della classe di analiti effettivamente presenti in un determinato campione. La rappresentatività è stata misurata dal contributo relativo (f) dei congeneri con livelli quantificati ($>LOQ$) secondo la formula $f = \Sigma (\text{congeneri quantificati}) / \Sigma (\text{congeneri quantificati e non quantificati})$.

Il valore di f è compreso tra 100 a 0 %, quest'ultimo essendo associato con la presenza di soli contributi virtuali ($<LOQ$). Per stime cumulative *medium bound*, la soglia (percentualizzata) per discriminare i valori non rappresentativi può assumersi pari a $f = 60$ % (De Felip, 1994; 1999).

3.6.2.6 Verifica della qualità dei dati

RIPRODUCIBILITÀ INTRA-LABORATORIO DEL METODO Questo controllo è stato eseguito con misurazioni indipendenti, congenere-specifiche, ripetute su una medesima matrice omogenea predisposta dal laboratorio. Devianze accettate sui singoli congeneri o sui valori cumulativi (analitici o TEQ), $< | \pm 20 \% |$.

ACCURATEZZA INTRA-LABORATORIO DEL METODO Questo controllo è stato eseguito con misurazioni congenere-specifiche ripetute su appropriato materiale di riferimento. Devianze accettate sui singoli congeneri o sui valori cumulativi (analitici o TEQ), $< | \pm 30 \% |$.

RECUPERO DI STANDARD INTERNI MARCATI Questo controllo è stato eseguito per ogni singolo congenere nel corso di tutti le determinazioni analitiche quantitative effettuate sui campioni di pesce e mangimi. Sono stati considerati accettabili recuperi compresi nel range 40–120 %.

LIMITE DI QUANTIFICAZIONE DEL METODO (LOQ) La determinazione del LOQ è stata eseguita sul campione reale, calcolando per ciascun congenere la concentrazione che produceva una risposta strumentale pari a quattro volte il rumore di fondo (*noise*, N), con $N \approx 3-4 SD_N$ (SD_N , deviazione standard associata al *noise*).

CONTAMINAZIONE LEGATA AD INTERFERENZE NEI BIANCHI PROCEDURALI A ciascun batch di campioni è stato abbinato un bianco procedurale il cui contributo avrebbe potuto influenzare il valore di un segnale analitico (X). Il seguente sistema di contrassegni o *flags* viene utilizzato nel laboratorio per qualificare e gestire il contributo di X_B (segnale del bianco):

- $X_B / X \leq 0.05$: l'interferenza è considerata "trascurabile" → nessuna correzione;
- $0.05 < X_B / X \leq 0.25$: l'interferenza è considerata "modesta" → nessuna correzione (*flag*, o contrassegno su X, "**");
- $0.25 < X_B / X \leq 0.75$: l'interferenza è considerata "sensibile" → correzione richiesta: $X[\text{valore corretto}] = X - X_B$ (*flag* "***");
- $0.75 < X_B / X \leq 1.25$: l'interferenza è considerata "marcata" → il segnale analitico è paragonabile al LOQ e sostituito da "<LOQ" (*flag* "****");
- $1.25 < X_B / X$: l'interferenza è considerata "eccessiva" e non correggibile → il valore di X è sostituito da ND ("non determinabile").

RIPETIBILITÀ DEI TEMPI DI RITENZIONE RELATIVI Livelli di CV% accettati, $< |\pm 0.1\%|$.

RISOLUZIONE GAS CROMATOGRAFICA I picchi dei congeneri d'interesse dovevano risultare risolti: sovrapposizione di uno o più componenti adiacenti, $< 10\%$.

RIPETIBILITÀ DEI FATTORI DI RISPOSTA RELATIVI (RRF) Livelli di CV% accettati per $(RF_{ANALYTE}) \times (RFC^{13-IS}) - 1$, $< |\pm 15\%|$ (con segnali $> LOQ$).

CORRETTEZZA DEL RAPPORTO DELLE MASSE ISOTOPICHE CRITICHE Le masse ioniche (es., M and M+2) campionate con tecnica SIM per identificazione/quantificazione dovrebbero fornire il previsto rapporto (teorico) (es., $[M] \times [M+2]^{-1}$) o un rapporto simile a quello dello standard. Livelli accettati di devianza dai livelli attesi, $< |\pm 20 \%|$.

QUANTIFICAZIONI PARALLELE BASATE SU DUE MASSE ISOTOPICHE Quantificazioni con due diverse masse isotopiche (es., M and M+2) dovrebbero differire $< |\pm 20 \%|$.

CONTROLLO DELLA LINEARITÀ DI RISPOSTA La linearità di risposta è stata controllata regolarmente con soluzioni standard di PBDE, PCDD+PCDF e di PCB su un intervallo di circa due ordini di grandezza, che includono i valori LOQ. Gli accertamenti sono stati eseguiti utilizzando generalmente i congeneri più importanti (es., 2,3,7,8-T₄CDD, 1,2,3,7,8-P₅CDD, 2,3,4,7,8-P₅CDF). Per i congeneri più tossici (TEF più elevati), i LOQ strumentali dovevano essere compatibili con una quantità iniettata di circa 50 fg per i congeneri prioritari.

RIPRODUCIBILITÀ INTRA-LABORATORIO NEL TEMPO Questo controllo è basato sulla ripetizione di determinazioni eseguite a intervalli di tempo (es., semestrale) su una matrice omogenea stabile idonea. Devianze sui singoli congeneri o sui valori cumulativi (analitici o TEQ), a differenti momenti temporali, maggiori di $|\pm 30 \%|$ comportano una specifica valutazione di congruenza e una conseguente azione a livello operativo.

RIPRODUCIBILITÀ E ACCURATEZZA INTER-LABORATORIO Valutazione basata sulle determinazioni dei congeneri d'interesse, indipendenti e ripetute su matrici omogenee e CRM distribuite da un ente organizzatore (Department of Analytical Chemistry at the Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway).

3.2 Presentazione e analisi dati ed elaborazioni statistiche

3.2.1 Test statistici utilizzati

Per l'elaborazione statistica dei dati relativi all'analisi di filetto e visceri di pesce e di mangimi sono stati utilizzati dei test statistici non parametrici.

La scelta di test non parametrici è stata determinata dal numero limitato dei dati e dalla loro distribuzione non normale. La non normalità della distribuzione è stata accertata applicando ai dati cumulativi di tutte le classi di analiti nei campioni di pesci e mangimi il test di Shapiro-Wilk: i dati sono risultati non distribuiti normalmente.

I test non parametrici utilizzati sono stati:

- Spearman test. Permette di calcolare il coefficiente di correlazione fra due variabili e il valore di p associato. E' l'analogo non parametrico del test di Pearson dal quale si distingue per il procedimento utilizzato per valutare la correlazione fra le due variabili che nel test di Spearman è basato sui ranghi. il test richiede che le variabili sotto osservazione siano misurate almeno su una scala ordinale.
- Mann whitney U test. Permette di valutare la presenza di una differenza significativa fra due gruppi di dati o al contrario l'indistinguibilità fra le singole osservazioni appartenenti ai due gruppi e di associare al risultato un valore di p. È l'alternativa non parametrica, basata sull'uso dei ranghi, al test t per campioni indipendenti.
- Kruskal-Wallis test. Permette di valutare la presenza di una differenza significativa fra più gruppi di dati o al contrario l'indistinguibilità fra le singole osservazioni appartenenti ai gruppi e di associare al risultato un valore di p. È l'alternativa non parametrica, basata sull'uso dei ranghi, all'analisi della varianza fra gruppi.

3.2.2 Campioni di filetto e visceri di pesce

I risultati dell'analisi congenere specifica relativa all'analisi di filetto e visceri di pesce sono stati riportati in forma di istogramma normalizzando i diversi congeneri rispetto al congenere prevalente. La scelta della forma grafica è stata determinata dalla necessità di rendere immediatamente visibile il pattern di contaminazione che è caratteristica importante per le famiglie di analiti oggetto di questo studio.

I dati cumulativi sono stati riportati in tabelle su base fresca, su base grassa e (per PCDD, PCDF e DL-PCB) in equivalenti di tossicità. I dati riportati in tabella sono stati

confrontati con i valori limite riportati dalla normativa vigente in materia e con dati analoghi disponibili in letteratura.

Ai risultati cumulativi sono stati applicati dei test statistici non parametrici allo scopo di evidenziare:

- eventuali differenze fra i livelli di contaminazione dei campioni di pesce prelevati dai due differenti siti di allevamento (Mann Whitney U test)
- eventuali differenze fra i livelli di contaminazione dei campioni di pesce legate ad andamenti stagionali (Kruskal-Wallis test)
- eventuali differenze significative fra i livelli di contaminazione su base grassa dei campioni di filetto e visceri (Mann whitney U test)
- eventuali correlazioni fra i livelli di contaminazione su base grassa dei campioni di filetto e di visceri (Spearman test)

3.2.3 Campioni di mangimi per acquacoltura

I mangimi per acquacoltura sono stati identificati in fase di campionamento con i loro nomi commerciali seguiti dal nome del sito di allevamento in cui erano stati prelevati e dalla data di campionamento. L'uso della data per l'identificazione si era reso essenziale poiché talvolta lo stesso tipo di mangime era stato somministrato nei due siti di allevamento differenti o nello stesso sito in periodi differenti e ogni volta campionato.

Per facilitare la gestione e analisi dei dati ai nomi commerciali sono stati sostituiti dei codici identificativi (ID campione) composti da un numero seguito da una lettera maiuscola dove il numero (da 1 a 6) sta a indicare l'ordine temporale di somministrazione e la lettera maiuscola (G o M) il sito di allevamento. Nel caso in cui lo stesso mangime sia stato somministrato nello stesso sito in due periodi differenti (e campionato due volte) il numero è seguito da una lettera minuscola che caratterizza più nel dettaglio l'ordine di somministrazione (Es.: 4aM e 4bM).

I risultati dell'analisi congenere specifica dei mangimi per acquacoltura sono stati riportati in forma di istogramma normalizzando i diversi congeneri rispetto al congenere prevalente. La scelta della forma grafica è stata determinata come nel caso dei campioni di

filetto e visceri di pesce dalla necessità di rendere immediatamente visibile il pattern di contaminazione e di evidenziare graficamente eventuali differenze fra i pattern riscontrati nei mangimi rispetto a quelli dei pesci.

Oltre ai profili dei 12 campioni di mangimi sono stati riportati in forma grafica i profili di contaminazione delle famiglie di analiti riferiti a quanto effettivamente somministrato ai pesci dei due siti di allevamento nei quattro trimestri precedenti i mesi di campionamento dei pesci ovvero:

- maggio-luglio 2006
- agosto-ottobre 2006
- novembre 2006-gennaio 2007
- febbraio-aprile 2007.

I dati congenere specifici da cui sono stati ricavati tali grafici sono stati stimati effettuando delle medie pesate dei singoli mangimi somministrati nei trimestri. Tali stime sono state effettuate moltiplicando i risultati relativi alle analisi di ognuno dei 12 campioni di mangime per il peso di mangime somministrato giornalmente nel mese e ancora per il numero di giorni di somministrazione ottenendo la quantità del tale mangime somministrata nel mese in questione. Tali quantità relative ai 3 mesi componenti ogni trimestre sono state poi sommate per ottenere le quantità trimestrali; tali quantità sono state divise per la quantità totale in grammi di mangime somministrata in quel trimestre per trasformare il dato di quantità in dato di concentrazione. La procedura è stata seguita per entrambi i siti di campionamento.

Tutto ciò è stato fatto allo scopo di ottenere per i mangimi dei dati che fossero in analogia con quelli dei pesci per i quali si hanno quattro campionamenti nei mesi di agosto, novembre, febbraio e aprile per rendere possibile un confronto immediato di profili e livelli.

I dati cumulativi dell'analisi dei 12 mangimi sono stati riportati in tabelle su base fresca, su base grassa e (per PCDD, PCDF e DL-PCB) in equivalenti di tossicità. I dati riportati in tabella sono stati confrontati con i valori limite riportati dalla normativa vigente in materia e con dati analoghi disponibili in letteratura.

Ai risultati cumulativi sono stati applicati dei test statistici non parametrici allo scopo di evidenziare:

- eventuali differenze fra i livelli di contaminazione dei campioni di mangimi somministrati nei due differenti siti di allevamento (Mann Whitney U test applicato alle stime trimestrali)
- eventuali differenze fra i livelli di contaminazione dei campioni di mangimi nei quattro trimestri precedenti il campionamento del pesce (Kruskal-Wallis test applicato alle stime trimestrali)

3.2.4 Correlazioni e confronti fra mangimi per acquacoltura e pesci

Ai risultati cumulativi relativi all'analisi di mangimi e filetto e visceri di pesce è stato applicato il test di Spearman allo scopo di evidenziare eventuali correlazioni fra i livelli di contaminazione su base grassa dei mangimi somministrati e dei pesci.

I profili congenere specifici relativi ai mangimi e ai pesci sono stati confrontati per evidenziare analogie e differenze.

4. Risultati e discussione

4.1 Normativa

La normativa europea riguardante il pesce destinato al consumo alimentare e mangimi per pesci riporta limiti massimi e livelli di azione solo per PCDD+PCDF e DL-PCB in termini di equivalenti di tossicità. Al momento della stesura di questo lavoro non sono ancora state normate le concentrazioni di NDL-PCB e PBDE in entrambe le matrici prese in considerazione.

La normativa europea riguardante i limiti massimi e i livelli di azione di PCDD+PCDF e DL-PCB è di seguito riportata:

4.1.1 Pesce

REGOLAMENTO (CE) N. 199/2006 DELLA COMMISSIONE del 3 febbraio 2006 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili.

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

RACCOMANDAZIONE 2006/88/CE DELLA COMMISSIONE del 6 febbraio 2006 relativa alla riduzione della presenza di diossine, furani e PCB nei mangimi e negli alimenti.

4.1.2 Mangimi

DIRETTIVA 2006/13/CE DELLA COMMISSIONE del 3 febbraio 2006 che modifica gli allegati I e II della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili

I limiti massimi e i livelli di azione per PCDD+PCDF e DL-PCB sono riportati in Tabella 3 insieme ai livelli di contaminanti in *Sparus aurata* e mangimi per acquacoltura disponibili in letteratura per tutti gli analiti oggetto di questo studio.

Tabella 3. Confronto fra le concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE determinate in questo studio in mangimi per acquacoltura e in pools di filetto di *Sparus aurata* con dati di letteratura e con i livelli massimi e di azione fissati dalla normativa vigente in materia.

	Analita	Questo studio	Dati di letteratura	Livelli massimi (ML) e livelli di azione (AL)
<i>Sparus aurata</i>	Σ (PCDD+PCDF) pgWHO-TE/g fw	0.08-0.14	0.3 ^a , 0.03 ^b	ML: 4.0 ^c AL: 3.0 ^d
	Σ (DL-PCB) pgWHO-TE/g fw	0.56-0.74	1.2 ^a , 0.10 ^b	AL: 3.0 ^d
	Tot TE pgWHO-TE/g fw	0.65-0.89	1.5 ^a , 0.13 ^b , 1.48 ^e	ML: 8.0 ^c
	Σ 6(PCB indicatori) ng/g fw	4.48-56.82	8.75 ^f	—
	Σ 8(PBDE) ng/g fw	0.51-0.76	1.25 ^g	—
			Questo studio	Dati di letteratura
<i>Feedingstuffs for fish</i>	Σ (PCDD+PCDF) pgWHO-TE/g fw	0.11-0.66	0.63 ^h , 0.93 ⁱ	ML: 2.25 ^l AL: 1.75 ^l
	Σ (DL-PCB) pgWHO-TE/g fw	0.48-4.19	1.34 ^h , 1.58 ⁱ	AL: 3.5 ^l
	Tot TE pgWHO-TE/g fw	0.59-4.4	2.01 ^h , 2.51 ⁱ	ML: 7.0 ^l
	Σ 6(PCB indicatori) ng/g fw	1.85-14.10	7.9 ^c , 13.9 ^h , 13.1 ^m	—
	Σ (PBDE) ng/g fw	0.61-2.18	16.7 ^h	—

a) FSA 2006a.

b) Fernandez *et al.*, 2004

c) Regolamento CE 1881, 2006.

d) Raccomandazione CE 88, 2006.

e) COT, 2001

f) Serrano *et al.*, 2003.

g) FSA 2006b.

h) Efsa, 2005

i) Gallani *et al.*, 2004a

l) Direttiva CE 13, 2006.

m) Gallani *et al.*, 2004b

4.2. Risultati dell'analisi di filetto e visceri di pesce

4.2.1 Risultati cumulativi

I risultati cumulativi relativi ai pools di filetto e visceri di pesce campionati in agosto, novembre, febbraio e aprile sono riportati rispettivamente in Tabella 4, Tabella 5, Tabella 6 e Tabella 7.

Tabella 4. Concentrazioni cumulative (upper bound salvo dove diversamente specificato) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in pools di filetto e visceri di *Sparus aurata* provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento^a nel mese di agosto 2006.

Analiti	G	M	G	M
	Filetto	Filetto	Visceri	Visceri
Contenuto in grasso %	8.39	8.27	76.3	81.2
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.92	0.13	1.30	0.91
Σ(PCDF)	0.65	0.40	5.31	3.90
Σ(PCDD+PCDF)	1.57	0.53	6.60	4.81
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.02	0.02	0.15	0.15
Σ(mono-ortho PCB)	1.80	1.45	13.72	12.64
Σ(dl-PCB)	1.82	1.47	13.87	12.79
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	8.38	72.07	8.29	11.55
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.76	0.55	5.70	4.55
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.05	0.03	0.42	0.28
Σ(PCDF)	0.09	0.05	0.79	0.52
Σ(PCDD+PCDF)	0.14	0.08	1.21	0.80
Σ(non-ortho PCB)	0.51	0.47	3.97	3.69
Σ(mono-ortho PCB)	0.23	0.19	1.73	1.62
Σ(dl-PCB)	0.74	0.65	5.70	5.31
Total TEQ	0.89	0.74	6.91	6.11
Total TEQ (Medium Bound)	0.88	0.74	6.88	6.08
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	18.72	6.40	8.65	5.92
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	21.69	17.78	18.18	15.75
Σ ₁₇ (PCB) ^c	99.92	871.43	10.87	14.22
Σ ₈ (PBDE) ^d	9.03	6.62	7.47	5.60
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	1.68	1.02	1.59	0.98
Σ(dl-PCB)	8.88	7.90	7.47	6.54
Total TEQ	10.55	8.92	9.05	7.52
Total TEQ (Medium Bound)	10.54	8.90	9.02	7.49

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

Tabella 5. Concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in pools di filetto e visceri di *Sparus aurata* provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento^d nel mese di novembre 2006.

Analiti	G	M	G	M
	Filetto	Filetto	Visceri	Visceri
Contenuto in grasso %	7.29	8.82	78.20	30.50
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.11	0.12	1.27	1.29
Σ(PCDF)	0.52	0.46	5.83	2.45
Σ(PCDD+PCDF)	0.63	0.58	7.10	3.75
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.02	0.02	0.16	0.05
Σ(mono-ortho PCB)	1.27	1.30	13.95	4.98
Σ(dl-PCB)	1.29	1.32	14.11	5.03
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	7.40	78.00	7.36	29.19
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.60	0.66	6.33	1.97
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ ,			
	fw	fw	fw	fw
Σ(PCDD)	0.04	0.03	0.45	0.16
Σ(PCDF)	0.08	0.06	0.92	0.31
Σ(PCDD+PCDF)	0.12	0.09	1.38	0.47
Σ(non-ortho PCB)	0.44	0.44	4.46	1.44
Σ(mono-ortho PCB)	0.16	0.16	1.80	0.64
Σ(dl-PCB)	0.60	0.61	6.26	2.07
Total TEQ	0.72	0.70	7.63	2.55
Total TEQ (Medium Bound)	0.72	0.70	7.62	2.45
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	8.66	6.57	9.08	12.29
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	17.73	14.97	18.05	16.50
Σ ₁₇ (PCB) ^c	101.57	884.32	9.42	95.71
Σ ₈ (PBDE) ^d	8.17	7.46	8.09	6.45
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ ,			
	lb	lb	lb	lb
Σ(PCDD+PCDF)	1.68	1.07	1.76	1.55
Σ(dl-PCB)	8.24	6.90	8.00	6.80
Total TEQ	9.92	7.97	9.76	8.35
Total TEQ (Medium Bound)	9.91	7.95	9.74	8.05

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

Tabella 6. Concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in pools di filetto e visceri di *Sparus aurata* provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento^a nel mese di febbraio 2007.

Analiti	G Filetto	M Filetto	G Visceri	M Visceri
Contenuto in grasso %	4.72	6.10	83.30	80.00
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.11	0.12	1.01	1.26
Σ(PCDF)	0.42	0.45	6.35	5.36
Σ(PCDD+PCDF)	0.54	0.57	7.36	6.62
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.02	0.02	0.23	0.22
Σ(mono-ortho PCB)	1.26	1.26	16.70	14.39
Σ(dl-PCB)	1.28	1.28	16.92	14.61
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	6.75	85.01	99.28	90.35
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.58	0.54	7.60	5.69
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.04	0.03	0.51	0.40
Σ(PCDF)	0.07	0.06	1.10	0.82
Σ(PCDD+PCDF)	0.10	0.09	1.61	1.22
Σ(non-ortho PCB)	0.45	0.42	5.03	4.58
Σ(mono-ortho PCB)	0.17	0.17	2.19	1.91
Σ(dl-PCB)	0.61	0.59	7.22	6.49
Total TEQ	0.72	0.68	8.83	7.71
Total TEQ (Medium Bound)	0.71	0.68	8.82	7.71
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	11.35	9.34	8.84	8.27
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	27.08	20.92	20.32	18.26
Σ ₁₇ (PCB) ^c	143.11	1393.54	119.19	112.93
Σ ₈ (PBDE) ^d	12.33	8.89	9.12	7.11
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	2.19	1.53	1.93	1.53
Σ(dl-PCB)	13.00	9.66	8.66	8.11
Total TEQ	15.19	11.18	10.59	9.64
Total TEQ (Medium Bound)	15.13	11.14	10.58	9.64

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

Tabella 7. Concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in pools di filetto e visceri di *Sparus aurata* provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento^a nel mese di aprile 2007.

Analiti	G Filetto	M Filetto	G Visceri	M Visceri
Contenuto in grasso %	3.52	4.71	80.60	73.50
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.11	0.16	1.35	1.36
Σ(PCDF)	0.43	0.43	7.16	5.39
Σ(PCDD+PCDF)	0.53	0.60	8.51	6.75
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.01	0.02	0.27	0.24
Σ(mono-ortho PCB)	1.20	1.25	20.28	15.42
Σ(dl-PCB)	1.21	1.27	20.55	15.66
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	7.07	8.46	115.73	101.26
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.60	0.51	8.52	6.35
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.03	0.04	0.68	0.49
Σ(PCDF)	0.06	0.06	1.32	0.80
Σ(PCDD+PCDF)	0.10	0.09	2.00	1.29
Σ(non-ortho PCB)	0.40	0.50	6.16	5.33
Σ(mono-ortho PCB)	0.16	0.17	2.64	2.09
Σ(dl-PCB)	0.56	0.67	8.80	7.41
Total TEQ	0.65	0.76	10.80	8.71
Total TEQ (Medium Bound)	0.65	0.75	10.80	8.70
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	15.16	12.64	10.56	9.19
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	34.51	26.89	25.49	21.31
Σ ₁₇ (PCB) ^c	200.77	179.70	143.58	137.76
Σ ₈ (PBDE) ^d	16.93	10.90	10.57	8.64
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	2.80	1.97	2.48	1.76
Σ(dl-PCB)	15.79	14.14	10.92	10.09
Total TEQ	18.60	16.11	13.40	11.85
Total TEQ (Medium Bound)	18.53	15.99	13.39	11.84

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

I livelli di PCDD+PCDF variano tra 0.53 (Giovinazzo, agosto) e 1.57 (Mattinata, agosto e Giovinazzo, aprile) pg/g fw (6.4 e 18.72 pg/g lb) nei filetti e tra 3.75 (Mattinata, novembre) e 8.51 (Giovinazzo, aprile) pg/g fw (5.92 e 12.29 pg/g lb) nei visceri.

I livelli di dl-PCB variano tra 1.21 (Giovinazzo, aprile) e 1.82 (Giovinazzo, agosto) ng/g fw (14.97 e 34.51 ng/g lb) nei filetti e 5.03 (Mattinata, novembre) e 20.55 (Giovinazzo, aprile) ng/g fw (15.75 e 25.49 ng/g lb) nei visceri.

In termini di equivalenti di tossicità (TEQ) i livelli di PCDD+PCDF variano tra 0.08 (Mattinata, agosto) e 0.14 (Giovinazzo, agosto) pgWHO-TE/g fw (1.02 e 2.80 pgWHO-TE/g lb) per i filetti e tra 0.47 (Mattinata, novembre) e 2.00 (Giovinazzo, aprile) pgWHO-TE/g fw (0.98 e 2.48 pgWHO-TE/g lb) per i visceri. I DL-PCB variano tra 0.56 (Giovinazzo, aprile) e 0.74 (Giovinazzo, agosto) pgWHO-TE/g fw (6.90 e 15.79 pgWHO-TE/g lb) per i filetti e tra 2.07 (Mattinata, novembre) e 8.80 (Giovinazzo, aprile) pgWHO-TE/g fw (6.54 e 10.92 pgWHO-TE/g lb) per i visceri. Il TEQ totale varia tra 0.65 (Giovinazzo, aprile) e 0.89 (Giovinazzo, agosto) pgWHO-TE/g fw (7.97 e 18.60 pgWHO-TE/g lb) per i filetti e tra 2.55 (Mattinata, novembre) e 10.80 (Giovinazzo, aprile) pgWHO-TE/g fw (7.52 e 13.40 pgWHO-TE/g lb) per i visceri. Tali risultati sono in linea con quanto riscontrato in letteratura in campioni analoghi di *Sparus aurata* (FSA, 2006a; Fernandez *et al.*, 2004; COT), mostrando comparativamente livelli di contaminazione contenuti.

Risulta evidente dall'analisi di tali dati che per entrambe le matrici il contributo più rilevante in termini tossicologici TE (circa l'80% del totale) spetta ai DL-PCB come del resto frequentemente riscontrato in letteratura (Fernandez *et al.*, 2004, EFSA, 2005).

I risultati relativi all'analisi dei filetti di pesce risultano inferiori di circa un ordine di grandezza (Tabella 3) non solo rispetto ai tenori massimi definiti dalla legge per il muscolo di pesce (PCDD+PCDF 4.0 pgWHO-TE/g fw, DL-PCB 4.0 pgWHO-TE/g fw, Regolamento CE 1881, 2006), ma anche rispetto ai livelli d'azione (PCDD+PCDF 3.0 pgWHO-TE/g fw, DL-PCB 3.0 pgWHO-TE/g fw, Raccomandazione CE 88, 2006).

I livelli cumulativi di NDL-PCB variano tra 6.75 (Giovinazzo, febbraio) e 85.01 (Mattinata, febbraio) ng/g fw (99.92 e 1393.54 ng/g lb) nel filetto e 7.36 (Giovinazzo, novembre) e 115.73 (Giovinazzo, aprile) ng/g fw (9.42 e 143.58 ng/g lb) nei visceri. I livelli cumulativi dei 6 (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 180) PCB

indicatori (4.48-56.82 ng/g fw) sono in linea con quanto riportato in letteratura (Tabella 3) per la *Sparus aurata* (Serrano *et al.*, 2003) per quanto riguarda i campioni raccolti nell'impianto di Giovinazzo, ma risultano notevolmente più alti nei campioni raccolti nell'impianto di Mattinata. Un tale risultato potrebbe essere dovuto alla vicinanza di una sorgente di contaminazione in quanto tale impianto risulta più vicino alla costa rispetto a quello di Giovinazzo. In particolare la vicinanza del fondale appare il fattore di rischio più probabile poiché nel caso di questo impianto la profondità risulta essere bassa.

