

Università “Cà Foscari”
Venezia

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

**Caratterizzazione di alcune zone della laguna di Venezia,
attraverso l’identificazione dei livelli di contaminazione da
policlorobifenili (PCB) e pesticidi organoclorurati
dell’ambiente lagunare**

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

Tesi di dottorato di **Annalisa Abballe**
Matricola 955160

Coordinatore del dottorando
Prof. Bruno Pavoni

Tutore del dottorando
Prof. Bruno Pavoni

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

INDICE GENERALE

PREMESSA.....	1
SCOPO DELLA TESI.....	2
INTRODUZIONE.....	4
I policlorobifenili	6
Esaclorobenzene.....	13
Diclorodifeniltricloroetano e diclorodifenildicloroetilene	14
Scelta delle matrici in studio	18
<i>Tapes philippinarum</i>	20
Bioconcentrazione, bioaccumulo e relativi fattori	21
Fattore di Accumulo Biota-Sedimento (BSAF).....	26
Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (Kow)	26
Biomagnificazione	29
MATERIALE E METODI	
Campionamento e pretrattamento	30
Biota	
▪ Campionamento	35
▪ Pretrattamento.....	36
Sedimento	
▪ Campionamento.....	37
▪ Pretrattamento.....	41
Analisi.....	42
Aggiunta di Standard Interno (SI).....	43
Estrazione e purificazione	
▪ Biota	44
▪ Sedimento	46
Evaporazione degli estratti e trasferimento in vial d'iniezione.....	47
Analisi strumentale	48
RISULTATI E DISCUSSIONE	
PCB	
▪ Biota.....	50
▪ Sedimento	55
<i>Elaborazione statistica</i>	60
▪ Criterio di selezione dei dati	61
▪ Analisi di correlazione e regressione lineare	65
<i>Analisi dei profili</i>	
▪ Biota.....	70
▪ Sedimento	75
▪ Profili medi	79
<i>Stima del BAF</i>	81

PESTICIDI	84
▪ Biota.....	85
▪ Sedimento	87
Elaborazione statistica	
▪ Criterio di selezione dei dati	90
Analisi di correlazione	95
Analisi dei profili	95
<i>Stima del BAF</i>	96
Valutazione dell' <i>Intake</i>	97
Valutazione del rischio	97
Calcolo del LADD	98
<i>Commenti</i>	101
CONCLUSIONI	103
<i>Ringraziamenti</i>	106
BIBLIOGRAFIA	107
Allegato 1.....	118
Allegato 2.....	127

PREMESSA

Questa tesi di dottorato nasce dall'elaborazione di dati prodotti nell'ambito di un certo numero di progetti di ricerca tra l'Istituto Superiore di Sanità e diversi Enti scientifici pubblici, come il Ministero dell'Ambiente, la Regione Veneto, la Magistratura alle Acque e l'Università "Cà Foscari". I progetti erano mirati alla definizione degli scenari d'esposizione umana a microcontaminanti tossici presenti in varie matrici del sistema lagunare veneziano, nel miglioramento della stima del rischio sanitario, e nell'identificazione di eventuali misure di riduzione dell'inquinamento. Allo scopo furono condotte delle indagini atte a valutare lo stato di contaminazione del sedimento, delle acque e del biota edule. In particolare, la determinazione dei livelli nelle vongole (*Tapes philippinarum*) è risultata molto importante ai fini della valutazione di un potenziale rischio per la salute pubblica dovuto al consumo di questi molluschi.

I microcontaminanti d'interesse erano stati selezionati da famiglie chimiche note per la loro tossicità, quali: idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB), polibromobifenileteri (PBDE), policlorodibenzodiossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), pesticidi clorurati (*p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, HCB), metalli pesanti (Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Pb, Sn, Zn), sostanze metallorganiche derivate dal mercurio e dallo stagno (MeHg, TBT, DBT, MBT, TPhT, DPhT, MPhT), e radionuclidi (^{40}K , ^{137}Cs , ^{226}Ra).

Per questo lavoro di dottorato, tra tutti gli analiti studiati, sono stati selezionati i tre pesticidi organoclorurati (*p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, HCB) e alcuni dei congeneri dei PCB, quelli cioè maggiormente presenti nelle matrici ambientali studiate e più importanti dal punto di vista tossicologico.

SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di dottorato ha come obiettivo principale quello di caratterizzare alcune zone della laguna veneta, attraverso l'identificazione dei livelli di contaminazione da PCB e pesticidi organoclorurati rilevati in campioni di vongole (*Tapes philippinarum*) e di sedimenti. In particolare, il confronto tra i livelli nelle vongole e nei sedimenti permetterà di valutare l'entità del bioaccumulo dai sedimenti alla biota. Sarà quindi possibile fare un'analisi congenere-specifica e valutare se esiste una relazione struttura dipendente, che correla cioè caratteristiche chimico-fisiche dell'analita con il fenomeno del bioaccumulo. Si potrà determinare quindi la reale efficacia delle vongole *Tapes philippinarum* come indicatori della contaminazione dei sedimenti.

Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti (dati di tipo espositivo) e di importanti informazioni tossicologiche, se disponibili in letteratura, sarà possibile fare una previsione del possibile rischio associato al consumo di vongole provenienti dalla laguna.

Gli obiettivi, principale e secondari, di questo lavoro di tesi sono riassunti nel seguente diagramma di flusso (Fig.1).

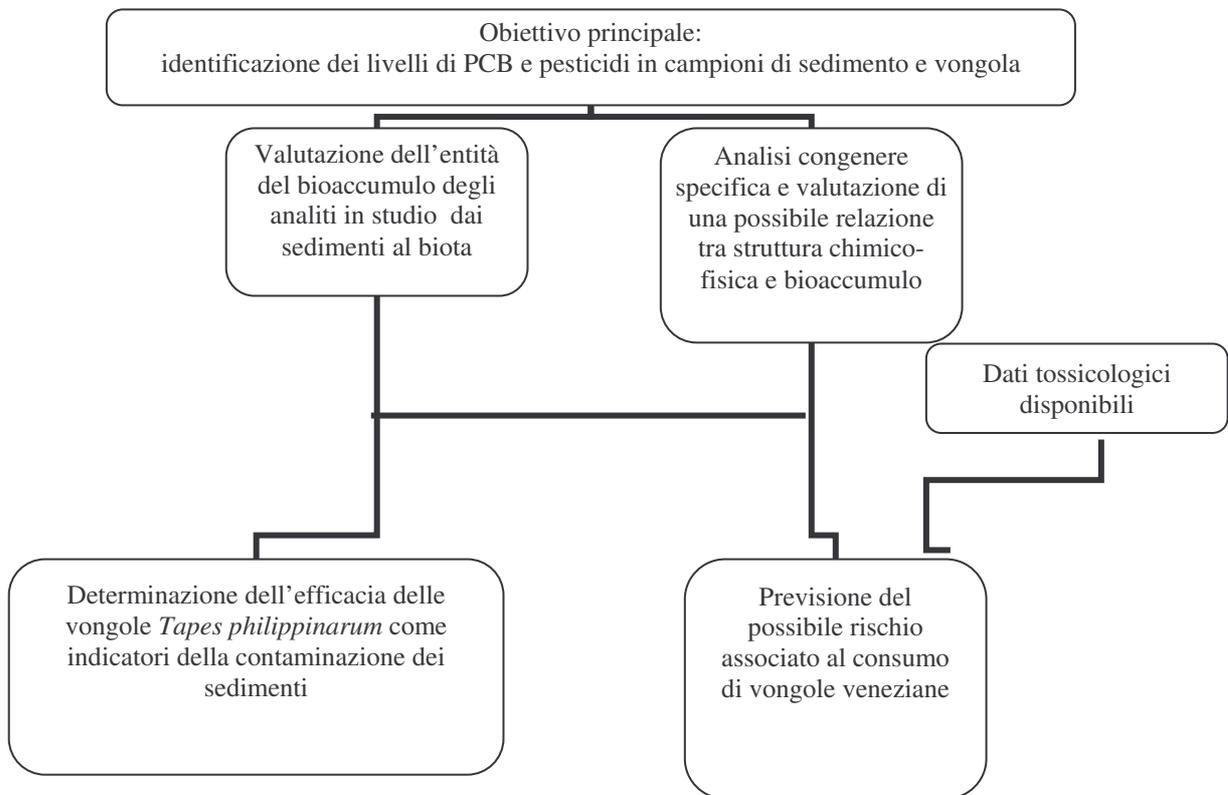


Fig. 1. Rappresentazione grafica degli obiettivi della tesi.

