

Università “Cà Foscari”

Venezia

Scuola Dottorale di Ateneo

Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali XXIV° ciclo

(Anno di discussione 2013)

Messa a punto di un metodo analitico per la determinazione di
metaboliti ossidrilati di PCB (PCB-OH) in specie ittiche di
interesse alimentare

Settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM/01

Tesi di Dottorato di **Valentina Marra**

Matricola 955596

Coordinatore del Dottorato

Prof. Bruno Pavoni

TUTOR (Ca' Foscari)

Prof. Bruno Pavoni

TUTOR (Istituto Superiore di Sanità)

Dott.ssa Elena De Felip

INDICE

Premessa	4
Introduzione	5
1. I Policlorobifenili (PCB)	7
1.1 <i>Struttura e proprietà chimico-fisiche dei PCB</i>	8
1.2 <i>Presenza nell'ambiente dei Policlorobifenili</i>	9
1.3 <i>Tossicità Ambientale e Umana</i>	9
1.4 <i>I PCB diossina-simili</i>	9
1.5 <i>I PCB non diossina-simili</i>	11
1.6 <i>Esposizione Ambientale</i>	13
1.6.1 <i>Bioaccumulo e Biomagnificazione</i>	13
1.7 <i>Rischio Ambientale</i>	14
2. I Policlorobifenili ossidrilati (PCB-OH)	19
2.1 <i>I Policlorobifenili ossidrilati</i>	20
2.2 <i>Il citocromo P450</i>	22
2.3 <i>Presenza dei PCB-OH nell'ecosistema</i>	24
2.3.1 <i>I PCB-OH nella fauna marina e terrestre</i>	24
2.3.2 <i>I PCB-OH nelle acque e nei sedimenti</i>	26
2.4 <i>Studi di eco-tossicità dei PCB-OH</i>	27
2.5 <i>Studi su siero umano</i>	28
2.6 <i>Studi su siero di pesce</i>	30
3. Scopo della Tesi e selezione dei metaboliti dei PCB per la messa a punto del metodo analitico	32
3.1 <i>Scopo della tesi e selezione dei PCB e dei PCB-OH</i>	33
4. Materiali	36
4.1 <i>Materiali</i>	37
4.1.1 <i>Siero Umano</i>	38
4.1.2 <i>Siero ittico</i>	38
4.2 <i>Specie ittiche studiate</i>	39
4.2.1 <i>Sparus Aurata</i>	39
4.2.2 <i>Dicentrarchus Labrax</i>	40
4.2.3 <i>I Salmonidi</i>	41
4.2.4 <i>Thunnus</i>	42
4.2.5 <i>Sarda Sarda</i>	43
4.2.6 <i>Auxis thazard thazard</i>	43
4.2.7 <i>Xipias gladius</i>	44
5. Metodo	45
5.1 <i>Percorso di messa a punto del metodo analitico</i>	46
5.2 <i>Ricerca bibliografica ed individuazione del metodo analitico da riprodurre nel siero di specie ittiche</i>	47
5.3 <i>Preparazione dei materiali</i>	49
5.3.1 <i>Preparazione degli standard</i>	49
5.3.2 <i>Preparazione delle soluzioni di estrazione e di metilazione</i>	53
5.4 <i>Strumentazione</i>	55
5.4.1 <i>Spettrometro di massa a singolo quadrupolo accoppiato a un gas cromatografo (HRGC-LRMS)</i>	56
5.4.2 <i>Spettrometro di massa a triplo quadrupolo accoppiato a un gas cromatografo (HRGC-LRMS/MS).</i>	59
5.5 <i>Prove di laboratorio su matrici umane ed ittiche con l'utilizzo di HRGC-LRMS a singolo quadrupolo</i>	61
5.5.1 <i>Valutazione di linearità e ripetibilità del HRGC-LRMS a singolo quadrupolo</i>	62
5.6 <i>Risultati sul siero umano</i>	66

5.7 Risultati su siero di orate e branzini allevati	67
5.8 Validazione del metodo analitico attraverso l'utilizzo dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo	70
5.9 Procedura di Validazione del metodo	72
6. Risultati della validazione del metodo analitico	76
6.1 Risultati della validazione per ogni coppia della curva in matrice	77
6.2 Analisi del campione di siero di salmone con lo spettrometro di massa ad alta risoluzione accoppiato al gas cromatografo ad alta risoluzione (HRGC-HRMS)	86
7. Analisi di campioni reali	88
7.1 Laguna di Orbetello	89
7.2 Bagnara Calabra-Porto Palo-Monopoli	93
8. Valutazione del rischio umano da esposizione a Policlorobifenili ossidrilati	97
8.2 Valutazione del rischio per l'uomo da PCB-OH	101
8.2.1 Calcolo dell' <i>intake</i> per la palamita, tonno, spada, tombarello	102
8.2.2 Tossicità per l'uomo dei PCB-OH	106
8.2.3 Studi epidemiologici	108
8.2.4 Possibili effetti tossici sull'uomo in base ai valori di <i>intake</i> calcolati	108
9. Conclusioni	110
BIBLIOGRAFIA	114
<i>Ringraziamenti</i>	123

Premessa

Lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di individuare i policlorobifenili ossidrilati, metaboliti dei policlorobifenili (microinquinanti ambientali tossici), in specie ittiche di interesse alimentare tramite la determinazione dei livelli di concentrazione di questi inquinanti nel siero. Per raggiungere questo obiettivo è stato messo a punto un metodo analitico, il più possibile economico e rapido. Di seguito viene riportata, sotto forma di schema, la struttura di questa tesi.

Introduzione



I Policlorobifenili e i loro metaboliti: chimica di reazione e tossicità



Metodi analitici e dati tossicologici presenti in letteratura



Validazione del metodo analitico



Ricerca e determinazione dei livelli in campioni reali e valutazione del rischio

Introduzione

I policlorobifenili ossidrilati (PCB-OH) sono i principali metaboliti dei policlorobifenili (PCB), una classe di inquinanti organici persistenti ambientali caratterizzati da elevata lipofilia e dalla capacità di bio-accumulare all'interno delle catene alimentari. Per le loro caratteristiche chimico-fisiche in parte vengono escreti attraverso le feci o l'urina e in parte sono trattenuti nel corpo umano (Sandau et al., 2000, Hovander et al., 2002, Fångström et al., 2002). A causa di un'ampia gamma di effetti tossici e di una diffusione ambientale ubiquitaria, i PCB sono stati inclusi nella Convenzione di Stoccolma sui POPs-UNEP POPs 2001 (UNEP, 2001) e nel Protocollo UNECE sui POPs, all'interno della Convenzione sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero, Long-Range Transboundary Air Pollution o LRTAP, 1998 (UNECE, 1998), i due principali strumenti regolatori attivati per ridurre o eliminare la presenza degli inquinanti organici persistenti (POP) nell'ambiente.

L'esposizione umana a questi inquinanti avviene essenzialmente per via alimentare e gli alimenti di origine animale sono responsabili di oltre il 90% dell'esposizione stessa. I PCB sono oggetto di analisi in matrici ambientali e umane da decine di anni, mentre l'individuazione e l'analisi dei PCB-OH è relativamente recente poiché è recente la scoperta dei loro effetti avversi sull'ambiente e sull'uomo.

La loro caratterizzazione tossicologica, sebbene ancora incompleta, ha dimostrato che questi composti sono in grado di alterare la fosforilazione ossidativa mitocondriale sia *in vivo* che *in vitro* su modelli di roditori (Ebner et al., 1987).

Brouwer e suoi collaboratori hanno inoltre dimostrato che alcuni PCB-OH, sia nell'uomo che negli animali, si legano con elevata affinità alla transtiretina (TTR), proteina trasportatrice che lega l'ormone tiroideo (tiroxina, T4). Alcuni PCB-OH hanno infatti un'affinità di legame dieci volte superiore alla tiroxina T4 per la transtiretina. Questa interazione può essere un importante fattore nel determinare la persistenza e gli alti livelli di questi metaboliti nel siero umano ed animale (Brouwer et al., 1986).

I dati che riguardano la presenza di PCB-OH nelle matrici alimentari, e nei prodotti ittici in particolare, sono molto scarsi. Con il presente studio è stato messo a punto un metodo analitico per la determinazione di PCB-OH in specie ittiche di interesse alimentare che è stato poi applicato alla determinazione dei PCB-OH in campioni di specie che rivestono un rilevante interesse per il consumatore, sia in termini nutrizionali, sia in termini di esposizione.

Le specie ittiche che sono state considerate nello studio sono state selezionate in base alla loro rilevanza da un punto di vista ambientale (ampia diffusione nel Mar Mediterraneo) e a considerazioni di tipo socio-economico (pescato molto produttivo).

Le specie selezionate per il presente studio sono specie che occupano un posto di rilievo nel pescato nazionale, quali l'orata e il branzino, il pesce spada, il tonno, la palamita, il tombarello e il salmone, perché, sia pur una specie non autoctona, è importante per il suo alto contenuto lipidico. Tale contenuto è determinante nell'accumulo di sostanze altamente lipofile come i PCB e la presenza in alte quantità dei precursori può rappresentare un ambiente molto favorevole alla formazione dei metaboliti PCB-OH.

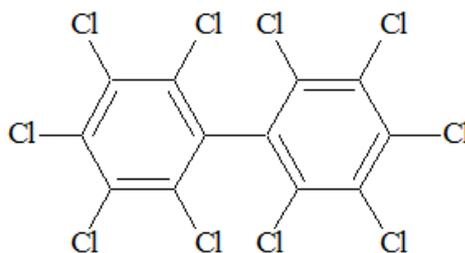
1. I Policlorobifenili (PCB)

1.1 Struttura e proprietà chimico-fisiche dei PCB

Con il termine bifenili policlorurati o policlorobifenili (PCB, $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ con n compreso tra 1 e 10) si designa una classe di idrocarburi clorurati usata dal 1930 per diversi scopi industriali, la cui produzione è stata interrotta negli anni '70. Sono stati prodotti generalmente in miscele complesse mediante clorurazione del bifenile con cloro gassoso in presenza di un catalizzatore (cloruro ferrico).

A seconda del numero e della posizione degli atomi di cloro (da 1 fino a 10) sui due anelli fenilici si possono avere 209 diverse molecole o "congeneri".

Figura 1: Struttura del decaclorobifenile



I PCB sono stati ampiamente usati a livello commerciale in miscele tecniche. La diversa percentuale di cloro determina anche un differente stato fisico di queste miscele, la cui densità aumenta all'aumentare del grado di clorurazione. La solubilità in acqua, generalmente molto bassa, diminuisce ulteriormente all'aumentare del grado di clorurazione passando da frazioni di mg/L per le miscele meno clorurate ad alcuni $\mu\text{g/L}$ per quelle con alto contenuto di cloro (WHO, 1993).

Le miscele commerciali dei PCB sono costituite da un elevato numero di congeneri, di solito 50–80 di cui solo una frazione minore in concentrazioni $>1\%$ in peso. Circa 80 dei 209 possibili congeneri risultano sistematicamente "assenti" ($<0,05\%$, p/p) nelle miscele più usate. Poiché la contaminazione delle matrici ambientali è di solito il risultato dell'esposizione a miscele di PCB diverse (con 20–30 componenti in concentrazioni $>1\%$ in peso), l'impronta di contaminazione dei PCB in tali matrici raramente è in grado di fornire indicazioni determinanti per l'individuazione delle sorgenti d'inquinamento (Schulz et al., 1989).

1.2 Presenza nell'ambiente dei Policlorobifenili

In conseguenza di un vasto impiego a livello industriale e commerciale, di un frequente improprio smaltimento e della loro elevata persistenza ambientale, i PCB sono ormai contaminanti ambientali ubiquitari. A causa della loro lipofilità (i valori di $\log K_{ow}$ per i 209 congeneri vanno da 4,46 a 8,18 (Hawker et al., 1988)), i PCB tendono a concentrarsi nei sedimenti, in particolare quelli marini, diventando quindi scarsamente disponibili alla degradazione fotochimica (Hansen, 1987, Safe, 1987). Dai sedimenti tali inquinanti possono contaminare i livelli bassi della catena trofica e salire lungo i livelli superiori fino ad arrivare all'uomo.

1.3 Tossicità Ambientale e Umana

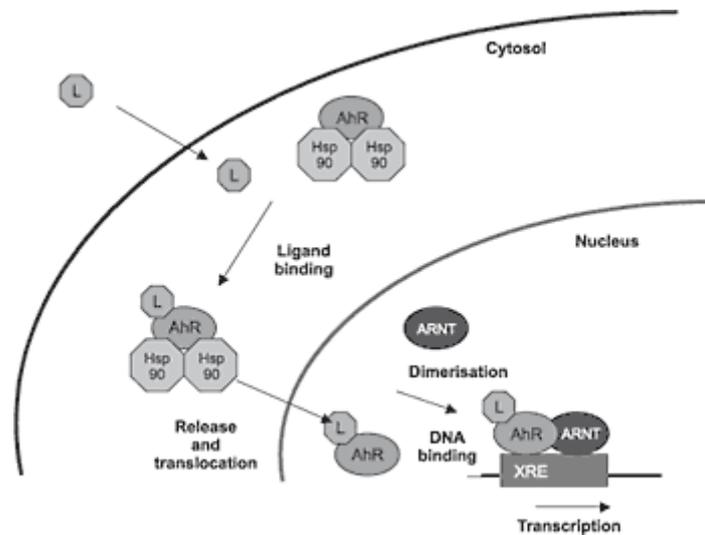
La tossicità dei PCB, dimostrata su animali di laboratorio e sull'uomo in seguito ad esposizione occupazionale e accidentale, si manifesta con disordini cutanei, perdita di peso, danni epatici, disfunzioni endocrine e riproduttive. Studi sulla cancerogenicità dei PCB su modelli animali hanno messo in evidenza il loro scarso potere genotossico; pertanto essi vengono considerati cancerogeni promotori piuttosto che iniziatori (Safe, 1987, WHO, 1993). Non è stata ancora trovata una chiara evidenza che l'esposizione ai livelli ambientali di PCB sia correlabile ad un aumento di rischio cancerogeno nell'uomo; la IARC (IARC, 1987) ha classificato i PCB come probabili cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2b) tranne il PCB 126 che è stato classificato come cancerogeno di Gruppo 1.

1.4 I PCB diossina-simili

La tossicità dei PCB è correlata alla struttura dei singoli congeneri: un interesse particolare da un punto di vista tossicologico è legato a quei PCB approssimativamente stereoisomeri della 2,3,7,8-T₄CDD (2,3,7,8 tetraclorodibenzodiossina), i cosiddetti PCB diossina-simili, i cui anelli fenilici possono disporsi sullo stesso piano in quanto le posizioni orto sono non-sostituite o sostituite con un atomo di cloro (PCB non orto o mono-ortosostituiti). A causa di tale struttura, l'azione tossica di questi congeneri è simile a quella della 2,3,7,8-T₄CDD, ma di minore intensità.

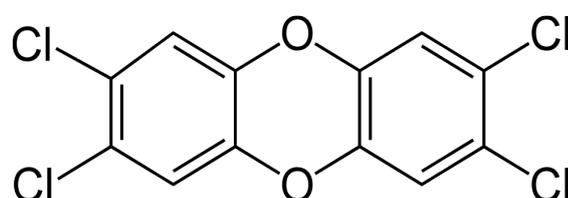
Gli effetti tossici diossina-simili, che si esplicano attraverso il legame al recettore aril-idrocarburico (AhR) (Figura 2), dipendono dall'abilità ad assumere una configurazione planare diossina-simile, possibile quando non vi è ingombro sterico in posizione orto (assenza di atomi di Cl o presenza di un solo Cl) (Casarett et al., 2003).

Figura 2: Legame del Recettore AhR con lo xenobiotico (Westwell, 2004)



Il rischio per la salute umana o animale derivante dall'esposizione a questo tipo di PCB viene dunque valutato sulla loro concentrazione totale espressa in equivalenti di tossicità (TEQ) alla 2,3,7,8-T₄CDD (Figura 3), calcolati moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun congenere per il corrispondente fattore di tossicità equivalente (TEF), così ottenendo la conversione del risultato analitico congenere-specifico in unità analitico-tossicologiche. Sommando i TEQ, si ottiene un solo dato che indica a quanta 2,3,7,8-T₄CDD equivalgano tutti i congeneri dosati. Questo approccio, basato sul comune meccanismo di azione dei PCB diossina-simili (DL-PCB) con PCDD e PCDF (policlorodibenzofurani), presuppone che gli effetti tossici dei singoli congeneri siano additivi.

Figura 3: Struttura della 2,3,7,8-T₄CDD



Tali fattori vengono attribuiti sulla base della conoscenza di parametri biochimici e tossicologici (come la capacità induttrice di enzimi specifici, la tossicità acuta, il potenziale cancerogeno, gli effetti sulla riproduzione). Valori di TEF sono stati determinati per i mammiferi e, più di recente, per uccelli e pesci; i TEF sono infatti specie-dipendenti (Giesy et al., 1998). Tra le varie scale di tossicità relativa esistenti, si può usare quella stabilita dal WHO nel 1998 (van den Berg et al., 1998) per PCDD, PCDF e PCB. Nel 2005 i valori di TEF per i 29 composti diossina simili sono stati rivalutati durante un incontro di un gruppo di esperti a Ginevra e i nuovi TEF pubblicati (van den Berg et al., 2006).

Tra gli effetti tossici specifici di diossine e DL-PCB c'è l'attività di distruttori endocrini, con alterazione dei livelli ormonali tiroidei, androgeni ed estrogeni (estrogenica e antiestrogenica). Questi effetti si manifestano per vari meccanismi: down-regulation del recettore per gli estrogeni (ER), interferenza tra il ligando e il recettore ER e/o l'induzione di mono-ossigenasi CYP-450 dipendenti coinvolti nel metabolismo dell'estradiolo. In particolare nel caso degli estrogeni questa tossicità si manifesta con disfunzioni riproduttive quali alterazione del *sex ratio* (rapporto dei sessi alterato nei nati da genitori esposti), ridotta fertilità o patologie estrogeno-correlate come l'endometriosi (Ahlborg et al., 1995, Mocarelli et al., 1996, Porpora et al., 2006, Porpora et al., 2009).

Un effetto tipico da tossicità acuta è la cloracne, sintomo più diffuso nelle contaminazioni accidentali, caratterizzato da proliferazione dell'epitelio follicolare delle ghiandole sebacee con infiammazione dei follicoli che si manifesta principalmente sulla pelle del viso (di Domenico et al., 1986).

1.5 I PCB non diossina-simili

Negli ultimi anni, sono stati condotti numerosi studi per caratterizzare l'attività tossicologica dei PCB non diossina-simili (NDL-non Dioxin Like), prevalenti nelle matrici ambientali ed alimentari. I PCB che fanno parte di questo gruppo non si legano al recettore AhR e non mostrano gli effetti tossici tipici dei congeneri Dioxin-Like. Per molti di questi congeneri è stata dimostrata attività immunotossica e la capacità di interferire con l'omeostasi endocrina. In particolare per alcuni congeneri è stata dimostrata *in vitro* e *in vivo* un'azione simil-estrogenica e tireostatica (COM, 2001).

I loro effetti tossici si manifestano soprattutto sul sistema nervoso in fase di sviluppo e sulle funzioni dei neurotrasmettitori. L'esposizione umana agli NDL-PCB avviene per più del 90% attraverso la dieta. Benché le concentrazioni di NDL-PCB negli alimenti siano gradatamente diminuite dall'epoca dell'introduzione della normativa ambientale sull'impiego e lo smaltimento dei PCB nell'Unione europea negli anni 1980, l'esposizione umana a questi composti è considerata ancora alta (EFSA, 2005).

Negli ultimi decenni i livelli di NDL-PCB riscontrati negli alimenti e nel latte materno sono diminuiti soprattutto in conseguenza delle misure ambientali introdotte negli anni '80, che ne proibivano l'uso nei prodotti di nuova fabbricazione. L'esposizione ai NDL PCB produce una serie di effetti avversi quali disturbi neurologici e dello sviluppo e deficit immunitari. Tuttavia, tali effetti sono indotti anche dai composti diossina simili, di gran lunga più potenti, che spesso coesistono con i NDL-PCB. È pertanto difficile determinare l'esatto contributo di questi ultimi. L'assunzione giornaliera media di NDL-PCB totali negli adulti in Europa si può stimare nell'ordine di 10-45 ng/kg di peso corporeo mentre nei bambini piccoli sono stati osservati valori più elevati. I pochi dati disponibili sull'esposizione dei bambini fino ai sei anni di età indicano un'assunzione media (escluso l'allattamento) di NDL-PCB totali di circa 27-50 ng/kg di peso corporeo per giorno. Tuttavia, laddove sono disponibili dati riferiti sia agli adulti sia ai bambini in una popolazione specifica, in generale si osservano nei bambini livelli di esposizione 2,5 volte superiori rispetto agli adulti (EFSA, 2005). In sottopopolazioni specifiche con elevata esposizione alimentare ai PCB, come i pescatori del mar Baltico, l'assunzione giornaliera tramite il pesce della somma dei sei NDL-PCB (che rappresentano circa il 50% degli NDL totali) può essere di circa 40 ng/kg di peso corporeo, corrispondente a un'assunzione di NDL-PCB totali di 80 ng/kg di peso corporeo al giorno, senza contare le altre componenti della dieta (EFSA, 2005).

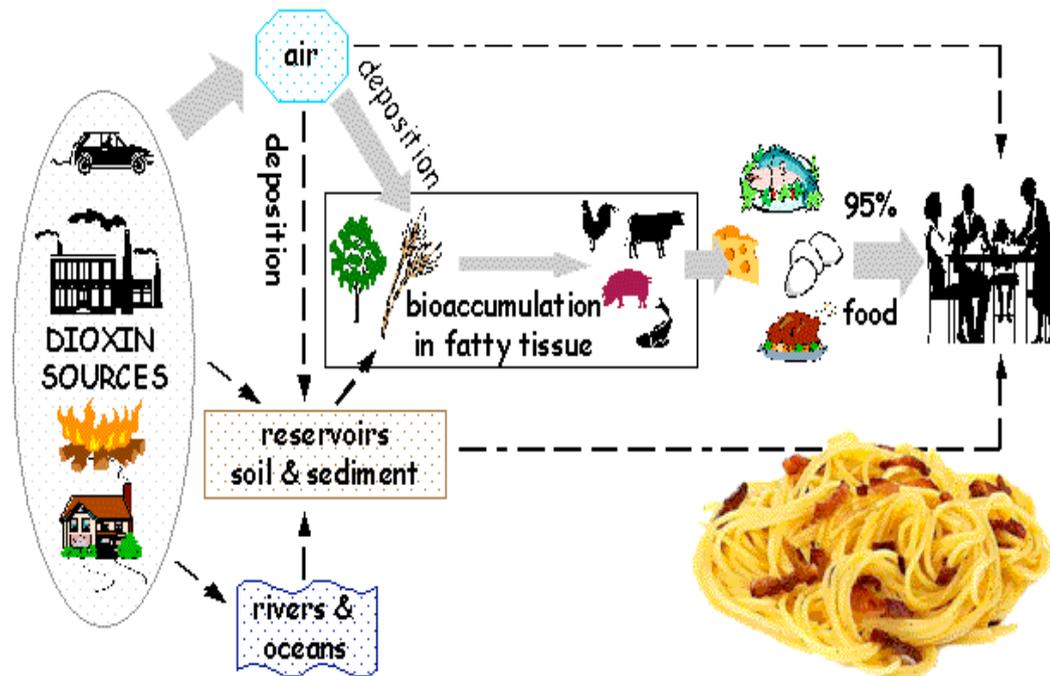
1.6 Esposizione Ambientale

1.6.1 Bioaccumulo e Biomagnificazione

Una volta immessi nell'ambiente, i PCB si legano essenzialmente alla frazione organica di suolo e sedimenti. Negli ambienti terrestri tendono quindi ad essere immobilizzati nel terreno, mentre negli ambienti acquatici hanno maggior mobilità, perché sono trasportati dalle correnti marine ed assorbiti dal particolato sospeso.

All'interno della catena alimentare si manifestano caratteristiche di bio-accumulo e bio-magnificazione; il bio-accumulo o accumulo biologico è il processo attraverso cui sostanze tossiche persistenti si accumulano all'interno di un organismo. Questo accumulo può avvenire attraverso qualsiasi via espositiva: respirazione, ingestione o semplice contatto, in relazione alle caratteristiche delle sostanze. La bio-magnificazione è invece il processo di bio-accumulo di sostanze tossiche e nocive negli esseri viventi con un aumento di concentrazione di queste sostanze all'interno degli organismi dal basso verso l'alto della piramide alimentare. Poiché gli organismi di un livello trofico più alto si nutrono di organismi di un livello trofico più basso, le concentrazioni delle sostanze di interesse aumentano attraverso i livelli trofici, raggiungendo nei tessuti degli organismi dei livelli trofici più alti valori di qualche ordine di grandezza più elevati di quelli riscontrati nell'ambiente (Oliver et al., 1988, Bayarri et al., 2001, EPA, 2000). Di seguito è riportata una immagine esplicativa della bio-magnificazione delle diossine la quale non si discosta molto da quella dei policlorobifenili (Figura 4).

Figura 4: La biomagnificazione *



* fonte:(<http://ilrisvegliodellacoscienza.blogspot.it/2011/02/diossine-la-loro-citotossicita.html>)

1.7 Rischio Ambientale

In genere la scoperta di una situazione di inquinamento ambientale deriva dall'osservazione dello stato di salute degli esseri viventi che ci vivono. Spesso questo si traduce in una diminuzione del numero degli individui di una comunità animale. Se non si osservano morie per effetti acuti di sostanze tossiche si pensa all'esistenza di inquinanti che possano aver danneggiato la capacità riproduttiva degli animali. I maggiori responsabili di ciò sono quei prodotti chimici che agiscono da interferenti ormonali. La Swedish Environmental Protection Agency riassume in una tabella (Tabella 1) alcune situazioni emblematiche osservate fino alla fine degli anni '90 e una possibile relazione con l'esposizione a sostanze definite Distruttori Endocrini o "Endocrine Disruptor Chemicals" il cui acronimo è EDCs (Olsson, 1998).

Tabella 1: Danni associati ad EDCs in animali selvatici (Olsson, 1998)

Animali		Effetti	Associazione con EDCs
Mammiferi	Pantere	Qualità dello sperma, Criptorchidismo	Probabile
	Visoni	Diminuzione della popolazione	Probabile
	Lontre	Disordini riproduttivi femminili	Si
	Foca	Iperplasia della corteccia surrenale	Si
Uccelli		Assottigliamento guscio delle uova	Si
		Embriotossicità / malformazioni	Si
		Malformazioni apparato riproduttivo	Probabile
		Comportamento riproduttivo	Probabile
Rettili	Alligatori	Pene piccolo, diminuzione dei livelli di testosterone	Probabile
Pesci		Produzione di vitellogenina	Si
		Mascolinizzazione	Probabile
		Diminuzione dei livelli di testosterone	Probabile
		Riduzione della grandezza dei testicoli	Probabile
Molluschi		Imposex	Si

Come si può notare in questa tabella, la maggior parte degli animali citati ha una frequentazione con ambienti acquatici. Questi bacini o corsi d'acqua sono spesso i siti di scarico e di raccolta per molti inquinanti, derivanti da scarichi industriali, urbani e acque di scolo provenienti da terreni agricoli trattati con pesticidi.