I livelli cumulativi di PBDE variano tra 0.51 (Mattinata, aprile) e 0.76 (Giovinazzo, agosto) ng/g fw (6.62 e 16.93 ng/g lb) nel filetto 1.97 (Mattinata, novembre) e 8.52 (Giovinazzo, aprile) ng/g fw (5.6 e 10.57 ng/g lb) nei visceri. Come già visto per PCDD, PCDF e DL-PCB anche i livelli di contaminazione da PBDE dei campioni di pesce analizzati sono piuttosto bassi se comparati con i dati disponibili in letteratura (Tabella 3) sulla *Sparus aurata* (FSA, 2006b).

I risultati relativi all'analisi di filetto di pesce prelevato nei quattro periodi di campionamento sembrano evidenziare per la maggior parte degli analiti in esame una maggiore presenza di contaminanti nei pesci provenienti dall'impianto di acquacoltura situato a maggiore distanza dalla costa (Giovinazzo). In particolare è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa (Mann-Whitney U test, $p = 0.02$) riguardante i livelli cumulativi di PCDD e PCDF in termini di equivalenti di tossicità su base fresca (fra i campioni prelevati nelle due località, livelli più alti a Giovinazzo). L'aumento dei livelli di contaminazione nei pesci prelevati in mare aperto rispetto a quelli prelevati in prossimità della costa sembra comunque piuttosto contenuto e appare più evidente nel mese di agosto mese nel quale la concentrazione di PCDD e PCDF presente nei mangimi somministrati a Giovinazzo (0.14 pgWHO-TE/g fw) è stata superiore di circa il 25 % (0.11 pgWHO-TE/g fw) rispetto a quella dei mangimi somministrati a Mattinata.

Un'eccezione all'andamento mostrato dalla maggior parte delle famiglie di contaminanti è rappresentata, come già evidenziato, dai risultati relativi all'analisi di NDL-PCB che presentano livelli significativamente più alti (Mann-Whitney U test, $p = 0.02$) nei campioni prelevati a Mattinata e che sembra suggerire una potenziale influenza dell'ambiente sulla contaminazione dei pesci.

Tra le due differenti matrici analizzate (filetto e visceri) non sembrano esserci

rilevanti difformità riguardo ai livelli di contaminazione espressi su base grassa nonostante la differenza molto marcata (circa un ordine di grandezza) nel contenuto lipidico. Il test di Mann-Whitney applicato alle concentrazioni cumulative su base fresca di tutte le classi di analiti analizzate nelle due differenti matrici ha fornito risultati che evidenziano una contaminazione molto più alta ($p < 0.001$) nei visceri per quasi tutte le classi di analiti; viceversa lo stesso test applicato agli stessi dati su base grassa ha fornito risultati negativi ($p > 0.05$) poiché l'effetto della notevole differenza nel contenuto lipidico delle due matrici risulta annullata utilizzando i dati su base grassa.

Un'eccezione a questa tendenza è rappresentata dai risultati relativi all'analisi di NDL-PCB per i quali la differenza nei livelli nei visceri rispetto ai filetti non è così marcata come negli altri analiti e il test di Mann-Whitney non solo non fornisce un risultato significativo sui dati su base fresca, ma fornisce un risultato positivo sui dati su base grassa ($p = 0.01$), ovvero su base grassa i livelli di NDL-PCB sono significativamente più alti nel filetto rispetto ai visceri. Ovviamente, questo risultato sembra riflettere la differenza dei livelli di lipidi nei due diversi tessuti. A parità di concentrazione di sostanze chimiche su base fresca ma con un contenuto lipidico differente, la concentrazione riportata per grammo di grasso risulterà maggiore nel tessuto con meno grassi in quanto in quello con un tenore lipidico superiore tale contaminazione risulterà diluita.

I risultati non sembrano evidenziare la presenza di differenze rilevanti nel carico di contaminanti nel pesce e nel contenuto in grasso legate ad andamenti stagionali per nessuna delle due matrici esaminate (Kruskall-Wallis test, $p > 0.05$). In entrambi i siti di campionamento nel periodo della sperimentazione (da agosto 2006 ad aprile 2007) si riscontra una generale diminuzione della percentuale di grasso dovuta all'effetto di diluizione generato dalla crescita in peso e dimensioni dei pesci. In conseguenza di ciò le concentrazioni dei contaminanti nei filetti di pesce espresse su base fresca sembrano mantenersi costanti o diminuire nel corso della sperimentazione; analizzando i risultati su base grassa sui quali influisce meno l'effetto della diluizione si osserva invece un generale incremento delle concentrazioni dei contaminanti nel tempo, conseguenza del prolungarsi dell'esposizione e del conseguente bioaccumulo.

L'andamento delle concentrazioni dei contaminanti nei visceri mostra invece una tendenza ad aumentare nel corso della sperimentazione sia su base fresca che su base grassa

poiché l'alta percentuale di grasso risente meno dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita dei pesci.

4.2.2 Risultati congenere specifici

I risultati congenere specifici dell'analisi di filetto e visceri di pesce raggruppati per famiglia di analiti e mese di campionamento sono riportati nelle Figure 4-19. Nelle figure i congeneri di diossine e furani sono identificati nel modo seguente: D1, 2,3,7,8-T₄CDD; D2, 1,2,3,7,8-P₅CDD; D3, 1,2,3,4,7,8-H₆CDD; D4, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD; D5, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD; D6, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD; D7, O₈CDD; F1, 2,3,7,8-T₄CDF; F2, 1,2,3,7,8-P₅CDF; F3, 2,3,4,7,8-P₅CDF; F4, 1,2,3,4,7,8-H₆CDF; F5, 1,2,3,6,7,8-H₆CDF; F6, 1,2,3,7,8,9-H₆CDF; F7, 2,3,4,6,7,8-H₆CDF; F8, 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF; F9, 1,2,3,4,7,8,9-H₇CDF; F10, O₈CDF.

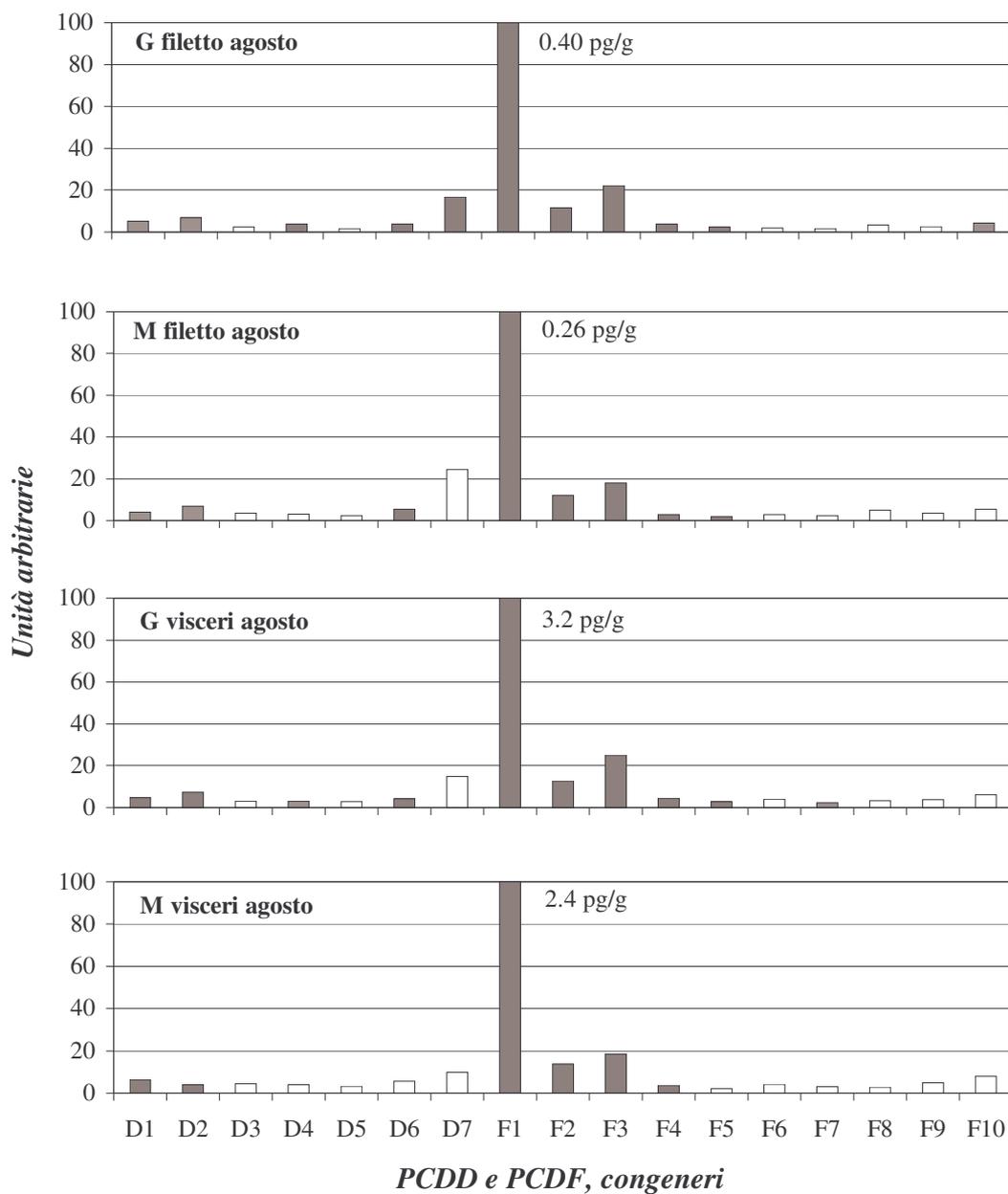


Figura 4. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in pools di visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

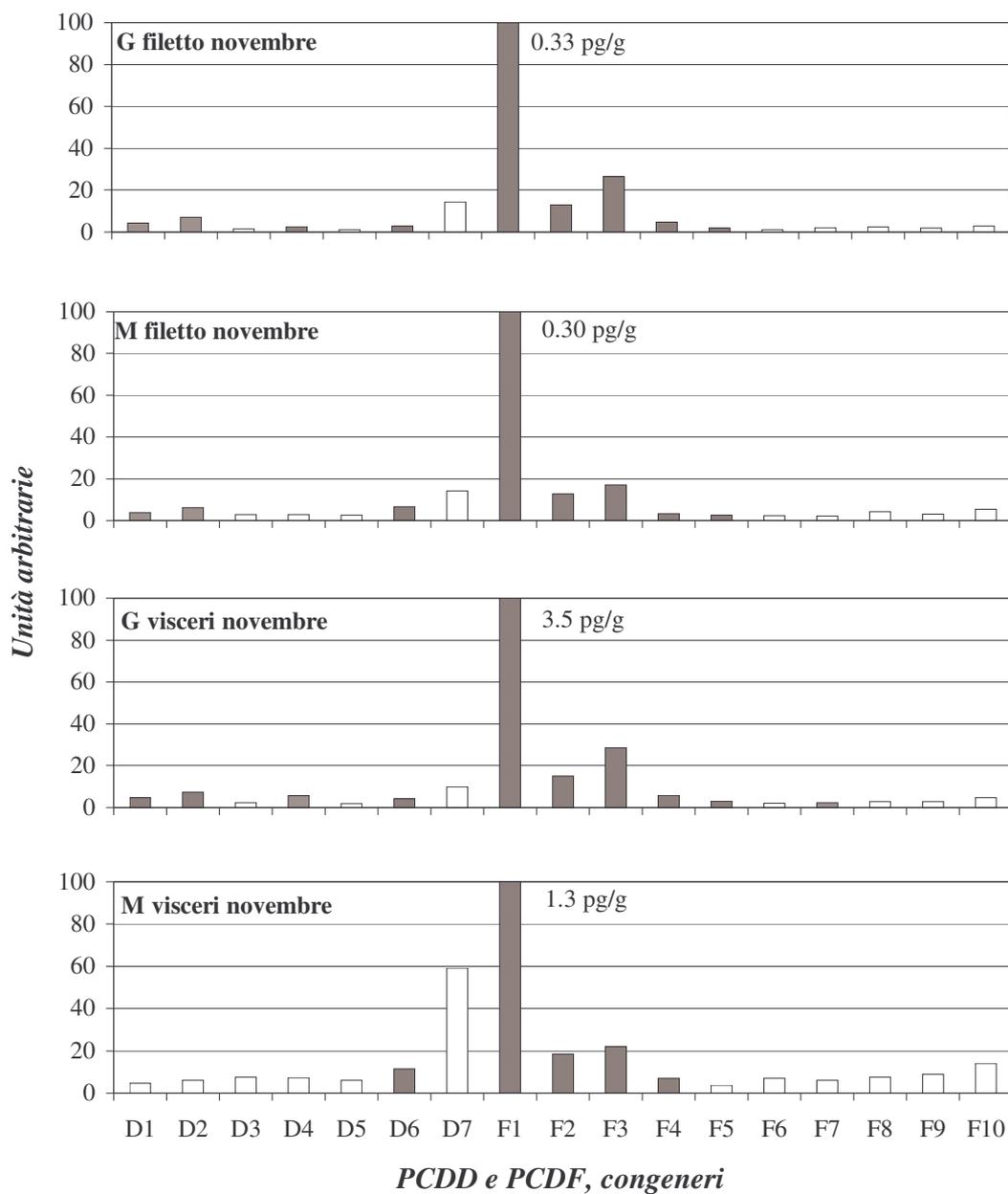


Figura 5. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di novembre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

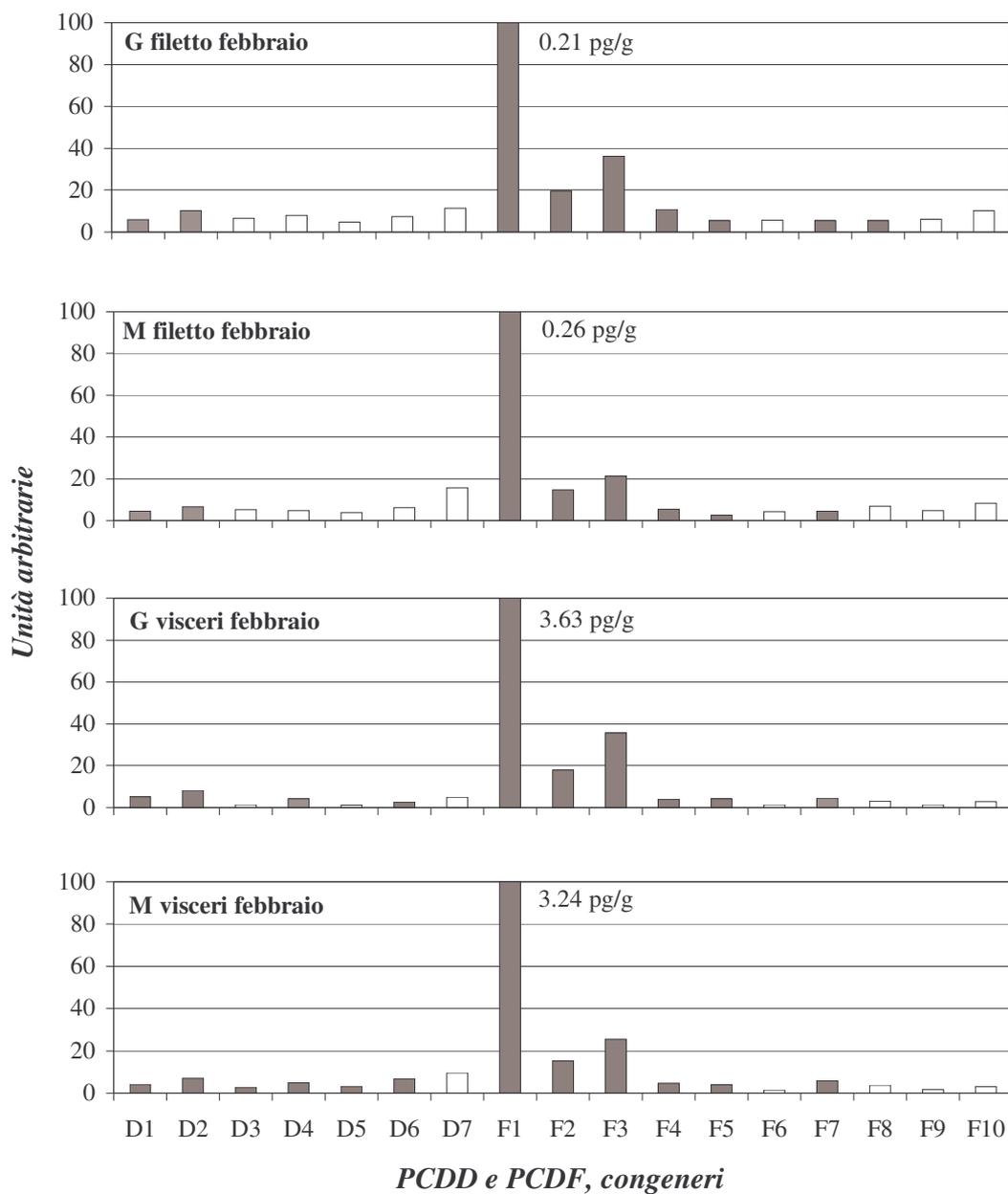


Figura 6. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

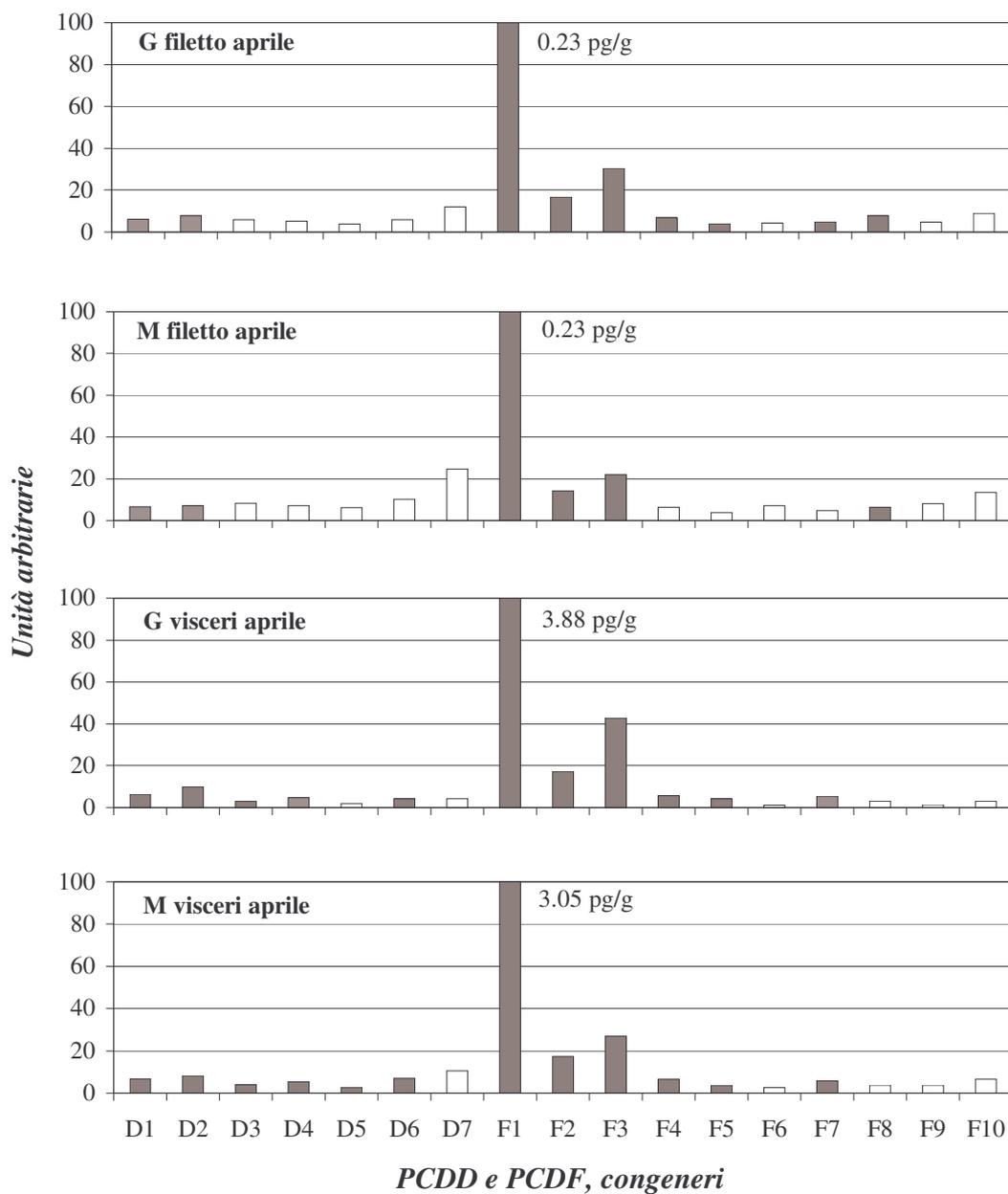


Figura 7. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

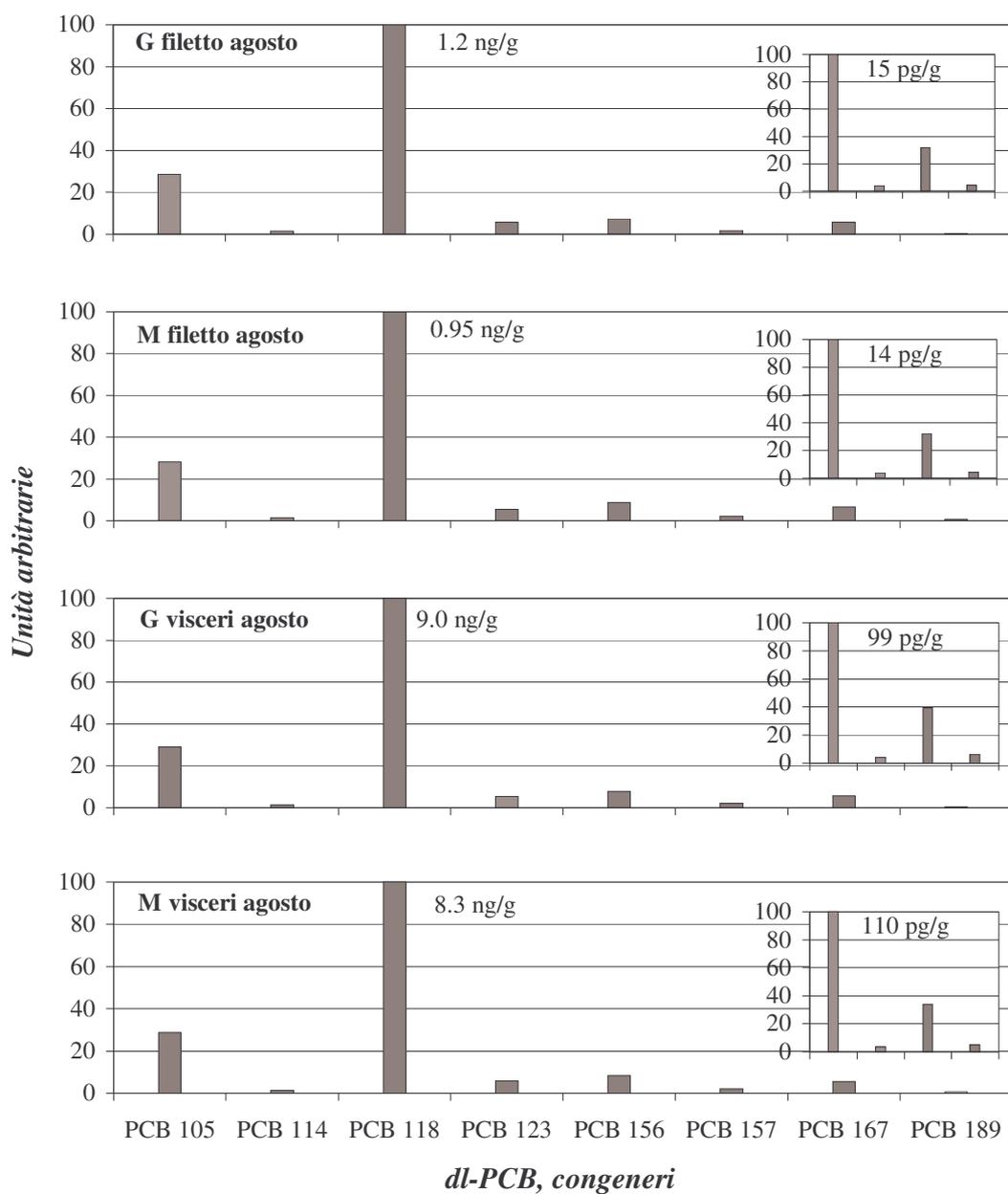


Figura 8. Concentrazioni relative di dl-PCB in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).

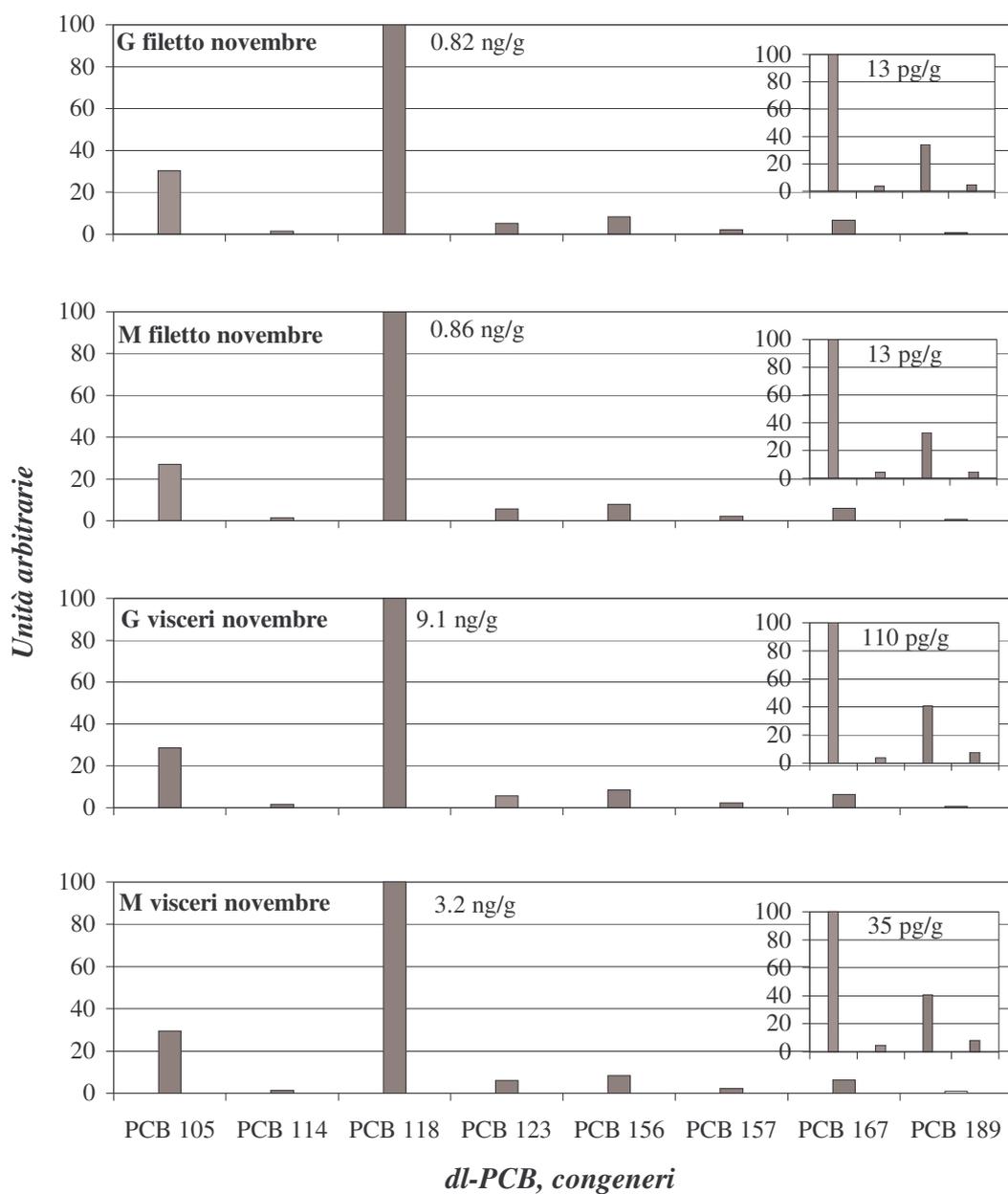


Figura 9. Concentrazioni relative di dl-PCB in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di novembre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).

