



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
**Dottorato di Ricerca in “Scienze Biomediche Applicate”**  
**XXIII Ciclo**

---

**Tesi di Dottorato**

**Monitoraggio dell’ambiente marino costiero del Golfo di Catania**  
**attraverso la specie bioindicatrice *Engraulis encrasicolus***

**Dott.ssa Chiara Copat**

Coordinatore:

Chiar.mo **Prof. A. Palmeri**

Tutor:

Chiar.mo **Prof. R. Fallico**

---

**ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012**

# INDICE

<b>1.0 INTRODUZIONE.....</b>	<b>pag. 4</b>
<b>2.0 I PESCI COME BIOINDICATORI E I BIOMARKERS DI ESPOSIZIONE.....</b>	<b>pag. 7</b>
<b>2.1 I pesci come bioindicatori.....</b>	<b>pag. 7</b>
<b>2.2 I biomarkers di esposizione.....</b>	<b>pag. 7</b>
2.2.1 Metallotioneine (MTs).....	pag. 9
2.2.2 Proteine da stress termico HSP70.....	pag. 10
2.2.3 Citocromo P450 e 7-etossiresorufina- O-dietilasi (EROD) .....	pag. 11
<b>3.0 CONTAMINANTI ANALIZZATI.....</b>	<b>pag. 13</b>
<b>3.1 Metalli .....</b>	<b>pag. 13</b>
<b>3.2 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) .....</b>	<b>pag. 29</b>
<b>3.3 Policlorobifenili (PCB) .....</b>	<b>pag. 34</b>
<b>3.4 I Pesticidi.....</b>	<b>pag. 41</b>
3.4.1 I Pesticidi Organoclorurati Analizzati – DDT, DDD, DDE.....	pag. 43
<b>4.0 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E BIOLOGICHE DELLA SPECIE STUDIATA.....</b>	<b>pag. 48</b>
<b>5.0 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag. 51</b>
<b>5.1 Determinazione dei metalli.....</b>	<b>pag. 51</b>
<b>5.2 Determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici .....</b>	<b>pag. 54</b>
<b>5.3 Determinazione Policlorobifenili (PCB) .....</b>	<b>pag. 57</b>
<b>5.4 Determinazione dei Pesticidi.....</b>	<b>pag. 62</b>
<b>5.5 Determinazione di proteine su campioni di fegato tramite tecnica Western Blotting.....</b>	<b>pag. 63</b>
<b>5.6 Determinazione di proteine su campioni di branchie tramite tecnica Immunoistochimica.....</b>	<b>pag.67</b>
<b>5.7 Determinazione dei tassi di consumo e relativi fattori di rischio.....</b>	<b>pag.70</b>

<b>6.0</b>	<b>RISULTATI</b> .....	<b>pag. 73</b>
<b>6.1</b>	<b>Metalli</b> .....	<b>pag. 73</b>
<b>6.2</b>	<b>Idrocarburi policiclici aromatici (PAHs)</b> .....	<b>pag. 85</b>
<b>6.3</b>	<b>Policlorobifenili Diossina-Simili</b> .....	<b>pag. 91</b>
<b>6.4</b>	<b>Pesticidi clorurati</b> .....	<b>pag. 93</b>
<b>6.5</b>	<b>Rilevazione dei Biomarkers tramite Western Blotting e Immunoistochimica</b> .....	<b>pag. 95</b>
<b>6.6</b>	<b>Tassi di consumo</b> .....	<b>pag. 98</b>
<b>7.0</b>	<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b> .....	<b>pag. 100</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>pag. 107</b>

## 1.0 INTRODUZIONE

L'ambiente viene di continuo sottoposto all'immissione di sostanze xenobiotiche il cui rilascio è dovuto principalmente ad attività antropiche. Una delle più complesse problematiche sociali della nostra epoca nasce, infatti, dalla frenetica corsa dei paesi industrializzati verso il mito del "tutto e subito".

Nell'ultimo millennio, l'agricoltura intensiva, la produzione di energie, la crescita industriale, le attività di trasporto e quelle ricreative, sorte allo scopo di soddisfare l'attuale concezione di benessere di una società sempre più esigente, hanno portato ad una drammatica contaminazione dell'ecosistema globale, provocando, in certi casi, gravi alterazioni ambientali. Si stima che fino ad oggi siano stati prodotti dall'industria chimica più di 100.000 composti di sintesi e che essi, almeno in parte, siano stati rilasciati nell'ambiente. Solo a partire dagli anni sessanta, i sempre più frequenti segnali d'allarme di situazioni ambientali compromesse indicarono l'esigenza, prima nella comunità scientifica e successivamente nelle autorità politico-amministrative, di una maggiore conoscenza delle problematiche legate alla contaminazione ambientale di origine antropica. E' in questo periodo che l'uomo inizia a percepire il pericolo dei potenziali effetti avversi a lungo termine delle sostanze xenobiotiche e del loro impatto sugli ecosistemi .

La "contaminazione ambientale" può essere definita come la conseguenza di un'azione umana capace di modificare le proprietà o la qualità delle risorse in un determinato intervallo di spazio e di tempo (Vighi e Bacci, 1998).

Il bersaglio ultimo per la maggior parte degli xenobiotici risulta spesso essere l'ambiente acquatico, sia perché essi vengono direttamente scaricati in mare o nei corsi d'acqua, sia perché vi giungono in seguito a processi idrologici o atmosferici (Stegeman e Hahn, 1994). E' necessario considerare, infatti, che i mari costituiscono il recapito finale delle acque dolci, spesso anch'esse pesantemente inquinate. Il quadro si complica ulteriormente se oltre a valutare la possibilità di immissione degli inquinanti in un dato ambiente si tiene conto delle interconnessioni tra i vari comparti ambientali.

Secondo la definizione ufficiale dell'O.N.U. l'inquinamento marino consiste nell'introduzione diretta o indiretta, da parte dell'uomo, nell'ambiente marino di sostanze e di energie capaci di produrre effetti negativi sulle risorse biologiche, sulla salute umana, sulle attività marittime, e sulla qualità delle acque. Una definizione più rilevante di "inquinamento idrico" ci è fornita dal D.lgs. 15 Maggio 1999 n. 152 che lo definisce come *"Lo scarico effettuato, direttamente o indirettamente, dall'uomo nell'ambiente idrico di sostanze o di energia le cui*

*conseguenze siano tali da mettere in pericolo la salute umana, nuocere alle risorse viventi e al sistema ecologico idrico, compromettere le attrattive o ostacolare altri usi legittimi delle acque".* Tale concetto appare estremamente rilevante perché fornisce una definizione giuridica ufficiale di quel fenomeno complesso che è rappresentato dall'inquinamento in senso stretto.

Per molto tempo si è ritenuto che il mare, data la sua vastità, fosse in grado di sopportare qualsiasi carico inquinante senza conseguenze. Solo i continui progressi delle scienze ambientali, della tossicologia e dell'epidemiologia hanno progressivamente richiamato la nostra attenzione sui danni che minacciano non solo il mezzo marino ma anche per via indiretta l'uomo. E' quindi fondamentale che si punti globalmente ad un obiettivo comune mirato alla salvaguardia della biosfera in un nuovo modello sociale di "sviluppo sostenibile", per un miglioramento della qualità della vita, senza eccedere la capacità di carico degli ecosistemi di supporto, dai quali essa dipende.

Negli ultimi anni lo sviluppo di nuove tecniche e di saggi sempre più sofisticati ha permesso di migliorare i piani di monitoraggio ambientale attraverso l'utilizzo di specie bioindicatrici (Al-Yakoob et al., 1993; Andral et al., 2004; Bayarri et al., 2004; Coelhan et al., 2006; De Andrade et al., 2004; Dural et al., 2006; Perugini et al., 2010) superando i limiti dello studio di biomonitoraggio classico, che è mirato alla semplice valutazione delle concentrazioni di contaminanti nel comparto abiotico, e che si presenta inefficace per quanto riguarda l'individuazione dei meccanismi attraverso i quali i contaminanti perturbano le comunità biologiche. L'utilizzo dei biomarkers supera tale limite ponendosi all'interno di un approccio indirizzato allo studio dello "stato di salute" di un ecosistema e delle sue componenti, valutando gli "early adverse effects" provocati dai contaminanti direttamente sugli organismi nel loro ambiente naturale (Depledge, 1994; Bucheli et al., 1995; Fossi et al., 2000; van der Oost et al., 2003; Linde-Arias et al., 2008; Doherty et al., 2010; Fasulo et al., 2010; Flammarion et al., 2010; Ji et al., 2010). Infatti la sola presenza di contaminanti chimici in un segmento di ecosistema acquatico, non indica di per se stessa gli effetti dannosi, ma secondo van der Oost et al. (2003) è necessario stabilire delle connessioni tra i livelli di background (cioè i livelli presenti nel comparto abiotico), i livelli interni di contaminazione tissutale degli organismi, e gli "early adverse effects". Negli ultimi decenni, tra i bioindicatori di nuova generazione, i pesci hanno assunto un crescente interesse come indicatori per la valutazione della qualità ambientale in differenti sistemi acquatici (Whitfield, 1996), e l'analisi dei livelli di contaminanti presenti nei loro tessuti e i rispettivi biomarkers di esposizione, rappresenta il principale tra gli obiettivi perseguiti nei programmi di biomonitoraggio ambientale (Fossi, 1998).

Inoltre, nella comunità scientifica, sta crescendo sempre di più l'interesse di conoscere i reali rischi per la salute umana, derivanti dall'esposizione alimentare a singoli contaminanti o a gruppi di contaminanti (Domingo et al., 2007; Marti-Cid et al., 2008; Llobet et al., 2006; Llobet et al., 2007; Falco et al., 2006; Spada et al., 2011; Turik et al., 2011; Storelli et al., 2009; Copat et al., 2011). Infatti, sebbene dal consumo di pesce derivino diversi benefici nutrizionali dovuti soprattutto al contenuto di proteine di alta qualità (il pesce fornisce il 17% delle proteine totali di origine animale e il 6% delle proteine totali consumate dall'uomo), di vitamine ed di altri nutrienti essenziali (Thvonen et al., 2000; Adeyeye et al., 2002; Chen et al., 2006; Zalloua et al., 2007; Ersoy et al., 2010), il bilancio tra benefici e rischi dovuti all'ingestione di contaminanti chimici, è stato ad oggi poco caratterizzato (Domingo et al., 2007). Per valutare i rischi per la salute del consumatore diviene necessario calcolare gli specifici tassi di consumo (giornaliero e settimanale) per singolo contaminante, confrontandoli con i livelli tossicologicamente accettati consigliati dalla FAO/WHO (Food and Agricultural Organization/World Health Organization) (Llobet et al., 2003), e quantificare il numero di pasti ammissibili per non incorrere in effetti cancerogeni (entro un limite di rischio di  $10^{-5}$ ) e cronici sistemici (EPA, 2000).

Il presente studio si propone quindi di valutare il possibile inquinamento del golfo di Catania e la possibile variazione del livello di bioaccumulo rispetto alle fasi del ciclo biologico della specie *Engraulis encrasicolus* (Linneo, 1758), tramite la ricerca di metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB) e pesticidi clorurati (Total DDT) in campioni di muscolo, e la valutazione, su campioni di branchie e di fegato, di biomarkers di esposizione a tali contaminanti quali: le metallotioneine (MTs); le proteine da stress termico o "heat shock proteins" (HSP70); l'ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD). Inoltre, sono stati calcolati i tassi di consumo relativi a questa specie ittica, tra le più rilevanti da un punto di vista economico per le marinerie della Sicilia, al fine di valutare i possibili rischi per la salute dell'uomo.

## 2.0 I PESCI COME BIOINDICATORI E I BIOMARKERS DI ESPOSIZIONE

### 2.1 I pesci come bioindicatori

Molti gruppi di organismi sono stati proposti come indicatori di cambiamenti ambientali ed ecologici; sebbene non esista un gruppo che metta d'accordo tutti i biologi, sembra che i pesci abbiano ricevuto notevoli attenzioni.

I pesci, infatti, sono stati utilizzati con successo come bioindicatori dei cambiamenti della qualità dell'ambiente in una grande varietà di habitat acquatici in quanto presentano numerosi vantaggi al fine del monitoraggio ambientale (Withfield and Elliott, 2002): 1) sono tipicamente presenti in tutti i sistemi acquatici, con l'eccezione di acque altamente inquinate; 2) per molte specie sono disponibili molte informazioni riguardo la risposta ambientale; 3) rispetto a molti invertebrati, i pesci sono relativamente facili da identificare e molti esemplari possono essere processati sul campo, e rilasciati in acqua (in caso di campionamento non distruttivo); 4) le comunità di pesci includono specie che rappresentano una ampia varietà di livelli trofici; 5) i pesci sono comparativamente più longevi di organismi invertebrati e forniscono, quindi, registrazioni a lungo termine dello stress ambientale. In particolare la "salute" dei pesci viene sfruttata come eccellente biomarker: la "salute" cellulare, rappresenta l'integrità strutturale delle componenti cellulari e il mantenimento dei processi cellulari a livello biochimico; la "salute" individuale, descrive la condizione strutturale, morfologica e funzionale dell'intero organismo; la "salute" della popolazione, rappresenta la sostenibilità ed il mantenimento della popolazione di una particolare specie; la "salute" della comunità, rappresenta l'appropriato insieme di organismi e le relazioni tra le specie di questo insieme. Correlato alla salute dei pesci, vi è lo "stress", cioè l'effetto cumulativo e quantificabile di fattori o combinazioni di essi, che operano su un individuo, una popolazione, una comunità o un ecosistema e che spesso riduce la fitness di sopravvivenza di ogni livello biologico di organizzazione. I pesci possono, inoltre, costituire un sistema per individuare dei potenziali rischi per la salute umana e un sistema di verifica dell'efficienza d'interventi di riqualificazione degli ambienti acquatici (Tancioni et al, 2005).

### 2.2 I biomarkers di esposizione

Depledge et al. (1994) definiscono come biomarker *“quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido*

*biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) e che dà evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti e/o radiazioni".*

L'utilizzo di biomarkers permette, attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione di sistemi detossificanti, alterazioni del DNA, ecc.), di prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine (cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive, ecc.); il ruolo dei biomarkers non è quello di dare informazioni quantitative sui livelli di esposizione di un organismo, ma è quello di fornire indicazioni sullo "stato di salute" come segnale potenziale di alterazioni ambientali (Fossi, 1998).

Al fine di valutare le forze e le debolezze dei biomarkers utilizzati sul pesce, Stegeman et al. (1992) hanno proposto sei criteri comprendenti le informazioni più importanti che dovrebbero essere disponibili o che sono già stati stabiliti per ciascun candidato biomarker:

- Il test per quantificare il biomarker deve essere affidabile (con garanzia di qualità), relativamente economico e facile da eseguire;
- La risposta deve essere sensibile all'esposizione di un tipo di inquinante o ai suoi relativi effetti, al fine di servire come un parametro di allarme precoce;
- I dati a disposizione del biomarker devono essere ben definiti al fine di distinguere tra la variabilità naturale (rumore) e lo stress indotto dal contaminante (segnale);
- L'entità dei fattori che possono confondere sull'interpretazione delle risposte dei biomarkers deve essere ben definita;
- Il meccanismo alla base dei rapporti tra la risposta del biomarker e l'esposizione a sostanze inquinanti (dosaggio e tempo) deve essere istituito;
- La rilevanza tossicologica dei biomarkers, come ad esempio i rapporti tra la sua risposta e
- (a lungo termine) l'impatto per l'organismo, deve essere istituito.

I biomarkers vengono comunemente classificati a seconda del loro segnale in: *biomarkers di esposizione*, che per definizione sono tutte quelle risposte di un organismo, ai diversi livelli di complessità strutturale, che indicano l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici, ma che non forniscono nessuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull'organismo; *biomarkers di effetto*, cioè tutte quelle risposte che indicano sia l'esposizione che l'effetto di un composto tossico (Fossi, 1998).

I biomarkers analizzati in questo studio, quali le metallotioneine (MTs), le proteine da stress termico HSP70 e l'enzima 7-etossiresorufina-O-dietilasi (EROD), fanno parte di quel



gruppo di biomarkers che dà risposte generate in un organismo a seguito dell'esposizione a composti inquinanti, caratterizzati dalla "induzione" dell'attività di proteine funzionali. A questo gruppo di biomarkers sono ascrivibili i meccanismi adattivi e protettivi coinvolti nella detossificazione da composti xenobiotici ed i meccanismi di difesa nei confronti dei metalli pesanti. In qualità di sistemi "substrato-inducibili" e "substrato-specifici" essi risultano estremamente specifici dal punto di vista qualitativo ed inoltre forniscono un segnale "precoce" e semiquantitativo della presenza di una particolare classe di contaminanti (Fossi, 2000).

### **2.2.1 Metallotioneine (MTs)**

Le metallotioneine (MTs) sono proteine non enzimatiche, citosoliche o nucleari a basso peso molecolare, caratterizzate da un elevato contenuto di cisteina (20-30%) e dall'assenza di amminoacidi aromatici e istidina. Le MTs sono "substrato inducibili" in presenza di ioni metallici, legandoli grazie all'elevatissima affinità che hanno per alcuni di essi, e di conseguenza costituiscono uno dei biomarkers di elezione per questa classe di contaminanti (Viarengo, 1989).

La presenza delle MTs è stata riscontrata in tutto il regno animale, dagli invertebrati (echinodermi, anellidi, molluschi, artropodi) ai vertebrati (pesci, anfibi, rettili, uccelli, mammiferi). Nei mammiferi sono state identificate più di dieci isoforme, nei pesci una o due.

La principale funzione biologica di tali proteine risiede nella regolazione della concentrazione intracellulare dei metalli essenziali Zn e Cu e nella detossificazione da questi o da altri metalli non essenziali (Roesijadi and Robinson, 1994; Marijić and Raspor, 2010). Le MTs sequestrano i metalli o li cedono, rendendoli disponibili per le reazioni biochimiche, a seconda delle necessità. L'effetto di detossificazione delle MTs negli organismi marini è stato descritto da molti autori che hanno individuato una correlazione tra la comparsa di MTs e l'aumentata tolleranza ai metalli potenzialmente tossici. E' da notare che esiste una soglia di concentrazione dei metalli nei tessuti a cui la MT è sintetizzata. Altra possibile funzione attribuita alle MTs è quella che le vede prendere parte ai processi di allontanamento dei radicali liberi. Nei pesci sembra che tali proteine possano essere diversamente espresse in relazione al contenuto tissutale di metalli. Alcuni pesci hanno livelli tissutali di metalli eccezionalmente alti, specialmente a livello epatico. In alcuni pesci tropicali livelli fisiologicamente alti di Zn sembrano essere associati con i processi riproduttivi mentre altre specie presentano un accumulo di Cu con andamento dipendente dall'età.

La capacità di induzione delle MTs è maggiore nei tessuti più attivamente responsabili dell'assunzione, immagazzinamento ed escrezione dei metalli e cioè, intestino, fegato e branchie (Roesijadi and Robinson, 1994). In alcuni pesci i livelli di MTs aumentano con andamento dipendente dalla dose e dal tempo di esposizione a metalli pesanti (George e Young, 1986; George, 1989; Hogstrand, 2002). La capacità di induzione dei diversi metalli varia con la specie ed il particolare tessuto. Nelle branchie di carpe, per es., è stato osservato il seguente ordine di intensità: Hg>Cd>Ag>Zn (Cosson, 1994). Alcuni metalli, come ad es. il Pb, non inducono sintesi di MTs. Generalmente le MTs hanno elevata affinità per il mercurio che, infatti, è in grado di allontanare il rame o lo zinco dalla molecola. Ciò può portare ad una riduzione delle normali concentrazioni tissutali di questi metalli essenziali in condizioni di prolungata esposizione ai sali di mercurio. A differenza del mercurio inorganico, il metilmercurio non si lega alle MTs ma ad altre proteine cellulari (es. emoglobina) in grado di sequestrare tale sostanza. E' da sottolineare, tuttavia, che altre condizioni, oltre che l'esposizione ai metalli, possono indurre la produzione di MTs. E' stato infatti dimostrato che sia gli ormoni glucocorticoidi (progesterone e glucagone) che gli ormoni peptidici siano capaci di indurre la sintesi delle MTs. Pertanto, la produzione di MTs può essere indotta anche da fenomeni naturali quali: accrescimento, riproduzione o rigenerazione dei tessuti. E' stato dimostrato inoltre che, fattori come la temperatura e/o lo stato nutrizionale possano influenzare il legame MTs-metalli. E' stato inoltre proposto, che la sintesi di MTs possa essere ridotta in presenza di alti livelli di contaminanti organici a causa di un'aumentata richiesta di residui cisteinici per la sintesi di glutatione. L'estradiolo e gli estrogeni policlorobifenili sembrano inibire l'induzione di metallotioneine Cd- mediata nel salmone artico (Gerpe et al., 2009). Sebbene vi sia un equilibrio dinamico nel legame dei metalli con le MTs, una volta che l'accumulo dei primi eccede la produzione delle altre, il sistema di detossificazione si satura e i metalli in eccesso possono legarsi ad enzimi ad essi sensibili ed esercitare effetti tossici. Tale effetto è stato definito come "spill-over" (Campenhout et al., 2004).

### **2.2.2 Proteine da stress termico HSP70**

Le proteine da stress sono proteine citosoliche che aumentano marcatamente in presenza di stress di varia natura, ambientali, chimici e fisiologici. La loro presenza è stata riscontrata in maniera ubiquitaria nel regno animale. Esse vengono convenzionalmente suddivise in due categorie: le "heat shock proteins" (HSP) o proteine dello shock termico, così chiamate perché identificate per la prima volta in cellule sottoposte a temperature elevate, e le "glucose-

regulated proteins” o proteine regolate dal glucosio. Le prime aumentano marcatamente a livello cellulare in risposta a variazioni termiche ed a vari stress fisici e chimici (Hugget et al., 1992), quali la presenza di metalli pesanti e di composti xenobiotici, la luce ultravioletta, l'anossia e lo stress salino (Stegeman et al., 1992; Di Giulio et al., 1995); la sintesi delle altre aumenta invece in carenza di glucosio e di ossigeno (Stegeman et al., 1992).

Questo gruppo di proteine, coinvolte nella protezione e nella riparazione della cellula, costituiscono, quindi, parte della strategia della cellula per proteggersi dai danni. Per questo motivo possono essere utilizzate come biomarkers generali per la valutazione del grado di stress di un organismo. Le HSP si suddividono in varie famiglie a seconda del loro peso molecolare su gel SDS-poliacrilammide: HSP 90, HSP 70, HSP 60, HSP 20-30. Queste famiglie di proteine da stress si dividono a loro volta in due gruppi: le proteine costitutivamente espresse nelle normali condizioni fisiologiche, che esplicano particolari funzioni nella fisiologia cellulare di base; le proteine altamente inducibili in risposta a stress ambientali (Sanders et al., 1991), tra queste le HSP 70 analizzate nello studio ora condotto.

### **2.2.3 Citocromo P450 e 7-etossiresorufina-O-dietilasi (EROD)**

Uno tra i principali enzimi di biotrasformazione è il citocromo P450, rappresentante di una famiglia di proteine (esistenti in varie isoforme, come il citocromo P450<sub>1A1</sub>) contenenti un gruppo eme, nel quale il ferro si trova solitamente nella forma ossidata di Fe<sup>3+</sup>. Gli enzimi P450 presiedono ad importanti funzioni fisiologiche, come la biosintesi e il catabolismo d'ormoni steroidi, acidi biliari, vitamine liposolubili e la metabolizzazione di molti contaminanti organici nel fegato dei vertebrati. Il citocromo P450<sub>1A1</sub>, in particolare, rappresenta la componente catalitica terminale del sistema multienzimatico delle ossidasi a funzione mista (MFO), un gruppo di enzimi epatici che agisce nella fase I della biotrasformazione di molti xenobiotici organici, tra i quali gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e alcuni congeneri tra i policlorobifenili (PCB). In presenza di una contaminazione da parte di composti organici quali idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB) e altri composti organo-alogenati, nei pesci si verifica l'induzione del citocromo P450<sub>1A1</sub> del fegato, consistente in un congruo aumento di concentrazione di tale enzima e quindi delle attività degli enzimi appartenenti al sistema delle MFO. L'induzione del citocromo P450<sub>1A1</sub> viene assunta come biomarker della presenza di contaminanti organici e può essere determinata indirettamente attraverso la misura delle attività di alcuni degli enzimi appartenenti al sistema delle MFO. Nei pesci, ad esempio, l'attività della 7- etossiresorufina-

O-dietilasi (EROD) rappresenta uno dei biomarkers più sensibili (van der Oost et al., 2003). Tuttavia, sebbene l'induzione nei pesci sia osservata con successo mediante misure di attività enzimatica, in siti fortemente inquinati si possono talora verificare fenomeni d'inibizione dell'attività degli enzimi del sistema multienzimatico delle ossidasi a funzione mista MFO e quindi anche dell'enzima 7-etossiresorufina-O-dietilasi (EROD), probabilmente dovuti ad alcuni congeneri di PCB o metalli come il cadmio (van der Oost et al., 2003).

## 3.0 CONTAMINANTI ANALIZZATI

### 3.1 Metalli

I metalli hanno suscitato un forte interesse per il controllo dell'inquinamento marino, per la facilità con la quale vengono accumulati dagli organismi planctonici e trasferiti negli anelli superiori della catena alimentare giungendo fino all'uomo.

Molti di essi sono presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0,1%; le loro concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce, sono solitamente di parti per milione o per miliardo. Nell'atmosfera le principali sorgenti di metalli di origine antropica sono la combustione e i processi industriali. I metalli sono sostanze con cui conviviamo quotidianamente, perché sono alla base della composizione di molti organismi viventi, ed anche del nostro stesso corpo. Alcuni di essi, però, sono potenzialmente molto tossici, per cui se penetrano nell'ambiente, e quindi nel nostro organismo, in dosi superiori a quelle tollerabili, comportano gravi conseguenze, spesso letali. Una caratteristica che li rende pericolosi è la tendenza ad accumularsi in alcuni tessuti degli esseri viventi provocando effetti negativi per la salute umana e per l'ambiente in generale. I metalli sono largamente utilizzati in tutte le attività produttive, dall'agricoltura all'industria, al terziario avanzato, e a causa di ciò queste sostanze vengono introdotte nell'aria, nell'acqua, nella catena alimentare e vengono quindi assorbite dall'organismo umano. Che cosa si intende però per metalli tossici? In realtà non esiste un elenco univoco dei metalli tossici poiché essi rientrano nella categoria più generale e meglio definita dei metalli pesanti. Con la definizione "metalli pesanti" vengono identificati quegli elementi chimici come alluminio, ferro, argento, bario, berillio, cadmio, cobalto, cromo, manganese, mercurio, molibdeno, nichel, piombo, rame, stagno, titanio, tallio, vanadio, zinco, ed alcuni metalloidi con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali l'arsenico, il bismuto ed il selenio, che presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- hanno una densità superiore a 5,0 g/cm<sup>3</sup>
- si comportano come cationi, ossia come ioni dotati di carica positiva quando entrano in un campo elettromagnetico;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno una tendenza a dare vita a legami chimici complessi;
- hanno una grande affinità con i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi;
- hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH ed EH.

Una delle classificazioni a cui spesso si fa riferimento quando si parla dei metalli dal punto di vista tossicologico è la seguente:

- Metalli essenziali: Na, Ca, K, Mg, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Mo, Zn, etc.
- Metalli non essenziali (tossici) tra cui i metalli pesanti: As, Ag, Au, Be, Cd, Cs, Hg, Pb, Sn, Sr, etc.

La loro tossicità è elevata sia per l'uomo che per tutte le specie viventi perché si legano con le strutture cellulari in cui si depositano, ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali, per cui gli organismi spesso non sono in grado di eliminarli dal loro interno. Non esiste una stretta correlazione tra la concentrazione e la tossicità del metallo in un determinato tessuto. Non sempre il metallo esercita la sua azione tossica nel tessuto o organo dove è presente in maggiore quantità. Il 95% del Pb accumulato nel corpo di un adulto si trova calcificato nel tessuto osseo (ossa e denti) mentre la tossicità si manifesta primariamente a carico dei tessuti renale, nervoso ed emopoietico. Alcuni tessuti possono accumulare in una forma relativamente non tossica elevate quantità di metalli tossici. I metalli generalmente esplicano la propria attività tossica attraverso uno o più dei seguenti meccanismi:

- Inibizione enzimatica diretta – la maggior parte dei metalli tossici presenta un'elevata affinità nei confronti di gruppi funzionali presenti nelle catene laterali di aminoacidi (gruppi sulfidrilici -SH, carbossilici -COOH, amminici -NH<sub>2</sub>, ecc.). In alcuni casi questi gruppi funzionali sono fondamentali per il normale svolgimento dell'attività enzimatica delle proteine cui appartengono o per la loro stabilità strutturale; se tali gruppi vengono impegnati in legami con altri metalli risulta alterata la funzionalità dell'enzima. Hg e Pb bloccano i gruppi sulfidrilici della Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPasi che svolge un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio elettro-osmotico cellulare.
- Effetti metabolici indiretti – in alcuni casi i metalli possono reagire con molecole biologiche che svolgono un fondamentale ruolo biochimico o come cofattori enzimatici o come substrati, impedendo di fatto reazioni enzimatiche attraverso un meccanismo non diretto sull'enzima.
- Sostituzione di metalli essenziali – molti metalli giocano un ruolo essenziale in numerose e fondamentali attività biologiche dell'organismo (attività enzimatica, processi di trasporto di membrana, bilancio osmotico, ecc), la loro sostituzione con metalli che hanno comportamento simile provoca un'inibizione di tali attività. Il cadmio è in grado di spostare lo

zinco da numerosi enzimi la cui attività è a quest'ultimo strettamente legata; il piombo interferisce con il rilascio di neurotrasmettitori mediato dal calcio.

- Squilibri delle concentrazioni di metalli essenziali – un eccesso di un dato metallo può provocare la riduzione dei livelli di concentrazione di un metallo essenziale; questo può avvenire sia per una competizione con i siti di assorbimento che per una competizione per le proteine che svolgono un ruolo di riserva. Carenze di rame possono essere per esempio causate da una eccessiva ma non direttamente tossica esposizione allo zinco; nelle intossicazioni da piombo si manifesta uno squilibrio nelle concentrazioni di numerosi metalli essenziali (ferro, zinco, rame e calcio).

Risulta molto importante ai fini tossicologici la concentrazione effettiva dello ione metallico nelle cellule dove esplica la sua azione tossica. Questa dipende dalla natura chimica del composto di cui il metallo era componente.

Quando si parla di inquinamento da metalli pesanti, normalmente però ci si riferisce a tre di questi elementi, che sono i maggiori responsabili dei danni ambientali, ossia: il mercurio, il cadmio e il piombo.

In questo studio sono stati analizzati metalli appartenenti al gruppo degli essenziali e metalli che, invece, non hanno un ruolo nella nostra fisiologia.

### Arsenico

Sebbene sia a rigore un non metallo, viene normalmente elencato in molti studi insieme ai metalli pesanti. Nell'acqua l'elemento è presente sia in forma organica che inorganica, in forma disciolta o gassosa, per lo più in forma ionica (EPA, 1985). L'azione tossica dei composti arsenicati trivalenti è dovuta al blocco dei gruppi sulfidrilici di alcuni enzimi, con conseguente alterazione di diversi processi metabolici d'importanza vitale; in particolare risultano alterati il metabolismo dei grassi e dei carboidrati e la respirazione cellulare (Buck, 1978). Nella maggior parte degli organismi, le concentrazioni di tale metallo sono, in genere, basse (<1.0 mg/kg peso fresco); risultano invece elevate nell'ambiente marino, dove però, l'arsenico è presente in larga misura sottoforma di arsenobetaine, composti organici che, in quanto tali, rappresentano un rischio minore per gli organismi acquatici e per chi se ne nutre. L'arsenico, pur concentrandosi negli organismi, non va incontro a biomagnificazione nella catena alimentare (Eisler, 1988). Facile risulta anche l'assorbimento dei composti organici che vengono rapidamente rimossi dai tessuti ed escreti (Overby e Frost, 1960; Overby e Frederickson, 1963). Tali composti, inoltre, formano rapidamente complessi reversibili con i gruppi sulfidrilici e idrossilici delle proteine e degli aminoacidi (Venugopal e Luckey, 1978). Benché l'arsenico sia

comunemente conosciuto per le sue proprietà tossiche, risulta essere un elemento essenziale per gli organismi; carenze di questo elemento portano infatti ad uno scarso sviluppo, una ridotta sopravvivenza e un' inibizione dei fenomeni riproduttivi in piante e animali (Eisler, 1988). Solo una piccolissima quota dell'arsenico totale presente nei mari rimane disciolto nell'acqua, la maggior parte, infatti, si lega alle particelle di materiale in sospensione (Mandal B.K. e Suzuki K.T., 2002). Le concentrazioni di arsenico nei tessuti degli organismi marini mostrano un vasto range di valori, in genere più alti nei lipidi, nel fegato e nei muscoli, in base anche a fattori quali: l'età dell'organismo, l'area geografica e la vicinanza ad attività che ne provocano il rilascio (Eisler, 1988). Anche la pelle risulta essere una via d'assorbimento dell'arsenico, che a questo livello è maggiore se i composti sono liposolubili (Venugopal e Luckey, 1978). Una volta assorbito l'arsenico si riversa nel torrente ematico dove si lega alle proteine plasmatiche, in particolare alle  $\alpha$ -globuline (Reilly, 2002) e alle globuline dell'emoglobina negli eritrociti (Venugopal e Luckey, 1978), e successivamente viene trasportato rapidamente a fegato, reni, mucosa intestinale, milza e muscoli.

### Cadmio

Il cadmio risulta essere ampiamente distribuito sulla crosta terrestre; poco utilizzato allo stato puro, è un costituente di molte leghe e molto utilizzati sono anche i suoi composti (ossidi, solfati e cloruri). Alcuni di questi in passato hanno trovato impiego nella produzione di antielmintici, ascaricidi, nematodocidi ed antisettici.

In ambiente acquatico i fenomeni di adsorbimento e di conseguente concentrazione del metallo nei fondali sono strettamente legate alle caratteristiche chimico fisiche dell'ambiente. Un pH particolarmente acido ed un elevato potenziale redox possono aumentare la mobilizzazione del metallo con conseguente maggior possibilità di assunzione da parte degli organismi (Khalid et al, 1981). Gli animali acquatici prelevano il metallo sia dall'acqua che dagli alimenti ingeriti ma non sembra che il cadmio sia suscettibile ai processi di biomagnificazione. In qualità di metallo dotato di elevati effetti tossici, il cadmio non possiede alcun ruolo fisiologico, ed associa un accumulo preferenziale nei tessuti molli ed ha un'emivita prolungata in rapporto alla sua scarsa eliminazione dall'organismo. Il cadmio presenta una capacità di legame con ligandi tiolici inferiore solo a quella di piombo e mercurio; questo spiega, oltre che l'elevata affinità dell'elemento per proteine quali l'emoglobina e le metallotioneine, ricche di gruppi leganti, anche la capacità di formare forti legami con i tessuti, tanto che l'azione degli agenti chelanti, attualmente disponibili per una sua rimozione, risulta inefficace. Una volta assorbito il cadmio passa in circolo legandosi alle proteine



plasmatiche, per essere poi distribuito in tutti i tessuti molli, soprattutto fegato e rene. Essendo in grado di legarsi fortemente a numerosi ligandi di molecole proteiche enzimatiche, ne può provocare una conseguente alterazione della struttura e della funzionalità. Diverse possono essere le conseguenze dell'azione del metallo a livello cellulare; tra queste ricordiamo l'inibizione delle ossidasi a funzione mista, le alterazioni di alcune attività del calcio e del suo trasporto transmembrana, il blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e le variazioni della funzionalità di vari metalloenzimi, quali alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi, superossido dismutasi, ecc. (Sporn et al., 1969; Webb, 1979). La capacità del metallo di sostituirsi allo zinco spiega invece la sua azione sui metalloenzimi; carenze di zinco, infatti, comportano un aggravamento degli effetti tossici causati dal cadmio (Vallee e Ulmer, 1972; Vallee e Glades, 1974). Gli organismi marini generalmente, vivendo in acque più dure, presentano una maggior resistenza rispetto agli organismi d'acqua dolce: sintomi di tossicità, infatti, compaiono per valori pari a 1.2-50 ppb per i primi e a 4-470 ppt per i secondi (Wayland, 2000). I molluschi e i crostacei ne accumulano notevoli quantità e come conseguenza possono mostrare danni all'epatopancreas e all'apparato riproduttore (Dudley et al., 1982). L'esposizione al cadmio comporta infine un aumento nella formazione di radicali superossido, responsabili dell'induzione di rotture del singolo filamento di DNA e perossidazione lipidica (Amoruso et al, 1982; Wahba e Waalkes, 1990). Tra le specie selvatiche i fenomeni tossici, a seguito di esposizione a cadmio, si riscontrano più frequentemente tra le specie acquatiche che non tra le specie aviarie o tra i mammiferi. Già a concentrazioni superiori a 10 ppb si riscontra, infatti, elevata mortalità in crostacei e teleostei; mortalità che risulta essere direttamente proporzionale alla durata dell'esposizione e inversamente proporzionale alla durezza dell'acqua e all'età dell'animale (Spehar et al., 1978; EPA, 1980; Kumada et al., 1980; Canton e Slooff, 1982).

### Cromo

Gli studi condotti per delineare le concentrazioni ambientali del metallo ne definiscono una presenza pari a 200 ppm nella crosta terrestre e a 1-2.5 ppb nelle acque marine, quando invece nelle zone superficiali del terreno e nei vegetali è rinvenibile solo in tracce (Venugopal e Luckey, 1978). Gli animali acquatici prelevano il metallo sia dall'acqua che dagli alimenti ingeriti, con un livello di assorbimento che varia in funzione dello stato di ossidazione del metallo; il cromo trivalente presenta una scarsa attitudine ad attraversare le membrane e per questo viene scarsamente assorbito; il cromo esavalente, in ambiente gastrico, viene rapidamente e spontaneamente ridotto a cromo trivalente con una velocità che varia in

funzione dell'acidità gastrica e della quantità di alimento presente. Nell'organismo il cromo riveste un ruolo essenziale per il trasporto di metaboliti cellulari attraverso le membrane e per il metabolismo dei carboidrati (Preston et al., 1976). Il substrato in grado di accumulare un'importante percentuale del cromo circolante è rappresentato dal tessuto osseo, e la distribuzione, a tale livello, risulta analoga a quella del calcio e dello stronzio, elementi costitutivi del tessuto osseo stesso; altri distretti di accumulo del metallo possono essere fegato, rene e milza. Il cromo è un elemento che, pur essendo in grado di svolgere un ruolo essenziale nel metabolismo dei glicidi in numerose specie animali, risulta altresì caratterizzato da attività cancerogena e capace per concentrazioni elevate, di indurre importanti effetti tossici; mentre il cromo trivalente non sembra presentare particolari effetti tossici per gli organismi, lo ione esavalente si comporta, al contrario, da agente potenzialmente dannoso. Il cromo esavalente desta, infatti, un maggiore interesse dal punto di vista prettamente tossicologico perché capace di indurre alterazioni comportamentali, modificazioni delle attività enzimatiche e dei parametri ematochimici, oltre che una minore resistenza agli agenti infettivi (Eisler 1986). In particolare, i composti esavalenti sono responsabili di effetti neurotossici, genotossici, tossici sul sistema immunitario. Numerosi studi hanno dimostrato che il cromo esavalente induce stress ossidativi, danno al DNA, apoptosi cellulare ed alterata espressione genica (Proietti et al., 2005).