INTRODUZIONE

La laguna di Venezia ha un'estensione di circa 550 km² e una profondità media inferiore a 1 m. Situata in un'area geografica a elevata antropizzazione, essa è sottoposta all'azione di numerosi inquinanti che, contaminando il materiale biologico vivente e accumulandosi nella catena alimentare, provocano l'esposizione della popolazione della regione circostante a diversi microcontaminanti tossici. Le principali fonti d'inquinamento sono le immissioni di acque di scarichi urbani e industriali, cui si sommano acque di dilavamento di terreni agricoli provenienti da attività esercitate sulla terraferma. La laguna è, inoltre, continuamente percorsa da imbarcazioni a motore che contribuiscono al suo carico inquinante. Un altro fattore di rischio è costituito dal limitato ricambio del corpo idrico, in quanto la laguna comunica con il mare aperto solamente in tre punti: le bocche di porto di Lido (o di San Nicolò), Malamocco, e Chioggia, che collegano rispettivamente il bacino settentrionale, centrale, e meridionale (Fig. 2).



Fig. 2. La laguna veneta: sono ben visibili la bocca di Lido, la bocca di Malamocco e la bocca di Chioggia, unici accessi al mare aperto.

La laguna di Venezia rappresenta un ecosistema con una lunga storia di impatto antropico, prevalentemente fisico, ma solo negli ultimi quindici anni sono stati riconosciuti i problemi ambientali dovuti all'inquinamento chimico, in particolare all'accumulo di inquinanti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants, POPs) nei sedimenti e negli organismi. Queste sostanze sono caratterizzate da emivite ambientali molto lunghe nel suolo e nei sedimenti (> 6 mesi), determinate da un'elevata stabilità chimica che consente loro di resistere ai comuni processi di degradazione ambientali quali idrolisi, reazioni redox, fotolisi, reazioni microbiologiche. I POP hanno inoltre bassa pressione di vapore (< 1000 Pa), e marcata solubilità nei grassi, espressa da un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}) molto elevato ($>10^5$). Quest'ultima

caratteristica, insieme a una notevole persistenza biologica, determina un elevato potenziale per il bioaccumulo e per la biomagnificazione, ovvero un aumento dei livelli di concentrazione attraverso le catene trofiche [UNECE].

La fabbricazione e l'uso di queste sostanze è regolata dalla Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants POP) che si prefigge di ridurre al minimo le emissioni globali di queste sostanze nell'ambiente. La Convenzione è stata ratificata dalla Svizzera il 30.07.2003 ed è entrata in vigore il 17.05.2004 [Convenzione di Stoccolma].

I policlorobifenili

Con il termine bifenili policlorurati o policlorobifenili (PCB) si designa una miscela di idrocarburi clorurati usata dal 1930 per diversi scopi industriali. Hanno una struttura composta da due anelli benzenici uniti da un legame singolo carbonio-carbonio. Gli atomi di idrogeno degli anelli che possono essere sostituiti da un atomo di cloro variano da uno a dieci (Fig. 3).

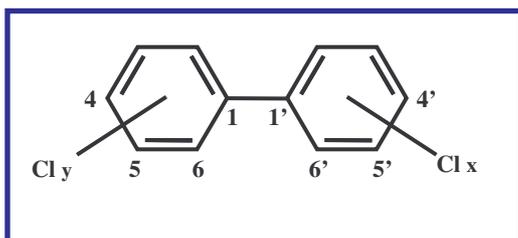


Fig. 3. Struttura generale dei policlorobifenili (PCB)

Questa struttura fa sì che i PCB siano una famiglia di 209 diversi composti o “congeneri”, distinti in relazione al diverso numero di atomi di cloro e alla disposizione degli stessi. Le loro proprietà chimico-fisiche dipendono essenzialmente dal numero degli atomi di cloro e dalla loro posizione sui due anelli benzenici. La notevole inerzia

verso altri composti (in particolare quelli con cinque o più atomi di cloro) [Rand et al., 1995], l'elevata resistenza al calore, l'elevata stabilità chimica-fisica, la resistenza agli acidi e alle basi, la non infiammabilità, sono state sfruttate in diverse applicazioni industriali. In particolare, i PCB sono stati ampiamente utilizzati come fluidi dielettrici nei trasformatori e nei condensatori elettrici; sono stati poi largamente impiegati come fluidi idraulici, veicolanti o diluenti sinergici dei pesticidi, plastificanti, ritardanti di fiamma, fungicidi, componenti di vernici [Erickson, 1992]. Inoltre i PCB possono essere prodotti come metaboliti indesiderati durante la fabbricazione di plastiche e di vernici.

In conseguenza di un così vasto impiego, di un frequente improprio smaltimento, e della loro elevata persistenza ambientale, i PCB sono ormai contaminanti ambientali ubiquitari, depositandosi prevalentemente nel grasso animale. Ciò è dovuto alla facilità di queste sostanze di sciogliersi nei grassi e di depositarsi. Sono quindi sostanze con una bassa solubilità in acqua e, viceversa, con alti valori di coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua. In particolare, soprattutto per i congeneri con un alto numero di atomi di cloro, questo coefficiente rappresenta una buona stima del potenziale di bioconcentrazione prima e di bioaccumulo poi [Cooper, 1991]. È stato inoltre dimostrato che i PCB hanno una forte tendenza a biomagnificare attraverso la catena alimentare, con un aumento progressivo delle concentrazioni quando si passa da un organismo di un livello trofico più basso ad uno di un livello superiore, soprattutto se grande predatore [Oliver and Niimi, 1988; Bayarri et al., 2000; EPA, 2000].

L'esposizione umana ai PCB può avvenire per assorbimento dermico, per inalazione di pulviscolo atmosferico, per ingestione di suolo contaminato o di acqua, o perfino attraverso contaminazioni accidentali [Chen et al., 1982; Rappe et al., 1987; Kannan et al., 1992]. Il contributo espositivo maggiore, circa il 90%, si ha attraverso la

dieta [Mes et al., 1991; Svensson et al., 1991; Anderson et al., 1998; Safe, 1998; Schlummer et al., 1998 Tsutsumi et al., 2001], tramite l'assunzione di cibi di origine animale [Furst et al., 1990]. In particolare, pesce e prodotti ittici in generale, rappresentano una piccola percentuale della dieta umana (circa il 10%), ma è dimostrato che questi rappresentano una delle maggiori fonti di esposizione ai PCB per l'uomo [Harrison et al., 1998; Alcock et al., 1998].

Dodici tra i congeneri dei PCB hanno dimostrato gradi di tossicità confrontabili con quelli osservati per la 2,3,7,8-TCDD [IPCS, 1989, 1993; IARC, 1997], il congenere più tossico della famiglia delle "diossine" (costituita da 210 diversi congeneri appartenenti alle famiglie delle policlorodibenzo-*p*-diossine, o PCDD, e dei policlorodibenzofurani, o PCDF), e sono chiamati per questo dioxin-like (DL). Gli effetti tossici diossina-simili, che si esplicano attraverso il legame al recettore aril idrocarburico (AhR) [CASARETT & DOULL'S], 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). La conformazione favorita a livello energetico per tutti i PCB è una conformazione non planare. Di conseguenza si comprende come per adottare una struttura planare simile alla TCDD (Fig. 4), sia richiesta una certa energia.

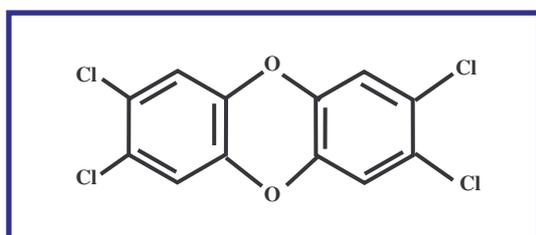


Fig. 4. Struttura della 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD)

È importante sottolineare che, a seconda della posizione del cloro, l'energia per la rotazione è diversa. Infatti per i congeneri non sostituiti in posizione orto l'ingombro sterico per la rotazione intorno al legame fenile-fenile è minimo, e la configurazione planare può essere adottata con il minimo di energia. La presenza di un atomo di cloro in orto, oltre che aumentare significativamente l'energia richiesta alla molecola per poter assumere una configurazione planare, decresce l'affinità di legame con il recettore Ah e di conseguenza anche la potenza tossicologica diossina-simile del congenero.

Il rischio per la salute umana derivante dall'esposizione a PCB diossina-simili (PCB-DL) viene valutato sulla loro concentrazione totale espressa in equivalenti di diossina (TEQ). Questi sono calcolati moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun congenero per il corrispondente fattore di tossicità equivalente (TEF) che è un numero compreso tra zero e uno che "pesa" la tossicità del singolo congenero rispetto a quello della 2,3,7,8-TCDD. Sommando i TEQ, si ottiene un solo dato che indica a quanta TCDD equivalgano tutti i congeneri dosati [Van den Berg M *et al.*, 1998; Van den Berg M *et al.*, 2006].