In particolare la contaminazione del pesce da contaminanti ambientali può riguardare sia il pescato che l'allevato. Il confronto fra i livelli di contaminanti riscontrati nel pesce è reso complicato dalle variazioni che possono essere indotte da parametri di varia natura fra cui la specie, l'età e la fase di vita del pesce, l'origine geografica e la stagione in cui il pesce è raccolto o pescato. Inoltre è generalmente accertato che la maggior parte dei contaminanti derivino dalla rete alimentare piuttosto che direttamente dall'acqua; giocano un ruolo rilevante sui livelli di accumulo di contaminanti anche l'ambiente e il sistema di allevamento. Riguardo al pescato, da un'ampia indagine condotta negli Stati Uniti negli anni '80, sono state individuate alcune aree marine all'interno delle quali i prodotti ittici presentavano livelli particolarmente elevati di metalli pesanti (arsenico, cadmio, mercurio, piombo, selenio) e contaminanti organici persistenti quali pesticidi organoclorurati, PCB, PCDD e PCDF e altri contaminanti derivanti dal loro diretto uso in acquacoltura. Da quest'indagine è risultato che i rischi di maggior rilievo per la salute dei consumatori erano i possibili danni al sistema riproduttivo dovuti all'esposizione a PCB e metilmercurio e il rischio cancerogeno dovuto a PCB, PCDD e PCDF, e pesticidi clorurati (Ferrara et al., 2004). Nel prodotto ittico di allevamento invece i contaminanti possono derivare dalla filiera produttiva e dal sito di allevamento. A questo proposito la letteratura scientifica internazionale ha talvolta evidenziato un maggior livello di contaminazione da inquinanti organici persistenti nel pesce di allevamento rispetto al pescato (Hites et al., 2004, Foran et al., 2005). In particolare un articolo pubblicato sulla rivista Science nel 2004 ha aperto un ampio dibattito in Europa e negli Stati Uniti sulla differenza nei livelli di contaminazione da contaminanti organoclorurati nel pesce selvatico e di allevamento e sui relativi rischi associati alla salute umana (Hites et al., 2004). Lo studio è stato condotto su circa 700 esemplari di salmone selvatico e allevato proveniente da vari paesi del mondo nei quali erano state determinate le concentrazioni di alcuni contaminanti organoclorurati (PCDD, PCDF, PCB e alcuni pesticidi).

Dai risultati delle analisi condotte è risultato che i livelli di contaminazione del salmone di allevamento erano significativamente più alti di quelli del salmone selvatico e che le concentrazioni più elevate erano state riscontrate nei salmoni di provenienza europea piuttosto che in quelli provenienti da America del Nord e del Sud. Quindi i modelli animali più studiati per evidenziare gli effetti di molti inquinanti sono i pesci e gli animali che vivono in quelle acque.

Uno studio del 2004 ha considerato le carpe (*Cyprinus Carpio*) del fiume Ebro in Spagna. Lungo il suo decorso il fiume ha raccolto inquinanti da zone industriali, zone agricole e acque di scolo cittadine. Esaminando le carpe catturate in corrispondenza di ogni sito inquinante e da una zona poco inquinata, si sono notate delle differenze che mostrano un diverso grado di danno, dovuto probabilmente ad interferenti ormonali disciolti nelle acque. Sono stati individuati aumenti dei livelli di vitellogenina nel plasma, in più della metà delle carpe maschio catturate vicino ad acque di scolo di coltivazioni trattate con pesticidi. Contemporaneamente, non si sono notati aumenti dei livelli endogeni di estradiolo circolante quindi questo fa pensare che ciò sia dovuto alla presenza di xenoestrogeni. Le carpe maschio delle zone inquinate hanno mostrato una diminuzione del testosterone plasmatico circolante; le carpe femmine delle zone inquinate invece una diminuzione dell'attività dell'aromatasi ovarica. La conseguente diminuzione nella produzione di estrogeni ha messo in evidenza come questi composti possono alterare significativamente il sistema endocrino delle Carpe del Fiume Ebro (Lavado et al., 2004). Sugli alligatori del lago Apopka in Florida invece, sono stati eseguiti diversi studi in cui si sono messi in evidenza i disordini riproduttivi di questi animali associandoli all'azione interferente ormonale causata dall'alta concentrazione di pesticidi nell'acqua (Guillette, 2000). Uno degli ultimi studi effettuati ha preso in considerazione la composizione ossea delle giovani femmine di alligatore di questo lago molto inquinato e le ha messe a confronto con quelle di altri alligatori femmine abitanti in un lago non inquinato. È stato così notato che questi animali catturati nel lago Apopka, hanno una densità minerale ossea di tibia e femore maggiore rispetto a quella delle stesse ossa degli alligatori femmina del lago Woodruff (lago presente in Florida ed a basso inquinamento).

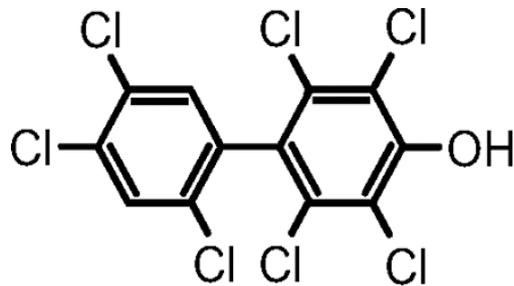
Questo fenomeno potrebbe essere associato all'alta presenza di xenoestrogeni nel lago inquinato che avrebbe interferito con il processo fisiologico di rimodellamento osseo portando ad un incremento della massa ossea di questi rettili (Lind et al., 2004).

2. I Policlorobifenili ossidrilati (PCB-OH)

2.1 I Policlorobifenili ossidrilati

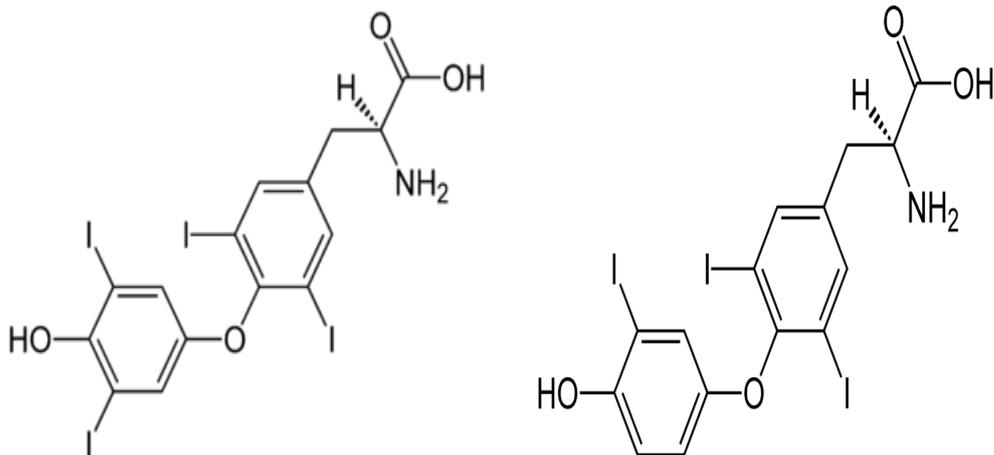
I policlorobifenili ossidrilati (PCB-OH) sono prodotti del metabolismo ossidativo dei PCB mediante una biotrasformazione di Fase I del citocromo P-450 (Yoshimura et al., 1987). I PCB-OH vengono escreti nell'uomo attraverso le feci e/o le urine e in parte sono trattenuti nel corpo. Nel siero umano e nel biota tali composti sono stati studiati solo negli ultimi 10-15 anni. La loro caratterizzazione tossicologica, sebbene ancora incompleta, ne ha dimostrato la capacità di alterare la fosforilazione ossidativa mitocondriale sia *in vivo* che *in vitro* su modelli di roditori (Ebner et al., 1987). La struttura chimica di alcuni dei PCB-OH è caratterizzata dal gruppo OH in posizione para con gli atomi di cloro in posizione adiacente, come il 4-OH-CB 109, il 4-OH-CB 146 e il 4-OH-CB 187 (Figura 5); questi 3 composti mostrano una struttura simile agli ormoni tiroidei (Tiroxina-T4, triiodotironina-T3, Figura 6) che hanno il gruppo OH in posizione para con gli atomi di iodio adiacenti.

Figura 5: Struttura chimica del 4-OH-CB 187



4-OH-CB187

Figura 6: Struttura chimica dell'ormone T4 e T3



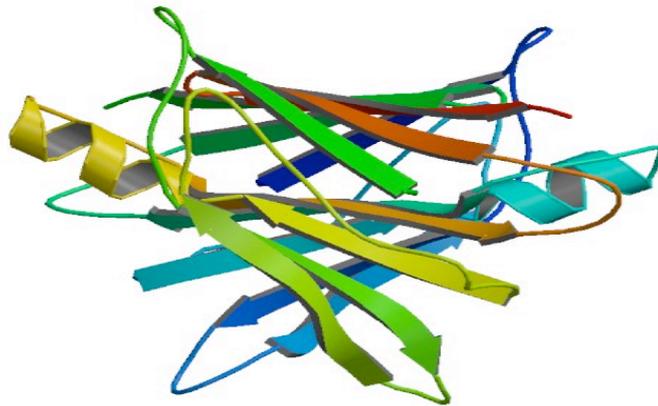
Tiroxina (T4)

Triiodotironina (T3)

Alcuni PCB-OH hanno un'affinità di legame dieci volte superiore alla tiroxina (T4) per la transtiretina. Questa interazione può essere un importante fattore nel determinarne la persistenza e gli alti livelli nel siero.

Brouwer e suoi collaboratori (Brouwer et al., 1986) hanno dimostrato come alcuni PCB-OH si leghino con elevata affinità alla transtiretina (TTR), una proteina trasportatrice che lega l'ormone tiroideo (T4). La TTR è un omotetramero di 55-kDa (Figura 7). Il peptide di base è composto da 127 peptidi legati in una struttura terziaria a foglietti beta. Due molecole identiche si legano e formano un dimero. La struttura quaternaria della molecola finale è rappresentata dall'assemblaggio di due dimeri identici con assetto speculare. La molecola è sintetizzata principalmente dal fegato, ma viene prodotta anche dai plessi corioidei e dall'epitelio pigmentato retinico (Hou et al., 2007).

Figura 7: La transtiretina*



* fonte: <http://cono-scienza.fisica.unipd.it/articoli.php?id=52>

2.2 Il citocromo P450

La famiglia del citocromo P450 è una superfamiglia enzimatica di emoproteine presente in tutti i domini dei viventi appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista (o monoossigenasi). I citocromi P450 sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo, essendo in grado di agire su un gran numero di differenti substrati, sia esogeni (farmaci e tossine di origine esterna) che endogeni (prodotti di scarto dell'organismo). Spesso prendono parte a complessi con funzione di catena di trasporto di elettroni, noti come sistemi contenenti P450. Esempi di reazioni catalizzate dal citocromo P450 sono l'ossidrilazione di composti alifatici o aromatici, la formazione di epossidi e l'ossidazione di alcoli. Il centro catalitico di reazione del citocromo P450 è il centro eme-tiolato, altamente conservato in tutte le isoforme conosciute, contenente un gruppo eme in cui un atomo di ferro è legato non covalentemente allo zolfo di un residuo cisteinico. Tale cisteina e diversi residui adiacenti sono altamente conservati nei CYP-450 conosciuti e presentano la seguente sequenza consenso [FW] - [SGNH] - x - [GD] - {F} - [RKHPT] - {P} - C - [LIVMFAP] - [GAD].

Il meccanismo di azione del citocromo è differente a seconda del tipo di reazione catalizzata, ma può essere schematicamente riassunto in sei fasi:

- 1) legame del substrato al citocromo P450
- 2) riduzione dell'atomo di ferro del gruppo eme con elettroni forniti da NADH o NADP(H)
- 3) legame dell'ossigeno molecolare al citocromo
- 4) trasferimento di un secondo elettrone
- 5) formazione di una molecola d'acqua
- 6) catalisi della specifica reazione

Lo studio e la caratterizzazione biochimica delle isoforme di citocromo P450 negli animali sono mirati principalmente a definire il loro tipo di risposta metabolica agli stress da xenobiotici, in modo da poterli utilizzare come organismi modello nelle sperimentazioni di nuovi farmaci e nella ecotossicologia (Brouwer et al., 1986).

2.3 Presenza dei PCB-OH nell'ecosistema

2.3.1 I PCB-OH nella fauna marina e terrestre

Nel secolo passato e nell'inizio dell'attuale il notevole incremento dello sviluppo industriale, commerciale ed agricolo, ed in generale di tutte le attività umane, ha portato come conseguenza ad un incremento dell'inquinamento delle aree interessate a tale sviluppo; l'inquinamento dell'ecosistema è caratterizzato in parte da una serie di contaminanti organici notevolmente persistenti nell'ambiente, i quali hanno un importante valore tossicologico perchè in grado di interferire negativamente con le funzionalità del sistema riproduttivo ed endocrino dell'uomo e dell'animale; tra questi ci sono i PCB-OH (Kroes et al., 2002, Kawano et al., 2005). I primi dati sulla presenza dei PCB-OH nella fauna sono stati ottenuti dalle feci di alcune specie di *Uria algae* e di *Halichoerus grypus* (foca grigia) a metà degli anni settanta (Jansson et al., 1975). Successivamente a quegli anni sono aumentati gli studi scientifici in cui si è indagata la presenza di questi inquinanti emergenti nella fauna e nella flora. A seguire una rassegna degli studi di letteratura più importanti:

- 1) Imaeda (Imaeda et al., 2009) e i suoi collaboratori nel 2005 hanno individuato residui di PCB-OH nel sangue di foche (*Pusa sibirica*) del lago Baikal in Russia. Sono state trovate concentrazioni di PCB-OH nel *range* di concentrazioni di 0,71-4,6 ng/g (di base grassa) e questi livelli confrontati con i livelli dei PCB parenti (6,4-130 ng/g di base grassa). Le concentrazioni di PCB-OH determinate sono risultate di 1-2 ordini di grandezza inferiori a quelle dei PCB; inoltre l'80% dei PCB-OH trovati sono risultati congeneri ad alto contenuto di cloro.
- 2) Tampal e collaboratori si sono invece concentrati sulla determinazione del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (K_{ow}) come indice della tendenza dei PCB-OH con 1-7 atomi di cloro di accumularsi nei tessuti grassi degli organismi viventi e quindi di ripartirsi tra una fase acquosa e una fase organica. I risultati hanno indicato che i congeneri con un numero più alto di atomi di cloro hanno un valore più alto di K_{ow} rispetto ai basso clorurati.

Ad elevati valori di K_{ow} si ha una maggiore tendenza del composto a ripartirsi nelle fasi organiche e ad entrare nella catena alimentare; il K_{ow} dell'eptaclorobifenile ossidrilato è risultato di un valore pari a 6, un ordine di grandezza inferiore rispetto al PCB precursore (Tampal et al., 2002, Mackay et al., 1992). Nonostante il valore di K_{ow} trovato sia risultato di un ordine di grandezza più basso rispetto a quello del PCB, Tampal ha dimostrato che questi inquinanti sono in grado non solo di accumularsi nelle acque, ma anche di essere successivamente trasferiti agli organismi acquatici.

In altri studi di letteratura si è focalizzata l'attenzione sulla ricerca dei congeneri dei PCB-OH più presenti nella fauna marina e terrestre; è stato dimostrato come il 4OH-CB 187 è il congenere che si trova con maggiore frequenza negli uccelli e negli orsi polari (Klasson-Wehler et al., 1998, Olsson et al., 2000, Berger et al., 2004, Sandau et al., 2000, Sandala et al., 2004), mentre il 4OH-CB 146 è risultato dominante negli uccelli marini del Nord Oceano Pacifico (Klasson-Wehler et al., 1998).

3) Ochiai (Ochiai et al., 2011) ha investigato la presenza dei PCB e dei PCB-OH nel sangue di piccoli cetacei catturati lungo le coste giapponesi. Ha preso in esame 3 diverse tipologie di cetacei e ha notato come le concentrazioni di PCB-OH differiscano nei tre esemplari: 61 pg/g di base grassa nel primo esemplare, 23 pg/g di base grassa nel secondo esemplare e 14 pg/g di base grassa nel terzo. E' stata anche studiata la possibile correlazione tra le concentrazioni dei PCB e dei loro metaboliti trovando un valore positivo ($r = 0,62$, $p < 0,001$); tale dato ha suggerito un'induzione del sistema enzimatico del CYP-450 nel metabolizzare i PCB in PCB-OH.

4) Park et al. (Park et al., 2009) ha studiato la presenza di questi inquinanti negli uccelli selvatici californiani. Ha analizzato il sangue del gheppio, le uova del falco pellegrino e tessuti di piccoli pulcini morti. I PCB e i loro metaboliti sono stati determinati rispettivamente usando l' HRGC-HRMS e il GC-NCI/MS. La sommatoria di 16 congeneri di PCB è risultata essere di 6,53-45,4 ng/g di base grassa mentre sono state trovate concentrazioni di PCB-OH <5% rispetto ai PCB parenti. Nelle uova (*range* 5,72-8,65 ng/g di base fresca) e nel tessuto del pulcini (20,9 ng/g di base fresca) sono state trovate concentrazioni molto più alte di PCB-OH. Tuttavia tali concentrazioni non sono state verificate in nessun altro studio di letteratura.

2.3.2 I PCB-OH nelle acque e nei sedimenti

I PCB-OH sono stati determinati anche nell'acqua e nei sedimenti (Darling et al., 2004, Sakiyama et al., 2004). In particolare sono stati ritrovati diversi congeneri nei sedimenti della Baia di Osaka, in particolar modo i congeneri basso clorurati come riportato di seguito (Tabella 2).

Tabella 2: PCB-OH in campioni di sedimenti della Baia di Osaka, Giappone
(Sakiyama et al., 2004)

5'-OH-CB18 3'-OH-CB42 5'-OH-CB17 3-OH-CB68 3'-OH-CB18 4'-OH-CB49
3'-OH-CB17 2'-OH-CB79 2'-OH-CB35 4'-OH-CB68 4'-OH-CB25 4'-OH-CB44
5'-OH-CB33 4'-OH-CB72 4-OH-CB39 4-OH-CB72 3'-OH-CB33 6'-OH-CB26
4'-OH-CB18 3-OH-CB28 5-OH-CB25 4-OH-CB26 5-OH-CB28
4-OH-CB31 4'-OH-CB26 4'-OH-CB33 4'-OH-CB20 4'-OH-CB35

Dagli studi di letteratura disponibili risulta chiaro che i PCB-OH basso clorurati si trovano principalmente nelle matrici ambientali (acqua e sedimenti), anche se i dati riguardanti queste matrici sono ridotti, mentre quelli alto clorurati negli organismi appartenenti ai livelli più alti della catena alimentare come uccelli e mammiferi. Questo ha fatto supporre che i PCB-OH basso clorurati si formino facilmente dai PCB parenti attraverso i microorganismi presenti nei sedimenti ambientali (Flanagan et al., 1993). In conseguenza di ciò alcuni di questi congeneri vengono disciolti nell'acqua e accumulati successivamente negli organismi acquatici come i pesci.

2.4 Studi di eco-tossicità dei PCB-OH

Diverse specie animali sono state utilizzate per lo studio della tossicità dei PCB-OH. Essendo composti presenti nella catena alimentare e nell'ecosistema risulta importante indagare sulla loro tossicità e sugli effetti dannosi che un'esposizione a questi inquinanti può provocare; tra gli studi più rilevanti sono stati scelti quelli che di seguito sono descritti:

1. Andersson (Andersson et al., 1999) ha studiato come i PCB e i PCB-OH possano interferire sull'attività estrogenica di una linea cellulare tumorale (MCF-7) e su delle colture primarie di epatociti di trote (*Oncorhynchus mykiss*). Per quanto riguarda le cellule tumorali ha notato come i PCB incrementino in modo significativo la proliferazione delle cellule MCF-7 (linea di cellule del tumore alla mammella); per quanto riguarda i PCB-OH nelle colture di epatociti di trote questi hanno mostrato un'attività molto più alta dei loro corrispettivi PCB; in particolar modo sono stati in grado di incrementare la sintesi della vitellogenina.
2. Anderson (Anderson et al., 1996) ha studiato come il CYP1A1 nel fegato dei pesci sia un buon marcatore della tossicità dei composti organici persistenti e in modo dettagliato dei PCB e dei PCB-OH.
3. Loomis (Loomis et al., 1999) si è concentrato invece sull'affinità di legame tra il recettore estrogenico nel citosol e nel nucleo di alcune frazioni testicolari e alcuni xenobiotici, come i PCB-OH nel *Micropogonias undulatus* (specie di ombrina). Valutando i dati ottenuti ha notato come i PCB-OH e altre sostanze (DDT, micotossine, kepone) abbiano una affinità di legame molto forte per il recettore estrogenico (ER) tanto da provocare danni a livello della riproduzione.

Altri studi sono stati condotti invece sui mammiferi e vengono riportati qui di seguito:

4. Meerts (Meerts et al., 2004) ha confrontato l'effetto tossico prodotto dal 4-OHCB 107 e quello di un mix di PCB nei ratti femmina gestanti. Questi sono stati esposti rispettivamente a 0,5 e 5 mg di 4-OHCB107 e mix di PCB per kg di peso corporeo nel periodo gestazionale 10-16 giorni. Ha notato come i livelli di ormoni tiroidei nel plasma delle gestanti dopo il parto sia rimasto invariato, mentre l'analisi nel plasma di maschi e femmine nati da soli 4 giorni è risultato al di sotto della norma.

Meerts ha notato anche che l'esposizione delle gestanti a un mix di PCB e dei loro metaboliti può provocare effetti avversi nei livelli dei neurotrasmettitori e nello sviluppo cerebrale dei nascituri.

5. Buitenhuis (Buitenhuis et al., 2006) si è focalizzato sull'esposizione pre-natale dei ratti a diversi PCB-OH. Ha notato come l'esposizione a questi inquinanti può influire sul nascituro, avendo questi composti la capacità di attraversare la placenta. Tuttavia non sono stati notati effetti teratogeni, perché le concentrazioni utilizzate nell'esposizione non sono state tali da provocare tale effetto.

Si è notato invece come in particolar modo l'esposizione al 4-OH CB 107 e il 4-OH CB 187 abbia provocato un acceleramento negli effetti avversi del ciclo estrale delle femmine di ratto.

La presenza di alcuni studi in *vitro* e pochi in *vivo* sulla tossicità dei PCB e dei loro metaboliti conferma la necessità di trovare dei metodi analitici efficaci nella loro determinazione così da poter studiare il loro effetto tossico sull'uomo e sugli animali.

2.5 Studi su siero umano

I dati relativi a studi sull'analisi e determinazione dei PCB-OH sono scarsi in letteratura. Tuttavia per quanto riguarda gli studi sulla determinazione di questi analiti nel siero umano i dati risultano più numerosi. In uno studio del 2010 sono stati analizzati e caratterizzati i livelli di PCB e PCB-OH e i livelli di T3 e di T4 nel siero e nel tessuto adiposo di donne giapponesi. Le concentrazioni della sommatoria di 90 congeneri di PCB-OH nel siero sono risultate di 630 pg/g di base fresca e 140 pg/g di base grassa mentre quelle nel tessuto adiposo di 4-5 volte più basse di quelle del siero. I valori di T3 e T4 sono state rispettivamente di 1,3 ng/g di base fresca e 62 ng/g sempre di base fresca. Gli isomeri dei PCB-OH più presenti nel siero sono stati il 4'-OH-CB101/120, 4-OH-CB 107/4'-OH-CB 108, 3'-OH-CB 138, 4-OH-CB 146, 3-OH-CB 153, 4'-OH-CB 172. Lo studio tuttavia non ha dimostrato una correlazione tra i livelli di PCB-OH e di ormoni tiroidei nel siero ($p < 0,05$) (Nomiya et al., 2010).

Nel 2008 scienziati americani hanno studiato una coorte (tra il 1959 e il 1967) di 20.000 donne in stato di gravidanza per vedere una possibile associazione tra i livelli dei contaminanti organici persistenti e la funzione tiroidea. I livelli materni di sommatoria dei PCB e sommatoria di PCB-OH trovati sono stati compresi nel *range* 0,74-7,99 ng/mL di base fresca con una mediana di 3,05 ng/mL per i PCB e da 0,12 a 0,98 ng/mL con una mediana di 0,39 per i PCB-OH. I metaboliti dei PCB più presenti nel siero sono risultati essere il 4-OH CB187 e il 4-OH CB107. Entrambi questi analiti interferiscono con il sistema tiroideo in esperimenti *in vitro* sia su animali che sull'uomo (Park et al., 2008).

Un altro studio riguardante l'analisi e la determinazione dei PCB-OH nel siero umano risale al 2000 ed è stato condotto da Sandau (Sandau et al., 2000). Questo studio ha previsto l'analisi di campioni ematici di 13 uomini e 17 donne provenienti dal Nord del Quebec, Canada. La concentrazione totale di PCB-OH nel sangue è stata individuata nel *range* 0,117-11,6 ng/g di base fresca. Queste concentrazioni sono state paragonate con quelle della popolazione del Sud del Quebec per le quali erano già disponibili dati analoghi. Il risultato è stato che le concentrazioni dei PCB-OH rilevate nei cittadini del Nord del Quebec sono risultate 70 volte superiori rispetto a quelle determinate nello studio precedente nei cittadini del Sud del Quebec. Nonostante il dato rilevante le concentrazioni individuate in tale studio non trovano riscontri con altri studi presenti in letteratura.

Fängström e collaboratori nel 2002 hanno condotto uno studio sul siero di donne incinte che vivevano nelle Isole Fær Øer le quali differivano per il regime alimentare rispetto alla popolazione generale. Alte concentrazioni di PCB-OH e PCB sono state trovate in parte della popolazione oggetto di studio. È stato trovato che l'intervallo di concentrazioni tra i livelli bassi e quelli alti era molto ampio (19-1800 ng/g di base grassa per quanto riguarda i PCB-OH e 150-22.000 ng/g di base grassa per i PCB). I PCB-OH più presenti nei campioni sono risultati essere i 4-OH-CB107, 3-OH-CB153, 3'-OH-CB 138 e 4-OH-CB187. Dallo studio è emerso che l'esposizione a tali inquinanti non dipende esclusivamente dalla zona geografica come ad esempio la zona del Mar Baltico o dei Grandi Laghi Usa ma anche e a volte soprattutto dalle abitudini alimentari, essendo paesi in cui il consumo di specie ittiche ad alto contenuto lipidico è molto diffuso (Fängström et al., 2002).

Dirtu e collaboratori (Dirtu et al., 2010) hanno reso noti i risultati dei loro studi nel 2010. Il lavoro ha riguardato campioni di siero umano campionati tra dicembre 2006 e gennaio 2007. Hanno investigato sui livelli e i profili di PCB e PCB-OH in due gruppi di popolazione (Belgi e Rumeni) con diversi livelli di inquinamento. Non hanno trovato una differenza significativa tra i livelli della somma di PCB misurati in entrambi i set di campioni, con una concentrazione media di 3100 pg/mL per i campioni rumeni (n=53) e 3380 pg/mL per i campioni belgi (n = 22). Per quanto riguarda invece la concentrazione media della somma dei PCB-OH nei Belgi, è risultata esserci una concentrazione di quasi il doppio (310 pg/mL) rispetto a quella dei rumeni (175 pg/mL).