### Ferro

E' il quarto elemento, in abbondanza, della crosta terrestre dopo silicio, ossigeno e alluminio; esso è uno degli elementi il cui ciclo biologico-chimico ha subito notevoli modificazioni a seguito delle attività umane; è il metallo predominante nel nucleo terrestre (90%) e nei minerali più importanti da cui si estrae è in forma di ossidi (magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), solfuri (pirite  $\text{FeS}_2$ ) e carbonati (siderite  $\text{FeCO}_3$ ); negli ecosistemi è presente prevalentemente in forma ossidata come  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$  e ha grande affinità con ossigeno e acqua. Il ferro è, insieme allo zinco, il metallo pesante più rappresentato nelle matrici biologiche ed è presente in concentrazioni elevate soprattutto nei tessuti molto vascolarizzati; è, infatti, un oligoelemento necessario agli esseri viventi e la sua fonte principale non è costituita dall'alimentazione, bensì dai depositi organici e dai prodotti dei processi emocateretici. La quota che si origina dalla distruzione degli eritrociti può essere immediatamente riutilizzata in forma di ferro attivo, piuttosto che essere depositata come ferro di riserva. Allo stesso tempo, tuttavia, a causa della sua capacità di cambiare rapidamente stato di ossidazione, il ferro può rivelarsi tossico, per cui la sua concentrazione deve essere mantenuta costante; questo processo viene attuato da una

proteina plasmatica, la transferrina, appartenente alle  $\beta_1$ -globuline, e da una proteina citosolica delle cellule del sistema reticoloendoteliale, la ferritina (Gutteridge, 1987). Uno dei meccanismi con cui il ferro esplica la sua azione tossica a livello cellulare consiste nella capacità di catalizzare la produzione di radicali idrossilici, potenti agenti ossidanti, capaci di determinare perossidazione delle membrane lisosomiali e depolimerizzazione dell'acido ialuronico con gravi danni all'organismo. In più, il metallo libero o sotto forma di aggregati di ferritina, esplica la sua azione tossica attraverso la produzione di radicali ossigeno e perossidi lipidici. L'elemento può causare l'inattivazione degli enzimi del ciclo di Krebs portando ad un accumulo di acido lattico e altri acidi nel sangue e nei tessuti e diminuendo contemporaneamente il volume plasmatico in ragione di un'aumentata permeabilità capillare (Venugopal e Luckey, 1978).

### Mercurio

Unico metallo liquido a temperatura ambiente; è un elemento abbastanza diffuso in natura. Le fonti naturali di rilascio di mercurio nell'ambiente sono costituite dalle esalazioni vulcaniche, dalle sorgenti termali e dagli sfiati naturali della crosta terrestre. Il Mar Mediterraneo è al centro di un'area sede del 65% delle risorse mondiali dell'elemento; questo trova riscontro nel fatto che i pesci del Mediterraneo, rispetto a quelli atlantici, manifestino livelli più elevati di mercurio. Il mercurio e i suoi composti non possiedono alcuna funzione biologica. La loro presenza nelle cellule degli organismi viventi rappresenta sempre una contaminazione che deve essere considerata come non desiderabile e potenzialmente pericolosa .

I mercuriali organici sono dotati di maggior liposolubilità e perciò vengono assorbiti dal tratto gastroenterico in misura maggiore rispetto ai sali inorganici. Come conseguenza di tale lipofilia, il mercurio proveniente da tali composti si concentra prevalentemente nel tessuto lipidico dei pesci; è in grado di provocare fenomeni di biomagnificazione e il suo comportamento si dimostra particolarmente subdolo in quanto gli organismi ai livelli più bassi della catena alimentare sono quelli più resistenti ai suoi effetti tossici. La concentrazione di Hg aumenta, inoltre, con l'età, con il peso, con la superficie corporea ed è l'unico metallo con queste caratteristiche. Le specie ittiche eliminano molto lentamente il mercurio assorbito. In alcune aree marine mediterranee inoltre, le particolari condizioni di scarso ricambio di ossigeno e di pH determinano produzioni di metilmercurio, principale sorgente di contaminazione dei pesci pelagici. I composti organici del mercurio formano un gruppo estremamente eterogeneo e sono dotati di potenzialità tossicologiche molto varie. Gli

alchilderivati, tra cui il più comune è il metilmercurio, sono i più pericolosi, mentre gli arilderivati ed i composti alcossilchilici sono caratterizzati da una tossicità relativamente inferiore (Jensen e Jernelov, 1972). La natura chimica è probabilmente la maggiore variabile capace di influenzare l'ecotossicologia del mercurio. Il metilmercurio è la specie più pericolosa a causa della sua alta stabilità, della sua solubilità nei grassi e delle sue qualità ioniche, che ne determinano la spiccata capacità di attraversare le membrane biologiche (Beijer e Jernelow, 1979). Negli organismi al vertice della catena alimentare, la maggior parte del mercurio è accumulato in forma metilata, principalmente come risultato del consumo di prede che contengono metilmercurio, ma in piccola parte anche per processi di metilazione che avvengono a livello intestinale (Boudou e Ribeyre, 1983).

### Piombo

Le concentrazioni medie di piombo presenti nella crosta terrestre sono piuttosto basse, circa 15-16 mg/kg; l'elemento si rinviene in numerosi minerali, come la galena, che rappresenta la fonte primaria di piombo allo stato naturale. Il piombo è pressoché ubiquitario ed è utilizzato in una grande varietà di prodotti (Ensley S., 2003). Le concentrazioni di piombo nella flora e nella fauna marine evidenziano una diminuzione di circa il 5% annuo, in linea con il graduale abbandono dell'uso della benzina al piombo. In mare il rilascio del metallo dai sedimenti è favorito a pH acidi, mentre una temperatura elevata e un pH basso in presenza di attività microbiche agevolano la sua organicazione (Chau et al., 1980;). Il piombo è un elemento che può agire come veleno esplicando interferenza con diversi sistemi metabolici in particolar modo nelle forme di intossicazione ad andamento cronico e come agente mutageno, cancerogeno e teratogeno, mentre non esiste alcuna segnalazione, reperibile in letteratura, che ne indichi un ruolo fisiologico. La distribuzione tissutale del metallo inizialmente, grazie alla frazione plasmatica libera, è pari ad un 60% nel tessuto osseo, ad un 25% in quello epatico e ad un 4% in quello renale. Successivamente, la quantità di piombo nelle ossa ammonta al 90%, dimostrando che la distribuzione iniziale è oggetto di una successiva ridistribuzione verso il tessuto osseo; si tratta del cosiddetto "steady state level". Il fenomeno dell'assorbimento del piombo risulta, da un punto di vista quantitativo, influenzato dall'età dell'animale. Una volta assorbito il piombo si riversa nel torrente circolatorio, inizialmente a livello plasmatico per poi penetrare rapidamente negli eritrociti dove si lega all'emoglobina e ad altri componenti cellulari (Raghavan et al., 1980). Il piombo tetraetile, grazie alla sua liposolubilità ed alla sua elevata diffusibilità, presenta un rapido assorbimento gastroenterico, respiratorio e cutaneo. Il composto, nell'organismo, viene in piccola parte metabolizzato, con

rilascio del metallo e successivo accumulo nei tessuti molli, mentre, in funzione della sua lipofilia, si accumula prevalentemente nel tessuto cerebrale (Venugopal e Luckey, 1978).

L'intossicazione cronica da piombo, prevalentemente professionale, viene chiamata saturnismo, può dar luogo a svariate manifestazioni:

- anemia (pallore da riduzione di globuli rossi)
- colica intestinale (dolori addominali)
- ipertensione arteriosa (aumento della pressione del sangue)
- alterazione dell'abilità manuale, aumento dei tempi di reazione
- nefropatia (danno renale)
- neuropatia (danno al sistema nervoso)

L'intossicazione acuta, oggi estremamente rara, può portare all'encefalopatia (danno cerebrale) e al coma.

### Rame

Il rame è un elemento ampiamente rappresentato in natura, presente tanto nel suolo e nelle acque, quanto negli organismi viventi, siano essi vegetali o animali. Fra le numerose applicazioni del rame se ne ricorda un suo utilizzo nella produzione di condutture elettriche e di leghe come bronzo (rame e stagno) e ottone (rame e zinco). I suoi sali vengono tuttora adoperati come antifungini, insetticidi e rodenticidi; l'utilizzo che provoca l'impatto ambientale di proporzioni maggiori in mare è quello che lo vede impiegato come antivegetativo nelle vernici impiegate in ambito navale, come alghicida e come preservante del legno. L'assorbimento del metallo avviene attraverso la mucosa dello stomaco e viene influenzato da numerosi fattori, comprese le caratteristiche dei composti contenenti l'elemento: ossidi, idrossidi, ioduri, glutammati, citrati e pirofosfati passano velocemente in circolo, mentre solfuri e sali insolubili sono assorbiti in minima parte (Van Campen, 1971). La presenza di molibdeno, zinco, ferro, cadmio e argento, così come un elevato apporto proteico nella dieta, ne inibiscono l'assorbimento. Il rame forma complessi con gli amminoacidi presenti nel lume intestinale e, in questo modo, attraversa rapidamente la mucosa con un meccanismo di trasporto attivo. Il rame è un elemento essenziale per gli animali e le concentrazioni più alte si trovano nei crostacei decapodi, nei gasteropodi e nei cefalopodi, nei quali l'emocianina del pigmento respiratorio contiene rame. L'eccesso di rame è immagazzinato di solito nel fegato, tuttavia, in generale, il metallo non si accumula lungo la catena alimentare, non è quindi soggetto a processi di biomagnificazione. Il meccanismo tramite il quale il rame esprime la sua tossicità è abbastanza complesso. Esso implica un

aumento della permeabilità cellulare negli eritrociti con conseguente emolisi, inibizione della glutatione-reduttasi e diminuzione del glutatione intracellulare ridotte un'agglutinazione dei globuli rossi. Questo porta a uno stress ossidativo dei globuli rossi e ad una accelerata perdita del glutatione ridotto intracellulare. Contemporaneamente gli ioni rameici inducono il rigonfiamento dei mitocondri e inibiscono il consumo di ossigeno (Bowler e Duncan, 1970). L'affinità del rame  $2^+$  per i gruppi tiolici dell'emoglobina aumenta la permeabilità e la lisi dei globuli rossi. Infine il rame aumenta la fragilità delle membrane lisosomiali, facilitando il rilascio di enzimi litici che provocano degenerazione cellulare (Chvapil *et al.*, 1972). Non si può stabilire con precisione un livello soglia di tossicità del rame, poiché questo dipende anche dalle concentrazioni di altri metalli come molibdeno, zinco e ferro che competono con il rame nell'assorbimento.

### Zinco

Lo zinco è un metallo non facilmente reperibile in natura, tuttavia, nelle matrici biologiche, dopo il ferro, è il metallo che raggiunge le più alte concentrazioni, trovandosi stabilmente legato ad enzimi o proteine come catione bivalente. Lo zinco possiede una discreta biodisponibilità a partire da numerose fonti, compreso lo zinco elementare ed i sali insolubili; questi ultimi, infatti, vengono solubilizzati dalla mucosa gastrica. L'assorbimento gastrointestinale varia grandemente a seconda dei composti ingeriti e della concentrazione di metallo nell'alimento. La presenza nel cibo di elevate aliquote di calcio, fosforo e rame riduce l'assorbimento di zinco, così come il cadmio compete con esso per gli stessi meccanismi di trasporto (Becker and Hoekstra, 1971). Negli organismi viventi lo zinco presenta distribuzione ubiquitaria, ma tende a concentrarsi soprattutto in muscoli, ossa e tegumento (Venugopal e Luckey, 1978). Lo zinco compare in moltissime classi di enzimi e cofattori biologici: ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, isomerasi e ligasi. Oltre ai suddetti composti, lo zinco entra a far parte di *metallotioneine*, implicate anche nei fenomeni di disintossicazione, e di *proteine regolatrici di geni*, che facilitano o impediscono la trascrizione di un gene. Lo zinco è in grado di legarsi anche con i nucleotidi e in conseguenza di ciò lo si può ritrovare negli acidi nucleici; possiede, inoltre, affinità per i gruppi tiolici (Venugopal e Luckey, 1978). Lo zinco è pure implicato nella modulazione del sistema immunitario, risulta, infatti, da numerosi studi che carenze di zinco provocano ridotta risposta immunitaria cellulo-mediata e diminuzione dell'intensità delle reazioni di ipersensibilità ritardata, a cui consegue maggiore suscettibilità a infezioni e patologie (Adams, 1999). Molti degli effetti tossici dello zinco derivano dalle sue complesse interazioni con altri nutrienti fondamentali, come Cu, Fe, Mg e Ca. Dosi elevate

provocano effetti antagonisti sul metabolismo. Un'intossicazione da zinco altera il metabolismo del Fe favorendone il suo turnover e diminuendo il tempo di vita degli eritrociti e l'accumulo del Fe come ferritina nel fegato (Settlemyre e Matrone, 1967 a, b). Lo zinco è tossico per gli organismi a concentrazioni molto più elevate rispetto agli altri metalli; i meccanismi che ne regolano l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione sono, infatti, molto efficienti. Tuttavia si possono avere alterazioni dell'omeostasi di questo metallo con accumulo di quantità tossiche per un eccessivo apporto con la dieta o per malnutrizione con scarsa assunzione di proteine.

### Manganese

Il manganese è un elemento relativamente abbondante nell'ambiente, si tratta del dodicesimo elemento più comune. Tra i metalli pesanti è secondo soltanto al ferro. Il manganese è presente in tutti i tessuti animali e vegetali, nell'acqua e nel pulviscolo atmosferico; si è rivelato elemento essenziale in ogni specie animale studiata. L'elemento è noto come attivatore di diversi enzimi *in vitro*. Nell'animale, in seguito a carenza indotta sperimentalmente, si evidenziano rallentamento della crescita, deformità scheletriche, diminuzione della capacità riproduttiva e difetti nel metabolismo di carboidrati e lipidi. L'assorbimento è influenzato negativamente dalla presenza di alcuni metalli, come ferro e cobalto e dall'elevato contenuto di calcio e fosforo presenti negli alimenti. Il manganese, dopo essere entrato nel circolo sanguigno, viene in gran parte captato dal fegato. Anche le ossa ne sono abbastanza ricche ed a causa della loro massa contengono la percentuale dell'elemento più elevata del corpo. A dispetto della sua essenzialità, l'eccessiva esposizione al manganese provoca fenomeni di tossicità al sistema nervoso centrale. L'effetto più comune della tossicità da manganese è la carenza secondaria di ferro; ciò è dovuto ad una competizione tra Fe e Mn per i comuni sistemi di trasporto. La tossicità acuta porta a crescita stentata, alterazioni del metabolismo dei carboidrati, alterazioni delle funzioni cerebrali e anomalie comportamentali; la neurotossicità può verificarsi anche con esposizioni a concentrazioni del metallo basse. Prove di laboratorio hanno indicato che un grave avvelenamento da manganese potrebbe essere in grado di causare lo sviluppo di tumori negli animali (Delbono et al 2002).

### Cobalto

Il cobalto è relativamente poco abbondante nella crosta terrestre e nelle acque naturali. Esso non è solitamente estratto in quanto tale, isolato, ma è ottenuto come sottoprodotto dell'attività di estrazione mineraria di nichel e rame. Noto come costituente della vitamina B<sub>12</sub>

(cianocobalamina) e del coenzima B<sub>12</sub>, il cobalto attiva un numero rilevante di reazioni enzimatiche; agisce come sostituto del manganese nell'attivare una serie di enzimi come la dipeptidasi; sostituisce lo zinco in alcuni enzimi e ne attiva altri. Interviene nel metabolismo del ferro stimolando l'eritropoiesi e permettendo così che tale metallo sia incorporato nella protoporfirina. Favorisce la sintesi della timidina, componente del DNA, nonché della colina e della metionina, fattori lipoproteici ed agenti epatoprotettori, capaci di fissarsi in modo selettivo sul tessuto adiposo. Sembra essenziale per la comparsa dei caratteri sessuali e per lo sviluppo di alcune ghiandole. Il cobalto è un oligoelemento immagazzinato soprattutto nel fegato. Un eccesso di cobalto può causare policitemia (proliferazione della linea eritropoietica), ipertrofia della tiroide e ipertrofia cardiaca. Dosi elevate di cobalto possono interferire con reazioni di decarbossilazione, impedire il metabolismo del piruvato e degli acidi grassi e favorire l'assorbimento del ferro e la sintesi della globina.

### Nichel

La maggior parte del nichel presente sulla terra è inaccessibile perché intrappolato nel nucleo fuso ferro-nichel del pianeta. La quantità totale di nichel disciolta in mare è stata calcolata essere intorno agli 8 miliardi di tonnellate. Il materiale organico ha una notevole capacità di assorbimento del metallo e questo spiegherebbe le considerevoli quantità ritrovate in sostanze quali il carbone e l'olio. Il nichel è un minerale in traccia considerato essenziale. Le ricerche eseguite hanno dimostrato che l'elemento copre ruoli importanti nel metabolismo degli ormoni, dei lipidi e nell'integrità della membrana cellulare. E' un attivatore di alcuni enzimi come arginasi, tripsina e carbossilasi e partecipa al metabolismo del glucosio. Se ne trovano quantità importanti nel DNA e nell'RNA e può agire come stabilizzatore di questi acidi nucleici. La carenza di nichel può influenzare il metabolismo di zinco e ferro. Negli animali l'avvelenamento da nichel si manifesta con esaurimento dei grassi e dell'ossigeno nel fegato. L'elemento si accumula nel fegato e nelle ossa. Gli ioni bivalenti come il calcio, il magnesio e lo zinco possono agire in una certa misura da antagonisti. La tossicità dell'elemento aumenta quando il minerale si combina con ossido di carbonio liberando nichel carbonile. Per quanto riguarda i meccanismi della cancerogenesi indotta da nichel, tale elemento esercita un'azione repressiva sul numero delle cellule natural-killer, una subpopolazione di linfociti. In secondo luogo il nichel ed i suoi sali agiscono attraverso la lipido-perossidazione e i metaboliti altamente reattivi prodotti, come il 4-idrossialchenale, provocando danni al DNA e inducendo la formazione di tumori.



## Vanadio

L'elemento è presente principalmente nel petrolio e nei materiali carboniferi e bituminosi, dove è associato alla frazione pesante. Il contenuto di vanadio nei suoli varia considerevolmente (3-310 mg/kg) in relazione al tipo di roccia madre che lo origina. I livelli di vanadio nell'acqua possono arrivare a 220 mg/l; le diversità geografiche sono dovute a differenze di piovosità od alla presenza di effluenti industriali. Il vanadio presente in acqua, derivante da deposizioni secche o umide, rientra nell'atmosfera come aerosol di particelle di sali marini generati sulla superficie dell'oceano. La maggior parte del vanadio che entra nell'acqua marina risulta essere in sospensione o assorbita sui colloidali, non reagisce chimicamente e passa meccanicamente attraverso l'acqua stessa. Questo fenomeno è evidenziato dalla distribuzione dell'elemento sul fondale marino: il vanadio è in prevalenza sottoforma di sedimento mentre soltanto il 10% è in forma solubile. Le basse concentrazioni nell'acqua marina, indicano che il metallo viene continuamente rimosso dall'acqua; ciò avviene sia per assorbimento sia per processi biochimici effettuati dagli organismi. Gli studi *in vitro* e sugli animali indicano che il vanadato e gli altri composti del vanadio fanno incrementare l'attività di trasporto del glucosio (Barceloux, 2000). Il vanadio assorbito viene trasportato dal sangue, prevalentemente legato alle transferrine del siero. In presenza di alcuni fattori biologici nel plasma e nel citoplasma, avviene un lento scambio del vanadio tra transferrina e ferritina. La forma pentavalente (vanadato) predomina nei fluidi corporei extracellulari mentre la forma tetravalente è la più comune forma intracellulare (WHO, 1988). Il vanadio si lega fortemente al citoplasma, al nucleo ed ai mitocondri. L'accumulo del vanadio nell'organismo dipende dalla specie, dall'età, dal composto del vanadio, dalla dose e dalla durata dell'esposizione. In generale la tossicità dei composti del vanadio è bassa, con aumento in relazione all'incremento della valenza: i composti pentavalenti, infatti, sono quelli più tossici (Barceloux, 2000). I principali effetti osservati della tossicità del vanadio sono: alterazioni ematologiche, alterazioni renali, alterazioni del sistema immunitario, mutagenicità, danni alla sfera riproduttiva e danni allo sviluppo (Barceloux, 2000). Gli effetti tossici sono in gran parte la conseguenza delle marcate proprietà ossidative del metallo. E' stata trovata una correlazione diretta tra l'estesa perossidazione lipidica e gli effetti epatotossici e neurotossici.

## Selenio

Il selenio presenta un'ampia ma non uniforme distribuzione nel mondo, esistono infatti delle zone dette "selenifere" caratterizzate da terreni di origine scistosa e di natura organica nei

quali il suolo può contenere anche più di 1000 ppm (Kakin, 1973) e la vegetazione può presentare livelli da far insorgere tossicosi negli organismi animali (Gennaro and Nebbia, 1984). La maggior parte delle altre aree (Italia compresa), invece, non presenta alti livelli dell'elemento. L'aria e le acque generalmente contengono concentrazioni di selenio non pericolose. Aumenti significativi di selenio in aree specifiche in genere sono attribuiti esclusivamente a fonti industriali e al dilavamento di terreni seleniferi. I selenati sono composti relativamente solubili e altamente tossici, simili ai solfati, mentre i seleniti sono praticamente insolubili, tanto da poter essere considerati come forme di deposito del selenio (Goyer, 1996). Quei pochi che sono invece solubili sono altamente tossici e formano con ferro e alluminio dei composti stabili. Nella forma elementare (stato di ossidazione 0) invece, il selenio è insolubile e non tossico. È stato stabilito che il selenio è un nutriente essenziale a basse concentrazioni (0,1 ppm), mentre a concentrazioni eccessive risulta tossico.

Il selenio viene assorbito nell'uomo principalmente a livello intestinale. Il grado di assorbimento è influenzato dalla forma chimica dell'elemento, dalla presenza di sali metallici e anche dalla particolare specie animale (Venugopal and Luckey, 1978). Selenuri metallici come i selenuri di arsenico, rame o cadmio sono caratterizzati da una scarsa solubilità che influenza l'assorbimento, la ritenzione e la distribuzione nel corpo sia del selenio che del metallo pesante (Goyer, 1996). Inizialmente si accumula in maggior quantità nel fegato e nel rene ma si riscontrano livelli apprezzabili anche nel sangue, nel cervello e nel cuore. Da ricordare infine che il selenio è un componente chiave di diversi enzimi nell'uomo. È infatti parte integrante della glutatione perossidasi (GSH-Px) e svolge, insieme alla vitamina E, funzione antiossidante a protezione delle membrane biologiche dai danni provocati dai radicali liberi. Il selenio è un elemento molto tossico, sebbene a basse concentrazioni sia essenziale. La tossicità varia con la forma di selenio assunta, in quanto le forme organiche contenute nei vegetali sono molto più tossiche dei seleniti o dei seleniati, mentre seleniuri e selenio elementare sono relativamente poco tossici (Hatch, 1982). I seleniti possono inoltre reagire con i gruppi tiolici della cisteina o del coenzima A formando selenosolfuri e rendendo inutilizzabili importanti cofattori (Ganther, 1968). È stata formulata un'ipotesi di legame reversibile del selenito con i gruppi -SH dell'acetil-CoA e del malonil-CoA che porterebbe al danneggiamento dei sistemi di respirazione cellulare comportando una ridotta produzione di ATP (Venugopal and Luckey, 1978).

## Fosforo

Il fosforo non si trova in natura allo stato elementare, ma sotto forma di fosfato (sale dell'acido fosforico). E' abbondante in alcune rocce e nelle cellule degli esseri viventi, del cui metabolismo è un componente essenziale. Il fosforo elementare è estremamente reattivo e, combinandosi con l'ossigeno emette una tenue luminescenza. I composti del fosforo sono coinvolti nelle funzioni vitali di tutte le forme di vita conosciute. Gruppi fosfato sono parte delle molecole del DNA, dell'RNA, dell'ATP e dei fosfolipidi. Il fosfato di calcio è un componente essenziale delle ossa e stimola le contrazioni muscolari; il fosforo è inoltre necessario nella mediazione intracellulare, assicura la funzionalità renale e la trasmissione degli impulsi nervosi. Sebbene la carenza di fosforo sia rara in quanto il minerale è presente in una grande varietà di alimenti, un'assunzione insufficiente può determinare difficoltà nella crescita, disturbi ossei come l'osteoporosi, alterazioni della conduzione nervosa, stanchezza mentale e fisica. L'avvelenamento cronico provoca la necrosi del tessuto osseo. Gli esteri fosforici sono velenosi per il sistema nervoso, mentre i fosfati inorganici non sono sostanzialmente tossici. Lo sversamento di grandi quantità di fertilizzanti o detergenti a base fosforica causa l'inquinamento del suolo e delle acque.

## Calcio

Il calcio viene assunto principalmente con la dieta, ma solo in parte viene assorbito dall'intestino (circa il 30%) mentre il resto viene eliminato con le feci. Un importante ruolo svolge il paratormone (PTH), che a livello dei tubuli renali permette il riassorbimento degli ioni Ca, e a livello osseo favorisce il rilascio di Ca da parte degli osteoclasti. Inoltre favorisce la attivazione della Vitamina D che permette un maggiore assorbimento a livello intestinale. In caso di osteoporosi si verifica un eccesso di rilascio di calcio dallo scheletro per effetto degli osteoclasti rispetto a quello depositato nel tessuto osseo neoformato dagli osteoblasti, spesso associandosi anche un insufficiente assorbimento intestinale del calcio. Nelle piante regola la chiusura degli stomi agendo sui canali del K. Un'assunzione quantitativa molto elevata può provocare ipercalcemia e/o ipercalciuria. L'ipercalcemia (eccesso di calcio nel sangue) può provocare disturbi del ritmo cardiaco e sintomi neurologici. L'ipercalciuria (eccesso di calcio nelle urine) può causare precipitazione di sali di calcio (ossalato o fosfato di calcio) nel parenchima renale o formazione di calcoli nelle vie escrettrici. Da ciò la possibilità di insufficienza renale e/o di coliche renali.

### Potassio

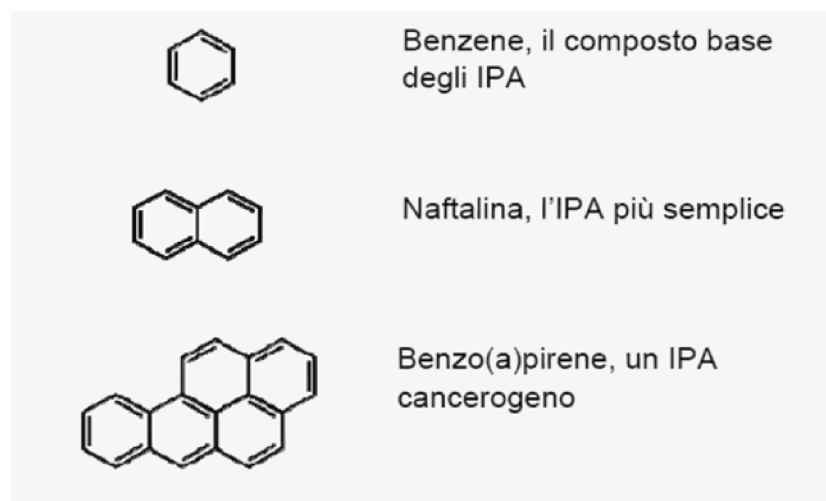
Il potassio è un metallo alcalino tenero, bianco-argenteo, che si trova in natura combinato con altri elementi sia nell'acqua di mare che in molti minerali. Si ossida rapidamente all'aria, ed è molto reattivo, specie con l'acqua; somiglia molto al sodio per il suo comportamento chimico. È facilmente infiammabile e corrosivo; molto leggero, secondo in ordine di leggerezza dopo il litio; è addirittura meno denso dell'acqua. Questo elemento costituisce circa il 2,4% del peso della crosta terrestre, dove è il settimo per abbondanza. In molti minerali è presente in forma di sali insolubili, dai quali è difficile estrarlo. Alcuni suoi minerali, tra cui la carnallite, la polialite e la silvite, vengono generalmente rinvenuti sul fondo di laghi e mari antichi. Nell'organismo, il potassio esiste sotto forma di ione positivo (catione),  $K^+$ , ed è lo ione inorganico più abbondante all'interno delle cellule, dove viene trasportato mediante meccanismi che richiedono un apporto di energia. Molti antibiotici, come ad esempio quelli prodotti dal *Bacillus brevis*, attaccano le cellule batteriche aprendo su di esse canali di scambio attraverso i quali gli ioni  $Na^+$  e  $K^+$  possono attraversare la membrana cellulare, alterando il potenziale elettrico della membrana stessa. La concentrazione di ioni  $K^+$  nel sangue è regolata in maniera da avere fluttuazioni minime, dato che concentrazioni troppo alte (iperkaliemia) o troppo basse (ipokaliemia) possono avere ripercussioni gravi sul cuore e sui nervi.

### Sodio

Il sodio è un metallo soffice, ceroso, argenteo, reattivo. Appartiene alla categoria dei metalli alcalini che è abbondante nei composti naturali. È altamente reattivo, brucia con una fiamma gialla, si ossida a contatto con l'aria e reagisce violentemente con l'acqua. Il sodio compone circa il 2,6% della crosta terrestre rendendolo il quarto elemento più abbondante e il primo tra i metalli alcalini. Gli ioni di sodio giocano un ruolo diverso in molti processi fisiologici. Cellule eccitabili, ad esempio, si affidano interamente al  $Na^+$  per causare una depolarizzazione della membrana cellulare: questo fenomeno, detto potenziale d'azione consiste in rapide variazioni nel potenziale di membrana che passa dal normale valore negativo verso un valore positivo, e termina con una variazione che ripristina il potenziale negativo. Il potenziale d'azione nelle cellule del sistema nervoso permette la trasmissione di informazioni fra cellule.

### 3,2 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) rappresentano una delle classi di composti chimici più significativi dal punto di vista sanitario e il cui monitoraggio nelle diverse matrici ambientali è di fondamentale importanza ai fini della valutazione del rischio per la salute umana. Vengono definiti come IPA composti organici costituiti da due o più anelli benzenici condensati, che possono avere gruppi alchilici o cicloalchilici brevi sostituiti, e sono presenti come miscele molto complesse, variabili secondo la fonte di emissione. (Menichini *et al.*, 1991; 1992; 1994).



Struttura del benzene e di alcuni idrocarburi policiclici aromatici

Gli IPA sono, quindi, presenti nell'ambiente sotto forma di miscele complesse contenenti oltre un centinaio di differenti composti. A causa di questa estrema varietà in genere è possibile identificarne analiticamente solo alcuni. Negli anni 1980 l'agenzia federale europea dell'ambiente (EPA) ha incluso 16 di questi composti nell'elenco dei principali inquinanti ambientali (priority pollutants). Da allora, vengono spesso analizzati questi 16 IPA in rappresentanza di tutta la classe, oppure ci si limita a misurare solo il benzo(a)pirene come sostanza indicatrice; la sua proporzione in una miscela di IPA si attesta con relativa costanza intorno al 10 %, perciò, dal suo tenore si può risalire alla concentrazione complessiva della miscela.

Questi contaminanti vengono di solito suddivisi in funzione del peso molecolare e del numero di atomi in:

- IPA leggeri (2-3 anelli condensati)
- IPA pesanti (4-6 anelli condensati)

Presentano diverse proprietà chimico fisiche tra cui:

- Un'elevata stabilità e una struttura geometrica piana;
- Sono solidi a temperatura ambiente ed hanno punti di ebollizione e di fusione elevati;
- La tensione di vapore è generalmente bassa ed inversamente proporzionale al numero di anelli contenuti;
- Sono poco solubili o del tutto insolubili in acqua e la solubilità diminuisce all'aumentare del peso molecolare;
- Sono altamente lipofili e solubili in molti solventi organici (Lide, 2002-2003);

Gli IPA si possono trovare in natura sia nella fase solida sia gassosa, o legati al particolato in relazione alla temperatura ed alla pressione di vapore ambientale. Generalmente, ad una temperatura di 25°C, IPA costituiti da tre anelli benzenici (quali fenantrene e antracene) si trovano prevalentemente in fase vapore, IPA a 4-5 anelli (quali pirene, fluorantene e benzo[a]pyrene) si distribuiscono invece tra le due fasi, mentre IPA da 6 anelli in su (quali antanantrene e coronene) si trovano quasi esclusivamente in fase solida (Yamasaki et al., 1982). La pressione di vapore degli IPA varia di un ordine di grandezza per ogni cambio di temperatura pari a 15°. Questo implica che ad elevate temperature, caratteristiche dei periodi estivi, anche IPA pesanti quali il benzo[a]pyrene si possono trovare in fase di vapore, mentre alle basse temperature invernali gran parte degli IPA leggeri volatili possono cristallizzare passando allo stato solido. Gli IPA presenti in atmosfera tendono a legarsi al particolato atmosferico con diametro inferiore ai 3 µm (Lane, 1989). In assenza di deposizioni umide queste particelle possono rimanere sospese in atmosfera per parecchi giorni (da 4h ai 40 giorni) (Eswea & Corn, 1971) e presentano pattern di distribuzione e deposizione molto estesi. Gli IPA si formano per combustione in carenza di ossigeno dai derivati del petrolio e del carbone e, più in generale, per processi termici di combustibili fossili, legna, o materiale organico (Becher et al., 1984). Il meccanismo di formazione degli IPA è abbastanza complesso;

esso consiste in una ripolimerizzazione di frammenti di idrocarburo che si formano durante un processo noto come “cracking”, cioè la frammentazione delle molecole più grosse di combustibile in numerose parti più piccole, quando vengono a contatto con il fuoco. La reazione di polimerizzazione avviene soprattutto in ipossia e in genere la velocità di formazione degli IPA aumenta al diminuire del rapporto ossigeno-combustibile. Eruzioni vulcaniche ed incendi boschivi rappresentano le principali fonti di emissione naturali di IPA, mentre quelle antropiche derivano da attività industriali, di trasporto e riscaldamento domestico. Tra le principali sorgenti industriali di IPA sono incluse: le aziende che lavorano i metalli grezzi, le raffinerie di petrolio, gli impianti per la produzione di carbon coke, le industrie che realizzano la carta, le industrie chimiche e quelle plastiche. Per la grande quantità di combustibile fossile utilizzato possono risultare delle fonti rilevanti anche le centrali energetiche. Maggiormente a rischio sono, difatti, coloro che svolgono la propria attività lavorativa in fonderie di ferro e acciaio, industrie di produzione dell'alluminio, processamento del combustibile fossile, pavimentazione delle strade. Negli ultimi 100 anni la concentrazione di questi contaminanti nella biosfera (acqua, aria, suolo) è in continuo aumento (Jones et al., 1989) e questo incremento è di certo imputabile alle emissioni antropiche. Dal momento che molti di questi composti e loro derivati si sono recentemente rivelati cancerogeni e mutagenici, diventa prioritario individuare efficaci misure di controllo e abbattimento di queste emissioni. Da alcuni anni, in molti paesi industrializzati, si stanno sviluppando applicazioni tecniche e normative in grado di far fronte a questo problema sanitario emergente, obbligando ad esempio l'impiego esclusivo di automobili catalizzate; secondo Rogge et al. (1993), le vetture non catalizzate emettono una quantità di IPA quasi trenta volte superiore alle vetture dotate di questo dispositivo. Delle quantità relativamente alte di IPA si possono trovare persino nel cibo come conseguenza di vari metodi di cucina, soprattutto negli alimenti cotti alla brace o per affumicatura; oppure possono essere presenti in seguito alla deposizione atmosferica su frutta e ortaggi presenti in aree agricole inquinate (Phillips, 1999). Quanto detto fin'ora spiega come mai gli Idrocarburi Policiclici Aromatici sono stati inclusi in una più ampia classe di inquinanti conosciuti con il nome di Inquinanti Organici Persistenti, cioè sostanze organiche che resistono ai processi ambientali di degradazione naturale, ovvero di scissione o trasformazione in altre sostanze grazie a meccanismi di origine chimica o biologica o originati dall'azione della luce (denominati per questo fotolitici). Gli IPA, quindi, sono composti chimicamente stabili e poco degradabili attraverso l'idrolisi (Howard et al., 1991), mentre sono suscettibili all'ossidazione e alla fotodegradazione. In genere, infatti, gli idrocarburi policiclici aromatici presenti nell'aria

possono degradarsi reagendo con la luce del sole e con altri composti chimici nel giro di qualche giorno o settimana. Quelli di massa maggiore, invece, aderiscono al particolato aerodisperso e, prima o poi, vanno a depositarsi al suolo. Dagli studi è emerso che la degradazione abiotica, nei suoli contaminati, può rimuovere (in un paio di anni dal 2 al 20%) quelli con tre anelli aromatici (Parks et al., 1990), mentre gli IPA con 4 o più anelli aromatici persistono nell'ambiente e possono essere assorbiti dalla materia organica. Per questa loro relativa stabilità, gli IPA si possono riscontrare anche a grandi distanze in località remote e molto lontane dalle zone di produzione. E' stato stimato che la vita media nel suolo e nell'aria può dipendere da vari parametri (ad esempio il tipo di adsorbimento su particelle, peso molecolare) e varia da alcune ore per l'aria a mesi o anni per il suolo. Gli idrocarburi policiclici aromatici sono anche importanti inquinanti delle acque; quando il particolato contenente gli IPA cade nelle acque superficiali, sia marine che interne, questi contaminanti, se hanno un basso peso molecolare restano in superficie, se invece hanno un peso molecolare elevato scendono in profondità, arrivando sui fondali dove si accumulano nei sedimenti. Una volta adsorbiti nei sedimenti vi restano fortemente legati costituendo un potenziale serbatoio di tali sostanze, e gli organismi che vivono sui fondali, come i filtratori e i bentonici se esposti ad alte concentrazioni possono bioaccumularli e biotrasformarli. Spesso la ricerca ha, infatti, riscontrato elevate concentrazioni di IPA in prodotti ittici provenienti da mari contaminati (Al-Yakoob et al., 1993; DouAbul et al., 1997). Questi inquinanti, analogamente ai metalli pesanti, tendono ad accumularsi in alcuni tessuti degli esseri viventi (bioaccumulo) poiché sono composti lipofili; la loro eliminazione dipende dalla capacità dell'organismo stesso di trasformarli in metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione. Anche se singolarmente nessuno degli IPA è stato sino ad ora classificato come cancerogeno certo per l'uomo, è noto che l'esposizione può causare neoplasie della pelle, del polmone e della vescica (Minoia *et al.*, 2000). La IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato alcuni di tali idrocarburi come possibili (gruppo 2A) o probabili (gruppo 2B) cancerogeni per l'uomo. Inoltre, otto IPA sono classificati dalla CEE con la frase R45 (agente cancerogeno per l'uomo) rientrando così, in ambito nazionale, nel D.Lgs. 626/1994 e successive modifiche (Apostoli et al., 1997; Petry et al., 1996). L'effetto tossico di questi composti si manifesta principalmente attraverso due tipi di interazione con le strutture cellulari:

- formazione di legami reversibili con siti lipofici che possono impedire i normali processi della cellula (tossicità acuta);



- formazione di metaboliti idrofilici, reattivi ed elettrofilici, che si legano alle strutture cellulari, provocando danni a lungo termine (tossicità cronica).

Particolarmente pericoloso è risultato il benzo(a)pirene, che si è dimostrato cancerogeno nell'essere umano ed è ritenuto causa di mutazioni genetiche, infertilità e disturbi dello sviluppo.

Anche se esistono più di cento diversi IPA, quelli più imputati nel causare dei danni alla salute di uomini e animali sono: l'acenaftene, l'acenaftilene, l'antracene, il benzo(a)antracene, il dibenzo(a,h)antracene, il crisene, il pirene, il benzo(a)pirene, l'indeno(1,2,3-c,d)pirene, il fenantrene, il fluorantene, il benzo(b)fluoroantene, il benzo(k)fluoroantene, il benzo(g,h,i)perilene e il fluorene.