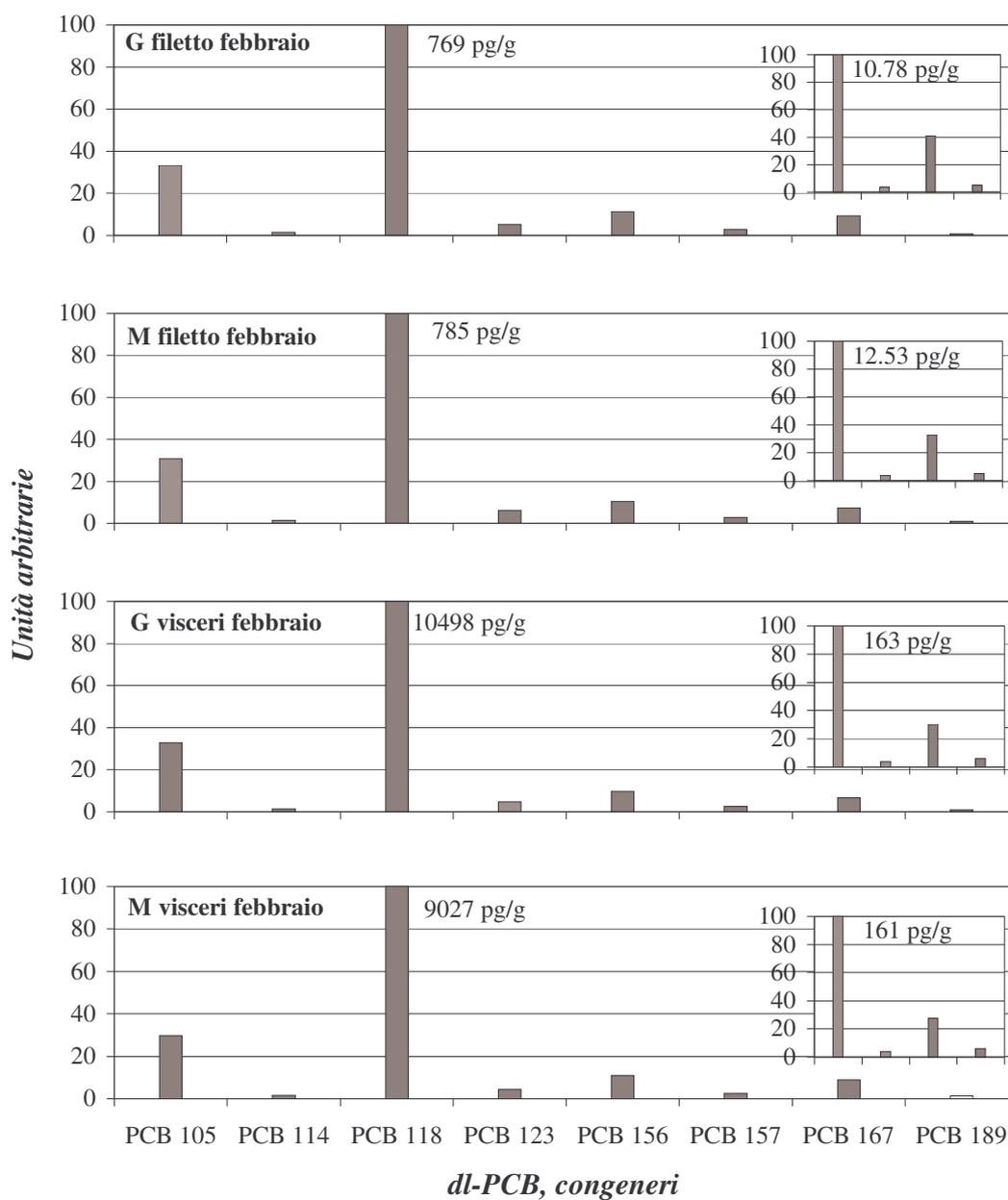


Figura 10. Concentrazioni relative di dl-PCB in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).

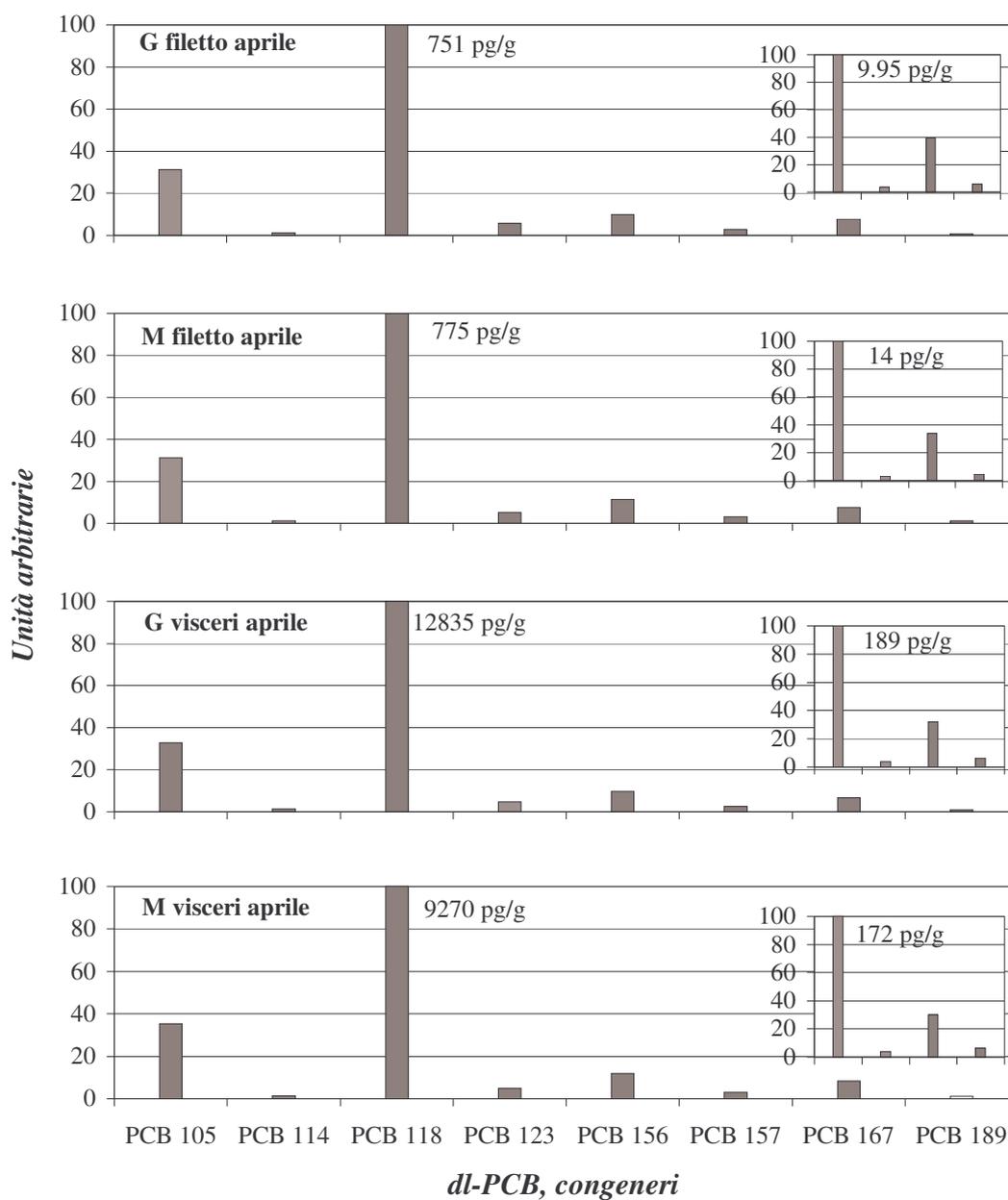
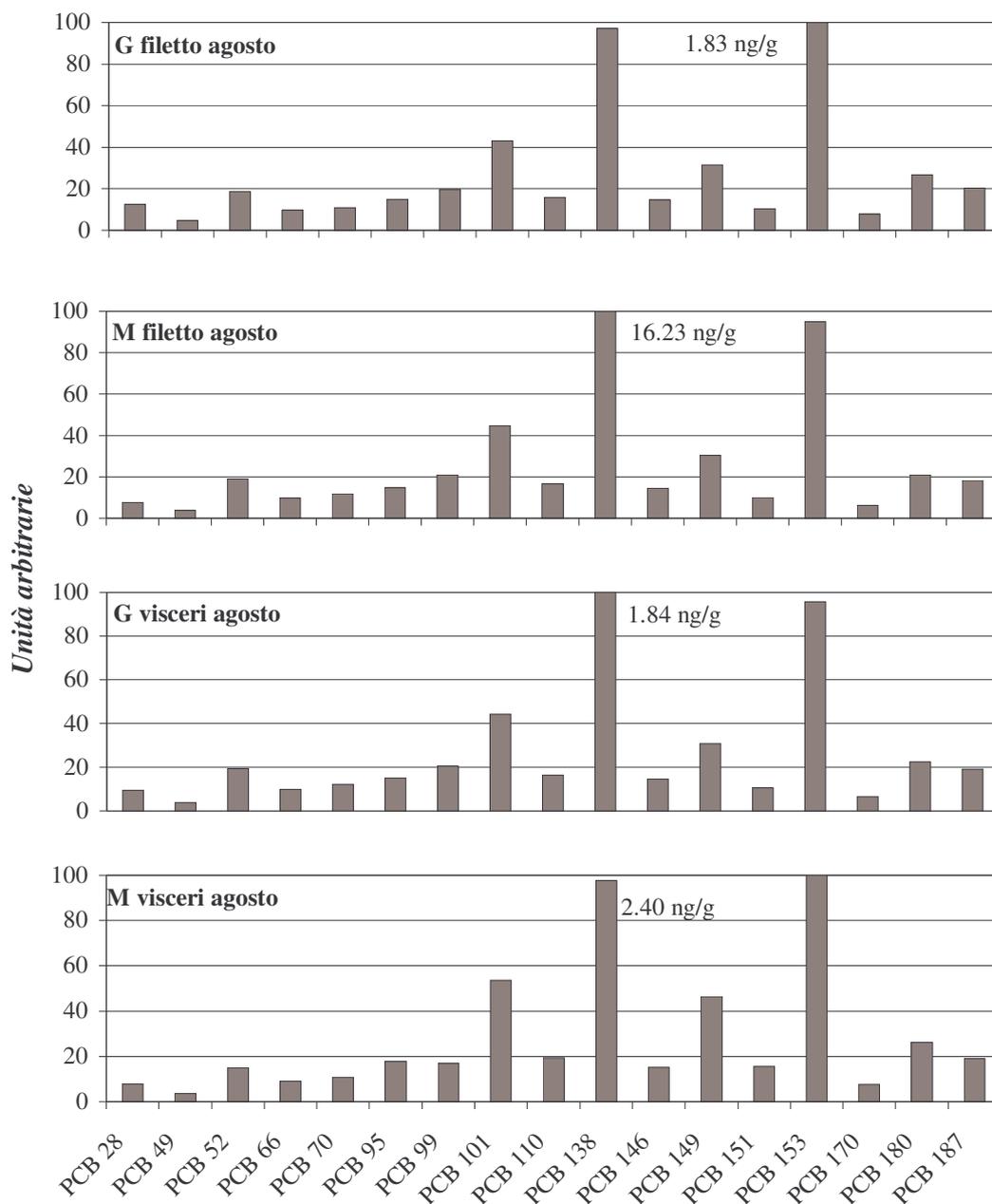
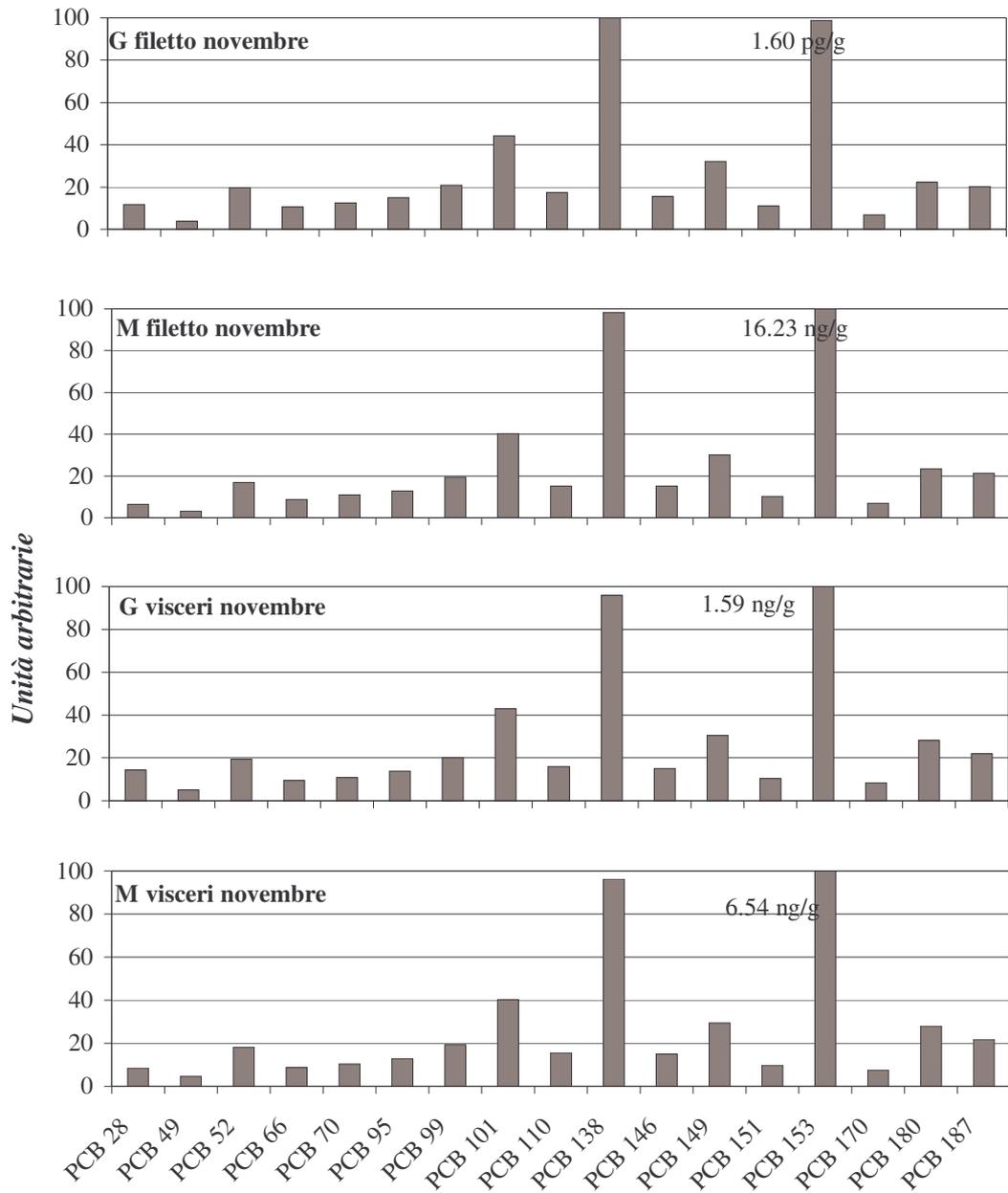


Figura 11. Concentrazioni relative di dl-PCB in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).



NDL-PCB, congeneri

Figura 12. Concentrazioni relative di NDL-PCB in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.



NDL-PCB, congeneri

Figura 13. Concentrazioni relative di NDL-PCB in pools di filetto e viscera di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di novembre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

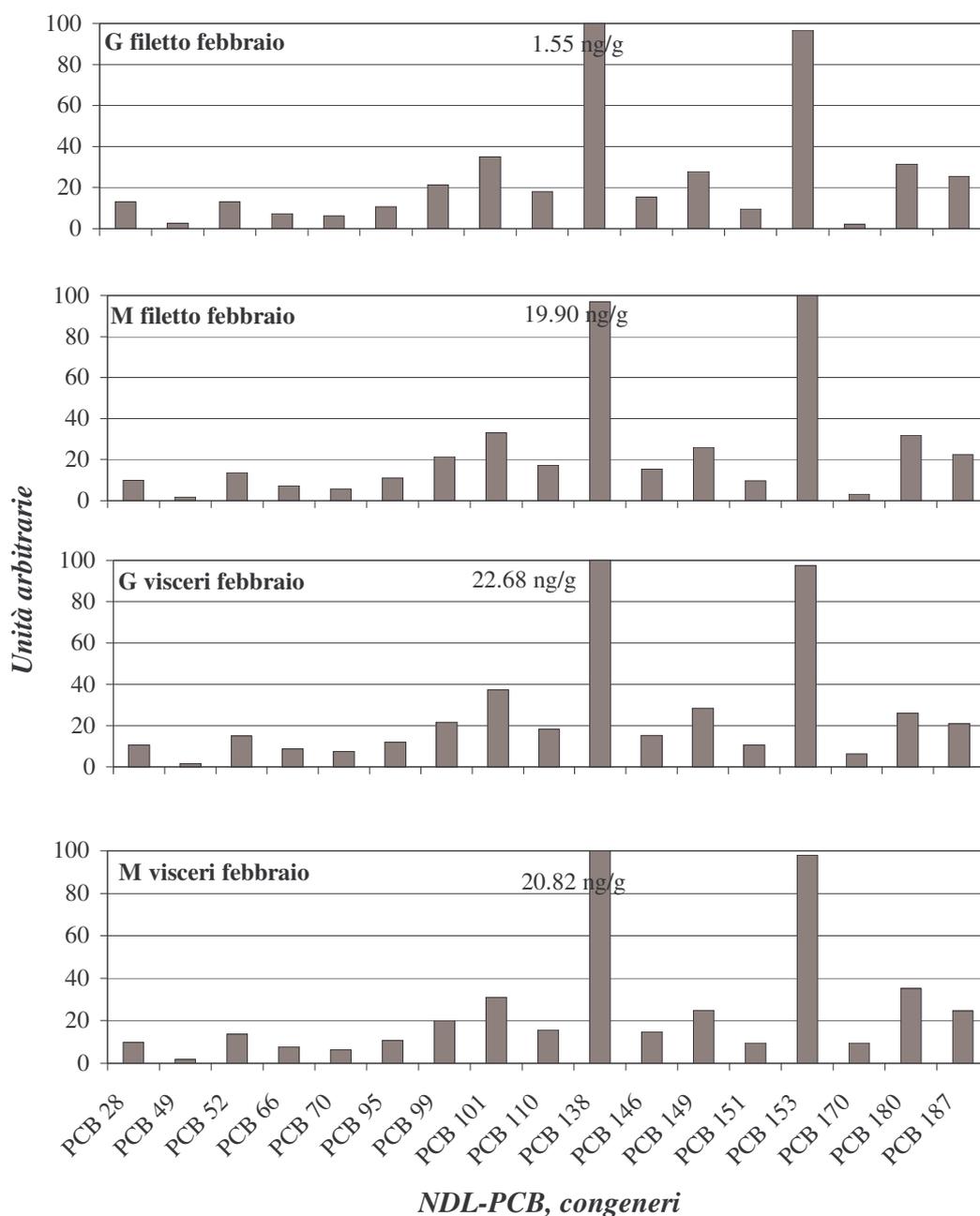
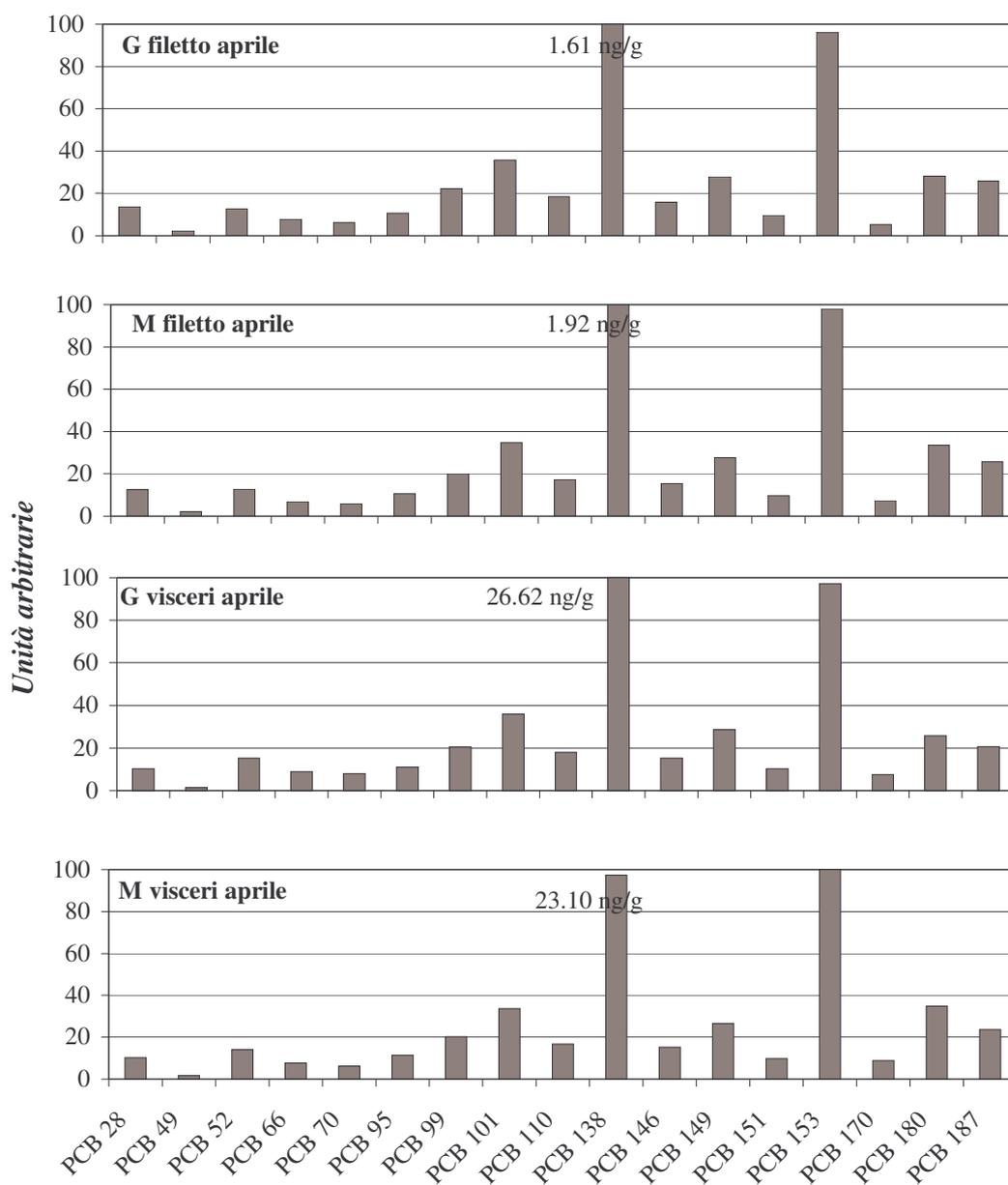


Figura 14. Concentrazioni relative di NDL-PCB in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.