L'impatto dei PCB sulla salute umana rimane tuttora un argomento controverso: livelli elevati di PCB sono stati collegati alla leucemia e un possibile collegamento con il tumore al seno è fonte continua di dibattito [Falck *et al.*, 1992; Milne, 1992; Wolff *et al.*, 1993]. 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, sebbene esista uno studio che dimostra entrambe le attività [Safe, 1989].

Poiché non è stato ancora dimostrato chiaramente che l'esposizione ai livelli ambientali di PCB sia correlabile a un aumento di rischio cancerogeno nell'uomo, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (International Agency for Research

of Cancer — IARC) ha classificato i PCB come probabili cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2A). Al momento, invece, non sembrano esserci effetti mutageni [IARC,1987].

Gli effetti tossici dei PCB-DL si verificano per induzione enzimatica in seguito al legame con il recettore aril idrocarburico (AhR), citoplasmatico, indispensabile allo sviluppo del fegato e del sistema immunitario, che interviene nei processi omeostatici e nella crescita e differenziazione cellulare [Yasunobu Aoki, 2001]. Il recettore Ah dopo il legame di queste sostanze viene attivato; a ciò consegue una traslocazione di questo dal citoplasma al nucleo e qui si combina con molecole dalle funzioni regolatorie note anche con il nome di *xenobiotic responsive elements* ed aumenta la trascrizione di geni che codificano per diversi enzimi biotrasformanti tra cui il principale è il citocromo P-450 1A1 (CYP-450) [CASARETT & DOULL'S]. Tra gli effetti tossici specifici di diossine e PCB-DL è importante ribadire l'attività di distruttori endocrini, con alterazione dei livelli ormonali di tiroide, androgeni ed estrogeni (estrogenica e antiestrogenica). Questi effetti si manifestano per vari meccanismi: *down-regulation* del recettore per gli estrogeni (ER), interferenza tra ligando e recettore ER e/o l'induzione di monossigenasi 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.

I PCB non diossina simili (PCB-NDL) sono i congeneri più importanti a livello di esposizione perché i più abbondanti negli alimenti [The EFSA Journal (2005) 284], sono inoltre di grande interesse a livello tossicologico perché mediante metabolismo ossidativo danno luogo a metaboliti idrossilati anch'essi tossici. Alterano la funzionalità endocrina con meccanismi diversi da quelli dei PCB-DL (induzione enzimatica fenobarbitale-simile). Presentano azione estrogenica, e in particolare l'affinità per i recettori degli estrogeni è maggiore se in para è presente un ossidrile, cioè per i metaboliti di alcuni congeneri. Manifestano azione tireostatica con diminuzione della concentrazione della tiroxina (T4), induzione della uridindifosfo-glucuroniltransferasi (UDP-GT) [IARC,1987].

Questi PCB manifestano anche una certa neurotossicità per blocco della sintesi della dopamina per inibizione della tirosina idrossilasi. Inoltre, ai valori di PCB osservati sono stati associati effetti “sottili” sullo sviluppo neurocomportamentale per esposizione in utero [Gray K. et al., 2005]. In particolare, questi effetti risultano particolarmente importanti in bambini esposti a concentrazioni relativamente alti di PCB dovuti a un prolungato consumo di pesce contaminato da parte delle mamme durante la gravidanza [EPA, 1994; CCFAC, 2000].

Alcuni congeneri tra i PCB-NDL vengono metabolizzati a idrossi-PCB e/o metil sulfonil-PCB. Taluni di questi metaboliti possono contribuire agli effetti ormonosimili dei PCB.

In Fig. 4, sono riportate le formule di struttura dei PCB di interesse per la presente tesi, ossia quelli a maggiore significato espositivo (maggiormente presenti nelle matrici di interesse) , cioè i congeneri *orto*-sostituiti PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180, normalmente definiti come “indicatori” perché correntemente usati per stimare il contenuto in PCB di una matrice ambientale-alimentare e il PCB 118, ad attività

diossina-simile (mono-*orto* sostituito). In particolare, i congeneri in studio sono da ricercare, per la loro abbondanza rilevante soprattutto nei prodotti ittici [MAFF, 1999].

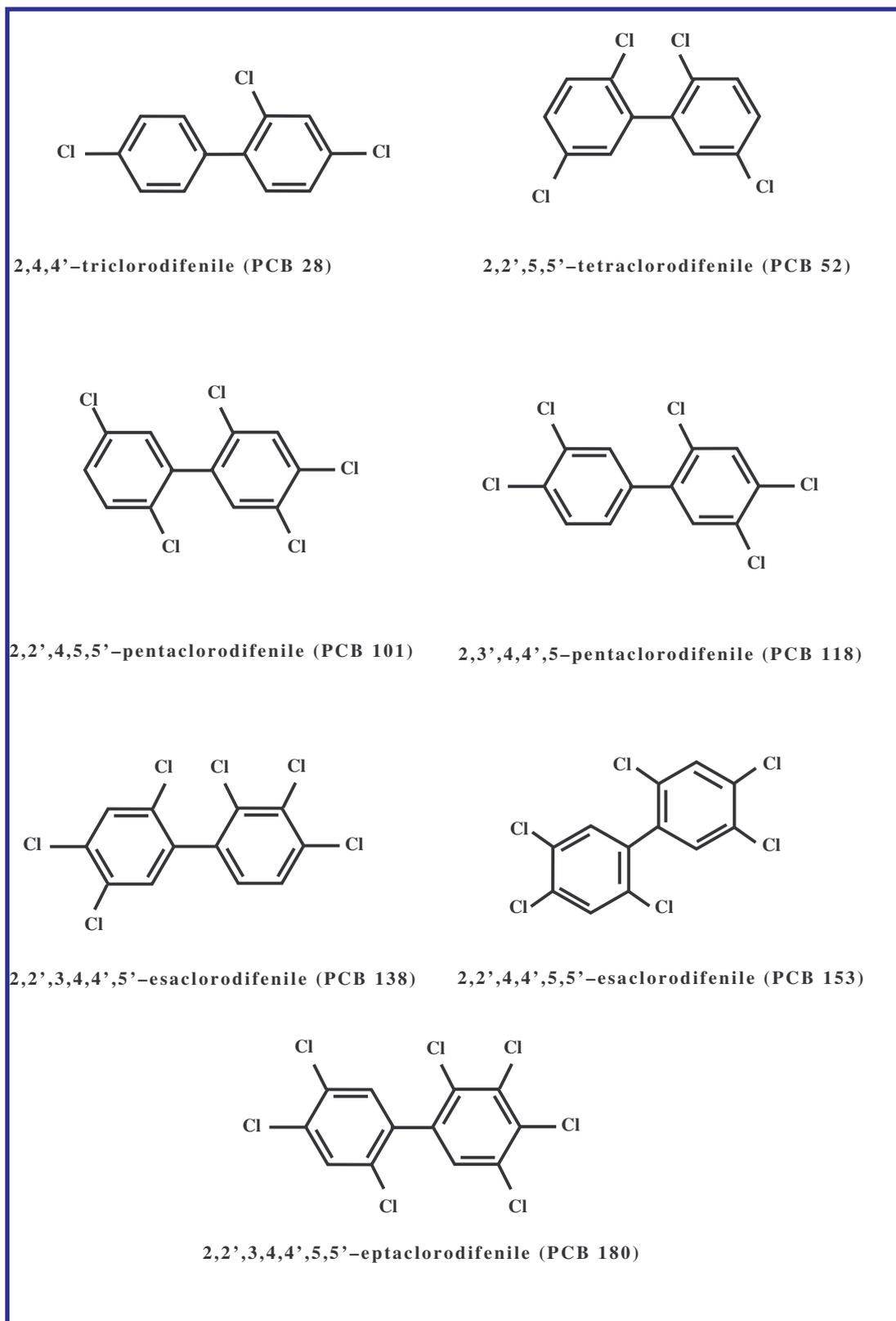


Fig. 4. Strutture dei principali policlorodifenili (PCB) di interesse tossicologico

La diffusione dei PCB nell'ambiente ha già suscitato preoccupazioni in rapporto ai possibili rischi per la salute umana.

Infatti, la Direttiva Europea 96/59/CE concernente lo smaltimento dei policlorobifenili e dei policlorotrifenili (PCB/PCT) abroga la precedente legislazione riformulando la definizione di PCB e riclassificando impianti ed apparecchiature contenenti tali sostanze non solo in base alla concentrazione di PCB, ma anche in relazione al rischio di dispersione nell'ambiente.

Esaclorobenzene

L'esaclorobenzene (HCB) è un idrocarburo di sintesi che presenta una struttura relativamente semplice costituita da un anello benzenico esaclorosostituito (Fig. 5).