**Classificazione IARC della cancerogenicità di alcuni IPA.**

Agente	Classificazione IARC
benzo[a]antracene benzo[a]pirene dibenzo[a,h]antracene	2 A: Probabile cancerogeno per l'uomo
benzo[b]fluorantene benzo[k]fluorantene indeno[1,2,3-cd]pirene	2 B: Possibile cancerogeno per l'uomo
Antracene; benzo[e]pirene; benzo[ghi]perilene; crisene; coronene; fenantrene; fluorantene; fluorene; perilene; pirene; trifenilene	3: Non classificabile come cancerogeno per l'uomo

L'uomo può assumere gli IPA in tre modi: consumando alimenti, inalando pulviscolo, o venendo in contatto con materiali che li contengono. Nei Paesi dell'UE i consumatori assumono IPA soprattutto attraverso i prodotti ittici e i cereali; questi ultimi hanno un tenore moderato di idrocarburi policiclici aromatici, ma vengono consumati in grandi quantità. I dati in letteratura evidenziano che una persona che segue un'alimentazione equilibrata assimila ogni giorno circa 235 ng di benzo(a)pirene. Chi consuma quantità superiori alla media di cereali e pesce, ne ingerisce circa il doppio. Per contro, l'acqua che si beve genera un apporto quotidiano di 2 ng al giorno, del tutto irrilevante (EFSA, 2008). Tuttavia numerosi studi hanno messo in evidenza che le molecole di IPA di per sé non sono agenti cancerogeni per l'uomo,

ma è richiesta la loro attivazione metabolica affinché possano esercitare i loro effetti mutagenici/carcinogenici (Harvey, 1991; Miller, 1978; Miller and Miller, 1966).

La loro liposolubilità e la speciale conformazione della struttura ad anelli li rende in grado di attraversare le membrane cellulari e di depositarsi nei tessuti adiposi. Alcuni IPA possono essere in seguito trasformati in composti estremamente reattivi, chiamati epossidi, che hanno una spiccata tendenza ad interagire con le molecole del DNA. Il materiale genetico viene così danneggiato e questo comporterebbe l'insorgenza dei tumori (Harvey, 1991). Molti IPA tra cui il Benzo[a]Pirene (Dipple et al., 1984; Gelboin, 1980) ed il Dibenzo[a,l]Pirene (Ralston et al., 1994; 1995; ) vengono metabolizzati attraverso questa via. La maggior parte dei dati sulla pericolosità degli IPA, a varie concentrazioni, derivano dai numerosi studi di laboratorio condotti in vitro o su animali, ma gli stessi rischi sussistono anche per l'uomo. Sembra che l'esposizione a queste sostanze comporti vari danni, quali l'immunosoppressione (Fernandez-Salguero et al., 1995), effetti teratogeni sulla riproduzione (Mattison e Nightingale, 1980) ed effetti promuoventi la cancerogenesi (Shimizu et al., 2000). Alcuni IPA hanno dimostrato in test di laboratorio di essere in grado di causare il cancro per inalazione (ai polmoni), per ingestione (allo stomaco) e per contatto dermico (alla pelle).

La frazione di IPA più implicata nello sviluppo del tumore è quella caratterizzata da 3 a 7 anelli aromatici. Nel corso di questi ultimi trent'anni, per fortuna, la concentrazione nell'aria di queste sostanze si è notevolmente ridotta. Il Decreto Ministeriale del 25/11/1994 fissava come obiettivo di qualità dell'aria per gli IPA, un valore giornaliero medio annuale di 1 ng/mc in riferimento al benzo(a)pirene. In effetti, il BaP si ritiene al momento il più tossico fra gli IPA comuni ed anche se è rinvenuto a concentrazioni modeste, è quello che contribuisce maggiormente alla tossicità totale. Successivamente tale limite è stato confermato come valore obiettivo dalla Direttiva Europea 2004/107/CE "concernente l'arsenico, il cadmio, il mercurio, il nichel e gli idrocarburi policiclici aromatici nell'aria ambiente" che è stata recepita recentemente dal Decreto Legislativo n.152 del 3 agosto 2007. Anche il Regolamento (CE) n.1881/2006, ai fini della tutela della salute pubblica, definisce per questo composto i tenori massimi in numerose matrici alimentari .

### **3.3 Policlorobifenili (PCB)**

I PCB, scoperti negli Stati Uniti verso la fine degli anni venti, dalla industria agro-chimica Monsanto, vennero brevettati e subito prodotti su larga scala, raggiungendo un grande interesse commerciale verso l'inizio degli anni cinquanta. Il brevetto venne concesso ad

un'azienda per ognuno dei principali paesi industrializzati (Giappone, Germania, Inghilterra, Francia, Italia e Spagna). L'Italia iniziò a produrli dal 1938, la Caffaro di Brescia, un'industria chimica produttrice di soda caustica, composti organici, cloro e suoi derivati sorta nel 1906 (Ruzzenenti, 2003). I primi paesi a terminare la produzione furono il Giappone nel 1972, gli Stati Uniti nel 1977, la Germania nel 1983, l'Italia nel 1984. Si stima che la produzione mondiale sia stata di 1.5 milioni di tonnellate. Solo negli Stati Uniti ne sono state prodotte 670.000 tonnellate e quantità analoghe si possono stimare per l'Europa, se si tiene conto che la Caffaro da sola ne ha messe in commercio 150.000 tonnellate. La notevole inerzia verso altri composti e l'elevata resistenza al calore sono state sfruttate in diverse applicazioni industriali (Pavan et al., 2003). Nella tabella sottostante sono indicati alcuni tra i più diffusi campi di impiego dei PCB's (modificata da Demi, 2000).

Sistemi chiusi:	olio per trasformatori, dielettrico nei condensatori, sigillante
Sistemi semichiusi:	scambiatore di calore, pompa per il vuoto, fluido idraulico
Sistemi aperti:	olio da taglio, lubrificante, impregnante antincendio, ammorbidente per materie plastiche

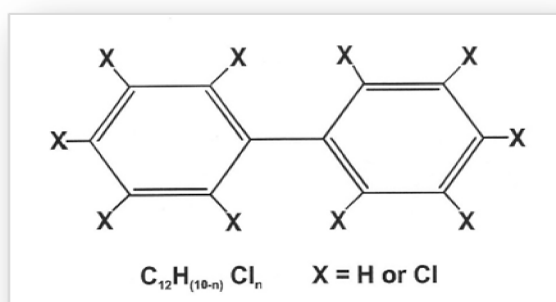
Campi di impiego dei PCB

Nel 1972 è stato vietato l'impiego di PCB in sistemi aperti, ossia vernici, masse di sigillatura, stoffe e carta. Nel 1996 (Direttiva 96/59/CE) è entrato in vigore il divieto generale di impiego dei PCB. Questi possono tuttavia continuare a giungere nell'aria-ambiente ed essere respirati; i PCB, sie erano ormai diffusi in ogni parte del globo: presenti nei materiali in cui sono stati impiegati, gettati nell'ambiente come rifiuti e dispersi, sulle lunghe distanze, dall'aria e dalle acque (superficiali e profonde), si sono sparsi in ogni angolo della terra e sono penetrati, pur in piccolissime dosi in ogni organismo vivente.

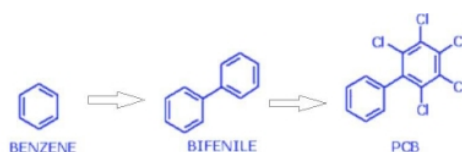
La maggior fonte di contaminazione umana è l'assunzione attraverso gli alimenti, anche se, in alcuni casi, non sono da sottovalutare l'inalazione e l'esposizione cutanea. La cronaca di

recente ha riportato episodi acuti di inquinamento da PCB, il più clamoroso quello dei polli ai PCB e alla diossina in Belgio nel 1998: qui, nella produzione dei mangimi, vennero erroneamente scambiati oli idraulici destinati allo smaltimento, per oli vegetali esausti da friggitoria (Van Larebeke et al., 2001). Nel 1971 in North Carolina, una partita di farina di pesce per l'alimentazione dei polli fu contaminata da PCB, presenti in un'apparecchiatura difettosa come fluido scambiatore di calore. Queste carni contaminate avrebbero potuto costituire un'importante fonte di contaminazione per l'uomo che le avrebbe consumate. In virtù della diminuzione della concentrazione ambientale, il carico negli ultimi 15 anni si è drasticamente ridotto. Affinché questa tendenza persista, occorre smaltire le potenziali fonti residue di contaminazione, applicando determinate procedure e attenzioni. Altre sorgenti di contaminazione sono imputate alle vernici di ponti (rivestimenti di protezione contro la corrosione), ai condensatori (si stima infatti che siano presenti sul territorio nazionale oltre 30.000 trasformatori elettrici con concentrazioni di PCB estremamente elevate, mentre è presunta l'esistenza di circa 45.000 condensatori contaminati di massa superiore a 1 Kg) e alle masse di sigillatura dei giunti delle grandi edificazioni di calcestruzzo di vecchia data (Ruzzenenti, 2003) In alcune nazioni (es. USA dal 1976) l'utilizzo dei PCBs è regolamentato da specifiche norme. La legislazione italiana prevede diversi valori limite per i PCB totali a livello ambientale (acque, acque sotterranee, suolo e sottosuolo) e fissa un valore limite di 25 ppm per quel che concerne lo smaltimento di rifiuti solidi urbani ed oli usati contenenti PCB (Direttiva 96/59/CE).

Vengono definiti Policlorobifenili (PCBs) una classe di idrocarburi non presenti in natura, commercialmente prodotti dalla clorazione diretta del bifenile, aventi formula chimica  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , con n compreso tra 1 e 10 (Ruzzenenti, 2003).



Nello specifico, questi composti si formano a temperature superiori ai 750°C, quando il benzene, in presenza di piombo come catalizzatore, reagisce formando bifenili. Questi, per reazione con cloro gassoso e in presenza di FeCl<sub>3</sub> come catalizzatore, danno origine a cloroderivati per sostituzione degli atomi di H. Quanto maggiore è la quantità di Cl<sub>2</sub>, tanto più lunga sarà la durata della reazione e tanto maggiore il numero di sostituenti Cl con formazione dei PCB. La sostituzione può avvenire teoricamente in tutte e dieci le posizioni (Apostoli et al., 2009).



La loro particolare struttura consente di discriminare le molecole in funzione del diverso numero di atomi di cloro e della loro posizione (Ruzzenenti, 2003), rendendo possibile quindi la classificazione e la nomenclatura, e ricavando il peso molecolare di ogni congenere (Silcher et al., 2007). Questa struttura fa sì che i PCB siano una numerosissima famiglia di 209 congeneri, distinti in relazione al diverso numero di atomi di cloro (da 1 a 10) e alla disposizione degli stessi (2\3\4\5\6\2'\3'\4'\5'\6'). Il termine PCB quindi si riferisce ad una miscela di più congeneri, anche se spesso viene considerato come una singola entità chimica. Inoltre molti autori utilizzano, per esempio, il termine PCB riferendosi specificatamente alle miscele commerciali (es. Aroclors) piuttosto che all'intera classe componente. Tali miscele contengono percentuali diverse di cloro (es. 16%, 42%, 48%, 54%, 60%) ed impurità di sostanze tossiche tra le quali dibenzofurano policlorinato (PCDF) e naftalene clorinato in concentrazione variabile. Al fine di rendere più agevole l'identificazione di un singolo congenere dal punto di vista chimico, sono state proposte nel corso degli anni diverse classificazioni; attualmente la più utilizzata (dai ricercatori) è quella di Ballschmiter e Zell (1980) che assegna un numero progressivo da 1 a 209 ai singoli congeneri a seconda del minore o maggiore grado di clorazione. Dal punto di vista chimico-fisico, i PCB sono caratterizzati da un'elevata stabilità dipendente anch'essa dal differente grado di clorazione. In generale, il punto di evaporazione e la lipofilia aumentano con il maggior grado di clorazione, la tensione di vapore e la solubilità nell'acqua invece diminuiscono; inoltre, sono resistenti ad acidi ed alcali ed alla fotodegradazione, non sono ossidabili, non attaccano i metalli, sono poco solubili in acqua, ma lo sono in olio e solventi organici quali alcol e acetone. Non sono infiammabili

(quando la loro molecola contiene più di 4 atomi di cloro), evaporano ad oltre 800°C e si decompongono solo oltre i 1000°C. Sono poco volatili, si possono spandere su superfici formando sottili pellicole, hanno bassa costante dielettrica, densità maggiore dell'acqua, e sono scarsamente biodegradabili. L'unico significativo processo naturale di degradazione chimica ambientale è quello della fotolisi, più attivo sui composti a basso grado di clorazione (emivita in atmosfera di circa 1 giorno) rispetto a quelli ad alto grado di clorazione (emivita in atmosfera fino a 67 giorni); nell'atmosfera, infatti, i PCB tendono a reagire con l'ozono e l'acqua per effetto della luce solare; il risultato di tali reazioni è la rimozione di atomi di cloro; i microorganismi sono in grado di degradare i mono-, i di- e i triclorobifenili abbastanza rapidamente. I congeneri con un più elevato grado di clorazione invece non vengono biodegradati. Anche la diversa posizione dell'atomo di cloro influisce sul destino ambientale di queste sostanze, per questo i congeneri che presentano un atomo di cloro in posizione para possono essere trasformati anaerobicamente, attraverso una dechlorazione riduttiva, a congeneri con un minor grado di clorazione e quindi soggetti a una più facile degradazione aerobia (WHO, 1992); per quanto riguarda la distruzione artificiale di tali miscele, questa è possibile solo con processi d'incenerimento.

Riassumendo, le caratteristiche più importanti dei PCB sono (Fiedler, 2001):

- stato liquido a temperatura ambiente
- bassa solubilità in acqua, alta solubilità in solventi organici
- alta temperatura di evaporazione: 170-380 °C
- non esplosivo
- bassa conduttività elettrica
- conducibilità termica molto alta
- stabilità elevata: alta resistenza alla degradazione termica e chimica

Tali caratteristiche ne determinano la tendenza all'accumulo nell'ambiente, e, successivamente, nella catena alimentare, uomo compreso. Esposizioni croniche a PCB possono determinare effetti teratogeni e mutageni in alcune specie animali, mentre composti

altamente clorurati inducono tumori in ratti e gatti anche se, in quest'ultimo caso, la relazione con i PCB non è sempre chiara (National Research Council, 1979).

La natura complessa delle miscele di PCB complica la valutazione del rischio sull'uomo. A tale scopo, è stato introdotto da Safe il concetto di TEF (fattore di tossicità equivalente), che viene calcolato confrontando l'affinità di legame dei vari composti organoclorurati con il recettore Ah, rispetto a quella della diossina 2,3,7,8-TCDD; a questa sostanza viene convenzionalmente attribuito un Fattore di Tossico Equivalenza (TEF) uguale a 1. La TCDD è una molecola molto stabile, resistente al calore e agli agenti chimici, insolubile in acqua e scarsamente nei grassi, la cui tossicità per l'uomo e per gli animali, sia acuta che cronica, è molto elevata. Gli studi mostrano che i PCB coplanari, come pure i congeneri mono-orto-sostituiti, si comportano in modo simile alla 2,3,7,8-tetracloro-para-dibenzodiossina (TCDD) (Demi, 2000). Solo 12 dei 209 congeneri dei PCB, i cosiddetti coplanari, presentano caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche paragonabili alle diossine e ai furani: questi sono definiti *PCB dioxin-like* (cioè simili alle diossine). È proprio questa somiglianza strutturale a far sì che i PCB coplanari agiscano, a livello cellulare, in maniera simile alla 2,3,7,8-TCDD, interazione che non è possibile per i congeneri non planari, detti non diossina-simili PCB.

PCB dioxin-like e relativi fattori di tossicità equivalente  
PCBdl (nome IUPAC) PCB-TEF, WHO-TEF (Van den Berg et al 1998)

3,3',4,4'-TCB	(77)	0,0005	0,0001
3,4,4',5-TCB	(81)	0,0001	0,0001
3,3',4,4',5-PeCB	(126)	0,1	0,1
3,3',4,4',5,5'-HxCB	(169)	0,01	0,01
2,3,3',4,4'-PeCB	(105)	0,0001	0,0001
2,3,4,4',5-PeCB	(114)	0,0005	0,0005
2',3,4,4',5-PeCB	(118)	0,0001	0,0001
2,3,3',4,4',5-HxCB	(123)	0,0001	0,0001
2,3',4,4',5,5'-HxCB	(156)	0,0005	0,0005
2,3',3,4',4,5'-HxCB	(157)	0,0005	0,0005
2,3',4,4',5,5'-HxCB	(167)	0,00001	0,00001
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	(189)	0,0001	0,0001

(T = tetra, Pe = penta, Hx = hexa, Hp = hepta)

Tali valori indicano che la tossicità dei singoli congeneri non è direttamente correlata al loro grado di clorazione, ma dipende, come già esposto, anche da altri fattori, tra cui il fatto di essere simili nella stereoisomeria alla 2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina (TCDD); per questo i PCB 126 e 169 sono tra i più tossici tra tutti i 209 PCB congeneri.

L'uomo, in quanto vertice della catena trofica, risulta esposto alle conseguenze derivanti dalla presenza di diossine nell'ambiente anche a concentrazioni basse. Qui di seguito si sintetizzano

gli effetti maggiormente noti di tali contaminanti sull'organismo, evidenziando che si tratta prevalentemente di patologie conseguenti ad esposizioni acute, tipiche di eventi incidentali e/o esposizioni professionali. Occorre inoltre osservare che, in alcuni casi, la relazione causa-effetto tra esposizione alla contaminazione ed effetti sull'organismo non è stata pienamente accertata. Studi condotti su animali e sull'uomo evidenziano le alterazioni a carico del sistema immunitario indotte da diossine anche a dosi molto limitate. Tali alterazioni consistono nella riduzione e nel danneggiamento della popolazione dei linfociti la cui funzione importante nella difesa dell'organismo è nota da tempo. Altri studi evidenziano come l'azione delle diossine può essere particolarmente dannosa durante lo sviluppo fetale, al momento cioè della differenziazione tissutale del sistema immunitario, determinando alterazioni a lungo termine, sia in senso immunodepressivo sia ipersensibilizzante. Altri importanti effetti delle diossine si riscontrano a livello del sistema endocrino; tali contaminanti vengono, infatti, classificati tra i modulatori endocrini, termine che indica "un agente esogeno che interferisce con produzione, rilascio, trasporto, metabolizzazione, legame, azione o eliminazione di ormoni naturali del corpo, responsabili del mantenimento dell'omeostasi (situazione che consente di mantenere in uno stato di equilibrio biochimico dinamico le condizioni di vita dell'ambiente interno del nostro organismo) e della regolazione dei processi riproduttivi e gli sviluppo".

Nei feti esposti a concentrazioni di diossine durante la fase gestazionale, sono stati riscontrati effetti sullo sviluppo del sistema nervoso e sulla neurobiologia del comportamento, oltre che effetti sull'equilibrio ormonale della tiroide. Le informazioni riportate sono quindi da intendersi come una sintesi dei dati disponibili. La TCDD è stata riconosciuta quale agente cancerogeno per l'uomo (classificata gruppo 1) dall'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro. L'esposizione cronica subletale alla TCDD provoca un accumulo di porfirine nel fegato ed un incremento dell'escrezione urinaria di questi metaboliti. Nei casi conclamati, l'accumulo di porfirine si estende anche alla milza ed ai reni. La TCDD è irritante per gli occhi, la cute e il tratto respiratorio. La sostanza può determinare effetti, anche in tempi ritardati rispetto all'esposizione, sul sistema cardiovascolare, sul tratto gastrointestinale, sul fegato, sul sistema nervoso e sul sistema endocrino. Gli effetti più comunemente osservati sulla salute umana sono la cloracne e le eruzioni cutanee. Studi su lavoratori esposti hanno mostrato alterazioni nell'analisi di sangue e urine correlabili a danni a carico del fegato.



### 3.4 I Pesticidi

I pesticidi sono sostanze chimiche, naturali o di sintesi, utilizzate in agricoltura per l'eliminazione sistematica di determinate specie viventi ritenute nocive per le colture, quali batteri, muffe, funghi, insetti, topi e qualsiasi altra specie ritenuta dannosa; queste sostanze, infatti, sono in grado di esercitare un'azione tossica nei confronti di un organismo, interferendo con i suoi processi riproduttivi e/o bloccandone un processo metabolico vitale (Baird, 1997). Inizialmente, i primi pesticidi prodotti portarono vantaggi notevoli: il DDT ed altri pesticidi clorurati probabilmente evitarono la morte di molti milioni di persone a causa di malattie trasmesse dagli insetti, come la malaria, la peste bubbonica e il tifo; si ebbe inoltre, in campo agricolo, un notevole incremento nella disponibilità di prodotti alimentari, parallelamente alla diminuzione dei costi del cibo e all'aumento dei profitti. Ma, accanto agli effetti positivi, se ne manifestarono, ben presto, molti negativi tanto da far pensare che gli effetti dannosi, derivanti dal largo utilizzo dei pesticidi, superassero i vantaggi. Negli organismi bersaglio si sviluppò, in breve tempo una resistenza genetica verso i pesticidi, inoltre si appurò che solo una piccola percentuale del quantitativo di pesticida utilizzato raggiunge il bersaglio, mentre la maggior parte del prodotto si disperde nell'ambiente (Miller et al., 1997). Fin dalla loro introduzione, i fitofarmaci sintetici hanno rappresentato un potenziale rischio per gli ecosistemi e di conseguenza anche per la salute dell'uomo, ma il fatto che consentissero di preservare la naturale crescita delle colture ci ha comunque autorizzato a farne un uso spropositato. I pesticidi sono composti molto diversi, che vanno da estratti di piante come il piretro, a sali ed olii minerali, fino ai più sofisticati composti organici, quelli le cui interazioni con l'ambiente e col corpo umano sono ancora poco conosciute; possono essere distinti in base alla classe chimica (ditiocarbammati, organofosforati, organoclorurati, piretroidi, ecc.) oppure in base al particolare utilizzo che ne viene fatto (erbicidi o diserbanti, insetticidi e anticrittogamici). Quelli più comunemente utilizzati sono: Acido cloroacetico, Acido 2,4 di- e 2,4,5 triclorofenossiacetico, Aldrin, Dieldrin, Clordano, Diclorodifenildicloroetano (DDT), Endosulfan, Lindano, Esaclorobenzene, Atrazina, Chlorphirifos, Alachlor, Malathion, Bentazone, Carbaril, ecc. (EPA, 1993a). Recenti studi indicano chiaramente che la contaminazione ambientale di pesticidi è sistematicamente sempre più presente nell'intera biosfera (Oehme et al., 1996): la loro presenza è stata rilevata nelle precipitazioni e nell'aria in differenti luoghi a scala mondiale (Dubus et al., 2000); inoltre, dato che diffondono facilmente nell'ambiente e sono molto persistenti possono persino finire nelle acque.

I principali problemi per l'ambiente riguardano: il bioaccumulo di sostanze attive o prodotti derivati dei pesticidi in uso nei tessuti animali e la biomagnificazione lungo la catena trofica delle concentrazioni delle sostanze imputate. Non bisogna dimenticare che lungo la catena alimentare la concentrazione dei fitofarmaci che tendono ad accumularsi nei tessuti va crescendo fino a raggiungere alti livelli proprio nei consumatori finali (ad esempio l'uomo). Ciò ha comportato danni a carico di specie animali che sono entrati accidentalmente a contatto con residui di pesticidi o loro metaboliti; essi, infatti, hanno mostrato forti alterazioni a carico del sistema nervoso e/o del sistema riproduttivo e le loro popolazioni hanno subito gravi flessioni demografiche (Borrel et al., 2010). L'esempio classico e anche il primo ad essere stato rilevato è quello del DDT (diclorodifeniltricloroetano). Accanto ai rischi per l'ambiente, molte ricerche hanno riguardato, in particolare, i rischi per la salute dell'uomo da parte di queste sostanze; è emerso che l'esposizione diretta o indiretta delle persone a tali sostanze, infatti, può avere effetti negativi, quali disturbi cronici e a lungo termine, particolarmente preoccupanti nei bambini, nelle persone anziane e nei lavoratori esposti spesso a tali sostanze.

Gli effetti dannosi alla salute provocati dai pesticidi sono riconducibili a diversi fattori:

- la durata d'esposizione e l'azione combinata di più pesticidi
- la quantità di pesticida a cui si è esposti
- il tipo di pesticida

I pesticidi possono essere assorbiti per inalazione, per contatto cutaneo, o attraverso l'apparato digerente, ma la principale fonte di esposizione per l'uomo rimane l'alimentazione (EPA, 1993a). Livelli elevati di pesticidi, infatti, si accumulano negli alimenti e studi recenti hanno mostrato che il rischio sembra essere circoscritto a gruppi di popolazioni che comprendono: consumatori abituali di pesce o carne o altri alimenti contaminati con elevati livelli di antiparassitari; neonati con madri che presentano un accumulo considerevole di pesticidi persistenti e individui che presentano disfunzioni del metabolismo del tessuto adiposo (Mansour, 2004). Nel 1993 è stata preparata una lista che comprendeva i 70 possibili prodotti cancerogeni. Oggi tale lista è stata aggiornata e il numero di antiparassitari che rappresentano fattori di rischio nell'insorgenza di patologie tumorali è salito a 160 (Mansour, 2004). Tra gli erbicidi, per esempio, l'atrazina è stata indicata come possibile causa dell'insorgenza di tumori, mentre i pesticidi a base di arsenico sembrano essere associati al cancro al polmone (IARC, 2004; Lega Ambiente, 2005). Inoltre, alcuni pesticidi presentano

chiaramente effetti tossici sulla riproduzione umana. Per esempio, un metabolita del DDT interferisce con gli ormoni che causano l'azione femminilizzante (Kelce et al., 1995). Per quanto riguarda, invece, gli effetti tossici sullo sviluppo, è stato evidenziato che l'esposizione durante le prime 2-3 settimane di gestazione porta a morte fetale, mentre l'esposizione dopo l'organogenesi causa ritardi nella crescita e deficit funzionali nell'embrione. Esistono in aggiunta, evidenze scientifiche di un aumento significativo della comparsa di aberrazioni cromosomiche in individui esposti a diversi insetticidi, erbicidi e fungicidi. A proposito di ciò, Brega e collaboratori nel 1998 riportano percentuali di tali aberrazioni comprese tra 2.66 e 10.30% in soggetti esposti, rispetto ai controlli che presentano percentuali comprese nell'intervallo 0.53-5.52%. Tutta una serie di ricerche hanno evidenziato, oltre al resto, che l'esposizione prolungata a basse dosi di diversi pesticidi determina negli individui esposti, alterazioni strutturali e funzionali del sistema immunitario, nonché riduzione della resistenza alle infezioni virali, batteriche e parassitarie. Ad esempio, l'insetticida malathion, considerato un composto a bassa tossicità, induce effetti immunotossici come evidenziato da diversi studi condotti su modelli animali. In base a tutte queste evidenze tossicologiche, alcuni pesticidi tra i più utilizzati e rappresentativi sono stati definitivamente messi al bando dalla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (POP), che ne vieta espressamente la fabbricazione, il commercio e l'impiego. Negli ultimi anni gli avvelenamenti da pesticidi, presentano, per fortuna, una riduzione nei paesi industrializzati rispetto a quelli in via di sviluppo, anche se non va dimenticato che non è facile ottenere statistiche veritiere sui casi di intossicazione da antiparassitari. Sono state anche proposte tecnologie per la rimozione dalle acque dei pesticidi, che comprendono principalmente processi di nanofiltrazione, processi di adsorbimento a carboni attivi (Sotelo, 2002) e processi foto-Fenton (Huston, 1999).

#### **3.4.1 I Pesticidi Organoclorurati Analizzati – DDT, DDD, DDE**

I pesticidi oggetto di questo lavoro sono i pesticidi clorurati, caratterizzati dalla presenza di anelli organici di varia complessità sostituiti con atomi di cloro; tali molecole presentano una struttura estremamente stabile a livello ambientale, tanto da non poter essere metabolizzati facilmente, anche se esistono specie batteriche in grado di effettuare reazioni parziali di degradazione degli stessi (Dolara, 1997). Hanno fatto la loro comparsa attorno agli anni '40-'50 e costituiscono uno dei gruppi maggiormente incriminato e monitorato; I composti che ne fanno parte, presentano particolari proprietà chimiche quali:

- Una solubilità estremamente bassa in acqua
- Un'alta solubilità in sostanze idrofobe come i grassi degli esseri viventi e in molti solventi organici

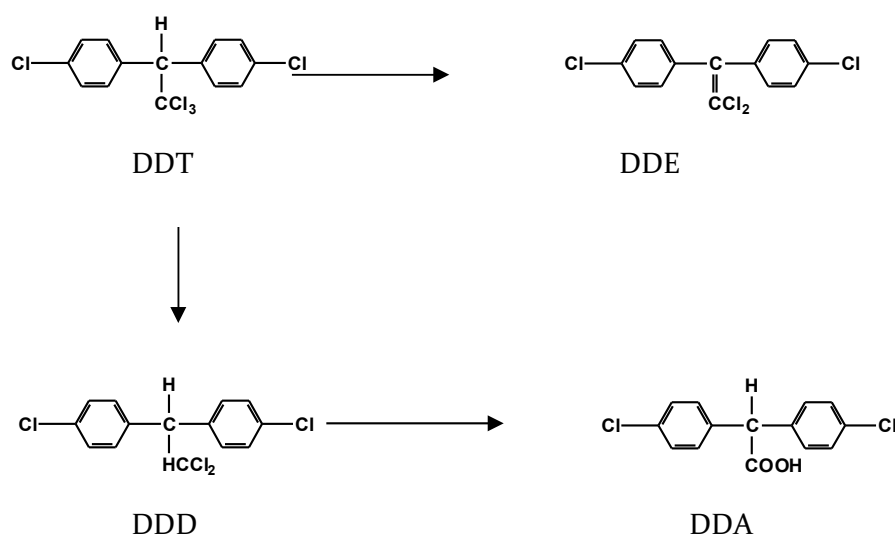
Di questo importante gruppo fa parte anche il diclorodifeniltricloroetano (DDT); esso tende a degradarsi molto lentamente nell'ambiente; nel suolo è stato calcolato un tempo di semivita di 4.3 - 5.3 anni (Woodwell et al. 1971), e nell'acqua di mare di 15 anni (Edwards, 1973). Fu sintetizzato per la prima volta nel 1874, ma solo diversi decenni più tardi il chimico Paul Muller ne scoprì l'attività insetticida. Si tratta di una sostanza cristallina, apolare, con una solubilità in acqua inferiore a 2 ppm, mentre è solubile nella maggior parte dei solventi organici. Strutturalmente, una molecola di DDT è un etano sostituito; i tre atomi di idrogeno legati a uno dei due atomi di carbonio sono sostituiti da atomi di cloro, mentre due dei tre atomi di idrogeno legati al secondo carbonio, sono rimpiazzati ciascuno da un anello benzenico contenente un atomo di cloro in posizione para, opposta cioè alla posizione del carbonio che nell'anello è legato all'unità etano.

Questa molecola si rivelò un potente veleno da contatto per il sistema nervoso degli insetti; infatti durante la seconda Guerra Mondiale fu impiegato per combattere le varie epidemie delle truppe, soprattutto la malaria, il cui vettore, la zanzara del genere *Anopheles*, era risultato particolarmente sensibile a questo insetticida. L'azione di questa molecola si esplica sulle fibre nervose periferiche e sui loro recettori sensoriali inibendo le  $Mg^{2+}$ , le  $Na^{+}$ , e le  $K^{+}$ -ATPasi, che controllano il trasferimento attivo di ioni attraverso il neurilemma (Joy, 1982; Murty, 1986). Gli effetti che determina negli insetti sono quindi di origine nervosa: riduzione della capacità di coordinazione, atassia e tremore delle zampe; tali sintomi possono essere seguiti da immobilità o morte (Joy, 1982). Dopo la guerra fu commercializzato per usi agricoli e forestali; i primi studi avevano dimostrato la bassa tossicità del DDT sull'uomo e sui mammiferi ed inoltre il suo assorbimento attraverso la pelle era risultato molto scarso (Kutz et al., 1991). Questo portò ad un incremento della produzione e dell'uso fino a raggiungere un massimo nel 1963. Già nel 1962, però Rachel Carson aveva lanciato un primo grido di allarme nei confronti della pericolosità del DDT pubblicando il libro "The Silent Spring", in cui per la prima volta a questo insetticida venivano attribuite gravi disfunzioni nella biologia riproduttiva di alcune specie di uccelli; tali disfunzioni si manifestavano in vario modo, dal decremento delle nascite fino all'estinzione della popolazione (Carson, 1962). L'uso del DDT fu proibito negli USA solo nel 1972; negli anni seguenti altri paesi ne limitarono o vietarono l'utilizzo. Ancora oggi, tuttavia, in alcune regioni tropicali è impiegato per il controllo degli

insetti vettori della malaria, considerando i suoi effetti negativi come “il male minore”. E’ stato stimato che dal 1943 al 1977 siano state introdotte nell’ambiente più di tre milioni di tonnellate di DDT e che gli USA hanno rappresentato uno dei principali produttori anche se questo pesticida è stato utilizzato maggiormente in altri paesi. Nel 1971 la National Academy of Sciences aveva stimato la quantità di DDT immessa nel sistema marino annualmente pari a  $2,4 \times 10^7$  Kg. In quel periodo questo valore corrispondeva a circa un quarto della stima della produzione mondiale di DDT. Il DDT nell’ambiente è sottoposto all’azione di fattori abiotici (temperatura, acqua, luce) e biotici (attività degli organismi) e viene degradato a diclorodifenildicloroetilene (DDE) ed a diclorodifenildicloroetano (DDD); entrambe sono molecole che hanno proprietà simili a quelle del principio attivo (Van den Berg et al., 1995). Sia del principio attivo che dei suoi derivati esistono i due isomeri pp’ e op’; la miscela commerciale contiene un 70% di pp’ DDT ed un 30% di op’ DDT, il quale non ha proprietà insetticide. La diversa pressione di vapore degli isomeri del DDT determina una differente capacità di vaporizzazione e di conseguenza percentuali diverse nell’atmosfera e nell’acqua degli isomeri stessi. In genere l’insieme del DDT e dei suoi prodotti di degradazione viene indicato con i termini di residui di DDT o DDT totale. Il DDT ed i suoi metaboliti hanno una elevata resistenza alla fotossidazione, una alta liposolubilità, e scarsa idrosolubilità, tutte caratteristiche che li rendono altamente stabili ed in grado di persistere per lungo tempo nell’ambiente; infatti quantità fino al 50% del prodotto applicato possono restare nel terreno per 10-15 anni (Fisher, 1999). Inoltre, in virtù del loro alto coefficiente di ripartizione lipidi/acqua, tendono ad accumularsi negli organismi, in particolare in tessuti ed organi ricchi di grasso (Joy, 1982). Da ciò consegue che l’uomo, posto all’apice della catena trofica, si trovi esposto ad alte concentrazioni di questo pesticida. L’uomo viene in contatto con il DDT soprattutto attraverso la sua diretta ingestione con l’alimentazione o tramite inalazione; il contatto dermico viene considerato insignificante (Joy, 1982). DDT e metaboliti sono stati riscontrati nella maggior parte dei prodotti alimentari (Guerranti et al., 2003b), anche se residui negli animali domestici sono decisamente diminuiti negli ultimi venti anni. Per quanto riguarda animali macellati, uova e latte si è riscontrata una diminuzione di concentrazione di circa dieci volte dal 1969 al 1979 (Tanabe et al., 1993) e la stessa tendenza può essere osservata nel pesce del Mar Baltico (Falandysz, 1985a, b, 1986a,b,c; Kannan et al., 1992). Da uno studio del 1992 in Vietnam, il DDT è risultato il più comune organoclorurato rilevato nel cibo e l’assunzione giornaliera di DDT e metaboliti è stata calcolata essere pari a  $19 \mu\text{g}/\text{persona}/\text{die}$  mentre in India pari a  $48 \text{ mg}/\text{persona}/\text{die}$ . Tracce di DDT sono state rilevate nel latte umano in tutto il pianeta. In uno studio del 1993 nel latte di donne in quattro remoti villaggi in Papua

Nuova Guinea il DDT fu rinvenuto nel 100% dei campioni (Fisher, 1999). In Italia Focardi et al. (1984), in un'indagine compiuta su latte umano proveniente dalla Toscana centrale, confermano la presenza di DDT in tutti i campioni analizzati, inoltre stimano che i neonati assumano quotidianamente da 2,7 a 15,1 µg di questo insetticida attraverso il latte materno. Negli organismi, uomo incluso, il DDT viene trasformato in DDE che, per le sue proprietà idrofobiche, va incontro a biomagnificazione nella catena trofica (Van den Berg et al., 1995). Un altro metabolita è il DDD, le cui proprietà chimico-fisiche sono simili a quelle del DDT e che persiste nell'ambiente essendo solo lentamente degradato a composti meno attivi. Questi due metaboliti sono poi trasformati in DDA (acido diclorodifenidiclorolacetico) che, essendo solubile in acqua, può essere escreto con le urine.

#### Metabolismo del DDT



Il DDE si accumula prevalentemente per assunzione diretta in seguito alla degradazione di DDT nell'ambiente (Kutz et al., 1991; Van den Berg et al., 1995). Nell'uomo esso tende quindi ad accumularsi in organi e tessuti particolarmente ricchi di lipidi come il tessuto adiposo, in quanto mantiene quelle proprietà idrofobiche proprie del DDT. La capacità di trasformare il DDT in DDE sembra essere il fattore principale nella sopravvivenza degli insetti esposti; essi sono così in grado di "bloccare" il DDT nel processo di trasformazione che si realizza a livello della cute e dell'intestino, in modo tale da non fargli raggiungere il sistema nervoso centrale (Van den Berg et al., 1995). Eppure, è stato osservato che il DDT e i suoi metaboliti possono presentare effetti neurotossici acuti e cronici anche sull'uomo, a causa di una certa similarità tra il sistema nervoso degli insetti e quello dei mammiferi.

In particolare, il DDT riesce ad interferire con il trasporto di cationi attraverso le membrane cellulari del sistema nervoso, provocando una irritabilità neuronale e un aumento dell'eccitabilità del sistema nervoso centrale (Weiss, 2004).

Il DDT e il diclorodifenildicloroetano (DDD), infatti, sono sostanze che per la loro particolare struttura chimica hanno mostrato, come già detto in precedenza, un'efficace azione tossica bloccando i canali ionici della cellula nervosa. Non altrettanto efficace nel blocco dei canali ionici si è rivelato il diclodifenildicloroetilene (DDE), che per la sua struttura planare (mancanza di carboni tetraedrici) non è in grado di inserirsi efficacemente in tali strutture cellulari e conseguentemente di esercitare un'azione tossica pari a quella sortita dai suoi analoghi (DDT, DDD). Inoltre, già nel 1947, alcuni ricercatori avevano osservato che, somministrando alte dosi di DDT ai ratti, il fegato sviluppava dopo un certo tempo cellule tumorali; altri studi inoltre hanno evidenziato la stretta relazione tra la somministrazione di DDT e lo sviluppo di epatocarcinoma (IARC, 1974). Esiste inoltre un legame tra DDT e cancro, infatti la IARC ha classificato il DDT come possibile cancerogeno umano (Gruppo 2B) sulla base di risultati ottenuti su esperimenti con animali da laboratorio (Falk et al., 1992; Wolff et al., 1993). Il DDT è risultato altamente tossico anche verso le forme di vita acquatiche; molte specie di pesci, infatti, presentano effetti dovuti alla presenza di questo contaminante (Zhang, 2008).

## 4.0 CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE E BIOLOGICHE DELLA SPECIE STUDIATA



*Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758)

Volgarmente chiamata “acciuga” o “alice”, è l’unica specie della famiglia degli engraulidi che popola i mari europei e rientra a pieno titolo tra le specie pelagiche di piccole dimensioni raggruppate con il nome generico di “pesce azzurro” (Bini, 1970).