NDL-PCB, congeneri

Figura 15. Concentrazioni relative di NDL-PCB in pools di filetto e viscero di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

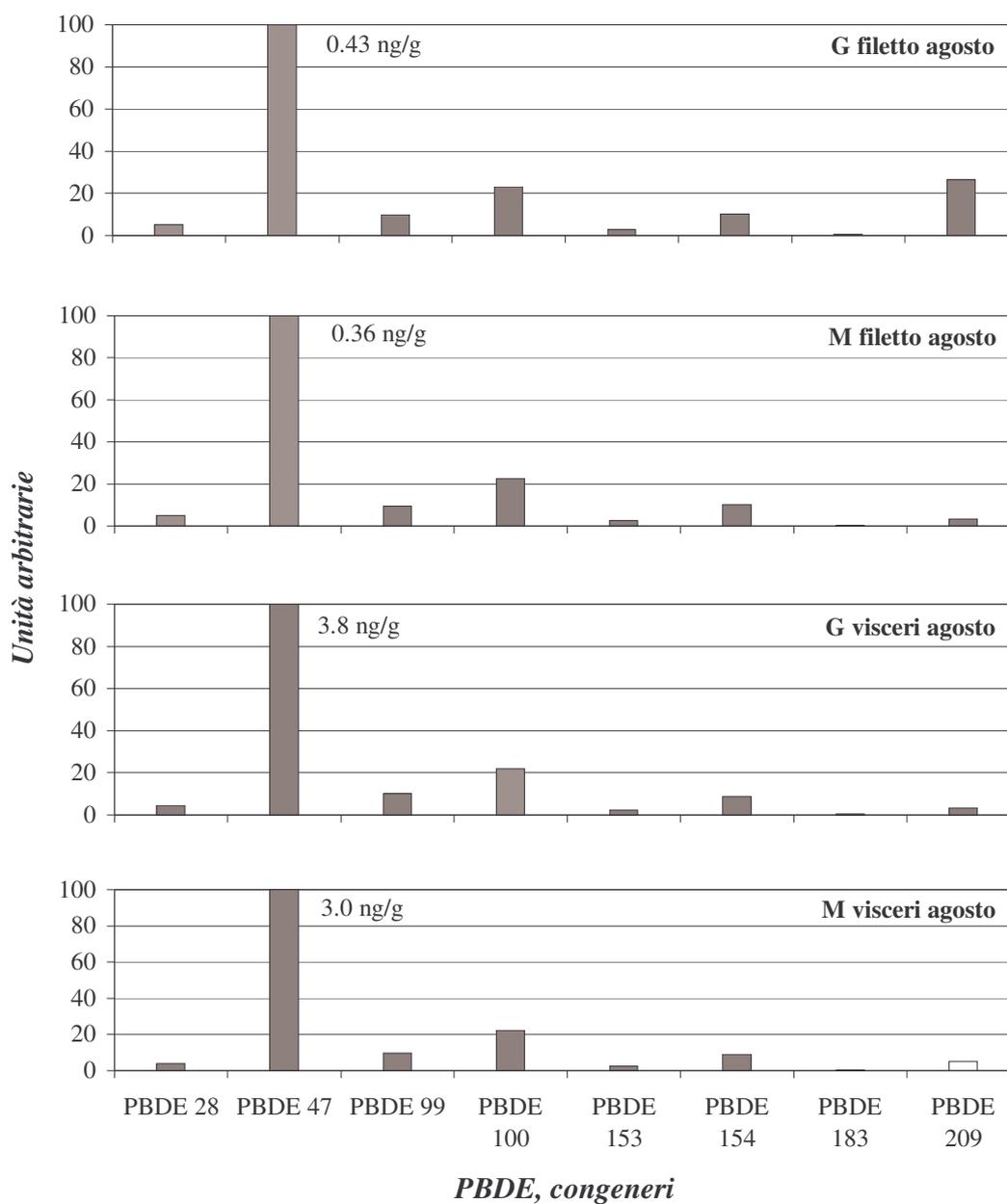


Figura 16. Concentrazioni relative di PBDE in pools di filetto e viscera di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

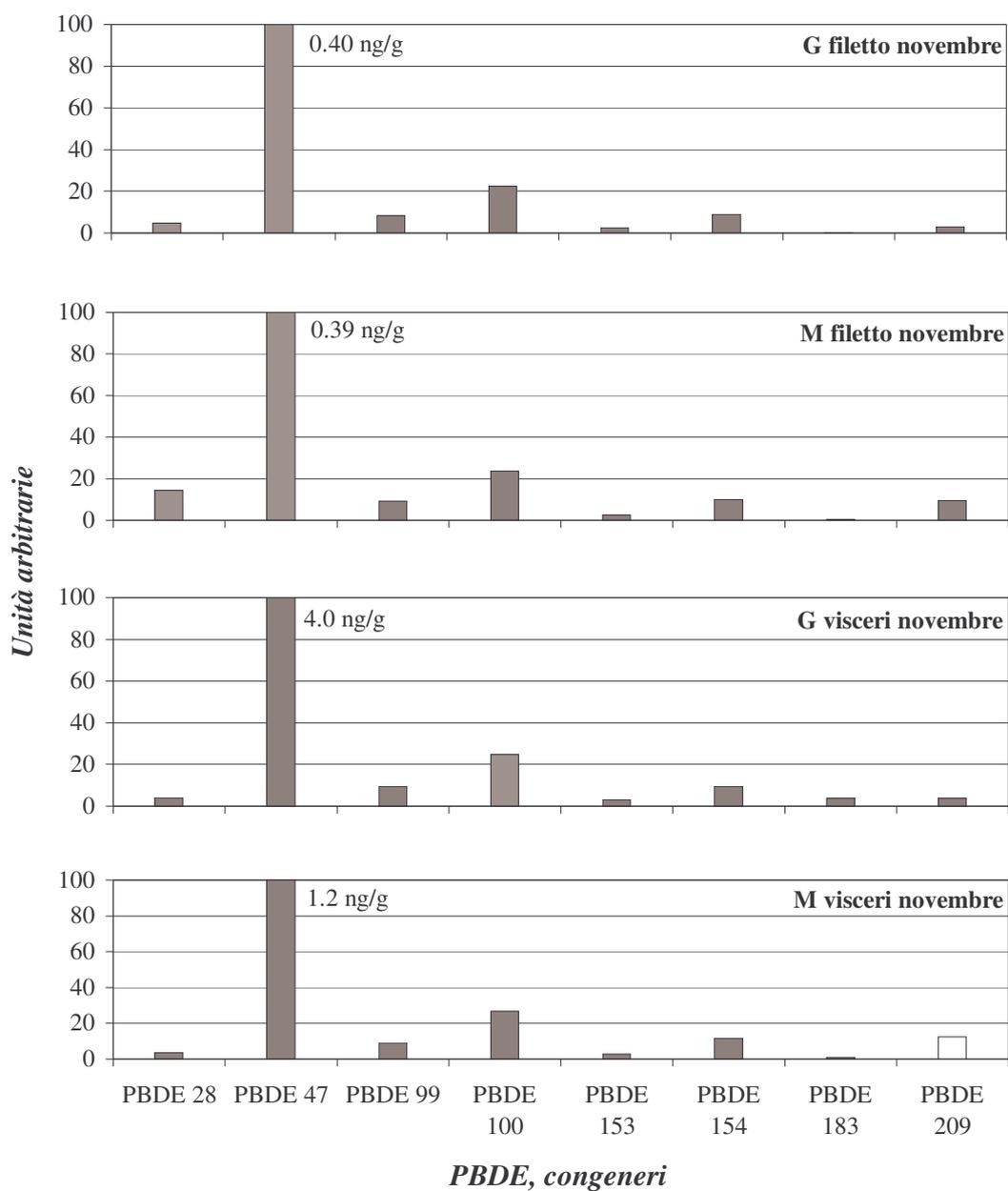


Figura 17. Concentrazioni relative di PBDE in pools di filetto e visceri di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di novembre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

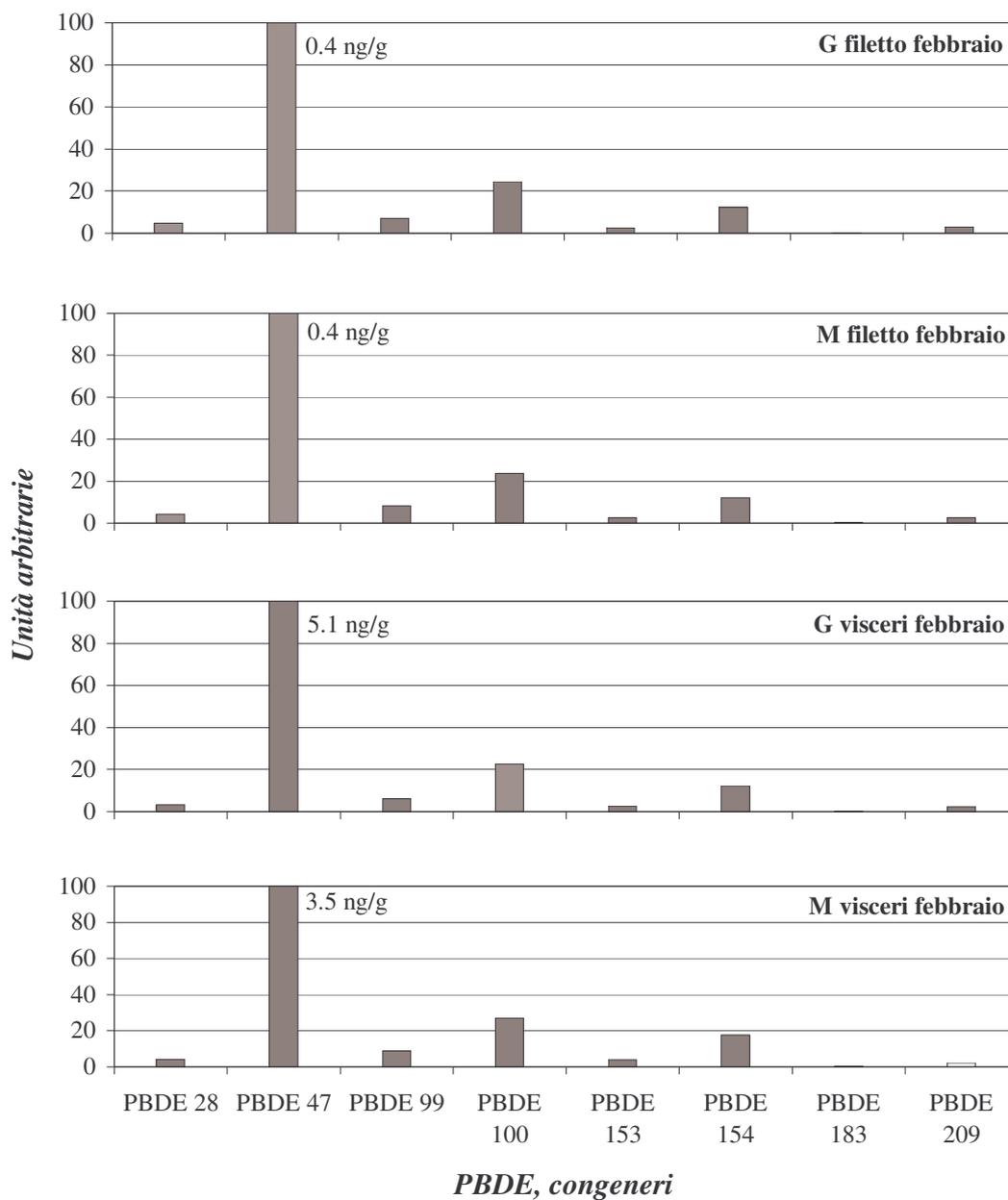


Figura 18. Concentrazioni relative di PBDE in pools di filetto e viscere di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

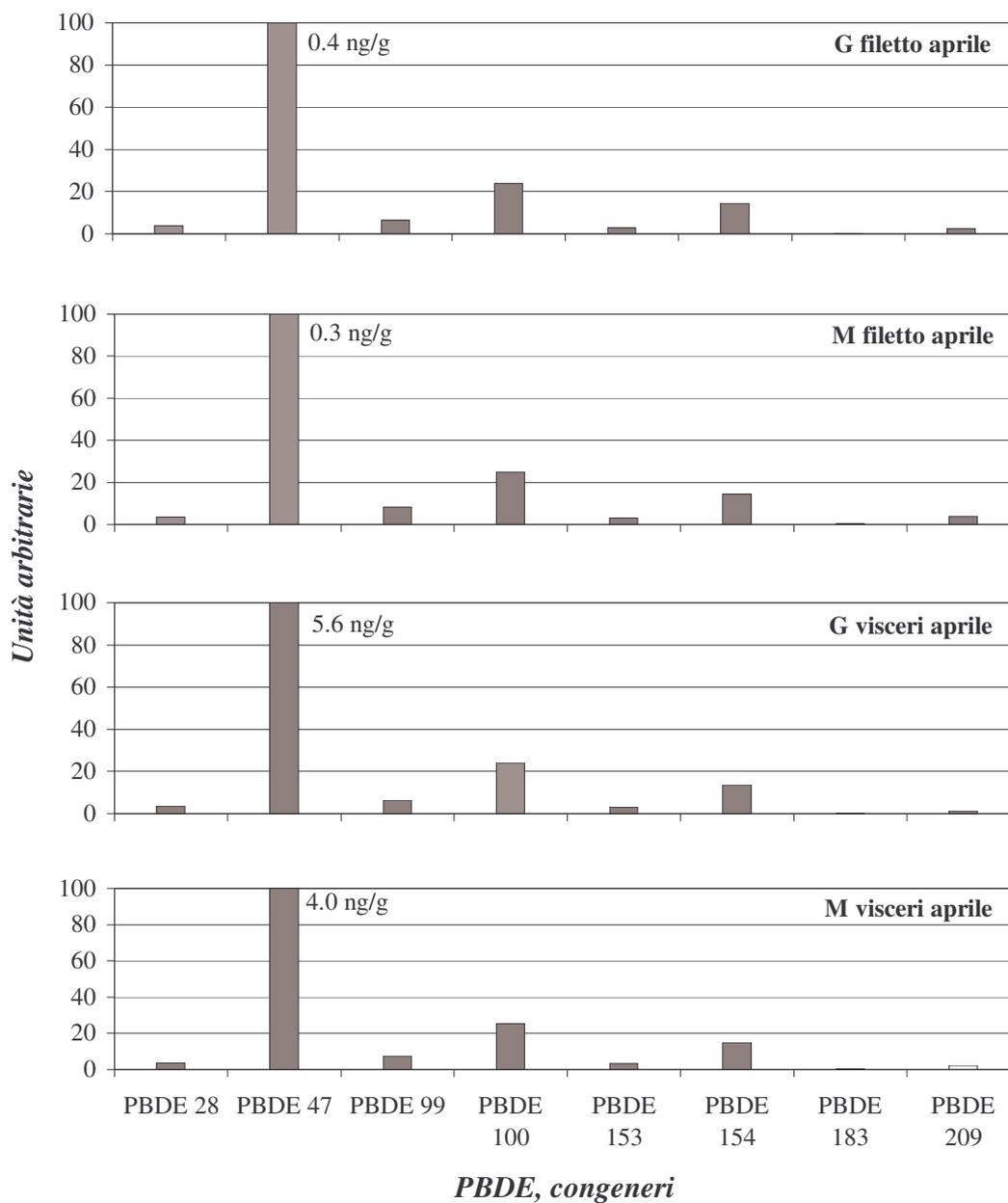


Figura 19. Concentrazioni relative di PBDE in pools di filetto e viscera di pesce (orata) provenienti da esemplari raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) nel mese di aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

Per nessuna delle famiglie di analiti si riscontrano rilevanti differenze nei profili di contaminazione relazionabili con i differenti siti di campionamento, la matrice analizzata (filetto o visceri), o la stagionalità.

I profili congenere specifici relativi a PCDD e PCDF (Figure 4-7) mostrano per tutti i campioni di filetto e visceri di pesce analizzati una prevalenza di PCDF sulle PCDD. Generalmente la prevalenza di PCDF su PCDD è indizio di contaminazione di origine industriale. Nei mangimi questa situazione potrebbe essere una conseguenza della lavorazione e preparazione dei mangimi stessi e delle materie prime da cui sono composti. I congeneri di PCDD e PCDF per i quali sono stati rilevati i valori più alti di contaminazione sono per le PCDD 2,3,7,8-T₄CDD, 1,2,3,7,8-P₅CDD, 1,2,3,6,7,8-H₆CDD, 1,2,3,7,8,9-H₆CDD e 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDD e per i PCDF 2,3,7,8-T₄CDF, 1,2,3,7,8-P₅CDF, 2,3,4,7,8-P₅CDF. Tali profili congenere specifici sono coerenti con quanto riscontrato comunemente in letteratura (Abad *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2007). La presenza fra gli analiti a concentrazione più alta di congeneri a grado di clorurazione intermedio (Cl₄-Cl₇) è un dato in linea con quanto atteso. Questo comportamento è, infatti, correlato alle peculiari caratteristiche di queste molecole che li portano a bioconcentrare con modalità fortemente dipendenti da massa e dimensioni della molecola. La potenzialità di bioaccumulo raggiunge i livelli massimi proprio per i congeneri a grado di clorurazione intermedio che sono caratterizzati dal bilancio ottimale fra grado di lipofilità (che tende ad aumentare la potenzialità di bioaccumulo) e ingombro sterico che per gli alto alogenati è il fattore limitante in fase di assorbimento.

I profili congenere specifici relativi ai DL-PCB (Figure 8-11) mostrano per tutti i campioni di filetto e visceri di pesce analizzati una netta prevalenza (differenza di circa un ordine di grandezza) di *mono-ortho* PCB sui *non-ortho* PCB. I congeneri di DL-PCB per i quali sono stati rilevati i valori più alti di contaminazione sono per i *mono-ortho* PCB i PCB 118 e PCB 105, per i *non-ortho* PCB i PCB 77 e PCB 126.

4.3 Risultati dell'analisi di mangimi per acquacoltura

4.3.1 Risultati cumulativi

I risultati cumulativi relativi ai campioni di mangimi per acquacoltura campionati nei periodi maggio-agosto, settembre-febbraio e dicembre-aprile sono riportati rispettivamente in Tabella 8, Tabella 9, e Tabella 10.

Tabella 8. Concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento da maggio ad agosto 2006.

Analiti	1G	2G	1M	2M
Contenuto in grasso %	15.76	17.91	18.78	19.14
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.44	0.50	0.65	0.58
Σ(PCDF)	1.07	1.44	1.48	0.82
Σ(PCDD+PCDF)	1.51	1.94	2.13	1.39
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.03	0.03	0.05	0.02
Σ(mono-ortho PCB)	1.12	1.32	3.25	0.90
Σ(dl-PCB)	1.16	1.35	3.30	0.92
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	7.82	11.35	29.65	8.05
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.78	1.11	2.18	0.85
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.05	0.07	0.16	0.06
Σ(PCDF)	0.11	0.25	0.21	0.11
Σ(PCDD+PCDF)	0.16	0.32	0.37	0.17
Σ(non-ortho PCB)	0.71	0.66	1.34	0.49
Σ(mono-ortho PCB)	0.14	0.19	0.45	0.12
Σ(dl-PCB)	0.85	0.85	1.80	0.61
Total TEQ	1.01	1.17	2.17	0.78
Total TEQ (Medium Bound)	0.97	1.13	2.07	0.74
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	9.56	10.83	11.34	7.28
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	7.34	7.55	17.58	4.81
Σ ₁₇ (PCB) ^c	49.62	72.03	188.11	51.11
Σ ₈ (PBDE) ^d	4.97	7.06	13.86	5.42
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	1.00	1.81	1.97	0.91
Σ(dl-PCB)	5.40	4.72	9.57	3.18
Total TEQ	6.40	6.53	11.55	4.09
Total TEQ (Medium Bound)	6.17	6.31	11.03	3.89

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

Tabella 9. Concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento da settembre 2006 a febbraio 2007.

Analiti	3G	4G	3M	4aM
Contenuto in grasso %	19.63	19.54	24.12	19.44
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.60	0.60	1.68	0.85
Σ(PCDF)	0.95	1.05	1.91	3.57
Σ(PCDD+PCDF)	1.55	1.65	3.58	4.42
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.02	0.02	0.04	0.02
Σ(mono-ortho PCB)	0.92	0.83	2.48	1.15
Σ(dl-PCB)	0.94	0.85	2.52	1.17
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	8.18	6.69	25.59	9.21
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.77	0.86	2.17	1.11
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ ,			
	fw	fw	fw	fw
Σ(PCDD)	0.08	0.09	0.13	0.16
Σ(PCDF)	0.13	0.18	0.27	0.50
Σ(PCDD+PCDF)	0.20	0.27	0.40	0.66
Σ(non-ortho PCB)	0.46	0.58	1.38	0.55
Σ(mono-ortho PCB)	0.13	0.11	0.36	0.16
Σ(dl-PCB)	0.59	0.68	1.73	0.71
Total TEQ	0.79	0.95	2.13	1.36
Total TEQ (Medium Bound)	0.74	0.91	2.13	1.28
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	7.89	8.43	14.86	22.71
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	4.77	4.37	10.45	6.01
Σ ₁₇ (PCB) ^c	51.90	42.42	162.40	58.46
Σ ₈ (PBDE) ^d	4.89	5.43	13.80	7.02
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ , pgWHO-TE g ⁻¹ ,			
	lb	lb	lb	lb
Σ(PCDD+PCDF)	1.04	1.38	1.65	3.37
Σ(dl-PCB)	2.99	3.48	7.19	3.64
Total TEQ	4.03	4.86	8.84	7.01
Total TEQ (Medium Bound)	3.79	4.64	8.82	6.58

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

Tabella 10. Concentrazioni cumulative (upper bound) di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento da dicembre 2006 ad aprile 2007.

Analiti	5G	5M	4bM	6M
Contenuto in grasso %	20.86	18.86	21.05	20.78
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.86	0.35	1.08	0.54
Σ(PCDF)	0.79	0.55	0.80	0.66
Σ(PCDD+PCDF)	1.65	0.90	1.88	1.21
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.17	0.02	0.17	0.10
Σ(mono-ortho PCB)	1.45	0.49	1.53	0.91
Σ(dl-PCB)	1.62	0.51	1.70	1.01
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	13.03	4.06	13.69	7.48
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.79	0.61	0.85	0.94
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.16	0.06	0.13	0.06
Σ(PCDF)	0.08	0.05	0.08	0.12
Σ(PCDD+PCDF)	0.24	0.11	0.21	0.17
Σ(non-ortho PCB)	3.50	0.41	3.98	2.56
Σ(mono-ortho PCB)	0.21	0.07	0.21	0.12
Σ(dl-PCB)	3.71	0.48	4.19	2.68
Total TEQ	3.95	0.59	4.40	2.85
Total TEQ (Medium Bound)	3.85	0.54	4.32	2.83
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	7.90	4.75	8.93	5.81
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	7.74	2.71	8.06	4.87
Σ ₁₇ (PCB) ^c	82.68	25.75	86.88	47.48
Σ ₈ (PBDE) ^d	4.99	3.89	5.37	5.95
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	1.17	0.58	0.99	0.83
Σ(dl-PCB)	17.77	2.53	19.92	12.90
Total TEQ	18.94	3.11	20.91	13.73
Total TEQ (Medium Bound)	18.44	2.89	20.51	13.64

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

I livelli di PCDD+PCDF variano tra 0.90 e 4.42 pg/g fw (4.75 e 22.71 pg/g lb), i DL-PCB tra 0.51 e 3.30 pg/g fw (2.71 e 17.58 pg/g lb).

In termini di equivalenti di tossicità (TEQ) i livelli di PCDD+PCDF variano tra 0.11 e 0.66 pgWHO-TE/g fw (0.58 e 3.37 pgWHO-TE/g lb), i DL-PCB tra 0.48 e 4.19 pgWHO-TE/g fw (2.53 e 19.92 pgWHO-TE/g lb) e il TEQ totale varia tra 0.59 e 4.40 pgWHO-TE/g fw (3.11 e 20.91 pgWHO-TE/g lb). I livelli riscontrati in questo studio sono coerenti con dati analoghi disponibili in letteratura per entrambe le classi di analiti determinate (PCDD+PCDF e DL-PCB) (Gallani *et al.*, 2004; EFSA, 2005).

Anche per i mangimi così come riscontrato per i pesci risulta evidente che il contributo più rilevante in termini tossicologici TE (circa il 75% del totale) spetta ai DL-PCB, fenomeno già osservato in letteratura (Gallani *et al.*, 2004).

I risultati relativi all'analisi dei mangimi risultano notevolmente inferiori ai livelli massimi permessi dalla Commissione Europea (PCDD+PCDF 2.25 ngWHO-TEQ/kg fw, somma di PCDD+PCDF e DL-PCB 7.0 ngWHO-TEQ/kg fw) e ai livelli di azione relativi a mangimi per pesci definiti dalla legge (PCDD+PCDF 1.75 ngWHO-TEQ/kg fw, DL-PCB 3.5 ngWHO-TEQ/kg fw, Direttiva 13 CE, 2006).

I livelli cumulativi di NDL-PCB variano tra 4.06 e 29.65 ng/g fw (25.75 e 188.11 ng/g lb). I livelli dei 6 PCB indicatori (1.85-14.10 ng/g fw) sono coerenti con quanto riscontrato comunemente in letteratura per mangimi destinati all'uso in acquacoltura in Europa (Serrano *et al.*, 2003; Gallani *et al.*, 2004; EFSA, 2005).

I livelli cumulativi di PBDE variano tra 0.61 e 2.18 ng/g fw (3.89 e 18.86 ng/g lb) e sono inferiori a quanto riportato dall'EFSA per mangimi per acquacoltura in Europa (EFSA, 2005).

I risultati dell'analisi dei mangimi di stesso tipo e marca raccolti in impianti e/o mesi differenti sono risultati talora discordanti. In particolare i mangimi identificati con 1G e 2G hanno concentrazioni simili di PCDD e PCDF, ma concentrazioni differenti di PCB (DL e NDL) e PBDE, in particolare queste tre classi di analiti hanno livelli più alti nel mangime 1M. I mangimi 4G e 5M pure mostrano livelli di contaminazione differenti, con valori più alti nel 4G. Fra i tre campioni 4aM, 4bM e 5G il 4bM e il 5G hanno concentrazioni simili fra di loro ma diverse da quelle del 4aM che ha concentrazioni di

PCDD e PCDF più alte e concentrazioni di PCB più basse. I campioni 2M e 3G infine mostrano risultati del tutto coerenti. Dall'analisi di questi dati si evince che fra *batch* differenti degli stessi mangimi possono esserci differenze anche rilevanti nei livelli di concentrazione di alcuni contaminanti. Tale fattore è imputabile verosimilmente al rinnovo dei lotti comprensivo della variazione di contaminazione indotta dalla variazione dei livelli nelle materie prime. In conseguenza di ciò appare necessario porre l'attenzione sul campionamento dei mangimi per la verifica dei livelli che devono essere calibrati sul rinnovo delle materie prime, da un punto di vista di management, dall'individuazione di sorgenti di materie prime di elevata qualità.

Tra i mangimi analizzati non sembra possibile evidenziare una differenza statisticamente significativa (Mann-Whitney U test $p > 0.05$) in termini di contaminazione dagli analiti oggetto di analisi in questo studio fra i due differenti siti di allevamento (Mattinata e Giovinazzo).

4.3.2 Elaborazioni statistiche sulle stime delle concentrazioni di contaminanti somministrate con i mangimi nei trimestri precedenti ai campionamenti di pesce

I dati cumulativi relativi alle stime delle concentrazioni trimestrali di contaminanti somministrate ai pesci con i mangimi sono stati riportati in Tabella 11 e Tabella 12.

Tabella 11. Concentrazioni cumulative (upper bound) stimate di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in mangimi per acquacoltura somministrati in due differenti siti di allevamento nei trimestri maggio-luglio 2006 e agosto-ottobre 2006.

Analiti	Tot in mangimi G mag-lug	Tot in mangimi M mag-lug	Tot in mangimi G ago-ott	Tot in mangimi M ago-ott
Contenuto in grasso %				
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.23	0.32	0.26	0.77
Σ(PCDF)	0.64	0.49	0.47	0.89
Σ(PCDD+PCDF)	0.86	0.80	0.74	1.65
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.01	0.01	0.01	0.02
Σ(mono-ortho PCB)	0.59	0.65	0.42	1.14
Σ(dl-PCB)	0.61	0.66	0.43	1.16
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	4.99	5.84	3.61	11.54
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.49	0.55	0.38	1.00
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.03	0.04	0.04	0.06
Σ(PCDF)	0.11	0.07	0.07	0.13
Σ(PCDD+PCDF)	0.14	0.11	0.11	0.19
Σ(non-ortho PCB)	0.31	0.32	0.24	0.63
Σ(mono-ortho PCB)	0.08	0.09	0.06	0.16
Σ(dl-PCB)	0.39	0.41	0.30	0.79
Total TEQ	0.53	0.52	0.41	0.98
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	4.68	4.36	3.47	7.78
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	3.29	3.59	2.03	5.44
Σ ₁₇ (PCB) ^c	27.09	31.67	16.96	54.32
Σ ₈ (PBDE) ^d	2.65	2.99	1.80	4.72
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	0.74	0.57	0.52	0.88
Σ(dl-PCB)	2.11	2.23	1.40	3.72
Total TEQ	2.86	2.81	1.91	4.60

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

Tabella 12. Concentrazioni cumulative (upper bound) stimate di PCDD, PCDF, dioxin-like PCB, non-dioxin-like PCB e PBDE in mangimi per acquacoltura somministrati in due differenti siti di allevamento nei trimestri novembre 2006-gennaio 2007 e febbraio-aprile 2007.

Analiti	Tot in mangimi	Tot in mangimi	Tot in mangimi	Tot in mangimi
	G nov-gen	M nov-gen	G feb-apr	M feb-apr
Contenuto in grasso %				
Dati cumulativi su base fresca				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , fw ^b	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw	pg g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.29	0.39	0.36	0.45
Σ(PCDF)	0.51	0.85	0.46	0.38
Σ(PCDD+PCDF)	0.80	1.24	0.82	0.83
<i>Dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ(non-ortho PCB)	0.01	0.03	0.05	0.07
Σ(mono-ortho PCB)	0.40	0.54	0.57	0.67
Σ(dl-PCB)	0.41	0.57	0.62	0.74
<i>Non-dioxin-like PCB</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₁₇ (PCB) ^c	3.25	4.55	4.92	5.84
<i>PBDE</i>	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw	ng g ⁻¹ , fw
Σ ₈ (PBDE) ^d	0.42	0.44	0.41	0.44
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw	pgWHO-TE g ⁻¹ , fw
Σ(PCDD)	0.04	0.06	0.06	0.05
Σ(PCDF)	0.09	0.11	0.06	0.05
Σ(PCDD+PCDF)	0.13	0.17	0.13	0.10
Σ(non-ortho PCB)	0.28	0.81	1.03	1.76
Σ(mono-ortho PCB)	0.05	0.07	0.08	0.09
Σ(dl-PCB)	0.33	0.89	1.10	1.85
Total TEQ	0.46	1.06	1.23	1.95
Dati cumulativi su base lipidica				
<i>PCDD e PCDF</i>	pg g ⁻¹ , lb ^f	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb	pg g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	4.08	6.30	3.97	4.05
<i>DL-PCB, NDL-PCB e PBDE</i>	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb	ng g ⁻¹ , lb
Σ(dl-PCB)	2.10	2.91	2.99	3.59
Σ ₁₇ (PCB) ^c	16.55	23.16	23.89	28.36
Σ ₈ (PBDE) ^d	2.13	2.24	1.99	2.16
<i>WHO-TEQ^e</i>	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb	pgWHO-TE g ⁻¹ , lb
Σ(PCDD+PCDF)	0.67	0.86	0.61	0.48
Σ(dl-PCB)	1.68	4.53	5.36	9.00
Total TEQ	2.35	5.38	5.97	9.48

(a) Giovinazzo (G), Mattinata (M).