Il contributo maggiore, per quanto riguarda i PCB-OH nei campioni Belgi è stato dato da il 4OH-CB107>4OH-CB146>4OH-CB187 (il 76% della somma dei PCB-OH) mentre il contributo maggiore per i campioni rumeni è stato dato da il 4OH-CB187>4OH-CB146>3'OH-CB138 (il 66% della somma dei PCB-OH nei campioni rumeni).

2.6 Studi su siero di pesce

Gli studi sul siero di pesce risultano in letteratura molto scarsi.

Nel 2003 Campbell e i suoi collaboratori hanno studiato la presenza di contaminanti organici persistenti come i PCB-OH nel siero di trote (*Salvelinus Namaycush*) della regione dei Grandi Laghi del Nord America.

Tra i contaminanti ossidrilati il più presente ed abbondante è risultato essere il 4-OH CB 187, analita riscontrato in specie ittiche di altri studi e anche nei vertebrati di differenti ecosistemi. Un altro gruppo di ossidrilati altrettanto importanti presenti nel lago sono risultati essere il 4'-OH-CB 199, 4'-OH-CB 208, 4,4'-OH-CB 202. La presenza di questi contaminanti altamente clorurati è risultata strana ed inaspettata, perché normalmente le trote, e in generale i pesci, hanno una bassa capacità di biotrasformare i PCB ad alta clorurazione (Campbell et al., 2003). Questo ha fatto supporre che i composti venissero bioaccumulati attraverso la catena alimentare e non formati nel pesce tramite biotrasformazione.

Un esempio di bioaccumulo attraverso l'ambiente di PCB-OH con 8-9 atomi di cloro è stato trovato esclusivamente nella carpa comune del fiume di Detroit dovuto principalmente a un'assunzione attraverso la dieta di cibo contaminato da questi analiti. Vista la scarsità di dati in letteratura, alcuni studiosi hanno approcciato un metodo diverso per individuare e studiare i policlorobifenili ossidrilati.

Buckman e collaboratori hanno analizzato delle trote di circa 80g e le hanno esposte ad una dieta a base di mix di PCB (Buckman et al., 2006). Dopo circa 30 giorni dall'esposizione a PCB nel siero sono stati trovati 8 PCB-OH.

I PCB-OH non sono stati trovati (il limite di determinazione = 0,02 pg/g) nel cibo e nel siero dei pesci di controllo, questo a dimostrazione del fatto che le trote possono biotrasformare in PCB-OH un numero consistente di PCB anche se in misura minore rispetto agli uccelli o ai mammiferi. Il meccanismo di biotrasformazione risulta comunque comune a tutte le specie e dipende dal numero di clori sostituiti.

Kunisue ha svolto uno studio sulla presenza di PCB-OH nel sangue di mammiferi e uccelli in Giappone (Kunisue et al., 2009). Sono stati identificati solo alcuni di questi analiti, come il 4OH-CB 101/120, 4OH-CB 107/4OH-CB 108, 4OH-CB 146, 4OH-CB 178, 4OH-CB 187, 4'OH-CB 172, 4OH-CB 202, e 4'OH-CB 199.

Sono state trovate più alte concentrazioni di PCB-OH nelle specie animali rispetto agli umani; i livelli di PCB-OH nel cane e nel procione sono risultati di un ordine di grandezza superiore a quello degli esseri umani.

Sono state osservate anche quantità elevate di tri-e tetra-cloro PCB-OH nel sangue del gatto e octaclorurati PCB-OH nel cane e nel sangue di cani procione.

Questi risultati hanno fatto dedurre che alcuni animali in particolare specie di felini e canidi come il cane e il cane procione, possono essere più facilmente suscettibili all'azione dei PCB-OH.

Gli studi su pesci tuttavia risultano essere pochi soprattutto per la difficoltà nel prelevare quantità elevate di siero, visto il basso contenuto di questo in specie di interesse alimentare, e per l'utilizzo di un metodo lungo e poco economico.

3. Scopo della Tesi e selezione dei metaboliti dei PCB per la messa a punto del metodo analitico

3.1 Scopo della tesi e selezione dei PCB e dei PCB-OH

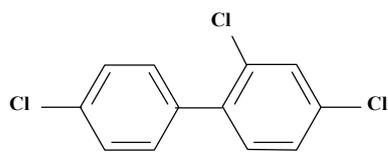
Il presente studio si è posto l'obiettivo di mettere a punto un metodo analitico per la determinazione di PCB-OH in specie ittiche di interesse alimentare e di applicare tale metodo alla determinazione dei PCB-OH in campioni di pescato; infatti la pesca può essere riconosciuta quale settore di rilevante importanza dal punto di vista socio-ambientale.

E' risultato importante soddisfare questo obiettivo perché, nonostante la tossicità accertata o presunta di queste sostanze in letteratura, non sono presenti molti studi sulla determinazione dei policlorobifenili ossidrilati in specie ittiche di largo consumo alimentare come quelle prese in esame.

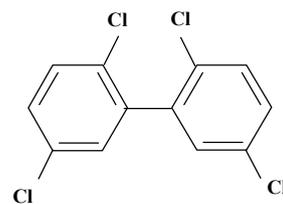
Nella figura 8 sono riportate le formule di struttura dei PCB parenti ricercati nella presente tesi e l'elenco dei rispettivi metaboliti. La scelta dei policlorobifenili ossidrilati è stata fatta in base ai dati di letteratura disponibili sulla loro tossicità e sulla presenza ambientale (in particolare nei prodotti ittici (MAFF, 1999)) loro o dei loro PCB precursori: sono stati selezionati i PCB-OH più tossici e più diffusi nell'ambiente o metaboliti dei PCB più diffusi nell'ambiente. In base ai criteri di selezione sopra citati sono stati selezionati i PCB-OH riportati in Tabella 3 accanto ai PCB precursori che pure sono stati oggetto di studio.

Anche i PCB selezionati hanno un significato espositivo importante in quanto per la maggior parte fanno parte del gruppo dei PCB definiti come "indicatori" (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180) perché correntemente usati per stimare il contenuto in PCB di una matrice ambientale-alimentare. Sono stati inoltre analizzati anche il PCB 118 (PCB ad attività diossina-simile) e il PCB 187.

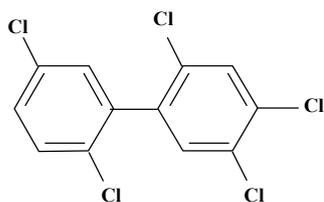
Figura 8: Struttura dei "PCB indicatori" e del PCB 118



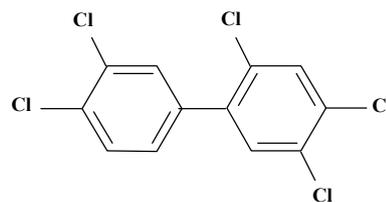
2,4,4'-trichlorodifenile (PCB 28)



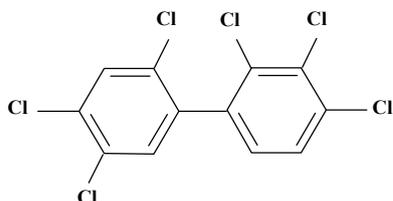
2,2',5,5'-tetrachlorodifenile (PCB 52)



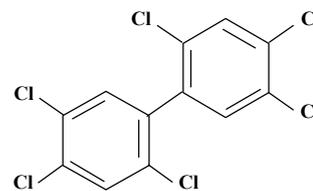
2,2',4,5,5'-pentachlorodifenile (PCB 101)



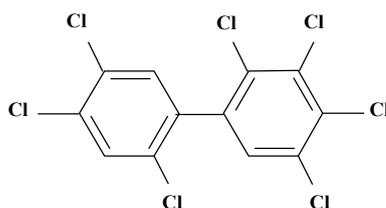
2,3',4,4',5-pentachlorodifenile (PCB 118)



2,2',3,4,4',5'-esaclorodifenile (PCB 138)

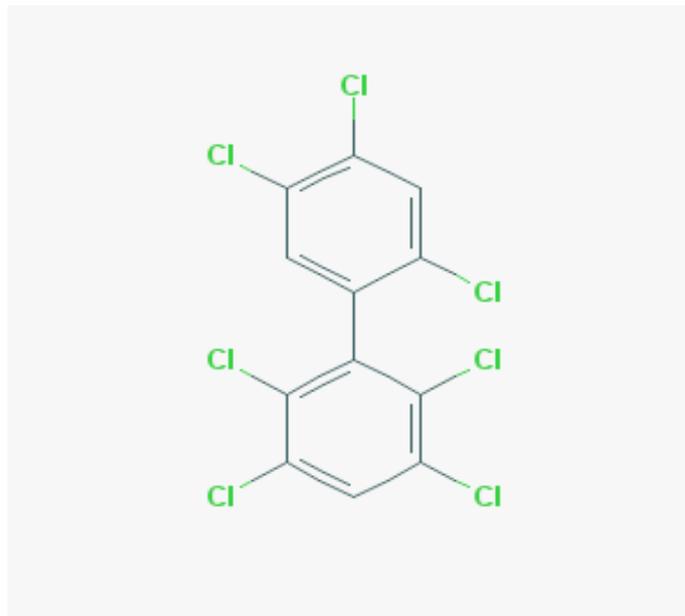


2,2',4,4',5,5'-esaclorodifenile (PCB 153)



2,2',3,4,4',5,5'-eptachlorodifenile (PCB 180)

Figura 9: struttura chimica del PCB 187



2,2',3,4',5,5',6-eptachlorobifenile (PCB 187)

Tabella 3: Elenco dei PCB e dei loro metaboliti (PCB-OH)

PCB	PCB-OH
PCB-118	4-OH CB107
PCB-138	4-OH CB146
PCB-138	3'-OH CB138
PCB-153	4-OH CB146
PCB-180	4'-OH CB172
PCB-187	4-OH CB187

4. Materiali

4.1 Materiali

I materiali utilizzati nella messa a punto del metodo vengono riportati di seguito:

- Siero Umano
- Siero ittico (salmone, orata, branzino, tonno, spada, palamita, tombarello)
- Provette in teflon da 45 mL
- Pipette pasteur
- Tettarelle
- Etichette di carta
- Vials a fondo conico da 8 mL
- Vials da iniezione 1 mL
- Esano $\geq 95\%$ di purezza
- N - Methyl tert buthil Etere (MTBE)
- Alcool isopropilico
- Acido Cloridico al 37%
- Acido Solforico al 96%
- N-methyl-n- nitroso urea
- Idrossido di Potassio
- Acqua per HPLC
- Dietil Etere
- Standard ^{12}C e ^{13}C PCB-OH

4.1.1 Siero Umano

Le prove preliminari per verificare l'efficacia del metodo sono state effettuate su siero umano presente nel laboratorio di ricerca.

4.1.2 Siero ittico

Il siero di pesce utilizzato per la messa a punto del metodo è stato acquistato dalla ditta US Biological (US Biological). Tale siero proviene da salmoni allevati.

Come campioni reali sono stati usati sieri di orate e branzini provenienti da allevamenti della zona di Monfalcone e dalla laguna di Orbetello e campioni di pesce spada, palamita, tonno, tombarello (pesce pescato) di tre zone italiane (Porto Palo, Bagnara Calabria e Monopoli).

I Sieri dei campioni di orate e branzini, sono stati ottenuti attraverso lo stordimento del pesce e il prelievo di sangue dalla vena cava, seguendo come procedura le linee guida redatte dall'EFSA (EFSA, 2004). I sieri di tonno, palamita, spada e tombarello erano disponibili in laboratorio, in quanto prelevati per uno studio immunologico svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità.

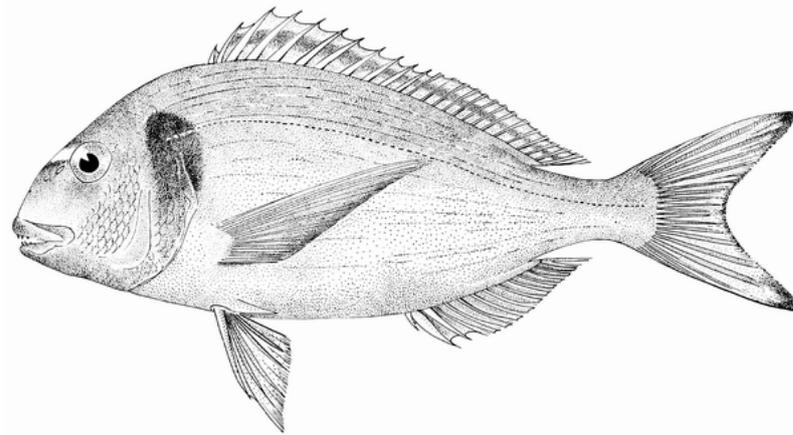
Di seguito vengono riportate le caratteristiche principali di queste specie di pesci.

4.2 Specie ittiche studiate

4.2.1 Sparus Aurata

La *Sparus Aurata* è stata scelta per la sua posizione rilevante nel panorama dell'acquacoltura italiana e mediterranea e l'alto contenuto lipidico (>4%) della sua parte edibile (Figura 10).

Figura 10: *Sparus Aurata*



E' infatti la specie marina più allevata in Italia e una delle cinque specie più prodotte in assoluto (EC, 2008). Uno dei criteri di selezione è stato l'alto contenuto lipidico. Questo fattore è di particolare rilevanza nell'ambito dei contaminanti di interesse in quanto i PCB parenti dei PCB-OH sono molto lipofili e si accumulano prevalentemente nei tessuti grassi raggiungendo le concentrazioni più elevate nelle specie acquatiche più ricche in grassi. L'orata è presente in tutto il bacino del Mar Mediterraneo e nell'Atlantico orientale, dall'estremo sud delle isole Britanniche a Capo Verde.

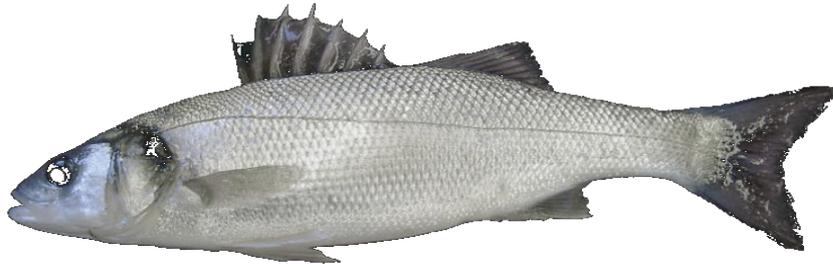
È un pesce strettamente costiero e vive tra i 5 e i 150 m dalla costa; frequenta sia fondali duri che sabbiosi, è particolarmente diffuso al confine fra i due substrati. Normalmente conduce una vita solitaria o a piccoli gruppi ed è molto comune nei mari italiani. La lunghezza massima dell'orata è di 70 cm; può raggiungere un peso di 10 kg circa.

La dieta prevalentemente carnivora della *Sparus Aurata* la rende un ottimo candidato per questo studio, per la capacità dei contaminanti organici persistenti di bio-accumulare lungo la rete trofica.

4.2.2 *Dicentrarchus Labrax*

Il *Dicentrarchus labrax*, detto spigola o branzino (prevalentemente nelle regioni italiane settentrionali) è un pesce marino della famiglia delle *Moronidae* (Figura 11).

Figura 11: *Dicentrarchus Labrax*



Vive nelle acque temperate del Mediterraneo, Mar Nero e Atlantico orientale. Lo si può trovare su qualsiasi tipo di fondale, da quelli rocciosi alle praterie di *Posidonia oceanica*. Ben tollerante ai cambiamenti di salinità è in grado di risalire i fiumi per parecchi chilometri in cerca delle proprie prede. Le dimensioni medie si aggirano tra i 45-60 cm, ma un individuo adulto può raggiungere e superare il metro e mezzo di lunghezza e i 15 kg di peso. La spigola è stato il primo pesce non della specie dei salmoni ad essere commercializzato in Europa e attualmente è il pesce più importante coltivato nelle aree mediterranee.

4.2.3 I Salmonidi

I *Salmonidi* sono un'importante famiglia di pesci, appartenente all'ordine *Salmoniformes*, a cui appartengono pesci come la trota e il salmone. Questi pesci sono presenti in tutto l'emisfero boreale, nelle zone temperate e fredde e fino alle zone polari, sia nei mari che nei fiumi e laghi. Sono stati largamente introdotti in tutte le parti del mondo con caratteristiche climatiche idonee. I salmonidi non sono sensibili alle basse temperature mentre le alte li possono uccidere, per questo nelle regioni meridionali d'Europa, Asia ed America settentrionale li ritroviamo solo nelle zone montane. È simile alla trota di mare da cui si riconosce però a prima vista per la bocca assai più grande che raggiunge l'occhio. Raggiunge 1,5 metri di lunghezza ed un peso di alcune decine di chilogrammi (Figura 12). Si tratta di un vorace predatore che in mare si ciba principalmente di pesci e di crostacei. Questi pesci sono anche molto sensibili alla carenza di ossigeno nell'acqua e, di conseguenza, all'inquinamento della stessa.

Figura 12: Un Salmonide



4.2.4 Thunnus

E' un genere della famiglia *Scombridae* che raggruppa 8 specie di grandi pesci pelagici predatori, conosciuti comunemente come tonni. Adattati al nuoto veloce, i tonni hanno un corpo allungato ed idrodinamico. La pinna dorsale e quella anale sono alte e robuste, posizionate nella seconda metà del corpo. Le pettorali sono potenti, le anali sono piccole. Dopo la pinna dorsale e quella anale sono presenti alcune pinnette stabilizzatrici (circa 7-10 per parte). La livrea è grigio argentea, con riflessi blu o neri. Le dimensioni sono elevate: si va da circa 1 metro del *Thunnus atlanticus* ai 4,5 metri del *Thunnus thynnus*.

Alcune specie sono a "sangue caldo", caratteristica rara tra i pesci (Figura 13)

Figura 13: *Thunnus*



4.2.5 Sarda Sarda

E' un pesce molto diffuso nel mar Mediterraneo, nel mar Nero e nell'oceano Atlantico. E' un pesce dalle abitudini nettamente pelagiche; si può trovare sia in alto mare che in acque costiere. E' frequente imbattersi in banchi numerosi di questi pesci predatori anche nel sotto costa, ma solo quando le condizioni metereologiche e marine lo consentono.

E' un pesce dal corpo fusiforme, molto idrodinamico. Arriva a misurare 80 cm per 10 kg di peso. E' una specie prettamente carnivora e si ciba principalmente di piccoli pesci come acciughe e sardine (Figura 14).

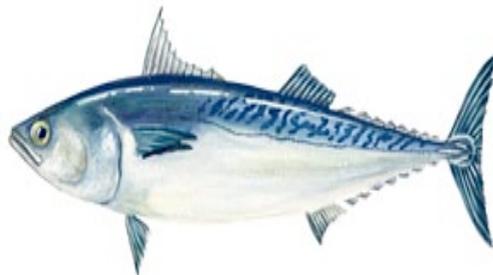
Figura 14: *Sarda Sarda*



4.2.6 Auxis thazard thazard

E' considerato un pesce cosmopolita; è molto presente lungo le coste europee e del Mar Mediterraneo e fino alla Manica. Ha una conformazione simile al tonno, ma si distingue da questo per le dimensioni che non superano il mezzo metro e il peso che non supera i 2 Kg. E' considerato un tipico predatore di aringhe e sardine (Figura 15).

Figura 15: *Auxis thazard thazard*



4.2.7 *Xipias gladius*

E' un pesce molto presente nelle zone tropicali, subtropicali e temperate di tutti gli oceani, nonchè nel Mar Mediterraneo. Il corpo è di colore scuro sul dorso. Si distinguono dalla presenza dell'inconfondibile "spada". Preda principalmente sgombri, tonni di piccole dimensioni, molluschi (Figura 16).

Figura 16: *Xipias gladius*



5. Metodo

5.1 Percorso di messa a punto del metodo analitico

Il metodo è stato messo a punto in 5 fasi consecutive:

- 1° STEP: Ricerca bibliografica ed individuazione del metodo analitico da riprodurre nel siero di specie ittiche

Nella parte iniziale del dottorato si è posta l'attenzione sulla ricerca di lavori in letteratura in cui venisse descritto un metodo di estrazione e determinazione dei metaboliti ossidrilati dei policlorobifenili nel siero di diverse matrici (Hovander et al., 2000, Hovander et al., 2002, Sandau et al., 2000, Fångström et al., 2002). Il metodo che più ha rispecchiato le nostre esigenze è stato quello descritto da Hovander (Hovander et al., 2000).

- 2° STEP: Scelta degli analiti da determinare

Una volta trovato il metodo si sono individuati gli analiti. La scelta dei policlorobifenili ossidrilati è stata fatta in base ai dati di letteratura disponibili sulla loro tossicità e sulla presenza ambientale loro o dei loro PCB precursori: sono stati selezionati i PCB-OH più tossici e più diffusi nell'ambiente o metaboliti dei PCB più diffusi nell'ambiente. Fra questi è stata necessario effettuare un'ulteriore selezione determinata dalla limitata disponibilità in commercio degli standard per analisi necessari alla loro determinazione. In base ai criteri di selezione sopra citati sono stati selezionati i seguenti metaboliti: 4-OH-CB 107, 4-OH CB 146, 3'-OH CB 138, 4'-OH CB 172, 4-OH CB 187.

- 3° STEP : Preparazione dei materiali

Si è proceduto alla preparazione degli standard, delle soluzioni di estrazione, della soluzione di diazometano e all'individuazione della strumentazione più adeguata per la determinazioni strumentale degli inquinanti.

- 4° STEP: prove di laboratorio su matrici umane e ittiche con l'utilizzo di HRGC-LRMS a singolo quadrupolo

Si è proceduto a verificare l'efficacia del metodo analitico attraverso l'analisi di campioni di siero umano e di siero di pesce.

- 5° STEP: validazione del metodo analitico attraverso l'utilizzo del HRGC-LRMS/MS a triplo quadrupolo

Si è proceduto alla validazione del metodo analitico di determinazione di PCB-OH in siero di salmone. Di seguito vengono descritti nel dettaglio i 5 punti del metodo.

5.2 Ricerca bibliografica ed individuazione del metodo analitico da riprodurre nel siero di specie ittiche

Il metodo più utile alle esigenze della tesi di dottorato è stato quello di Hovander (Hovander et al., 2000). La scelta è derivata dal fatto che tale metodo è quello più riportato negli articoli di letteratura di altri autori scientifici. Tale metodo prevede la determinazione di PCB e PCB-OH in siero umano.

Di seguito viene riportato il metodo nella sua interezza.

a) Estrazione della fase lipidica contenente i PCB e i loro metaboliti ossidrilati (PCB- OH)

10g di siero vengono trasferiti in una provetta di teflon da 50 ml; il campione viene opportunamente omogenizzato su vortex, e contaminato con due miscele di standard interni marcati sul carbonio 13 (std ¹³CPBC e std ¹³CPCB-OH) contenenti rispettivamente i seguenti analiti di nostro interesse: PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180, PCB 187, e 4-OH CB 107, 4-OH CB 146, 3'-OH CB 138, 4'-OH CB 172, 4-OH CB 187. Il campione viene lasciato a riposo per una notte e il giorno seguente viene denaturato (denaturazione delle proteine) con l'aggiunta prima di HCl 6M e poi di alcool isopropilico. Per l'estrazione della fase lipidica, si aggiunge una miscela di esano: MTBE (1:1) e, dopo centrifugazione, si separa la fase organica che viene poi trasferita in una provetta contenente una soluzione acquosa di KCl 1%. Si ripete l'estrazione altre due volte, raccogliendo la fase organica nella stessa provetta contenente il cloruro di potassio. Si agita e si centrifuga per separare e raccogliere la fase organica contenente i PCB e i loro metaboliti ossidrilati.

b) Separazione dei PCB dai PCB-OH

La soluzione organica è portata a secco sotto flusso di azoto e ripresa con esano. Tale procedura serve per eliminare qualunque residuo di MTBE. Si aggiunge poi una soluzione di KOH 0,5 M in 50% di etanolo e si miscela. Si centrifuga e si separa la soluzione organica; la soluzione di KOH viene estratta per 2 volte con esano, centrifugando ogni volta e unendo la fase organica alla precedente. La fase organica contiene i PCB; questa seguirà la procedura adeguata alla determinazione di questi analiti. La soluzione di KOH invece contiene i metaboliti in forma anionica (PCBO⁻).

Si acidifica con HCl 2M e i PCB-OH nuovamente indissociati, sono estratti 3 volte con esano:MTBE (9:1). La fase organica contenente i PCB-OH, è trasferita in una provetta e seguirà la procedura per la determinazione degli analiti.

c) Purificazione e analisi dei PCB

Alla soluzione organica ottenuta dall'estrazione si aggiunge dell'H₂SO₄ concentrato (5 mL), si miscela e si centrifuga per 20 minuti a 3000 giri. Si preleva il surnatante e lo si raccoglie in un vial di vetro da 8 mL; l'eluato viene concentrato e iniettato allo spettrometro di massa per l'analisi dei congeneri di PCB di interesse.

d) Derivatizzazione, purificazione e analisi PCB-OH

Alla soluzione contenente i PCB-OH si aggiunge una soluzione eterea di diazometano (CH₂N₂) preparata di fresco; la soluzione si deve colorare di giallo e rimanervi per almeno 2 minuti (l'intera operazione di derivatizzazione dei PCB-OH a PCB-OCH₃ con diazometano va eseguita rigorosamente sotto cappa e seguendo le adeguate norme di sicurezza). In caso contrario si aggiunge ancora la soluzione eterea di CH₂N₂ fino al verificarsi della condizione. Dopo 30 minuti la derivatizzazione può essere considerata quantitativa e quindi si può allontanare l'eccesso di CH₂N₂ evaporando sotto flusso di azoto fino alla scomparsa del caratteristico colore giallo. L'estratto, contenente i PCB-OCH₃, viene portato a secco, ripreso con esano e sottoposto a trattamento con acido solforico concentrato. Si miscela, si centrifuga e si raccoglie la fase esanica che, dopo un'opportuna riduzione di volume, è iniettata allo spettrometro di massa per l'analisi dei congeneri.

5.3 Preparazione dei materiali

5.3.1 Preparazione degli standard

Lo standard interno (SI) è un analita che viene aggiunto prima di qualsiasi trattamento del campione. Deve avere caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle degli analiti da dosare, perché deve avere un comportamento il più possibile analogo a questi in tutte le fasi del procedimento analitico. Per questo motivo la situazione migliore è quella in cui si dispone di analoghi isotopicamente marcati delle molecole da determinare. In questo caso è assicurato un comportamento cromatografico che non richiede modifiche di rilievo nello schema d'eluizione adottato per gli analiti. Lo SI deve essere facilmente reperibile in commercio ed avere un elevato grado di purezza.

Sono state preparate sia miscele di standard che singole soluzioni di standard.

Le due miscele di PCB-OH sono state così composte: la miscela figlia std ¹²C PCB-OH è stata composta dal 4-OH CB 107, 3'-OH CB 138, 4-OH CB 146, 4'-OH CB 172, 4-OH CB 187, ottenuta dai singoli standard già presenti in laboratorio. La miscela figlia std ¹³C PCB-OH è invece stata composta dagli standard interni marcati corrispondenti ai congeneri presenti nello std dei naturali se disponibili in commercio o da congeneri con lo stesso grado di clorurazione.