### ⌘ Descrizione

Corpo affusolato, snello, a sezione ovaliforme con ventre liscio ed arrotondato. La testa è allungata (circa 25% della lunghezza totale) e presenta ampie aperture branchiali. Il muso appuntito è prominente ed acuto. La bocca è infera ed ampia, con la mascella superiore che oltrepassa il margine posteriore degli occhi, e quella inferiore corta e con piccoli denti che, all’indietro raggiunge quasi il bordo del preopercolo. Gli occhi sono di notevoli dimensioni e negli adulti presentano una membrana adiposa. L’unica pinna dorsale, provvista di raggi molli, è situata circa a metà del corpo in posizione avanzata rispetto alle pinne anali; queste sono di piccole dimensioni e situate in posizione mediana. Le pinne pettorali in posizione ventrale sono sottili ed allungate, la pinna caudale è forcuta. La superficie del corpo, ricoperta da squame caduche, presenta la colorazione tipica delle specie pelagiche, azzurra con sfumature grigio-verdastre sul dorso e argentea sui fianchi e sul ventre. Si tratta di un adattamento mimetico tipico dei pesci pelagici per sfuggire ai predatori; visto dall’alto, il blu del dorso si confonde con l’oscurità delle acque profonde del fondale, visto dal basso il ventre chiaro si confonde con la luce proveniente dalla superficie (Millàn et al., 1999). La vita massima è circa 4 anni.



### ⌘ Habitat

E' un pesce pelagico gregario, vive in grossi banchi e compie importanti migrazioni, a scopo trofico e riproduttivo, che lo vedono avvicinarsi alla costa in primavera-estate e spostarsi a maggiori profondità per la restante parte dell'anno (in Mediterraneo 100-180 m, nel Mar Nero 60-70 m). Specie eurialina ed euriterma, tollera variazioni di salinità comprese tra 5 e 41 e variazioni di temperatura in un intervallo che va da 6 a 29°C; in alcuni casi arriva a penetrare negli estuari, negli stagni salmastri e nelle lagune (Suau et al., 1979).

### ⌘ Nutrizione

L'acciuga ha abitudini trofiche diurne e si ciba preferenzialmente di zooplancton; in particolare di piccoli crostacei, quali i copepodi, e di larve di diversa origine, appartenenti soprattutto ai molluschi. In alcuni casi può nutrirsi anche di fitoplancton (Lucchetti, 2003).

### ⌘ Riproduzione

La riproduzione di *E. encrasicolus* avviene in prossimità della costa, dove la specie trova maggiore abbondanza di alimento, e si estende dal periodo estivo fino all'autunno con un picco maggiore in giugno-luglio ed uno minore in ottobre-novembre (Millàn et al., 1999; Grammitto et al., 2001). I sessi sono separati e la maturità sessuale è raggiunta al termine del primo anno di vita, alla taglia di circa 9cm. Ogni femmina emette fino a 40.000 uova di forma ellittica e di circa 1 mm di diametro che, una volta emesse all'esterno, vengono fecondate rimanendo allo stato pelagico fino a 50 metri di profondità. La larve, di circa 2 mm, schiudono dopo 2-3 giorni dando subito inizio alla vita gregaria (Grammitto et al., 2001). Gli individui giovanili e immaturi presentano una banda argentea lungo i fianchi e costituiscono, insieme ai giovani di sardina, il cosiddetto "bianchetto" la cui cattura è strettamente regolata da decreti ministeriali (Lucchetti, 2003).

### ⌘ Pesca

*E. encrasicolus* viene pescata principalmente con reti da traino pelagiche (volanti), reti da circuizione (lampara o ciancuolo), e reti da posta fissa e derivanti (menaide e tremaglio). La taglia minima pescabile è di 9 cm; in Italia le catture più rilevanti avvengono nel mar Adriatico, in particolare nel periodo compreso tra Marzo e Settembre (Lucchetti, 2003).



## 5.0 MATERIALI E METODI

Trenta campioni di acciuga sono stati campionati nell' area del Golfo di Catania nei mesi di Febbraio, Giugno e Settembre 2010, che corrispondono rispettivamente al periodo non riproduttivo della specie, al periodo riproduttivo più intenso, e al periodo riproduttivo meno intenso. Da tutti gli esemplari sono stati prelevati campioni di branchie, immediatamente conservati sotto formalina, e successivamente utilizzate per l'allestimento di preparati istologici duraturi per la determinazione di MTs, HSP70 ed EROD mediante metodi immunoistochimici. Le stesse proteine sono state misurate tramite Western Blotting nei campioni di fegato conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Campioni di tessuto muscolare sono stati invece utilizzati per le analisi relative all'accumulo di metalli, IPA, PCB e DDT totale.



### 5.1 Determinazione dei metalli

#### Trattamento preliminare dei campioni

Per il trattamento dei campioni in laboratorio è stato utilizzato materiale da dissezione (coltelli, bisturi, pinzette e forbici) in acciaio inossidabile per evitare possibili contaminazioni.

Per ogni esemplare, mediante l'utilizzo di una bilancia analitica, sono stati pesati 0,5 g di tessuto muscolare, immediatamente conservati in appositi contenitori, in plastica sterile monouso, prima del successivo ciclo di mineralizzazione.

#### Mineralizzazione acida con sistema a microonde

Il metodo prevede la digestione totale del tessuto animale, con miscela di acidi forti, a caldo, in recipienti chiusi, per portare in soluzione tutti i metalli presenti.

Si tratta, in particolare, di un sistema chiuso a microonde che prevede l'utilizzo di contenitori in PTFE con coperchio, alloggiati in piastre multiple, nei quali sono state trasferite le aliquote di tessuto muscolare.

Ai campioni presenti nei contenitori sono stati successivamente aggiunti 6 ml di  $\text{HNO}_3$  al 65% e 2 ml di  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%; i contenitori sono stati chiusi e dopo circa 15 minuti è stata eseguita la mineralizzazione in forno a microonde adottando un preciso programma termico appositamente costruito. Per ogni tornata di campioni sono stati preparati anche dei bianchi contenenti solo la soluzione digestiva.

Terminato il ciclo di mineralizzazione, i contenitori sono stati aperti sotto cappa dopo averli lasciati raffreddare a temperatura ambiente per una notte; successivamente i campioni digeriti sono stati trasferiti in provette di plastica sterile e portati ad un volume di 30 ml con acqua bidistillata.

I contenitori utilizzati per la mineralizzazione sono stati sottoposti a lavaggi con acqua acidulata ( $\text{HNO}_3$  1:5) dopo ogni ciclo digestivo.

#### Analisi quali-quantitativa dei metalli mediante ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)



ICP-MS Elan DRC-e

La tecnica ICP-MS è una tipologia di spettrometria di massa altamente sensibile e in grado di effettuare determinazioni di tipo quali-quantitativo su molteplici sostanze inorganiche, metalliche e non metalliche, presenti anche in concentrazioni inferiori a una parte per trilione. In ICP-MS, il plasma è utilizzato per atomizzare e ionizzare gli atomi del campione. Gli ioni, ottenuti, vengono quindi fatti passare, attraverso un sistema di aperture (coni), nell'analizzatore di massa, nell'ambito di un sistema che lavora sotto vuoto. Gli isotopi degli elementi vengono identificati in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ), tramite un analizzatore a quadrupolo, e l'intensità di ogni picco è proporzionale alla quantità del particolare isotopo dell'elemento nel campione.

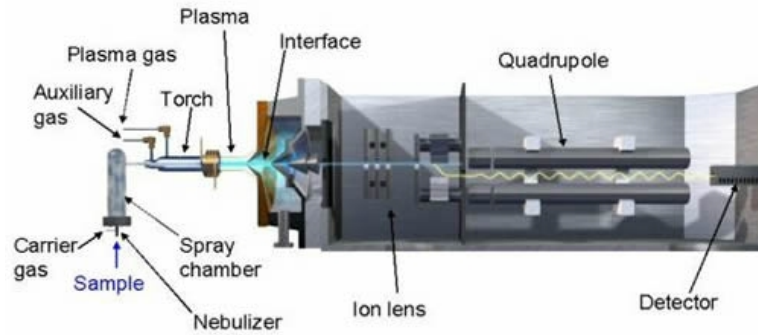
### Ionizzazione

Una bobina di metallo, alimentata da un generatore di radiofrequenze (RF) genera un intenso campo magnetico. Nel centro di questo avvolgimento è posta la torcia che consiste di 3 tubi concentrici, in quarzo, che contengono 3 flussi separati di Ar. Il plasma è indotto dal flusso di Ar. Il campione, introdotto come fine aerosol o gas, viene trasportato attraverso il tubo più interno.

La torcia dell'ICP è costruita in modo tale da permettere l'iniezione del campione direttamente nel cuore del plasma, dove esso collide con elettroni liberi, atomi di Ar e ioni  $Ar^+$  subendo i processi di atomizzazione e ionizzazione. Gli ioni che si formano sono prevalentemente monocarichi ( $M^+$ ) anche se possono formarsi specie  $M^{++}$ . Inoltre nel plasma alcuni di questi ioni possono ricombinarsi con altre specie producendo specie molecolari stabili (es.  $M^{+}Ar^+$ ,  $M^{+}Z^+$ ,  $MO^+$ , ecc.), molte delle quali, essendo cariche positivamente, potrebbero essere trasmesse all'analizzatore di massa insieme agli ioni  $M^+$  e  $M^{++}$ . Ai fini dell'analisi si preferisce avere la forma monocationica  $M^+$ , pertanto si scelgono le condizioni sperimentali che ne aumentino la produzione a scapito delle altre.

### Campionamento degli ioni

La zona critica dello strumento è quella dell'interfaccia tra il plasma, che opera a pressione ambiente, e lo spettrometro di massa, che necessita di alto vuoto (circa  $10^{-7}$  mBa). L'interfaccia consiste di due coni con la punta rivolta verso il plasma, il sampler cone (cono di campionamento) più prossimo al plasma e lo skimmer cone (cono di scrematura) localizzato qualche millimetro dietro il sampler.



**Illustrazione delle componenti interne di un ICP-MS**

Subito dietro ai coni, il sistema di lenti focalizza gli ioni verso la regione del quadrupolo, attraverso il passaggio in un cilindro metallico carico che agisce da lente focalizzatrice; infatti dal momento che la carica della lente è la stessa degli ioni, essi sono respinti indietro andando a formare un fascio di ioni definito.

#### Separazione degli ioni – Il quadrupolo

Lo spettrometro di massa separa i singoli ioni carichi in base alla massa, agendo come un filtro. Il quadrupolo consiste di quattro barre orizzontali parallele che vanno a delimitare uno spazio a sezione quadrata; alle coppie agli antipodi vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fa muovere gli ioni, consentendo solo a quelli di una data massa di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore. Il quadrupolo, quindi, smista gli ioni sulla base del rapporto massa-carica.

#### Il detector

Gli ioni provenienti dallo spettrometro di massa colpiscono la superficie attiva del detector, generando un segnale elettronico misurabile. Tale superficie attiva, costituita da un dinodo, emette un elettrone ogni volta che risulta colpita da uno ione dando così vita ad un segnale amplificato; l'elettrone rilasciato dal primo dinodo colpisce il secondo che a sua volta emette più elettroni. La cascata di elettroni continua fin quando non si ottiene un impulso misurabile.

### **5.2 Determinazione Degli Idrocarburi Policiclici Aromatici**

#### Estrazione degli IPA

Prima di iniziare l'estrazione degli IPA dai campioni, è stato necessario effettuare delle prove di recupero per dimostrare che il metodo scelto fosse in grado di garantire un'accettabile

recupero degli analiti da una matrice spiked (muscolo controllo addizionato di standard) e conoscere inoltre l'eventuale effetto matrice che potrebbe verificarsi nella determinazione fluorimetrica in HPLC. In particolare, per la nostra prova abbiamo utilizzato una concentrazione di 100 µl di standard mix certificato di 16 IPA (Tab. 3) della Ultra Scientific, con una concentrazione finale totale di 69,05 µg/ml. Il recupero non inferiore al 70% di ogni analita ha testimoniato la validità del metodo scelto. La scelta della concentrazione del recupero non è stata casuale, ma è stata preceduta da un'attenta ricerca bibliografica che ha messo in evidenza come, nel muscolo di pesce proveniente da altri distretti geografici, il valore medio di IPA totali ritrovati si aggira sempre intorno a 0,69 µg/g. Una volta validato il metodo, si è proceduto al trattamento dei campioni oggetto di studio. Ciascun muscolo è stato per prima cosa pesato, con una bilancia analitica, tagliato in piccoli pezzi mediante un bisturi e messo in una vial di vetro da 20 ml, con tappo a vite e con setto in teflon. Al campione di muscolo sono stati aggiunti 10 ml di soluzione di diclorometano-acetone al 50% con grado di purezza per HPLC; la soluzione è stata preparata utilizzando becker e pipette graduate di vetro, opportunamente puliti. A questo punto il contenuto della vial è stato accuratamente omogeneizzato al fine di disfare meglio il muscolo e renderlo più accessibile alla soluzione estraente; in seguito si è proceduto alla estrazione per sonicazione per 6 minuti, 2 minuti per volta, con piccole pause tra una sonicazione e l'altra, per evitare il riscaldamento del campione e quindi possibili perdite degli analiti ricercati. L'energia cinetica della sonicazione, quindi, è servita ad estrarre le molecole organiche di nostro interesse dalla matrice. L'estratto ottenuto è stato raccolto con una pipetta pasteur monouso e messo in una vial di raccolta, mentre al campione rimasto sono stati aggiunti altri 10 ml di soluzione estraente e sottoposto ad un altro ciclo di sonicazione; infine, sono stati aggiunti ulteriori 2 ml di diclorometano alla vial contenente il campione, e tramite un'agitazione finale in vortex, sono state recuperate le eventuali molecole di IPA rimaste adese alle pareti. Infine, data la fotolabilità degli IPA, sia la vial di raccolta che quella contenente il muscolo sono state avvolte con alluminio per proteggere l'estratto dalla luce. L'estratto ottenuto è stato purificato con cartucce C<sub>18</sub> Bond Elute Varian da 12 ml, precedentemente condizionate con 5 ml di diclorometano, 5 ml di isopropanolo e 5 ml di acqua per HPLC. I possibili IPA rimasti nelle pareti delle vials sono stati recuperati con una miscela di diclorometano ed acetone al 50% e caricati sempre nella cartuccia. In questo modo il tutto è stato purificato e l'eluato che si è ottenuto è stato concentrato in corrente di azoto e portato a secco, per il cambio di solvente. Infine il campione è stato ripreso con 1 ml di acetonitrile e analizzato con l'HPLC.

### Analisi quali-quantitativa degli IPA

Sia il campione della prova di recupero che i campioni reali, sono stati analizzati in un sistema HPLC Varian ProStar 325 con doppia rivelazione UV-FL, per mezzo di una colonna Varian Chromsep 15 cm x 0,5µm x 1,5 cm con opportuna programmata di eluizione, con lunghezza d'onda fissa a 255 nm per il detector UV e con programmata a 6 lunghezze d'onda per il detector FL. Il sistema è stato precedentemente tarato mediante taratura a 4 punti con un coefficiente di correlazione medio di  $R^2 = 0.9878$  per le 16 molecole.

La tecnica HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) permette di separare due o più composti presenti in miscela sfruttando l'equilibrio di affinità tra una fase stazionaria posta all'interno della colonna cromatografica e una fase mobile inerte che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di ritenzione) rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta affinità per la fase mobile. Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è spinto attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione, è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 µm); per questo motivo, se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato, è indispensabile applicare un'elevata pressione. Alla fine della colonna è applicato un rivelatore (UV-VIS, Spettrofluorimetria) e un calcolatore, che permettono una analisi in continuo dell'uscita della colonna e identificazione e quantificazione delle sostanze iniettate.

I vantaggi principali di questa tecnica sono: la dimensione ridotta della colonna che evita problemi di deviazioni longitudinali (movimenti della fase mobile longitudinale) e di percorsi alternativi; la velocità di eluizione (passaggio della fase mobile attraverso la colonna) costante e regolabile; velocità di esecuzione ridotta; piccole quantità di composto necessaria all'analisi (nell'ordine dei µg e ng di campione solubilizzato in apposito solvente). Lo svantaggio principale dell'HPLC è, invece, il costo elevato. A causa delle elevate pressioni di esercizio, la strumentazione per HPLC è di norma più complessa rispetto a quella per altre tecniche cromatografiche. Le componenti principali dell'apparecchiatura sono:

- Contenitori per la fase mobile
- Pompe (a pistone ternaria)



- Sistemi di introduzione del campione (Autosampler)
- Colonna
- Peltier multi valve
- Rivelatori (UV-FL)
- Fractions collector
- Software (Galaxie)

La regione dello spettro più sfruttata nei rivelatori ad assorbanza per HPLC è l'UV, in secondo ordine vi è la regione del visibile; i rivelatori a fluorescenza presentano il vantaggio di una maggiore sensibilità, di solito superiore a un ordine di grandezza, rispetto ai metodi ad assorbanza. Hanno, però, lo svantaggio di un minore campo di applicabilità, dato che il numero delle specie assorbenti è notevolmente superiore rispetto a quelle fluorescenti. Si possono comunque usare rivelatori a fluorescenza anche per analiti non fluorescenti se si riesce a trattarli con reagenti che li rendano tali (derivatizzazione).

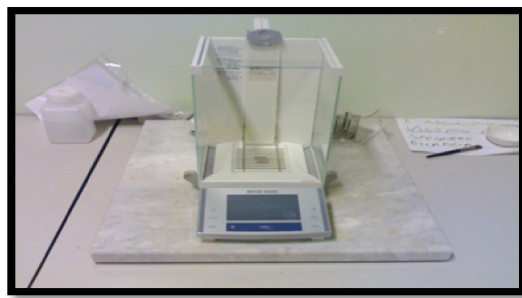
Le cromatografie di colonna forniscono sia informazioni qualitative (i tempi di ritenzione) che quantitative, basate sul confronto dell'area e dell'altezza del picco cromatografico con quello di uno o più standards.

### **5.3 Determinazione Policlorobifenili (PCBs)**

#### Fase Preliminare

I campioni da analizzare sono stati scongelati e pesati (1 g), con l'ausilio di materiale da dissezione quali bisturi e pinzette, utilizzando una bilancia analitica (Mettler TOLEDO xs105); dalla letteratura è emerso che le concentrazioni medie di PCB riscontrate nel muscolo di pesce sono solitamente basse, di conseguenza, abbiamo ritenuto opportuno raggruppare i 60 campioni in 12 gruppi da 5 grammi al fine di ottenere quantità rilevabili dallo strumento.

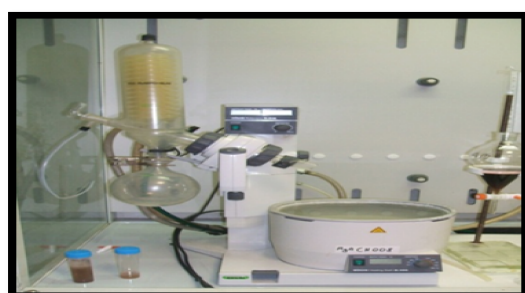
Ogni campione è stato successivamente posto a bagno in HCl normapur con grado di purezza al 37% per 18-30 ore, al fine di ottenere una matrice liquida su cui effettuare le estrazioni.



### Fase Di Estrazione

Ogni campione liquefatto è stato versato in un imbuto separatore; ad esso sono stati aggiunti 50 ml di soluzione estraente diclorometano-esano, con proporzioni, rispettivamente, del 75% di diclorometano (con grado di purezza per determinazione di residui di pesticidi), e del 25% di esano con lo stesso grado di purezza. Ottenuta la miscela si è proceduto all'agitazione dell'imbuto, avendo cura di fare sfiatare allentando il tappo ogni 10-15 secondi, per permettere ai gas prodotti di fuoriuscire; dopo di che la soluzione ottenuta è stata lasciata a decantare per 15-20 minuti, al fine di ottenere una separazione di fase.

Ottenuta la separazione, le due fasi sono state diversamente trattate; quella superiore, costituita dalla soluzione estraente, e che intrappolava le molecole di nostro interesse, è stata raccolta in un pallone di vetro; quella inferiore, data dalla matrice disciolta in acido, è stata invece sottoposta ad altri due cicli di estrazione, identici a quello precedentemente descritto. Una volta raccolti circa 150 ml di soluzione estraente, si è proceduto riduzione del volume fino a 2 ml mediante rotavapor (BUCHI- HEATING BATH B-490).



A questo punto l'estratto è stato purificato in colonnine di florisil, precedentemente attivate con abbondante esano; L'esano di attivazione è stato poi stato scaricato, ad eccezione di un battente sul quale è stato versato il campione, avendo cura di avvinare con soluzione estraente abbondantemente le pareti del pallone che conteneva l'estratto, al fine di recuperare eventuali

molecole rimaste adese alle pareti interne del pallone. Dunque, si è proceduto con l'aggiunta in colonna di 10 ml di esano, che è stato fatto scorrere senza utilizzo di vuoto a pressione; questo è stato raccolto in un pallone, e la sua funzione è stata quella di distribuire i PCB lungo la colonnina di florisil. A questo punto sono stati aggiunti 20 ml di soluzione estraente sul florisil, suddivisi in due aliquote da 10 ml ciascuna, che sono state raccolte, utilizzando vuoto a pressione, insieme all'esano. I 30 ml raccolti sono stati di nuovo concentrati al rotavapor, questa volta quasi fino a secchezza, al fine di avere la certezza che non ci fossero residui di diclorometano, che avrebbero potuto danneggiare la colonna del gascromatografo. Il campione è stato quindi recuperato con circa 5-6 ml di esano, versato in una vial, avvinando sempre le pareti del pallone. La riduzione finale del volume, fino a 1 ml, è stata effettuata in corrente d'azoto.

### Analisi Dei Campioni

L'analisi dei campioni è stata eseguita mediante gascromatografia; questa è una tecnica che viene utilizzata per separare miscele complesse costituite da diversi componenti. Tutti i tipi di cromatografia sono basati sul fatto che, ogni composto di una miscela, a parità di condizioni, interagisce con l'ambiente circostante in maniera diversa. In questa tecnica si sfruttano le diverse proprietà chimico-fisiche degli analiti, quali la loro solubilità in un mezzo liquido, la massa molecolare, la carica, il loro ingombro sterico. Le tecniche cromatografiche, infatti, sono definite in base ai principi fisico-chimici che sfruttano e classicamente sono suddivise in: adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, filtrazione molecolare. Ogni sistema di separazione viene determinato dalla distribuzione competitiva di un componente tra una fase stazionaria ed una mobile (chiamata carrier), a loro volta in equilibrio tra loro. Fra i componenti della miscela (che costituisce il campione iniziale) alcuni saranno in grado di interagire più fortemente con la fase stazionaria venendone trattenuti, altri meno e di conseguenza saranno favoriti a interagire con la fase mobile.

In altre parole, la cromatografia si basa sulla diversa ripartizione dei componenti da separare tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni componente con esse. Nella tecnica gas-cromatografica, cioè quella utilizzata in questo studio, la fase mobile è un gas detto carrier, che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria, la quale può essere un solido granulare poroso oppure un liquido.

La strumentazione essenziale di ogni cromatografo è la seguente :

- sistema di alimentazione gas di trasporto (carrier);
- iniettore o camera di iniezione;

- colonna;
- rivelatore o detector;
- registratore e integratore.

Esistono due tipi di iniezione, split e splitless; lo split si usa quando il campione, a motivo della sua alta concentrazione, potrebbe saturare la risposta del detector e, uscendo fuori scala, falserebbe il risultato dell'analisi; pertanto è necessario diluirlo. In questo iniettore il campione viene premiscelato con il gas di trasporto; di questa miscela solo una parte passa realmente nella colonna, mentre buona parte viene indirizzata verso la valvola regolabile di spurgo. Diversa è la tecnica splitless, che invia direttamente in colonna tutto il campione. Il campione, dopo essere stato iniettato, è portato in testa alla colonna, sottoposto al flusso costante del gas di trasporto e separato nelle sue componenti in funzione di quanto queste siano affini (di solito per polarità) alla fase stazionaria; un'ulteriore variabile su cui si agisce spesso per migliorare la separazione, è la temperatura della colonna, che può essere tenuta costante ("isoterma") o fatta variare secondo un gradiente desiderato (programmata di temperatura). Nei moderni strumenti la programmazione è di tipo lineare, e prevede le seguenti tappe:

- Isoterma iniziale: indica per quanto tempo si rimane a una determinata temperatura.
- Fase di rampa: stabilisce la temperatura da raggiungere e con quale velocità.
- Isoterma finale: indica per quanto tempo si deve restare alla temperatura più alta.
- Raffreddamento: si attua dopo la fine della registrazione del cromatogramma.

Quando il campione esce dall'estremità finale della colonna (si dice che è stato eluito) viene raccolto da un rivelatore. Il diagramma che rappresenta il segnale generato dal rivelatore in funzione del tempo - fissato a zero l'istante in cui il campione è stato immesso nella colonna - è il cromatogramma del campione; esso si presenta come una sequenza di picchi di varia ampiezza ed altezza distribuiti lungo l'asse del tempo. Dal tempo di ritenzione di ogni picco è possibile dedurre l'identità del composto eluito; dall'area o dall'altezza dei picchi è possibile dedurre le concentrazioni o le quantità assolute dei vari composti presenti nel campione analizzato, a seconda del rivelatore impiegato.

In questo lavoro, il detector impiegato è di tipo ECD (rivelatore a cattura di elettroni); si tratta di un rivelatore selettivo e non distruttivo. Esso è costituito da una sorgente radioattiva ( $^{63}\text{Ni}$ ) che emette radiazioni beta (elettroni). Gli elettroni primari, emessi dalla sorgente, vengono a trovarsi in un campo elettrico di cui la sorgente costituisce l'anodo, mentre il catodo si trova verso l'uscita. Gli elettroni primari colpiscono il carrier formando ioni positivi ed elettroni secondari. Il flusso di queste cariche costituisce la corrente di fondo e dipende dalla differenza di potenziale tra i due elettrodi. Quando insieme al carrier è presente un'altra sostanza elettroaffine, cioè in grado di catturare gli elettroni secondari, si verifica una diminuzione di corrente di fondo. La corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un registratore. Le sostanze maggiormente rivelate sono quelle contenenti alogeni, quali, ad esempio, i PCB. In questo lavoro, i campioni estratti con la tecnica precedentemente descritta sono stati analizzati mediante GC2010-ECD SHIMADZU.

La colonna capillare usata è di tipo VF-5 PESTICIDES ( $30\text{m} \times 0,25\text{mm ID} \times 0,25 \mu\text{m DF}$ ). Il programma di temperatura iniziale del forno è stato il seguente: isoterma iniziale a  $150^\circ\text{C}$  per 0 min, incremento fino a  $180^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , isoterma a  $180^\circ\text{C}$  per 0 minuti, incremento fino a  $260^\circ\text{C}$  a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , isoterma a  $260^\circ\text{C}$  per 3 minuti, incremento fino a  $300^\circ\text{C}$   $10^\circ\text{C}/\text{min}$  e isoterma a  $300^\circ\text{C}$  per 5 minuti. La corsa totale ha la durata di 31 minuti. Come gas di trasporto è stato utilizzato idrogeno, alla velocità flusso di 1 ml/min. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a  $300^\circ\text{C}$ , mentre la temperatura del detector ECD è di  $330^\circ\text{C}$ . Le iniezioni sono state effettuate in modalità split 1/10 con un volume di iniezione di 1  $\mu\text{l}$ .

Prima di iniziare l'estrazione dei PCB dai campioni di pesce è stato necessario effettuare delle prove di recupero, per dimostrare che il metodo scelto fosse in grado di garantire un'accettabile recupero di analiti da un campione fortificato o matrice spiked (muscolo controllo addizionato di standard), e conoscere inoltre l'eventuale effetto matrice che potrebbe verificarsi nella determinazione al GC-ECD.

Un recupero di ogni analita non inferiore al 70% testimonia la validità del metodo scelto. Nelle prove di recupero, ogni campione veniva addizionato di un ml di standard mix contenente 39 congeneri di PCB, alla concentrazione di 250 ppb. La scelta della concentrazione del recupero non è stata casuale, ma è stata preceduta da un'attenta ricerca bibliografica.

Sono state inoltre utilizzate delle matrici di riferimento, opportunamente corredate di certificato di analisi. Si è inoltre proceduto alla taratura a 9 punti (5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppb), e alla messa a punto del metodo sullo strumento utilizzato per l'analisi, utilizzando degli standard singoli certificati.

## 5.4 Determinazione dei Pesticidi

Dopo la determinazione dei PCB, gli stessi campioni sono stati analizzati, previa opportune prove di recupero su campioni addizionati di standard mix di pesticidi, anche per la determinazione di DDT, DDE e DDD. L'unica differenza, rispetto alla precedente metodica, riguarda il solvente con il quale il campione è stato recuperato; mentre per i PCB si procedeva, dopo asciugatura fino a secchezza in corrente d'azoto, all'aggiunta di un ml di esano, per i pesticidi si è addizionato un ml di soluzione estraente diclorometano-esano 75%-25%. L'analisi è stata svolta utilizzando un gascromatografo-spettrometro di massa. La metodologia analitica del gas massa (GC/MS) combina la tecnica gas-cromatografica (GC) con le potenzialità della spettrometria di massa (MS) per la determinazione qualitativa e quantitativa di una ampia gamma di sostanze, prevalentemente organiche, a bassa polarità e basso peso molecolare accomunate da una temperatura di ebollizione sempre inferiore a 300°C.

I principali vantaggi che si ottengono utilizzando lo spettrometro di massa come rivelatore dopo la separazione cromatografia dei componenti, consistono in una sensibilità maggiore rispetto ai detectors comunemente usati dai GC; lo spettrometro di massa, infatti, rappresenta il rivelatore ideale per la gascromatografia, perché permette di analizzare in tempo reale i singoli picchi in uscita dalla colonna, effettuando sia un'analisi qualitativa che quantitativa, mediante il confronto dello spettro ottenuto. Il principio della spettrometria di massa consiste, in generale, nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione dei diversi ioni prodotti e nella loro rivelazione. In uno spettrometro di massa il campione viene portato in fase gassosa e le molecole vengono frammentate per bombardamento con elettroni; il catione radicalico che si forma (ione molecolare) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (ioni frammento). Gli ioni che si formano, accelerati da un campo elettrico posto in un campo magnetico, percorrono traiettorie diverse secondo il rispettivo rapporto carica/massa e perciò si separano tra di loro.

Il risultato è lo spettro di massa, che consente di ricostruire la formula della molecola presente dall'identificazione dei frammenti in base alla loro massa atomica; negli strumenti moderni lo spettro viene confrontato dal computer con i numerosi spettri memorizzati nella banca dati (library) o con composti standard. Nel corso delle analisi il detector utilizzato è stato Spettrometria di Massa Tandem.

In generale, uno spettrometro di massa tandem è costituito da due analizzatori disposti in serie. Il primo analizzatore (MS<sub>1</sub>) ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti

in uno spettro, lo ione desiderato. Lo ione selezionato (ione padre, genitore o precursore) viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una cella di collisione, e i frammenti (ioni figli o prodotto), generati dalla dissociazione dello ione molecolare a causa degli urti con il gas di collisione introdotto nella camera, vengono separati dal secondo analizzatore (MS<sub>2</sub>) in base al loro rapporto m/z. In questo modo si possono avere informazioni alle volte determinanti per la risoluzione di problemi strutturali.

Strumenti dotati di sistema tandem MS sono i tripli quadrupoli e, come nel caso dello strumento utilizzato da noi, le trappole ioniche, dove tutti e tre i suddetti eventi avvengono in un unico luogo, la trappola.

Negli analizzatori a trappola ionica le barre del filtro di massa presentano una disposizione sferica. Mentre nel quadrupolo lineare gli ioni selezionati passano direttamente verso il rivelatore, la trappola di ioni trattiene temporaneamente tutti gli ioni, che vengono rilasciati sequenzialmente verso il rivelatore variando il campo elettrico; diventa quindi possibile intrappolare per un tempo lungo a piacere gli ioni che provengono dalla sorgente. Una piccola quantità di elio all'interno della trappola aiuta questo processo diminuendo l'energia cinetica degli ioni e facendoli rimanere verso il centro della trappola e lontani dalle pareti. Oltre che "conservare" gli ioni, è possibile, aumentando progressivamente la radiofrequenza, rendere instabili le traiettorie degli ioni a rapporti m/z via via crescenti, che quindi escono dalla trappola e vanno a colpire il detector. In generale le trappole ioniche non raggiungono gli intervalli di massa e l'alta risoluzione di altri strumenti del settore ma sono estremamente versatili, forniscono buona sensibilità ed hanno costi iniziali contenuti. L'analisi dei campioni è stata eseguita mediante GCMS/MS 4000 VARIAN; la colonna capillare utilizzata di tipo VF5MS (30m × 0,25mm × 0,25 µm). Il programma di temperatura iniziale del forno è stato il seguente: isoterma iniziale a 60°C per 0,5 min, incremento fino a 150°C a 50°C/min, isoterma a 150°C per 0 minuti, incremento fino a 300°C a 8°C/min, isoterma a 300°C per 10 min. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio, alla velocità di flusso di 1 ml/min. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 250°C. Le iniezioni sono state effettuate in modalità split con un volume di un µl e un rapporto di splittaggio 1/20.

## **5.5 Determinazione di proteine su campioni di fegato tramite tecnica Western Blotting**

Il Western Blotting è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Per facilitare il riconoscimento in genere le proteine vengono previamente separate in base

alle loro dimensioni sfruttando una elettroforesi denaturante (SDS-Page). Successivamente esse vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa e quindi si procede alla rivelazione vera e propria mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

### Preparazione dei campioni

Tutte le operazioni riportate di seguito sono state svolte a +4°C.

Ogni aliquota di fegato è stata omogeneizzata con Potter in Tampone di lisi Ripa più Inibitori. L'omogenato è stato poi centrifugato a 9000 x g per 20 minuti a +4°C (Microfuge R, Beckman Coulter) previa sonicazione. Il sovrantante ottenuto è stato prelevato e congelato a -80°C fino al momento delle analisi.

### Quantificazione delle proteine mediante BCA

Utilizzando albumina di plasma bovino (BSA), è stata preparata una curva standard di calibrazione a varie concentrazioni. Per la procedura di quantificazione è stato utilizzato il BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). La lettura delle soluzioni, preparate in doppio, è stata eseguita ad una lunghezza d'onda pari a 560 nm, allo spettrofotometro 1420 Multilabel Counter, Victor<sup>3</sup>, Perkin Elmer, previa incubazione a 37°C per 30 min; lo strumento fornisce un risultato dato dalla media delle due letture. La concentrazione proteica, espressa in µg/µl, viene calcolata in rapporto alla curva standard di BSA.

[albumin] µg	OD		Media	OD-blank	SAMPLE	[sample] µl	Letture 1	Letture 2	OD		µg	µg/µl
0	0,134	0,131	0,133	0	1	3	0,760	0,730	0,745	0,611	41,84	13,95
4	0,208	0,203	0,206	0,073	2	3	0,688	0,687	0,6875	0,5535	38,51	12,84
10	0,311	0,306	0,309	0,176	3	3	0,424	0,428	0,426	0,292	19,70	6,57
15	0,368	0,368	0,368	0,2355	4	3	0,477	0,490	0,4835	0,3495	24,67	8,22
20	0,442	0,444	0,443	0,3105	5	3	0,879	0,956	0,9175	0,7835	55,31	18,44
30	0,575	0,580	0,578	0,445	6	3	0,638	0,679	0,6585	0,5245	37,02	12,34
40	0,701	0,711	0,706	0,5735	7	3	0,507	0,528	0,5175	0,3835	27,07	9,02
60	1,005	0,994	1	0,867	8	3	0,364	0,443	0,4035	0,2695	19,02	6,34
80	1,237	1,244	1,241	1,108	9	3	0,362	0,347	0,3545	0,2205	15,56	5,19
0,998033837												
<b>y=mX+b</b>	m		b		0,014		0,018					
<b>Statistic Array</b>	se(m)		se(b)		0,000		0,008					
	r^2		se(y)		0,997		0,013					

**Risultati ottenuti dal processo di quantificazione. In giallo la concentrazione proteica espressa in µg/µl.**

### Preparazione e trattamento delle aliquote

I campioni sono stati aliquotati e diluiti in Simple Buffer 2x in modo da ottenere aliquote con concentrazione proteica di 50 µg/µl, sulla base dei risultati ottenuti dal processo di quantificazione.

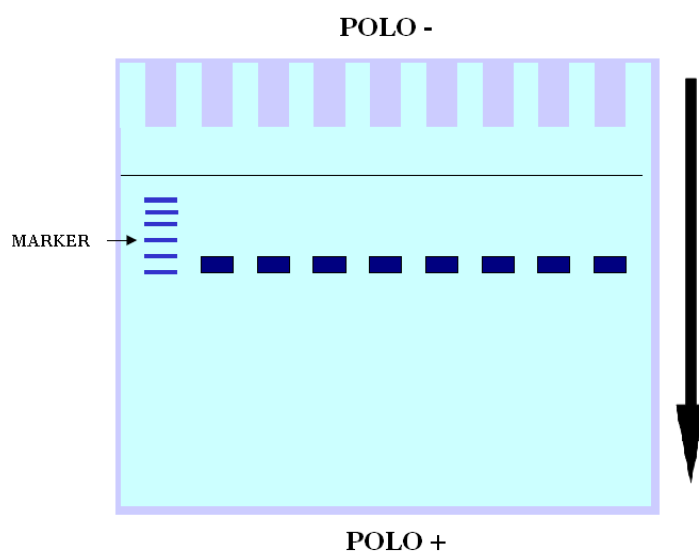


Le eppendorf contenenti i campioni sono state sottoposte a centrifugazione per 15 sec. a +4°C, previo trattamento al vortex e infine, per ottenere la denaturazione delle proteine, sono state inserite per un minuto in un becker con acqua in ebollizione.

#### Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE)

Nell'ambito degli studi strutturali risulta particolarmente utile ricorrere ad una separazione delle catene polipeptidiche su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), utilizzando un detergente anionico, il sodio dodecil-solfato (SDS). Questo denaturante proteico conferisce una carica netta negativa, praticamente uniforme, alle catene proteiche da separare, la cui migrazione nel gel dipenderà di conseguenza esclusivamente dal peso molecolare. Le proteine migrano così attraverso le maglie del polimero, sotto l'effetto di un campo elettrico solo in base alla massa.

Il gel è ottenuto dalla copolimerizzazione di acrilammide e N,N'-metilen-bis-acrilammide; quest'ultima utilizzata come reticolante della catene lineari. Catene polimeriche lineari sono legate trasversalmente da molecole di bis-acrilammide; le maglie formatesi in tal modo sono caratterizzate da una porosità dipendente dalla concentrazione del monomero, dal rapporto monomero-reticolante e dalle condizioni di reazione.



Per il nostro studio sono stati preparati gel con porosità del 15%.

I campioni sono stati caricati nei pozzetti del gel, avendo cura di inserire nel primo pozzetto circa 10µl di markers. Le proteine sono state fatte migrare per tutta la lunghezza del gel, grazie al campo elettrico applicato e all'utilizzo di un apposito tampone di corsa (Running Buffer).

#### Trasferimento in nitrocellulosa

A questo punto si è proceduto al trasferimento delle proteine su un supporto costituito da una membrana di nitrocellulosa con porosità 0,45 µm (Hybond-ECL). Il trasferimento è avvenuto applicando una corrente di 300 mA per un'ora, in apposito tampone di trasferimento (Transfer

Buffer). Particolare attenzione è stata data alla preparazione del “sandwich” di trasferimento nel quale i diversi elementi sono stati posti nel seguente ordine, partendo dal lato rivolto verso il polo negativo:

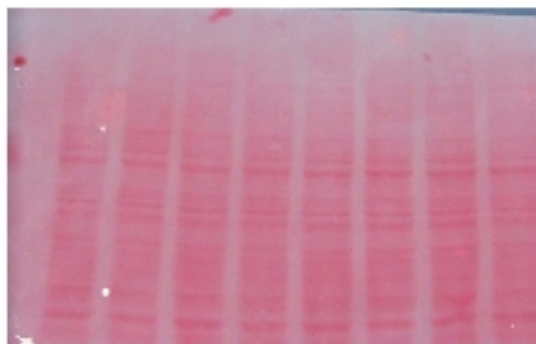
- Spugna;
- Carta;
- Gel;
- Membrana;
- Carta;
- Spugna.