(b) fw = fresh weight, concentrazioni riferite al peso fresco.

(c) Σ₁₇(PCB)= Σ(PCB 28, 49, 52, 66, 70, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 180, 187)

(d) Σ₈(PBDE)= Σ(PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

(e) 1998 WHO-TEQs humans-mammals (Van den Berg *et al.*, 1998).

(f) lb = lipid base, concentrazioni su base grassa.

I valori di concentrazione di contaminanti nei mangimi stimati su base trimestrale non presentano differenze statisticamente significative (Mann-Whitney U test, $p > 0.05$) nei due siti di allevamento oggetto dello studio per nessuna delle famiglie di analiti considerate.

Il test di Kruskal-Wallis applicato alla stessa serie di dati allo scopo di evidenziare eventuali differenze nel carico di contaminanti somministrato con i mangimi nei quattro trimestri precedenti il campionamento dei pesci non ha evidenziato differenze significative ($p > 0.05$).

4.3.3 Risultati congenere specifici

I risultati congenere specifici raggruppati per famiglia di analiti relativi alle stime delle concentrazioni trimestrali di contaminanti somministrate ai pesci con i mangimi per acquacoltura sono riportati nelle Figure 20-31.

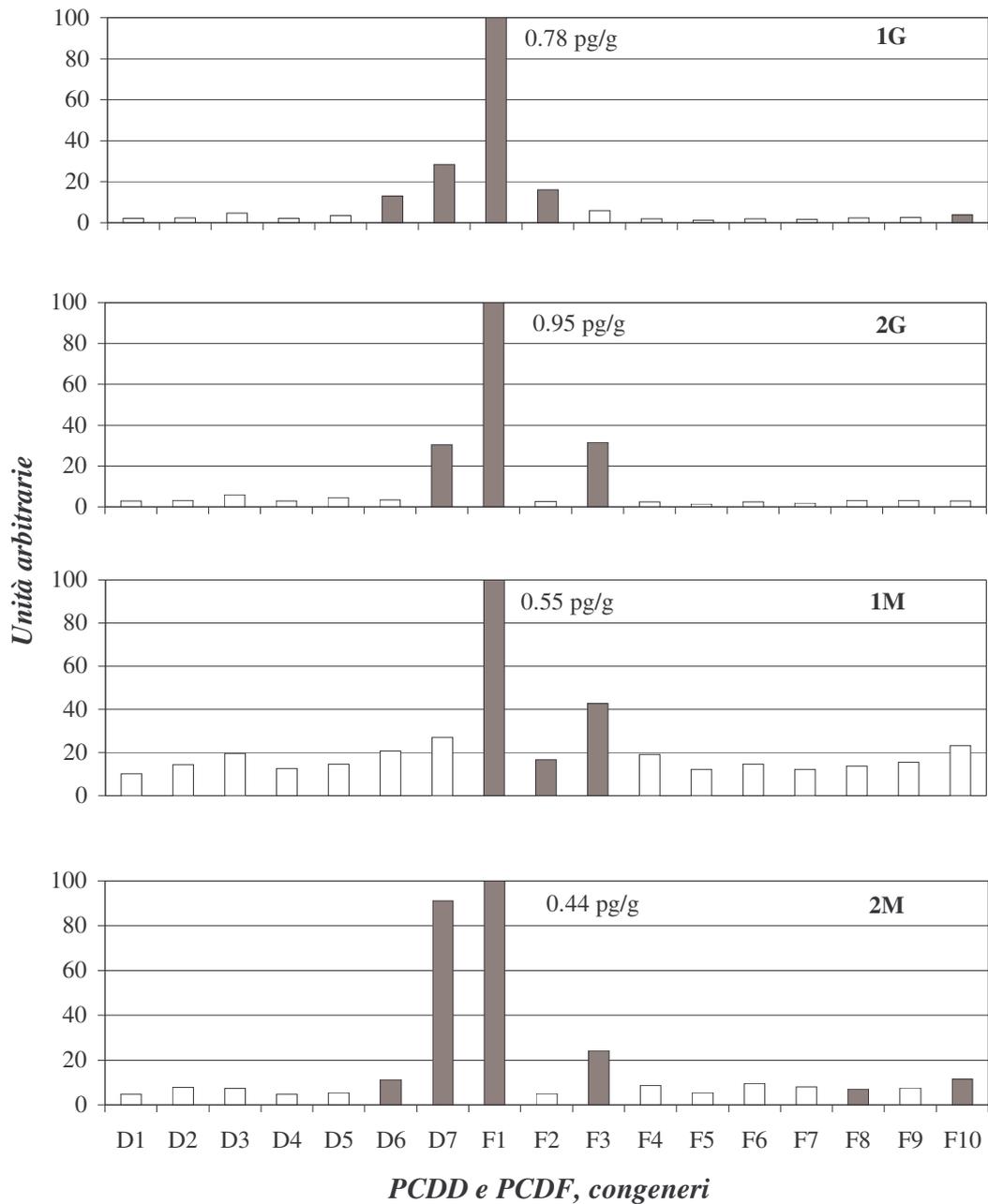


Figura 20. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio ad agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

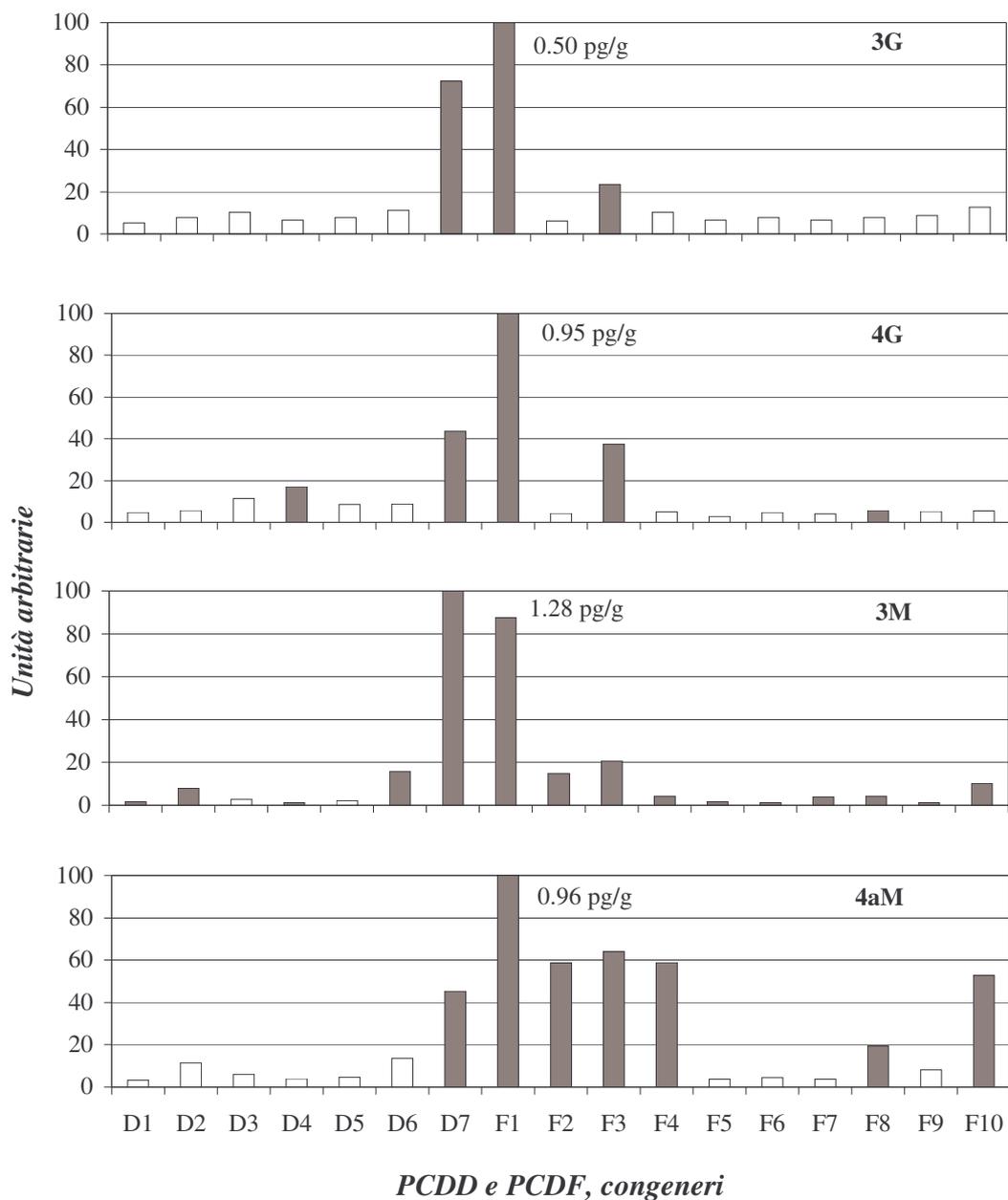


Figura 21. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da settembre 2006 a febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

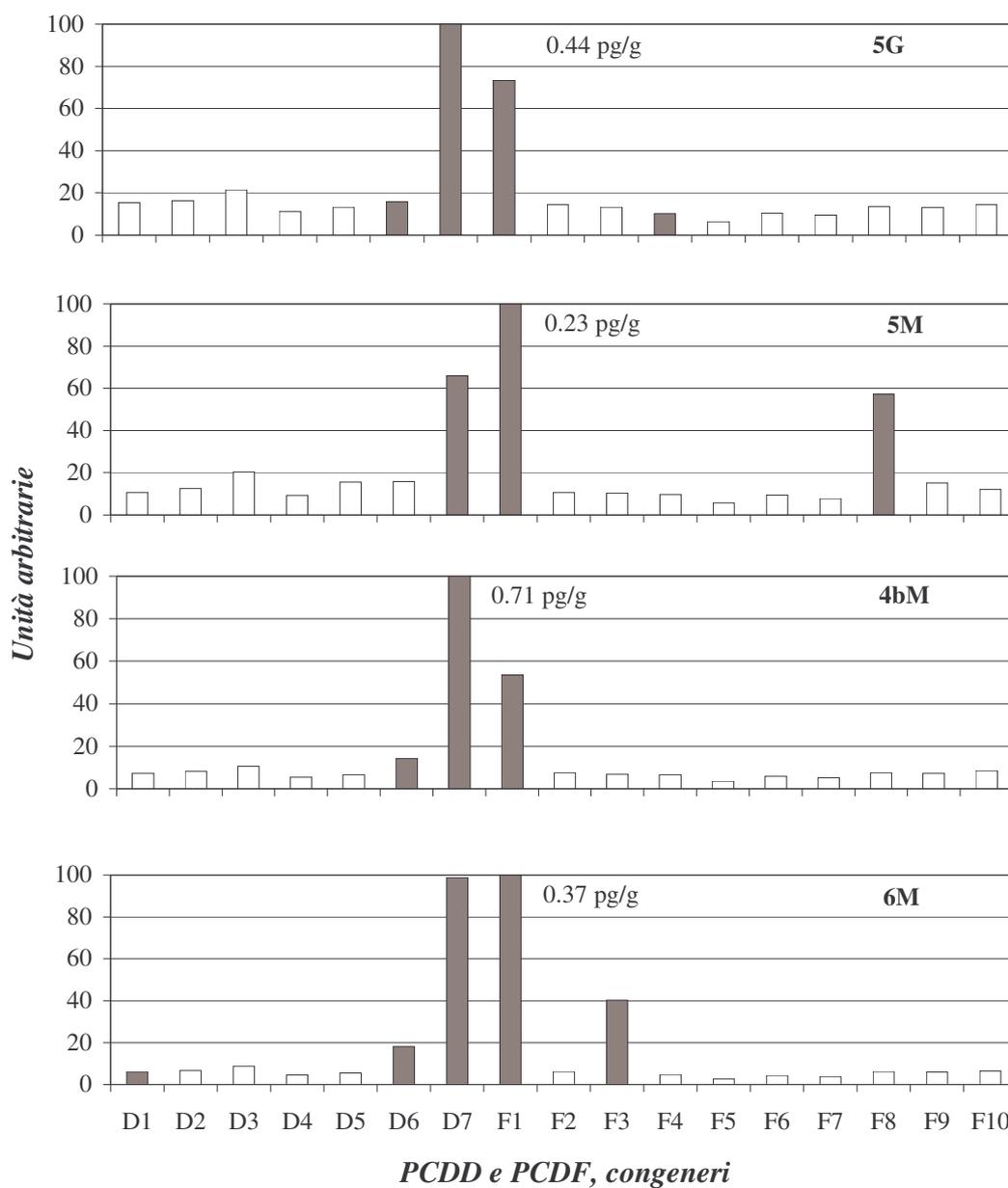


Figura 22. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da dicembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

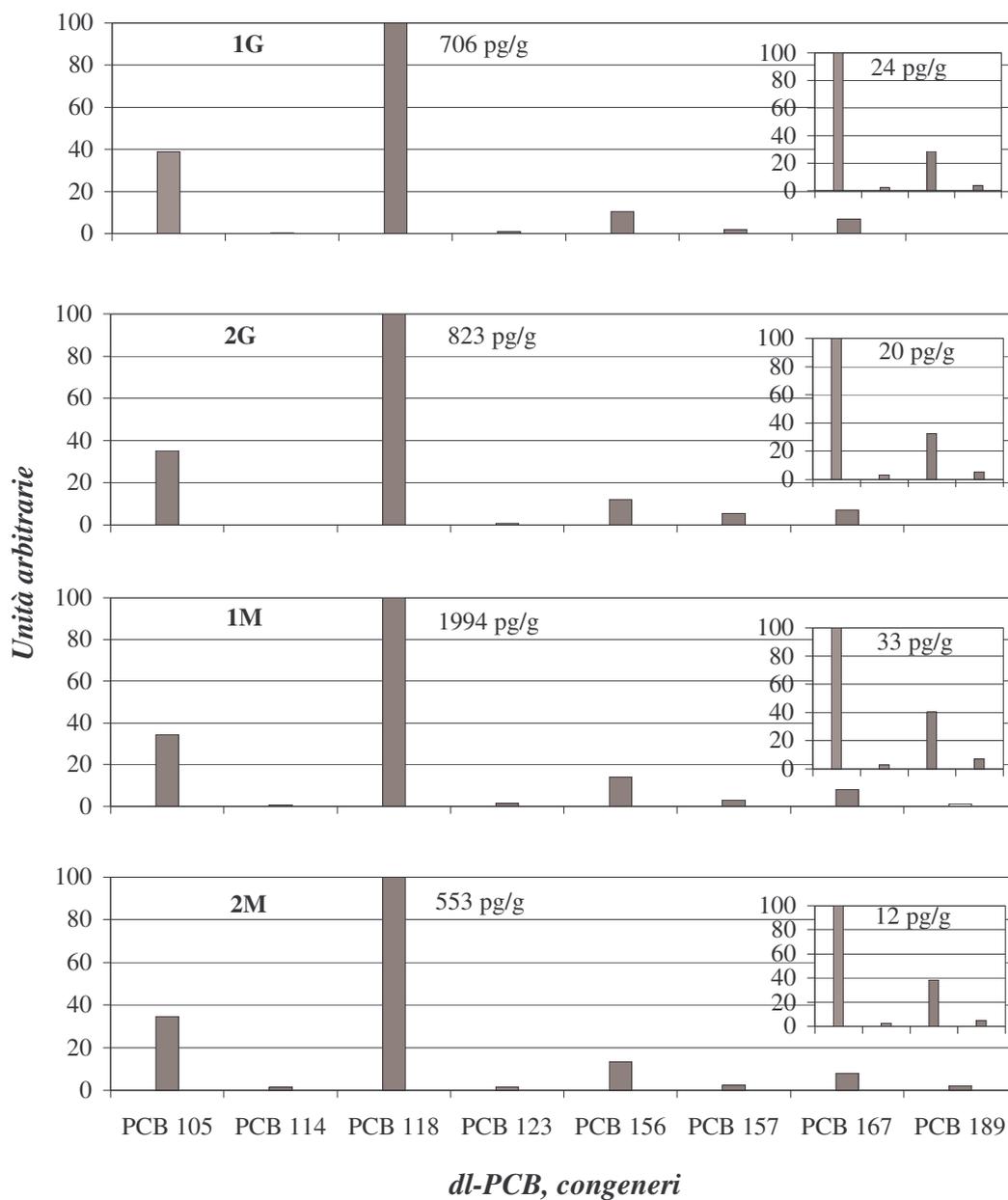


Figura 23. Concentrazioni relative di DL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio ad agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).

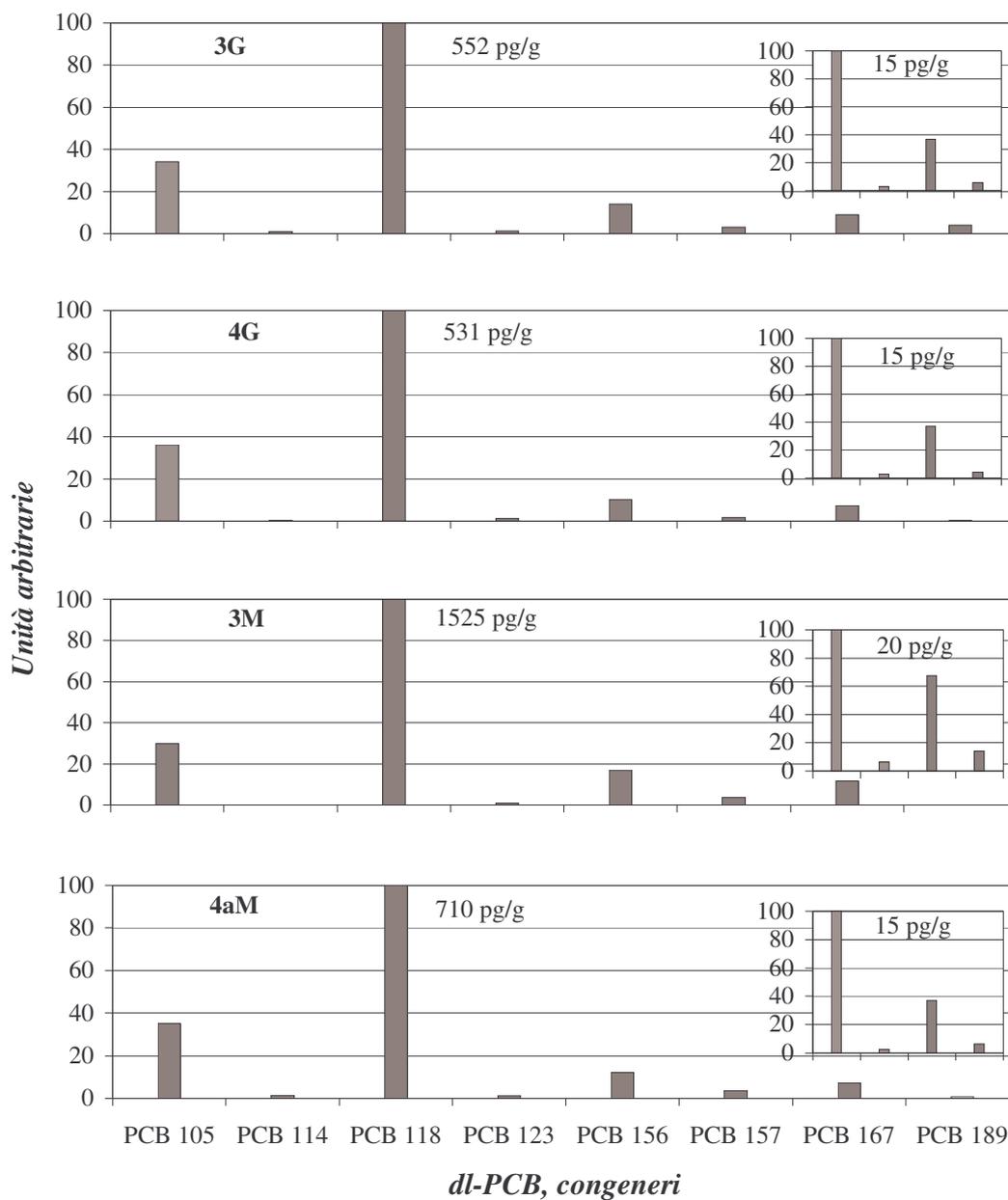
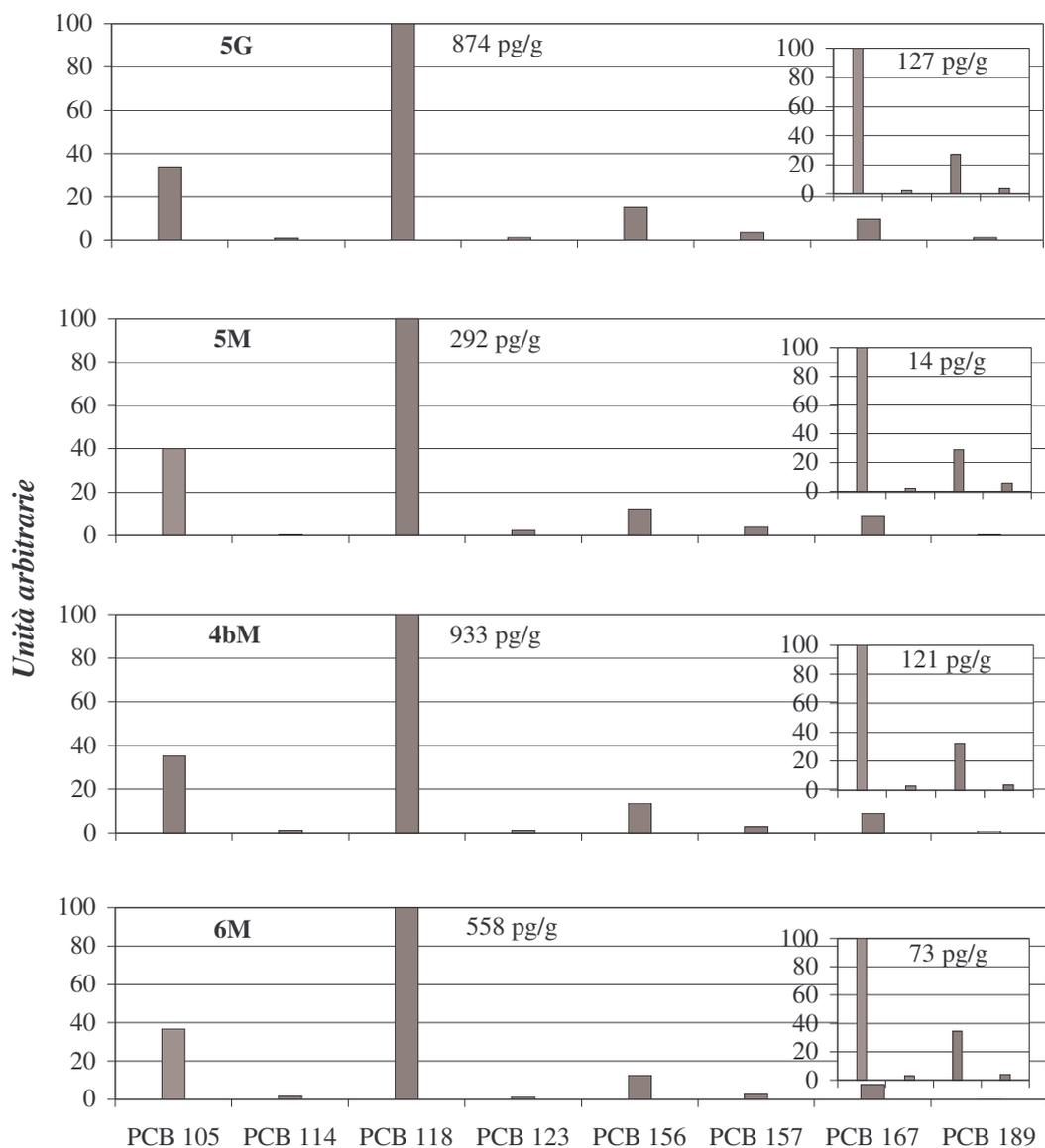
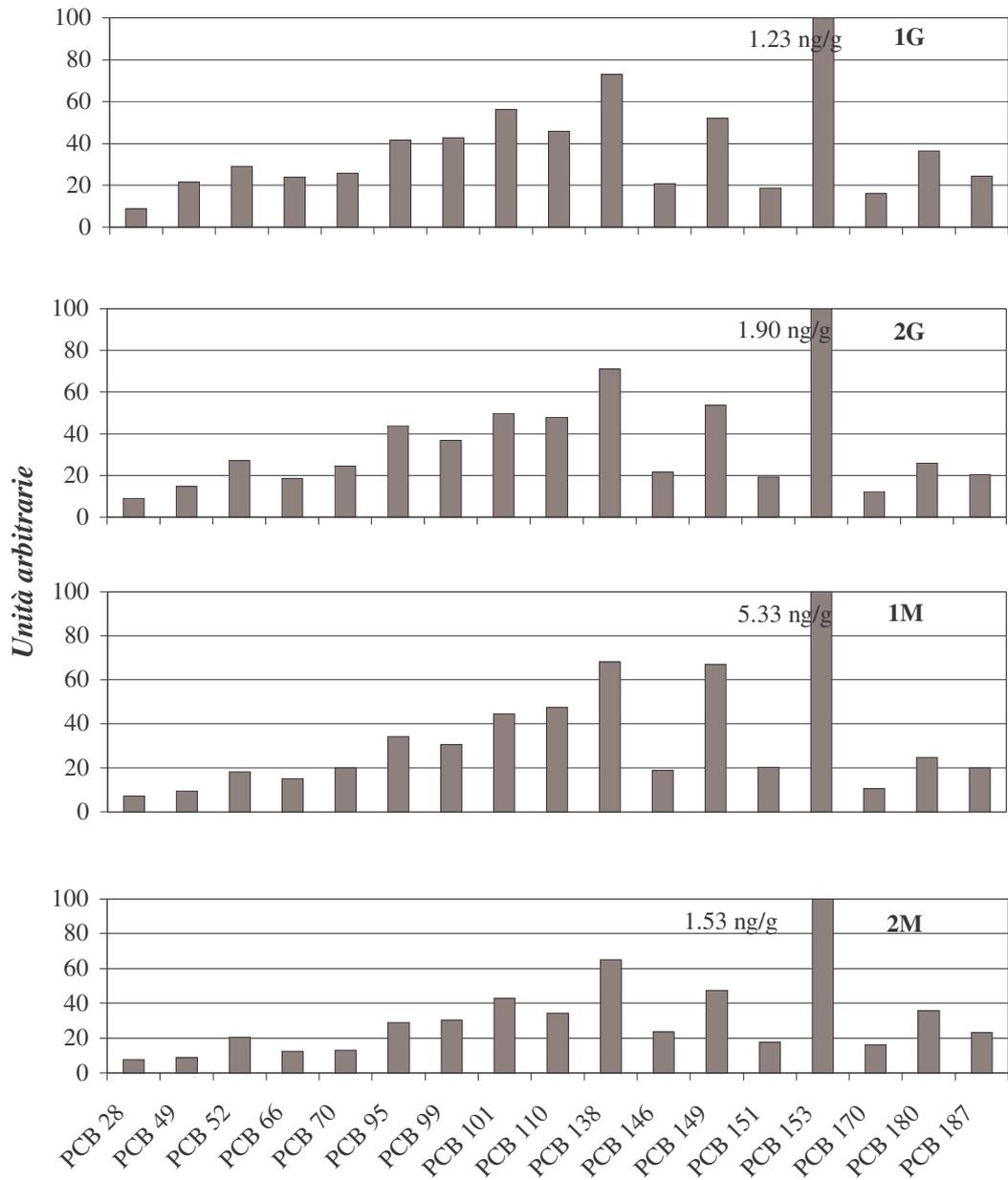


Figura 24. Concentrazioni relative di DL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da settembre 2006 a febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).



dl-PCB, congeneri

Figura 25. Concentrazioni relative di DL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da dicembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).