Preparazione dei singoli standard ¹³C

- MARCATI:

Soluzione di ¹³C 4-OH CB 120

La soluzione è stata preparata prelevando il necessario volume dal singolo matraccio dell'analita ¹³C 4-OH CB 120 e portando a volume in un matraccio da 5 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione STD		Concentrazione finale
	PCB OH (ng/ μL)	V μL	
¹³ C 4-OH CB 120	5	500	500

Soluzione di ^{13}C 4-OH CB 159

La soluzione è stata preparata prelevando il necessario volume dal singolo matraccio dell'analita ^{13}C 4-OH CB 159 e portando a volume in un matraccio da 5 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione STD		Concentrazione
	PCB OH (ng/ μL)	V μL	finale (pg/μL)
^{13}C 4-OH CB 159	5	500	500

Soluzione di ^{13}C 4'-OH CB 172

La soluzione è stata preparata prelevando il necessario volume dal singolo matraccio dell'analita ^{13}C 4'-OH CB 172 e portando a volume in un matraccio da 5 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione STD		Concentrazione
	PCB OH (ng/μL)	V μL	finale (pg/μL)
^{13}C 4'-OH CB 172	5	500	500

Soluzione di ^{13}C 4-OH CB 187

La soluzione è stata preparata prelevando il necessario volume dal singolo matraccio dell'analita ^{13}C 4'-OH CB 187 e portando a volume in un matraccio da 5 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione STD		Concentrazione
	PCB OH (ng/μL)	V μL	finale (pg/μL)
^{13}C 4-OH CB 187	5	500	500

A questo punto si è proceduto a preparare due miscele contenenti tutti gli analiti marcati, una soluzione, quella madre più concentrata e una soluzione figlia meno concentrata.

Preparazione miscela Soluzione MADRE di ¹³C PCB-OH

La soluzione è stata preparata prelevando i necessari volumi dei singoli ¹³C PCB-OH (500 ul) dai relativi matracci con transferpette da 1 mL e portando a volume in un matraccio da 5 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione STD		Concentrazione finale
	PCB OH (ng/μL)	V μL	
¹³ C 4-OH CB 120	5	500	500
¹³ C 4-OH CB 159	5	500	500
¹³ C 4'-OH CB 172	5	500	500
¹³ C 4-OH CB 187	5	500	500

Preparazione miscela Soluzione FIGLIA di ¹³C PCB-OH

Si sono prelevati 500 ul di ¹³C PCB-OH soluzione Madre e portando a volume in un matraccio da 50 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione finale (pg/μL)
¹³ C 4-OH CB 120	5
¹³ C 4-OH CB 159	5
¹³ C 4'-OH CB 172	5
¹³ C 4-OH CB 187	5

Preparazione miscela Soluzione MADRE di ¹²C PCB-OH

La soluzione è stata preparata prelevando i necessari volumi dei singoli ¹²C PCB-OH dai relativi matracci con transferpette da 1 mL e portando a volume in un matraccio da 5 mL con isotano.

Metabolita	Concentrazione STD		Concentrazione finale (pg/ μ L)
	PCB OH (ng/ μ L)	V μ L	
¹² C 4-OH CB 107	5	500	500
¹² C 3'-OH CB 138	5	500	500
¹² C 4-OH CB 146	5	500	500
¹² C 4'-OH CB 172	5	500	500
¹² C 4-OH CB 187	5	500	500

Preparazione miscela Soluzione FIGLIA di ¹²C PCB-OH

Si sono prelevati 500 μ l di ¹³C PCB-OH soluzione Madre e si porta a volume in un matraccio da 50 mL con isotano.

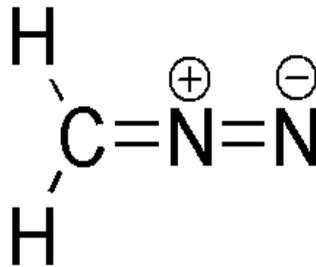
Metabolita	Concentrazione finale (pg/ μ L)
¹² C 4-OH CB 107	5
¹² C 3'-OH CB 138	5
¹² C 4-OH CB 146	5
¹² C 4'-OH CB 172	5
¹² C 4-OH CB 187	5

5.3.2 Preparazione delle soluzioni di estrazione e di metilazione

Sono state preparate le seguenti soluzioni: HCl 6 M , HCl 2M, KOH 0,5 M in 50 % etanolo. La soluzione di diazometano è stata preparata per metilare i composti di interesse e trasformarli da PCB-OH a PCB-OCH₃. La metilazione è fondamentale in quanto la strumentazione utilizzata per l'identificazione degli inquinanti di interesse è in grado di individuare con maggiore efficacia composti con il gruppo -CH₃ anzichè con il gruppo -OH.

La soluzione di diazometano che ha formula:

Figura 17: Formula del diazometano



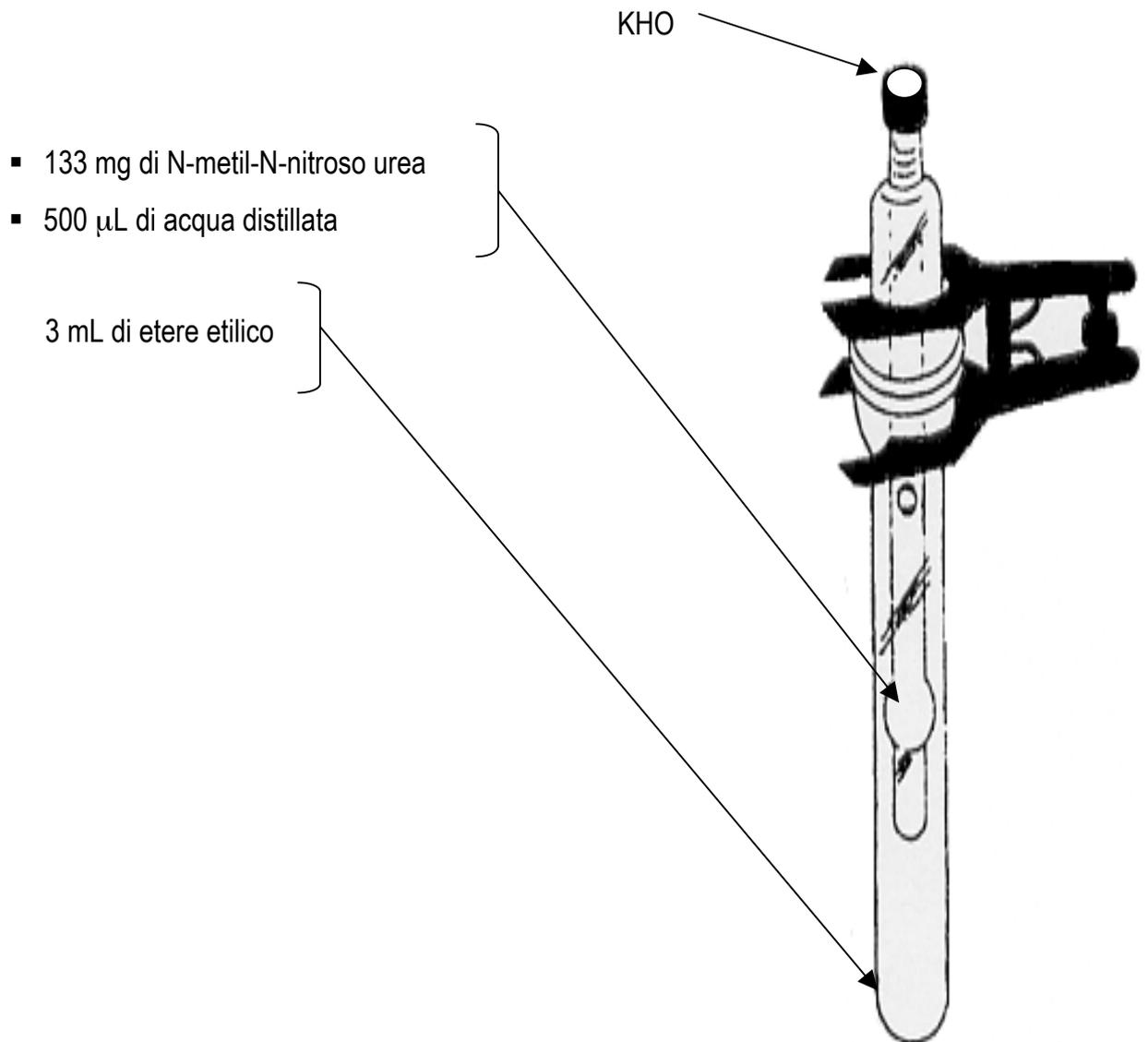
viene così preparata:

Ad apparecchio aperto (strumento di vetro come da immagine seguente) si è posta nella parte interna 133 mg di N-metil-N-nitroso urea e 500 µl di acqua distillata estratta; nella parte esterna si sono messi 3 mL di etere etilico.

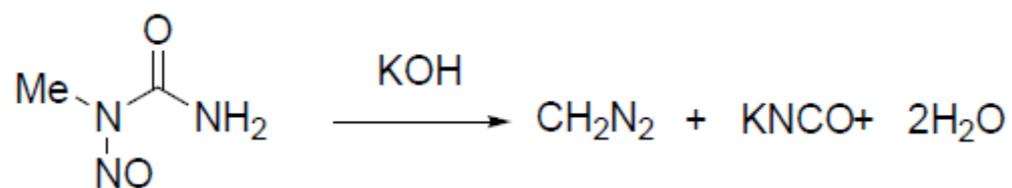
A questo punto si è chiuso il tappo e con una siringa, si sono iniettati 600 µl di soluzione di KOH 5 N (soluzione preparata miscelando 5 ml di acqua distillata con 1,4 g di KOH in pastiglie) attraverso un setto forabile posto sul tappo del contenitore.

Si è lasciato agire per almeno 1h in attesa della colorazione gialla della soluzione. Si è poi proceduto alla derivatizzazione del campione e degli standard. L'intera operazione per sicurezza è avvenuta in ghiaccio, in quanto la reazione è esotermica.

Figura 18: Strumento per la preparazione del diazometano



La reazione chimica che porta alla formazione del diazometano è la seguente:



5.4 Strumentazione

La determinazione strumentale dei PCB-OH metilati è stata effettuata in gas cromatografia ad alta risoluzione associata alla spettrometria di massa a bassa risoluzione.

Sono stati utilizzati uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo accoppiato a un gas cromatografo e uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo accoppiato a un gas cromatografo. Entrambi gli strumenti operano tramite spettrometria di massa a bassa risoluzione associata a gas cromatografia ad alta risoluzione (HRGC-LRMS), ma il triplo quadrupolo è in grado di operare anche con una tecnica nota come massa/massa (HRGC-LRMS/MS) tramite la quale un frammento di massa isolato dal primo quadrupolo può essere ulteriormente frammentato in una cella di collisione (il secondo quadrupolo) e i suoi frammenti selezionati dal terzo quadrupolo.

Il singolo quadrupolo è stato utilizzato in una prima fase esplorativa mirata alla valutazione dell'efficienza della fase preparativa del metodo analitico e alla determinazione di massima dei livelli di concentrazione degli analiti di interesse nei campioni di siero di pesce. Esaurita la messa a punto della fase preparativa del metodo e in considerazione del fatto che i livelli di PCB-OH misurati nel siero di pesce sono risultati molto bassi è stato disposto di effettuare alcune prove di determinazione con uno strumento che utilizza una tecnica strumentale più selettiva e sensibile, ovvero lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo. In base ai risultati ottenuti dopo tali prove è stato deciso di utilizzare per la successiva fase di validazione del metodo analitico nel suo complesso lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Le prestazioni del triplo quadrupolo nell'analisi dei PCB-OH sono state infine valutate anche tramite confronto diretto con i risultati ottenuti sugli stessi campioni tramite l'uso di uno spettrometro di massa ad alta risoluzione accoppiato a un gas cromatografo ad alta risoluzione (HRGC-HRMS).

5.4.1 Spettrometro di massa a singolo quadrupolo accoppiato a un gas cromatografo (HRGC-LRMS)

Nello spettrometro di massa a singolo quadrupolo, le sostanze in fase gassosa che fuoriescono dalla colonna cromatografica già separate sono immesse direttamente nella camera di ionizzazione dove vengono ionizzate da un fascio di elettroni prodotto da una sorgente ionica che può essere diversa a seconda della tecnica utilizzata.

La ionizzazione per impatto elettronico (EI, electron impact) è la tecnica più comune: in questo caso un filamento incandescente di renio o tungsteno emette un fascio di elettroni che, accelerati verso un anodo situato dalla parte opposta al filamento, acquistano un'elevata energia, normalmente fissata a 75 eV. Quando questi elettroni vengono a contatto con la sfera elettronica di una molecola (impatto elettronico), le trasferiscono la loro energia, provocando l'espulsione di un elettrone con formazione di un catione radicalico (ione molecolare) altamente instabile, che può spontaneamente o per urto decomporsi in una serie di frammenti di massa inferiore e questi a loro volta in altri, secondo schemi tipici della classe chimica di appartenenza. Ogni molecola avrà quindi una sua frammentazione caratteristica e specifica detta spettro di massa che dipenderà sia dalla natura delle molecole sia dalle condizioni operative di ionizzazione.

La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate, nel nostro caso quelle ionizzate positivamente, sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore che consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica.

Lo spettrometro di massa a singolo quadrupolo ha anche la possibilità di utilizzare la tecnica della ionizzazione chimica negativa (NCI, negative chemical ionization): questa scelta è stata necessaria nella determinazione analitica delle sostanze oggetto del nostro studio in quanto l'analisi tramite impatto elettronico ha dato problemi di sensibilità e specificità. Inoltre nei campioni erano presenti sostanze interferenti che in EI non potevano essere distinte dalla molecola oggetto dello studio. Il tutto ha reso molto complessa l'individuazione degli analiti di interesse per questa tesi di dottorato.

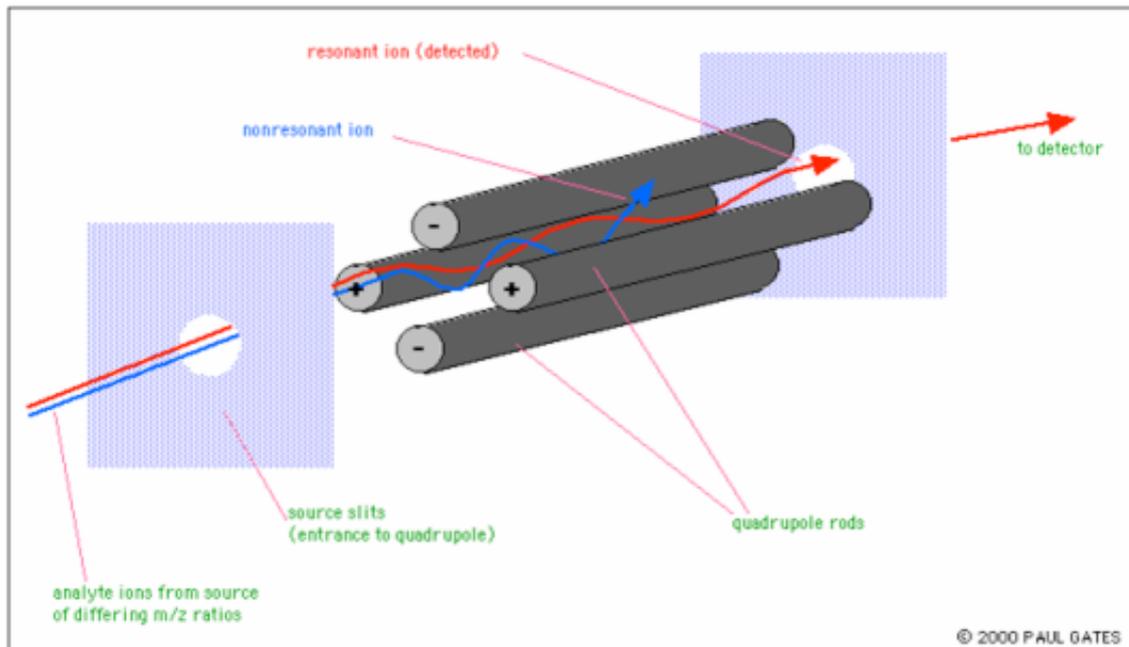
Questa tecnica viene generalmente utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano eccessivamente; si basa sull'interazione del campione vaporizzato con un reagente ionizzato che nella maggior parte dei casi è il metano (CH_4). In genere la ionizzazione chimica genera dei frammenti più stabili di quanto non faccia l'impatto elettronico.

Infatti dopo NCI i legami C-C tendono a rompersi solo se il frammento prodotto in seguito alla rottura è particolarmente stabile. Inoltre da studi di letteratura si è visto che la NCI è più adatta all'analisi dei composti alogenati. È una tecnica tuttavia poco utilizzata per l'analisi dei PCB-OH, infatti in letteratura si trovano pochi lavori in cui viene citata (Sandau et al., 2000, Hovander et al., 2000).

Una volta ionizzata la molecola, gli ioni vengono indirizzati verso l'analizzatore. In questo caso l'analizzatore è composto da un singolo quadrupolo. Questo quadrupolo è costituito da 4 barre cilindriche e metalliche lunghe circa 20 cm ognuna che delimitano il cammino degli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector. Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante: le barre sull'asse verticale hanno un potenziale negativo mentre quelle sull'asse orizzontale un potenziale positivo. A causa delle oscillazioni del campo magnetico applicato al quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig-zag sbattendo sulle barre del quadrupolo, tranne quelli che hanno un'energia cinetica tale da avere un movimento sinusoidale che gli permette di uscire dal quadrupolo ed entrare nel sistema di rivelazione. Il sistema di rivelazione amplificherà il segnale arrivato e lo digitalizzerà e invierà al calcolatore dello spettrometro.

Di seguito è riportata un'immagine esplicativa del quadrupolo (Figura 19).

Figura 19: Schema di un quadrupolo*



* fonte: <http://www.dia.unisa.it/~ads/BIOINFORMATICA/Proteomica/glossario.html>

5.4.2 Spettrometro di massa a triplo quadrupolo accoppiato a un gas cromatografo (HRGC-LRMS/MS).

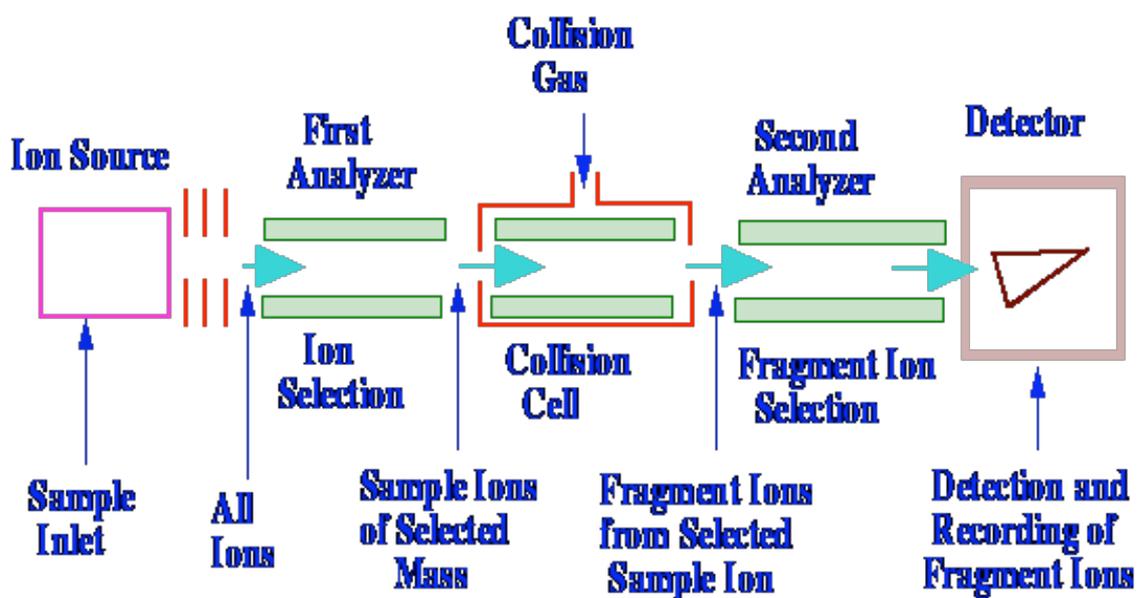
Una configurazione strumentale composta da tre quadrupoli in serie viene utilizzata negli strumenti cosiddetti "a triplo quadrupolo". In questa configurazione il primo ed il terzo quadrupolo agiscono da filtri di massa, mentre il quadrupolo centrale, riempito con un gas inerte (generalmente azoto o argon), come cella di collisione.

Uno strumento a triplo quadrupolo può operare in modalità differenti e più complesse di quelle caratteristiche del singolo quadrupolo. È possibile lavorare infatti in "product ion scan", dove il primo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto m/z (massa/carica) fissato e, dopo la frammentazione nel secondo quadrupolo, il terzo quadrupolo effettua una scansione su un determinato *range* di massa. In questo modo è possibile dall'analisi dei frammenti avere informazioni sull'identità di una molecola (Figura 20). Nella modalità "parent ion scan" invece è il terzo quadrupolo che è sintonizzato permanentemente su un dato rapporto m/z , mentre il primo quadrupolo lavora in scansione su un *range* di massa. Questa modalità permette di individuare classi di molecole strutturalmente simili. Nella modalità "neutral loss scan" invece, entrambi i quadrupoli lavorano in scansione, ma tra il primo ed il terzo quadrupolo è mantenuta una differenza prefissata di m/z , in altre parole mentre il primo quadrupolo è sintonizzato su un determinato m/z il terzo si trova a $(m/z - x)$, ed x è mantenuto costante durante la scansione. È possibile così individuare facilmente classi di molecole che hanno in comune una parte della struttura. Le modalità "parent ion scan" e "product ion scan" sono utili soprattutto per studi sul metabolismo. Una ulteriore modalità, "single reaction monitoring" (SRM) viene utilizzata per l'analisi quantitativa nei sistemi accoppiati con la cromatografia liquida (HRLC-LRMS/MS) o la gas cromatografia (HRGC-LRMS/MS) ed è la modalità utilizzata in questo studio. In questo caso l'identità della molecola è nota a priori ed il primo quadrupolo è fissato su di un valore determinato di m/z (ione genitore o precursore), mentre il terzo su quello di un frammento (ione figlio o prodotto). La variazione dell'energia di collisione applicata nel secondo quadrupolo permette di modificare la frammentazione della molecola privilegiando la formazione di un frammento rispetto a un altro.

In questa modalità operativa la possibilità di selezionare lo ione precursore, frammentarlo e selezionare fra i frammenti prodotti quello di interesse riduce notevolmente la possibilità di interferenze sul segnale finale e permette di aumentare la specificità del sistema di rivelazione. Nel caso venga selezionato più di un frammento si parla di "multiple reaction monitoring" (MRM).

La scelta di questa strumentazione utilizzata in modalità MS/MS è stata fondamentale per la messa a punto del metodo analitico, in quanto oltre a minimizzare l'effetto matrice ha migliori caratteristiche di sensibilità e selettività.

Figura 20: Schema di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo*



*fonte: <http://www.analyticalspectroscopy.net>

5.5 Prove di laboratorio su matrici umane ed ittiche con l'utilizzo di HRGC-LRMS a singolo quadrupolo

1. Partendo dal metodo di Hovander sono state effettuate inizialmente 10 prove (ogni prova composta da 5 campioni di siero) che hanno richiesto un notevole lavoro sperimentale in quanto sono stati riscontrati alcuni problemi analitici e strumentali (difficoltà nella procedura di estrazione e di derivatizzazione, difficoltà nell'ottenere un buon recupero degli standard interni e problemi di sensibilità e specificità al HRGS-LRMS in E.I. (Hovander et al., 2000).
2. Queste difficoltà ci hanno portato a ridimensionare il metodo analitico e a testarlo su altri campioni di siero umano e poi di pesce. Prima di testare il metodo si è proceduto però a verificare la linearità dello strumento HRGC-LRMS a singolo quadrupolo.
3. Successivamente si è utilizzato un unico campione omogeneo di siero suddiviso in vari sottocampioni per l'analisi, utilizzati per il calcolo di esattezza (e recupero) e precisione (ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio, in termini di deviazione standard e CV%).

E' stato analizzato un batch di 5 sottocampioni (\approx 5g ognuno, identificati come P1, P2, P3, P4, P5) provenienti da un unico campione omogeneo di siero umano più un bianco (acqua estratta = 5g).

Il siero è stato ottenuto da un pool omogeneo utilizzato in laboratorio per analisi di messa a punto di metodi analitici. I risultati verranno descritti nelle pagine successive.

5.5.1 Valutazione di linearità e ripetibilità del HRGC-LRMS a singolo quadrupolo

Una volta preparate tutti i materiali si è proceduto come prima cosa a valutare la risposta strumentale del HRGC-LRMS a singolo quadrupolo sotto forma di linearità e ripetibilità con l'utilizzo degli standard precedentemente preparati.

Per ripetibilità si intende il grado di concordanza tra una serie di misure di uno stesso misurando, quando le singole misurazioni sono effettuate lasciando immutate le condizioni. Per linearità si intende la proprietà di uno strumento di misura di dare in lettura valori che possano mettersi in relazione lineare con il segnale d'ingresso (misurando).