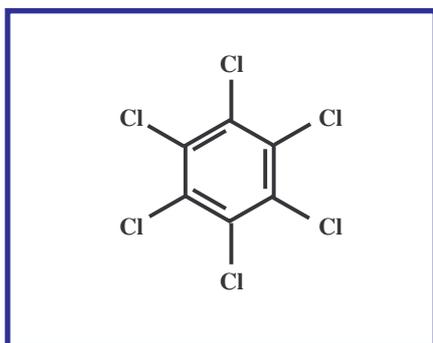


Fig. 5 Struttura dell'Esacolorobenzene (HCB)

Introdotta per la prima volta nel 1945, è stata per lungo tempo usata in agricoltura principalmente come fungicida nell'immagazzinamento dei cereali. Questa sua applicazione è proseguita fino agli anni '70, quando divennero evidenti gli effetti avversi sull'ambiente e sulla salute umana. Questi ultimi sono emersi in seguito ad un avvelenamento accidentale avvenuto negli anni '50 in Turchia durante il quale si verificarono circa 600 casi di porfiria cutanea tarda, con ulcere cutanee, cambio del

colore della pelle, artrite e problemi al fegato, al sistema nervoso e allo stomaco [Gocmen et al.,1989].

Attualmente la quantità più significativa di HCB viene immessa nell'ambiente come sottoprodotto di alcuni processi industriali o come impurezze durante la produzione di alcuni pesticidi [Barbera J.L., 2005]. E' inoltre un sottoprodotto dell'incenerimento dei rifiuti urbani.

Nonostante il suo utilizzo in agricoltura sia stato vietato in diversi Paesi (proprio a causa delle sue caratteristiche chimico-fisiche, soprattutto per la semi-volatilità, la stabilità chimica e la resistenza alla biodegradazione), dati europei ufficiali relativi agli anni '90 mostrano come l'utilizzo in campo agricolo costituisca ancora la maggiore fonte di emissione di questo contaminante.

E' distribuito in maniera diffusa nell'ambiente ed è, tra i POP, quello maggiormente soggetto al fenomeno del trasporto atmosferico a lunga distanza. E' considerato tra gli inquinanti ambientali più persistenti [Beyer, A., et al., 2000].

L'HCB è stato classificato dalla IARC come possibile cancerogeno per l'uomo (Gruppo 2B); è stata inoltre evidenziata un'attività di distruttore endocrino [IARC, 2001].

Diclorodifeniltricloroetano e diclorodifenildicloroetilene

Il diclorodifeniltricloroetano (DDT) è una sostanza chimica sintetizzata nel 1874 e immessa in commercio come insetticida a partire dagli anni '40. Il suo utilizzo ha raggiunto l'apice nella seconda guerra mondiale quando è stato impiegato abbondantemente contro tifo e colera [Van Metre et al., 1997].

Il prodotto tecnico contiene il 65–80% di *p,p'*-DDT (Fig. 6a). Altri importanti componenti del prodotto tecnico sono i composti *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE e *p,p'*-DDD

(Fig. 6b e Fig. 6c). Gli ultimi due composti (unitamente al loro analogo orto e para derivati dall'*o,p'*-DDT) sono anche i due principali prodotti di decomposizione nei sistemi biologici [WHO-IPCS,1979].

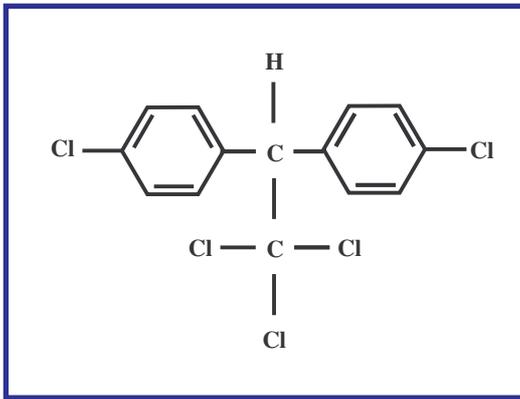


Fig. 6a. Struttura del *p,p'*-Diclorodifeniltricloroetano (DDT)

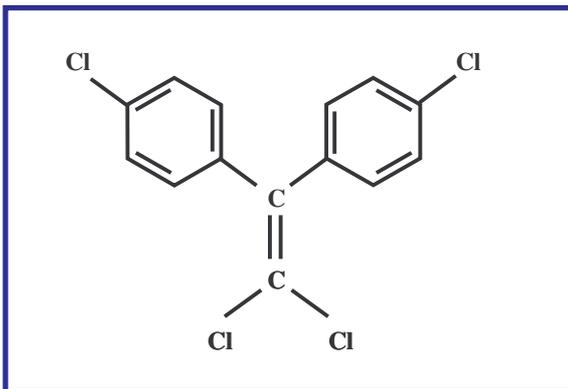


Fig. 6b. Struttura del *p,p'*- Diclorodifenildicloroetilene (DDE)

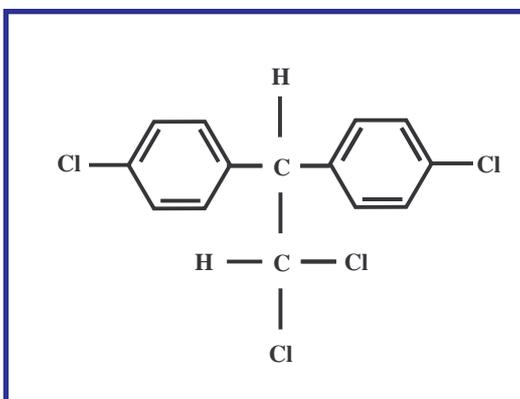


Fig. 6c. Struttura del *p,p'*- Diclorodifenildicloroetano (DDD)

Da ora in poi in questo lavoro di tesi le espressioni “DDT” e “DDE” si riferiscono rispettivamente a *p,p'*-DDT, e a *p,p'*-DDE. La principale attività insetticida può essere attribuita al *p,p'*-DDT. Il DDT viene usato come intermedio nella produzione del pesticida dicofol e può comparire come principale impurità nel prodotto finale. Il DDT è stato vietato in molti paesi europei nella stragrande maggioranza degli usi all’inizio degli anni 1970. Le norme sull’impiego del DDT come pesticida sono diventate estremamente restrittive dal 1981 e dal 1986 l’uso di questo prodotto è vietato nell’UE. Pur essendo bandito nella maggior parte dei paesi del mondo, il DDT continua a essere usato per il controllo dei vettori, soprattutto nelle zone colpite da malaria endemica; un uso più esteso è stato raccomandato di recente anche dall’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per l’irrorazione residuale degli interni nella lotta alla malaria.

Per le sue proprietà lipofile e la sua persistenza nell’ambiente, il DDT e i composti a esso correlati sono soggetti a bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena alimentare. Il DDT è una delle sostanze incluse nella convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (POP) e nel protocollo sui POP (CLRTAP-POP) della convenzione sull’inquinamento atmosferico transfrontaliero a grande distanza della Commissione economica delle Nazioni Unite per l’Europa (UNECE).

Il DDT viene rapidamente assorbito nell’organismo dell’uomo e degli animali; l’emivita del DDT va da un mese nel ratto a quattro anni nell’uomo. Negli animali e nell’uomo il DDE è generalmente più persistente del DDT. Quest’ultimo e i suoi composti vengono trasferiti al latte e alle uova e si accumulano negli animali domestici e nei pesci. Il DDT ha una bassa tossicità acuta nei mammiferi e nella maggior parte delle specie aviarie.

I principali organi bersaglio sono il sistema nervoso e il fegato. Il DDT ha inoltre effetti negativi sui tessuti ormonali, la riproduzione, lo sviluppo fetale e il sistema immunitario. Il DDT, compresi *p,p'*-DDE e DDD, provoca negli animali da laboratorio tumori principalmente nel fegato e risulta essenzialmente negativo negli studi di genotossicità. La IARC ha classificato il DDT tra i possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B) [IARC, 1991].

Caratterizzato da elevata tossicità ad alta persistenza, il DDT, dopo essere stato immesso nell'ambiente, permane a lungo nel suolo, dove viene lentamente degradato dai microrganismi in DDE (diclorodifenildicloroetilene) e DDD (diclorodifenildicloroetano) che, attraverso l'erosione degli strati superficiali del suolo, arrivano a contaminare le acque di superficie. A causa delle loro caratteristiche chimiche, il DDT e i suoi prodotti di degradazione, possono percorrere lunghe distanze. Il DDT, e in particolare il DDE, si accumulano nelle piante e nei tessuti grassi di pesci, uccelli e altri animali. Anche nell'uomo, dove la principale fonte espositiva deriva dagli alimenti di origine animale il DDT viene metabolizzato principalmente a DDE, prodotto in seguito ad una ossidazione enzimatica CYP-450 dipendente, da parte del DDT-deidrociorasi [CASARETT & DOULL'S]. Il DDE persiste a lungo nei tessuti umani avendo un $t_{1/2}$ di 6 anni [EFSA, 2006].