NDL-PCB, congeneri

Figura 26. Concentrazioni relative di NDL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio ad agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

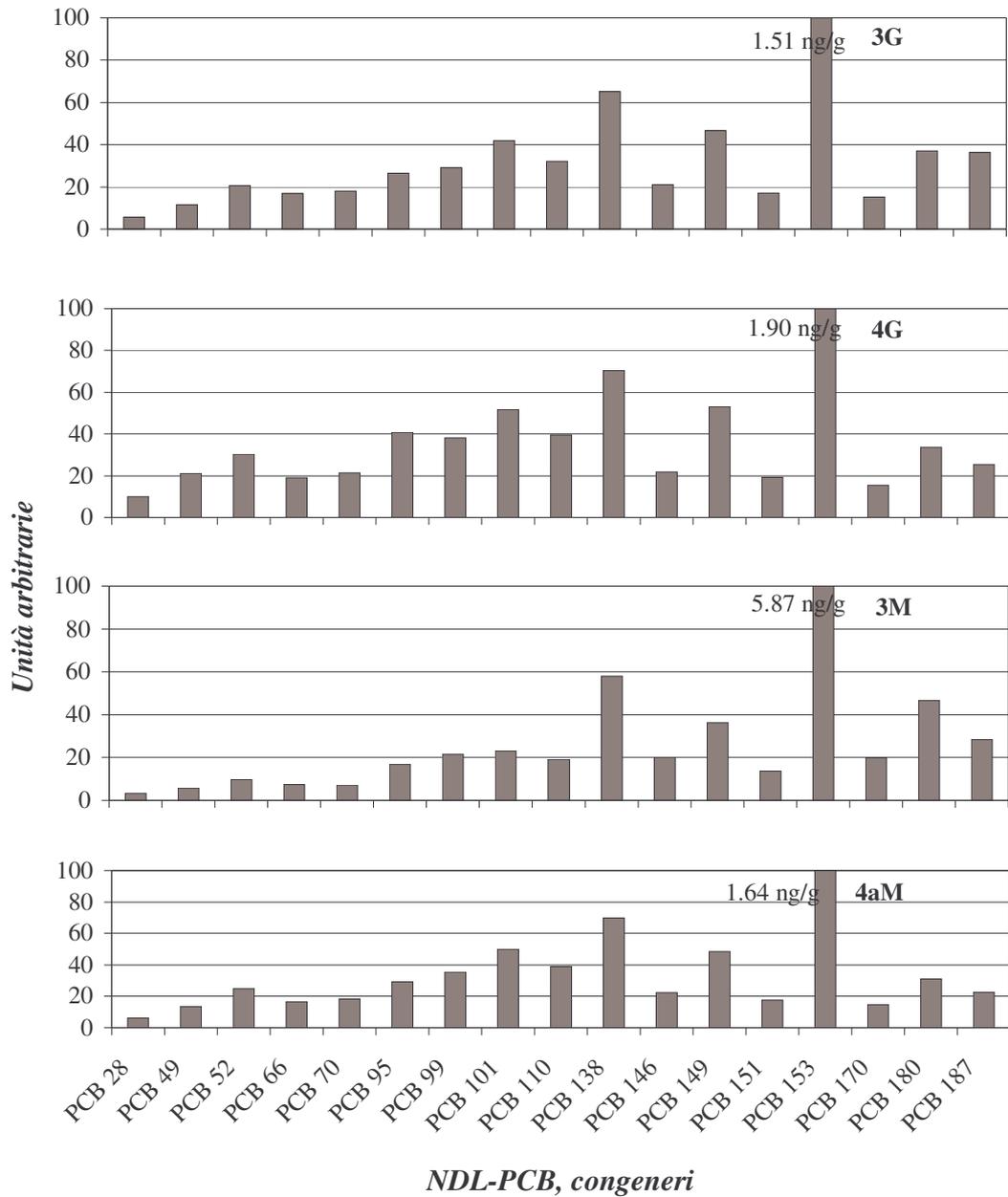


Figura 27. Concentrazioni relative di NDL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da settembre 2006 a febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

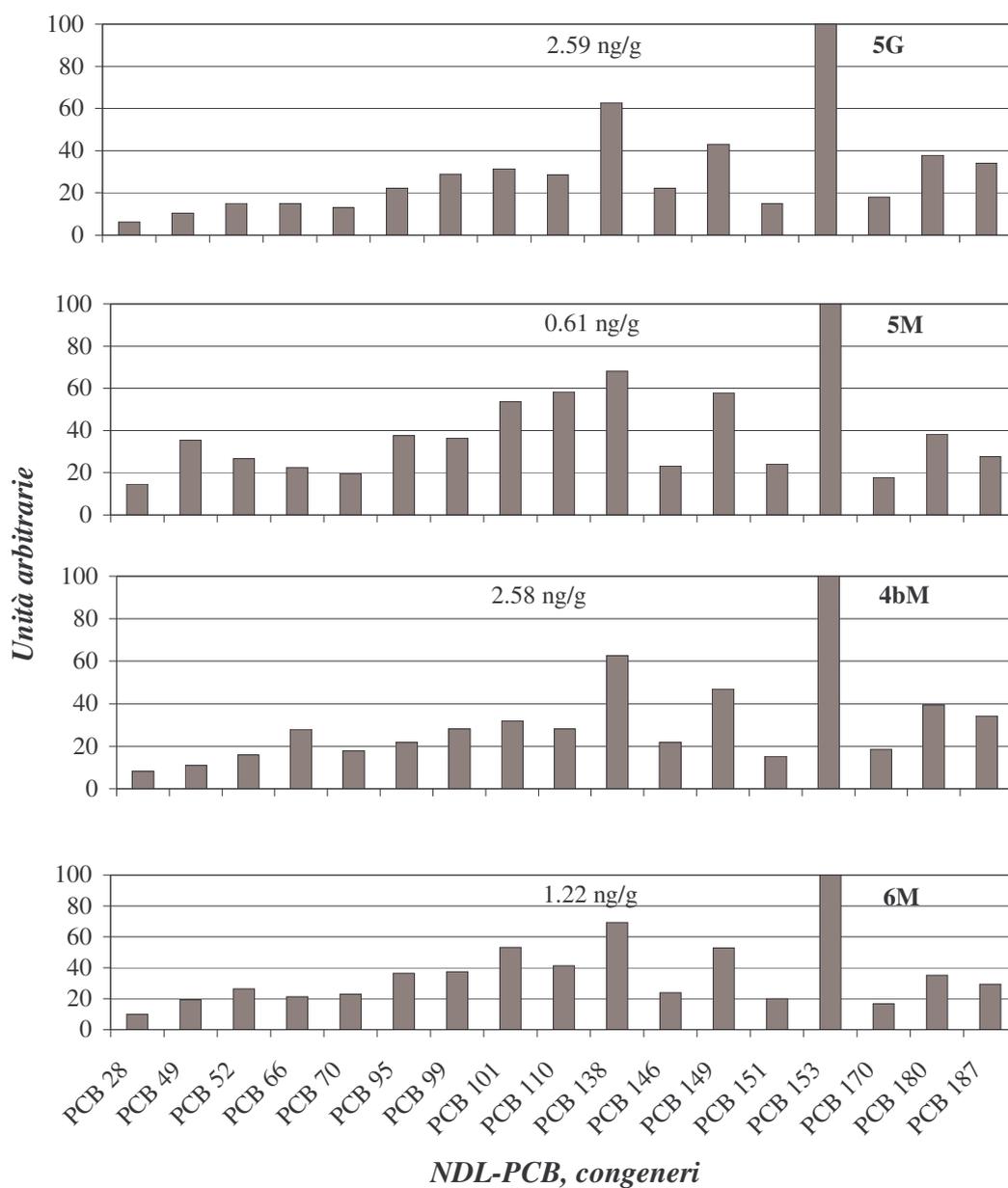


Figura 28. Concentrazioni relative di NDL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da dicembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

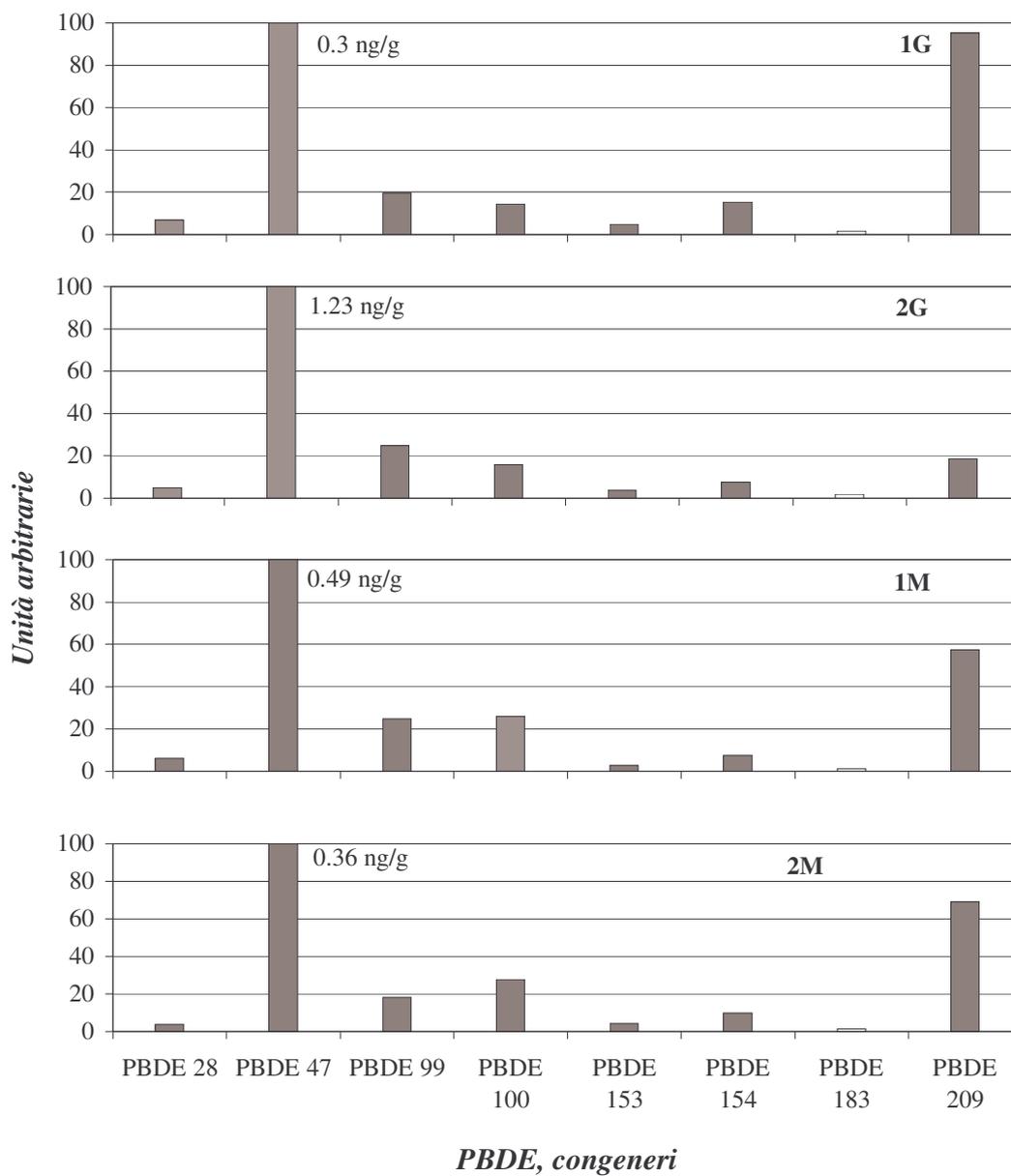


Figura 29. Concentrazioni relative di PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio ad agosto 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

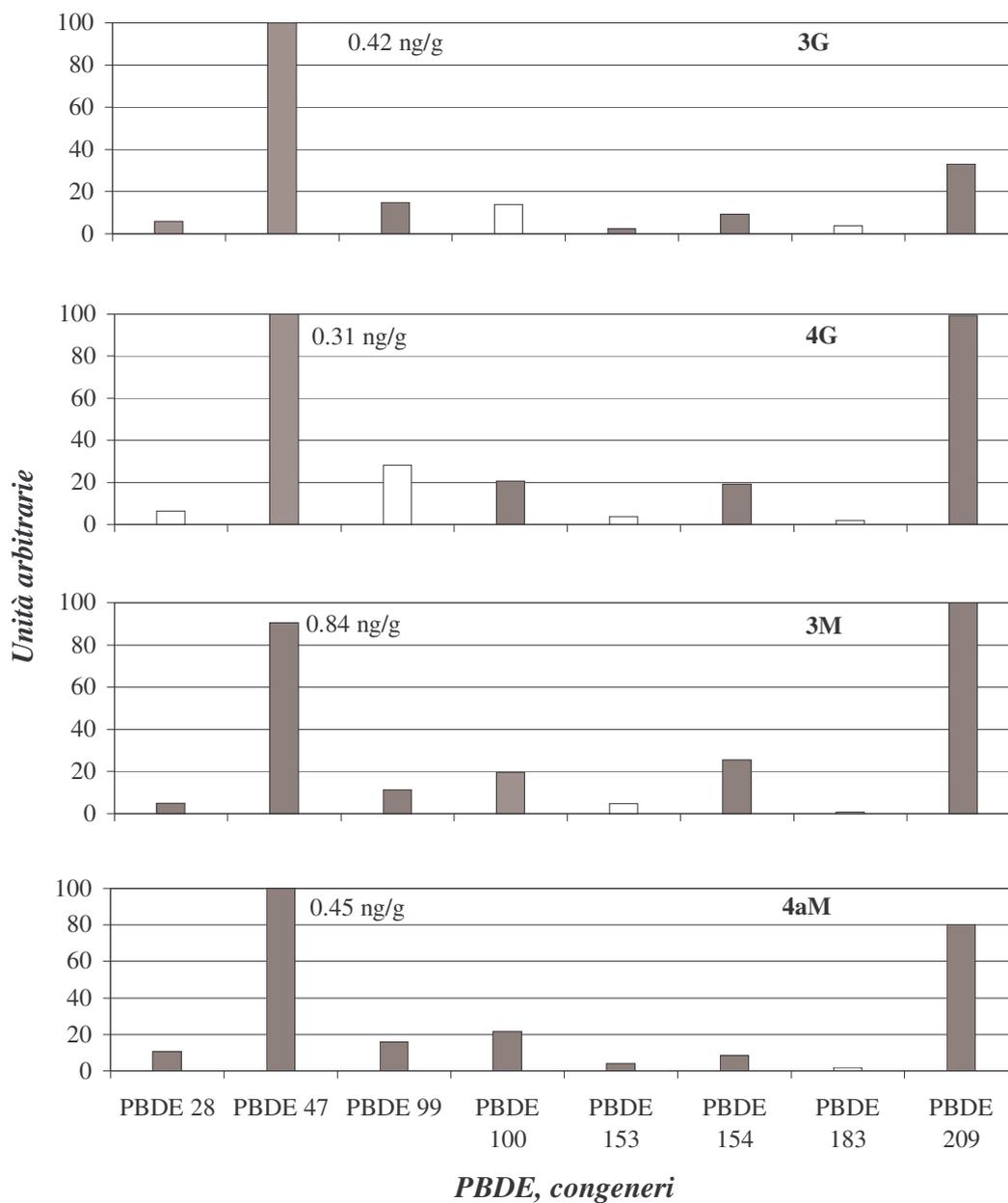
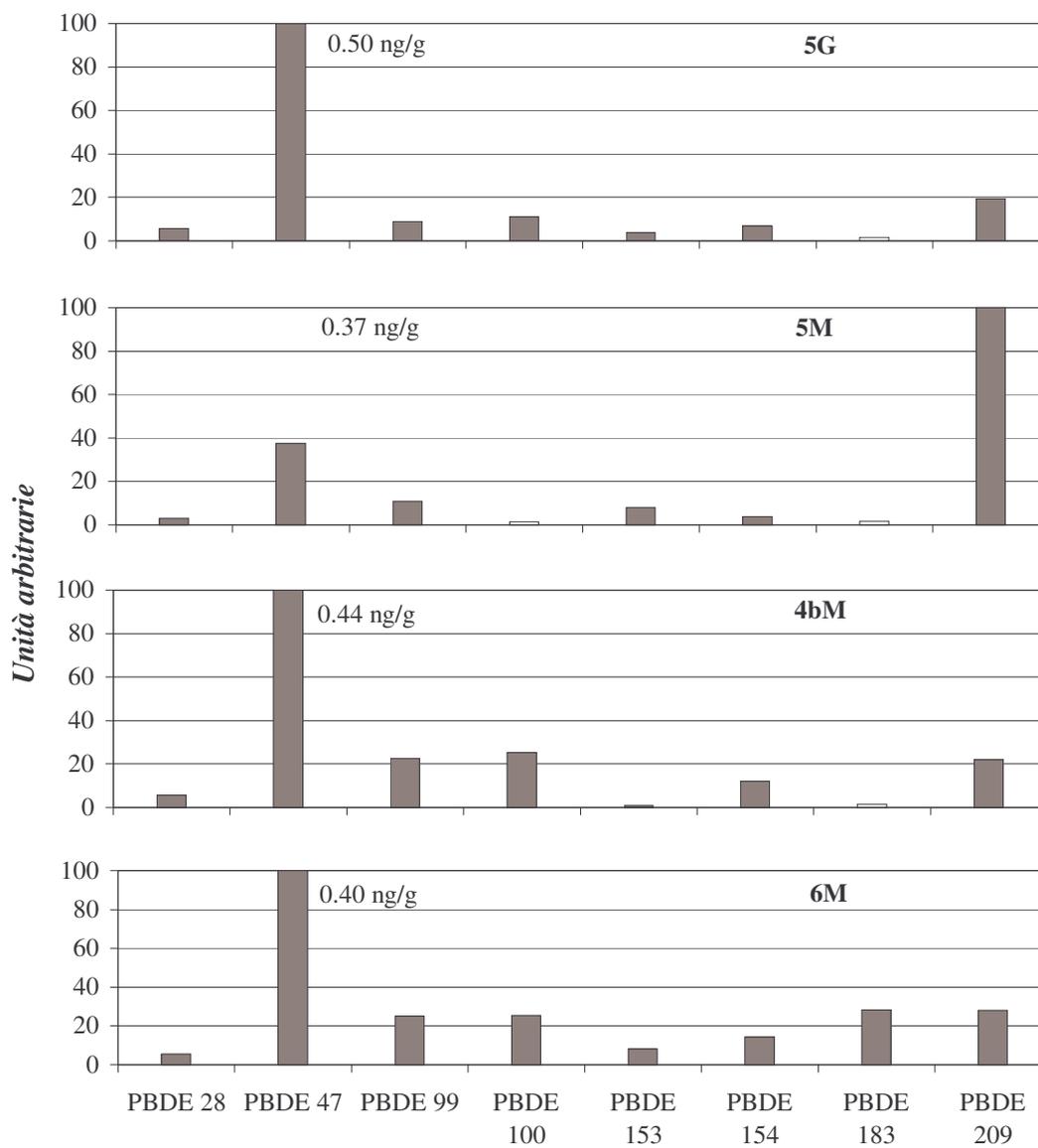


Figura 30. Concentrazioni relative di PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da settembre 2006 a febbraio 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.



PBDE, congeneri

Figura 31. Concentrazioni relative di PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da dicembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

Per DL-PCB (Figure 23, 24 e 25) e NDL-PCB (Figure 26, 27 e 28) non si riscontrano grandi differenze nei profili di contaminazione nei differenti mangimi analizzati.

Il profilo dei DL-PCB è dominato dai PCB 118 e 105 fra i *mono-ortho* e dai PCB 77 e 126 fra i *non-ortho*.

Il pattern dei NDL-PCB ha come congeneri principali i PCB 153, PCB 138, PCB 101, PCB 149 e PCB 180, tutti congeneri molto diffusi nell'ambiente. Limitando l'analisi ai 6 PCB indicatori il profilo riscontrato nei campioni di mangimi di questo studio è simile a quanto riportato in letteratura (Gallani *et al.*, 2004b) per i mangimi per pesci caratterizzato da (in ordine di concentrazione): PCB 153 > PCB 138 > PCB 101 > PCB 180 > PCB 52 > PCB 101.

Alcune differenze sono invece riscontrabili nei pattern dei diversi campioni relativi a PCDD e PCDF (Figure 20, 21 e 22) e PBDE (Figure 29, 30 e 31).

Nei profili relativi a PCDD e PCDF (Figure 20-22) i congeneri dominanti sono il 2,3,7,8 T₄CDF e la O₈CDD: nella maggior parte dei campioni (1G, 2G, 1M, 2M, 3G, 4G, 4aM, 5M) il congenero principale è il T₄CDF, spesso associato alla presenza di 2,3,4,7,8-P₅CDF mentre in altri (3M, 5G, 4bM) il congenero principale è la O₈CDD. Il campione 6M infine è caratterizzato dalla presenza dei due congeneri praticamente allo stesso livello di concentrazione. La presenza di 2,3,7,8 T₄CDF e O₈CDD come congeneri principali trova riscontro nei dati reperibili in letteratura (Blanco *et al.*, 2007).

Nei profili congenero specifici dei PBDE i due congeneri dominanti sono alternativamente il PBDE 47 (2G, 1M, 2M, 3G, 4aM, 5G, 4bM, 6M) e il PBDE 209 (3M, 5M), nei campioni 1G e 4G i due congeneri si trovano in concentrazioni molto simili. Tali congeneri sono del resto fra i più diffusi nell'ambiente in quanto componenti principali di due fra le più comuni miscele commerciali di ritardanti di fiamma bromurati (EHC, 1994).

4.4 Relazione fra concentrazioni di contaminanti determinate nei campioni di *Sparus aurata* e nei mangimi per acquacoltura

4.4.1 Risultati dell'analisi di correlazione fra concentrazioni di contaminanti determinate nei campioni di *Sparus aurata* e nei mangimi per acquacoltura

L'analisi di correlazione (Spearman r) effettuata sulle concentrazioni espresse su base grassa dei contaminanti oggetto dello studio nei pesci e nei mangimi non ha evidenziato la presenza di una correlazione significativa per nessuna delle famiglie di analiti oggetto di studio, salvo che per PCDD+PCDF. Quest'ultimo risultato però non può essere preso in considerazione in modo rigoroso in quanto l'alto numero di congeneri di PCDD e PCDF non quantificati nei mangimi rende di fatto poco confrontabile il dato con quello dei pesci; in considerazione di ciò l'analisi di correlazione per PCDD e PCDF è stata ripetuta sul solo T₄CDF, congenere sempre quantificato in entrambe le matrici, e il risultato è stato non significativo.

I motivi dell'assenza di correlazione fra contaminazione di pesce e mangimi possono essere di varia natura. Innanzitutto il presente studio è uno studio di osservazione "sul campo" non in regime di esposizione controllata. Inoltre la variabilità biologica in termini tossicocinetici e tossicodinamici, intragrupo e intergruppo (intraimpianto e interimpianto), può influenzare in maniera rilevante la capacità diagnostica dello studio alle condizioni di esposizione indicate. In aggiunta tra *intake* e *body burden* intervengono fattori determinanti che possono generare notevoli differenze fra la dose assunta e la dose interna di un contaminante.

4.4.2 Stima dell'entità del trasferimento di contaminanti dai mangimi ai filetti di *Sparus aurata*

Al fine di ottenere indicazioni sul contributo della dieta alla contaminazione da inquinanti organici persistenti riscontrata nel pesce è stata stimata la percentuale di contaminanti trasferita dal mangime al filetto degli esemplari di *Sparus aurata* di taglia commerciale.

Il calcolo delle quantità dei contaminanti contenuti nei mangimi somministrati ai pesci complessivamente nei 12 mesi di sperimentazione è stato effettuato moltiplicando il dato espresso in termini di concentrazione relativo a ogni mangime per la quantità di mangime somministrata giornalmente (considerando una somministrazione giornaliera di cibo pari al 1.25% del peso corporeo medio dei pesci) e per i giorni di somministrazione. Tale calcolo è stato effettuato per entrambi i siti di allevamento.

Analogamente per calcolare la quantità di contaminanti presente nei filetti di pesce

il dato di concentrazione è stato moltiplicato per il peso dei filetti.

I risultati sono mostrati in Tabella 13.

Tabella 13. Quantità di contaminanti organici persistenti riscontrate nei mangimi per acquacoltura somministrati complessivamente nei 12 mesi di sperimentazione e nei filetti di *Sparus aurata* di taglia commerciale

Analiti	Filetto di pesce Giovinazzo	Filetto di pesce Mattinata	Mangimi Giovinazzo	Mangimi Mattinata	% di trasferimento Giovinazzo	% di trasferimento Mattinata
Σ (PCDD), pg	13	22	719	1197	2%	2%
Σ (PCDF), pg	51	58	1198	1631	4%	4%
Σ (PCDD+PCDF), pg	63	81	1917	2825	3%	3%
Σ (<i>non-ortho</i> PCB), pg	1190	2700	52514	96810	2%	3%
Σ (<i>mono-ortho</i> PCB), ng	143	169	1154	1790	12%	9%
Σ (dl-PCB), ng	144	171	1206	1887	12%	9%
Σ_{17} (PCB), ng	841	1142	9734	16614	9%	7%
Σ_8 (PBDE), ng	71	69	995	1443	7%	5%

Le percentuali di trasferimento così calcolate vanno da un minimo di 2% per PCDD e PCDF a un massimo di 12% per i DL-PCB. Le percentuali di trasferimento più alte sono quelle relative ai PCB (DL e NDL), in analogia con quanto riportato in letteratura per altre specie (Isosaari *et al.*, 2004; Lundebye *et al.*, 2004; Berntssen *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007). Nel complesso i valori delle percentuali di trasferimento sembrano piuttosto contenuti rispetto a quelli riportati in letteratura (Berntssen *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007) anche in considerazione del fatto che non è stato possibile valutare e sottrarre il contributo alla contaminazione proveniente dall'ambiente. A tale proposito tuttavia è indicativa la scarsa differenza fra le percentuali di trasferimento relative ai due siti di allevamento nei quali il contributo alla contaminazione proveniente dall'ambiente è presumibilmente differente; quest'ultimo dato starebbe a indicare che la maggior parte dei contaminanti presenti nel pesce proviene dalla dieta.

I risultati sopra riportati, sebbene interessanti per una valutazione di massima del contributo della dieta all'esposizione a POPs dei pesci di allevamento, sono da considerare puramente indicativi per alcuni motivi in parte già riportati. In particolare è importante ricordare che il presente studio non è uno studio in regime di esposizione controllata e che

le quantità di mangimi somministrate sono state spesso variate in modo difficilmente valutabile in dipendenza da fattori quali, a esempio, forti variazioni della temperatura ambientale; questo ha portato a sovrastimare le quantità di mangimi somministrate e le quantità di contaminanti assunte dai pesci e di conseguenza a sottostimare le percentuali di trasferimento.

In aggiunta a ciò va considerato che tra *intake* e *body burden* intervengono fattori determinanti che possono generare notevoli differenze fra la dose assunta e la dose interna di un contaminante.