Sono stati iniettati 3 batches di soluzioni standard, contenenti gli analiti di interesse. I batches sono stati preparati a diverse concentrazioni e ogni batch è stato metilato con diazometano (ogni volta preparato ex novo), in modo da verificare anche la ripetibilità della derivatizzazione. Poiché il metodo analitico prevede un dosaggio strumentale per diluizione isotopica nelle miscele di standard sono stati inseriti anche standard interni marcati isotopicamente sugli atomi di carbonio. Nelle tabelle seguenti (Tabella 4-5) vengono riportate le composizioni delle due miscele (la prima di standard interni marcati, la seconda di standard naturali) di standard utilizzate:

Tabella 4: Miscela Std ¹³C PCB-OH (Soluzione Madre Concentrata)

Analita	Concentrazione finale (pg/μL)
¹³ C 4-OH CB 120	500
¹³ C 4-OH CB 159	500
¹³ C 4'-OH CB 172	500
¹³ C 4-OH CB 187	500

Tabella 5: Miscela Std ¹²C PCB-OH (soluzione figlia)

Analita	Concentrazione finale (pg/μL)
¹² C 4-OH CB 107	5
¹² C 3'-OH CB 138	5
¹² C 4-OH CB 146	5
¹² C 4'-OH CB 172	5
¹² C 4-OH CB 187	5

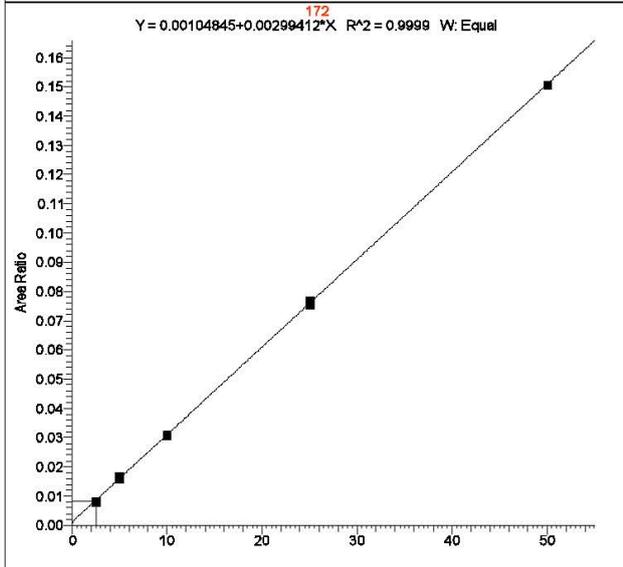
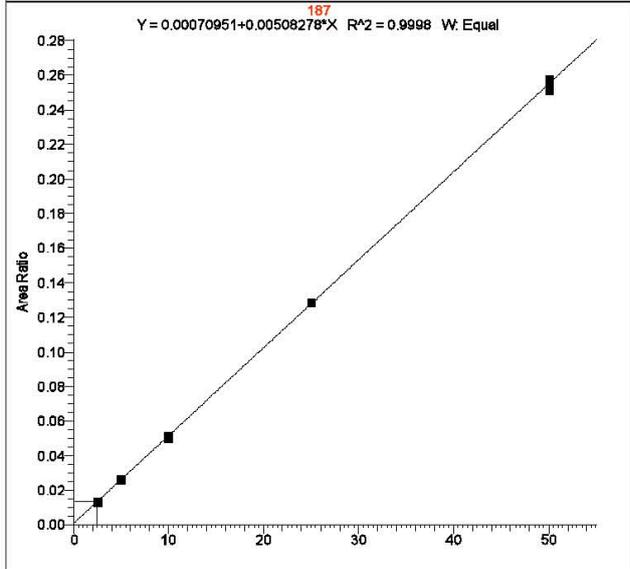
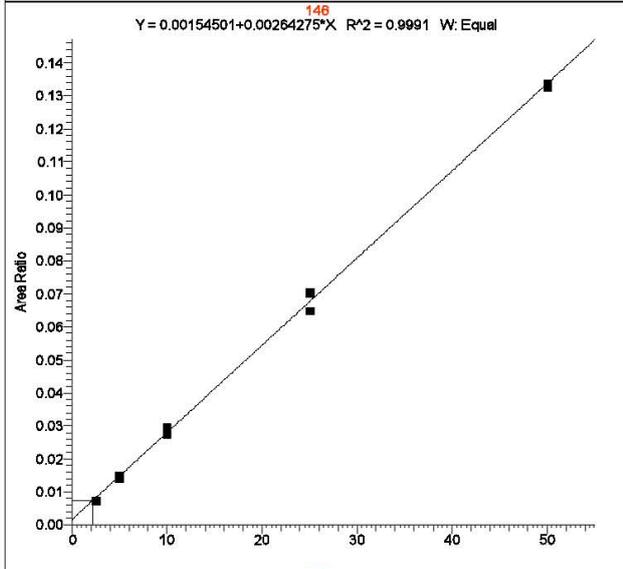
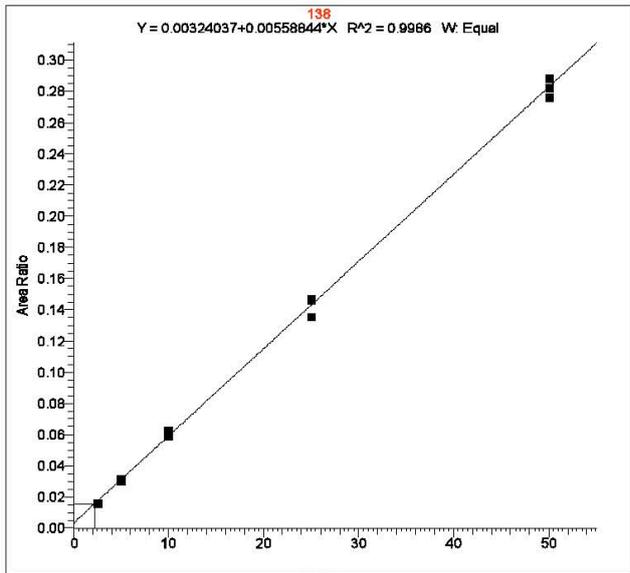
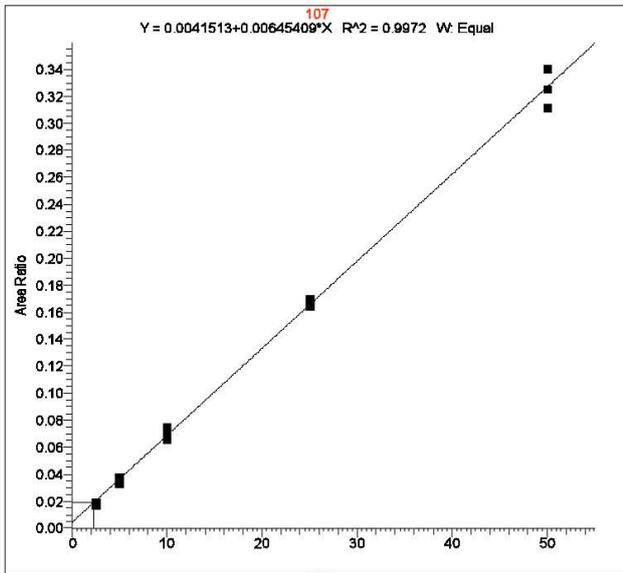
I 3 batches di soluzione standard utilizzati per la verifica di linearità e ripetibilità sono stati così preparati: tutti e 3 i batches sono stati composti da 5 soluzioni costituite da Std ¹²C a concentrazioni differenti e Std ¹³C a concentrazioni uguali. Le soluzioni sono state portate a secco e riprese con 100 μ L di Clordano (utilizzato come standard di iniezione). La concentrazione finale degli std componenti i 3 batches è riportata di seguito (Tabella 6).

Tabella 6: Volumi e concentrazioni delle soluzioni standard

V prelevato Std ¹²C (μL)	Concentrazione Finale Std ¹²C (pg/μL)	N° ripetizioni	V prelevato Std ¹³C (μL)	Concentrazione Finale Std ¹³C (pg/μL)	N° rip
50	2,5	3	100	50	3
100	5	3	100	50	3
200	10	3	100	50	3
500	25	3	100	50	3
1000	50	3	100	50	3

Di seguito i grafici che mostrano linearità e ripetibilità per ogni analita (Grafico 1):

Curva di Calibrazione PCB-OH NCL.xls



Una volta verificata la linearità dello strumento la prova preliminare per verificare l'efficacia del metodo è stata effettuata su siero umano essendo difficile reperire campioni di siero di pesce.

A seguito delle difficoltà riscontrate dal metodo di Hovander si è deciso di effettuare alcune modifiche anche sostanziali nella procedura di analisi riportata in letteratura. Poiché l'obiettivo è stato quello di mettere a punto un metodo analitico efficace ma allo stesso tempo breve ed economico, si è pensato di ridurre la complessità della procedura analitica e in particolare eliminare il passaggio di separazione tra i policlorobifenili e i loro metaboliti ossidrilati.

Per verificare la funzionalità del metodo modificato si è proceduto ad una prima prova utilizzando un unico campione omogeneo di siero umano suddiviso in 5 sottocampioni per l'analisi, utilizzati per il calcolo di **esattezza** (e recupero) e **precisione** (ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio, in termini di deviazione standard e CV%).

Il metodo di analisi, estrazione e purificazione degli analiti ha previsto le fasi di seguito riportate:

- ❖ Fortificazione dei campioni
- ❖ Denaturazione delle proteine con HCl 6M e 2-propanolo
- ❖ Due estrazione consecutive con Esano:MTBE 1:1
- ❖ Purificazione, derivatizzazione e analisi PCB-OH:
 1. Attacco acido con H₂SO₄
 2. Derivatizzazione con Diazometano
- ❖ Dosaggio degli analiti

Il metodo rispetto a quello presentato da Hovander risulta drasticamente ridotto, e questo ci ha permesso di ottenere un metodo più economico ma soprattutto molto più efficace.

L'ulteriore modifica apportata al metodo è stata quella di invertire gli step di purificazione e derivatizzazione dei campioni. Anziché procedere prima alla derivatizzazione e poi all'attacco acido i due step sono stati invertiti, permettendo così al diazometano di metilare gli analiti in un campione privo di impurità che avrebbero potuto interferire con la derivatizzazione. Questo metodo è stato utilizzato su siero umano e di pesce.

Di seguito vengono riportati i risultati delle prove effettuate su siero umano e siero di pesce utilizzando il metodo “breve” con strumentazione HRGC-LRMS a singolo quadrupolo.

5.6 Risultati sul siero umano

I dati su siero umano e su siero ittico (orate e branzini della zona di Monfalcone) sono stati ottenuti attraverso l'utilizzo del HRGC-LRMS a singolo quadrupolo come detto in precedenza (paragrafo 5.4.1). Lo strumento è un *Thermo Scientific DSQ Single Quadrupolo*; si è utilizzata una colonna HT8 PCB 60mx0,25mm in ionizzazione chimica negativa (NCI) per l'analisi dei PCB-OCH₃.

La scelta di questa strumentazione con la tecnica della NCI è risultata utile per la fase preliminare di messa a punto del metodo. La scelta della NCI rispetto al EI è stata necessaria per ridurre l'effetto matrice che in EI ci ha impedito la quantificazione dei congeneri di interesse.

Nelle tabelle seguenti (Tabella 7-8) sono riportati i recuperi degli standard interni marcati per ogni campione sottoposto ad analisi e le concentrazioni per ogni analita espresse in ng/g di base fresca.

Tabella 7: Recuperi dei singoli analiti per le 5 aliquote di siero umano

Analita/Campione	Bianco	P1	P2	P3	P4	P5	Media	DS	CV%
¹³ C 4-OH CB 120	62%	77%	85%	71%	77%	49%	70%	13%	18%
¹³ C 4-OH CB 159	112%	105%	130%	123%	119%	68%	110%	22%	20%
¹³ C 4'-OH CB 172	64%	84%	89%	72%	77%	51%	73%	14%	19%
¹³ C 4'-OH CB 187	92%	106%	107%	102%	101%	68%	96%	15%	15%

Tabella 8: Concentrazione (ng/g, base fresca) di PCB-OH nei 5 sottocampioni di siero umano

Analita/Campione	P1	P2	P3	P4	P5	Media	Dev.Std	Cv%
¹² C 4-OH CB 107	0,065	0,059	0,055	0,062	0,057	0,060	0,4%	6%
¹² C 3'-OH CB 138	0,043	0,039	0,033	0,036	0,036	0,037	0,4%	10%
¹² C 4-OH CB 146	0,018	0,017	0,016	0,018	0,017	0,017	0,1%	4%
¹² C 4'-OH CB 172	0,011	0,013	0,012	0,014	0,014	0,013	0,2%	12%
¹² C 4-OH CB 187	0,068	0,065	0,058	0,063	0,060	0,063	0,4%	6%

Dall'analisi dei risultati sopra riportati è stato possibile concludere che il metodo per questa prova era in grado di fornire dati accurati (recuperi degli standard interni marcati compresi fra il 50 e il 110%) e precisi (CV% fra campioni a uguale concentrazione compreso fra il 6 e il 12%).

Successivamente è stato possibile effettuare prove su siero di pesce per verificare l'efficacia di tale metodo anche in questa matrice.

5.7 Risultati su siero di orate e branzini allevati

Sono state svolte diverse prove per poter confermare la validità del metodo analitico anche su siero di pesce utilizzando sempre un HRGC-LRMS a singolo quadrupolo.

Vista la difficoltà nel prelevare grandi quantità di sangue dai pesci, e di conseguenza la difficoltà nell'ottenere siero da tali prelievi, si è deciso di eseguire la prova su pool di specie ittiche disponibili per le prove di laboratorio. I 2 pool composti da sieri di orate e di branzino sono stati suddivisi in 6 aliquote identiche e sono stati sottoposti ad analisi.

I sieri utilizzati di *Dicentrarchus labrax* (branzino o spigola) e di *Sparus aurata* (orata) provenivano da allevamenti dall'alto Adriatico, nella zona di Monfalcone.

Nelle tabelle seguenti (Tabella 9-10-11-12) sono riportati sia i recuperi degli standard interni marcati per ogni sottocampione sottoposto ad analisi del branzino e dell'orata che le concentrazioni degli analiti espressi in pg/g su base fresca.

Tabella 9: Recuperi dei singoli analiti per il bianco e le 6 aliquote di siero di orata

Analita	Bianco	O1	O2	O3	O4	O5	O6	Media
¹³ C OH CB 120	24%	61%	58%	59%	55%	58%	58%	53%
¹³ C OH CB 159	53%	111%	103%	105%	98%	104%	104%	97%
¹³ C OH CB 172	34%	65%	62%	66%	60%	63%	64%	59%
¹³ C OH CB 187	49%	86%	80%	84%	80%	83%	82%	78%

Tabella 10: Recuperi dei singoli analiti per il bianco e le 6 aliquote di siero di branzino

Analita	Bianco	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Media
¹³ C OH CB 120	23%	55%	54%	52%	53%	53%	53%	49%
¹³ C OH CB 159	52%	98%	97%	92%	92%	91%	95%	88%
¹³ C OH CB 172	34%	70%	69%	63%	66%	64%	67%	62%
¹³ C OH CB 187	50%	90%	89%	83%	87%	85%	86%	81%

Tabella 11: Concentrazione (pg/g, base fresca) di PCB-OH nelle 6 aliquote di siero di orata

Analita	O1	O2	O3	O4	O5	O6	M	DS	Cv %
¹² C 4-OH CB 107	< 0,057	< 0,069	< 0,147	< 0,074	< 0,064	< 0,070			
¹² C 3'-OH CB 138	< 0,018	< 0,022	< 0,047	< 0,023	< 0,020	< 0,022			
¹² C 4-OH CB 146	< 0,045	< 0,056	< 0,120	< 0,060	< 0,052	< 0,057			
¹² C 4'-OH CB 172	< 0,061	< 0,074	< 0,151	< 0,077	< 0,067	< 0,073			
¹² C 4-OH CB 187	0,044	0,047	0,039	0,048	0,047	0,053	0,046	0,0046	9%

Tabella 12: Concentrazione (pg/g, base fresca) di PCB-OH nelle 6 aliquote di siero di branzino

Analita	B1	B2	B3	B4	B5	B6
¹² C 4-OH CB 107	< 0,130	< 0,136	< 0,168	< 0,157	< 0,156	< 0,146
¹² C 3'-OH CB 138	< 0,041	< 0,043	< 0,053	< 0,051	< 0,051	< 0,046
¹² C 4-OH CB 146	< 0,105	< 0,110	< 0,138	< 0,132	< 0,131	< 0,118
¹² C 4'-OH CB 172	< 0,116	< 0,121	< 0,158	< 0,145	< 0,146	< 0,131
¹² C 4-OH CB 187	< 0,057	< 0,060	< 0,076	< 0,070	< 0,070	< 0,065

Dall'analisi dei risultati sopra riportati è possibile affermare che il metodo per questa prova è stato in grado di fornire dati accurati (recuperi degli standard interni marcati per le orate compresi fra il 53% e il 97% , per i branzini compresi tra il 49% e l'88%).

Per quanto riguarda la determinazione degli inquinanti nei sieri dei prodotti ittici analizzati, le concentrazioni di questi risultano basse.

Questi livelli sono spiegabili sia per la piccola quantità di siero analizzata dovuta alla poca quantità di sangue che una specie come l'orata e il branzino possiede e sia per la tipologia di prodotti ittici utilizzati in quanto provenienti da allevamenti controllati dove il mangime è stato sottoposto a innumerevoli controlli di qualità portandolo ad essere un alimento quasi sempre pulito e non contaminato.

La precisione sotto forma di CV% è stata possibile calcolarla esclusivamente per i 6 pool di orata e solo per l'analita ¹²C 4-OH CB 187 ottenendo un CV del 9 %.

Le concentrazioni estremamente basse dei contaminanti oggetto di analisi rilevate con l'analisi dei campioni reali di orata e branzino hanno evidenziato la necessità di provare a migliorare l'efficienza della determinazione strumentale tramite l'utilizzo di uno strumento più sensibile e selettivo del singolo quadrupolo, ovvero uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

Tale strumento rispetto al singolo quadrupolo offre la possibilità di minimizzare le interferenze presenti in matrice migliorando il rapporto fra segnale e rumore di fondo con conseguente aumento della sensibilità dell'analisi.

5.8 Validazione del metodo analitico attraverso l'utilizzo dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo

La validazione del metodo analitico è stata svolta utilizzando siero di salmone allevato acquistato presso una ditta statunitense.

La determinazione degli analiti di interesse è stata ottenuta attraverso l'utilizzo di un gas cromatografo associato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo le cui caratteristiche sono state già descritte nel paragrafo 5.4.2. Tale scelta è stata motivata dalla maggiore selettività e sensibilità dello strumento rispetto un a uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo. Questo strumento, utilizzato in via esplorativa per la determinazione dei PCB-OH metilati aveva infatti dei limiti nella determinazione degli analiti di interesse dovuti alla presenza di interferenze ai livelli di concentrazione estremamente bassi che caratterizzavano i campioni di siero di pesce.

Il triplo quadrupolo utilizzato è stato un *TSQ Quantum GC XLS* (Thermo-Scientific Italia, Milano). Tale strumento comprende un gas cromatografo *Trace GC Ultra* equipaggiato con un auto-campionatore *Tri-plus*, un iniettore *PTV* e un triplo quadrupolo *TSQ Quantum XLS*. Lo strumento è stato utilizzato in EI con modalità SMR (Ingelido AM et al., 2011). Con l'utilizzo del Triplo Quadrupolo è stato possibile minimizzare ulteriormente l'effetto matrice già notevolmente ridotto dall'introduzione dell'uso della NCI con il singolo quadrupolo.

In fase di messa a punto del metodo è stata testata la risposta strumentale generata dalle frammentazioni caratteristiche dei PCB-OH metilati identificate in letteratura (Safe et al., 1995) ovvero la perdita dei gruppi CH_3 , COCH_3 e Cl_2COCH_3 . Ogni transizione è stata testata a differenti valori di energia di collisione per identificare il valore di energia che ottimizzasse la risposta strumentale per ogni frammento.

Il pattern di frammentazione migliore, in termini di risposta strumentale e di riduzione del rumore di fondo, è risultato quello in cui il precursore perde il gruppo COCH_3 con un'energia di collisione pari a 20 V per tutti i congeneri analizzati. Nella tabella che segue (Tabella 13) sono riportate le transizioni e le energie di collisione utilizzate nel metodo per ogni frammentazione.

Tabella 13: Transizioni ed energie di collisione utilizzate allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo

Congenero	Precursore (massa, amu)	Prodotto (massa, amu)	CE (energia di collisione, V)
¹² C PeCB-OCH ₃	355,89	312,87	20
¹³ C PeCB-OCH ₃	367,93	323,91	20
¹² C HxCB-OCH ₃	389,85	346,83	20
¹³ C HxCB-OCH ₃	401,89	357,87	20
¹² C HpCB-OCH ₃	423,81	380,79	20
¹³ C HpCB-OCH ₃	435,85	392,83	20

Vengono riportate anche le condizioni gas cromatografiche utilizzate nel metodo per la determinazione dei PCB-OH metilati.

Metodo del forno:

- *Temperatura iniziale (c°): 80*
- *Tempo iniziale (min): 1.00*
- *Velocità 1 (c°/min): 30.0*
- *Temperatura finale (c°): 240.0*
- *Tempo di attesa (min): 0.00*
- *Velocità 2 (c°/min): 5.0*
- *Temperatura finale (c°): 300*
- *Tempo di attesa (min): 0.00*
- *Velocità 3 (c°/min): 30.0*
- *Temperatura finale (c°): 320.0*
- *Tempo di attesa (min): 5.00*

5.9 Procedura di Validazione del metodo

Per la messa a punto del metodo sono stati utilizzati 25 mL dei 50 acquistati. Si è deciso di validare il metodo analitico su matrice per verificarne l'applicabilità nel range di concentrazioni riscontrate in letteratura, utilizzando come riferimento le concentrazioni di PCB-OH ritrovate nei campioni di Li (Li et al., 2003) e Campbell (Campbell et al., 2003). A tal scopo, è stato determinato il livello di contaminazione naturale della matrice nel volume di siero poi utilizzato per la curva di calibrazione. E' stata successivamente costruita una curva impostando 4 punti a diverse concentrazioni.

Sono state preparate 8 aliquote da 3 ml di siero ognuna, con le quali sono stati predisposti due replicati per ognuno dei livelli di concentrazione considerati. Ad ogni aliquota è stata aggiunta una concentrazione nota di standard ^{13}C e standard ^{12}C .

La curva è stata progettata sulla base dei dati riportati negli articoli di Campbell (Campbell L. et al., 2003) e Li (Li et al., 2003), relativi a congeneri di PCB e PCB-OH di interesse per questa tesi in diverse specie di pesci simili ai salmoni per caratteristiche fisiologiche.

In particolare, l'articolo di Campbell riporta i risultati della determinazione di PCB-OH nel siero di trote campionate negli anni 2000-2001. Nei due anni sono state prese in totale 25 trote. Da queste è stato prelevato il sangue e sono stati creati dei *pool* in base al lago di appartenenza. Di seguito sono riportate le concentrazioni medie degli inquinanti espresse in pg/g di base fresca nei diversi laghi (Tabella 14).

Tabella 14: Concentrazioni espresse in pg/g su base fresca (Campbell et al., 2003)

Analiti	Lake Ontario (2001)	Lake Champlain (2001)	Lake Ontario (2000)	Lake Opeongo (2000)	Lake Superior (2000)
4'-OH-CB 107+ 4-OH 109	na*	na*	4,9±2,7	0,3	1,5±0,5
4-OH-CB 146	1,1±3,6	<0,01	na*	na*	na*
3'-OH-CB 138	5,0±6,4	1,2±2,4	na*	na*	na*
4-OH-CB 187	75,5±34,2	17,8±10,8	104,5±45,6	14,7	61,0±33,5
4'-OH-CB 172	31,8±20,1	10,5±3,3	na*	na*	na*

* non analizzato

Si nota dalla tabella come le concentrazioni di PCB-OH oscillino tra il <0,01 e 104,5 pg/g su base fresca.

Lo studio di Li (Li et al. 2003) mette invece in luce la presenza di PCB-OH in specie pelagiche e bentoniche del fiume Detroit, un fiume che collega il lago Huron al lago Erie attraverso il lago St.Clair negli Stati Uniti. Il campionamento è stato effettuato tra Agosto e Settembre 2001. Sono stati fatti dei pool per ogni specie catturata e sono stati determinati molti PCB-OH, tra cui il 4-OH CB107, 3'-OH CB138 e 4-OH CB187, congeneri presi in esame in questa tesi. Le concentrazioni rilevate in questo studio sono di gran lunga più alte di quelle trovate da Campbell. E' da notare che lo studio è risultato particolarmente interessante per il lavoro di tesi perché le specie analizzate sono specie pelagiche fisiologicamente simili al salmone, pesce utilizzato nella messa a punto del metodo. Nella tabella 15 sono riportati i valori dei 3 PCB-OH trovati (Li et al., 2003).

Tabella 15: Concentrazioni medie espresse in ng/g di base fresca

(Li et al., 2003)

Analiti	1	2	3	4	5	6	7
4'-OH-CB107	0,11	0,30 0,14-0,53	0,24 0,15-0,32	0,26	0,18 0,13-0,24	0,15 <0,001-0,31	0,14
3'-OH-CB138	0,01	5,04 <0,001-19,40	37,71 10,71-65,25	16,13	<0,001	11,89 11,53-12,24	94,29
4-OH-CB187	0,12	1,16 <0,001-5,72	0,80 <0,01-1,61	5,54	0,02 <0,001-0,05	1,66 <0,001-3,32	9,40

1) White Sucker, 2) Common Carp, 3) Bigmouth buffalo, 4) Fresh water drum, 5) Brown bullhead, 6) Lake sturgeon, 7) Cannel catfish

Si nota come i dati ottenuti da questo autore si riferiscano a concentrazioni che oscillano tra <0,001 ng/g (< 1 pg/g) e 94,29 ng/g (94290 pg/g). Studiando i dati di entrambi gli articoli, si è deciso di creare una curva in matrice utilizzando il metodo già testato sul siero di orate e branzini. Nelle due tabelle (Tabella 16-17) che seguono vengono riportati tutti i dati utilizzati per la costruzione della curva in matrice.

Tabella 16: Concentrazioni di PCB-OH note inserite nei campioni di siero di salmone

Costruzione della curva in matrice		
4 punti sulla retta		Volume di siero per ogni campione = 3mL
	Concentrazioni di riferimento espresse in pg/mL	2 replicati per ogni punto
1. punto	5 pg/mL	(2 replicati: 1a e 1b)
2. punto	50 pg/mL	(2 replicati: 2a e 2b)
3. punto	500 pg/mL	(2 replicati: 3a e 3b)
4. punto	5000 pg/mL	(2 replicati: 4a e 4b)

Per ogni punto è stato preparato uno standard di iniezione alle stesse concentrazioni di analiti dei campioni. Tutti i campioni e gli standard sono stati contaminati con 10 µl di ogni standard marcato (¹³C 120,159,172,187)

In questa prima tabella vengono descritti i quattro punti della curva e le concentrazioni di riferimento per ogni punto.

Tabella 17: Calcoli per la contaminazione dei campioni di siero di salmone

Per il primo e secondo punto della curva si è usato uno std ¹²C diluito

Conc.Std ¹²C 0,5 pg/μL

Conc. Analiti in 3 mL di siero:

	Conc pg/mL	Vol siero mL	pg tot	V. da prelevare dallo std ¹² C (μL)	Vol.finale campione (μL)	Conc. pg/ul in 50 μL	V iniettato 2 μL	pg iniettati
1. punto	5	3	15	30	50	0,30	2	0,60
2. punto	50	3	150	300	50	3,00	2	6,00

Per il 3 e 4 punto uso lo std ¹²C concentrato

Conc std ¹²C 500 pg/μL

	Conc pg/mL	Vol siero mL	pg tot	V. da prelevare dallo standard ¹² C (μL)	Vol.finale campione (μL)	Conc pg/ul in 50 μL	V iniettato 2 μL	pg iniettati
3. punto	500	3	1500	3	50	30	2	60
4. punto	5000	3	15000	30	50	300	2	600

In questa seconda tabella (17) vengono riportati i vari passaggi per la contaminazione dei campioni di siero. Per ogni punto della curva, i due replicati sono stati contaminati con la concentrazione di riferimento indicata nella tabella 16.

Viene indicato anche il volume di Standard ¹²C prelevato per la contaminazione e quanti pg sono stati iniettati al HRGC-LRMS/MS a triplo quadrupolo.

6. Risultati della validazione del metodo analitico

6.1 Risultati della validazione per ogni coppia della curva in matrice

Attraverso l'utilizzo del HRGC-LRMS/MS a triplo quadrupolo è stato possibile ottenere per ogni coppia della curva in matrice i risultati riportati di seguito.