L'esposizione al DDT viene pertanto determinata essenzialmente tramite il dosaggio del DDE. Il dosaggio dell'altro importante metabolita, il DDD, non viene mai effettuata, poiché, come noto da tempo viene escreto molto facilmente dagli organismi, compreso l'uomo.

Recenti studi dimostrano come DDT e i suoi prodotti di degradazione possano essere considerati distruttori endocrini (Debier *et al.*, 2005). Infatti esperimenti sul pesce Medaka ha causato la reversione del sesso da maschio a femmina, in conseguenza

di una singola esposizione delle uova (Edmunds J.S.G. *et al.*, 2000). Dai dati disponibili, però, non si riesce a capire se l'effetto estrogenico di questo insetticida e dei suoi metaboliti sia correlato alla dose (Turusov V. *et al.*, 2002).

Scelta delle matrici in studio

In questa tesi, sono stati raccolti i dati relativi ai livelli di contaminazione da inquinanti organici persistenti (POP) in campioni di vongole e sedimenti prelevati in diverse zone della laguna. Le analisi, effettuate dal Reparto di Chimica Tossicologica del Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, prevedevano lo studio di 50 congeneri di PCB e dei tre pesticidi organoclorurati d'interesse, oltre a numerosi altri contaminanti come le policlorodibenzo-*p*-diossine e i policlorodibenzofurani. In questo lavoro sono stati considerati i risultati delle analisi sui tre pesticidi e su sette congeneri dei PCB che, come detto in precedenza, sono quelli maggiormente presenti nelle matrici di interesse e pertanto più importanti ai fini di una valutazione espositiva.

La grande persistenza di queste sostanze e la tendenza al bioaccumulo dovuta all'elevata lipofilia, permette ai POP immessi nell'ambiente, e nelle acque in particolare, di depositarsi nei sedimenti. Infatti, essi tendono ad associarsi alla frazione organica del particolato sospeso e ad accumulare con esso nei sedimenti del fondale. Da qui, attraverso l'interazione con gli organismi acquatici (come ad esempio, le vongole) che vivono a contatto con il particolato sospeso e con il sedimento di fondo [Da Ros, *et. Al.*, 1998], le sostanze predette si accumulano e possono migrare attraverso i vari livelli delle reti trofiche di cui fanno parte anche organismi che rientrano nell'alimentazione umana.

L'assorbimento di queste sostanze da parte degli organismi acquatici avviene dal consumo di acqua e di cibo contaminati [Neff, 1984], e dal contatto diretto con sedimenti contaminati o attraverso l'acqua interstiziale. Questo processo di assorbimento è chiamato bioaccumulo e un organismo come la vongola sembra essere una specie chiave per la valutazione dell'esposizione ai POP, perché vive a stretto contatto con il sedimento. Inoltre, poiché soggetta ad intensa attività di pesca, la vongola può rappresentare un importante veicolo dei POP all'uomo. Infatti, come già detto in precedenza, l'esposizione principale a questi contaminanti da parte dell'uomo avviene principalmente attraverso la dieta. I prodotti ittici sembrano essere una fonte espositiva molto importante, soprattutto in zone dove la pesca risulta essere una fonte economica rilevante.

D'altra parte, questo organismo bentonico può essere impiegato come indicatore del degrado della qualità ambientale dovuto all'inquinamento. Infatti, dai molluschi è possibile ottenere anche dati diretti, qualitativi e quantitativi, su specifici contaminanti.

Essi si comportano infatti come delle vere e proprie "centraline naturali" di rilevamento: sono capaci di accumulare e trattenere al loro interno elevate concentrazioni di inquinanti persistenti senza subire danni a breve-medio termine. Sono infatti detti organismi bioaccumulatori, sottoinsieme dei bioindicatori. L'analisi periodica del loro contenuto permette di identificare tali contaminanti (dati qualitativi) e di ricostruirne i patterns di deposizione (dati quantitativi) [Niimi A.J. 1996; Boese B.L., 1997; Colombo J.C., 1997; Scarponi *et al.*, 1998; Wentz D.A. *et al.*, 1998; Thompson S. *et al.*, 1999; Binelli A., 2003; Fung C.N. *et al.*, 2004; Micheletti C. *et al.*, 2004; Miniero R. *et al.*, 2005; Miniero R. *et al.*, 2007].

D'altra parte, anche lo studio dei fondali marini e l'analisi delle caratteristiche chimiche e fisiche dei sedimenti riveste una notevole importanza nella valutazione

dell'ambiente marino. I sedimenti, infatti, possono svolgere un ruolo di trasporto diretto dei contaminanti e possono inoltre fungere da ricettacolo transitorio e definitivo degli stessi. Inoltre i livelli sedimentari più superficiali sono sede di un complesso sistema ecologico, quali le comunità bentoniche e le praterie a *Posidonia oceanica*, utili per caratterizzare le condizioni ambientali di aree marine e costiere.

Per l'importanza ambientale che riveste, la contaminazione dei sedimenti ha mosso, sin dalla seconda metà degli anni '80 [Miniero *et al.*, 2005], lo sviluppo di criteri di qualità, da utilizzare nell'ambito dei processi decisionali relativi al risanamento di zone contaminate [Apitz, 2007a].

Tapes philippinarum

Le vongole sono largamente allevati in Italia. Ogni anno vengono prodotte circa 30.000 tonnellate di vongole e circa il 30% della produzione nazionale proviene dalla laguna di Venezia [Binelli *et al.*, 2003]. La specie più allevata negli impianti di acquicoltura nel nord-est dell'Italia [Rossi and Paesanti, 1992] è la *Tapes philippinarum*, detta anche vongola di Manila.

E' una specie originaria del Pacifico (Giappone); è stata introdotta prima in Francia (1980) e successivamente nella laguna di Venezia (1983) per scopi commerciali. Vive in acque salmastre sepolta nella sabbia o nel fondale melmoso, ed è in grado di tollerare un intervallo di temperatura dell'acqua che va da 0 a 23 °C. La conchiglia è di forma triangolare arrotondata. Il guscio è resistente e presenta una serie di creste, la sua colorazione varia dal grigio al giallo fino ad arrivare al marrone (Fig. 7). La superficie interna della conchiglia è liscia con una striscia di colore viola scuro. Il tessuto del corpo è di colore arancione. il periodo riproduttivo va da maggio ad ottobre [<http://www.istitutoveneto.it>].

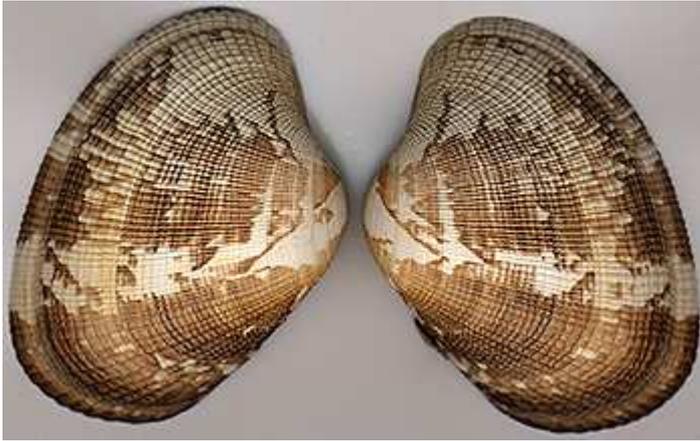


Fig. 7. *Tapes philippinarum*

Bioconcentrazione, bioaccumulo e relativi fattori.

Una sostanza tossica immessa nell'ambiente viene a contatto con gli organismi viventi che non sono adattati a molecole con struttura chimica differente da quella delle molecole naturali. Infatti, i sistemi enzimatici degli organismi decompositori non sono sempre in grado di mineralizzare queste molecole, dette "xenobiotiche", che quindi possono persistere a lungo negli ecosistemi e danneggiare gravemente la componente biotica in cui permangono. A volte le molecole sono assorbite, accumulate e metabolizzate, ma i prodotti del metabolismo possono essere a loro volta nuove molecole che talora risultano altrettanto o più pericolose dei composti di partenza.

L'assorbimento di sostanze tossiche da parte di un organismo può avvenire o attraverso il processo di bioconcentrazione, e/o attraverso il bioaccumulo, e/o la biomagnificazione.

Per bioconcentrazione si intende l'assorbimento di una sostanza chimica direttamente dal mezzo in cui l'organismo vive (tipicamente dall'acqua); più in generale, invece, si parla di bioaccumulo, quando le fonti espositive sono diverse (es. acqua, cibo, sedimento, contatto epidermico e altro).