Per i motivi sopraelencati risulta essere più illuminante per indagare l'influenza della dieta sull'esposizione dei pesci ai contaminanti oggetto dello studio un'analisi sulle differenze e analogie dei profili di contaminazione di pesci e mangimi.

4.5 Confronto dei profili di contaminazione di pesce e mangimi per acquacoltura

I risultati congenere specifici raggruppati per famiglia di analiti relativi alle stime delle concentrazioni trimestrali di contaminanti somministrate ai pesci con i mangimi sono stati riportati nelle Figure 32-39.

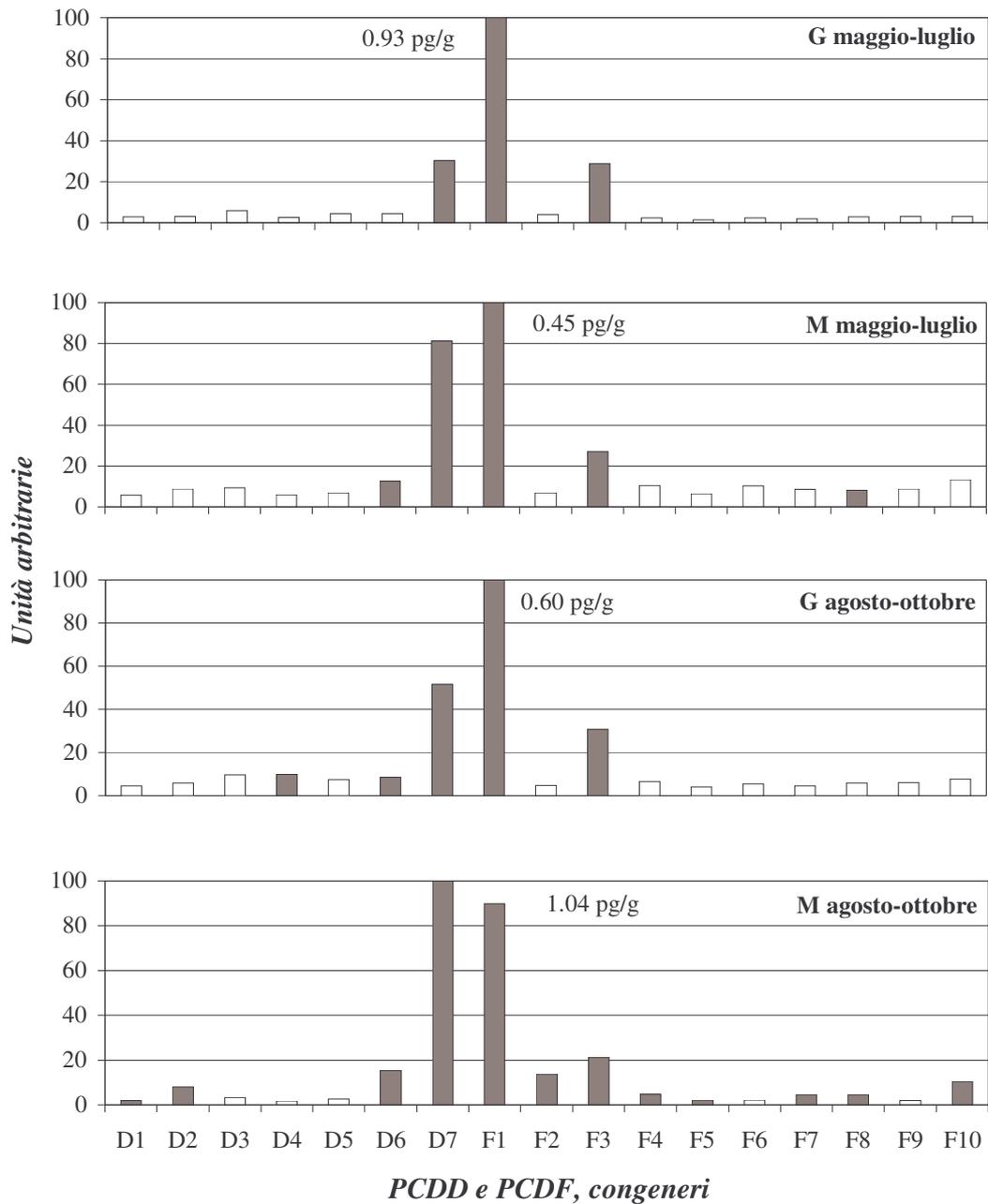


Figura 32. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio ad ottobre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

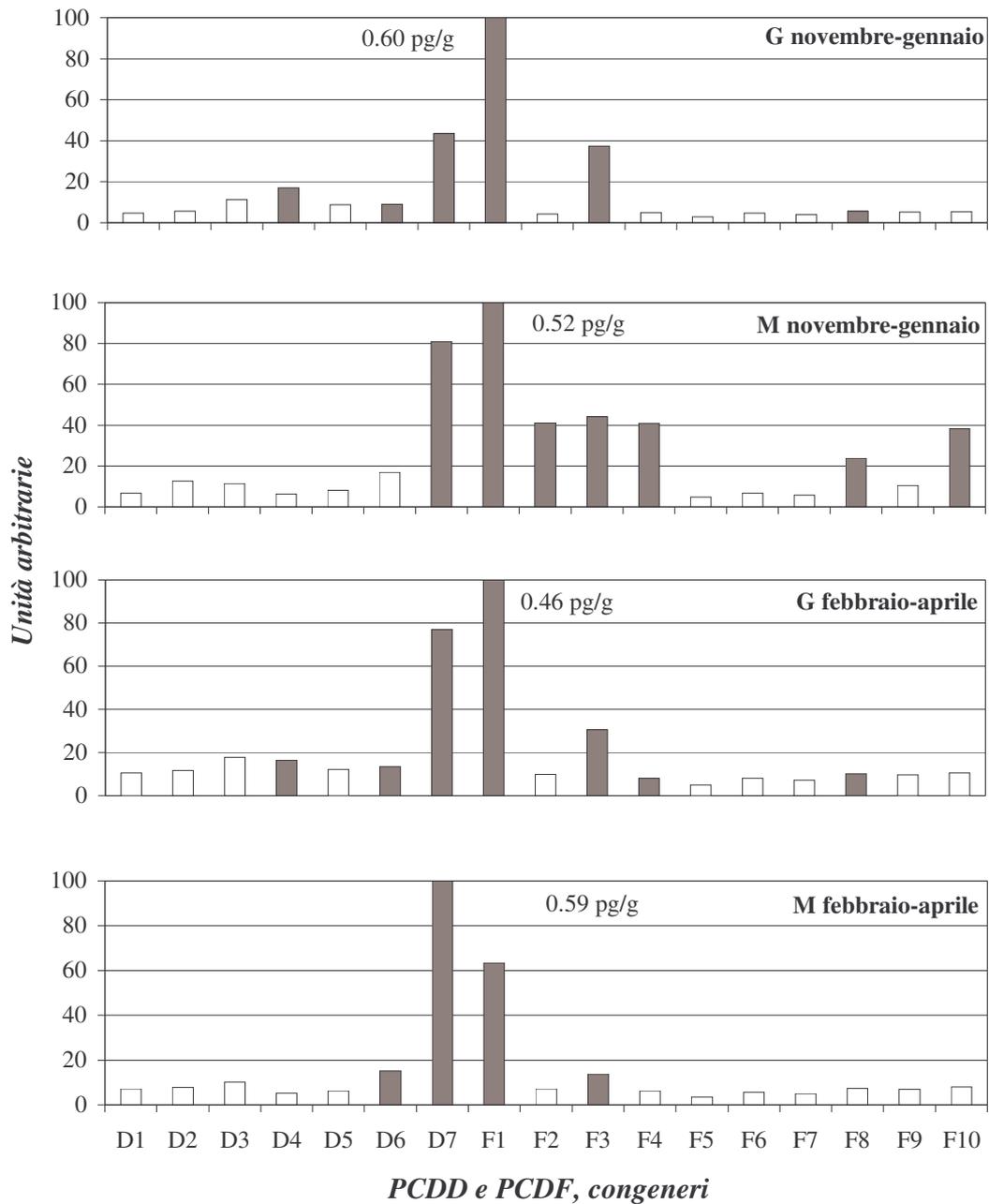
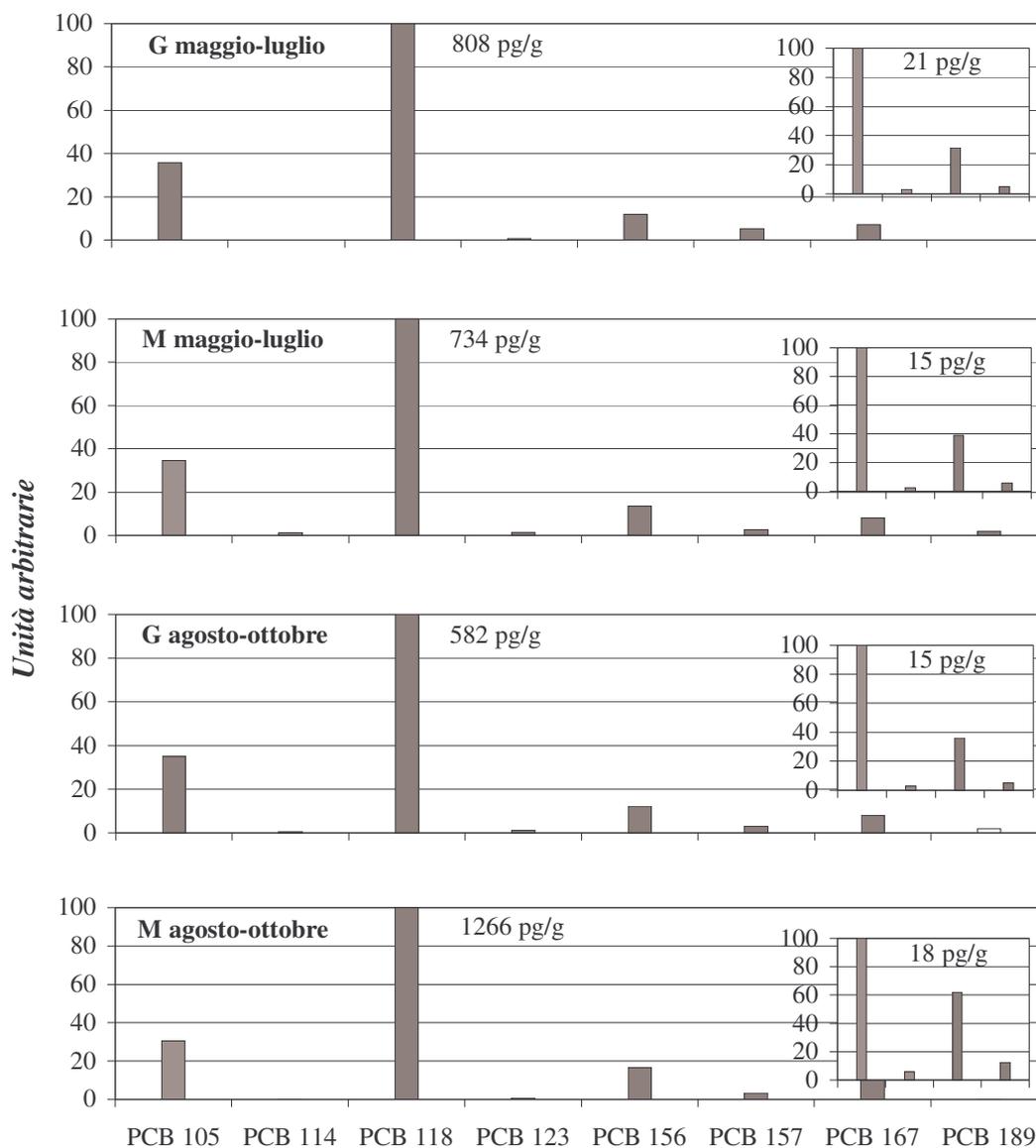
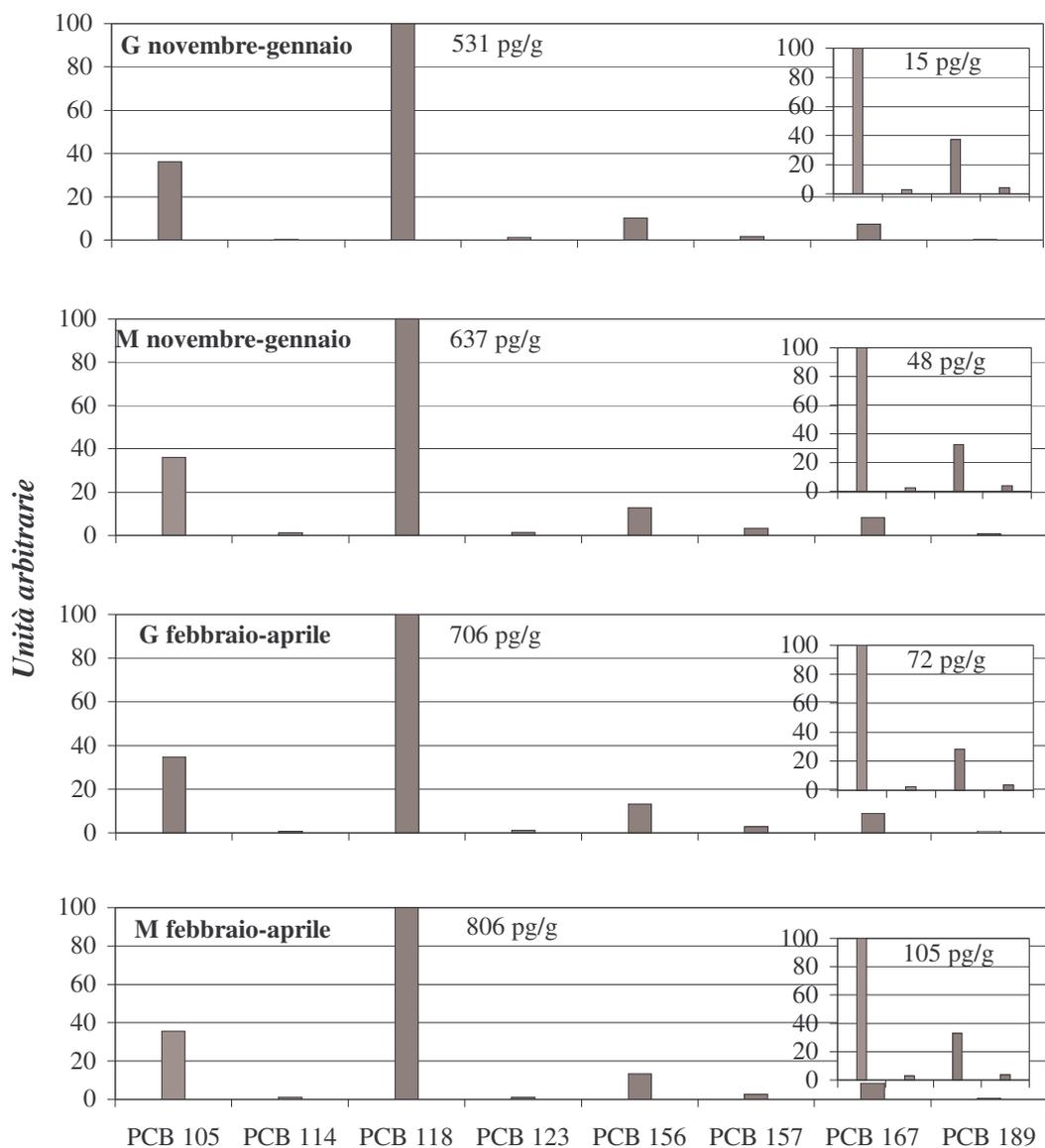


Figura 33. Concentrazioni relative di PCDD e di PCDF in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da novembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.



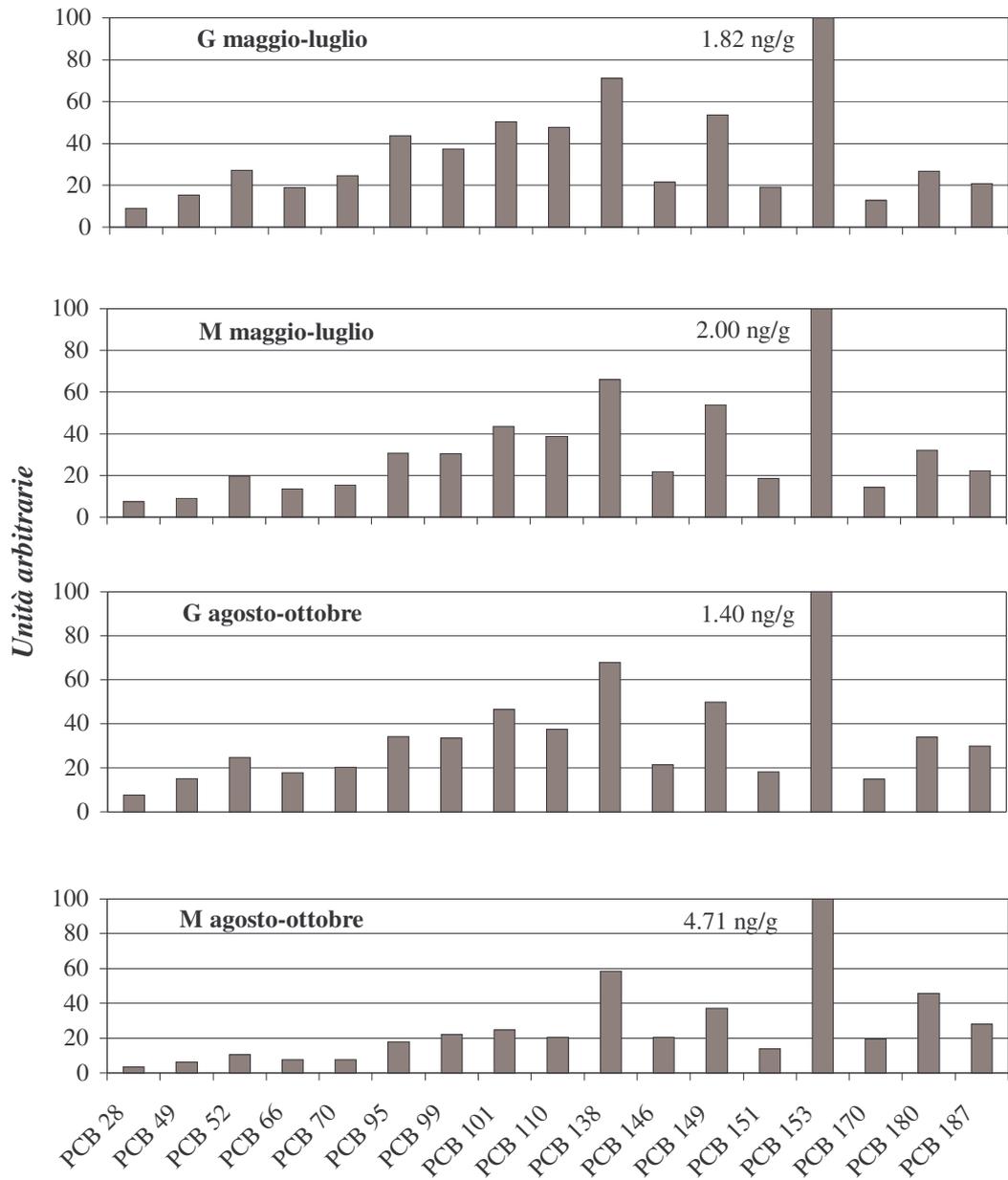
dl-PCB, congeneri

Figura 34. Concentrazioni relative di DL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio a ottobre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).



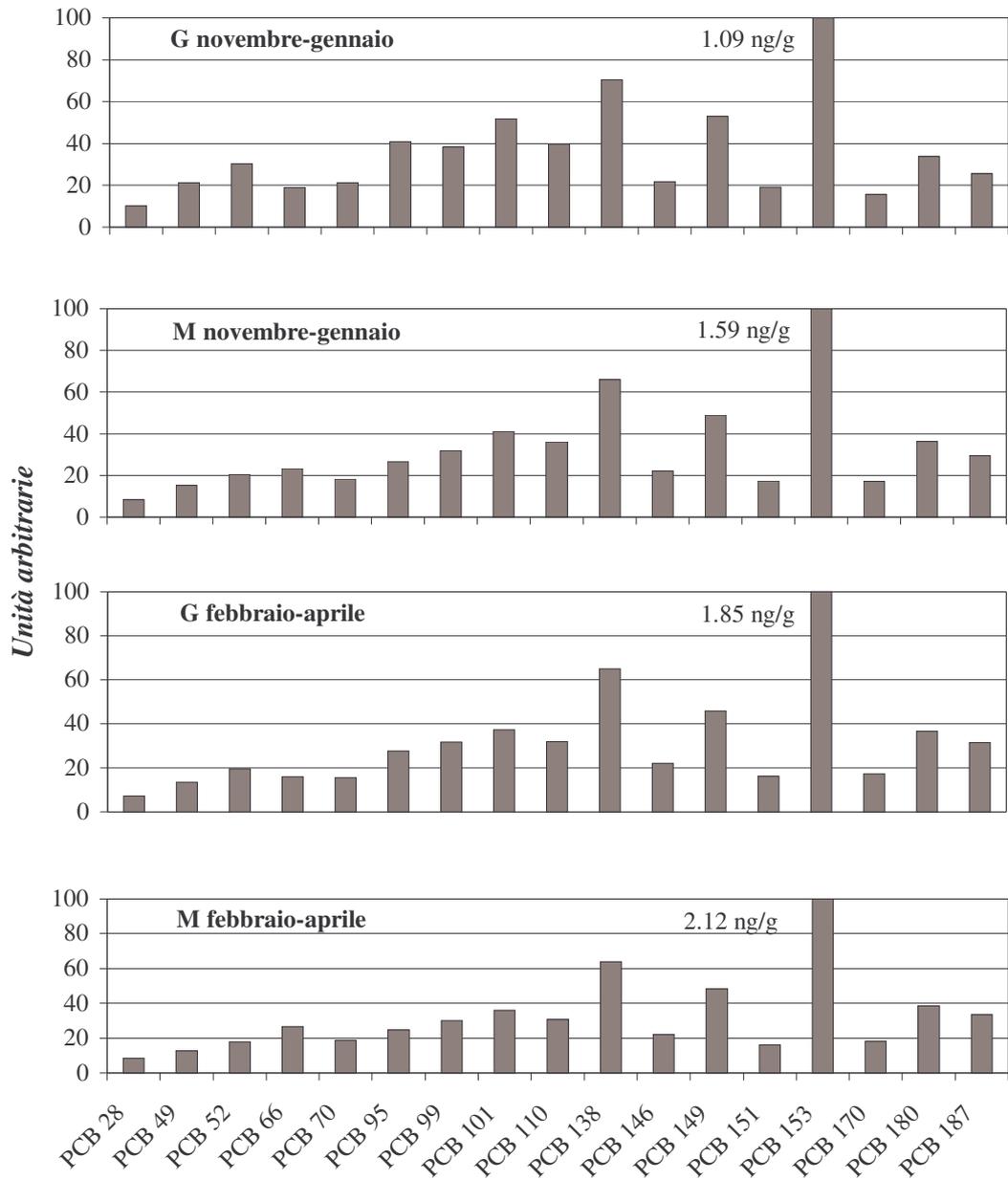
dl-PCB, congeneri

Figura 35. Concentrazioni relative di DL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da novembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Nel riquadro in alto di ogni grafico sono riportati i non-ortho PCB (nell'ordine, da sinistra verso destra: PCB 77, 81, 126, 169).



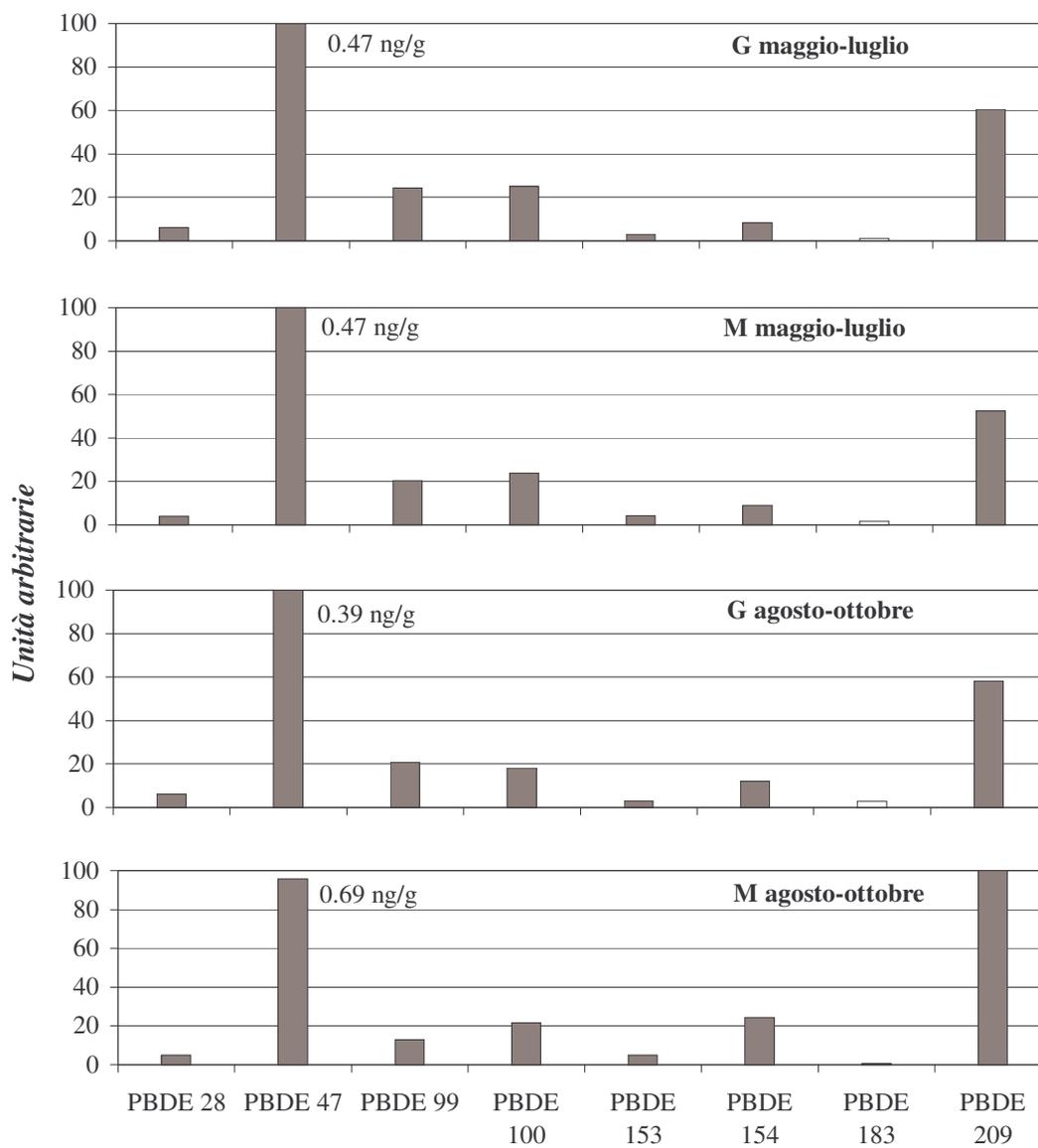
NDL-PCB, congeneri

Figura 36. Concentrazioni relative di NDL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio a ottobre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.