1° coppia di campioni = concentrazione di riferimento nota 5 pg/g

Tabella 18: Concentrazioni espresse in pg/g trovate nella 1° coppia di campioni di siero contaminati ad una concentrazione nota di 5 pg/g

Analiti	salmone 1a	salmone 1b
	pg/g di fresco	pg/g di fresco
P ₅ CB-OH 107	5,9	5,7
H ₆ CB-OH 138	5,8	5,5
H ₆ CB-OH 146	6,0	5,8
H ₇ CB-OH 172	5,9	5,3
H ₇ CB-OH 187	5,7	5,5

2° coppia di campioni = concentrazione di riferimento nota 50 pg/g

Tabella 19: Concentrazioni espresse in pg/g trovate nella 2° coppia di campioni di siero contaminati ad una concentrazione nota di 50 pg/g

Analiti	salmone 2a	salmone 2b
	pg/g di fresco	pg/g di fresco
P ₅ CB-OH 107	58	55
H ₆ CB-OH 138	57	54
H ₆ CB-OH 146	60	56
H ₇ CB-OH 172	58	52
H ₇ CB-OH 187	57	56

3° coppia di campioni = concentrazione di riferimento nota 500 pg/g

Tabella 20: Concentrazioni espresse in pg/g trovate nella 3° coppia di campioni di siero contaminati ad una concentrazione nota di 500 pg/g

Analiti	salmone 3a	salmone 3b
	pg/g di fresco	pg/g di fresco
P ₅ CB-OH 107	540	510
H ₆ CB-OH 138	587	540
H ₆ CB-OH 146	580	520
H ₇ CB-OH 172	523	509
H ₇ CB-OH 187	574	538

4° coppia di campioni = concentrazione di riferimento nota 5000 pg/g

Tabella 21: Concentrazioni espresse in pg/g trovate nella 4° coppia di campioni di siero contaminati ad una concentrazione nota di 5000 pg/g

Analiti	salmone 4a	salmone 4b
	pg/g di fresco	pg/g di fresco
P ₅ CB-OH 107	5147	5004
H ₆ CB-OH 138	5428	5038
H ₆ CB-OH 146	5514	5321
H ₇ CB-OH 172	5236	4958
H ₇ CB-OH 187	5118	5007

Per ogni coppia e per ogni congenere è stato possibile calcolare la media, la precisione e l'esattezza. Data la scarsa numerosità campionaria si è scelto di calcolare la precisione come differenza dei due valori trovati diviso la media dei due valori, mentre l'esattezza è stata calcolata come differenza tra il valor medio e il valore di riferimento noto. Nelle tabelle successive sono riportati i risultati di media, precisione ed esattezza per ogni coppia della curva in matrice.

1 punto : concentrazione di riferimento = 5 pg/g

Tabella 22: valori di media, precisione ed esattezza

Analiti	Media	Precisione %	Esattezza	Esattezza %
P ₅ CB-OH 107	5,8	3%	0,80	16%
H ₆ CB-OH 138	5,7	5%	0,65	13%
H ₆ CB-OH 146	5,9	3%	0,90	18%
H ₇ CB-OH 172	5,6	11%	0,60	12%
H ₇ CB-OH 187	5,6	4%	0,60	12%

La precisione percentuale varia tra il 3% e l' 11%, mentre l'esattezza oscilla tra il 12% dell'analita H₇CB-OH 172 e H₇CB-OH 187 e il 18% del H₆CB-OH 146.

Dai risultati del 1° punto della curva in matrice si nota come il metodo risulti preciso (% < del 20%) e sufficientemente esatto (valore più alto vicino al 20%).

2 punto : concentrazione di riferimento = 50 pg/g

Tabella 23: valori di media, precisione ed esattezza

Analiti	Media	Precisione %	Esattezza	Esattezza %
P ₅ CB-OH 107	57	5%	6,5	13%
H ₆ CB-OH 138	56	5%	5,5	11%
H ₆ CB-OH 146	58	7%	8,0	16%
H ₇ CB-OH 172	55	11%	5,0	10%
H ₇ CB-OH 187	57	2%	7,0	13%

I dati riscontrati nel secondo punto della curva mostrano una precisione del metodo per tutti i congeneri (tra il 2% e l'11%), mentre il metodo risulta sufficientemente esatto nell'intervallo 10% - 16%.

3 punto : concentrazione di riferimento = 500 pg/g

Tabella 24: valori di media, precisione ed esattezza

Analiti	Media	Precisione%	Esattezza	Esattezza%
P ₅ CB-OH 107	525	6%	25	5%
H ₆ CB-OH 138	564	8%	64	13%
H ₆ CB-OH 146	550	11%	50	10%
H ₇ CB-OH 172	516	3%	16	3%
H ₇ CB-OH 187	556	6%	56	11%

4 punto : concentrazione di riferimento = 5000 pg/g

Tabella 25: valori di media, precisione ed esattezza

Analiti	Media	Precisione %	Esattezza	Esattezza %
P ₅ CB-OH 107	5076	3%	76	2%
H ₆ CB-OH 138	5233	7%	233	5%
H ₆ CB-OH 146	5418	4%	418	8%
H ₇ CB-OH 172	5097	5%	97	2%
H ₇ CB-OH 187	5063	2%	63	1%

Per il 3° e 4° punto della curva si nota come i dati di precisione e di esattezza per tutti i congeneri siano migliori di quelli trovati per i primi due punti della curva. Si evidenzia come la precisione per il 3° punto oscilla tra il 3% e l'11% mentre l'esattezza percentuale oscilla tra il 3% e 13%. Valori simili si trovano per il 4° punto della curva (precisione tra il 2% e il 7% e l'esattezza tra l'2% e l'8%). Questi dati sottolineano come il metodo messo a punto risulti essere più affidabile a concentrazioni più elevate (500 pg/g e 5000 pg/g) rispetto a concentrazioni più basse (5 pg/g e 50 pg/g). Un ulteriore dato di conferma della validità del metodo è riscontrabile dalle regressioni lineari dove si correlano le concentrazioni di tutti e 4 i punti di ogni singolo congenere con le concentrazioni di riferimento note per lo stesso congenere.

Di seguito vengono riportati i grafici di regressione lineare fra pg/g teorici (5,50,500,5000 pg/g) e pg/g reali (Grafici 2-3-4-5-6) per ogni singolo congenere analizzato.

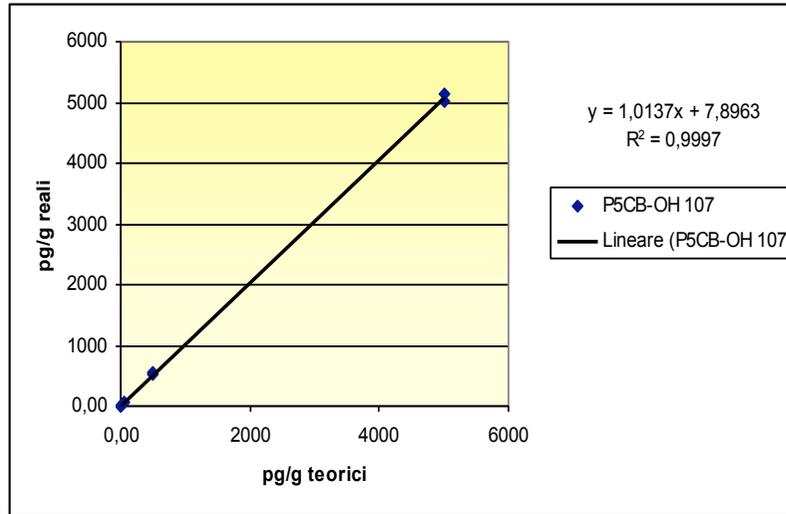


Grafico 2

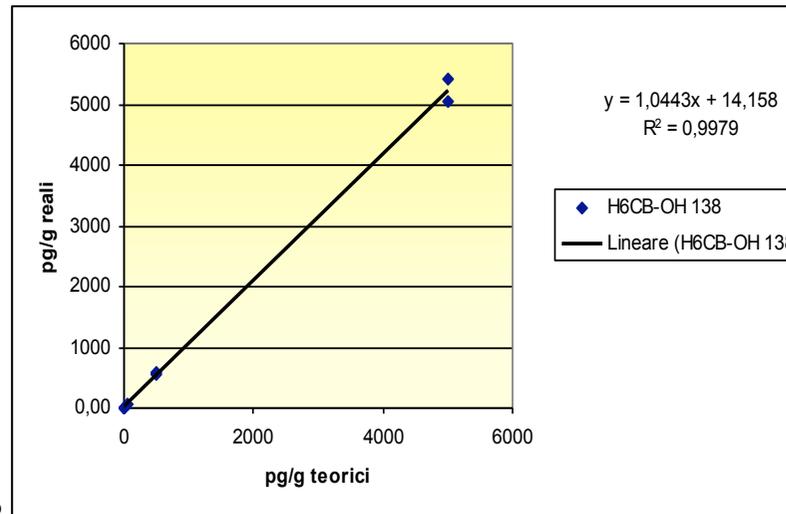
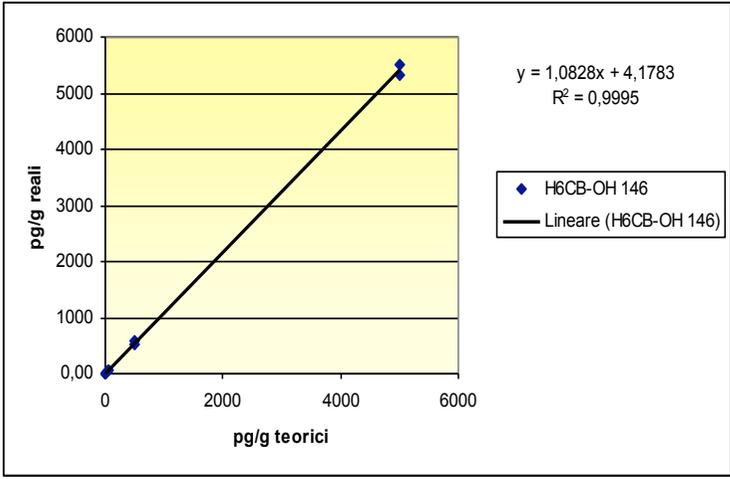
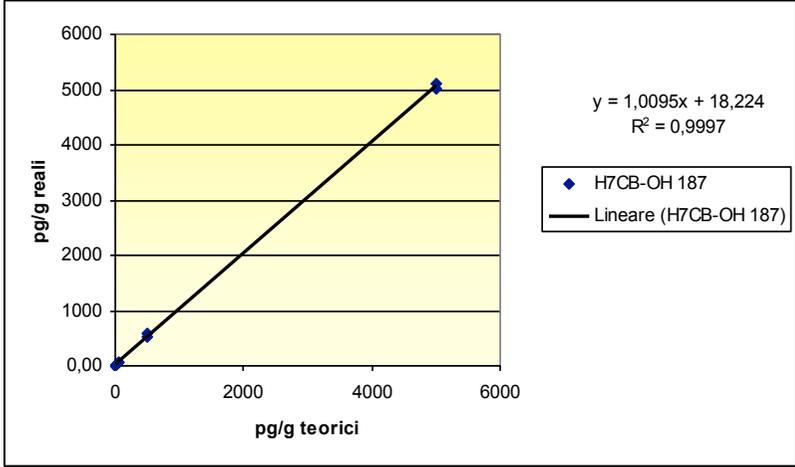
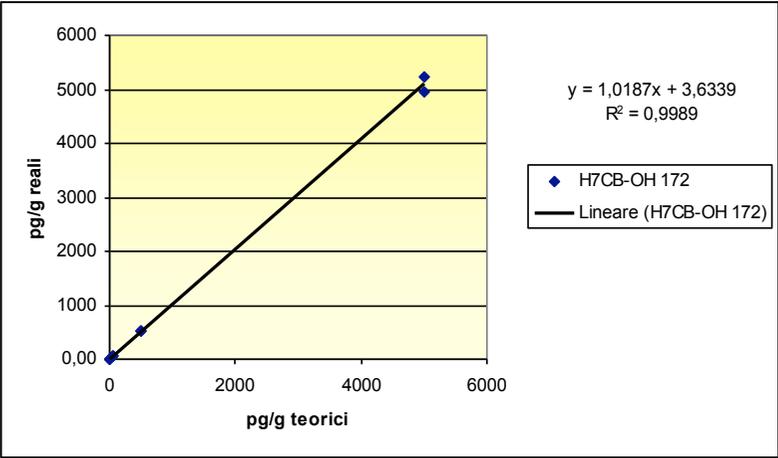


Grafico 3



Grafici 4,5 e 6



Dai grafici si nota come l' R^2 è estremamente vicino al valore 1 indicando una forte correlazione tra le due variabili prese in esame.

Dai dati presentati si può affermare che il metodo testato, attraverso l'utilizzo della curva in matrice, risulti essere preciso, esatto e lineare in tutto il range di concentrazione preso in esame.

Una volta validato il metodo analitico si è proceduto ad analizzare i restanti 25 mL circa di siero di salmone per valutare una possibile presenza di PCB e dei loro metaboliti.

Nella tabella seguente (Tabella 26) vengono riportate le concentrazioni dei congeneri di interesse e dei loro PCB parenti espressi su base grassa e su base fresca (si considera una % di grasso del 10% circa).

Tabella 26: Concentrazioni di PCB nel siero di salmone espresse in ng/g di fresco e di grasso

Analiti	ng/g fresco	ng/g grasso
P ₅ CB 118	0,02	0,21
H ₆ CB 138	0,04	0,44
H ₆ CB 153	0,06	0,64
H ₇ CB 180	0,02	0,25

Tabella 27: Concentrazioni di PCB-OH nel siero di salmone espresse in pg/g di fresco

(* , **)

Analiti	pg/g di fresco
P ₅ CB-OH 107	3,4
H ₆ CB-OH 138	< 0,73
H ₆ CB-OH 146	5,1
H ₇ CB-OH 172	< 1,3
H ₇ CB-OH 187	3,8

* LOD (limit of detection) = 0.73

** LOQ (Limit of quantification) = 2.19

I dati mostrano come i valori di PCB-OH siano molto bassi, al limite del primo punto della curva in matrice indice di una presenza minima di questi inquinanti. Per quanto riguarda i PCB notiamo valori che variano tra 0,02 e 0,06 ng/g di fresco, valori maggiori rispetto ai metaboliti. I dati dei PCB su base grassa sono riportati perché questi composti sono altamente lipofili e le loro concentrazioni nelle matrici analizzate vengono sempre riportate in relazione al grasso.

6.2 Analisi del campione di siero di salmone con lo spettrometro di massa ad alta risoluzione accoppiato al gas cromatografo ad alta risoluzione (HRGC-HRMS)

Il reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità ha messo a disposizione per questa tesi di dottorato la possibilità di utilizzare un'ulteriore strumentazione per poter confermare l'adeguatezza della scelta dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo per le analisi strumentali dei PCB-OH metilati nei campioni di siero di pesce, soprattutto riguardo all'alto livello di sensibilità strumentale richiesto per la rilevazione di tali sostanze presenti nella matrice in studio in quantità dell'ordine di pg/g

A tale scopo è stato scelto di utilizzare uno spettrometro di massa ad alta risoluzione che è lo strumento di elezione per l'analisi delle sostanze organiche persistenti a livelli di fg/ μ L. Le sue caratteristiche principali sono infatti:

- elevata sensibilità
- elevato rapporto segnale/rumore
- basso limite di determinazione
- basso limite di quantificazione

La HRGC-HRMS è inoltre la tecnica utilizzata nelle analisi di conferma per il controllo dei livelli di sostanze organiche persistenti negli alimenti (UE N. 252/2012). Tuttavia recenti studi (Iacovella et al., 2010; Ingelido et al., 2011) hanno valutato le prestazioni della HRGC-LRMS/MS concludendo che l'uso della MS/MS permette di raggiungere risultati paragonabili a quelli ottenuti in HRGC-HRMS nell'analisi di diossine e PCB. In seguito è stato costituito dal laboratorio europeo di riferimento per l'analisi di Diossine e PCB negli alimenti un gruppo di lavoro sull'utilizzo di nuove tecniche per la determinazione di diossine e PCB in alimenti e mangimi (Core Working Group "Possible use of new MS techniques/instruments for determination of dioxins and PCBs in feed and food"), che ha concluso che anche la HRGC-LRMS/MS oltre alla HRGC-HRMS può essere utilizzata come metodo di conferma nelle analisi ufficiali di diossine e PCB negli alimenti (Kotz et al., 2012).

Lo spettrometro di massa ad alta risoluzione utilizzato è stato il DFS High Resolution GC/MS della Thermo Scientific.

L'iniezione di un campione di siero di salmone in HRGC-HRMS non ha fornito risultati migliori di quelli ottenuti con la HRGC-LRMS/MS, anzi la risposta strumentale è risultata peggiore a causa principalmente dell'interferenza del fondo che ha determinato un rapporto segnale/rumore più basso di quello ottenuto in HRGC-LRMS/MS.

Tale risultato sembrerebbe indicare che l'HRGC-HRMS non appare essere lo strumento più adatto per l'analisi dei PCB-OH metilati in siero di pesce con questo metodo. Questo risultato è coerente con quanto riscontrato in letteratura poiché le tecniche strumentali utilizzate in questo tipo di studi sono la HRGC-LRMS in NCI e l'HRGC-HRMS/MS (Hovander et al. 2002, Safe et al., 1995).

7. Analisi di campioni reali

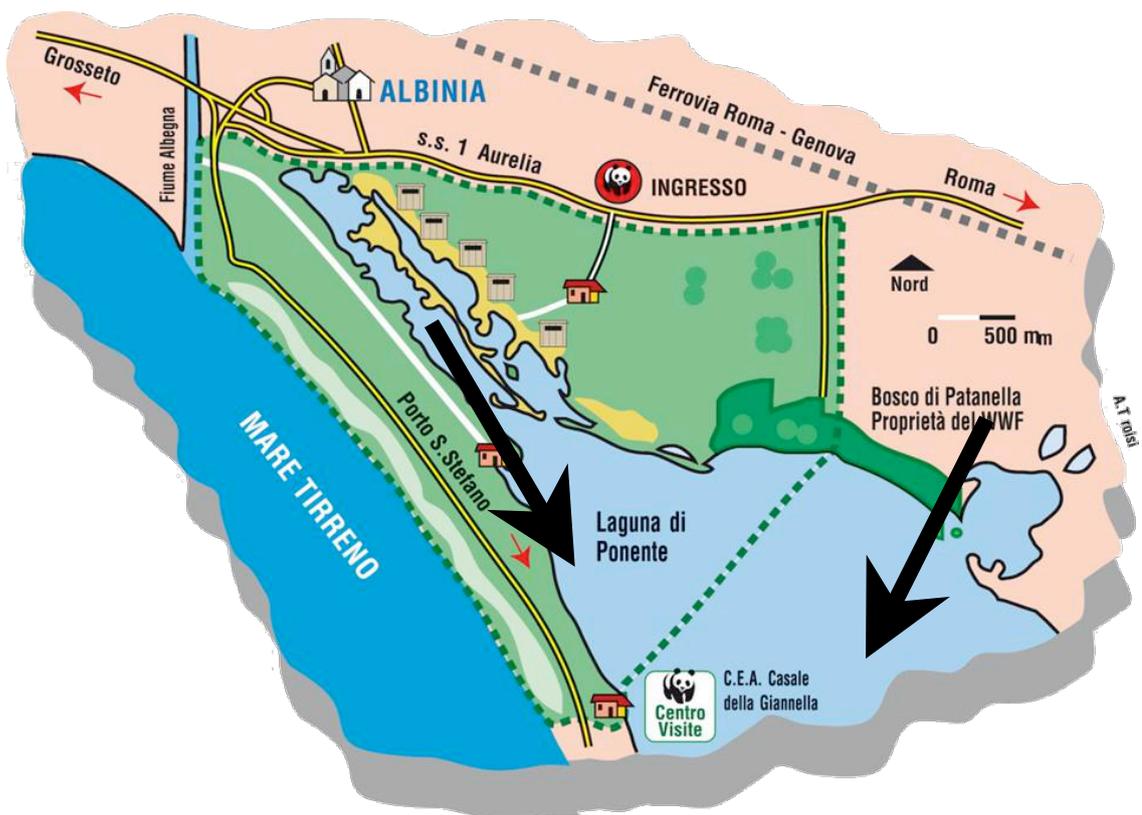
I campioni reali analizzati sono stati ottenuti sia da pesci di allevamento che da pesci pescati. Le due specie di pesci allevati sono state le orate e i branzini provenienti dalla laguna di Orbetello, mentre sono state scelte quattro specie di pesci selvatici (tombarello, pesce spada, palamita, tonno) provenienti da Bagnara Calabra, Porto Palo, Monopoli.

7.1 Laguna di Orbetello

I campioni di orate e branzini sono stati analizzati come pool di sieri, provenienti dalla laguna di Orbetello (Figura 21).

La Laguna di Orbetello è situata sulla costa meridionale della Toscana e rappresenta uno dei più importanti bacini salmastri italiani. Ha una estensione complessiva di circa 2.700 ettari ed una profondità media di circa 1m, morfologicamente presenta un aspetto triangolare, i cui lati sono costituiti dal tombolo di Giannella ad ovest, dal tombolo di Feniglia a sud e dalla costa toscana ad est.

Figura 21: Laguna di Orbetello*



*fonte: segniditerra.net

Tre canali assicurano lo scambio idrico con il mare: il canale Ansedonia per la laguna di Levante ed i canali Nassa e Fibbia per la laguna di Ponente; quest'ultimo, in particolare, mette in comunicazione le acque lagunari con quelle del fiume Albegna, che sfocia nella costa toscana, immediatamente a nord della laguna di Orbetello.

Le due lagune si sviluppano su una superficie rispettivamente pari a 1500 ettari e 1200 ettari e sono comunicanti tra loro in diversi punti. La genesi della laguna è il risultato di una lenta evoluzione che solo in tempi storici, con il completamento del tombolo della Giannella, ha raggiunto l'assetto attuale. L'intera area, pur essendo di dimensioni relativamente modeste, presenta un notevole grado di complessità, in termini di morfologia e di dinamica dei processi ambientali che la caratterizzano.

La laguna di Orbetello, insieme a tutte le aree umide circostanti, riveste una grande importanza non solo dal punto di vista economico, poiché produttrice di orate e branzini a livello nazionale ma anche naturalistico e conservazionistico.

Nella parte orientale della laguna di ponente è presente il sito di bonifica di interesse nazionale (SIN) di Orbetello – Area ex Sitoco , un'area di laguna ed un'area a terra in cui sono presenti anche gli impianti e i depositi dismessi della Società ex Sitoco, ad oggi di proprietà della Società Laguna Azzurra S.r.l. e l'area lagunare ad essa prospiciente.

Nello stabilimento ex Sitoco si producevano, fino al 1991, fertilizzanti granulari fosforati, acido nitrico ed acido solforico. Il processo produttivo di quest'ultimo prevedeva l'impiego di pirite, dal cui arrostitimento si producevano come prodotti di scarto ceneri di pirite ricche di impurità come metalli pesanti e metalloidi (As, Pb, Zn e Cd). Il SIN ad oggi è stato caratterizzato sia per l'area lagunare che per l'area a terra. Le problematiche legate alla valutazione dello stato di contaminazione e dello stato ecologico della laguna di Orbetello richiedono un articolato e approfondito piano di indagini, che vede la necessità di elaborare un progetto volto ad estendere il livello conoscitivo fino ad ora raggiunto, per meglio definire il quadro ambientale del "sistema laguna" nel suo complesso e, contestualmente, per stabilire gli eventuali interventi di bonifica e riqualificazione ambientale, nonché per perseguire gli obiettivi specifici contenuti nella Direttiva 2000/60/CE per questa tipologia di corpo idrico (ICRAM, 2005).

Tale zona è risultata essere interessante per lo studio, poiché nonostante non ci siano rilevanze scientifiche della presenza di un inquinamento da PCB/PCB-OH nella laguna, in essa sono presenti innumerevoli allevamenti di orate e branzini che vengono poi smistati nei mercati italiani.

I due pool di siero, di circa 6 mL di volume ognuno, sono stati fortificati con gli standard interni ^{13}C di PCB e di PCB-OH e sono stati sottoposti ad analisi. Si è proceduto alla determinazione dei contaminanti attraverso l'uso del HRGC-LRMS a triplo quadrupolo.

Tutti i congeneri dei PCB-OH sono risultati essere al di sotto del limite di rilevabilità nei due pool, mentre è stato possibile quantificare i PCB parenti di interesse, le cui concentrazioni, espresse in ng/g di base fresca sono di seguito riportate (Tabella 28).

Tabella 28: Concentrazioni dei PCB nell'orata e nel branzino espresse in ng/g di base fresca

Analiti	ng/g orata	ng/g branzino
P ₅ CB 118	0,07	0,06
H ₆ CB 138	0,12	0,17
H ₆ CB 153	0,17	0,29
H ₇ CB 172	0,06	0,10
H ₇ CB 187	0,06	0,09

Facendo riferimento a una % media di grasso del 6% sia per le orate che per i branzini di allevamento, si possono ricavare le concentrazioni di PCB in ng/g di base grassa, di seguito riportate.

Tabella 29: Concentrazioni dei PCB nell'orata a e nel branzino espresse in pg/g di base grassa

Analiti	pg/g orata	pg/g branzino
P ₅ CB 118	0,12	0,10
H ₆ CB 138	0,21	0,29
H ₆ CB 153	0,28	0,49
H ₇ CB 172	0,10	0,18
H ₇ CB 187	0,11	0,15

Le concentrazioni di PCB su base grassa di orate e branzini risultano essere più basse di quelle riscontrate nel salmone di allevamento. Il fatto che in questa ultima specie (per la quale era disponibile un volume di siero di circa 25 mL) sia stato possibile quantificare i PCB-OH indica che volumi di siero di alcuni mL, quali quelli ragionevolmente reperibili da specie di dimensioni inferiori a quelle del salmone, impediscono una determinazione adeguata dei PCB-OH ai valori correnti di contaminazione da PCB.

7.2 Bagnara Calabria-Porto Palo-Monopoli

E' stato possibile analizzare i PCB e PCB-OH anche in residui di campioni di siero di pesce già presenti nel Reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità, prelevati nell'ambito di uno studio ISS su prodotto ittico nazionale. Questi campioni, provenienti da diverse specie di pesci, sono stati precedentemente utilizzati per studi immunologici. Le specie disponibili sono state molte (tombarello, palamita, pesce spada, tonno, gamberi, alici, triglia, nasello, scampo, sgombro, sarda). Di queste si sono analizzati i sieri di Tombarello, Palamita, Pesce Spada e Tonno, provenienti da tre diverse zone italiane, perché posizionandosi agli ultimi livelli della catena alimentare è molto probabile che siano caratterizzati da elevate concentrazioni di PCB e quindi c'è una maggiore probabilità di poterne rilevare i metaboliti. Di seguito sono riportate le concentrazioni di PCB e dei loro metaboliti per tutte e quattro le specie di pesci e per le tre zone analizzate.