Come già ricordato, invece, per biomagnificazione si intende l'assorbimento attraverso l'ingestione lungo le catene trofiche.

E' utile ricordare che ogni qual volta si parla di assorbimento si intende l'acquisizione da parte di un organismo di una determinata sostanza dall'ambiente come risultato di processi attivi o passivi.

Il più semplice modello di bioconcentrazione è quello illustrato qui di seguito. Si suppone che ci siano solo due compartimenti: il mezzo circostante e l'organismo.

Indichiamo con **A** la concentrazione della sostanza tossica (da ora in poi denominata tossico) nell'ambiente circostante (ad es. misurata in mg L^{-1} e con **C** la concentrazione del tossico nell'organismo (ad es. in mg kg^{-1}). È spesso ragionevole assumere che ogni organismo assorba nell'unità di tempo una quantità di tossico proporzionale alla concentrazione del medesimo nell'ambiente, per esempio attraverso la respirazione branchiale se si tratta di pesci. D'altra parte gli organismi sono anche in grado di espellere o metabolizzare una parte del tossico presente nei loro tessuti per esempio attraverso l'escrezione. È spesso ragionevole supporre che il rilascio del tossico nell'unità di tempo sia proporzionale alla concentrazione nei tessuti. In breve possiamo scrivere la seguente equazione di bilancio [Bruggerman W.A. *et al.*, 1984;]:

$$dC/dt = k_1 A(t) - k_2 C(t)$$

dove k_1 e k_2 sono rispettivamente la costante di assorbimento e di rilascio. Se assumiamo che la concentrazione di tossico nell'ambiente è costante e pari ad **A**, la concentrazione **C** di tossico nell'organismo tende verso la concentrazione di equilibrio (quella per cui $dC/dt = 0$), ovvero verso

$$C_{eq} = (k_1/k_2) A$$

Come verrà spiegato in seguito, se definiamo come fattore di bioconcentrazione (BCF, BioConcentration Factor) il rapporto tra la concentrazione nell'organismo e quella nel mezzo circostante possiamo dire che a regime si ha:

$$\text{BCF} = k_1/k_2$$

Il BCF sarà tanto più alto quanto maggiore è la costante di assorbimento e quanto minore è la costante di rilascio. Naturalmente per ogni dato tossico il BCF varia da specie a specie, mentre all'interno di ogni specie il BCF è diverso per ogni diversa sostanza assorbita [Lake J.L. *et al.*, 1990; Borgå K *et al.*, 2005] e può essere diverso per una stessa sostanza tra diversi stadi di accrescimento dell'organismo in studio.

Il risultato di entrambi i processi, bioconcentrazione e bioaccumulo, è che nell'organismo si ha un aumento della concentrazione della sostanza tossica rispetto all'ambiente circostante. Inoltre, essi possono essere visti semplicemente come il risultato delle velocità di assorbimento e di detossificazione di una sostanza chimica da parte di un organismo acquatico. Tali velocità dipendono da numerosi fattori, inclusi le proprietà chimico-fisiche della sostanza in esame, la fisiologia dell'organismo, le condizioni ambientali, fattori ecologici, quali la catena alimentare, la quantità della sostanza e il tipo di fonte espositiva. Quando le velocità di assorbimento e di detossificazione sono uguali, la distribuzione della sostanza tra l'organismo e la sua fonte espositiva (o sorgente) è all'equilibrio, si trova cioè in uno *steady state*. Per una esposizione costante, il tempo richiesto per raggiungere l'equilibrio varia in funzione delle proprietà (es. strutturali, o chimico-fisiche) della sostanza considerata e di altri fattori. Ad esempio, alcune sostanze richiedono un tempo più lungo per raggiungere le condizioni di *steady state* tra i comparti ambientali (es. molti mesi per alcune sostanze idrofobiche), mentre altre raggiungono l'equilibrio abbastanza rapidamente (es. ore o giorni per certe sostanze idrofile). Il concetto di equilibrio è molto importante quando si

valuta il bioaccumulo o la bioconcentrazione e quando si applicano questi principi alle situazioni del mondo reale, come ad esempio nella determinazione dei criteri di qualità delle acque.

Per alcune sostanze e per alcuni organismi che richiedono un periodo di tempo relativamente lungo per raggiungere l'equilibrio, cambiamenti della concentrazione della sostanza stessa nella colonna d'acqua possono avvenire molto più rapidamente rispetto ai corrispondenti cambiamenti della concentrazione nei tessuti dell'organismo. Quindi, se il sistema parte sostanzialmente da condizioni d'equilibrio, il rapporto tra la concentrazione nel tessuto e la concentrazione nell'acqua può essere considerato simile a un rapporto di *steady state* e si possono avere valori predittivi di un potenziale bioaccumulo a lungo termine.

Per proteggere la salute umana da pericoli dell'esposizione a sostanze chimiche bioaccumulabili, in particolare per valutare nel miglior modo possibile il rischio derivante dal consumo di pesce, l'EPA propone l'uso di un fattore di bioaccumulo (BAF), da utilizzare come criterio di valutazione della qualità delle acque e di conseguenza degli organismi che in essa vivono. Il BAF, caratteristico per ogni sostanza chimica, è definito come il rapporto della concentrazione del contaminante nel tessuto animale considerato e la concentrazione dello stesso contaminante nell'acqua dove l'animale vive. Nella determinazione della concentrazione nei tessuti si tiene conto di tutti i contributi espositivi, quali cibo, acqua e sedimento con cui l'organismo può venire a contatto, soprattutto per quegli organismi che vivono a stretto contatto con il sedimento, come ad esempio le vongole. Le sostanze chimiche con dei valori di BAF più alti tendono ad essere accumulate in quantità maggiore, rispetto alle sostanze con bassi valori di BAF. Per questo motivo, il fattore di bioaccumulo è definito come il rapporto (espresso in L/kg) tra la concentrazione dell'inquinante nel tessuto di un

organismo e la concentrazione dello stesso inquinante nell'acqua circostante, dove l'organismo e il suo cibo sono esposti. Questo rapporto non cambia in modo sostanziale nel tempo. Per contaminanti altamente bioaccumulabili in sistemi dinamici, valori affidabili di BAF possono essere determinati solo se, tra gli altri fattori, le concentrazioni nella colonna d'acqua sono calcolati per un periodo di tempo sufficiente (es. un periodo di tempo che approssimativamente sia sufficiente affinché l'inquinante raggiunga lo *steady state*). Inoltre, un adeguato calcolo della concentrazione nella colonna d'acqua e nel tessuto è richiesto per lo sviluppo di valori di BAF affidabili.

Il BAF sostituisce o meglio completa un altro fattore, introdotto dall'EPA negli anni '80, sempre come criterio di valutazione della qualità delle acque: il fattore di bioconcentrazione (BCF), di cui si parlava sopra. Il BCF, anch'esso caratteristico per una sostanza chimica, misura l'assorbimento di una sostanza in un tessuto attraverso l'acqua. Come già visto, il BCF è definito come il rapporto della concentrazione del contaminante nel tessuto animale, derivante dall'acqua, come unica fonte espositiva, e la concentrazione dello stesso contaminante nell'acqua dove l'animale vive. Il fattore di bioconcentrazione, quindi, rappresenta l'assorbimento e la ritenzione di una sostanza da parte di un organismo acquatico solo dall'acqua circostante, attraverso le branchie o qualunque altra parte della superficie corporea, in situazioni in cui il rapporto concentrazione tessuto/concentrazione acqua non cambia sostanzialmente nel tempo.

Risulta intuitivo come l'uso del fattore BAF descriva meglio l'assorbimento totale di una sostanza in un tessuto e sia pertanto più idonea per una corretta valutazione dell'esposizione sia dell'ambiente che dell'uomo, ed è quindi considerato il migliore approccio alla valutazione dell'esposizione da utilizzarsi ai fini di un adeguato *risk assessment*.

Fattore di Accumulo Biota-Sedimento (BSAF)

Il Fattore di Accumulo Biota-Sedimento (BSAF) è dato dal seguente rapporto:

$$BSAF = C/C_{soc}$$

dove:

C = la concentrazione della sostanza chimica determinata nel tessuto del biota, espressa su base grassa (g/g grasso) [Craig E. et al., 1995];

C_{soc} = la concentrazione della sostanza chimica determinata nel sedimento, prelevato nelle vicinanze del biota in esame, espressa su base secca o sul carbonio organico totale (g/ g carbonio organico nel sedimento);

La concentrazione C_{soc} può essere calcolata come:

$$C_{soc} = C_s/f_{oc}$$

dove:

C_s = concentrazione della sostanza nel sedimento

f_{oc} = frazione del carbonio organico nel sedimento.