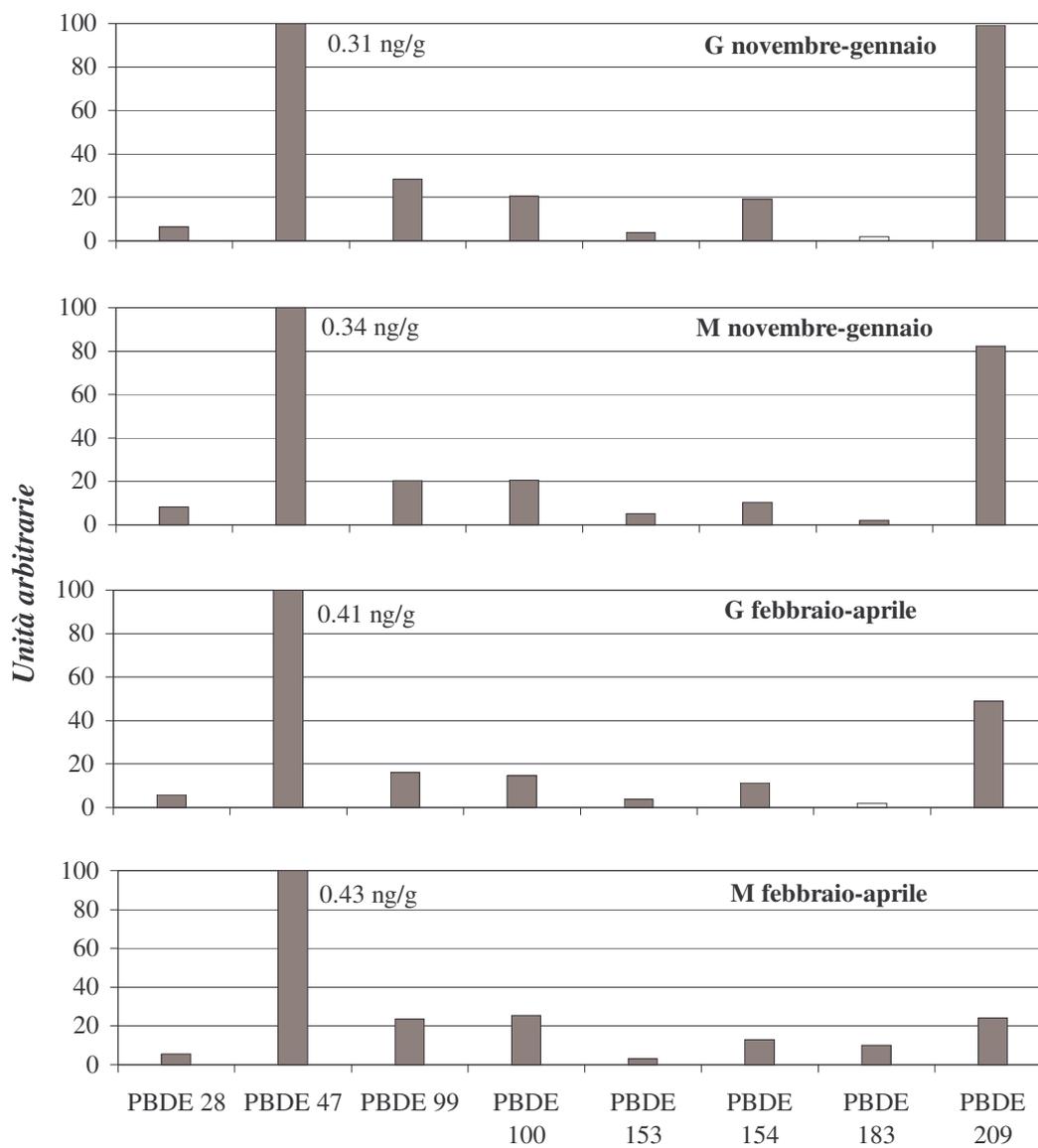
NDL-PCB, congeneri

Figura 37. Concentrazioni relative di NDL-PCB in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da novembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.



PBDE, congeneri

Figura 38. Concentrazioni relative di PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da maggio a ottobre 2006. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.



PBDE, congeneri

Figura 39. Concentrazioni relative di PBDE in mangimi per acquacoltura raccolti in due differenti siti di allevamento (G, Giovinazzo e M, Mattinata) da novembre 2006 ad aprile 2007. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

Dal confronto fra i profili di contaminazione relativi a PCDD e PCDF, DL-PCB, NDL-PCB e PBDE è possibile evidenziare alcune differenze dovute principalmente al diverso potenziale di bioaccumulo presente all'interno delle famiglie di analiti per i diversi congeneri.

In particolare per PCDD e PCDF la differenza nel profilo di contaminazione riguarda soprattutto la O₈CDD che è presente nei mangimi (salvo rare eccezioni) in quantità relativa dal 40 al 100% e che raramente raggiunge concentrazioni quantificabili nel pesce. L'effetto del bioaccumulo si avverte sebbene in misura minore anche per i congeneri 2,3,7,8-T₄CDD e 1,2,3,7,8-P₅CDD che nei mangimi sono quasi sempre in quantità < LOQ mentre nei pesci sono quasi sempre quantificabili e in quantità relative intorno al 10 %; si ricordi che per PCDD e PCDF il potenziale di bioaccumulo è massimo per tetra e penta clorurati. Tale fatto può essere spiegato anche prendendo in considerazione il consumo di mangime da parte dei pesci: livelli di fondo nei mangimi possono raggiungere livelli importanti nei pesci quando il consumo è elevato. Infatti il protrarsi di un consumo di cibo elevato associato alle caratteristiche di persistenza (emivite ambientali superiori a 6 mesi nel suolo e nei sedimenti e superiori a 2 mesi nell'acqua) di questo genere di contaminanti può portare a un notevole bioaccumulo e a un'amplificazione rilevante dei livelli. I congeneri 1,2,3,4,6,7,8-H₇CDF e O₈CDF hanno invece l'andamento opposto: quasi sempre determinati nei mangimi tendono a non raggiungere livelli quantificabili nei pesci per la loro scarsa capacità di bioaccumulo.

Nei profili di contaminazione relativi ai DL-PCB non si riscontrano differenze sostanziali fra pesce e mangimi; la notevole somiglianza fra i pattern è probabilmente legata al fatto che per i DL-PCB non sembra esserci una differenza rilevante nella potenzialità di bioaccumulo dei diversi congeneri (Blanco *et al.*, 2007; Isosaari *et al.*, 2004) e comunque i congeneri principali presenti in mangimi e pesci (PCB 77, PCB 126, PCB 118, PCB 105, PCB 156 e PCB 167) sono compresi in un range limitato di grado di clorurazione (4-6 atomi di cloro) e dunque presentano potenziali di bioaccumulo simili.

I profili congeneri-specifici dei NDL-PCB in mangimi e pesci hanno un andamento simile e sono caratterizzati dalla prevalenza dei seguenti congeneri: PCB 153, PCB 101, PCB 138, PCB 180. E' possibile tuttavia evidenziare alcune differenze nelle concentrazioni relative di congeneri con differente grado di clorurazione. A titolo esemplificativo si

consideri l'entità del contributo relativo dei congeneri PCB 138 (esaclorosostituito) e PCB 180 (eptaclorosostituito): i livelli di PCB 138 tendono ad essere più importanti nei pesci rispetto ai mangimi e quelli di PCB 180 viceversa sono (relativamente agli altri congeneri) più bassi nei pesci. Il motivo di tale comportamento è da ricercare nella maggior capacità di bioaccumulare degli esaclorosostituiti sugli epta.

L'analisi del pattern dei PBDE nei profili dei mangimi e dei pesci mostra la differenza più marcata per il PBDE 209 che dal 20-100% nei mangimi scende al 5-20% nel pesce. Questo è dovuto alla correlazione fra potenzialità di bioaccumulo e grado di bromurazione caratteristica dei PBDE per i quali la capacità di attraversare le membrane cellulari è fortemente legata alla massa e alle dimensioni della molecola: le molecole con ingombro sterico maggiore tendono a bioconcentrare in misura molto minore rispetto ai congeneri a più basso grado di alogenazione (Hakk and Letcher, 2003).

L'analisi dei pattern di mangimi e pesci porterebbe a confermare le osservazioni riscontrate nei dati di letteratura relative all'accumulo di contaminanti nel pesce dovuto principalmente alla componente alimentare piuttosto che all'influenza di altre fonti di esposizione.

5. Conclusioni

Tutte le famiglie di analiti oggetto dello studio sembrano mostrare una sostanziale omogeneità di livelli e di profili di contaminazione nelle due matrici di biota analizzate, nei diversi siti e periodi di campionamento. I risultati dell'analisi dei mangimi per acquacoltura mostrano una maggiore variabilità sebbene non statisticamente significativa.

Sebbene non sia stata riscontrata una correlazione significativa fra i livelli di contaminanti nei campioni di *Sparus aurata* e nei mangimi, dal confronto fra i pattern congenere specifici riscontrati nelle due matrici è possibile ipotizzare che la principale fonte espositiva responsabile dell'accumulo di tali contaminanti nel pesce sia rappresentata dall'alimentazione. La mancanza di correlazione fra i livelli può essere imputata oltre ai motivi sopraesposti anche alla mancanza di informazioni sulla concentrazione dei contaminanti in esame nell'ambiente (in particolare in acqua e articolato sospeso) che pure può essere una fonte espositiva rilevante per i pesci.

La variabilità dei livelli di contaminazione riscontrati nei mangimi dello stesso tipo

e marca ma provenienti da diversi *batch* indica la possibilità di migliorarne la qualità allo scopo di ottenere una riduzione dei livelli osservati nei filetti. Tale osservazione è corroborata anche dall'evidenza sperimentale della maggior presenza di PCDF sulle PCDD, sintomo di origine industriale della contaminazione presumibilmente avvenuta in fase di preparazione dei mangimi e delle materie prime che li compongono. Questo porta a considerare la possibilità di diminuire i livelli di contaminazione dei pesci di allevamento operando delle modifiche ai processi industriali alla base della preparazione dei mangimi.

I livelli riscontrati nei filetti di pesce e nei mangimi rientrano ampiamente nei limiti di legge e nei livelli di azione (Regolamento CE 1881, 2006; Raccomandazione CE 88, 2006; Direttiva CE 13, 2006) e risultano generalmente inferiori a quanto riportato in letteratura (Fernandez *et al.*, 2004, EFSA, 2005, FSA, 2006a, FSA 2006b). Questi risultati in ambito di gestione del rischio portano a concludere che il consumo regolare di orate allevate nelle zone poco inquinate dell'Adriatico meridionale può contribuire in modo rilevante a ridurre l'esposizione alimentare a PCDD, PCDF, DL-PCB, NDL-PCB e PBDE in Italia e più in generale all'interno del bacino del Mediterraneo, principale mercato per le orate di produzione italiana.

Ringraziamenti

Il lavoro di tesi sperimentale presentato in queste pagine è stato svolto presso il reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma ed è stato reso possibile grazie alla partecipazione dei colleghi del reparto.

In particolare vorrei ringraziare Vittorio Abate e Nicola Iacovella senza i quali non sarebbe stato possibile ottenere i dati sperimentali e Fabiola Ferri, Valentina Marra e Silvia Valentini per l'aiuto in fase di stesura finale della tesi.

Un ringraziamento speciale va inoltre al capo reparto Elena De Felip per il suo sostegno e la sua pazienza e ad Annalisa Abballe per avermi coinvolto in questa avventura.

Riferimenti bibliografici

Abad E., Ábalos M., Calvo M., Nombela J., Caixach J., Rivera J. (2003). Surveillance program on dioxins and dioxin-like pcbs in fish and shellfish consumed in Spain. *Organohalogen Compounds*, 60-65.

Ahmed FE, Hattis D, Wolke RE, Steinman D. (1993). Risk assessment and management of chemical contaminants in fishery products consumed in USA. *Journal of Applied Toxicology*;13(6):395-410.

Andersson PL, Wågman N, Berg HA, Olsson P-E, Tysklind M (1999). Biomagnification of structurally matched polychlorinated and polybrominated diphenylethers (PCDE/PBDE) in Zebrafish (*Danio rerio*). *Organohalogen Compounds* 43, 9-12

API, 2008. Associazione Piscicoltori Italiani. Aree tematiche, Specie, Orata. Disponibile all'indirizzo: <http://www.api-online.it/index.cfm?ent=areeTematiche&p=1&sp=orata>

Ballschmiter K., Buchert H., Niemczyk R., Munder A., Swerev M. (1986). Automobile exhausts versus municipal waste incineration as sources of the polychlorodibenzodioxins (PCDD) and -furans (PCDF) found in the environment. *Chemosphere* 15, 901–915.

Bell J.G., McEvoy J., Webster J.L., McGhee F., Millar R.M., Sargent J.R. (1998). Flesh lipid and carotenoid composition of Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Agric Food Chem* 46, 119-127

Berntssen MHG, Lundebye A-K, Torstensen B (2005). Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed. *Aquaculture Nutrition* 11, 219-231

BfR, 2006: BfR rät von einer Übernahme der neuen Toxizitätsäquivalentfaktoren (WHOTEF) in die gesetzlichen EU-Regelungen für Lebens- und Futtermittel ab, Stellungnahme Nr. 003/2007 des BfR vom 04. September 2006 Disponibile all'indirizzo:

http://www.bfr.bund.de/cm/208/bfr_raet_von_einer_uebernahme_der_neuen_toxizitaetsaeq_uivalentfaktoren_ab.pdf

Björklund J., Tollbäck P., Hiärne C., Dyremark E., Östman C. (2004). Influence of the injection technique and the column system on gas chromatographic determination of polybrominated diphenyl ethers. *Journal Chromatography A* 1041, 201–210.

Blanco SL, Sobrado C, Quintela C, Cabaleiro S, González JC, Vieites JM. (2007). Dietary uptake of dioxins (PCDD/PCDFs) and dioxin-like PCBs in Spanish aquacultured turbot (*Psetta maxima*). *Food Additives and Contaminants*, 24, 421 – 428.

Brambilla G, Cherubini G, Ferretti E, Iacovella N, Menotta S, Ubaldi A, di Domenico A. (2003). Polychlorobiphenyls clearance in farmed rainbow trout: preliminary study results and development of a chemobiokinetic model. *Organohalogen compounds*, 64, 349-352.

Brambilla G, Dellatte E, Fochi I, Iacovella N, Miniero R, di Domenico A. (2007). Depletion of selected polychlorinated biphenyl, dibenzodioxin, and dibenzofuran congeners in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a hint for safer fish farming. *Chemosphere*, 66, 1019-1030.

Bruggemann, A., Opperhuizen, A., Wijnbenga, A., Hutzinger, O. (1984). Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish. *Toxicological and environmental chemistry* 7, 173–189.

Bureau S, Axelman J, Broman D, Jakobsson E (1997). Dietary uptake in pike (*Esox lucius*) of some polychlorinated biphenyls, polychlorinated naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers administered in natural diet. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2508-2513.

Burreau S, Broman D, Örn, U (2000) Tissue distribution of 2, 2', 4, 4'-tetrabromo [¹⁴C]diphenyl ether ([¹⁴C]-PBDE 47) in pike (*Esox lucius*) after dietary exposure – a time series study using whole body autoradiography. *Chemosphere* 40, 977-985

COM (2001). Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters — A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. *COM (2001) 262*. Environment Directorate-General, European Commission (Brussels).

Commissariato di governo per l'emergenza rifiuti in Campania, 2008. Salute e rifiuti in Campania. Disponibile all'indirizzo: http://www.governo.it/GovernoInforma/Dossier/decreto_rifiuti/report.pdf

De Felip E., di Domenico A., Falleni M., Ferri F., Iacovella N., Menale G., Tafani P., Tommasino G., & Turrio Baldassarri L. (1994). Polychlorodibenzodioxin and polychlorodibenzofuran levels in dielectric fluids containing polychlorobiphenyls. *Toxicological and Environmental Chemistry* 46, 239–260.

De Felip E., Miniero R. (1999). Procedimenti analitici adottati per il rilevamento di microcontaminanti in sedimenti lagunari. *ISTISAN 99/28*. A report of the Istituto Superiore di Sanità, Rome (Italy).

De Voogt P., Wells D.E., Reutergårdh L., & Brinkman U.A.Th. (1990). Biological activity, determination and occurrence of planar, mono- and di-ortho PCBs. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 40, 1–46.

DIRETTIVA 2006/13/CE DELLA COMMISSIONE del 3 febbraio 2006 che modifica gli allegati I e II della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del

Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili

EC 2007. Eurostat Fisheries yearbook 2007. Eurostat pocketbooks. Disponibile all'indirizzo: <http://ec.europa.eu/fisheries/publications/fishyearbook2007.pdf>

EC (European Commission) (2003). Scientific Committee on Food (SCF). Report of the Scientific Committee on Food on the revision of the essential requirements of infant formulae and follow-on formulae. Disponibile all'indirizzo: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html

EC 2005. Aquaculture in the European Union. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/fisheries/publications/aquaculture05_en.pdf

EC 2008. Facts and figures on the CFP. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/fisheries/publications/facts/pcf08_en.pdf

EFSA 2005. Background note on EFSA risk assessment related to the safety of wild and farmed fish (Request N° EFSA- Q-2004-23).

EFSA 2005. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the european parliament related to the safety assessment of wild and farmed fish. The EFSA Journal 236, 1–118.

EHC (Environmental Health Criteria) 162, 1994. Brominated diphenyl ethers. Disponibile all'indirizzo: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>

FAO 2006. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Disponibile all'indirizzo: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5600e/y5600e00.pdf>

FAO. 2009. FIGIS Species Fact Sheets. Sparus aurata. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Rome. Disponibile all'indirizzo: <http://www.fao.org/fishery/species/2384/en>

Fernandez, M.A., Gómara, B., Bordajandi, L.R., Herrero, L., Abad, E., Abalos, M., Rivera, J., Gonzalez, M.J. (2004). Dietary intakes of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in Spain. *Food Addit Contam* 21, 983–91.

Ferrara F., Funari E. Rischio chimico associato alla qualità delle acque del mare Adriatico. Rapporto finale delle attività finanziate dal Progetto MURST/CNR “Prisma 2”. *Rapporti ISTISAN* 04/4. Disponibile all'indirizzo: http://dspace.iss.it/dspace/bitstream/2198/-22594/1/ISSA04_1123_3117_2004_I_04_04.pdf

Fisk AT, Norstrom RJ, Cymbalisky CD, Muir DCG. (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:951–961.

Foran Jeffery A., Carpenter David O., Coreen Hamilton M., Knuth Barbara A. Schwager Steven J. (2005) Risk-Based Consumption Advice for Farmed Atlantic and Wild Pacific Salmon Contaminated with Dioxins and Dioxin-like Compounds. | *Environmental Health Perspectives*, 113

FSA (UK Food Standards Agency) (2004a). Advice on fish consumption: benefits & risks. Scientific Advisory Committee on Nutrition and Committee on toxicity. Disponibile all'indirizzo: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fishreport2004full.pdf>

FSA (UK Food Standards Agency) (2004b). COT statement on brominated flame retardants in fish from the Skerne-Tees rivers system. Statement agreed December 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://www.food.gov.uk/science/ouradvisors/toxicity/statements/cotstatements2004branch/cotstatementbfrfish2004>

FSA 2006a Food Survey Information Sheets. Dioxins and dioxin-like PCBs in farmed & wild fish and shellfish. Disponibile all'indirizzo: <http://www.food.gov.uk/science/ouradvisors/toxicity/statements/cotstatements2006/>

FSA 2006b. Food Survey Information Sheets. Brominated chemicals in farmed & wild fish & shellfish and fish oil dietary supplements. Disponibile all'indirizzo: <http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsisbranch2006/fsis0406>

Giesy J.P., Kannan K. (1998). Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): Implication for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 28, 511–569.

Hawker DW, Connell DW. (1988): Octanol–water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Sci Technol*, 22, 382–7.

Hakk H., Letcher R.J. (2003). Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants—a review. *Environment International*, 29 801–828 823

Hansen L.G. (1987). Environmental toxicology of polychlorinated biphenyls. In *Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology — Environmental Toxin Series 1*, 15–48. Safe S. & Hutzinger O., Eds., Springer-Verlag (Berlin).

Hardy M.L. (2002). A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products. *Chemosphere*, 46, 717–728.

Hites Ronald A., Foran Jeffery A., Carpenter David. O, Coreen Hamilton M., Knuth Barbara A., Schwager Steven J. (2004). Global Assessment of Organic Contaminants in Farmed Salmon *Science* 303, 226. Disponibile all'indirizzo: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

IARC (1997). Polychlorinated Dibenzo-*para*-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 69*, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (Lyon).

IARC (1999). Brominated Diphenyl Ethers. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 71*, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization (Lyon).

ISMEA 2008. Il mercato dei prodotti ittici freschi in italia Disponibile all'indirizzo: <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2479>

Isosaari P., Kiviranta H., Lie O., Lundebye A.-K., Ritchie G., Vartiainen T. (2004). Accumulation and distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and polychlorinated biphenyl congeners in Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1672-1679.

Isosaari P., Vartiainen T., Hallikainen A., Ruohonen K. (2002). Feeding trial on rainbow trout: comparison of dry fish feed and Baltic herring as a source of PCDD/Fs and PCBs. *Chemosphere* 48, 795-804

Isosaari, P., Lundebye, A.-K., Ritchie, G., Lie, Ø., Kiviranta, H. & Vartiainen, T. (2005). Dietary accumulation efficiencies and biotransformation of poly-brominated diphenyl ethers in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Additives and Contaminants*, 22, 829-837.

ISS, 2004. Rischio chimico associato alla qualità delle acque del mare Adriatico. Rapporto finale delle attività finanziate dal progetto MURST/CNR "Prisma 2". Ferrara F., Funari E. *Rapporti ISTISAN 04/4*

Johnson A, Olson N. (2001). Analysis and occurrence of polybrominated diphenyl ethers in Washington state freshwater fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 41, 339– 344.

Kjeller L.-O., Jones K.C., Johnston A.E., Rappe C. (1991). Increases in the polychlorinated dibenzo-p-dioxin and -furan content of soils and vegetation since the 1940s. *Environmental Science and Technology* 25, 1619–1627.

Lundebye A.-K., Bernttsen M.H.G., Lie O., Ritchie G., Isosaari P., Kiviranta H., Vartiainen T. (2004). Dietary uptake of dioxins (PCDD/PCDFs) and dioxin-like PCBs in Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture Nutrition* 10, 199-207.

Mackay D, Shiu WY, Ma KC. 1992. Illustrated Handbook of Physical Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Volume II: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins, and Dibenzofurans. New York, NY: Lewis Publishers.

Ministero Politiche agricole, alimentari, forestali, 2007. I° programma nazionale triennale della pesca e dell'acquacoltura. Disponibile all'indirizzo: http://www.governo.it/GovernoInforma/Dossier/Pianocomunicazione_pesca/02_Programm

[a_Triennale%20pesca_2007-2008%20\(2\).pdf](#)

Ministero Politiche agricole, alimentari, forestali, 2009. Pesca e acquacoltura,
Disponibile all'indirizzo:
http://www.politicheagricole.it/PescaAcquacoltura/Acquacoltura/005_EstensivaIntensiva.htm#A

Mortimer DN, Gem M, Rose M, Fernandes A, White S, Knowles. (2006) Dioxins and PCBs in farmed and wild fish. how important is the difference? *Organohalogen Compounds* 68, 616-619.

Oehme M., Manø S., & Bjerke B. (1989). Formation of polychlorinated dibenzofurans a dibenzo-p-dioxins by production processes for magnesium and refined nickel. *Chemosphere* 18, 1379-1389.

RACCOMANDAZIONE 2006/88/CE DELLA COMMISSIONE del 6 febbraio 2006 relativa alla riduzione della presenza di diossine, furani e PCB nei mangimi e negli alimenti.

Rappe C. & Andersson R. (1992a). Analyses of PCDDs and PCDFs in wastewater from dish washers and washing machines. *Organohalogen Compounds* 9, 191–194.

Rappe C. & Andersson R. (1992b). Levels of PCDDs and PCDFs in human feces. *Organohalogen Compounds* 9, 195–198.

Rappe C. (1994). Dioxin, patterns and source identification. *Fresenius Journal of*

Analytical Chemistry 348, 63–75.

Rappe C., Kjeller L.-O., Kulp S.-E., & de Wit C. (1991). Levels, profile and pattern of PCDDs and PCDFs in samples related to the production and use of chlorine. *Chemosphere* 23, 1629–1636.

REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.

REGOLAMENTO (CE) N. 199/2006 DELLA COMMISSIONE del 3 febbraio 2006 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili.

Ritter L, Solomon KR, Forget J, Sternoff M, Leary CO. (1996). Persistent Organic Pollutants. An Assessment Report on: DDT-Aldrin-Dieldrin-Endrin-Chlordane Heptachlor-Hexachlorobenzene Mirex-Toxaphene Polychlorinated Biphenyls Dioxins and Furans. Prepared for the International Programme on Chemical Safety. Disponibile all'indirizzo: : <http://irptc.unep.ch/pops/indxhtmls/asses0.html>.

Safe S. (1987). PCBs and human health. In *Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology — Environmental Toxin Series* 1, 133–145. Safe S. & Hutzinger O., Eds., Springer-Verlag (Berlin).

Schulz D.E., Petrick G., & Duinker J.C. (1989). Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environmental Science and Technology* 23, 852–859.

Serrano R., Barreda M., Blanes M.A. (2008). Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea

bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea. *Marine Pollution Bulletin* 56, 963–972.

Sewart A., Harrad S.J., McLachlan M.S., McGrath S.P., Jones K.C. (1995). PCDD/Fs and non-o-PCBs in digested U.K. sewage sludges. *Chemosphere* 30, 51–67.

Stapleton HM, Letcher RJ, Baker JE (2002). Uptake, metabolism and depuration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by the common carp, (*Cyprinus carpio*). *Organohalogen Compounds* 58: 201-204

Stapleton HM, Alae M, Letcher RJ, Baker JE (2004a). Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environmental Science and Technology* 38: 112-119

Stapleton HM, Letcher RJ, Li J, Baker RA (2004b). Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1939-1946

Stapleton HM, Letcher RJ, Baker RA (2004c). Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology* 38: 1054-1061

Stringer R.L., Costner P., & Johnston P.A. (1995). PVC manufacture as a source of PCDD/Fs. *Organohalogen Compounds* 24, 119–123.

The Taxonomicon (2010). *Sistema Naturae*. Disponibile all'indirizzo: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx>

UNECE 1998. UNECE — Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants, Aarhus (Denmark), 24 June 1998. Convention on Long-range Transboundary Air Pollution 1998. Disponibile all'indirizzo: http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.htm

UNEP 2001. UNEP – Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Stockholm (Sweden) 22 May 2001. Disponibile all'indirizzo: http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf

US EPA (1994). Method 1613B. Tetra- through octachlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC-HRMS. Engineering and Analysis Division (4303), Office of Water, US Environmental Protection Agency (Washington).

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X., Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., & Zacharewski T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health and Perspectives* 106, 775–92.

Van den Berg Martin, S. Birnbaum Linda, Denison Michael, De Vito Mike, Farland William, Feeley Mark, Fiedler Heidelore, Hakansson Helen, Hanberg Annika, Haws Laurie, Rose Martin, Safe Stephen, Schrenk Dieter, Tohyama Chiharu, Tritscher Angelika, Tuomisto Jouko, Tysklind Mats, Walker Nigel, E. Peterson Richard. (2006) The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences* 93, 223–241

WHO (1989). Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans. Environmental Health Criteria 88. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization (Geneva).

WHO (1993). Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition). *Environmental Health Criteria* 140. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization (Geneva).

WHO (1994). Brominated Diphenylethers. *Environmental Health Criteria 162*. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization (Geneva).

WHO (2001). Joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives (JECFA). Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls. Food Additives Series: 48. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Disponibile all'indirizzo: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je20.htm>

WHO (2003). Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution. *Health risks of Persistent Organic Pollutants from Long-Range Transboundary Air Pollution*. Copenhagen (Denmark), 2003. Disponibile all'indirizzo: <http://www.euro.who.int>