Il trasferimento è avvenuto ponendo la cella in ghiaccio.

### Colorazione

Al termine del trasferimento la membrana è stata immersa in circa 20 ml di soluzione di Rosso Ponceau al fine di valutare l'efficienza del trasferimento, la presenza di bolle ed evidenziare l'area di lavoro.

La membrana è stata successivamente decolorata mediante lavaggi in TBS.



Colorazione delle bande proteiche con Rosso Ponceau

### Blocking in latte

I siti rimasti liberi a seguito del processo di trasferimento sono stati bloccati rivestendo la membrana con una miscela di proteine non specifiche. Il filtro di nitrocellulosa è stato quindi immerso in una soluzione al 5% di latte in polvere Nonfat Dry Milk (Premium Sanalac) in PBS per un'ora per evitare il legame non specifico dell'anticorpo su tali siti liberi.

### Incubazione in Anticorpo Primario

Si è proceduto a questo punto con l'incubazione della membrana in anticorpo primario, over night, su supporto oscillante.

Una volta rimosso e recuperato l'anticorpo primario, sono stati eseguiti tre lavaggi, da 15 min. con TBST su agitatore per eliminare dalla membrana l'eventuale anticorpo in eccesso che non avesse aderito al proprio antigene.

### Incubazione in Anticorpo Secondario

Lo step successivo ha visto l'incubazione in anticorpo secondario diluito in latte, per un'ora su supporto oscillante a temperatura ambiente.

Dopo aver eliminato l'anticorpo secondario sono stati eseguiti tre lavaggi in TBST da 15 min. su agitatore, per eliminare dalla membrana l'anticorpo in eccesso che non ha aderito alle immunoglobuline dell'anticorpo primario.

### Rivelazione e Sviluppo

A seguire è stato portato avanti il processo di rivelazione della proteina, attraverso l'esposizione della membrana ad un substrato chemiluminescente (ECL) per un minuto; una volta asciugata la membrana, il segnale è stato rilevato tramite autoradiografia su lastra fotografica (X-Ray Blue Film, BG Phor).

### Reblotting

Le membrane sono state normalizzate per contenuto proteico di  $\beta$ -Actina (housekeeping) adottando la stessa metodica utilizzata per la rivelazione degli altri anticorpi: trattamento con anticorpo primario Anti- $\beta$ -Actin Monoclonal, incubazione con anticorpo secondario, esposizione a ECL e sviluppo.

## **5.6 Determinazione di proteine su campioni di branchie tramite tecnica Immunoistochimica**

### Fissazione

Per prevenirne la decomposizione, i campioni di branchie appena prelevati, sono stati fissati mediante immersione in formalina. Il trattamento ha la funzione di bloccare le attività vitali

della cellula, rendendo insolubili i componenti strutturali, stabilizzando le proteine e inattivando gli enzimi idrolitici.

#### Lavaggio

I tessuti sono stati lavati in PBS (pH 7,4) per eliminare il fissativo in eccesso.

#### Disidratazione

Per eliminare la componente acquosa, che non permetterebbe l'entrata della paraffina nel tessuto, i tessuti sono stati disidratati mediante la scala ascendente degli alcoli (Etanolo 50°-70°-80°-90°-100°-Xilolo).

#### Diafanizzazione

Al fine di rendere il pezzo diafano (trasparente) e penetrabile dalla paraffina, si è proceduto al trattamento con un solvente della paraffina, quale lo Xilolo.

#### Incubazione

I tessuti sono stati immersi in paraffina e incubati in stufa, tarata secondo il punto di fusione della paraffina a 59°C, per permettere alla paraffina stessa di sostituirsi al solvente, all'interno del pezzo istologico.

#### Inclusione

I campioni sono stati immersi in paraffina e fatti solidificare a temperatura ambiente. Infine si è proceduto al montaggio su supporto solido per permetterne il taglio.

#### Taglio

Al microtomo sono state effettuate sezioni dello spessore di circa 5-6 µm.

#### Montaggio

Le sezioni, raccolte e montate su vetrini portaoggetto, sono state lasciate asciugare in stufa a 37°C per 24h.

#### Sparaffinatura e Idratazione

I vetrini sono stati immersi in soluzioni decrescenti di alcool (Xilolo-Etanolo100°- 90°-80°-70°-50°30°) e infine portati acqua distillata.

#### Incubazione in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

I vetrini sono stati incubati per 30' in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> all'0,5% in PBS per bloccare la perossidasi endogena che avrebbe potuto dar luogo ad una colorazione aspecifica. Al termine sono stati eseguiti lavaggi in PBS per eliminare i residui di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### Incubazione in NGS

I pezzi sono stati incubati per 1h in NGS (Normal Goat Serum) al 20 % in PBS, in camera umida e a temperatura ambiente al fine di bloccare i siti aspecifici che avrebbero potuto dare dei falsi positivi.

#### Incubazione in anticorpo primario

I campioni sono stati incubati over night in anticorpo primario diluito in PBS in camera umida a +4°C. Al termine sono stati eseguiti lavaggi in PBS.

#### Incubazione in anticorpo secondario

I vetrini sono stati incubati in anticorpo secondario perossidato diluito in PBS, per 2h in camera umida e a temperatura ambiente. A seguire lavaggi in PBS.

Per ogni campione analizzato sono state effettuate delle sezioni di controllo per le quali è stato omesso il passaggio in siero immunospecifico.

#### Incubazione in DAB

I campioni sono stati incubati in DAB in Tris HCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 7,6 per 5'. Il DAB costituisce il substrato della perossidasi esogena accoppiata all'anticorpo secondario e rende possibile la rivelazione della proteina. Al termine sono stati eseguiti lavaggi in PBS.

#### Disidratazione e Montaggio

Per eliminare i residui di H<sub>2</sub>O i vetrini sono stati disidratati in alcool crescenti, fino allo Xilolo; al termine è avvenuto il montaggio del vetrino coprioggetto.

#### Esame al microscopio ottico

## 5.7 Determinazione dei tassi di consumo e relativi fattori di rischio

I rischi per la salute dell'uomo derivanti dal consumo di questa specie sono stati valutati stimando :

- L'esposizione giornaliera caso controllo (EDI<sub>cc</sub>) sulla base di un ingestione giornaliera (IR<sub>d</sub>) media della specie in Sicilia di 6 g (Copat et al. 2011)

$$EDI_{cc} = (C * IR_d) / BW$$

C è la concentrazione media del contaminante nel muscolo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), BW il peso corporeo, assumendo che sia di 70Kg (EPA 2000).

- L'esposizione giornaliera calcolata assumendo che per pasto vengono consumati 227g di muscolo (EDI<sub>m</sub>) (EPA 2000)

$$EDI_m = (C * IR_m) / BW$$

- L'esposizione settimanale caso controllo (EWI<sub>cc</sub>) sulla base di un ingestione settimanale di 42g (IR<sub>w</sub>) (Copat et al. 2011)

$$EDI_w = (C * IR_w) / BW$$

I tassi di consumo calcolati sono stati poi confrontati con quelli suggeriti dalla World Health Organisation (WHO) per i contaminanti per i quali sono disponibili.

Inoltre sono stati calcolati il numero di pasti mensili per non avere effetti cancerogeni e non cancerogeni secondo le indicazioni della European Protection Agency (EPA).

Per gli effetti cancerogeni è stato calcolato il massimo tasso di consumo di pasti al mese che non generino un rischio più grande di 1 su 100000:

$$CRLim = \frac{ARL * BW}{CSF * Cm}$$

CRLim = massimo tasso di consumo al giorno (Kg/d)

ARL = livello di rischio accettabile in individui con una speranza di vita di 70 anni (1 in 1000000)

BW = peso corporeo

CSF = Cancer Slope Factor (mg/kg-giorno)

Cm = concentrazione misurata del contaminante

$$CRmm = \frac{CRLim * Tap}{MS}$$

CRmm = massimo tasso di consumo in termini di pasti al mese (meals/mo)

CRLim = massimo tasso di consumo al giorno (Kg/d)

Tap = intervallo di tempo sul quale vengono calcolati i tassi di consumo (30,44 giorni/mese)

MS = grandezza della porzione di pesce (227 g pesce/pasto)

Per gli effetti non cancerogeni è stato calcolato il massimo tasso di consumo di pasti al mese che non generino effetti cronici sistemici:

$$CRLim = \frac{RfD * BW}{Cm}$$

CRLim = massimo tasso di consumo al giorno (Kg/d)

Cm = concentrazione misurata del contaminante (mg/kg)

RfD = dose di riferimento (mg/kg- giorno)

$$CRmm = \frac{CRLim * Tap}{MS}$$

CRmm = massimo tasso di consumo in termini di pasti al mese (meals/mo)

CRLim = massimo tasso di consumo al giorno (Kg/d)

Tap = intervallo di tempo sul quale vengono calcolati i tassi di consumo (30,44 giorni/mese)

MS = grandezza della porzione di pesce (227 g pesce/pasto)



## 6.o RISULTATI

### 6.1 Metalli

Tabella 1

Concentrazione dei metalli (ppm w.w.) nel tessuto muscolare dei pesci campionati a febbraio

As	Cd	Hg	Pb	Zn	Cu	Mn	Cr	Co	Ni	Se	V	Fe	Mg	Ca	P	Na	K
7,719	0,005	0,067	0,007	7,348	0,783	0,536	0,941	0,014	0,017	0,423	0,377	11,989	383,7	1354,2	2996,4	1128,3	1508,8
8,885	0,002	0,094	0,002	6,023	0,596	0,610	1,077	0,011	0,027	0,458	0,505	6,756	420,0	1378,2	2837,0	768,3	4405,3
6,478	0,006	0,078	0,007	8,436	0,607	0,720	1,003	0,013	0,085	0,457	0,423	9,074	481,9	296,7	4019,5	906,3	5419,3
7,438	0,004	0,048	0,003	8,758	0,650	0,591	1,128	0,011	0,025	0,521	0,484	9,561	336,8	1303,5	2810,0	807,6	3765,1
8,422	0,002	0,048	0,001	9,043	0,606	0,439	1,051	0,008	<mdl	0,419	0,388	10,542	431,0	1047,4	3016,7	960,8	5090,6
3,519	0,013	0,062	0,002	5,749	0,668	0,407	1,081	0,014	0,004	0,575	0,416	18,899	433,4	259,0	3476,7	997,7	5374,0
6,207	0,004	0,056	0,003	8,867	0,735	0,519	1,083	0,010	0,095	0,423	0,415	14,631	424,0	926,5	3105,9	986,1	4905,7
7,239	0,002	0,047	0,005	10,403	0,858	0,671	1,051	0,014	0,019	0,463	0,427	11,463	381,6	336,0	3058,9	971,1	4468,8
3,611	0,002	0,064	0,005	14,034	0,946	0,584	1,107	0,012	<mdl	0,452	0,350	5,721	396,6	569,2	2715,7	1584,5	4387,4
7,398	0,003	0,089	0,002	6,659	0,571	0,698	0,988	0,009	0,025	0,393	0,449	7,587	381,1	654,0	2679,2	696,1	4743,7
6,577	0,004	0,154	0,003	9,859	0,549	0,671	1,060	0,012	0,016	0,443	0,403	4,378	409,4	603,2	2842,9	1055,9	4570,4
6,930	0,004	0,095	0,002	5,431	0,587	0,364	1,037	0,010	0,042	0,476	0,329	13,372	329,2	540,7	2910,6	762,5	3749,0
4,781	0,008	0,064	0,010	12,513	0,902	0,660	1,136	0,020	<mdl	0,521	0,354	4,744	464,2	412,0	2946,3	1898,4	4383,5
5,700	0,011	0,053	0,008	10,647	0,789	0,611	1,103	0,017	0,070	0,539	0,381	<mdl	430,0	1032,3	3451,6	1031,1	5078,5
5,277	0,008	0,077	0,008	9,219	0,461	0,787	1,061	0,018	0,031	0,564	0,436	<mdl	423,5	276,8	2900,0	376,1	377,3
8,700	0,010	0,025	0,004	9,867	0,798	0,766	0,696	0,014	<mdl	0,442	0,238	10,005	443,1	601,0	3554,6	1248,0	4781,7
6,272	0,002	0,046	0,013	8,049	0,767	0,491	0,780	0,010	0,016	0,399	0,240	8,148	369,2	825,9	3187,1	1021,1	3944,7
4,459	0,003	0,054	0,003	9,039	0,598	0,606	0,751	0,008	0,006	0,388	0,267	6,780	378,0	343,0	2821,7	1416,0	4606,9
4,307	0,003	0,060	0,003	8,987	0,585	0,588	0,718	0,008	<mdl	0,362	0,258	3,417	460,6	335,2	3124,9	2038,8	5028,1
6,200	0,001	0,053	0,016	8,422	0,763	0,486	0,756	0,010	0,004	0,359	0,234	5,328	454,9	510,5	2942,6	1926,0	4553,6
8,672	0,009	0,049	0,008	11,743	0,818	0,748	0,767	0,015	0,048	0,437	0,240	7,844	362,6	291,8	2902,8	1192,0	4782,0
8,583	0,009	0,048	0,007	11,588	0,803	0,743	0,748	0,015	0,019	0,429	0,234	5,228	403,7	296,7	3048,4	1183,9	4872,6
7,615	0,006	0,041	0,002	8,075	0,610	0,408	0,749	0,013	<mdl	0,447	0,251	13,396	428,6	778,7	3614,1	1446,6	5004,5
6,695	0,005	0,064	0,007	7,172	0,535	1,200	0,657	0,013	0,054	0,354	0,349	<mdl	448,3	481,0	3315,5	1256,4	5121,6
12,400	0,007	0,040	0,002	10,110	0,707	0,418	0,818	0,018	0,025	0,466	0,280	10,910	374,6	508,5	2686,1	1800,1	3966,0
8,547	0,006	0,048	0,007	7,716	0,454	0,563	0,725	0,010	0,003	0,427	0,259	4,354	429,8	544,0	3364,7	1012,5	4944,3
3,068	0,001	0,058	0,006	9,624	0,638	0,381	0,738	0,005	0,005	0,247	0,251	8,834	470,0	521,9	3692,6	1199,8	6111,4
7,336	0,002	0,064	0,003	6,724	0,657	0,627	0,690	0,010	0,038	0,298	0,327	9,889	406,1	469,9	3098,9	1008,9	4454,5
5,940	0,006	0,095	0,005	7,603	0,786	0,647	0,744	0,021	0,019	0,529	0,318	6,313	496,3	835,8	3664,8	1530,5	5516,4
3,773	0,005	0,095	0,001	11,069	0,917	0,424	0,686	0,011	0,045	0,314	0,247	10,492	346,1	425,6	2756,9	1035,0	4259,9

\*mdl: method detection limit

## Tabella 2

Concentrazione dei metalli (ppm w.w) nel tessuto muscolare dei pesci campionati a giugno

As	Cd	Hg	Pb	Zn	Cu	Mn	Cr	Co	Ni	Se	V	Fe	Mg	Ca	P	Na	K
5,741	0,014	0,062	0,039	17,117	1,007	1,066	0,996	0,022	0,210	0,672	0,304	13,119	702,0	1235,9	3123,0	1051,7	4779,3
4,269	0,002	0,010	0,002	23,413	1,539	0,708	0,831	0,016	0,080	0,578	0,239	7,539	954,0	1332,6	2593,8	944,0	3706,6
7,468	0,002	0,010	<mdl	18,208	1,703	0,527	0,978	0,018	0,048	0,541	0,276	15,977	447,0	1012,3	2506,5	1257,2	3852,8
4,479	0,010	0,114	0,008	30,338	1,499	0,852	2,300	0,030	0,537	0,701	0,348	7,758	742,0	794,4	2505,8	855,9	3814,0
5,903	0,001	0,017	<mdl	24,967	2,705	0,681	0,971	0,020	0,049	0,605	0,276	8,452	843,0	832,7	2174,8	2437,6	3261,7
7,074	0,005	0,312	<mdl	34,718	2,389	0,560	1,139	0,025	0,071	0,734	0,331	15,465	471,0	653,0	2124,4	1604,7	3805,2
6,280	0,018	0,010	0,007	32,065	1,748	2,040	1,083	0,032	0,191	0,753	0,364	13,456	667,0	698,3	2770,4	1796,1	4801,2
5,138	0,009	0,010	0,011	16,024	0,742	1,172	1,023	0,012	0,063	0,595	0,319	8,450	482,0	664,1	2618,1	1415,1	4414,8
6,682	0,002	0,010	0,001	28,407	2,828	0,812	0,801	0,028	0,064	0,623	0,231	18,450	554,0	910,3	2025,5	1042,2	3205,0
3,288	0,007	0,077	0,001	14,375	0,667	0,625	0,777	0,017	0,110	0,658	0,229	15,020	480,0	606,3	2753,0	1509,6	4515,8
6,294	0,005	0,010	<mdl	44,621	4,315	0,857	1,216	0,037	0,139	0,771	0,353	5,180	613,8	1032,0	3072,0	2598,8	5246,1
5,557	0,007	0,010	0,059	20,491	1,779	0,949	1,123	0,025	0,114	0,821	0,319	6,836	419,1	1099,4	3389,0	1219,3	4939,6
5,271	0,008	0,063	0,001	32,325	1,612	0,772	1,144	0,027	0,074	0,771	0,327	6,862	519,1	789,8	2828,8	2521,5	4410,3
5,876	0,003	0,057	0,002	45,218	3,464	0,991	1,767	0,027	0,090	0,690	0,316	8,087	526,5	956,0	3632,8	1628,4	6204,1
4,804	0,016	0,010	0,008	25,644	1,368	1,313	1,058	0,021	0,136	0,812	0,314	9,123	686,0	845,0	2907,3	2193,8	4780,8
7,927	0,003	0,010	0,039	29,770	2,576	0,837	1,416	0,021	0,056	0,740	0,411	15,125	601,0	745,5	3023,1	2288,8	4687,6
5,729	0,005	0,054	<mdl	35,636	3,286	1,924	1,442	0,032	0,225	0,888	0,436	6,951	527,5	752,0	3110,9	2586,3	5418,3
7,091	0,011	0,033	<mdl	16,334	1,575	0,547	1,127	0,021	0,068	0,764	0,326	9,450	952,0	799,7	3240,3	1514,4	5188,5
4,010	0,011	0,010	<mdl	23,580	1,750	0,667	1,062	0,025	0,082	0,766	0,307	10,756	577,6	1708,5	3684,6	2677,7	4809,7
6,636	0,020	0,054	0,008	22,213	1,193	0,897	1,168	0,027	0,120	0,840	0,355	11,160	444,3	850,0	2839,1	1586,6	5095,4
5,230	0,009	0,043	<mdl	36,407	1,344	1,043	1,053	0,021	0,083	0,643	0,313	13,308	387,7	1622,0	2747,2	1140,8	3963,5
6,530	0,003	0,074	0,026	31,882	2,635	0,754	0,958	0,025	0,045	0,570	0,280	9,147	470,6	679,3	2837,1	1887,2	4760,2
5,828	0,002	0,043	0,008	41,610	2,133	0,923	0,959	0,015	0,073	0,516	0,290	51,308	762,0	1322,0	2742,9	1760,0	4687,2
5,424	0,004	0,031	<mdl	35,680	3,301	0,708	1,214	0,023	0,080	0,685	0,355	17,705	605,0	640,4	2608,2	1507,6	4618,9
5,079	0,009	0,044	<mdl	16,504	0,951	0,590	1,086	0,013	0,066	0,669	0,318	14,031	494,0	1014,0	2627,1	1388,8	4228,3
2,871	0,012	0,053	0,045	31,458	1,128	0,699	1,011	0,013	0,058	0,557	0,298	14,599	803,0	1025,0	4133,1	1815,5	4649,5
3,065	0,003	0,039	<mdl	15,399	1,793	0,607	0,781	0,018	0,019	0,472	0,231	9,560	560,0	651,4	2925,9	1610,6	5030,9
6,349	0,016	0,040	0,003	34,091	1,084	1,080	1,394	0,029	0,173	0,999	0,416	23,869	553,0	1268,0	3042,8	1692,8	4228,4
2,393	0,001	0,027	<mdl	22,233	1,069	0,304	0,644	0,011	<mdl	0,305	0,186	12,450	705,0	998,0	2692,0	1510,1	4716,6
4,093	0,010	0,010	0,026	26,691	1,182	0,705	1,237	0,018	0,098	0,801	0,371	12,529	599,0	840,0	2658,4	1491,3	4657,9

\*mdl: method detection limit

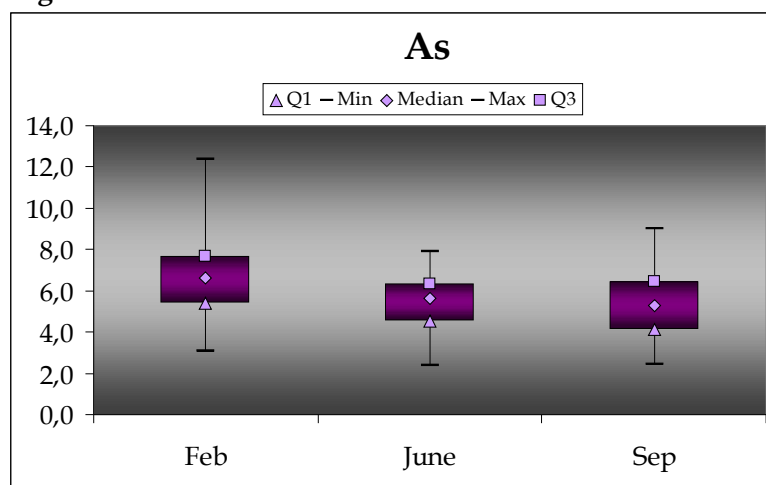
### Tabella 3

Concentrazione dei metalli (ppm w.w) nel tessuto muscolare dei pesci campionati a settembre

As	Cd	Hg	Pb	Zn	Cu	Mn	Cr	Co	Ni	Se	V	Fe	Mg	Ca	P	Na	K
4,109	0,003	0,067	0,009	11,085	0,490	0,399	0,702	0,012	0,600	0,291	0,042	14,094	485,7	607,3	2573,6	1873,2	4555,9
2,489	0,004	0,094	0,075	11,691	0,550	0,609	0,889	0,012	0,336	0,314	0,060	10,098	552,5	803,3	2187,6	1439,5	4182,1
6,383	0,005	0,078	0,032	14,300	0,515	0,759	0,061	0,016	0,960	0,362	0,075	17,953	684,9	857,8	3396,8	2446,4	6183,0
3,629	0,002	0,048	0,010	8,705	0,551	0,391	0,035	0,012	0,432	0,300	0,053	18,260	494,0	670,7	2682,2	1757,3	4638,3
5,913	0,004	0,048	0,085	13,653	0,517	0,759	<mdl	0,013	0,487	0,330	0,107	2,891	733,0	1618,4	3490,5	2319,3	5737,3
3,842	0,008	0,062	0,025	10,640	0,640	1,105	<mdl	0,050	0,960	0,322	0,524	14,780	703,0	657,4	3653,1	2009,4	6151,9
5,044	0,004	0,056	0,074	10,619	0,628	0,787	0,353	0,032	2,536	0,328	0,015	37,139	511,2	760,7	3256,5	1466,5	6728,8
3,809	0,003	0,047	0,007	10,875	0,511	0,531	0,096	0,022	2,336	0,265	<mdl	24,199	556,9	476,1	2875,6	2434,3	6250,2
6,446	0,003	0,064	0,003	21,458	1,077	0,858	0,168	0,009	0,055	0,335	0,081	11,203	471,1	759,0	2990,2	1388,2	6238,0
2,456	0,002	0,089	0,021	49,335	1,030	1,054	0,489	0,010	0,226	0,413	0,109	9,016	635,5	699,2	3876,5	2013,5	8650,9
4,873	0,008	0,154	0,074	34,146	0,957	1,408	0,343	0,017	0,155	0,313	0,108	11,759	612,6	914,7	2711,0	2655,1	5576,0
9,021	0,001	0,095	0,008	36,878	0,886	0,966	0,063	0,008	0,134	0,373	0,100	9,265	615,1	693,4	3286,9	2219,7	6023,6
6,458	0,003	0,064	0,002	16,857	0,789	0,739	0,034	0,010	0,021	0,319	0,094	9,030	524,2	781,4	3179,6	1811,0	6314,8
2,568	0,006	0,053	0,014	26,934	1,359	0,869	<mdl	0,010	<mdl	0,336	0,098	11,747	546,5	884,1	3375,3	2456,9	8201,9
6,124	0,013	0,077	0,016	35,687	1,077	1,008	<mdl	0,008	<mdl	0,374	0,077	11,681	800,7	884,8	3752,8	2711,1	6633,6
2,490	0,006	0,025	0,009	23,147	0,743	1,021	0,355	0,006	0,104	0,177	0,048	8,824	188,6	899,6	1541,6	779,2	2780,7
4,365	0,005	0,046	0,026	24,908	0,924	0,556	0,098	0,008	0,047	0,276	0,067	13,649	463,6	691,4	2460,6	2008,4	5152,2
4,654	0,003	0,054	0,041	19,430	0,889	0,766	0,020	0,007	0,049	0,279	0,108	13,860	505,6	690,8	2598,0	1778,1	4532,1
5,545	0,011	0,060	0,013	19,008	1,201	0,646	0,248	0,014	0,096	0,315	0,061	16,702	390,4	1311,3	2248,8	1304,8	2955,7
4,145	0,009	0,053	0,020	13,508	0,597	0,532	0,705	0,013	0,233	0,254	0,033	9,780	386,1	1059,0	1900,8	1228,8	2711,1
8,127	0,003	0,049	0,015	18,876	1,260	0,691	0,699	0,015	0,107	0,328	0,108	11,437	581,3	1231,4	3719,6	1490,5	5518,1
7,193	0,003	0,048	0,007	21,568	0,547	0,339	0,905	0,010	0,192	0,311	0,095	5,266	500,0	999,8	3161,7	1874,6	5303,7
5,625	0,004	0,041	0,003	12,932	0,832	0,275	1,167	0,009	0,238	0,286	0,056	9,290	536,7	533,8	3022,4	1667,2	4847,4
7,250	0,007	0,064	0,007	17,040	0,972	0,436	0,493	0,010	0,132	0,278	0,062	7,770	486,2	914,7	3076,8	1727,4	4629,5
4,399	0,003	0,040	<mdl	12,619	0,663	0,233	0,398	0,006	0,090	0,241	0,057	4,655	394,8	752,6	2610,8	950,5	3742,0
8,244	0,007	0,048	0,015	18,325	0,624	0,397	0,430	0,009	0,183	0,302	0,056	10,660	663,7	1031,7	3342,6	2535,3	4652,3
6,639	0,002	0,058	<mdl	14,183	0,681	0,264	0,254	0,010	0,057	0,231	0,049	5,158	445,7	769,5	2754,5	1612,1	4123,6
4,789	0,002	0,064	0,002	15,472	0,687	0,327	0,207	0,005	0,532	0,250	0,061	4,255	399,3	842,2	2632,6	949,1	3592,6
5,816	0,005	0,095	0,025	19,424	0,785	0,669	0,327	0,013	0,536	0,304	0,094	14,173	531,0	850,0	2941,0	1818,0	5236,0
5,816	0,005	0,095	0,025	19,424	0,758	0,669	0,238	0,012	0,236	0,222	0,052	14,173	531,0	850,0	2941,0	1818,0	5236,0

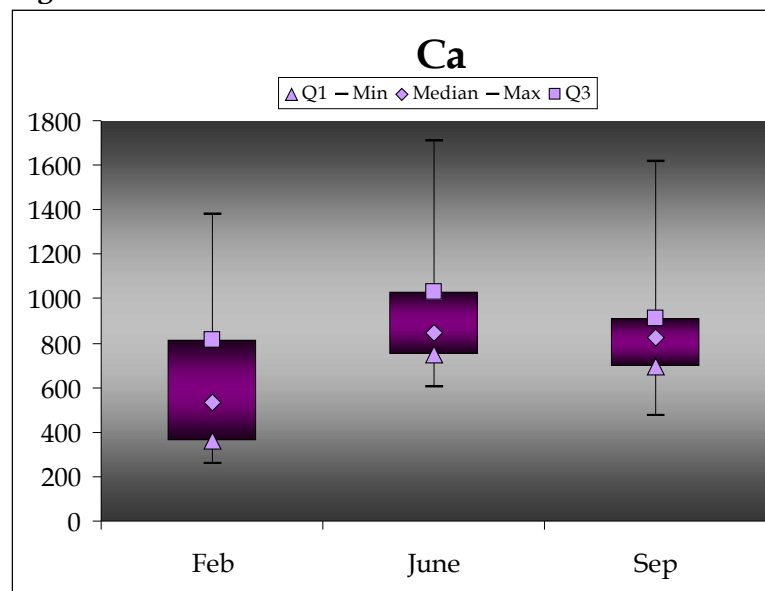
\*mdl: method detection limit

**Figura 1**



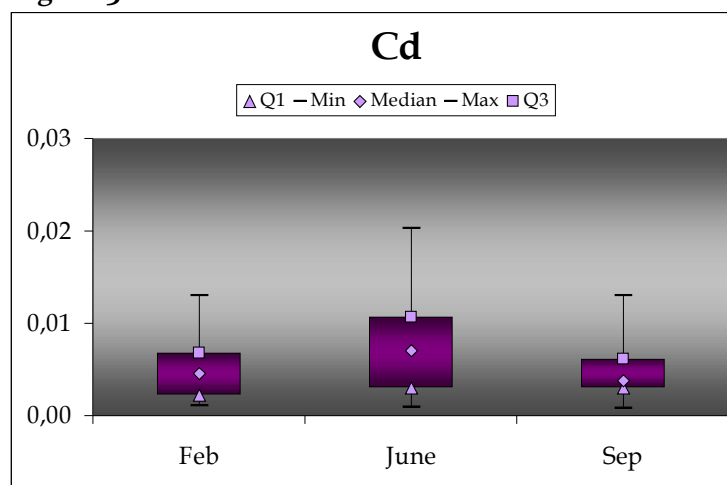
L'As ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 5,771 con un minimo di 2,393 e un massimo di 12,40. Le concentrazioni riscontrate a febbraio sono significativamente maggiori (Test-T di Student:  $p < 0.05$ ) di quelle riscontrate a giugno e settembre.

**Figura 2**



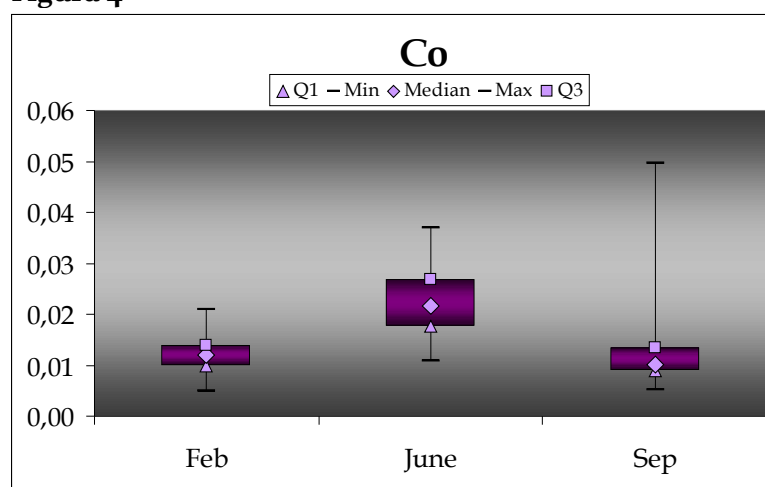
Il Ca ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 807 con un minimo di 259 e un massimo di 1708. Le concentrazioni riscontrate a giugno e settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$ ).

**Figura 3**



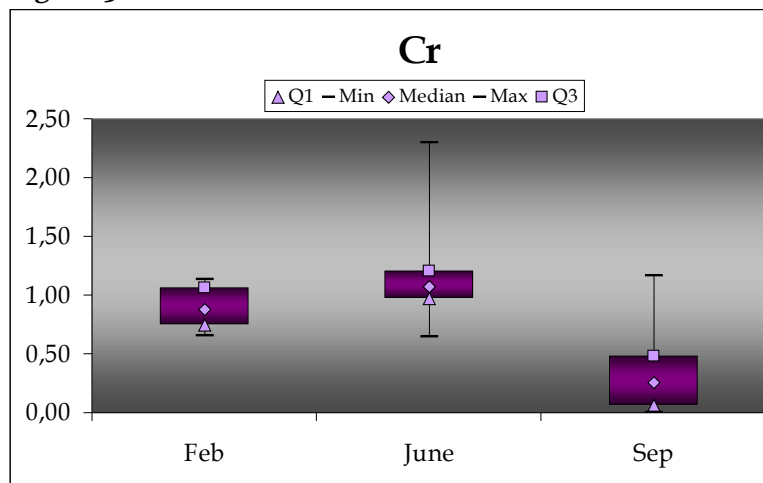
Il Cd ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,006 con un minimo di 0,001 e un massimo di 0,020. Le concentrazioni riscontrate giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a settembre (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ).

**Figura 4**



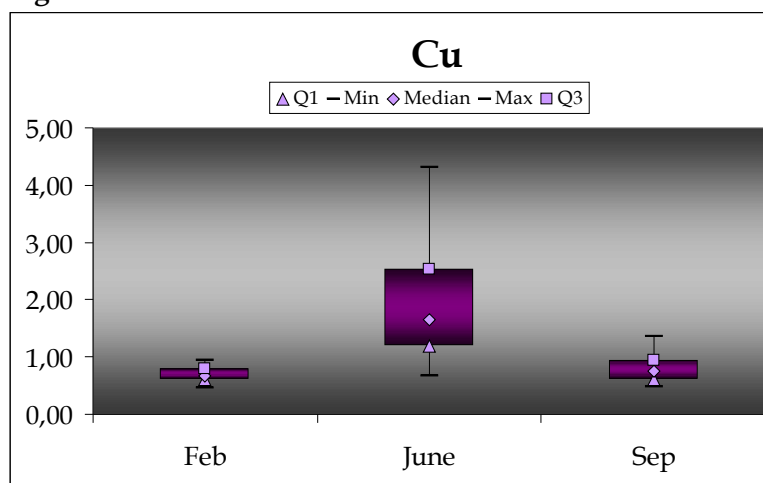
Il Co ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,016 con un minimo di 0,005 e un massimo di 0,050. Le concentrazioni riscontrate giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a settembre e a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 5**



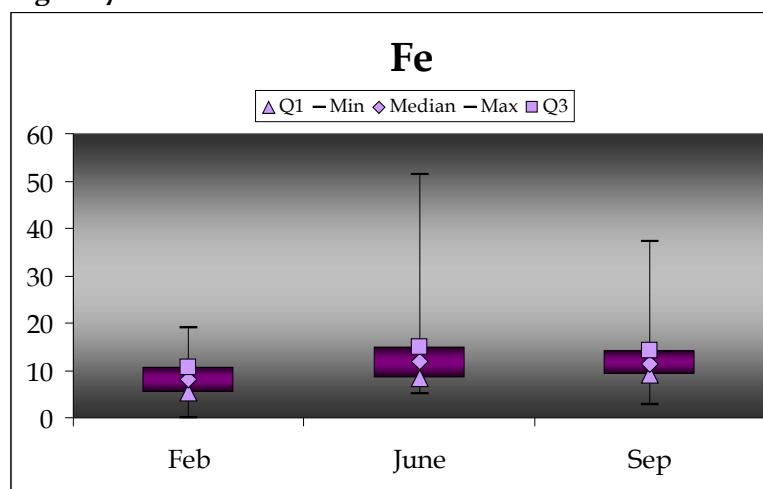
Il Cr ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,783 con un minimo di < MDL e un massimo di 2,300. Le concentrazioni riscontrate a giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ) e settembre (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ). Anche le concentrazioni riscontrate a febbraio sono significativamente più alte di quelle riscontrate a settembre (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 6**



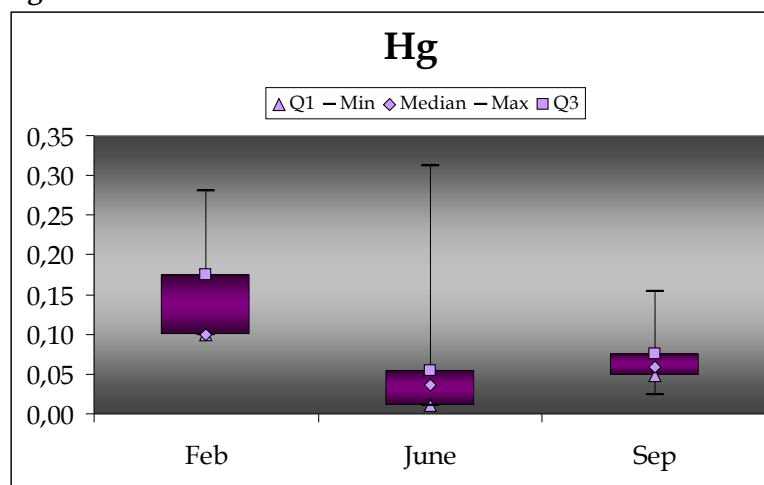
Il Cu ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 1,120 con un minimo di 0,454 e un massimo di 4,315. Le concentrazioni riscontrate a giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ) e settembre (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 7**



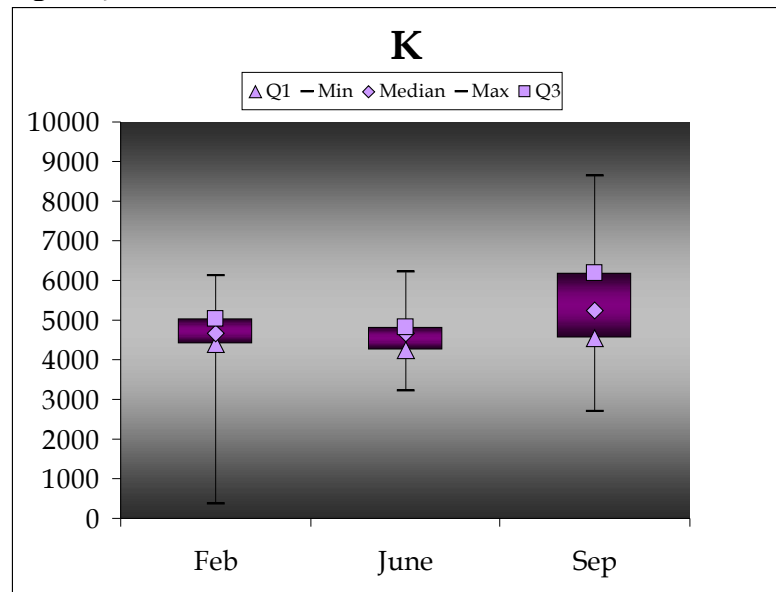
Il Fe ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 11,05 con un minimo di < MDL e un massimo di 51,308. Le concentrazioni riscontrate a giugno e settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ).