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow})

Il bioaccumulo di una sostanza è correlato al coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}) della sostanza stessa. Esso può essere definito come il rapporto tra la concentrazione di una sostanza in n-ottanolo e la concentrazione della stessa sostanza nella fase acquosa in un sistema a due fasi (ottanolo-acqua) all'equilibrio ad una specifica temperatura. Si esprime come:

$$K_{ow} = [S]_{ottanolo}/[S]_{acqua}$$

dove

[S] = concentrazione della sostanza S espressa in molarità o ppm

Questo parametro termodinamico è usato in molti studi ambientali per determinare il destino di sostanze chimiche nell'ambiente. Infatti, il K_{ow} indica la tendenza di una sostanza a legarsi alla frazione organica, o lipidica, di una matrice piuttosto che alla frazione acquosa. In altre parole, se la concentrazione della sostanza in esame è maggiore in ottanolo, solvente organico usato come surrogato di matrici organiche, che in acqua, il K_{ow} avrà valori elevati; viceversa per valori bassi del coefficiente, la sostanza tenderà ad associarsi alla frazione non organica (o acquosa). Quindi il K_{ow} è un mezzo per poter stimare il potenziale bioaccumulo di una sostanza [Paul C.M. van Noort, 2009].

Più spesso si usa il log Kow. L'EPA afferma che i composti per i quali logKow è maggiore di 3.5 devono essere considerati potenzialmente pericolosi per l'ambiente, perchè bioaccumulabili.

In generale, all'aumentare della lipofilità della sostanza aumenta la tendenza all'accumulo. Fanno eccezione alcune sostanze, come il metilmercurio che accumula nei pesci molto più largamente di quanto indichi il solo coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua.

Nella Tab. 1 sono riportati il log Kow e la solubilità in acqua di alcune sostanze di interesse per questa tesi [Hardy M.L., 2002; WHO, 2003].

Tab. 1. Principali proprietà chimico-fisiche di alcuni POP. ^a

Analita	Pressione di vapore (Pa) a 25 °C	Log K _{ow} ^b	Solubilità in acqua (g/L) a 25 °C
PCB ^c	1.2 × 10 ⁻³ (PCB 47)	6.3 (PCB 47)	48.6 × 10 ⁻⁶ (PCB 47)
	0.32 × 10 ⁻³ (PCB 99)	7.0 (PCB 99)	5.97 × 10 ⁻⁶ (PCB 99)
	0.83 × 10 ⁻⁴ (PCB 153)	7.6 (PCB 153)	1.28 × 10 ⁻⁶ (PCB 153)
HCB	0.0023	5.5	5 × 10 ⁻⁶
<i>p,p'</i> -DDT	2.13 × 10 ⁻⁵ ^d	6.91	25 × 10 ⁻⁶
<i>p,p'</i> -DDE	8.0 × 10 ⁻⁴	6.51	120 × 10 ⁻⁶
<i>p,p'</i> -DDD	1.80 × 10 ⁻⁴	6.02	90 × 10 ⁻⁶
PCDD/PCDF	7.47 × 10 ⁻¹⁰ – 5.33 × 10 ⁻⁶ ^e	5.6-8.0 ^f	19.3 ^f (7.9-483) × 10 ⁻⁹

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

b) Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua

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

d) Valore riferito a 20 °C

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

f) Valore riferito a 2,3,7,8-T₄CDD

Biomagnificazione

Per alcune sostanze chimiche, come per quelle altamente idrofobiche (cioè lipofile), l'assorbimento attraverso la catena alimentare può essere la più importante via espositiva. 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 [Oliver and Niimi, 1988; Bayarri et al., 2000; EPA, 2000], valori di qualche ordine di grandezza più elevati di quelli riscontrati nell'ambiente. Questo processo, ossia l'aumento delle concentrazioni lungo i livelli trofici, si chiama biomagnificazione; questo può comportare una serie di effetti avversi per la salute dei consumatori di pesce dei livelli trofici più alti, in particolare per l'uomo che si trova nel livello trofico più alto.

MATERIALI E METODI

Campionamento e pretrattamento

I reperti di biota e sedimento oggetti di questo studio sono stati raccolti in tempi diversi durante le campagne di campionamento effettuate nel periodo 1995-2000. Le coppie di reperti considerati per questo studio sono riportati in Tab. 2.

Campagna di campionamento	Reperti biota	Reperti sedimento	Coordinate GPS della zona del prelievo	Tipologia di area
1995	5/2-C-2	5-A2	Lat. 45° 43' 21" N Long. 12° 25' 99" E	1 ^a
	7-C-1	7-A2	Lat. 45° 40' 0.4" N Long. 12° 26' 53" E	3 ^c
	7475/C	Chioggia1-2	Lat. 45° 23' 34" N Long. 12° 28' 53" E	4 ^d
	4411	10	Lat. 45° 43' 96" N Long. 12° 31' 85" E 1.3 m	2 ^b
	7484	6A	Lat. 45° 43' 58" N Long. 12° 25' 17" E	1 ^a
	12*, 14* ^(a)	40	Lat. 45° 41' 73" N Long. 12° 25' 31" E	1 ^a
1998 (1)	SLV-B-430	SLV-S-230B	Lat. 45° 39' 09" N Long. 12° 20' 16" E	3 ^c
	SLV-alfa-B-480	SLV-a-S-380A	Lat. 45° 42' 47" N Long. 12° 28' 66" E	3 ^c
1998 (2)	SLV-beta-B-491	SLV-b-S-390C ^(b)	Lat. 45° 50' 29" N Long. 12° 40' 86" E	3 ^c
2000	E1-B	E1-S	Lat. 45° 41' 47" N Long. 12° 26' 45" E	3 ^c
	E2-B	E2-S	Lat. 45° 41' 10" N Long. 12° 25' 96" E	3 ^c
	E3-B	E3-S	Lat. 45° 39' 50" N Long. 12° 25' 06" E	3 ^c

E4-B	E4-S	Lat. 45° 39' 19" N Long. 12° 24' 58" E	3 ^c
E5-B	E5-S	Lat. 45° 39' 95" N Long. 12° 25' 73" E	3 ^c
E6-B	E6-S	Lat. 45° 40' 70" N Long. 12° 26' 60" E	3 ^c
F2-B	F2-S	Lat. 45° 39' 69" N Long. 12° 28' 62" E	3 ^c
F3-B	F3-S	Lat. 45° 39' 46" N Long. 12° 29' 47" E	3 ^c
F4-B	F4-S	Lat. 45° 40' 72" N Long. 12° 28' 25" E	3 ^c
F5-B	F5-S	Lat. 45° 40' 33" N Long. 12° 29' 40" E	3 ^c
X1-B	X1-S	Lat. 45° 43' 43" N Long. 12° 25' 55" E	1 ^a
Chioggia 1-B	Chioggia 1-S	Lat. 45° 22' 44" N Long. 12° 28' 44" E	4 ^d
7473, 7474	90	Lat. 45° 23' 08" N Long. 12° 25' 60" E	4 ^d

^(a) Questi reperti sono stati raccolti nella campagna del 1996, ma confluiscono nei reperti del 1995.

^(b) Questi reperti sono stati raccolti nella campagna 1998 (1)

1998 (1): Giugno-Luglio;

1998 (2): Ottobre

^a Area 1: Esposizione prevalentemente industriale;

^b Area 2: Esposizione prevalentemente o esclusivamente urbana;

^c Area 3: Esposizione mista;

^d Area 4: Bassa esposizione, zone di pesca e allevamento

Tab. 2. Elenco delle 22 coppie di reperti biota-sedimenti campionate dal 1995 al 2000. Ciascuna coppia è individuata geograficamente dalle coordinate GPS.

Come si può vedere dalla tabella, ogni coppia di reperto proveniva da una stessa zona di campionamento, individuata in dettaglio dalle coordinate GPS (Global Positioning System) che permettono un sicuro posizionamento geografico all'interno della laguna. Sono inoltre specificate la campagna di campionamento e la tipologia di area di provenienza dei reperti, caratterizzata da un suo specifico impatto antropico.

Questo impatto è stato caratterizzato in grande prevalenza attraverso i livelli congenere specifici di PCDD e PCDF e dai livelli totali di altri contaminanti come, per l'appunto, NDL-PCB e pesticidi clorurati. Su questa base e sulla base della posizione geografica, sono stati individuati degli impatti relativamente specifici e successivamente correlati alle attività antropiche lagunari. Pertanto, dalla posizione geografica e dalle informazioni sulle attività antropiche in laguna, è possibile individuare delle aree ad esposizione industriale, urbana, mista e di pesca o allevamento. La collocazione spaziale originale dei reperti è ben riportata in Fig. 8 e Fig. 9.