Legenda:

BC = Bagnara Calabria

PP =Porto Palo

MO = Monopoli

Tabelle 30 e 31: Concentrazioni di PCB e PCB-OH nel tombarello espresse in ng/g di base fresca

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB 118	H ₆ CB 138	H ₆ CB 153	H ₇ CB 180	H ₇ CB 187
BC	tombarello	0,10	0,28	0,45	0,23	0,19
BC	tombarello	0,50	1,23	2,25	0,86	0,81
PP	tombarello	0,26	0,42	0,75	0,33	0,26

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB-OH 107	H ₆ CB-OH 138	H ₆ CB-OH 146	H ₇ CB-OH 172	H ₇ CB-OH 187
BC	tombarello	0,02	0,01	0,05	0,03	0,04
BC	tombarello	0,10	0,04	0,22	0,09	0,16
PP	tombarello	0,05	0,01	0,08	0,04	0,05

Tabelle 32 e 33: Concentrazioni di PCB e PCB-OH nella palamita espresse in ng/g di base fresca

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB 118	H ₆ CB 138	H ₆ CB 153	H ₇ CB 180	H ₇ CB 187
BC	palamita	0,23	0,53	0,86	0,46	0,29
MO	palamita	1,29	2,29	4,21	2,84	1,28
MO	palamita	0,05	0,15	0,24	0,10	0,08
PP	palamita	1,53	2,90	6,11	4,32	2,40

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB-OH 107	H ₆ CB-OH 138	H ₆ CB-OH 146	H ₇ CB-OH 172	H ₇ CB-OH 187
BC	palamita	0,05	0,02	0,09	0,05	0,06
MO	palamita	0,26	0,07	0,42	0,31	0,26
MO	palamita	0,01	0,004	0,02	0,01	0,02
PP	palamita	0,31	0,09	0,61	0,47	0,48

Tabelle 34-35: Concentrazioni di PCB e PCB-OH nel tonno espresse in ng/g di base fresca

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB 118	H ₆ CB 138	H ₆ CB 153	H ₇ CB 180	H ₇ CB 187
BC	tonno	0,29	0,73	1,28	0,44	0,52
PP	tonno	0,18	0,50	0,91	0,47	0,33

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB-OH 107	H ₆ CB-OH 138	H ₆ CB-OH 146	H ₇ CB-OH 172	H ₇ CB-OH 187
BC	tonno	0,06	0,02	0,13	0,05	0,10
PP	tonno	0,04	0,01	0,09	0,05	0,07

Tabelle 36-37: Concentrazioni di PCB e PCB-OH nel pesce spada espresse in ng/g di base fresca

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB 118	H ₆ CB 138	H ₆ CB 153	H ₇ CB 180	H ₇ CB 187
BC	spada	0,21	0,54	0,87	0,43	0,41
PP	spada	0,16	0,38	0,63	0,30	0,27

Zona	ng/g base fresca	P ₅ CB-OH 107	H ₆ CB-OH 138	H ₆ CB-OH 146	H ₇ CB-OH 172	H ₇ CB-OH 187
BC	spada	0,04	0,02	0,09	0,05	0,08
PP	spada	0,03	0,01	0,06	0,03	0,05

Le concentrazioni di PCB e di PCB-OH per tutte le 4 specie analizzate sono risultate più alte rispetto a quelle determinate in Orate, Branzini e Salmone. Questo perché essendo specie posizionate nei livelli più alti della catena trofica hanno una maggiore capacità di bioaccumulo. Il pattern dei PCB-OH nelle specie analizzate è risultato sovrapponibile.

Questo dato potrebbe essere indicativo del fatto che il metabolismo è il principale responsabile della presenza dei PCB-OH nei pesci mentre il bioaccumulo gioca un ruolo minore.

In tutte le specie, i metaboliti più abbondanti sono stati il 4-OH CB 146 e il 4-OH CB 187. Quest'ultimo è il metabolita a maggiore abbondanza relativa, essendo il 4-OH CB 146 prodotto sia dal PCB 138 che dal PCB 153. Entrambi i metaboliti hanno caratteristiche strutturali (ossidrile in para, due atomi di cloro adiacenti al gruppo ossidrilico) che rendono massima la capacità di legarsi alla proteina di trasporto della tiroxina e di esibire quindi un'attività tireostatica.

8. Valutazione del rischio umano da esposizione a Policlorobifenili ossidrilati

8.1 Consumi italiani di prodotti ittici

L'alta resistenza alla degradazione chimica e biologica, la persistenza nell'ambiente e l'accumulo nelle catene alimentari e infine le caratteristiche tossicologiche, rendono i policlorobifenili e i loro metaboliti di particolare interesse per la salute pubblica. Oltre il 90% dell'esposizione dell'uomo ai PCB è dovuta agli alimenti (Mes et al., 1991, Svensson et al., 1991, Anderson et al., 1998, Safe, 1998, Schlummer et al., 1998) in particolar modo a quelli di origine animale (Furst et al., 1990). Pertanto, per garantire la tutela dei consumatori è importante contenere l'esposizione dell'uomo derivante dal consumo alimentare.

La Commissione Europea (Scientific Committee on Food) ha per questo raccomandato l'adozione da parte dei Paesi EU di azioni e regolamenti comuni per il controllo dei livelli di inquinanti organici persistenti nei prodotti alimentari. Tra i regolamenti attualmente in vigore che fissano i livelli massimi di concentrazione degli inquinanti organici persistenti in vari alimenti d'origine zootecnica, si riferisce in modo specifico ai PCB il Regolamento (UE) N. 1259/2011 della Commissione del 2 dicembre 2011 il quale, modificando il regolamento (CE) n. 1881/2006, ha stabilito le concentrazioni limite sia per i PCB diossina-simili che per quelli non diossina-simili.

Su richiesta della Commissione, il gruppo scientifico dell'EFSA sui contaminanti della catena alimentare, ha dato un parere sulla presenza di PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari e nei mangimi (EFSA, 2005). I livelli massimi di PCB non diossina-simili sono stati stabiliti sulla base di recenti dati riuniti nella relazione scientifica dell'EFSA intitolata «Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed» (EFSA, 2010) e si riferiscono ai 6 PCB indicatori (PCB 28, 52, 101, 138, 153 e 180) la cui somma comprende generalmente almeno la metà della quantità totale di PCB non diossina simili nei prodotti alimentari e nei mangimi (UE 1259/2011). Tale limite è stato posto uguale a 75 ng/g di peso fresco.

Al fine di poter effettuare un confronto con i valori limite della normativa abbiamo utilizzato i dati di concentrazione dei PCB ottenuti dall'analisi di tessuto muscolare (dati già presenti nel laboratorio), proveniente dalle quattro specie di pesce analizzate precedentemente per l'analisi dei PCB-OH nel siero. Di seguito vengono riportate le concentrazioni per ogni specie di pesce per le 3 zone selezionate (BC= Bagnara Calabria; MO= Monopoli, PT= Porto Palo) (Tabella 38).

Tabella 38: concentrazioni dei 6 PCB indicatori nel tessuto muscolare delle 4 specie analizzate (esprese su base fresca)

Zona	Specie	\sum 6 NDL-PCB indicatori espressi in ng/g di base fresca
BC	tombarello	10,88
BC	palamita	20,03
BC	tombarello	48,30
BC	spada	20,78
BC	tonno	27,24
MO	palamita	99,91
MO	palamita	5,42
PP	palamita	148,40
PP	tombarello	17,90
PP	spada	14,31

Si può notare dalla tabella come solamente in un esemplare di palamita e proveniente dalla zona di Monopoli e in un esemplare della stessa specie della zona di Porto Palo la concentrazione cumulativa dei 6 NDL-PCB indicatori risulti essere maggiore del limite di legge fissato dalla normativa EU (75 ng/g di fresco).

Pur nei limiti rappresentati dalla esigua numerosità campionaria, e tenendo conto della variabilità delle concentrazioni di PCB osservate in esemplari di questa specie prelevati in aree diverse, la palamita risulta pertanto essere l'unica tra le specie ittiche di interesse alimentare a cui potrebbe essere associato un problema di tipo tossicologico/sanitario. E' stato quindi stimato l'*intake*, parametro che indica l'apporto del nutriente o dell'inquinante proveniente dall'alimento consumato nel tempo (van Klaveren J.D. et al., 2012); in questo contesto è stato calcolato in base al consumo medio dell'alimento (es. nella settimana) e la concentrazione dell'inquinante nell'alimento stesso, nelle due palamite in cui sono stati riscontrati i livelli più elevati dei 6 NDL-PCB e successivamente sono stati confrontati con i valori medi di *intake* riscontrati nel report dell'EFSA sulla presenza di contaminanti nella catena alimentare (EFSA, 2005).

I valori stimati di *intake* per le due palamite con le due concentrazioni più alte dei 6 NDL PCB (99,91-148,4 ng/g di base fresco) sono risultati molto elevati (nel *range* di 60.000-100.000 ng/persona/settimana).

L'EFSA, nell'*Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European parliament related to the safety assessment of wild and farmed fish (2005)*, riferisce che la concentrazione media degli NDL PCB nel prodotto ittico generico è stimata in 12,5 ng/g su fresco (Gallani et al., 2004, EFSA 2005), mentre per i principali paesi europei (tra cui l'Italia, insieme alla Francia, alla Gran Bretagna alla Norvegia, Svezia e Olanda) è stimato un valore di *intake* medio nel *range* 42-112 ng/persona/settimana; per l'Italia il valore medio di *intake* è stato individuato in 70 ng/persona/settimana. Si nota come i valori di *intake* per le due palamite siano molto più elevati rispetto ai valori indicati dall'EFSA. Questi dati potrebbero essere indicativi di un problema tossicologico per l'uomo (effetti sulla tiroide, sul fegato, problemi immunologici, estrogenici, effetti sul sistema neuro-comportamentale) pur nei limiti rappresentati dalla esigua numerosità campionaria, e tenendo conto della variabilità delle concentrazioni di PCB osservate in esemplari di questa specie prelevati in aree diverse. (Byrne et al., 1987, Gray et al., 1993, Linder et al., 1974, Tryphonas et al., 1986,1989,1991, Levin et al., 1988). Infatti il pesce pur fornendo proteine di elevato valore biologico, bilanciate nella composizione in aminoacidi essenziali, ricche di metionina e lisina che rende tale alimento importante per la dieta dell'uomo (Irepa, 2010, ISTAT, 2010), se contaminato da sostanze pericolose per la salute dell'uomo (come i PCB), può essere considerato un'importante fonte di esposizione (Levenson et al., 2006, Smith et al., 2005).

Non esiste però a tutt'oggi per gli NDL PCB nel pesce consumato dall'uomo una dose massima superata la quale la popolazione può manifestare questi effetti tossici; questo ci impedisce di concretizzare l'ipotesi di manifestazione dell'effetto dannoso.

8.2 Valutazione del rischio per l'uomo da PCB-OH

Esistendo un rischio per la salute dell'uomo da consumo di pesce contaminato sono stati studiati criteri di valutazione del rischio stesso che hanno lo scopo di garantire un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente. La valutazione del rischio rientra nell'analisi del rischio che è un processo particolarmente articolato che prevede l'identificazione di un agente tossico, la sua caratterizzazione tossicologica e, infine, la raccolta di tutti i provvedimenti di carattere scientifico, politico, etico ed economico da attuare.

Si è soliti distinguere l'analisi del rischio (risk analysis) in tre parti (WHO,1993):

1. valutazione del rischio (risk assessment): è il processo di stima e caratterizzazione del rischio per la salute umana derivante da agenti chimici, fisici, biologici;
2. gestione del rischio (risk management): è il processo di unione di dati scientifici con problemi sociali, economici, politici ed etici che porta alla stesura di leggi o decisioni da adottare per limitare o abbattere il rischio per l'uomo;
3. comunicazione del rischio (risk communication): è il processo di informazione dell'opinione pubblica sul rischio e di tutte le strategie da attuare per il suo controllo.

La valutazione del rischio è quindi uno step critico dell'analisi del rischio che prevede la raccolta di dati tossicologici, sia sperimentali che epidemiologici, ai fini di identificare 4 parametri che sono riportati di seguito (EPA 1986, EPA 1991, EPA 1992):

- Identificazione del rischio
- Caratterizzazione della relazione dose-risposta
- Caratterizzazione dell'esposizione
- Caratterizzazione del rischio

Partendo da questi 4 punti si è cercato di svolgere, per questa tesi di dottorato una stima del possibile rischio per l'uomo associato all'esposizione alimentare da PCB-OH.

La valutazione del rischio derivante per l'uomo dall'impiego di una sostanza chimica necessita in primo luogo della determinazione della sua tossicità in diverse condizioni sperimentali ed utilizzando diversi sistemi biologici (modelli animali *in vivo*, mentre *in vitro* linee cellulari, colture cellulari di mammifero, frazioni subcellulari di organo) (Testai, 2008) , in secondo luogo della estrapolazione dei dati così ottenuti all'uomo.

8.2.1 Calcolo dell'*intake* per la palamita, tonno, spada, tombarello

Alla luce dei dati di consumo del prodotto ittico e dei livelli dei contaminanti organici persistenti riscontrati nelle specie analizzate è stato possibile valutare, per quanto riguarda i PCB, l'*intake* prendendo come concentrazioni nell'alimento quelle determinate nel muscolo. Per quanto riguarda i PCB-OH, avendo a disposizione solo i dati sul siero si è ipotizzato il calcolo dell'*intake*, non sapendo come questi metaboliti si comportino passando dal prodotto ittico all'uomo.

L'*intake* è stato calcolato partendo dai consumi medi/settimanali/persona del pesce e dei prodotti ittici nei bambini, nelle donne e nell'uomo (Tabella 39, Inran 2011) residenti nel sud Italia e nelle Isole in quanto le specie ittiche analizzate erano state catturate in Puglia, Calabria e Sicilia.

Di seguito sono riportati i consumi medi settimanali dei prodotti ittici.

Tabella 39: Stime di consumo di prodotto ittico fresco e congelato nella popolazione del sud Italia ed Isole, solo consumatori (Inran, 2011)

Solo Consumatori	Età (anni)	Peso corporeo (media) (kg)	Consumo medio di prodotti ittici (g/settimana/persona)
bambini	3-10	23,1	469
donne	18-64	67,2	602
uomini	18-64	82	626

L'*intake* è stato calcolato moltiplicando i consumi medi di ogni categoria con la concentrazione minima e massima dei 6 PCB indicatori per ogni specie analizzata. Questo ha portato ad avere 2 stime di *intake*, una minima e una massima. A seguire sono riportati i risultati per la palamita, tonno, spada, tombarello (da Tabella 40 a Tabella 43).

Tabella 40 palamita	Categoria	Intake ng/settimana/persona
	Bambini*	804,328
	Donne*	3262,83
	Uomini*	3392,92
	Bambini**	69.599
	Donne**	89.336
	Uomini**	92.898

* valori minimi di intake
** valori massimi di intake

Tabella 41 tonno	Categoria	Intake ng/settimana/persona
	Bambini*	9802,1
	Donne*	12581,8
	Uomini*	13083,4
	Bambini**	12775,56
	Donne**	16398,48
Uomini**	17052,24	

* valori minimi di intake
** valori massimi di intake

Tabella 42 spada	Categoria	Intake ng/settimana/persona
	Bambini*	6711,39
	Donne*	8614,62
	Uomini*	8958,06
	Bambini**	9745,82
	Donne**	12509,56
Uomini**	13008,28	

* valori minimi di intake
** valori massimi di intake

Tabella 43 tombarello	Categoria	Intake ng/settimana/persona
	Bambini*	5102,72
	Donne*	6549,76
	Uomini*	6810,88
	Bambini**	22652,7
	Donne**	29076,6
Uomini**	30235,8	

* valori minimi di intake
** valori massimi di intake

Per quanto riguarda la valutazione dell'*intake* per i PCB-OH sono state utilizzate le concentrazioni minime e massime (su base fresca) di ogni singolo congenere, per tutte le specie di pesce. Di seguito vengono ricordate (paragrafo 7.2) le concentrazioni che erano state determinate in precedenza (da Tabella 44 a Tabella 47).

Tabella 44 tombarello	Congenere	Concentrazione _{min} ng/g	Concentrazione _{max} ng/g
	P ₅ CB-OH 107	0,01	0,10
	H ₆ CB-OH 138	0,01	0,04
	H ₆ CB-OH 146	0,05	0,22
	H ₇ CB-OH 172	0,03	0,09
	H ₇ CB-OH 187	0,04	0,16

Tabella 45 palamita	Congenere	Concentrazione _{min} ng/g	Concentrazione _{max} ng/g
	P ₅ CB-OH 107	0,01	0,31
	H ₆ CB-OH 138	0,004	0,09
	H ₆ CB-OH 146	0,02	0,61
	H ₇ CB-OH 172	0,01	0,47
	H ₇ CB-OH 187	0,02	0,48

Tabella 46 tonno	Congenere	Concentrazione _{min} ng/g	Concentrazione _{max} ng/g
	P ₅ CB-OH 107	0,04	0,06
	H ₆ CB-OH 138	0,01	0,02
	H ₆ CB-OH 146	0,09	0,13
	H ₇ CB-OH 172	0,05	0,05
	H ₇ CB-OH 187	0,07	0,10

Tabella 47 spada	Congenere	Concentrazione _{min} ng/g	Concentrazione _{max} ng/g
	P ₅ CB-OH 107	0,04	0,04
	H ₆ CB-OH 138	0,01	0,02
	H ₆ CB-OH 146	0,06	0,09
	H ₇ CB-OH 172	0,03	0,09
	H ₇ CB-OH 187	0,05	0,08

Nelle tabelle successive (da Tabella 48 a Tabella 51) vengono riportate i valori di *intake* per il tombarello, spada, tonno e palamita e per tutti i congenere analizzati.

Tabella 48 palamita (ng/settimana/persona)	Categoria	P₅CB-OH 107	H₆CB-OH 138	H₆CB-OH 146	H₇CB-OH 172	H₇CB-OH 187
	Bambini*	4,69	1,876	9,38	4,69	9,38
	Donne*	6,02	2,408	12,04	6,02	12,04
	Uomini*	6,26	2,504	12,52	6,26	12,51
	Bambini**	145,39	42,21	286,09	220,43	225,12
	Donne**	186,62	54,18	367,22	282,94	288,96
	Uomini**	194,06	56,34	381,86	294,22	300,48
* valori minimi di intake ** valori massimi di intake						

Tabella 49 tonno (ng/settimana/persona)	Categoria	P₅CB-OH 107	H₆CB-OH 138	H₆CB-OH 146	H₇CB-OH 172	H₇CB-OH 187
	Bambini*	18,76	4,69	42,21	23,45	32,83
	Donne*	24,08	6,02	54,18	30,1	42,14
	Uomini*	25,04	6,26	56,34	31,3	43,82
	Bambini**	28,14	9,38	60,97	23,45	46,9
	Donne**	36,12	12,04	78,26	30,1	60,2
	Uomini**	37,56	12,52	81,38	31,3	62,6
* valori minimi di intake ** valori massimi di intake						

Tabella 50 spada (ng/settimana/persona)	Categoria	P₅CB-OH 107	H₆CB-OH 138	H₆CB-OH 146	H₇CB-OH 172	H₇CB-OH 187
	Bambini*	18,76	4,69	28,14	14,07	23,45
	Donne*	24,08	6,02	36,12	18,06	30,1
	Uomini*	25,04	6,26	27,56	18,78	31,3
	Bambini**	18,76	9,38	42,21	23,45	37,52
	Donne**	24,08	12,04	54,18	30,1	48,16
	Uomini**	25,04	12,52	56,34	31,3	50,08
* valori minimi di intake ** valori massimi di intake						

Tabella 51 tombarello (ng/settimana/persona)	Categoria	P₅CB-OH 107	H₆CB-OH 138	H₆CB-OH 146	H₇CB-OH 172	H₇CB-OH 187
	Bambini*	4,69	4,69	23,45	14,07	18,76
	Donne*	6,02	6,02	30,01	18,06	24,08
	Uomini*	6,26	6,26	31,3	18,78	25,04
	Bambini**	46,9	18,76	103,18	42,21	75,04
	Donne**	60,2	24,08	132,44	54,18	96,32
	Uomini**	62,6	25,04	137,72	56,34	100,16
* valori minimi di intake ** valori massimi di intake						

Si può notare come i valori di *intake* dei PCB-OH siano più bassi dei valori di *intake* dei PCB dell'ordine di 10 (*intake* minimo)/100(*intake* massimo) volte.

Ciò evidenzia che l'assunzione ipotetica di PCB-OH tramite il pesce è minima se confrontata a quella dei PCB. In ogni caso non essendoci limiti di legge per quanto riguarda le concentrazioni di NDL PCB e dei loro metaboliti nel pesce, non è possibile affermare che i valori di *intake* calcolati risultino essere valori rischiosi per la salute dell'uomo.

L'unico modo per ipotizzare un rischio per l'uomo da esposizione a PCB-OH è basarsi sui pochi dati sperimentali in *vivo* e *vitro* che dimostrano come tali composti manifestino meccanismi di tossicità per l'uomo, come viene descritto in seguito.

8.2.2 Tossicità per l'uomo dei PCB-OH

I PCB-OH sono stati rilevati nel siero umano, dove si trovano legati alle proteine plasmatiche (Sandau et al., 2000). Gli studi che forniscono più informazioni sulle concentrazioni dei diversi congeneri di PCB-OH nel siero umano sono stati effettuati per determinare l'esposizione in utero a questi inquinanti, a causa della loro attività di "endocrine active substances" (EAS) su sistemi in *vitro* e in *vivo*, riferibile essenzialmente a effetti sull'omeostasi degli ormoni tiroidei ed effetti di tipo estrogenico.

I metaboliti rilevati alle più alte concentrazioni sono il 4-OH PCB 187 > 4-OH PCB 146 > 3-OH PCB-153 > 4'OH PCB-172 > 4-OH PCB-107.

La tossicità dei PCB-OH è ben lontana da essere caratterizzata. Gli studi su modelli in *vitro* e su modello animale, pur fornendo indicazioni sul possibile meccanismo di azione, non consentono la caratterizzazione di una relazione dose-risposta e la derivazione di NOEL (o NOAEL) o benchmark dose.

Gli studi di tipo epidemiologico indicano un'associazione tra livelli di esposizione in utero a specifici PCB-OH ed effetti di tipo neuro-comportamentale sul neonato, ma non sono in grado di fornire alcun nesso causale.

Studi in vitro

- Attività di tipo tireostatico

Studi su culture cellulari hanno dimostrato che i PCB-OH con l'ossidrilico in posizione 4 e la cloro sostituzione contemporanea nelle posizioni 3 e 5 inibiscono il legame del T3 alla transtiretina. L'attività di inibizione è massima per il 4-OH-PCB187 (Kitamura et al., 2005).

- Attività di tipo estrogenico

Attività di tipo diretto: legame con i recettori per gli estrogeni.

I requisiti strutturali per questo tipo di attività sono la presenza di un ossidrilico in para su un anello e di due Cl in orto, sull'altro anello, che conferiscono alla molecola una struttura rigida non coplanare più simile a quella degli ormoni steroidei (Arulmozhiraja et al., 2005). Questo tipo di struttura non caratterizza i metaboliti a più elevata abbondanza nel siero umano. L'ossidrilico in posizione 4 e la cloro sostituzione contemporanea nelle posizioni 3 e 5 diminuiscono l'affinità di legame con i recettori per gli estrogeni.

Attività di tipo indiretto: inibizione della estrogeno-sulfotransferasi (EST)

L'attività di tipo estrogenico che si sostanzia nell'inibizione dell'enzima deputato alla rimozione degli estrogeni dai tessuti bersaglio e nel conseguente aumento della concentrazione di estrogeni a livello locale è massima per i PCB-OH con il gruppo ossidrilico in posizione -para con i due atomi di Cl adiacenti tra cui il 4-OH 3,5,3',4' tetra-CB e il 4-OH 2,3,5,3',4' penta-CB in cui il valore di IC₅₀ [concentrazione di inibitore necessaria per inibire il 50% del bersaglio] è risultata pari a 0,21-0,61 IC₅₀ (nM) per il 4-OH 3,5,3',4' tetra CB e 0,15-0,25 IC₅₀ (nM) per il 4-OH 2,3,5,3',4' penta CB (Kester et al., 2000) su esperimenti condotti su batteri *S. Typhimurium*.

Kester e collaboratori hanno notato che i composti -orto sostituiti come il 2-OH 3,4,3',4' tetra-CB e il 2-OH 4,5,3',4' tetra-CB avessero invece una minor capacità inibente l'enzima estrogeno-sulfotransferasi (EST); infatti il loro IC₅₀ è risultato >1000 (nM) per il primo PCB-OH e nel range 720-1000 nM per il secondo PCB-OH. Il 4-OH PCB107, metabolita sia del PCB 105 che del PCB 118 è risultato uno dei congeneri a maggiore inibizione della EST.

Il diverso comportamento dei PCB-OH nella loro capacità di inibizione enzimatica, a seconda della posizione del gruppo -OH, è stata dimostrata anche da Schurr (Schurr et al., 1998a,1998b) per quanto riguarda gli ormoni tiroidei. Schurr ha usato i citosol di fegato di ratto come sorgente dell'enzima e ha effettuato un saggio in vitro utilizzando la 3,3' diiodotironina (T2) marcata come substrato.

Ha osservato nello studio che i PCB-OH con maggiore attività inibente la sulfottransferasi T2 sono i PCB con il gruppo ossidrilico in posizione -para e -meta; nel suo saggio l'inibitore più potente è risultato essere il 3-OH 2,3',4,4',5 penta-CB con un IC₅₀ di 0,2 µM; per quanto riguarda i PCB-OH con il gruppo ossidrilico in posizione -orto questi sono risultati inibitori molto labili della sulfottransferasi T2.

Studi in vivo

Una riduzione dei livelli di tiroxina totale è stata osservata nel plasma fetale in ratti esposti a 4-OH-CB-107 in fase prenatale (Meerts et al., 2002), e tossicità neuro-comportamentale in ratti da esposizione in utero (Meerts et al., 2004).

8.2.3 Studi epidemiologici

E' stata osservata un'associazione tra livelli di 4-OH PCB 107 e diminuzione dei valori di Mental Development Index in neonati (Park et al., 2009). Il meccanismo possibile per la neuro-tossicità di questo congenere potrebbe essere correlato alla sua attività estrogenica.

8.2.4 Possibili effetti tossici sull'uomo in base ai valori di *intake* calcolati

Non essendo disponibili informazioni sulle concentrazioni che possono produrre effetti tossici sull'uomo, abbiamo ipotizzato un confronto tra le concentrazioni associate all'inibizione enzimatica ricavate da Kester e da Schuur con quelle derivanti dall'*intake* calcolate in questa tesi di dottorato.

Il confronto ci ha permesso di stimare un possibile effetto dei livelli di PCB-OH ipotizzabili nel corpo umano, corrispondenti ai valori di *intake* calcolati, in base alle concentrazioni che in letteratura sono state associate all'inibizione della estrogeno-sulfottransferasi.

Abbiamo quindi considerato la concentrazione del 4 OH-PCB 107 ($2,5 \times 10^{-10}$ M) (Kester et al., 2002) e (2×10^{-10} M) (Schuur et al., 1998a) e il valore di *intake* più alto del PCB-OH 107 trovato in tutte e quattro le specie da noi studiate (194,6 ng). Per poter confrontare questi dati siamo partiti dal nostro valore di *intake* convertito opportunamente in g, diviso per il peso molecolare e rapportato alla quantità di sangue che in media una persona di circa 60 kg ha nel corpo (6 L). Si ricava da questo rapporto la concentrazione massima ipotizzabile nel sangue umano per esposizione settimanale attraverso il consumo di pesce per il 4 OH-PCB 107 in moli/L (1×10^{-10} M).