**Figura 8**



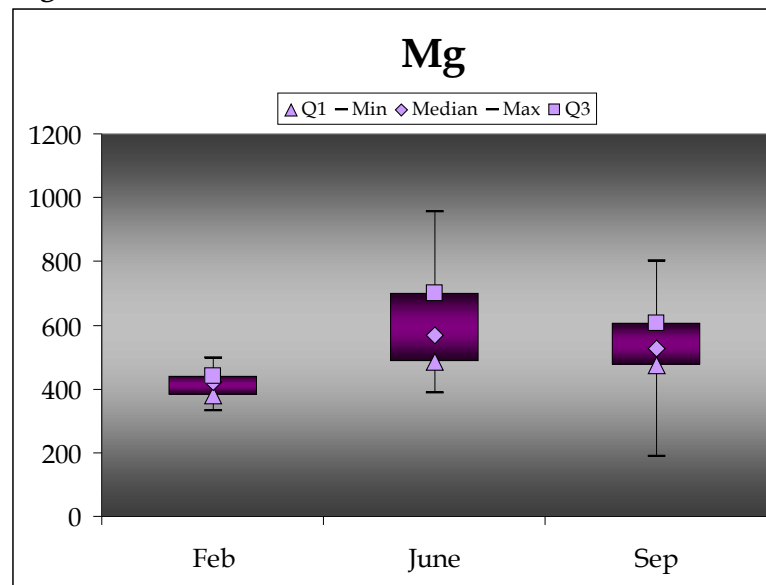
Il Hg ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,084 con un minimo di 0,010 e un massimo di 0,312. Le concentrazioni riscontrate a febbraio sono significativamente più alte di quelle riscontrate a giugno e settembre (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ).

**Figura 9**



Il K ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 4753 con un minimo di 377 e un massimo di 8651. Le concentrazioni riscontrate a settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio e a giugno (Test-T di Student:  $p < 0.05$ ).

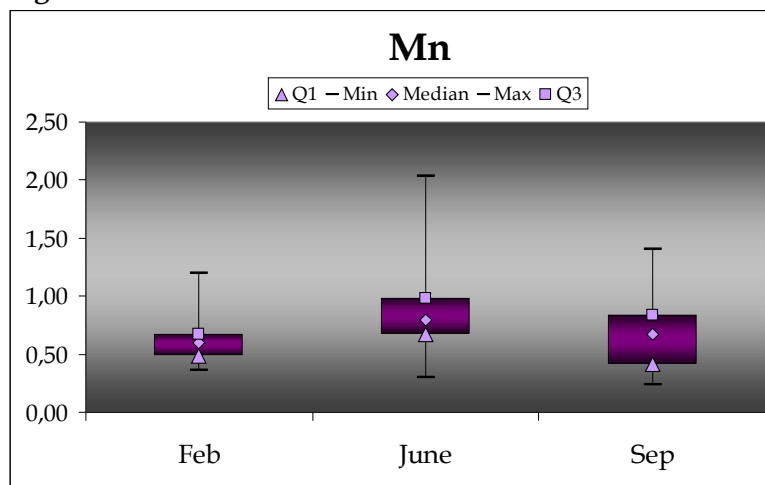
**Figura 10**



Il Mg ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 516 con un minimo di 188 e un massimo di 954. Le concentrazioni riscontrate a giugno e settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

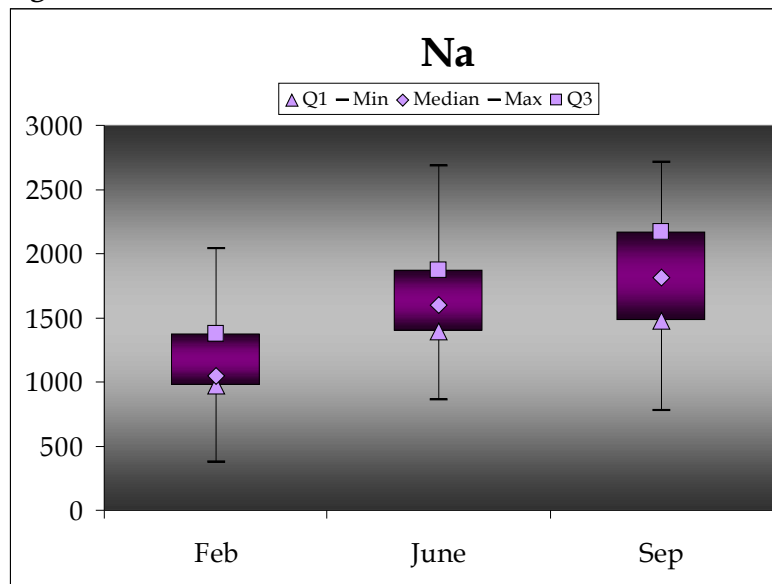


**Figura 11**



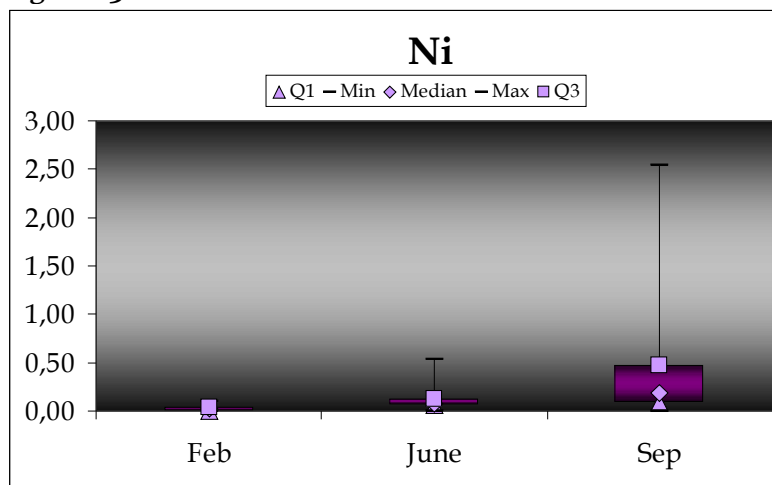
Il Mn ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,713 con un minimo di 0,233 e un massimo di 2,040. Le concentrazioni riscontrate a giugno e settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ).

**Figura 12**



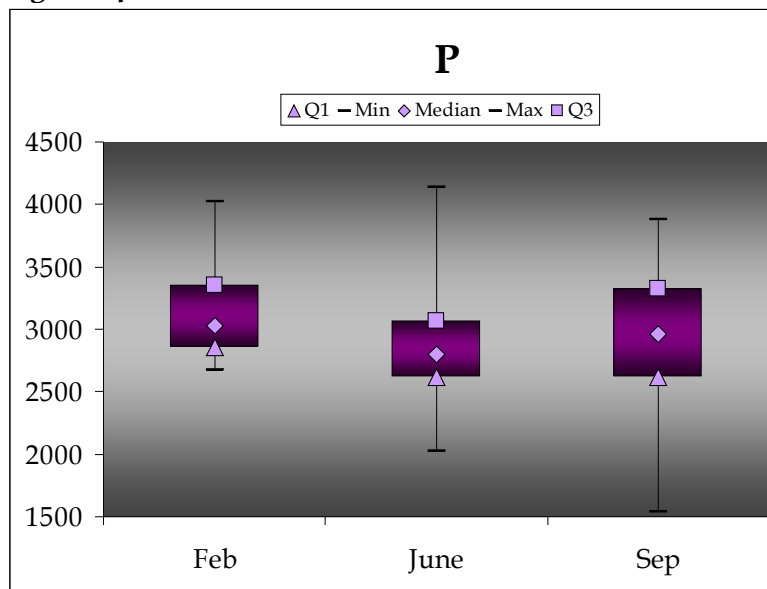
Il Na ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 1559 con un minimo di 779 e un massimo di 2711. Le concentrazioni riscontrate a giugno e settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 13**



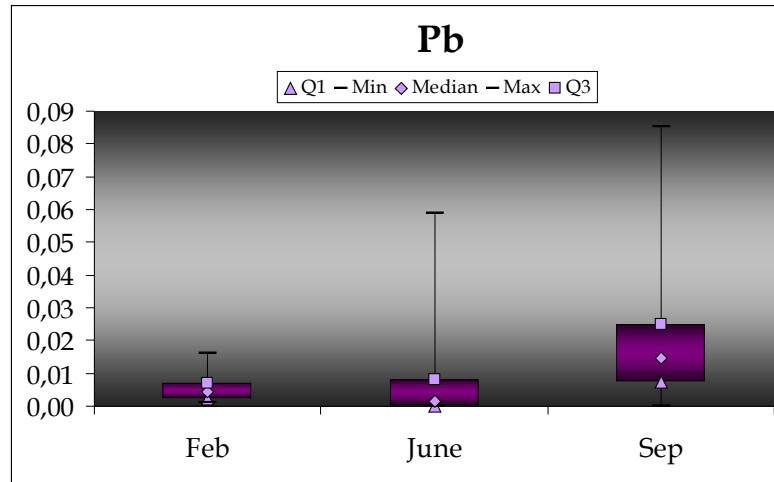
Il Ni ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,178 con un minimo di < MDL e un massimo di 2,536. Le concentrazioni riscontrate a settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio e giugno (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ). Le concentrazioni riscontrate giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 14**



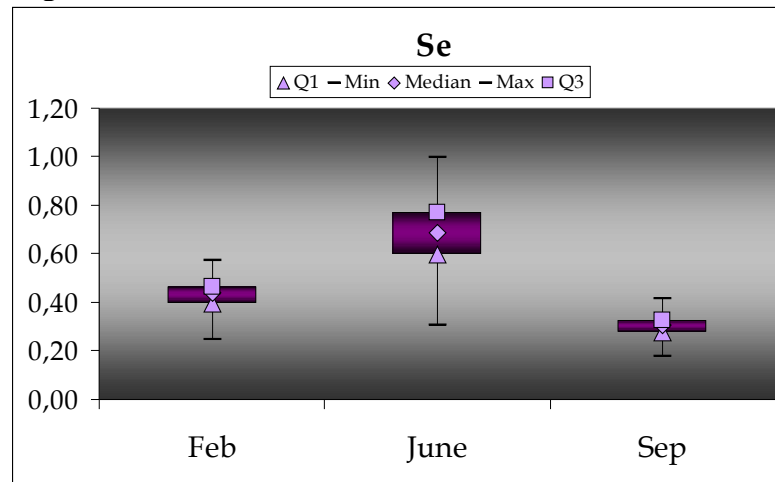
Il P ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,178 con un minimo di < MDL e un massimo di 2,536. Le concentrazioni riscontrate a settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio e giugno (Test-T di Student:  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ). Le concentrazioni riscontrate giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 15**



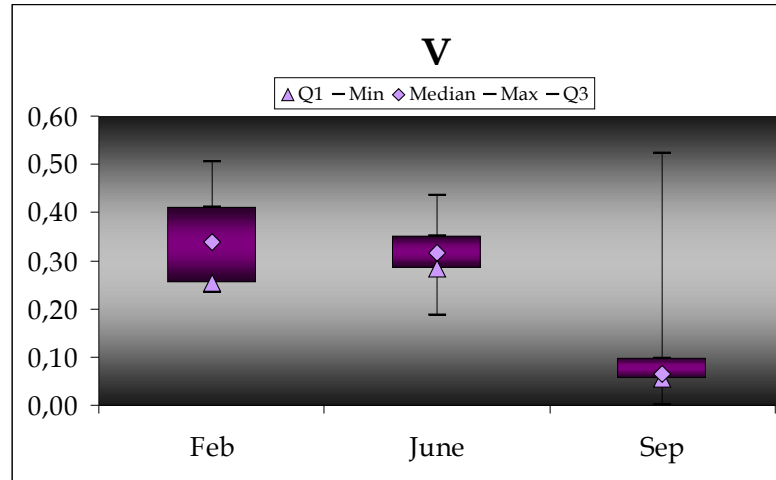
Il Pb ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,012 con un minimo di < MDL e un massimo di 0,085. Le concentrazioni riscontrate a settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio e giugno (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ).

**Figura 16**



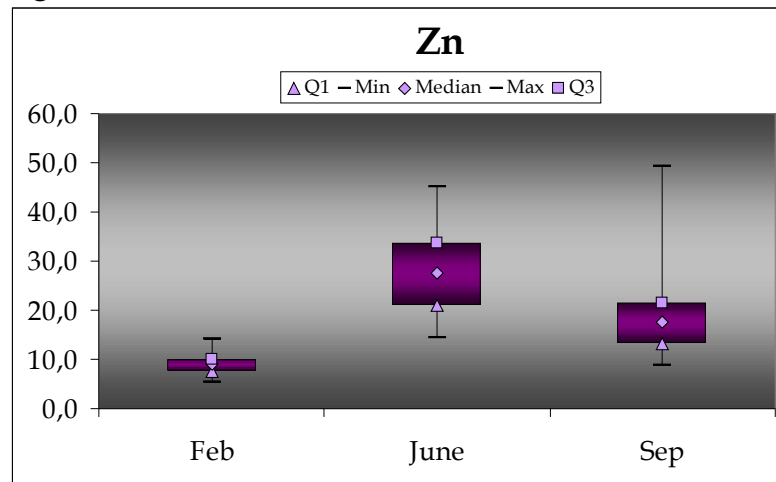
Il Se ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,473 con un minimo di 0,177 e un massimo di 0,999. Le concentrazioni riscontrate a giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio e settembre (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).

**Figura 17**



Il V ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 0,246 con un minimo di < MDL e un massimo di 0,524. Le concentrazioni riscontrate a febbraio e a giugno sono significativamente più alte di quelle riscontrate a settembre (Test-T di Student:  $p < 0,001$ ).

**Figura 18**



Il Zn ha una concentrazione (ppm w.w.) media di 18,65 con un minimo di 5,431 e un massimo di 49,34. Le concentrazioni riscontrate a giugno e settembre sono significativamente più alte di quelle riscontrate a febbraio (Test-T di Student:  $p < 0,001$ ).

## 6.2 Idrocarburi policiclici aromatici (PAHs)

**Tabella 4**

Concentrazione dei PAHs (ppm w.w.) nei pesci campionati a febbraio

NA	ACY	AC	FL	PHE	AN	FA	PY	BaA	CH	BbF	BKF	BaP	DahA	BghiP	IP	Σ16IPA
1,313	1,256	1,268	0,582	0,009	0,003	0,486	0,004	0,004	0,002	0,001	0,001	0,007	0,001	0,001	0,007	4,939
1,175	0,077	0,010	0,009	0,009	0,003	0,658	0,010	0,019	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	1,977
1,136	2,548	0,087	0,038	0,010	0,003	0,003	0,014	0,005	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,001	3,855
1,288	0,005	0,126	0,017	0,008	0,002	2,158	0,001	0,005	0,007	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,005	3,624
0,001	0,001	0,258	0,258	0,842	0,025	2,918	0,001	0,001	0,001	0,001	0,015	0,001	0,055	0,001	0,003	4,380
0,880	1,594	0,954	2,258	0,014	0,004	0,598	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,021	0,001	0,006	6,331
1,123	0,459	0,001	0,012	0,012	0,003	0,003	0,001	0,008	0,006	0,004	0,001	0,001	0,107	0,002	0,029	1,744
1,156	0,002	0,108	0,003	0,006	0,003	0,046	0,001	0,005	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,004	1,339
0,312	0,946	5,267	1,258	0,158	0,012	0,032	0,003	0,056	0,001	0,001	0,001	0,012	0,001	0,001	0,019	8,062
1,169	0,035	0,085	0,017	0,003	0,003	1,258	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,015	2,579
1,669	2,258	0,163	0,030	0,006	0,002	0,024	0,001	0,010	0,024	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,019	4,193
0,292	0,259	0,458	0,035	0,035	0,011	0,035	0,001	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,019	1,148
1,739	0,166	0,010	0,687	0,006	0,002	0,024	0,005	0,059	0,005	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,003	2,713
1,592	0,875	0,186	0,002	0,006	0,002	0,002	0,005	0,025	0,001	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	0,015	2,706
2,340	1,258	0,089	0,597	0,005	0,001	2,384	0,001	0,009	0,001	0,001	0,014	0,001	0,089	0,001	0,009	6,792
2,975	1,259	0,956	0,001	0,003	0,001	0,010	0,025	0,045	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,010	5,282
1,664	0,005	0,048	1,258	0,002	0,002	0,006	0,010	0,005	0,001	0,001	0,005	0,001	0,087	0,001	0,009	3,097
0,005	1,268	0,094	4,101	0,615	0,615	1,225	0,010	0,005	0,001	0,001	0,015	0,001	0,074	0,001	0,014	8,032
1,124	0,258	0,073	0,002	0,003	0,009	0,018	0,001	0,001	0,001	0,001	0,010	0,001	0,001	0,001	0,013	1,505
1,715	0,953	0,423	0,017	<mdl	<mdl	0,029	<mdl	0,005	0,001	0,001	0,009	0,001	0,038	0,001	0,015	3,194
0,327	0,001	0,226	0,258	0,064	0,010	0,032	0,010	0,001	0,001	0,001	0,010	0,005	0,001	0,001	0,001	0,949
0,664	0,456	0,018	<mdl	0,001	<mdl	0,025	0,041	0,005	0,027	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	0,009	1,247
0,575	0,987	0,295	1,568	0,001	<mdl	0,258	0,004	0,040	0,001	0,001	0,001	0,004	0,040	0,001	0,009	3,777
1,389	0,259	1,259	5,258	0,002	0,002	0,076	0,001	0,001	0,001	0,001	0,009	0,001	0,076	0,001	0,009	8,337
0,735	0,945	0,036	0,956	0,001	<mdl	0,031	0,027	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	0,009	2,747
1,225	0,589	0,215	0,014	0,001	<mdl	0,001	0,005	0,047	0,019	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,010	2,122
0,001	0,456	0,009	5,280	1,258	2,384	0,258	0,001	0,037	0,018	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,013	9,708
2,258	0,258	0,252	0,018	0,001	<mdl	0,001	0,004	0,040	0,018	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	2,856
1,192	3,269	2,597	0,099	0,009	0,003	0,009	0,005	0,047	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	<mdl	0,007	7,239
2,258	0,019	1,259	0,015	0,001	<mdl	0,001	0,005	0,047	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,003	3,616

\*mdl: method detection limit

## Tabella 5

Concentrazione dei PAHs (ppm w.w.) nei pesci campionati a giugno

NA	ACY	AC	FL	PHE	AN	FA	PY	BaA	CH	BbF	BKF	BaP	DahA	BghiP	IP	Σ16IPA
0,258	1,258	1,988	0,142	0,449	0,142	0,142	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,388
0,250	0,001	0,001	0,094	0,094	0,094	0,094	0,001	0,019	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,655
0,043	0,043	1,259	1,228	0,084	0,084	0,084	0,003	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,847
2,584	0,001	0,234	0,408	0,408	0,408	2,406	0,001	0,010	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	6,467
2,584	0,001	0,206	0,077	0,077	0,077	0,311	0,016	0,012	0,017	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	3,384
6,258	0,598	0,001	0,149	0,863	0,149	0,813	0,001	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	8,851
0,268	0,489	0,128	0,178	0,178	0,178	0,178	0,027	0,025	0,002	0,002	0,007	0,002	0,002	0,009	0,002	1,675
1,258	0,025	0,070	0,258	0,987	0,018	2,174	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,810
1,258	1,259	1,288	0,162	0,341	0,162	0,162	0,027	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,667
2,598	0,011	0,073	1,258	0,572	0,170	0,170	0,005	0,016	0,001	0,001	0,001	0,004	0,043	0,001	0,001	4,925
0,059	0,965	0,421	0,051	0,124	0,051	0,051	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,010	0,001	1,740
1,269	1,256	0,320	0,103	0,103	0,103	1,887	0,003	0,015	0,001	0,001	0,012	0,006	0,001	0,001	0,001	5,082
1,225	0,598	0,024	6,257	0,072	0,030	0,282	0,001	0,009	0,001	0,001	0,012	0,003	0,057	0,010	0,005	8,587
1,258	0,022	0,053	0,347	0,063	0,063	0,063	0,006	0,009	0,001	0,001	0,001	0,004	0,051	0,004	0,003	1,949
0,458	1,258	0,258	0,221	1,026	0,221	0,948	0,006	0,012	0,001	0,001	0,010	0,003	0,022	0,008	0,014	4,467
0,258	0,789	0,027	5,258	0,076	0,076	0,401	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	6,898
0,057	0,132	0,023	0,053	0,053	0,053	1,273	0,001	0,023	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,003	1,679
1,259	1,258	0,122	0,046	0,156	0,046	0,046	0,001	0,023	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	2,966
1,258	0,003	0,080	0,066	0,159	0,066	0,066	0,001	0,034	0,001	0,001	0,001	0,010	0,001	0,001	0,001	1,749
0,030	1,258	0,477	1,127	0,312	0,104	1,258	0,001	0,009	0,001	0,001	0,001	0,001	0,013	0,001	0,001	4,595
1,286	0,025	0,046	0,029	0,029	0,029	0,416	0,001	0,019	0,001	0,001	0,005	0,003	0,001	0,001	0,001	1,893
0,025	0,789	0,246	0,123	0,123	0,123	1,134	0,006	0,012	0,006	0,001	0,001	0,002	0,007	0,001	0,001	2,600
0,597	1,258	0,269	0,292	0,030	0,030	0,473	0,008	0,020	0,001	0,001	0,001	0,004	0,001	0,004	0,001	2,990
0,091	0,657	0,279	1,258	0,034	0,034	0,403	0,006	0,012	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	2,786
0,428	2,598	0,089	0,258	0,127	0,502	1,258	0,004	0,015	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	5,287
1,258	0,956	0,055	0,818	0,105	0,105	1,562	0,008	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,889
1,258	0,070	0,207	2,584	0,291	0,291	1,201	0,001	0,001	0,001	0,039	0,001	0,001	0,001	0,019	0,001	5,967
1,258	0,741	0,035	0,258	1,224	0,282	1,130	0,003	0,022	0,001	0,004	0,016	0,006	0,011	0,001	0,001	4,993
0,458	1,258	0,246	0,161	0,398	0,161	1,895	0,007	0,001	0,003	0,001	0,001	0,004	0,006	0,001	0,001	4,602

\*mdl: method detection limit

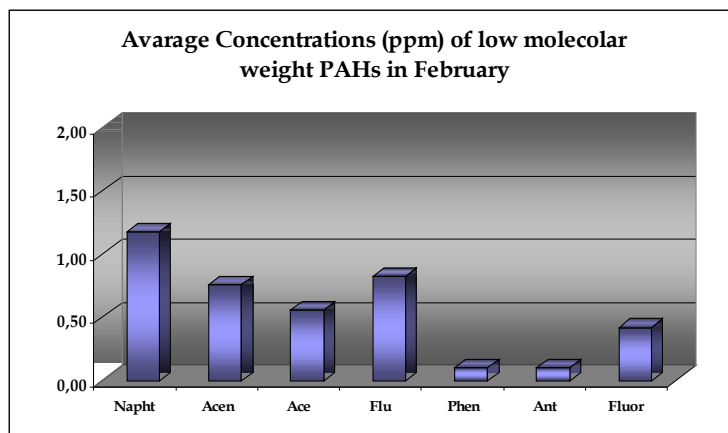
**Tabella 6**

Concentrazione dei PAHs (ppm w.w.) nei pesci campionati a settembre

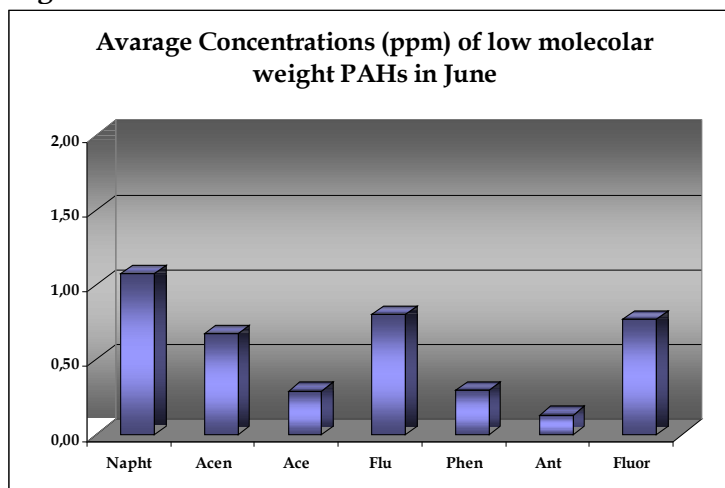
NA	ACY	AC	FL	PHE	AN	FA	PY	BaA	CH	BbF	BKF	BaP	DahA	BghiP	IP	Σ16IPA
1,254	0,290	0,003	0,354	0,560	0,560	1,868	0,003	0,001	0,001	0,003	0,003	0,005	0,003	0,003	0,001	4,917
1,254	2,587	0,003	0,123	0,492	0,492	0,492	0,003	0,010	0,001	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,001	5,474
0,045	1,258	0,003	0,125	0,033	0,033	0,033	0,003	0,006	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	1,555
1,008	1,258	0,003	0,054	0,515	0,515	0,515	0,003	0,005	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	3,895
<mdl	0,119	0,003	0,505	0,505	0,505	0,505	0,003	0,003	0,017	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	2,184
1,005	1,288	0,003	0,014	0,497	0,497	0,497	0,003	0,004	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	3,829
1,258	0,003	0,003	0,526	0,526	0,526	0,526	0,003	0,005	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	3,421
0,597	2,258	0,003	0,519	0,519	0,519	3,457	0,003	0,001	0,001	0,003	0,003	0,005	0,003	0,010	0,001	7,903
1,584	0,158	0,003	0,529	0,529	0,529	0,529	0,003	0,001	0,001	0,003	0,003	0,001	0,003	0,003	0,001	3,895
0,459	0,286	1,258	0,537	0,537	0,537	0,537	0,003	0,002	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	4,185
0,258	0,125	0,003	0,984	0,518	0,518	0,518	0,003	0,001	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	2,963
5,258	0,202	0,003	0,354	0,519	0,519	0,519	0,003	0,015	0,001	0,003	0,003	0,001	0,003	0,003	0,001	7,426
2,394	0,316	0,954	0,001	0,023	0,001	0,001	0,003	0,009	0,001	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	3,718
0,123	0,958	0,254	0,548	0,548	0,548	0,548	0,003	0,009	0,001	0,003	0,003	<mdl	0,003	0,003	0,001	3,567
0,256	0,458	0,001	0,254	1,127	1,127	1,127	0,001	0,012	0,001	0,001	0,001	0,018	0,001	0,001	0,001	4,395
0,258	0,268	0,269	0,035	1,030	1,030	1,030	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	<mdl	0,001	0,001	0,001	3,938
2,458	0,057	2,584	0,036	1,059	1,059	1,059	0,001	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	8,343
1,258	0,358	0,001	0,248	1,094	1,094	1,021	0,001	0,023	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	5,120
0,001	1,258	0,978	0,258	1,116	1,116	1,116	0,004	0,015	0,001	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	5,886
1,254	1,254	0,259	0,258	1,019	1,019	1,019	0,001	0,025	0,001	0,001	0,001	<mdl	0,001	0,001	0,001	6,131
0,225	1,258	0,485	0,245	1,151	1,151	1,151	0,001	0,019	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	5,696
0,985	0,042	0,269	0,123	1,069	1,069	1,069	0,001	0,025	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,674
1,258	0,058	0,589	0,945	1,130	1,130	1,130	0,001	0,014	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	6,271
0,587	0,945	0,001	0,597	1,139	1,139	1,139	0,001	0,012	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	5,581
2,525	0,009	0,958	0,054	1,090	1,090	1,090	0,001	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	6,848
1,254	0,984	0,001	0,064	1,016	1,016	1,016	0,001	0,025	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	5,397
0,954	0,259	0,956	0,258	1,138	1,138	0,215	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,940
0,987	0,059	0,001	0,259	1,018	1,018	1,018	0,001	0,022	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	4,394

\*mdl: method detection limit

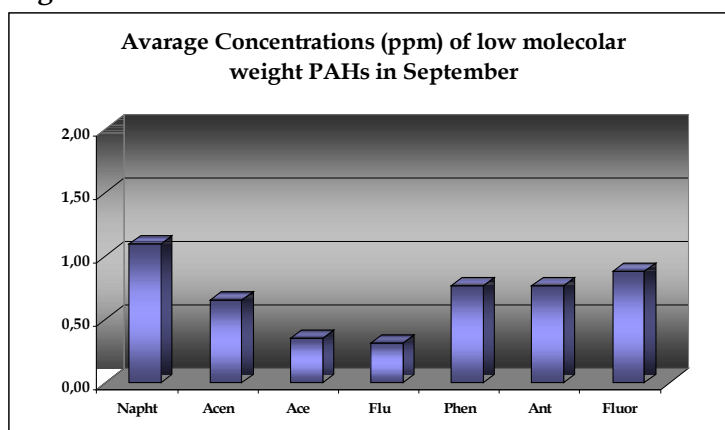
**Figura 19**



**Figura 20**



**Figura 21**



Tra gli idrocarburi policiclici aromatici a basso peso molecolare sono state riscontrate differenze significative solo per quanto riguarda le concentrazioni di Phenantrene e Fluorantene, significativamente più alte a giugno e a settembre rispetto al periodo invernale (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ), e Anthracene, significativamente più alte a settembre rispetto agli altri due periodi di campionamento (Test-T di Student:  $p < 0.001$ ).



Figura 22

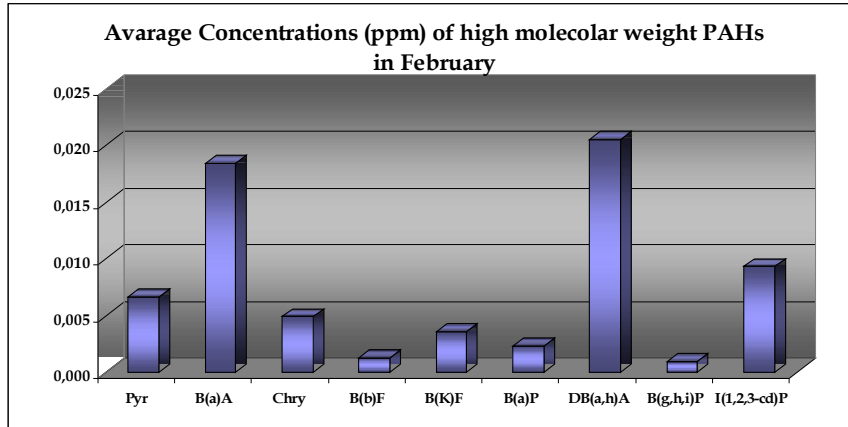


Figura 23

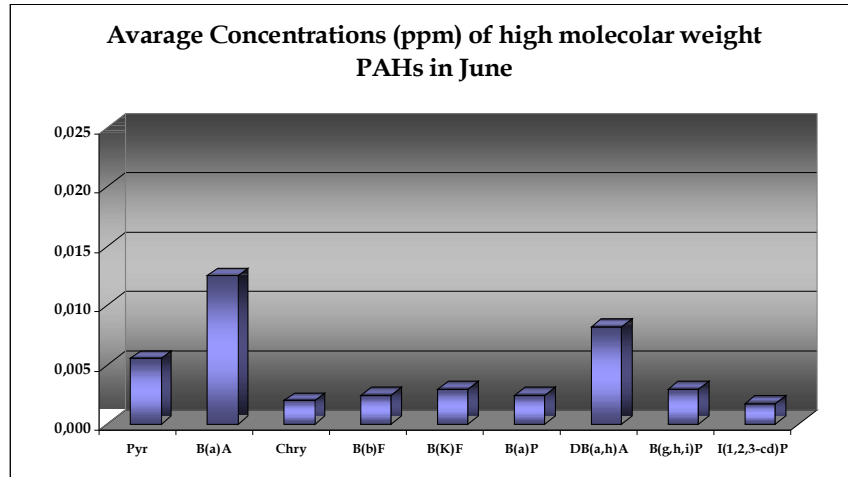
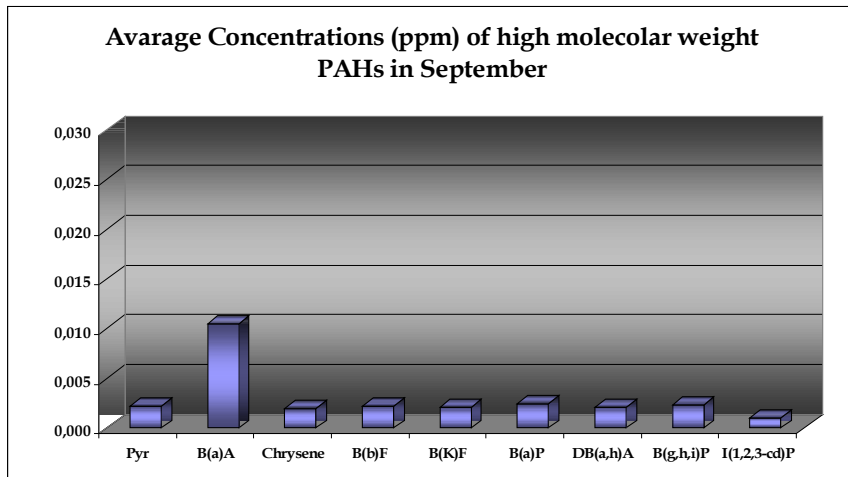


Figura 24

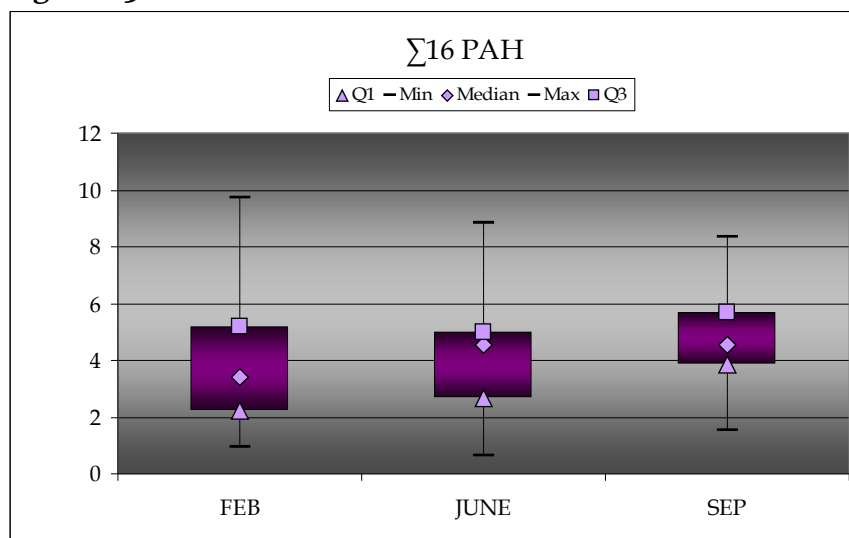


## Tabelle 7

Test-T di Student tra i PAHs ad alto peso molecolare

Test-T di Student	PY	BaA	CH	BbF	BKF	BaP	DahA	BghiP	IP
Feb-June	0,621	0,261	0,061	0,400	0,509	0,792	0,080	<b>p&lt;0,05</b>	0,100
Feb-Set	<b>p&lt;0,05</b>	<b>0,140</b>	0,054	<b>p&lt;0,001</b>	0,096	0,707	<b>p&lt;0,01</b>	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&lt;0,001</b>
June-Set	p<0,05	0,123	ND	0,849	0,290	0,908	<b>p&lt;0,05</b>	0,456	<b>p&lt;0,001</b>

Figura 25



Dall'analisi dei singoli idrocarburi policiclici aromatici ad alto peso molecolare sono emerse concentrazioni più alte tendenzialmente nel periodo invernale, anche se confrontando le concentrazioni della sommatoria non sono state riscontrate differenze significative. La concentrazione media (ppm w.w.) della  $\Sigma 16$  PAHs è pari a 4,32 con un minimo di 0,655 ed un massimo di 9,720.

### 6.3 Policlorobifenili Diossina-Simili

**Tabella 8**

PCBs Diossina-Simili (pg/g TEQ) nei pesci campionati a febbraio

Sample Group	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
1 - 5	0,058	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,458	<mdl	0,004	0,003	<mdl	<mdl	0,523
6 - 10	0,258	0,056	<mdl	0,116	0,040	0,021	0,258	0,002	0,005	<mdl	0,005	0,010	0,771
11 -15	0,097	<mdl	<mdl	0,109	0,058	0,100	<mdl	<mdl	0,004	0,005	<mdl	<mdl	0,373
16 - 20	0,045	<mdl	0,020	0,104	0,087	0,227	<mdl	0,004	0,009	0,005	0,002	0,015	0,517
21 - 25	0,045	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,048	0,005	<mdl	<mdl	<mdl	0,098
26 - 30	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,001	0,001	0,002	0,004
<b>Mean</b>	<b>0,084</b>	<b>0,009</b>	<b>0,003</b>	<b>0,055</b>	<b>0,031</b>	<b>0,058</b>	<b>0,119</b>	<b>0,009</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,381</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 9**

PCBs Diossina-Simili (ppb) nei pesci campionati a febbraio

Sample Group	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
1 - 5	1,933	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,005	<mdl	0,133	0,100	<mdl	<mdl	2,171
6 - 10	8,600	0,558	<mdl	3,879	0,133	0,069	0,003	0,067	0,167	<mdl	0,002	0,033	13,51
11 -15	3,233	<mdl	<mdl	3,626	0,194	0,332	<mdl	<mdl	0,133	0,167	<mdl	<mdl	7,686
16 - 20	1,500	<mdl	0,066	3,469	0,290	0,755	<mdl	0,133	0,295	0,167	0,001	0,050	6,726
21 - 25	1,500	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	1,600	0,167	<mdl	<mdl	<mdl	3,267
26 - 30	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,033	<mdl	0,007	0,040
<b>Mean</b>	<b>2,794</b>	<b>0,093</b>	<b>0,011</b>	<b>1,829</b>	<b>0,103</b>	<b>0,193</b>	<b>0,001</b>	<b>0,300</b>	<b>0,149</b>	<b>0,078</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,015</b>	<b>5,567</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 10**

PCBs Diossina-Simili (pg/g TEQ) nei pesci campionati a giugno

Sample Group	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
31 - 35	0,045	0,025	<mdl	0,067	0,058	0,054	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,249
36 -40	0,030	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,012	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,042
41 - 45	0,049	<mdl	<mdl	0,095	<mdl	0,005	0,597	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,746
46 - 50	0,058	0,048	<mdl	0,045	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,151
51 -55	0,065	<mdl	<mdl	<mdl	0,005	0,015	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,085
56 -60	0,098	0,095	<mdl	0,108	<mdl	0,045	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,346
<b>Mean</b>	<b>0,058</b>	<b>0,028</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,053</b>	<b>0,011</b>	<b>0,022</b>	<b>0,100</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,270</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 11**

PCBs Diossina-Simili (ppb) nei pesci campionati a giugno

Sample Group	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
31 - 35	1,500	0,250	<mdl	2,233	0,193	0,180	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	4,357
36 -40	0,001	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,001
41 - 45	0,002	<mdl	<mdl	0,003	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,005
46 - 50	0,002	<mdl	<mdl	0,002	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,004
51 -55	0,002	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,002
56 -60	0,003	0,001	<mdl	0,004	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,008
<b>Mean</b>	<b>0,252</b>	<b>0,042</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,374</b>	<b>0,032</b>	<b>0,030</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,729</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 12**

PCBs Diossina-Simili (pg/g TEQ) nei pesci campionati a settembre

Sample Group	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
61 - 65	0,058	<mdl	<mdl	0,072	0,026	0,029	<mdl	0,002	0,017	0,008	<mdl	<mdl	0,212
66 -70	0,125	<mdl	<mdl	0,162	<mdl	0,081	0,568	<mdl	0,033	<mdl	<mdl	0,019	0,988
71 -75	0,025	0,023	<mdl	0,241	<mdl	0,082	0,288	<mdl	0,045	<mdl	<mdl	0,019	0,724
76 - 80	0,089	0,067	<mdl	0,129	<mdl	0,036	0,045	<mdl	0,026	<mdl	<mdl	0,005	0,396
81 - 85	0,025	<mdl	<mdl	0,172	<mdl	0,127	0,069	0,357	0,039	0,073	<mdl	0,019	0,881
86 -90	0,025	0,041	<mdl	0,127	<mdl	0,040	<mdl	<mdl	0,019	<mdl	<mdl	0,005	0,257
<b>Mean</b>	<b>0,058</b>	<b>0,022</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,150</b>	<b>0,004</b>	<b>0,066</b>	<b>0,162</b>	<b>0,060</b>	<b>0,030</b>	<b>0,014</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,011</b>	<b>0,576</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 13**

PCBs Diossina-Simili (ppb) nei pesci campionati a settembre

Sample Group	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
61 - 65	1,933	<mdl	<mdl	2,410	0,088	0,097	<mdl	0,055	0,555	0,270	<mdl	<mdl	5,408
66 -70	0,004	<mdl	<mdl	0,005	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,001	<mdl	<mdl	<mdl	0,011
71 -75	0,001	<mdl	<mdl	0,008	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,002	<mdl	<mdl	<mdl	0,011
76 - 80	0,003	0,001	<mdl	0,004	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,001	<mdl	<mdl	<mdl	0,009
81 - 85	0,001	<mdl	<mdl	0,006	<mdl	<mdl	<mdl	0,012	0,001	0,002	<mdl	<mdl	0,023
86 -90	0,001	<mdl	<mdl	0,004	<mdl	<mdl	<mdl	<mdl	0,001	<mdl	<mdl	<mdl	0,006
<b>Media</b>	<b>0,324</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,406</b>	<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,011</b>	<b>0,093</b>	<b>0,04</b> <b>5</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>0,911</b>

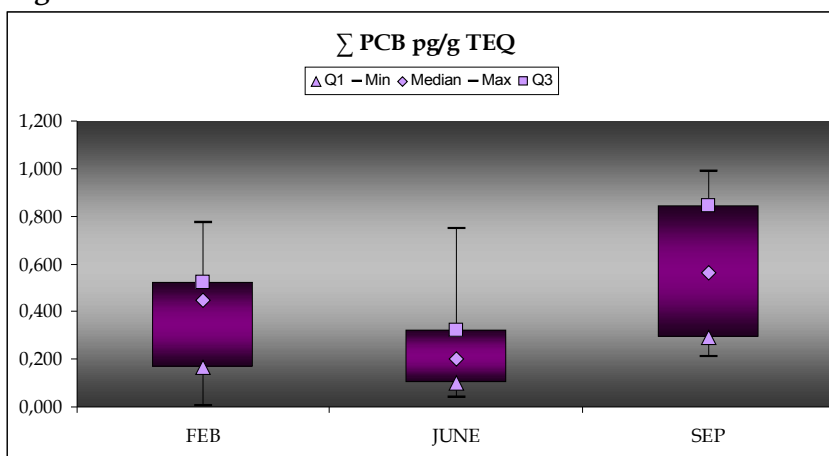
\*mdl: method detection limit

**Tabella 14**

Test-T di Student sulla base dei risultati espressi in pg/g TEQ

Test-T di Student	81S	77S	123S	118S	114S	105S	126S	167S	156S	157S	169S	189S	ΣPCB
Feb-June	0,583	0,410	0,363	0,948	0,381	0,449	0,897	0,302	p<0,05	0,058	0,158	0,148	0,555
Feb-Set	0,379	0,501	0,363	p<0,01	0,188	0,862	0,724	0,371	p<0,01	0,410	0,158	0,202	0,266
June-Set	0,990	0,622	ND	p<0,05	0,291	0,092	0,614	0,361	p<0,01	0,310	ND	p<0,05	0,160

**Figura 26**



Dall'analisi dei singoli policlorobifenili diossina-simili sono emerse concentrazioni leggermente più alte a settembre, sebbene come per i PAHs le concentrazioni della sommatoria non hanno evidenziato differenze significative. La media complessiva dei PCB è pari 0,409 (pg/g TEQ) con un minimo di 0,004 e un massimo di 0,988.

#### 6.4 Pesticidi clorurati

**Tabella 15**

Pesticidi clorurati (ppm w.w.) nei pesci campionati a febbraio

Sample Group	4,4'DDE	4,4'DDD	4,4'DDT
1 - 5	0,033	<mdl	<mdl
6 - 10	<mdl	<mdl	<mdl
11 -15	0,025	<mdl	<mdl
16 - 20	0,005	<mdl	<mdl
21 - 25	0,015	<mdl	<mdl
26 - 30	0,004	<mdl	<mdl
<b>Mean</b>	<b>0,014</b>	<b>&lt;mdl</b>	<b>&lt;mdl</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 16**

Pesticidi clorurati (ppm w.w.) nei pesci campionati a giugno

<b>Sample Group</b>	<b>4,4'DDE</b>	<b>4,4'DDD</b>	<b>4,4'DDT</b>
31 - 35	0,005	<mdl	<mdl
36 -40	0,035	0,009	<mdl
41 - 45	0,015	<mdl	<mdl
46 - 50	0,032	0,001	<mdl
51 -55	<mdl	<mdl	<mdl
56 -60	0,032	0,008	<mdl
<b>Mean</b>	<b>0,020</b>	<b>0,003</b>	<b>&lt;mdl</b>

\*mdl: method detection limit

**Tabella 17**

Pesticidi clorurati (ppm w.w.) nei pesci campionati a settembre

<b>Sample Group</b>	<b>4,4'DDE</b>	<b>4,4'DDD</b>	<b>4,4'DDT</b>
60-65	0,010	0,002	<mdl
66-70	0,025	<mdl	<mdl
71-75	<mdl	<mdl	<mdl
76-80	0,029	0,010	<mdl
81-85	0,008	0,001	<mdl
86-90	0,041	0,012	<mdl
<b>Mean</b>	<b>0,019</b>	<b>0,004</b>	<b>&lt;mdl</b>

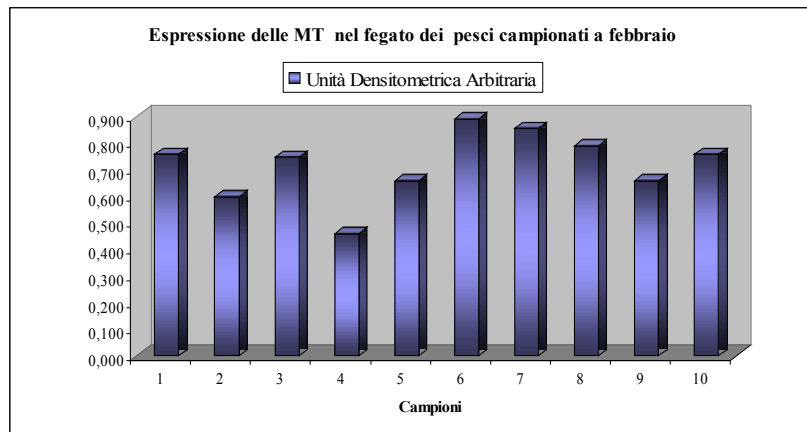
\*mdl: method detection limit

Tra i pesticidi clorurati analizzati non sono state riscontrate tracce di DDT in nessuno dei periodi di campionamento ma solo tracce dei rispettivi metaboliti DDD e DDE. In particolare il DDD ha una media complessiva di 0,002 (ppm w.w.) con un minimo di <mdl e un massimo di 0,012, il DDE ha una media complessiva di 0,017 (ppm w.w.) con un minimo di <mdl e un massimo di 0,041. Non sono state rilevate significative differenze tra i periodi analizzati.

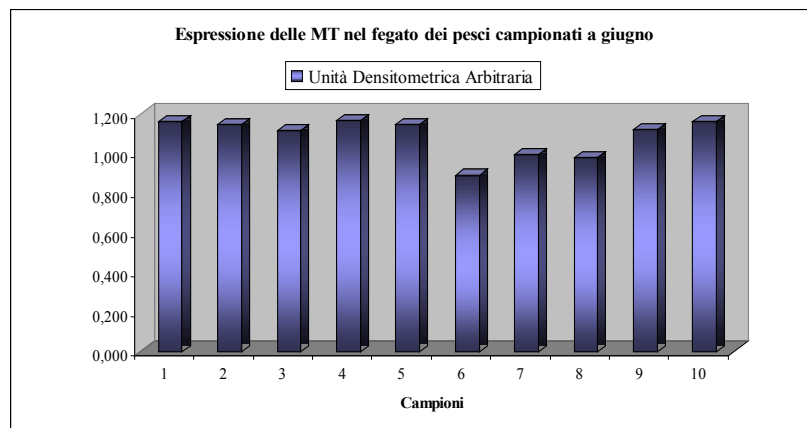
## 6.5 Rilevazione dei biomarkers tramite Western Blotting e Immunoistochimica

L'analisi proteica tramite Western Blotting in campioni di fegato e Immunoistochimica in campioni di branchie ha evidenziato immunopositività solo per le metallotioneine e le HSP 70. In particolare le MTs sono risultate maggiormente espresse nei campioni prelevati a giugno e settembre, sia nel fegato che nelle branchie, invece le HSP 70 sono risultate espresse solo nei campioni prelevati a giugno e settembre.

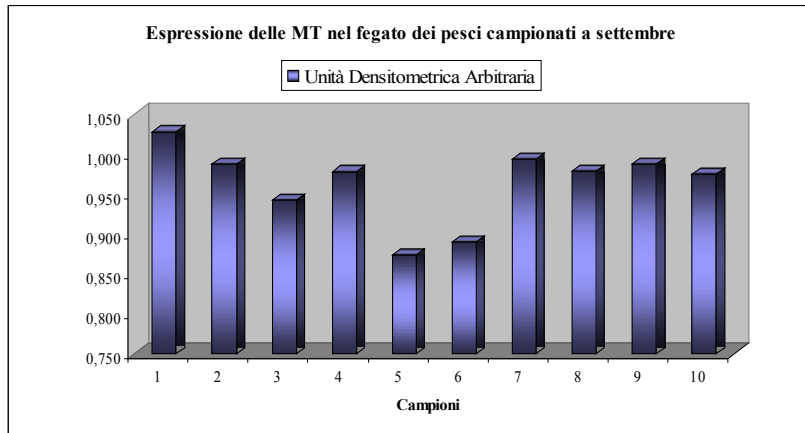
**Figura 27**



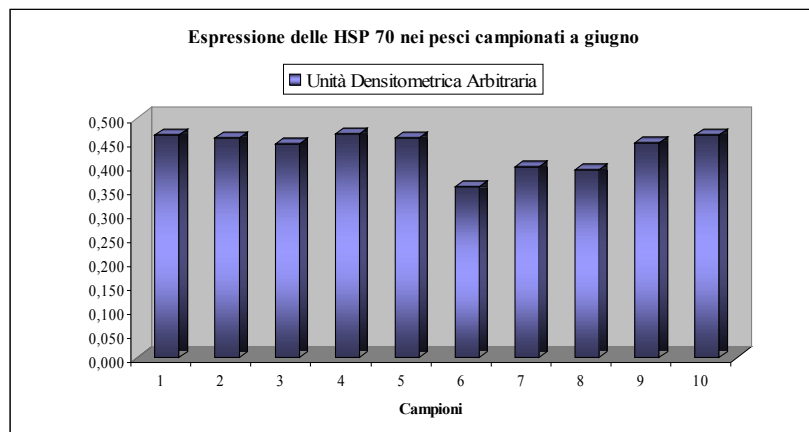
**Figura 28**



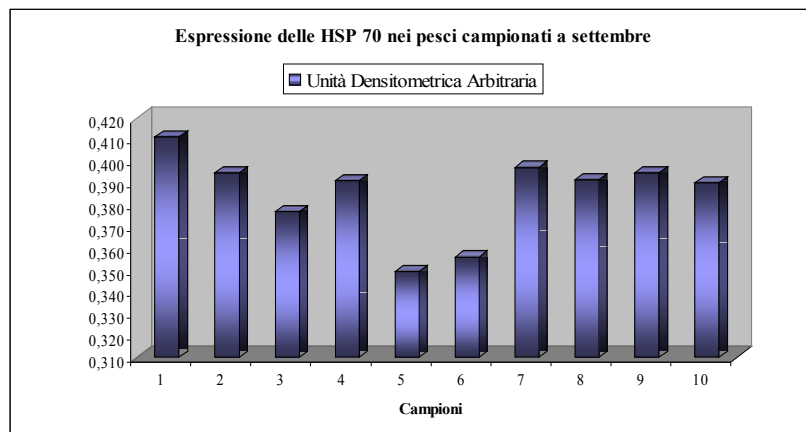
**Figura 29**



**Figura 30**

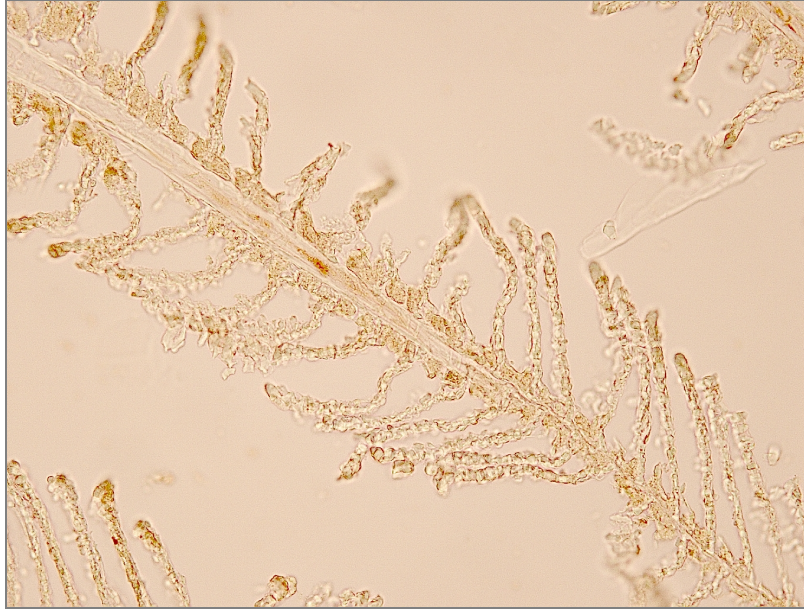


**Figura 31**

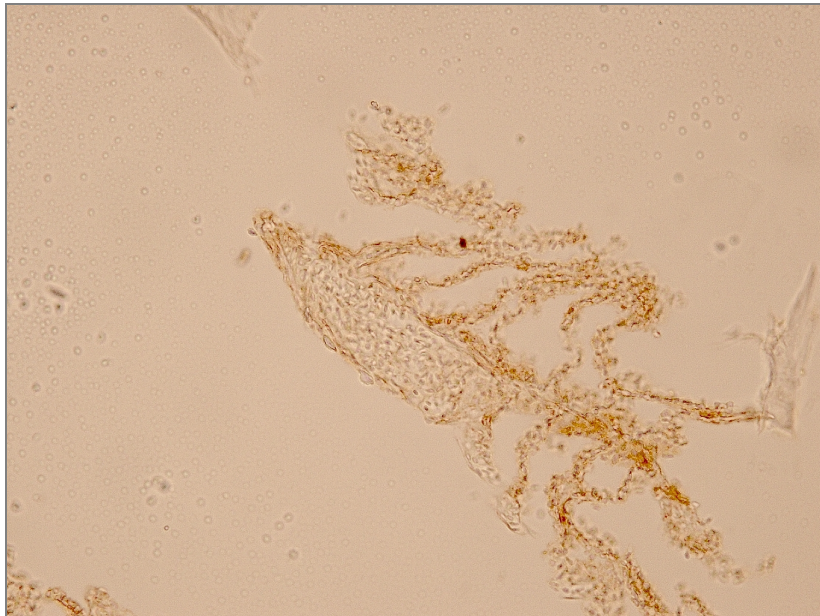




**Sezione di epitelio branchiale immunopositivo all'anticorpo anti-MT**



**Sezione di epitelio branchiale immunopositivo all'anticorpo anti-HSP-70**



## 6.6 Tassi di consumo

**Tabella 18**

Mean (ppm w.w.) of metals analyzed, CSF (cancer slope factor ppm-day); RfD (reference dose ppm-day); EDIcc (ppb-day); EDIm (ppb-day); EWIcc (ppb-week); TI (tolerable intake suggested by FAO/WHO); CRmmc (meals/mo); CRmmr (meals/mo)

Metals	Mean	CSF	RfD	EDIcc	EDIm	EWIcc	TI	CRmmc	CRmmr
As	5,771	1,500	<mdl	0,495	18,72	3,463	15 ppb -w	<0,5	<0,5
Pb	0,012	NA	NA	0,001	0,040	0,007	25 ppb -w	NA	NA
Cd	0,006	NA	0,001	<mdl	0,019	0,003	7 ppb -w	NA	>16
CH3Hg	0,084	NA	<mdl	0,007	0,272	0,050	1,6 ppb -w	NA	11
Cr III	0,783	NA	1,500	0,067	2,539	0,470	/	NA	>16
Cr VI	0,783	NA	0,003	0,067	2,539	0,470	/	NA	>16
Cu	1,120	NA	NA	0,096	3,632	0,672	/	NA	NA
Co	0,016	NA	NA	0,001	0,051	0,010	50-500 ppb -d	NA	NA
Ni	0,178	NA	0,020	0,015	0,577	0,107	/	NA	>16
Se	0,473	NA	0,005	0,041	1,534	0,284	/	NA	>16
V	0,246	NA	0,009	0,021	0,797	0,147	/	NA	>16
Fe	11,05	NA	NA	0,947	35,83	6,630	/	NA	NA
Zn	18,65	NA	0,300	1,599	60,49	11,19	300-1000 ppb -d	NA	>16
Mn	0,713	NA	0,140	0,061	2,312	0,428	/	NA	>16
Mg	516	NA	NA	44,23	1673	309,6	/	NA	NA
Ca	807	NA	NA	69,17	2616	484,2	/	NA	NA
P	2975	NA	NA	255,0	9647	1785	/	NA	NA
Na	1559	NA	NA	133,6	5055	935,4	/	NA	NA
K	4753	NA	NA	407,4	15413	2851	/	NA	NA

Data from various inorganic metals. We assume Hg as total CH<sub>3</sub>Hg, Cr as total Cr III and as total Cr VI.; NA: CSF and RfD are not available in the EPA's Integrate Risk Information System (IRIS) for this pollutant, and TI is not available in the Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) online database

**Tabella 19**

Mean and SD (ppb wet weight) of PCBs analyzed, CSF (cancer slope factor ppm-day); RfD (reference dose ppm-day); EDIcc (ppb-day); EDIm (ppb-day); EWIcc (ppb-week); TI (tolerable intake suggested by FAO/WHO); CRmmc (meals/mo) CRmmr (meals/mo)

PCBs	Mean	CSF	RfD	EDIcc	EDIm	EWIcc	TI	CRmmc	CRmmr
ΣPCBs dioxin-like	2,402	NA	2,000	0,001	0,008	0,001	0,018 ppb-w	>16	>16

NA: CSF and RfD are not available in the EPA's Integrate Risk Information System (IRIS) for this pollutant

**Tabella 20**

Mean and SD (ppm wet weight) of PAHs analyzed, CSF (cancer slope factor ppm-day); RfD (reference dose ppm-day); EDIcc (ppt-day); EDIm (ppt-day); EWIcc (ppt-week); TI (tolerable intake suggested by FAO/WHO); CRmmc (meals/mo) CRmmr (meals/mo)

PAHs	Mean	CSF	RfD	EDIcc	EDIm	EWIcc	TI	CRmmc	CRmmr
NA	1,117	NA	0,02	95,74	3622	670,2	NA	NA	>16
ACY	0,697	NA	NA	59,74	2260	418,2	NA	NA	NA
AC	0,405	NA	0,06	34,71	1313	243,0	NA	NA	>16
FL	0,652	NA	0,04	55,89	2114	391,2	NA	NA	>16
PHE	0,382	NA	NA	32,74	1238	229,2	NA	NA	NA
AN	0,327	NA	0,3	28,03	1060	196,2	NA	NA	>16
FA	0,685	NA	0,04	58,71	2221	411,0	NA	NA	>16
PY	0,005	NA	0,03	0,429	16,21	3,000	NA	NA	>16
BaA	0,021	NA	NA	1,800	68,10	12,60	NA	NA	NA
CH	0,003	NA	NA	0,257	9,729	1,800	NA	NA	NA
BbF	0,002	NA	NA	0,171	6,486	1,200	NA	NA	NA
BkF	0,003	NA	NA	0,257	9,729	1,800	NA	NA	NA
BaP	0,002	7,3	NA	0,171	6,486	1,200	10 ppt-d	6	NA
DahA	0,01	NA	NA	0,857	32,43	6,000	NA	NA	NA
BghiP	0,002	NA	NA	0,171	6,486	1,200	NA	NA	NA
IP	0,006	NA	NA	0,514	19,46	3,600	NA	NA	NA
ΣPAHs	4,32	NA	NA	370,3	14009	2592	NA	NA	NA

NA: CSF and RfD are not available in the EPA's Integrate Risk Information System (IRIS) for this pollutant, and TI is not available in the Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) online database

**Tabella 21**

Mean and SD (ppm wet weight) of Pesticide analysed, CSF (cancer slope factor ppm-day); RfD (reference dose ppm-day); EDIcc (ppb-day); EDIm (ppb-day); EWIcc (ppb-week); TI (tolerable intake suggested by FAO/WHO); CRmmc (meals/mo) CRmmr (meals/mo)

Pesticide	Mean	CSF	RfD	EDIcc	EDIm	EWIcc	TI	CRmmc	CRmmr
DDE	0,017	0,340	NA	0,001	0,055	0,010	10 ppb-d	16	NA
DDD	0,002	0,240	NA	<mdl	0,006	0,001	10 ppb-d	>16	NA

NA: CSF and RfD are not available in the EPA's Integrate Risk Information System (IRIS) for this pollutant. TI (tolerable intake suggested by FAO/WHO for DDT).

## 7.0 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

La ricerca effettuata ha permesso di valutare il livello di contaminazione del Golfo di Catania utilizzando la specie bioindicatrice *Engraulis encrasicolus* (Linneaus, 1758), detta volgarmente acciuga, nel cui tessuto muscolare sono stati presi in esame un importante pool di contaminanti, dai metalli pesanti, continuamente immessi nell'ambiente per via di processi di origine sia naturale che antropica, ai contaminanti organici persistenti come i policlorobifenili, già banditi a partire dagli anni 80.

*E. encrasicolus*, sebbene sia un teleosteo di piccola taglia, appartenente ad un livello trofico basso, con una vita media massima di 4 anni (Lucchetti A., 2003), riflette perfettamente la biodisponibilità di contaminanti presenti nella sua nicchia trofica, ad eccezione di quelli soggetti a biomagnificazione come il mercurio, che raggiunge concentrazioni molto alte in altre specie pelagiche come il tonno (*Thunnus thynnus*) e il pesce spada (*Xiphias gladius*) (Falco et al., 2006; Marti-Cid et al, 2008). Questa specie ittica è stata scelta anche perché è tra le più importanti da un punto di vista economico nelle marinerie siciliane, rappresentando il 5,67% della produzione totale di alimenti di origine marina (ISTAT, 2000).

La ricerca condotta rappresenta il punto di partenza per la valutazione del rischio ecologico e ambientale (ERA - Environmental Risk Assessment) nell'area del Golfo di Catania, procedura mediante la quale gli effetti avversi reali o potenziali di inquinanti o di altre attività antropiche sull'ecosistema o sulle sue componenti vengono stimate con un noto grado di certezza, usando metodologie scientifiche (Depledge 1994).

La moderna tossicologia ambientale mira infatti a valutare le risposte di un organismo, di una popolazione o di una comunità naturale nei confronti di uno stress ambientale (De Andrade et al., 2004; Sasaki et al., 1997; Sarkar et al., 2006; Fasulo et al., 2010; Flammarion et al., 2002) e molti studi utilizzano i pesci come organismi sentinella, sia negli ambienti marini che d'acqua dolce, mediante un approccio multibiomarkers (Linde-Arias et al., 2008; Ji et al., 2010; Doherty et al., 2010).

Questo studio ha anche permesso di iniziare una valutazione preliminare dei rischi per la salute umana, che potrebbero derivare dal consumo di pesce locale in caso di contaminazione. Infatti, per la maggior parte degli individui non esposti professionalmente, gli alimenti, e in particolar modo gli alimenti di origine marina, sono la principale via di assunzione di inquinanti ambientali (Falco et al., 2006). Una dieta raccomandata dovrebbe essere in grado di

fornire un corretto apporto nutrizionale con un livello minimo di microrganismi patogeni e contaminanti chimici (Martì-Cid et al., 2007).

Dai risultati ottenuti relativi al bioaccumulo di metalli pesanti nei i gruppi campionari della specie ittica in esame, sono emerse alcune differenze statisticamente significative, sia in relazione alle diverse fasi del ciclo biologico della specie, sia in relazione ai diversi periodi dell'anno presi in esame.

La maggiore concentrazione di metalli essenziali negli esemplari campionati a giugno e secondariamente a settembre trova la sua principale interpretazione nel ruolo cruciale che questi elementi svolgono durante il periodo riproduttivo; l'inizio della stagione estiva corrisponde infatti al picco riproduttivo massimo annuale della specie, mentre la fine della stagione estiva corrisponde al secondo periodo riproduttivo, che però ha un intensità minore del primo (Millàn et al., 1999; Grammitto et al., 2001). L'aumento del fabbisogno metabolico durante le fasi riproduttive, potrebbe favorire l'assorbimento di alcuni metalli essenziali (Riggio et al., 2003, Dragun et al., 2007; Marijić and Raspor, 2010) come calcio (Fig.1), cobalto (Fig. 4), rame (Fig. 6), ferro (Fig. 7), potassio (Fig. 9), magnesio (Fig. 10), manganese (Fig. 11), sodio (Fig. 12 ), fosforo (Fig. 14), selenio (Fig. 16) e zinco (Fig. 18). Purtroppo, i dati riferiti all'accumulo di alcuni metalli essenziali sono ancora molto carenti; conseguentemente, la maggior parte degli studi di biomonitoraggio ambientale si riferiscono all'analisi dei composti chimici tossici, sebbene anche gli stessi metalli essenziali in concentrazioni troppo elevate possano provocare tossicità (Audet et al., 2008; Corradi et al., 2010; Ker et al., 2010). Questo studio, infatti, per la prima volta rende noti i valori di alcuni elementi quali sodio, potassio, calcio, magnesio e fosforo nel tessuto muscolare di *E. encrasicolus*, i quali aumentano significativamente durante i periodi riproduttivi della specie. Per altri metalli essenziali, come zinco, ferro e manganese, è possibile poter condurre un confronto con i dati presenti in letteratura: le concentrazioni di zinco indicate da altri Autori (Topcuoglu et al., 2002; Turkmen et al., 2008; Papetti et al., 2009; Turan et al., 2009; Yildirim et al., 2009), sono in linea con quelle riscontrati negli esemplari ora campionati nel periodo non riproduttivo, mentre sono significativamente più basse di quelle che invece sono state rilevate nei periodi riproduttivi, sebbene però gli autori non abbiano specificato la fase del ciclo biologico della specie al momento del campionamento; le concentrazioni di ferro e manganese sono inferiori a quelle riscontrate in letteratura (Topcuoglu et al., 2002; Turkmen et al., 2008; Turan et al., 2009). Dall'analisi dei pesci campionati nel periodo invernale è emerso un accumulo maggiore di arsenico (Fig.1), mercurio (Fig. 8) e vanadio (Fig. 17), rispetto agli altri periodi dell'anno. I risultati ora ottenuti relativamente a questi metalli, indicano che negli esemplari campionati

nel Golfo di Catania, le concentrazioni sono più elevate di quelle indicate per la stessa specie in altre aree del Mediterraneo (Sepe et al., 2003; Falco et al., 2006; Marti-Cid et al., 2007; Papetti et al., 2009). Questo risultato è probabilmente attribuibile all'origine vulcanica di questi metalli (Di Leonardo et al., 2006; Nagai et al., 2006; Pandet et al., 2006; Hernandez et al., 2011; Bundschuh et al., 2011) poiché nel bacino del Mediterraneo sono presenti innumerevoli vulcani sottomarini, in particolar modo nello Ionio e nel basso Tirreno (Di Leonardo et al., 2006). Non è quindi escluso che il maggior contributo di questi elementi, soprattutto nel periodo invernale, sia dovuto non solo ad emissioni naturali, ma anche al maggiore idrodinamismo delle acque che favorirebbe un rimescolamento e una risalita di questi elementi presenti in profondità in tracce abbondanti. E' da sottolineare che, tra questi metalli solo il mercurio è regolamentato nelle derrate alimentari dal Reg. CE N. 1881/2006, che stabilisce un limite massimo di 0,50 mg/kg nel muscolo di pesce; la concentrazione media annuale da noi ritrovata (0,084 mg/kg; Fig. 8) è largamente di sotto di tale limite.

Un altro risultato interessante ottenuto, emerge dal confronto con i dati recentemente indicati in letteratura, che sono in accordo con i nostri per quanto riguarda cadmio e piombo (Topcuoglu et al., 2002; Sepe et al., 2003; Falco et al., 2006; Marti-Cid et al., 2007; Turkmen et al., 2008; Papetti et al., 2009; Turan et al., 2009; Yildirim et al., 2009); anche i dati relativi al nichel, ad eccezione della concentrazione di quest'ultimo nei pesci campionati a settembre, che sono leggermente più elevate dei dati presenti in letteratura (Turkmen et al., 2008; Papetti et al., 2009; Turan et al., 2009; Yildirim et al., 2009), e quelli relativi al cobalto e al rame (Topcuoglu et al., 2002; Turkmen et al., 2008), ad eccezione del rame rilevato da Papetti et al. (2009) in campioni di *E. encrasicolus* pescati nelle coste tirreniche del Lazio meridionale, sono in accordo con quelli rilevati in altri studi a livello internazionale. Diversamente, i valori riferiti in letteratura alle concentrazioni di cromo (Topcuoglu et al., 2002; Sepe et al., 2003; Turkmen et al., 2008; Turan et al., 2009; Yildirim et al., 2009), non sono in accordo con i nostri dati, sebbene questi non siano significativamente più elevati da poter ipotizzare una contaminazione particolare dell'area in esame. Tra questi metalli pesanti, solo il cadmio e il piombo, hanno dei limiti fissati dal Reg. CE N. 1881/2006, pari a 0,10 mg/kg e 0,30 mg/kg rispettivamente. Anche in questo caso, le concentrazioni medie da noi riscontrare (Fig. 3, 15) non hanno superato i suddetti limiti.

I dati relativi ai singoli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) hanno evidenziato per quanto riguarda i composti a basso peso molecolare, un accumulo tendenzialmente maggiore nel

periodo estivo (Fig. 19, 20, 21), mentre, per quanto riguarda i composti ad alto peso molecolare, un accumulo tendenzialmente maggiore nel periodo invernale (Fig. 22, 23, 24).

Gli IPA originano potenzialmente da processi di combustione incompleta di combustibili fossili, dalla combustione di biomasse o di rifiuti urbani, da fuoriuscite accidentali di idrocarburi, dalla decomposizione della materia organica e dal traffico navale (Liu et al 2005; Guo et al 2006, 2007). Devono però essere considerate le variazioni stagionali dovute alle precipitazioni e ai cambiamenti chimico fisici delle acque, e le variazioni annuali delle emissioni di IPA di origine antropica, che ne differenziano i livelli di biodisponibilità. Nello studio ora condotto, la maggiore presenza di IPA a basso peso molecolare nel periodo estivo è certamente una conseguenza dell'aumento del traffico navale e da diporto; invece la maggiore disponibilità degli IPA ad alto peso molecolare nel periodo invernale è data sia dallo spostamento in profondità della nicchia trofica della specie, sia dal maggiore idrodinamismo delle acque che favorisce il rimascolamento dei fondali. Gli IPA infatti, per via della loro elevata idrofobicità e capacità di legarsi al particolato, nell'ambiente marino tendono a depositarsi preferibilmente nei sedimenti (Kannan et al. 2005; Colombo et al. 2006).

Sebbene esistano delle variazioni significative stagionali per i singoli composti, il confronto statistico delle sommatorie non ha evidenziato differenze significative (Fig. 25). I dati riportati in letteratura, nell'ambito di indagini volte a valutare la presenza di IPA nel muscolo di questa stessa specie e di altre specie di aree differenti, sembrano evidenziare un grado di contaminazione analogo a quello da noi ottenuto (James et al., 2009; Bordajandi et al., 2004; Llobet et al., 2006; Perugini et al., 2007). Il Regolamento CE 1881/2006, stabilisce dei tenori massimi consentiti nel muscolo di pesce solo per il composto Benzo(a)Pyrene, fissandolo a 2 ppb. Il Benzo[a]Pyrene, infatti, è il più noto IPA cancerogeno, e la sua azione potrebbe rivelarsi molto pericolosa per la salute umana qualora la sua presenza venisse dimostrata nei prodotti ittici o negli altri alimenti; è un composto che in sé è chimicamente inerte, ma nel corso di reazioni metaboliche può formare degli intermedi elettrofili, cancerogeni e genotossici, capaci di interagire con varie macromolecole biologiche, compreso il DNA (Jernström and Gräslund, 1994). Sebbene in alcuni esemplari analizzati, appartenenti a tutti e tre i gruppi di campioni siano stati riscontrati valori superiori al tenore massimo consentito (Tabella 4, 5, 6), il calcolo delle medie stagionale indica che tale composto è sempre al di sotto del limite di legge fissato.

Per quanto riguarda i PCB diossina simili, i risultati ottenuti relativi alla sommatoria dei composti, così come per gli IPA, non hanno evidenziato alcuna differenza significativa tra i periodi presi in esame; quanto è emerso dimostra, in accordo con i dati in letteratura, che

questi composti, nonostante il loro utilizzo sia stato bandito già da tempo, sono altamente lipofili e persistenti negli ecosistemi acquatici (Andral et al., 2004; Pinto et al., 2008). Il Regolamento CE 1881/2006 definisce un tenore massimo della sommatoria delle diossine e PCB diossina simili di 8.0 pg/g TEQ nel muscolo di pesce. Il nostro risultato è sottostimato perché include solamente i PCB diossina simili, sebbene questi costituiscono la percentuale maggiore della suddetta sommatoria. Il limite fissato dal regolamento, nei tre gruppi campionati, non è stato mai superato, e le concentrazioni oscillano da 0,004 a 0,988, con una concentrazione media di 0,409 pg/g TEQ (Fig. 26). I dati da noi ottenuti sono in accordo o inferiori con quelli riscontrati in letteratura per la stessa specie (Perugini et al., 2004; Naso et al., 2005; Coelhan et al., 2006; Moon et al., 2009; Çakıroğulları et al., 2010) e per altre specie aliutiche (Kucuksezgin et al., 2001; Johnston et al., 2002; Bordajandi et al., 2004; Bocio et al., 2006; Burreau et al., 2006; Lobet et al. 2006; Lobet et al. 2007; Storelli et al., 2010).

Per quanto concerne i pesticidi clorurati analizzati, la somma dei metaboliti 4,4' DDE, 4,4' DDD, 4,4' DDT ci ha fornito un valore di DDT totale (per convenzione la somma di DDE, DDD, DDT viene chiamata DDT totale); i tenori di concentrazione nei tre periodi presi in esame, evidenziano un accumulo maggiore di 4,4' DDE nel periodo estivo, con un valore medio di 0,020 µg/g a giugno e 0,019 µg/g a settembre rispetto a quello del periodo invernale che è pari a 0,014 µg/g (Tabella 15, 16, 17). Anche in questo caso, come per i PCB e gli IPA, la differenza nella sommatoria tra i risultati dei tre gruppi di esemplari analizzati, non è risultata statisticamente significativa, evidenziando, anche in questo caso, che non esiste una variazione nell'accumulo di questi composti nei tre diversi periodi dell'anno. Il confronto con i dati bibliografici indica, inoltre, che i nostri livelli medi di DDT totale sono inferiori o in accordo con quelli rilevati in altri studi per la stessa specie (Bayarri et al., 2001; Perugini et al., 2004; Naso et al., 2005; Moon et al., 2009; Stefanelli et al., 2004) e per altre specie aliutiche (Kucuksezgin et al., 2001; Kannan et al., 2002; Kiziewicz et al., 2002; Storelli et al., 2010). La presenza dei metaboliti del DDT, sebbene in tracce, conferma che questo composto organico è altamente persistente, nonostante sia stato bandito dagli inizi degli anni 70, e che, nell'ambiente è sensibilmente lipofilo, capace di bioaccumularsi nei tessuti degli organismi ed essere metabolizzato. Secondo il D.M 27/08/2004 la somma di tutti gli isomeri e metaboliti del DDT nei prodotti della pesca e dell'acquacoltura con contenuto di grassi inferiore al 5%, non deve superare il limite di 50 µg/Kg peso umido; poiché il contenuto di grassi in *E. encrasicolus* oscilla intorno all'1%, le concentrazioni da noi riscontrate sono da ritenersi inferiori ai limiti previsti.



Dall'analisi dei biomarkers di esposizione, inoltre, non sono emersi risultati tali da poter affermare che le concentrazioni dei contaminanti presentano livelli tossici per la specie.

Infatti, le metallotioneine sono state trovate uniformemente espresse nei tre gruppi campionari analizzati, con concentrazioni crescenti rispettivamente a febbraio (Fig. 27), giugno (Fig. 28) e settembre (Fig. 29). La maggiore espressione delle MTs nei periodi riproduttivi della specie è probabilmente in relazione, più che alla necessità di detossificazione dai metalli, alla loro funzione di trasporto dei metalli essenziali, in particolare zinco e rame che durante la riproduzione contribuiscono allo sviluppo degli ovociti (Riggio et al., 2003). Infatti, sebbene le MTs abbiano la capacità di legare un gran numero di metalli pesanti agevolando il loro trasporto e la loro escrezione, e rappresentando un sensibile biomarkers di esposizione a questa classe di contaminanti (Mohmed et al., 2008; Wang et al., 2011; Kayaalti et al., 2011), queste proteine non enzimatiche sono costitutivamente espresse, perché hanno la funzione di legare i metalli essenziali presenti, partecipando attivamente alla loro regolazione omeostatica (Kayaalti et al., 2011).

Le proteine da stress HSP 70 non sono invece state trovate espresse negli esemplari campionati a febbraio, invece in quelli campionati a giugno e settembre sono state trovate debolmente espresse, probabilmente in relazione all'aumento della temperatura dell'acqua nel periodo estivo. Le proteine da stress termico HSP 70 prevengono l'aggregazione e/o degradazione delle altre proteine (Parsell and Lindquist, 1993; Buckley et al., 2006; Lapointe et al., 2011) e queste due risposte hanno l'effetto di limitare e compensare le possibili alterazioni proteiche derivanti dal calore, che compromette la fase iniziale del processo di traslocazione e promuove la degradazione proteica (Buckley et al., 2006; Lapointe et al., 2011).

L'enzima 7- etossiresorufina-O-dietilarsenicoi (EROD), non è stato trovato espresso in nessun gruppo campionario; questo dato è indice di una bassa contaminazione di IPA e composti organoclorurati nell'area del Golfo di Catania, e rafforza l'evidenza che il contenuto e l'attività dell'induzione del CYP1A nei pesci, relativo alla presenza di questi composti, è caratterizzato da una risposta direttamente proporzionale alle dosi (Stegeman and Hahn, 1994; van der Oost et al., 2003).

Anche dall'analisi dei tassi di consumo della specie è emerso un quadro positivo (Tab. 18, 19, 20, 21) se si considerano gli innumerevoli effetti cronici sistemici e cancerogeni che possono derivare da intossicazioni alimentari dei singoli contaminanti. Sebbene il CRmmc e il CRmmr dell'arsenico sia risultato in entrambi i casi  $<0,5$  (Tab. 18), questo risultato è riferito

all'arsenico totale, e, come è noto, la forma tossica dell'arsenico è quella inorganica (Edomond et al., 1993), che negli alimenti non supera mai il 3% dell'arsenico totale presente (Food Standard Agency, 2004). Inoltre i tassi di consumo trovati per i singoli contaminanti sono sempre inferiori a quelli massimi consigliati (quando disponibili) dalla World Health Organization e dalla Food and Agricultural Organization.