Con tutte le opportune cautele, considerando che abbiamo confrontato dati in *vitro* con concentrazioni di PCB-OH ipotizzabili nel sangue umano, si può affermare, che almeno per il PCB-OH 107, le concentrazioni ematiche derivanti dall'*intake* calcolato siano di poco inferiori a quelli trovati in letteratura, ad indicare che un'assunzione media alla settimana di 194,6 ng potrebbe apportare delle alterazioni nella funzionalità della sulfottransferasi (EST). Dati di letteratura ci ricordano che nel complesso la quantità totale di PCB-OH che può essere presente nel sangue umano è pari in media al 10% (e nel *range* 5-20%) del totale dei PCB presenti (Sandau et al., 2000, Lecther et al., 2000, Sjodin et al., 2000).

E' importante sottolineare che il contributo derivante dall'assimilazione dei PCB-OH tal quali attraverso l'alimentazione è sicuramente inferiore a quello relativo alla produzione metabolica di PCB-OH dai PCB parenti.

9. Conclusioni

In questo lavoro è stato messo a punto un metodo analitico per la determinazione di policlorobifenili ossidrilati (PCB-OH) in specie ittiche di interesse alimentare.

Questi metaboliti dei PCB, rilevabili nel siero umano e nel siero di biota, sono stati studiati solo negli ultimi anni. La loro caratterizzazione tossicologica, sebbene ancora incompleta, ne ha dimostrato la capacità di alterare la fosforilazione ossidativa mitocondriale *in vitro* e *in vivo*. I PCB-OH manifestano inoltre la capacità di alterare l'omeostasi endocrina interferendo nel legame tra gli ormoni tiroidei e la trans-tiretina e a causa di una elevata affinità di legame per il recettore degli ormoni estrogeni, possono esercitare un'azione simil-estrogenica.

Si è scelto di approfondire lo studio dei PCB-OH perché questi inquinanti sono i metaboliti principali dei PCB, una classe di inquinanti a diffusione ubiquitaria, e a elevata tossicità. Poiché i PCB sono presenti nelle matrici alimentari di origine animale (il consumo delle quali determina oltre il 90% dell'esposizione umana a questi inquinanti), è ragionevole supporre che i PCB-OH siano contaminanti presenti nelle stesse matrici. In questo studio abbiamo scelto di determinare i livelli dei PCB-OH in specie ittiche. E' da rilevare che le informazioni sulla presenza di contaminanti in queste specie sono molto scarse. Tale scarsità di dati è dovuta, per quanto riguarda il pesce e in particolare per il siero di pesce, alla difficoltà di reperire quantità di questa matrice adeguate al rilevamento dei contaminanti in studio alle concentrazioni molto basse a cui questi sono presenti. Disporre di quantità elevate di siero è particolarmente complesso per le specie di piccola taglia che posseggono minime quantità di sangue e quindi di siero. Questa difficoltà è confermata anche dai pochissimi studi di letteratura in cui si sono determinati i PCB-OH nel siero di pesce; i pochi studi presenti in letteratura sono comunque stati svolti su specie ittiche di dimensioni grandi.

Obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quindi quella di mettere a punto un metodo analitico per la determinazione di questi inquinanti, e di verificare una volta validato il metodo se questi inquinanti fossero presenti in specie ittiche di interesse alimentare e valutare un possibile rischio per l'uomo.

Il metodo analitico, messo a punto su siero umano, è stato validato su siero di pesce, per verificarne l'applicabilità nel *range* di concentrazioni riscontrate in letteratura (Li et al., 2003, Campbell et al., 2003).

A tal scopo, è stato determinato il livello di contaminazione naturale della matrice nel volume di siero poi utilizzato per la curva di calibrazione. Tutti i congeneri di PCB-OH di interesse sono risultati essere al di sotto del limite di rilevabilità. E' stata quindi costruita la curva impostando 4 punti a diverse concentrazioni. Le analisi sono state effettuate tramite un gas cromatografo associato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo. La scelta di questa strumentazione si è resa necessaria per la sua elevata sensibilità e selettività rispetto al gas cromatografo associato a spettrometro di massa a singolo quadrupolo.

Le concentrazioni estremamente basse di PCB-OH rilevate nei campioni di orata e branzino hanno infatti evidenziato la necessità di utilizzare uno strumento più sensibile e selettivo del singolo quadrupolo, in grado di minimizzare le interferenze presenti in matrice migliorando il rapporto fra segnale e rumore di fondo con conseguente aumento della sensibilità dell'analisi.

Una volta validato il metodo si è proceduto a determinare la concentrazione di questi inquinanti nel siero di specie ittiche di interesse alimentare (orata, branzino, spada, tombarello, tonno, palamita). Le concentrazioni di PCB e di PCB-OH per tutte e 4 le specie pescate analizzate sono risultate più alte di quelle osservate nei campioni di orate, branzini e salmone già analizzate. Questo risultato è motivato dalla più elevata posizione delle quattro specie nella catena trofica e dal conseguente maggiore bioaccumulo. Il *pattern* dei PCB-OH nelle specie analizzate è risultato sovrapponibile. Questo dato può essere ritenuto indicativo del fatto che il metabolismo dei PCB è il principale responsabile della presenza dei PCB-OH nei pesci, mentre il bioaccumulo gioca un ruolo minore.

L'analisi dei PCB-OH è stata ripetuta utilizzando la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS) che è la tecnica analitica di elezione per l'analisi delle sostanze organiche persistenti a livelli di pg/mL. L'analisi di un campione di siero di salmone in HRGC-HRMS non ha fornito risultati migliori di quelli ottenuti con la HRGC-LRMS/MS. La peggiore risposta strumentale è stata determinata principalmente dall'interferenza del fondo che ha determinato un rapporto segnale/rumore più basso di quello ottenuto in HRGC-LRMS/MS.

Per quanto riguarda i possibili effetti tossici sull'uomo non si conoscono ancora le concentrazioni alle quali si possano determinare effetti avversi. La mancanza di dati impedisce di valutare adeguatamente il rischio per la popolazione.

Tuttavia, al fine di stimare, sia pur con grosse approssimazioni, l'esposizione umana da consumo di specie ittiche, e il possibile rischio associato, si è ipotizzato un valore di *intake* sia per PCB che per i PCB-OH conoscendo i consumi medi settimanali della popolazione del sud Italia. La scelta dei dati dei consumi è stata necessaria perché le specie sottoposte ad analisi provenivano dall'Italia meridionale e insulare.

Da questi valori di *intake* abbiamo stimato la quantità di PCB-OH che possono essere assunti con il consumo di pesce (relativamente alle quattro specie selezionate). Tale stima, pur nei limiti di alcune pesanti approssimazioni (tra cui l'assunzione che i PCB-OH ingeriti non vadano incontro a processi metabolici e di escrezione) indica che la quantità di PCB-OH derivante da *intake* alimentare, sia pur inferiore alla quantità di PCB-OH derivanti dal metabolismo di PCB, potrebbe essere entro un ordine di grandezza dalla concentrazione di questi ultimi. La concentrazione di PCB-OH risultante dai due contributi appare essere nell'intervallo di concentrazioni per le quali si sono osservate *in vitro* effetti di tipo tireostatico e simil-estrogenico.

Possiamo quindi concludere che è stato raggiunto l'obiettivo della tesi perché è stato validato il metodo analitico per la determinazione di PCB-OH in specie ittiche. Si è inoltre valutato, se pur con una numerosità campionaria non molto ampia, la presenza di questi inquinanti nel siero di specie ittiche di interesse alimentare.

Si è infine stimata, sia pur con evidenti approssimazioni, quale possa essere l'esposizione alimentare a PCB-OH derivante dal consumo delle specie ittiche alimentari per le quali erano disponibili dati di contaminazione, al fine di verificare se la concentrazione ad essa associata fosse in un *range* di concentrazioni associabili ad un effetto tossicologico.

La scarsità di risultati reperibili in letteratura sulla presenza di questi contaminanti nel biota, anche di interesse alimentare, e l'interesse tossicologico ad essi associato, rende di sicuro interesse proseguirne lo studio su diverse specie ittiche.

BIBLIOGRAFIA

- Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C. et al., 1995
Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Critical reviews in toxicology* 25, 463–531
- Anderson, P.N., Hites, R.A., 1996
OH radical reactions: The major removal pathway for polychlorinated biphenyls from the atmosphere. *Environmental Science & Technology* 30 (5), 1756–1763
- Anderson, H.A., Falk, C., Hanrahan, L., Olson, J. et al., 1998
Profiles of Great Lakes critical pollutants: a sentinel analysis of human blood and urine. *Environmental Health Perspective* 106, 279 - 289
- Andersson P.L., Blom A., Johannisson A., Pesonen M. et al., 1999
Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: in vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, August, Volume 37, Issue 2, pp 145-150
- Arulmozhiraja S., Shiraishi F., Okumura T., Iida M. et al., 2005
Structural Requirements for the Interaction of 91 Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls with Estrogen and Thyroid Hormone receptors. *Toxicologica Sciences* 84, 49-62
- Bayarri, S., Turrio Baldassarri, L., Iacovella, N., Ferrara, F., & di Domenico, A., 2001
PCDDs, PCDFs, PCBs, and DDE in edible marine species from the Adriatic sea. *Chemosphere* 43, 601-611
- Byrne, J.J., Carbone, J.P. and Hanson, E.A. 1987
Hypothyroidism and abnormalities in the kinetics of thyroid hormone metabolism in rats treated chronically with polychlorinated biphenyl and polybrominated biphenyl. *Endocrinology* 121:520-527
- Berger U., Herzke D. and Sandanger T.M., 2004
Two trace analytical methods for determination of hydroxylated PCBs and other halogenated phenolic compounds in eggs from Norwegian birds of prey. *Analytical Chemistry* 76:441-452
- Brouwer A, Van den Berg KJ. 1986
Binding of a metabolite of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl to transthyretin reduces serum vitamin A transport by inhibiting the formation of the protein complex carrying both retinol and thyroxin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 85:301–312
- Buckman A.H., Wong C.S., Chow E.A., Brown S.B. et al., 2006
Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish. *Aquatic Toxicology* 78 (2006) 176–185
- Buitenhuis C.J.K., Cnijn P.C., Velzen van M., Lillenthal H., et al. 2006
Prenatal exposure of rats to hydroxylated PCBs and some brominated flame retardants. *IVM* 06/0
- Campbell L., Muir D.G., Whittle D., Mike, Backus S. et al., 2003
Hydroxylated PCBs and Other Chlorinated Phenolic Compounds in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*) Blood Plasma from the Great Lakes Region *Environmental Science Technology*, 37, 1720-1725

Casarett & Doull's. Jun 26, 2003
Essentials of Toxicology by Curtis Klaassen and John B. Watkins III

COM 2001

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

Darling C., Alae M., Campbell L., Pcepavicius G. et al., 2004

Hydroxylated PCBs in abiotic environmental matrices: precipitation and surface waters. *Organohalogen Compounds* 66:1497-1502

Dirtu A.C., Veerle L. B. J., Cernat R. Neels H. et al., 2010

Distribution of PCBs, Their Hydroxylated Metabolites, and other phenolic Contaminants in human serum from two European countries. *Environmental Science Technology*, 44,2876-2883

di Domenico A, Zapponi G.A., 1986

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the environment: human health risk estimation and its application to the Seveso case as an example. *Regulatory Toxicology Pharmacology* Sep;6(3):248-260

Ebner K.V. Braselton W.E.Jr. 1987

Structural and chemical requirements for hydroxychlorobiphenyls to uncouple rat liver mitochondria and potentiation of uncoupling with Aroclor 1254. *Chemico-biological interactions*,63,139-155

EC 2008

Facts and figures on the CFP: http://ec.europa.eu/fisheries/publications/facts/pcp08_en.pdf

EFSA 2004

Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals

EFSA 2005

Parere del gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) in merito alla presenza di policlorodifenili (PCB) non diossino-simili nei mangimi e negli alimenti

EFSA 2010

Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed8(7):1701

EPA 1986

Guidelines for the risk Assessment of Chemicals Mixture

EPA 1991

Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment

EPA 1992

Guidelines for exposure Assessment

- EPA, 2000
Bioaccumulation testing and interpretation for the purpose of sediment quality assessment: status and needs, EPA-823-R-00-001 and Appendix, EPA-823-R-00-002
- Fängström B., Athanasiadou M., Grandjean P., Weihe P. and Bergman Å., 2002
Hydroxylated PCB Metabolites and PCBs in Serum from Pregnant Faroese Women. *Environmental Health Perspectives* Volume 110 N. 9
- Ferrara F., Funari E. 2004
Rischio chimico associato alla qualità delle acque del mare Adriatico. Rapporto finale delle attività finanziate dal Progetto MURST/CNR "Prisma 2". Rapporti ISTISAN 04/4
- Flanagan W. P. and May R.J. 1993
Metabolite detection as evidence for naturally occurring aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments. *Environmental Science & Technology*, 27:2207-2212
- Foran J.A., Carpenter D.O., Coreen H.M., Knuth B. A. et al., 2005
Risk-Based Consumption Advice for Farmed Atlantic and Wild Pacific Salmon Contaminated with Dioxins and Dioxin-like Compounds. *Environmental Health Perspectives*, 113 (5); 552-556
- Furst, P., Furst, C., Groebel, W., 1990
Levels of PCDDs and PCDFs in food-stuffs from the Federal Republic of Germany. *Chemosphere* 20, 787-792
- Gallani B., Boix A., Verstraete F., von Holst C. et al., 2004.
Dioxins and PCBs in Food and Feed: data available to the European Commission, 2004, EUR 21093 EN.
- Giesy J.P., Kannan K. 1998
Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): Implication for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 28, 511-569
- Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Marshall, R. and Andrews, J. 1993
Reproductive and thyroid effects of low-level polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure. *Fundamental and Applied Toxicology* 20(3):288-294
- Guillette LJ Jr. 2000
Organochlorine pesticides as endocrine disruptors in wildlife. *Central European journal of public health* Jul-8 Suppl:34-5
- Hansen L.G., Safe S. & Hutzinger O., 1987
In Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology-Environmental Toxin Series 1, 15-48
- Hawker DW, Connell DW., 1988
Octanol-water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environmental Science & Technology*, 22, 382-7
- Hites R.A., Foran J.A., Carpenter D.O., Coreen H.M et al., 2004
Global Assessment of Organic Contaminants in Farmed Salmon. *Science* 9 January: Vol. 303 no. 5655 pp. 226-229

- Hovander L., Athanasiadou M., Asplund L., Jensen S. and Wehler E.K., 2000
Extraction and Cleanup Methods for Analysis of Phenolic and Neutral Organohalogen in Plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol 24 November/Dicember
- Hovander L., Malmberg T., Athanasiadou M., Athanassiadis I. et al., 2002
Identification of Hydroxylated PCB Metabolites and Other Phenolic Halogenated Pollutants in Human Blood Plasma . *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 105–117
- Hou, X., Parkington, H. C., Coleman, H. A., Mechler, A. et al., 2007
Transthyretin oligomers induce calcium influx via voltage-gated calcium. *Journal of neurochemistry*. Jan;100(2):446-57
- Iacovella N, Ingelido A.M., De Felip E., Brambilla G., et al., 2010.
Triple quad GC-MS/MS technique for PCDD, PCDF, and DL-PCB determination in milk. 30th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs) - Dioxin 2010. San Antonio (Texas), 12-17
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1987, Polychlorinated biphenyls [1336-36-3]. Vol. 18, Suppl. 7
- ICRAM Febbraio 2005. CII-TO-O-03.05
- Imaeda D. , Nomiya K., Kunisie T., Iwata H. et al. 2009
Residue Levels of OH-PCBs and PCBs in the Blood of Baikal Seals (*Pusa sibirica*). *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia*, pp. 111–117
- Ingelido A.M., Brambilla G., Abballe A., di Domenico A. et al., 2011
PCDD, PCDF, AND DL-PCB analysis in food: performance evaluation of the high-resolution gas chromatography/lowresolution tandem mass spectrometry technique using consensus-based samples *Rapid Communication Mass Spectrometry*, 26, 236–242
- Inran 2011, www.inran.it
- Irepa 2010, <http://www.irepa.org/it/home.html>
- Istat 2010, I consumi delle famiglie. *Statistiche Report*
- Jansson B., Jensen S., Olsson M., Remberg L. et al., 1975
Identification by GC-MS of phenolic metabolites of PCB and p-p'-DDE isolated from Baltic guillemot and seal. *AMBIO* 4: 93-97
- Kawano M, Hasegawa J, Enomoto T, Onishi H. et al., 2005
Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs): recent advances in wildlife contamination study. *Environmental Science*.;12(6):315-24
- Kester H.A.M., Bulduk S., Tibboel D., Meini W. et al., 2000
Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(3):1142–1150

- Kitamura S., Jinno N., Suzuki T., Sugihara k. Et al., 2005
Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 208, 377-387
- Klasson-Wehler E., Bergman K., Athanasiadou M., Ludwig JP. et al., 1998
Hydroxylated and methylsulfonyl polychlorinated biphenyl metabolites in albatrosses from midway atoll, north pacific ocean. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No. 8, pp. 1620–1625, 1998
- Kotz A., Malisch R., Focant J., Eppe G. et al., 2012
Analytical Criteria for use of MS/MS for determination of dioxin and dioxin like PCBs in feed and food. *Organohalogen Compounds* Vol. 74, 156-159
- Kroes R., Muller D., lambe J., Lowik M.R.H. et al. 2002
Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology* 40, 327-385
- Kunisue T. and Tanabe S., 2009
Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the blood of mammals and birds from Japan: Lower chlorinated OH-PCBs and profiles. *Chemosphere* 74, 950–961
- Lavado R., Thibaut R., Raldua D., Martin R. et al., 2004
First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196: 247-257
- Letcher RJ, Klasson-Wehler E, Bergman Å.,2000
Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In: *The Handbook of Environmental Chemistry: New Types of Persistent Halogenated Compounds*, Vol 3:315–359
- Levenson CW, Axelrad DM., 2006
Too much of a good thing? Update on fish consumption and mercury exposure. *Nutr Rev*;64:139–145
- Levin, E.D., Schantz, S.L. and Bowman, R.E. 1988
Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys. *Archives Toxicology* 62(4):267-73
- Li H., Ken G. D., Bennet H., Haffner G.D. and Letcher R.J., 2003
Plasma-Associated Halogenated Phenolic Contaminants in Benthic and Pelagic Fish Species from the Detroit River. *Environmental Science Technology*,37, 832-839
- Lind P.M., Milnes M.R.,Lundberg R., Bermudez D. et al., 2004
Abnormal bone composition in female juvenile american alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka,Florida). *Environmental Health Perspective* 112(3): 359-362, 2004
- Linder, R.E., Gaines, T.B. and Kimbrough, R.D. 1974
The effect of polychlorinated biphenyls on rat reproduction. *Food Cosmet Toxicology* 12,63- 77
- Loomis AK, Thomas P.,1999
Effects of estrogens and xenoestrogens on androgen production by Atlantic croaker testes in vitro: evidence for a nongenomic action mediated by an estrogen membrane receptor. *Biology Reproduction*, Apr;62(4):995-1004

- Mackay D., Ying S.W. and Ching M.K. 1992
Illustrated handbook of Physical-Chemical properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Volume 1 Monoaromatic hydrocarbons, Chlorobenzenes and PCBs
- MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of UK, 1999
Dioxins and PCBs in UK and imported marine fish. Number 18
- Meerts I.A., Assink Y., Cenijin P.H., van de Berg J.H.J. et al., 2002
Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rati. *Toxicological Science* 68:361-371
- Meerts I. A.T.M., Lilienthal H., Hoving S., Jahannes H.J., et al. 2004
Developmental exposure to 4-hydroxy-2,3,3',4',5 pentachlorobiphenyl (4-OH-CB 107): Long term effects on brain development, behavior and brain stem auditory evoked potentials in rats. *Toxicological Sciences*, 82: 207-218
- Mes J., Newsome W.H., Conacher H.B.S., 1991
Levels of specific polychlorinated biphenyls congeners in fatty foods from five Canadian cities between 1986 and 1988. *Food Additives Contaminants* 8 , 351 - 361
- Mocarelli, P., Brambilla, P., Gerthoux, P.M., Patterson, D.G.Jr. and Needham, L.L., 1996
Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 348-409
- Nomiyama K., Yonehara T., Yonemura S., Yamamoto M. et al., 2010
Determination and characterization of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCB) in serum and adipose Tissue of Japanese Women Diagnosed with Breast cancer. *Environmental Science and Technology*, 44, 2890-2896
- Ochiai M., Nomiyama K., Isobe T., Yamada T. et al., 2011
Accumulation of Halogenated Phenolic Compounds in Small Toothed Whales. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Environmental Pollution and Ecotoxicology*, pp. 187–192
- Oliver, B.G., Niimi, A.J., 1988.
Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environmental Science & Technology* 22, 388 – 397
- Olsson P.E 1998
Endocrine disrupting substances-Impairment of reproduction and development.
Swedish Environmental Protection Agency.
- Olsson A., Cedere K., Bergman A. and Helander B., 2000
Nestling blood of the white-tailed sea eagle (*Haliaeetus albicilla*) as an indicator of territorial exposure to organohalogen compounds-An evaluation. *Environ.Sci.Technol.* 34:2733-2740
- Park JS, Bergman A, Linderholm L, Athanasiadou M. et al., 2008
Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere.* Feb;70(9):1676-84
- Park H.Y., Park J. S., Sovcikova E. , Kocan A. et al., 2009
Exposure to Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in the Prenatal Period and Subsequent Neurodevelopment in Eastern Slovakia *Environ Health Perspect.* 2009 October; 117(10): 1600–1606.

- Porpora, M.G., Ingelido, A.M., di Domenico, A., Ferro, A. et al., 2006
Increased levels of polychlorobiphenyls in Italian women with endometriosis. *Chemosphere* 63 (2006) 1361–1367
- Porpora, M.G., Medda, E., Abballe, A., Bolli, S. et al., 2009
Endometriosis and Organochlorinated Environmental Pollutants: A Case–Control Study on Italian Women of Reproductive Age. *Environ. Health Persp.* 117 (7), 1070-1075
- Sandala GM., Sonne-hansen C., Dieyz R., Muir D.C.G. et al., 2004
Hydroxylated and methylsulfone PCB metabolites in adipose and whole blood of polar bear (*Ursus maritimus*) from East Greenland. *Sci. Total Environ.* 331:125-141
- Sandau C.D., Ayotte P., Dewailly Eric, Duffe and Norstrom R.J., 2000
Analysis of Hydroxylated Metabolites of PCBs (OH-PCBs) and Other Chlorinated Phenolic Compounds in Whole Blood from Canadian Inuit. *Environmental Health Perspectives* V.108 N. 7 July
- Safe S., 1987
PCBs and human health. In *Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology*. Environmental Toxin Series 1, 133–145
- Safe S., Washburna K., Zacharewskia T., Phillipsa T., 1995
Synthesis and characterization of hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) identified in human serum. *Chemosphere* Volume 31, Issue 4, August 1995, Pages 3017–3023
- Safe, S.H., 1998
Development validation and problems with the toxic equivalency factor. Approach of risk assessment of dioxins and related compounds. *Journal of animal science* 76,134 - 141
- Sakiyama T., Okumura T., Kakutani N., Mori Y., 2004
Hydroxy polychlorinated biphenyls in fishes and sediments. *Proceedings of 13th Symposium on Environmental Chemistry, Shizuoka, Japan*, pp. 556-557
- Schlummer, M, Moser, G.A., McLachlan, M., 1998
Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs, and HCB in humans: mass balance and mechanistic considerations. *Toxicology and Applied Farmacology* 152, 128 - 137
- Schulz D.E., Petrick G., & Duinker J.C., 1989
Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environmental Science and Technology* 23, 852–859
- Schuur A.G., Brouwer A., Bergamn A., Coughtrie MW. et al., 1998(a)
Inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chemico-Biological Interactions* Feb 20;109(1-3):293-7
- Schuur A.G., Legger F.F., van Meeteren M.E., Moonen M.J. et al., 1998 (b)
In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons. *Chemico-Biological Interactions* Feb (20); 109 (1-3): 293:7

- Sjödén A, Hagmar L, Klasson-Wehler E, Björk J, Bergman Å., 2000
Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish Men. *Environ Health Perspect* 108:1035–1041
- Smith KM, Sahyoun NR., 2005
Fish consumption: recommendations versus advisories, can they be reconciled? *Nutrition Reviews* 63:39–46
- Svensson, B.G., Nilsson, A., Hanson, M., Rappe, C. et al., 1991
Exposure to dioxins and dibenzofurans through the consumption of fish. *The New England Journal of Medicine* 324, 8-12
- Tampal N., Lehmler H.J., Espandiari P., Malmberg T and Robertson L.W., 2002
Glucuronidation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs). *Chemical Research in Toxicology* 15: 1259-1266
- Testai E., 2008
La valutazione tossicologica e la derivazione dei valori di riferimento. Presentazione PPT, corso fitomarmaci. Istituto Superiore di Sanità, Maggio 2008
- Tryphonas L, Charbonneau S, Tryphonas H, Zawidzka, Z. et al., 1986
Comparative aspects of Aroclor 1254® toxicity in adult *Cynomolgus* and Rhesus monkeys: A pilot study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 15:159-169
- Tryphonas, H., Hayward, S., O'Grady, L., Loo J.C. et al. 1989
Immunotoxicity studies of PCB (Aroclor 1254) in the adult rhesus (*Macaca mulatta*) monkey - preliminary report. *International Journal of Immunopharmacology* 11(2):199-206
- Tryphonas, H., Luster, M.I., White, K.L. Jr., Naylor, P.H. et al., 1991
Effects of PCB (Aroclor® 1254) on non-specific immune parameters in Rhesus (*macaca mulatta*) monkeys. *International Journal of Immunopharmacology* 13:639-648
- UE 1259/2011 [Eur-lex.europa.eu](http://eur-lex.europa.eu)
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:320:0018:0023:IT:PDF>
- UNECE 1998
Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution on Persistent Organic Pollutants, Aarhus (Denmark), 24 June 1998. Convention on Long-range Transboundary Air Pollution.
http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.html
- UNEP 2001
Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Stockholm (Sweden)22
http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf
- UsBiological <http://www.usbio.net/>
- van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunstrom B. et al., 1998
Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health and Perspectives* 106, 775–92

van den Berg M., Birnbaum L., Denison M., De Vito M. et al., 2006
The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences* 93, 223–241

van Klaveren JD., Goedhart P.W., Wapperom D., van der Voet H., 2012
A European tool for usual intake distribution estimation in relation to data collection by EFSA. Question No EFSA-Q-2010-01342, Supporting Publications:EN-300

Westwell, A.D 2004
The therapeutic potential of aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonists in anticancer drug development. *Drug Fut*,29(5)479

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

Yoshimura J., Yonemoto Y., Yamada H., Koga M. et al., 1987
Metabolism in vivo of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats. *Xenobiotica* 17, 897– 910

Ringraziamenti

Il lavoro di tesi sperimentale presentato in queste pagine è stato svolto presso il Reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma.

Vorrei ringraziare Nicola Iacovella senza il quale non sarebbe stato possibile ottenere i dati sperimentali e le mie colleghe Annalisa Abballe, Annamaria Ingelido e Silvia Valentini per l'aiuto durante questi 3 anni di avventura.

Un ringraziamento va infine al Direttore di Reparto Elena De Felip e al Professore Bruno Pavoni dell'Università Ca-Foscari per avermi dato la possibilità di svolgere questo Dottorato.