Riassumendo, dai dati di questa ricerca, si evince che :

- Le popolazioni di *E. encrasicolus* accumulano una certa quantità di metalli, IPA e composti organoclorurati nei loro tessuti, ma tuttavia, i limiti di legge previsti dal Reg. 1881/2006 per i contaminanti nel muscolo di pesce, non sono stati superati.
- I metalli essenziali si accumulano maggiormente durante i periodi riproduttivi della specie.
- L'accumulo degli altri metalli e degli IPA è maggiormente correlato ad un origine naturale, antropica ed alle variazioni delle caratteristiche chimico fisiche delle acque nelle diverse stagioni.
- La presenza di PCB e DDT, sebbene in tracce, sono la conferma che composti banditi già da 40 anni persistono nell'ambiente.
- I livelli di contaminanti trovati nei tessuti della specie non sembrano essere tali da provocare effetti tossici né nella specie ittica studiata né nell'uomo.

In conclusione, da questa prima analisi di valutazione del rischio ambientale nell'area del Golfo di Catania, è emerso un quadro positivo, sebbene i contaminanti rilevati siano legati ad un certo grado di antropizzazione, e dovrebbero essere costantemente monitorati per garantire standard di qualità dell'area in esame.

Sarà sicuramente interessante includere in un futuro monitoraggio ambientale dell'area del Golfo di Catania, specie ittiche con una vita media più lunga e una nicchia trofica diversa da quella di *E. encrasicolus*, ma sempre specie di elevata importanza economica, al fine di definire e caratterizzare più accuratamente il grado di inquinamento dell'area in esame, non solo per la salute del mare, ma soprattutto per quella dell'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams R.H., 1999. *Farmacologia E Terapeutica Veterinaria*. Edizione Italiana A Cura Di C. Beretta, Emsi editore, Roma, pp. 793-823.
- Adeyeye E.I., 2002. Determination of the chemical composition of the nutritionally valuable parts of male and female common West African fresh water crab *Sudana-nautes africanus*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53 (3): 189-196.
- Al-Yakoob S, Saeed T, 1993. Al-Hashash H. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Edible Tissue Of Fish From The Gulf After The 1991 Oil Spill. *Mar Pollut Bull* 27:297-301.
- Amoruso M.A., Witz G., Goldstein B.D., 1982. Enhancement Of Rat Andhuman Phagocyte Superoxide Anion Radical Production By Cadmium In Vitro. *Toxicol Lett* 10 (2-3): 133-138
- Andral B, Stanisiere JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F, Boissery P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar Pollut Bull* 49(9-10):704-712.
- Apostoli P., Bergonzi R, Catalani S., 2009. Policlorobifenili (Pcb) E Cancro. *G Ital Med Lav Erg* 31(4): 419-427.
- Apostoli P, Cassano F, Clonfero E, Dell'Omo M, Fiorentino ML, Izzotti A, Minoia C, Pavanello S, Valerio F., 1997. Tossicologia e prevenzione dei rischi da esposizione professionale a idrocarburi policiclici aromatici. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia* 19 (4):137-151.
- Audet P., Charest C., 2008. Allocation plasticity and metal-partitioning: meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environmental Pollution* 156: 290-296.
- Bayarri S., Baldassarri L.T., Iacovella N., Ferrara F., di Domenico A., 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs, and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 43: 601-610.
- Bowler K. e Duncan D.J., 1970. The Effect Of Copper On Membrane Enzymes. *Biochem Biophys Acta* 196:116-119.
- Becker W.M. e Hoekstra W.G., 1971. The Intestinal Absorption Of Zinc. In: *Intestinal Absorption Of Metal Ions, Trace Elements And Radionuclides* (S.C. Skoryna And D.Waldron-Edward Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 229.256
- Baird, C., 1997. *Chimica ambientale*. Zanichelli editore, Bologna, pp. 273.
- Beijer K., Jernelov A., 1979. Methylation Of Mercury In Natural Waters". In J.O. Nriagu (Ed.). *The Biogeochemistry Of Mercury In The Environment*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 201- 210
- Becher G., Haugen A., Bjoresth A., 1984. Multimethod Determination Of Occupational Exposure To Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: *An Aluminum Plant, Carcinogenesis* 5 (5): 647-651.
- Bini G. (1968-1970). *Atlante dei pesci delle coste italiane*. 1-10. Mondo sommerso, Roma.

- Bordajandi L. R., Gomez G., Abad E., Rivera J., Del Mar Fernandez-Baston M., Blasco J., Gonzalez M. J., 2004. Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): levels and health implications. *J Agric Food Chem* 52 (4): 992-1001.
- Boudou A., Ribeyre F., 1983. Contamination Of Aquatic Biocenoses By Mercury Compounds: An Experimental Toxicological Approach. In: J.O. Nriagu (Ed.). *Aquatic Toxicology*. John Wiley, New York, 73-116.
- Bocio A., Domingo J.L., Falcó G., Llobet J.M., 2007. Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in fish and seafood from the Catalan (Spain) market: Estimated human intake. *Environment International* 33: 170-175.
- Borrell A, Garcia-Solà A, Aguilar A, García NA, Crespo EA, 2010. Organochlorine residues in South American sea lions, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800): bioaccumulation and time trends. *Bull Environ Contam Toxicol* 2010 84(6):731-737.
- Bucheli, T. D. and Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 25(3)201-268.
- Buck W.B. 1978. Toxicity Of Inorganic And Aliphatic Organic Arsenicals. In: *Toxicity Of Heavy Metals In The Environment*. (Ed) F.M. Oehme, pp 357-369, Marcel Dekker, New York
- Buckley B.A., Gracey, A.Y., Somero, G.N., 2006. The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. *J. Exp. Biol.* 209, 2660-2677.
- Bundschuh J., Litter M.I., Parvez F., Roman-Ross G., Nicoli H.B., Jean J.S., Liu C.W., Armienta M.A., Guiherme L.R., Cuevas AG, Cornejo L., Toujaguez R., 2011. One century of arsenic exposure in Latin America: a review oh history and occurrence from 14 country. *Sci Total Environ*. In press
- Burreau S., Zebuhr Y., Broman D., Ishaq R., 2006. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Sci Total Environ* 366 (2-3): 659-72.
- Çakirogulları G.Ç., Uçar Y., Oymael B., Bozkurt E.N., Kılıç D., 2010. PCDD/F, dl-PCB and indicator PCBs in whiting, horse mackerel and anchovy in Black Sea in Turkey. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 10: 357-362.
- Campenhout K. V., Infante H.G., Adams F. and R. Blust, 2004. Induction and Binding of Cd, Cu, and Zn to Metallothionein in Carp (*Cyprinus carpio*) Using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicological Sciences* 80, 276-287
- Canton J.H. E Slooff W., 1982. Toxicity And Accumulation Studies Of Cadmium (Cd<sup>2+</sup>) With Freshwater Organisms Of Different Trophic Levels. *Ecotoxicol Environ Safety* 6:113-138.
- Carson R. 1962. *The Silent Spring*. Penguin Books(Ed), Harmondsworth, pp 317.

- Chau Y.K., Wong P.T.S., Kramer O., Bengert G.A., Cruz R.B., Kinrade J.O., Lye J., Van Loon J.C., 1980. Occurrence Of Tetraalkyllead Compounds In The Aquatic Environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 24 (2):265-269
- Chen D., Zhang M., Shrestha S., 2006. Compositional characteristics and nutritional quality of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Food Chem.* 103 (4): 1343-1349.
- Chvapil M., Ryan J.N. E Zukoski C.F., 1972. The Effect Of Zinc And Other Metals On Stability Of Lysosomes. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 642- 644.
- Coelhan M., Strohmeier J., Barlas H., 2006. Organochlorine levels in edible fish from the Marmara Sea, Turkey. *Environ. Int.* 32: 775-780.
- Cogun H.Y., Yuzereroglu T.A., Firat O., Gok G., Kargin F., 2006. Metal concentrations in fish species from the northeast Mediterranean Sea. *Environ Monit Assess* 121: 431-438
- Colombo JC, Cappelletti N, Laschi J, Migoya MC, Speranza E, Skorupka CN., 2006. Sources, vertical fluxes, and equivalent toxicity of aromatic hydrocarbons in coastal sediments of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ Sci Technol.* 40:734-740.
- Copat C., Bella F., Castaing M., Fallico R., Sciacca S., Ferrante M., 2011. Heavy Metals Concentrations in Fish from Sicily (Mediterranean Sea) and Evaluation of Possible Health Risks to Consumers. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology* DOI : 10.1007/s00128-011-0433-6.
- Corradi N, Charest C., 2011. Some like it toxic. *Mol Ecol.* 20(16):3289-90.
- De Andrade, V.M., Silva, J., Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L., Freitas, T.R. (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environ. Mol. Mut.* 44, 459-68.
- Demi, E. 2000. I Bifenili Policlorurati. In: *Tossicologia* (Greim H., Deml E. Eds). Zanichelli.
- Depledge M.H., 1994. The rational basis of the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi M.C. e Leonzio C., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 271-295.
- Di Giulio, R. T., Benson, W. H., Sanders, B. M. and Van Veld, P. A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (ed. G. M. Rand), pp. 523-561. Washington, DC: Taylor and Francis.
- Di Leonardo R, Tranchida G, Bellanca A, Neri R, Angelone M, Mazzola S., 2006. Mercury levels in sediments of central Mediterranean Sea: a 150+ year record from box-cores recovered in the Strait of Sicily. *Chemosphere* 65(11):2366-376.
- Dipple, A., Moschel, R.C. And Bigger, C.A.H., 1984. Polynuclear Aromatic Carcinogens. In: Searle, C.E. (Ed.), *Chemical Carcinogens*, ACS Monograph, Vol. 182. American Chemical Society Press, Washington DC, Pp. 41- 163.
- Domingo J. L., Bocio A., Falco G., Llobet J. M., 2007. Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology* 230 (2-3): 219-26.

- Doherty V.F., Ogunkuade O.O., Kanife U.C., 2010. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in Some Selected Fishes in Lagos, Nigeria. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 7: 359-365
- Dolara, P., 1997. *Tossicologia generale e ambientale*. Piccin Nuova Libreria s.p.a.
- DouAbul A A-Z, Heba H MA, Fareed K H., 1997. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (Pahs). In: *Fish From The Red Sea Coast Of Yemen*. *Hydrobiologia* 352:251-62.
- Dragun Z., Raspor B., Podrug M., 2007. The influence of the season and the biotic factors on the cytosolic metal concentrations in the gills of the European chub (*Leuciscus cephalus* L.). *Chemosphere* 69 (2007) 911-919
- Dudley R.E., Svoboda D.J., Klaassen C.D., 1982. Acute Exposure To Cadmium Causes Severe Liver Injury In Rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 77: 414-426.
- Dugo G., La Perar L., Bruzzese A., Pellicanò T.M. and Lo Turco V., 2006. Concentration of Cd (II), Cu (II), Pb (II), Se (IV) and Zn (II) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tissues from Tyrrhenian Sea and Sicilian Sea by derivative stripping potentiometry. *Food Control* 17 (2): 146-152.
- Dural M., Göksu M.Z, Ozak A.A., Derici B., 2006. Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 and *Mugil cephalus* L, 1758 from the Camlik lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environ Monit Assess* 118 (1-3): 65-74.
- EC, 2006. Commission Regulation N. 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels of certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of the European Union: Legislation Series* 64:5-24.
- Edmond J.M., Stallard R.F., Craig H., Craig V., Weiss R.F. and Coulter G.W., 1993. Nutrient chemistry of the water column of Lake Tanganyika. *Limnol Oceanogr* 38: 725-738.
- Edwards J.G., 1973. DDT in British Rain. *Science* 179: 4077-956.
- Ensley S., 2003. Lead-Metals And Minerals. In: *Clinical Veterinary Toxicology*, Di Plumlee K.H. (Ed), Mosby, 22: 204-210.
- EFSA, 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Food 1- Scientific Opinion Of The Panel On Contaminants In The Food Chain. *The EFSA Journal* 724: 1-114
- Eisler R., 1988. Arsenic Hazard To Fish, Wildlife And Invertebrates: A Synoptic Review. Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report N. 12.
- EPA, 1980. Ambient Water Quality Criteria For Cadmium. In: *U.S. Environ. Protection Agency Report*
- EPA, 1985. Ambient Water Quality Criteria For Arsenic. In: *U.S. Environ. Protection Agency Report*
- Ersoy B., Celik M., 2010. The essential and toxic elements in tissues of six commercial demersal fish from eastern Mediterranean Sea. *Food Chem Toxic* 48:1377-1382

- Eswea N.A., Corn M., 1971. Residence Time Of Particles In Urban Air. *Atmos Environm* 5: 571-578.
- Falandysz J., (1983a). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in herring from the southern Baltic. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 182: 131-5.
- Falandysz J. (1983b). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in cod from the southern Baltic,. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 182: 136-9.
- Falandysz J. (1983c). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in livers of cod from the southern Baltic. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 182: 224-7.
- Falco G., Llobet J.M., Bocio A., Domingo J. L., 2006. Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *J Agric Food Chem* 54 (16): 6106-6112
- Falk F., Ricci A., Wolff M.S., Godbold J., Deckers P., 1992. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47: 143-146.
- Fang J.K.H., Wu R.S.S, Zheng G.J., Au D.W.T, Lam P.K.S. and Shin P.K.S., 2009 . The use of muscle burden in rabbitfish *Siganus oramin* for monitoring polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in Victoria Harbour, Hong Kong and potential human health risk. *Sci Total Environ.* 407(14):4327-32.
- Fasulo S., Mauceri A., Maisano M., Giannetto A., Parrino V., Gennuso F., D'Agata A., 2010. Immunohistochemical and molecular biomarkers in *Coris julis* exposed to environmental contaminants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi: 10.1016/j.eco env.2009.12.025
- Fernandez-Salguero P., Pineau T., Hilbert D.M., Mcphail T., Lee S.S.T., Kimura S., Nebert D., Rudikoff S., Ward J.M., Gonzalez F.J., 1995. Immune System Impairment And Hepatic Fibrosis In Mice Lacking The Dioxinbinding Ah-Receptor. *Science* 268:722-726.
- Fiedler H., 1998. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Uses and Environmental Releases. St. Petersburg, Russian Federation, 1-4 July 1997. pp 81-129.
- Fisher B.E., 1999. Most unwanted. *Environ Health Perspect* 107 (1): A18-A23.
- Flammarion P., Devaux A, Nehls S., Migeon B., Noury P., Garric J., 2002. Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51: 145-153
- Fossi M.C., 1998. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognostici di "salute" ambientale. *Ecotossicologia*. UTET
- Gelboin H.V., 1980. Benzo[A]Pyrene Metabolic Activation And Carcinogenicity: Role And Regulation Of Mixed Function Oxidases And Related Enzymes. *Physiol Rev* 60: 1107-1166.
- Gennaro S.M. e Nebbia C., 1984. Selenio. In: *Tossicologia Veterinaria*. A Cura Di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano 180-188.
- George S.G., 1989. Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxication systems: dose-response. *Aquatic Toxicology* 15(4): 303-309.

- George, S.G., Young, P., 1986. The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzyme of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 83, 37-44.
- Gerpe M., Kling P., Berg A.H., Olsson P., 2009. Arctic char (*Salvelinus alpinus*) metallothionein: cDNA sequence, expression, and tissue-specific inhibition of cadmium-mediated metallothionein induction by  $17\beta$ -estradiol, 4-OH-PCB 30, and PCB 104. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9(3): 638-345.
- Gramitto M. E., 2001. La gestione della pesca marittima in Italia. Fondamenti tecnico-biologici e normativa vigente. In Marchesi grafiche Editoriali S.p.a. Monografie scientifiche cnr. 319 pp.
- Guerranti C., Mariottini M., Corsi I., Focardi S., 2003. Environmental endocrine disruptors in sex hormone sensitive human tissue and adipose tissue. *Atti del SETAC Europe 13th Annual Meeting "Understanding the Complexity of Environmentals: A Way to Sustainability"*, Hamburg, Germany, 27 April - 1 May 2003 p.202.
- Guo Z, Lin T, Zhang G, Yang Z, Fang M., 2006. High-resolution depositional records of polycyclic aromatic hydrocarbons in the central continental shelf mud of the East China Sea. *Environ Sci Technol*. 40:5304-5311.
- Guo Z, Lin T, Zhang G, Zheng M, Zhang Z, Hao Y, Fang M., 2007. The sedimentary fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Yangtze River Estuary coastal sea for the past century. *Sci Total Environ*. 386:33-41.
- Gutteridge J.M.C., 1987. Lipid Peroxidation: Some Problems And Concept. In: *Oxygen Radicals And Tissue Injury* (B. Halliwell Ed.), The Upjohn Company, Bethesda, Maryland.
- Harvey R.G., 1991. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Chemistry And Carcinogenicity. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 11-87.
- Hernandez H., Rodriguez R., 2011. Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environ Monit Assess*. In press
- Hogstrand C., Balesaria S., Glover C.N., 2002. Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 133: 523-535.
- Huggett et al., 1992. In: *Sediment Toxicity Assessment*, pp. 403-430. (Burton, Ed.) Lewis Publishers, Ann Arbor, MI.
- Huston P.L., Pignatello J.J., 1999. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted fenton reaction. *Water Research* 33 (5), 1238-1246.
- Howard P.H., Boethling R.S., Jarvis W.F., Meylan W.M. e Michalenko E.M., 1991. *Handbook Of Environmental Degradation Rates*. Printup, H.T. (Ed). Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- IARC, 1974. Monograph on the Evaluation of carcinogenic Risk of Chemicals to man: Some Organochlorine Pesticides. International Agency for Research in Cancer, Lyon, France, Vol. 5.



- IARC, 1983. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part I. Chemicals, Environment and Experimental Data, Vol. 32.
- IARC, 1986. Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans. Tobacco Smoking. Lyon (France): International Agency For Research On Cancer, Vol. 38.
- IARC, 1987. Overall Evaluations Of Carcinogenicity: An Updating Of IARC Monographs Volumes 1 To 42. Lyon (France): International Agency For Research On Cancer.
- IARC, 1997. Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Man. Vol. 69, P. 33.
- IARC, 2004. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 1-88.
- IPCS (International Programm of Chemical Safety), 1998. Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. Geneva: International Programme On Chemical Safety - World Health Organization.
- ISTAT (2000) Statistica sulla pesca, caccia e zootecnia. Alba Grafica Spa, Roma
- Jana N.R., Sarkar S., Yonemoto J., Tohyama C., Sone H., 1998. Strain Differences In Cytochrome P450<sub>1a1</sub> E Expression Caused By 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-P-Dioxin In The Rat Liver: Role Of The Aryl Hydrocarbon Receptor And Its Nuclear Translocator. *Biochem Biophys Res Commun* 248:554-558.
- Jernström B. and Gräslund A., 1994. Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys Chem.* 49(3):185-99.
- Ji Y., Lu G., Wang C., Song W., Wu H., 2010. Fish transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality. *J. Environ. Sci.* 22: 1826-1832
- Joy R.M., 1982. Chlorinated hidrocarbon insecticides. In: Echobicon D.J. and Joy R.M., *Pesticides and neurological diseases.*CRC Press: 91-104.
- Jones K.C., Grimmer G., Jakob J., Johnston A.E., 1989. Changes In The Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Content Of Wheat Frain And Pasture Grassland Over Last Century From One Site In The U.K. *Sci Total Environ* 78: 117-130.
- Johnston T.A., Fisk A.T., Whittle D.M., Muir D.C., 2002. Variation in organochlorine bioaccumulation by a predatory fish; gender, geography, and data analysis methods. *Environ Sci Technol* 36 (20): 4238-44.
- Kakin H.W., 1973. *Adv Chem Serv* 123. 96.
- Kalay M., Ay O., Canli M., 1999. Heavy metal concentrations in fish tissues from the northeast Mediterranean Sea. *Bull Environ Contam Toxicol* 63(5):673-81.
- Kannan K., Falandysz J., Yamashita N., Tanabe S., Tatsukawa R., 1992. Temporal trends of organochlorine concentrations in cod-liver oil from southern Baltic proper, 1971-1988. *Mar Pollut Bull* 24: 358-363.

- Kannan K, Corsolini S, Imagawa T, Focardi S, Giesy P., 2002. Polychlorinated -naphthalenes, -biphenyls, -dibenzofurans and p,p' -DDE in bluefin tuna, swordfish, cormorants and barn swallows from Italy. *Ambio* 31:207-211
- Kannan K, Johnson-Restrepo B, Yohn SS, Giesy JP, Long DT., 2005. Spatial and temporal distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Michigan Inland Lakes. *Environ Sci Technol.* 39:4700-4706.
- Kayaaltı Z, Aliyev V, Söylemezoğlu T., 2011. The potential effect of metallothionein 2A -5A/G single nucleotide polymorphism on blood cadmium, lead, zinc and copper levels. *Toxicol Appl Pharmacol.* 256(1):1-7
- Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375 (6532):581-585.
- Ker K., Charest C., 2010. Nickel remediation by AM-colonized sunflower. *Mycorrhiza*, 20: 399-406.
- Khalid R.A., Gambrell R.P., Patrick W.H. Jr, 1981. Chemical Availability Of Cadmium In Mississippi River Sediment. *J Environ Qual* 10 (4): 523-528.
- Kiziewicz B., Czczuga B., 2003. DDT and its metabolites in the tissues of certain fish species from Polasie province. *Polish Journal of environmental studies* 12 (1): 123-127.
- Kosanovic M., Hasan M.Y., Subramanian D., Al Ahbabi A.A., Al Kathiri O.A., Aleassa E.M., Adem A., 2007. Influence of urbanization of the western coast of the United Arab Emirates on trace metal content in muscle and liver of wild Red-spot emperor (*Lethrinus lentjan*). *Food Chem Toxicol* 45(11):2261-6.
- Kucuksezgin F., Altay O., Uluturhan E., Kontas A., 2001. Trace metal and organochlorine residue levels in red mullet (*Mullus barbatus*) from the eastern Aegean, Turkey. *Water Res* 35 (9): 2327-32
- Kumada H., Kimura S., Yokote M., 1980. Accumulation And Biological Effects Of Cadmium In Rainbow Trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 97-103.
- Kutz F.W., Wood P.H. e Bottimore D.P., 1991. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose t. *Reviews of Environ Contam Toxicol* 120: 1-74
- Lide DR., 2003-2003. *CRC Handbook Of Chemistry And Physics*, 83rd Edition. Boca Raton (Fl): Crc Press.
- Linde-Arias A.R., Inácio A.F., de Albuquerque C., Freire A.M., Moreira J.C., 2008. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. *Sci. Total Environ.* 399: 186-192.
- Liu GQ, Zhang G, Li XD, Li J, Peng XZ, Qi SH., 2005. Sedimentary record of polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment core from the Pearl River Estuary, South China. *Mar Pollut Bull.* 51:912-921.
- Llobet J.M., Falco G., Casas C., Teixidò A., Domingo J., 2003. Concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in common foods and estimated daily intake by children, adolescents, adults, and seniors of Catalonia, Spain. *J Agric Food Chem* 51: 838-842

- Llobet J.M., Falco G., Bocio A., Domingo J.L., 2006. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through consumption of edible marine species in Catalonia, Spain. *J Food Prot* 69 (10): 2493-9.
- Llobet J. M., Falco G., Bocio A., Domingo J.L., 2007. Human exposure to polychlorinated naphthalenes through the consumption of edible marine species. *Chemosphere* 66 (6): 1107-13.
- Lucchetti A., 2003. *Biologia, pesca e consumo della Engraulis encrasicolus (Linneo, 1758). Il Pesce* vol.5
- Mansour S.A., 2004. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology* 198: 91-115.
- Marti-Cid R., Bocio A., Llobet J. M., Domingo J.L., 2008. Balancing health benefits and chemical risks associated to dietary habits: RIBEFood, a new Internet resource. *Toxicology* 244 (2-3): 242-8.
- Marijić V. F., Raspor B., 2010. The impact of fish spawning on metal and protein levels in gastrointestinal cytosol of indigenous European chub. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152: 133-138
- Mattison D.R., Nightingale M.S., 1980. The Biochemical And Genetic Characteristics Of Murine Ovarian Aryl Hydrocarbon (Benzo[A]Pyrene) Hydroxylase Activity And Its Relationship To Primordial Oocyte Destruction By Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 56: 399-408.
- Menichini E., Bocca A., Merli F., Ianni D., Monfredini F., 1991. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Olive Oils On The Italian Market. *Food Additives And Contaminants* 8 (3): 363-69.
- Menichini E., 1992. Opinion Adopted By The Italian National Advisory Toxicological Committee On Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Rapporto Istisan 92/4.
- Menichini E., 1994. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Identity, Physical And Chemical Properties, Analytical Methods. Roma: Istituto Superiore Di Sanità (Rapporti Istisan 94/5).
- Menichini E., Rossi L., 1991. Idrocarburi Policiclici Aromatici: Basi Scientifiche Per La Proposta Di Linee Guida (Rapporto Istisan 91/27).
- Millàn M., 1999. Reproductive characteristics and condition status of anchovy *Engraulis encrasicolus* L. from the Bay of Cadiz (SW Spain). *Fisheries Research*, 41: 73-86.
- Minoia C., Perbellini L., 2000. Monitoraggio Ambientale E Biologico Dell'esposizione Professionale A Xenobiotici: Idrocarburi Policiclici Aromatici, Ed. Morgan, 2, Gennaio 2000.
- Mohamed S., Kheireddine O., Wyllia H.M., Roquia R., Aicha D., Mourad B., 2008. Proportioning of biomarkers (GSH, GST, Ache, Catalase) indicator of pollution at *Gambusia affinis* (Teleostei fish) exposed to cadmium. *Environ. Res. J.* 2: 177-181.
- Moon H.B., Kim H.S., Choi M., Yu J., Choi H.G., 2009. Human health risk of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides resulting from seafood consumption in South Korea, 2005-2007. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1819-1825.
- Murty, A.S., 1986. Toxicity of pesticides to fish. Vol.1, CRC Press, Boca Raton.

- Miller, E.C., 1978. Some Current Perspectives On Chemical Carcinogenesis In Humans And Experimental Animals: Presidential Address. *Cancer Res* 38: 1479-1496.
- Miller E.C. e Miller J.A., 1966. Mechanism Of Chemical Carcinogenesis: Nature Of Proximate Carcinogens And Interactions With Macromolecules. *Pharmacol Rev* 18: 805-838.
- Miller G.T., 1997. Ambiente, Risorse, Sostenibilità. Piccin Nuova Libreria Spa, Padova, pp. 53.
- Nagay M., Saitoh J., Ohno H., Hitomi C., Wada M., 2006. Pentavalent vanadium of the underground water level enhances the sweet taste sense to glucose in college students. *Biometals* 19(1): 7-12
- Naso B., Perrone D., Ferrante M.C., Bilancione M., Lucisano A., 2005. Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy. *Sci. Total Environ.* 343: 83-95.
- Oehme M., Haugen J. E. e Schlabach M., 1996. Seasonal changes and relations between levels of organochlorines in Arctic ambient air: first result of an all-year-round monitoring program at Ny-Alesund, Svalbard, Norway. *Environ Sci Technol* 30: 2294-2304.
- Overby L.R. e Frederickson R.L., 1963. Metabolic Stability Of Arsanilic acid In Chickens. *J Agric Food Chem* 1 (1): 378-381.
- Overby L.R. e Frost D.V., 1960. Excretion Studies In Swine Fed Arsanilic Acid. *J Anim Sci* 19: 140
- Pandey P.K., Sharma R., Roy M., Roy S., Pandey M., 2006. Arsenic contamination in the Kanker district of central-east India: geology and health effects. *Environ Geochem Health.* 28(5): 409-420
- Pavan I., Baroffio C., Passini V., Bilei T., Pira E., Minoia C., 2003. Policlorobifenili: Valori Di Riferimento. *G Ital Med Lav Erg, Pavia.* 25 (1): 61-67.
- Phillips D.H., 1999. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In The Diet. *Mutat Res* 443:139-147.
- Papetti P., Rossi G., 2009. Heavy metals in fishery products of low Lazio and the use of metallothionein as a biomarkers of contamination. *Environ Monitor Assess* 159: 589-598
- Parks K.S., Sims R.C., Dupont R.R., Doucette W.J. e Matthews J.E., 1990. Fate Of Pah Compounds In 2 Soil Types - Influence Of Volatilization, Abiotic Loss And Biological Activity. *Environ Toxicol Chem* 9 (2): 187-195.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-439.
- Perugini M., Cavaliere M., Giammarino A., Mazzone P., Olivieri V., Amorena M., 2004. Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea. *Chemosphere* 57, 391-400.
- Perugini M., Visciano P., Giammarino A., Manera M., Di Nardo W., Amorena M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. *Chemosphere* 66(10): 1904-10

- Pinto B., Garritano S.L., Cristofani R., Ortaggi G., Giuliano A., Amodio-Cocchieri R., Cirillo T., De Giusti M., Boccia A., Reali D., 2008. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed seafood. *Environ Monit Assess* 144(1-3):445-53.
- Preston A.M., Dowdy R.P., Preston M.A., Freeman J.N., 1976. Effect Of Dietary Chromium On Glucose Tolerance And Serum Cholesterol In Guinea Pigs. *J. Nutr* 106 (10): 1391-397.
- Raghavan S.R.V., Culver B.D., Gonick H.C., 1980. Erythrocyte Leadbinding Protein After Occupational Exposure 1. Relationship To Lead Toxicity. *Environ Res* 22: 264-270.
- Ralston S.L., Lau H.H., Seidel A., Luch A. e Baird W.M., 1995. Stereoselective Activation Of Dibenzo[A,L]Pyrene To (-)-Anti (11R,12S,13S,14R)- And (+)-Syn(11S,12R,13S,14R)-11,12diol-13,14-Epoxides Which Bind Extensively To Deoxyadenosine Residues Of DNA In The Human Mammary Carcinoma Cell Linemcf-7. *Carcinogenesis* 16(12): 2899-907.
- Ralston S.L., Lau H.H.S., Seidel A., Luch A., Platt K.L. e Baird W.M., 1994. Polycycl Arom Compds 6:199-206.
- Reilly C., 2002. The Toxic Metalloids: Arsenic, Antimony And Selenium, Tellurium And Boron. In: *Metal Contamination of Food*. Elsevier Applied Science London And New York.
- Riggio M., Filosa S., Parisi E., Scudiero R., 2003. Changes in zinc, copper and metallothionein contents during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 191-196
- Roesijadi G., Robinson W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: Mechanism of uptake, accumulation and release. In: *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and cellular Perspectives* (eds: Malins DC, Ostrander GK) Lewis Publishers, London, 539 pp.
- Rogge W.F., Hidlemann L.M., Mazurek M.A.A., Glen R.C., Simoneit B.R.T., 1993. Sources Of Fine Organic Aerosol. 2. Non-Catalyst And Catalyst-Equipped Automobiles And Heavy-Duty Diesel Trucks. *Environmental Science And Technology* 27: 636-651.
- Ruzzenenti, 2003. La Storia dei Pcb (Policlorobifenili). *Miracoli e Disastri della Tecnica del Novecento, "Altronecento. Ambiente-Tecnica-Società"*, Rivista On-Line Promossa Dalla Fondazione "Luigi Micheletti"
- Sarkar A., Ray D., Shrivastava A.N., Sarker S., 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15: 333-40.
- Sanders B.M., Martin L.S., Nelson W.G., Phelps D.K., Welch W., 1991. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Marine Environmental Research* 31 (2): 81-97.
- Sasaki Y.F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda S., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofuni T., Hayashi M. 997. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutat. Res.* 393: 133-9.
- Sepe A., Ciaralli L., Ciprotti M., Giordano R., Funari E., Costantini S., 2003. Determination of cadmium, chromium, lead and vanadium in six fish species from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* 20(6): 543-552

- Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T., 2000. Benzo[A]Pyrene Carcinogenicity Is Lost In Mice Lacking The Aryl Hydrocarbon Receptor. *Proc Natl Acad Sci* 97:779-82.
- Settlemire C.T e Matrone G., 1967. In Vivo Interference Of Zinc With Ferritin Iron In The Rat. *J Nutr* 92:153-158.
- Settlemire C.T e Matrone G., 1967. In Vivo Effect Of Zinc On Iron Turnover In Rats And Life Span Of The Erythrocyte. *J Nutr* 92: 159-164.
- Silcher S., Grimaldi D., Balzamo S., 2007. Linee Guida Sui Rifiuti Speciali –Pcb, 5. Siniscalco F.
- Sivaperumal P., Sankar T., Viswanathan V. and Nair P.G., 2007. Heavy metal concentrations in fish, shellfish, and fish products from internal markets of India vis-a-vis international standards. *Food Chemistry* 102 : 612-620.
- Sotelo J.L., Ovejero G., Delgado J.A., Martinez I., 2002. Comparison of adsorption and kinetics of four chlorinated organics from water onto GAC. *Water Research* 36: 599-608.
- Spada L., Annicchiarico C., Cardellicchio N., Giandomenico S., Di Leo A., 2011. Mercury and methylmercury concentrations in Mediterranean seafood and surface sediments, intake evaluation and risk for consumers. *Int J Hyg Environ Health* in press
- Spehar R.L., Anderson R.L., Fiandt J.T., 1978. Toxicity And Bioaccumulation Of Cadmium And Lead In Aquatic Invertebrates. *Environ Pollut* 15 (3): 195-208.
- Sporn A., Dinu I., Stoenescu L., Cirstea A., 1969. Beitrage Zur Ermittlung Der Wechselwirkungen Zwischen Cadmium Und Zink. *Nahrung*. 13: 461.
- Stefanelli P., Di Muccio A., Ferrara F., Barbini D.A., Generali T., Pelosi P., Amendola G., Vanni F., Di Muccio S., Ausili A., 2004. Estimation of intake of organochlorine pesticides and chlorobiphenyls through edible fishes from the Italian Adriatic Sea during 1997. *Food Control* 15, 27-38.
- Stegeman J.J. and Hahn M.E, 1994. Stegeman J.J., Hahn M.E., Malins D.C., Ostrander G.K., Editors. *Aquatic Toxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL pp. 87-206.
- Stegeman J.J., Brouwer M., Di Giulio R., Forlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., Van Veld P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chimica exposure and effect. In: Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H.L. (eds), *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publisher, MI, USA pp. 253-336.
- Storelli MM, Barone G, D'Addabbo R, Marcotrigiano GO., 2006. Concentrations and composition of organochlorine contaminants in different species of cephalopod molluscs from the Italian waters (Adriatic Sea). *Chemosphere* 64 (1): 129-34.
- Storelli M.M. Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *J Food Prot* 2009, 72, (5), 1116-20

- Storelli M.M., Perrone V.G., 2010. Detection and quantitative analysis of organochlorine compounds (PCBs and DDTs) in deep sea fish liver from Mediterranean Sea. *Environ Sci Pollut Res Int.* 17(4):968-76
- Suau P., 1979. Un ejemplo de regulacion en pesquerias. *Inv. Pesq*
- Tahvonen R., Aro T., Nurmi J., Kallio H., 2000. Mineral content in Baltic herring and Baltic herring products. *J. Food Compos. Anal.* 13: 893-903.
- Tanabe S., Kannan N., Subramanian An., Watanabe S., Tatsukawa R., 1987. Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environ Pollut* 47: 147-163.
- Tancioni L., Scardi M., Cataudella S., 2005. I Pesci Nella Valutazione Dello Stato Ecologico Dei Sistemi Acquatici. *Ann. Ist. Super Sanità* 41 (3): 399-402.
- Tepe Y., 2009. Metal concentrations in eight fish species from Aegean and Mediterranean Seas. *Environ Monit Assess* 159 (1-4): 501-509.
- Topcuoğlu S., Güngör N., Kirbaşoğlu C., 2002. Distribution coefficients (Kd) and desorption rates of <sup>137</sup>Cs and <sup>241</sup>Am in Black Sea sediments. *Chemosphere* 49 (10): 1367-1373.
- Topcuoğlu S., Kirbaşoğlu C., Güngör N., 2002. Heavy metals in organisms and sediments from Turkish Coast of the Black Sea, 1997-1998. *Environ Int* 27 (7): 521-526.
- Turan C., Dural M., Oksuz A., Ozturk B., 2009. Levels of heavy metals in some commercial fish species captured from the Black Sea and mediterranean coast of Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol* 82: 601-604
- Turyk M. E., Bhavsar S.P., Bowerman W., Boysen E., Clark M., Diamond M., Mergler D., Pantazopoulos P., Schantz S., Carpenter D.O., 2011. Risks and Benefits of Consumption of Great Lakes Fish. *Environ Health Perspect in press*
- Türkmen A., Tepe Y., Türkmen M., 2008. Metal levels in tissues of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L., 1758, and picarel, *Spicara smaris* L., 1758, from Black, Marmara and Aegean seas. *Bull Environ Contam Toxicol* 80 (6): 521-525.
- Tüzen M., 2003. Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 80: 119-123.
- Tuzen M, 2009. Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 47 (8): 1785-1790.
- US-EPA, 2000. Risk-based concentration table. Philadelphia, PA: United States Environmental Protection Agency.
- Valle B.L. E Glades A., 1974. The Metallobiochemistry of Zinc Enzymes. *Adv. Enzymol.* 56: 283
- Valle B.L. E Ulmer D.D., 1972. Biochemical Effects Of Mercury, Cadmium And Lead. *Annu Rev Biochem* 41(10): 131-138.

- Van Campen D.R., 1971. Absorption Of Copper From The Gastrointestinal Tract. In: Intestinal Absorption Of Metal Ions, Trace Elements And Radionuclides (S.C. Skoryna And D. Waldron- Edward Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 211.
- Van den Berg M., Van Den Meent D., Peijnenburg W.J.G.M., Sijm D.T.H.M., Struijs J., Tas J.W., 1995. Transport, accumulation and transformation processes. In: Van Leeuwen C.J. and Hermens J.L.M. (eds ), Risk assessment of chemicals: an introduction. Kulveer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London: pp 37-52, 96 -97.
- van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- Van Larebeke N., Hens L., Schepens P., Covaci A., Baeyens J., Everaert K., Bernheim J.L., Vlietinck R., De Poorter G., 2001. The Belgian Pcb And Dioxin Incident Of January-June 1999: Exposure Data And Potential Impact On Health. *Environ Health Perspect* 109(3): 265-273.
- Venugopal B. e Luckey T.D., 1978. Chemical Toxicity Of Metals And Metalloids. *Metal Toxicity in Mammals 2* Plenum Press, New York And London.
- Viarengo A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev Aquat Sci* 1: 295-317.
- Vighi M., Bacchi E, 1998. *Ecotoxicologia*. UTET.
- Wayland M., 2000. Metals as Threats to Wildlife. In: Short Course On Wildlife Toxicology. Canadian Cooperativew Wildlife Centre. Saskatoon, 1-3 March 2000.
- Wahba Z. e Waalkes M.P., 1990. Effect on on Vivo Low-Dose Cadmium Pretreatment on the in Vitro Interactions of Cadmium with Isolated Interstitial Cells of the Rat Testes. *Fund Appl Toxicol* 15: 641
- Webb M., 1979. *The Chemistry, Biochemistry And Biology Of Cadmium*. Elsevier/North Holland Biochemical, New York.
- Weiss B., Amler S., Amler R.W., 2004. Pesticides. *Pediatrics* 113(S4): 1030-1036.
- Whitfield A.K., 1996. A review of estuarine ichthyology in South Africa over the past 50 years. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 51 (Special Issue) pp. 79-89.
- Whitfield A.K., Elliot M., 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestion for the future. *Journal of Fish Biology* 61:229-250.
- Wolff M.S., Toniolo P.G., Leel E.W., Rivera M., Dubin N., 1993. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 648.
- Woodwell G.M., Craig P.P., Johnson H.A., 1971. DDT in the biosphere: where does it go? *Science* 174(14): 1101-107.



- Zalloua P.A., Hsua Y., Terwedowa H., Zangc, T., Genfu Tang D.W., Li, Z., 2007. Impact of seafood and fruit consumption on bone mineral density. *Maturitas* 56: 1-11.
- Zhang Z., Hu J., 2008. Effects of p,p'-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Environ Sci (China)* 20 (3): 347-352.