Fig.8. Collocazione spaziale dei reperti di biota, prelevati nelle quattro campagne di campionamento dal 1995 al 2000. I siti di prelievo sono stati collocati in figura ricorrendo a informazioni topografiche basate sia sull'osservazione visiva, sia sulle coordinate GPS, sia sulla posizione di campioni di sedimento raccolti negli stessi siti. In rosso sono evidenziati i reperti derivanti da una zona ad esposizione prevalentemente industriale, in blu il campione proveniente da una zona ad esposizione prevalentemente urbana, in giallo quelli campionati in una zona ad esposizione di tipo misto e in verde i campioni provenienti da una zona di pesca e allevamento.



Fig. 9. Collocazione spaziale dei reperti di sedimento, prelevati nelle quattro campagne di campionamento dal 1995 al 2000. I siti di prelievo sono stati collocati in figura ricorrendo a informazioni topografiche basate sia sull'osservazione visiva, sia sulle coordinate GPS, sia sulla posizione di campioni di sedimento raccolti negli stessi siti. In rosso sono evidenziati i reperti derivanti da una zona ad esposizione prevalentemente industriale, in blu il campione proveniente da una zona ad esposizione prevalentemente urbana, in giallo quelli campionati in una zona ad esposizione di tipo misto e in verde i campioni provenienti da una zona di pesca e allevamento.

Biota

Campionamento

Il prelievo dei reperti di biota è stato effettuato nell'ambito di cinque campagne, due attuate nell'Ottobre del 1995, una a Luglio del 1996, una nell'estate del 1998 e una nell'Aprile-Maggio del 2000. I reperti prelevati nel Luglio 1996 hanno confluito in quelli del 1995.

Le vongole sono state sempre prelevate a mano dal fondo lagunare e, quando la profondità non lo consentiva, tramite operatori subacquei. Per le prime quattro campagne, i campioni di biota sono stati prelevati in prossimità dei sedimenti da sottoporre poi ad analisi. Solo in alcuni casi il doppio prelievo non è stato contemporaneo.

Nel caso invece della campagna del 2000 le vongole sono state campionate a mano nel triangolo idealmente tracciato dai tre prelievi di sedimento (vedi campionamento sedimenti).

Dalla massa di molluschi prelevati in ogni sito si è costituito un campione di qualche kg. Ogni aliquota, selezionata nell'ambito di ciascun sito di campionamento, è stata mescolata a bordo dell'imbarcazione con le altre aliquote di vongole provenienti dalla medesima zona. I *pools* così formati da quantità approssimativamente equinumeriche di organismi sono stati considerati campioni (sono detti campioni compositi), ciascuno mediamente rappresentativo della zona di provenienza. Pertanto, gli organismi di ciascun campione composito sono considerati a contaminazione omogenea.

Pretrattamento

Dopo il prelievo, i reperti sono stati sciacquati abbondantemente per la rimozione dell'eventuale sedimento adeso, e conservati in sacchetti sigillati per alimenti a ≈ 4 °C fino al pretrattamento, effettuato entro otto ore dal campionamento. Dopo aver rimosso le parti eduli dei molluschi, queste venivano sciacquate con acqua distillata, sgrondate e omogeneizzate meccanicamente. L'omogeneizzato veniva confezionato in sacchetti di plastica per alimenti, pesati e poi lavorati o conservati in surgelatore a -20 °C in attesa di essere sottoposti ai successivi trattamenti.

Nel complesso, sono stati analizzati 22 campioni/reperti di biota, ottenuti da siti di campionamento distribuiti prevalentemente nel bacino centrale e meridionale della laguna (Tab. 2 e Fig. 8). Il sito di campionamento è stato individuato determinando la posizione sulla base di caratteristiche locali o determinando le sue coordinate geografiche tramite il sistema GPS o entrambi i metodi. Da ogni sito è stato raccolto il reperto ricercato, o più d'uno se più specie di molluschi erano presenti. In genere, ogni reperto era costituito da numerosi individui che, nel caso dei bivalvi, servivano a raggiungere la quantità minima di campione necessaria all'analisi.

Per tutti i reperti sono state determinate le coordinate GPS, tenendo conto di tutte le informazioni a disposizione derivanti dalle diverse campagne di campionamento.

Sedimento

Campionamento

Il prelievo di tutti i reperti di sedimento è stato effettuato in quattro campagne, due nel 1995, una nel 1998 e l'ultima nel 2000. In totale sono stati raccolti 22 campioni/reperti di sedimento. I campioni provenienti dalla seconda campagna del 1995 hanno confluito insieme a quelli provenienti dalla prima campagna.

Qui di seguito vengono riportati in dettaglio i tempi e i modi di campionamento delle campagne effettuate.

Nelle due campagne del 1995 (Maggio-Giugno 1995 e Ottobre 1995) i reperti di sedimento sono stati raccolti da un sommozzatore e/o immergendo verticalmente nel fondale lagunare una sonda cilindrica ($\varnothing_1 = 4$ cm) (“carotaggio”), o mediante asporto di materiale superficiale direttamente in contenitore per alimenti (prelievo superficiale), poi impiegato anche per la conservazione a -20 °C. Le “carote” venivano estruse e sezionate a bordo immediatamente dopo il prelievo; ogni sezione era poi trasferita in un sacchetto di plastica per alimenti per una conservazione prolungata a -20 °C.

I reperti sono stati prelevati da 6 zone di campionamento da quattro aree lagunari a differente impatto antropico identificate ricorrendo sia all'osservazione visiva sia alla determinazione delle coordinate geografiche tramite il sistema GPS. Da ogni sito veniva recuperato uno o più reperti che poi venivano riuniti in *pool*, caratteristico della zona campionata. I *pool* costituiti erano 6, uno per ogni zona di campionamento (Tab. 2 e Fig. 9). A questo proposito è utile ricordare che, poiché ogni *pool* è stato ottenuto miscelando contributi equiponderali di due, tre, o quattro reperti, i risultati analitici ottenuti da ciascuna matrice rappresentano in effetti dei valori “medi” di zona.

Proprio l'utilizzo dei *pool* implica una serie vantaggi, ma anche una serie di svantaggi riportati di seguito.

Vantaggi:

- riducono tempi e costi di analisi;
- a parità di numero di dosaggi il pool rappresenta una fetta più ampia di popolazione investigata rispetto al singolo;
- per gli analiti presenti in tracce permette di raggiungere i limiti di determinazione del metodo analitico;

Svantaggi:

- il risultato di pool è sempre una media aritmetica pesata. Se la distribuzione dei dati singoli è molto lontana da una gaussiana la media aritmetica può non rappresentare bene la tendenza centrale (meglio mediana o media geometrica);
- il risultato di pool non permette di stimare la variabilità del dato (deviazione standard, intervallo di confidenza). Per stimarla occorre analizzare più *pool*. Senza una stima di variabilità comunque non è possibile evidenziare un'eventuale eterogeneità dei singoli che sparisce nel dato di pool;
- non è possibile identificare eventuali outliers all'interno di un *pool*.

Pertanto, se da un lato utilizzare il *pool* significa avere una rappresentatività più ampia della laguna, dall'altra risulta evidente come i dati analitici siano carenti dell'informazione derivante dall'unità campionaria a favore di un generico livellamento (o diluizione degli analiti) che all'interno del *pool* ogni contributo sito-specifico esercita sulle componenti complementari.

I reperti di sedimento raccolti nell'ambito della terza campagna di campionamento (Giugno-Luglio 1998) provenivano da due zone di campionamento, all'interno delle quali sono stati individuati più siti di prelievo, comunque appartenenti

ad una unica tipologia di area caratterizzata da un'esposizione di tipo misto (industriale e urbana) (Tab. 2 e Fig. 8 e 9). Come per i reperti di biota, da ogni sito veniva recuperato uno o più reperti di sedimento riuniti successivamente in *pool*, specifico della zona campionata. I pool sottoposti ad analisi erano tre.

I reperti di sedimento sono stati campionati da imbarcazione mediante l'uso di benna, di tipo Ekman-Birge (Fig. 10) che, lasciata cadere per gravità dall'imbarcazione, riesce a raggiungere i 15-20 cm di profondità del fondale lagunare utili ai fini della rappresentatività del campione. Una volta a bordo il reperto veniva rapidamente trasferito in un sacchetto di plastica per alimenti, usando accorgimenti atti a prevenire possibili contaminazioni esterne e a minimizzare eventuali fenomeni di contaminazione incrociata con altri reperti. Il sacchetto veniva sigillato *in loco*, identificato e inserito in un secondo sacchetto che veniva a sua volta sigillato e identificato.

Tutti i sacchetti contenenti i campioni di sedimento venivano conservati al fresco in contenitori coibentati portatili e, al termine di ogni giornata di campionamento, tempestivamente trasferiti in frigorifero (4 °C).

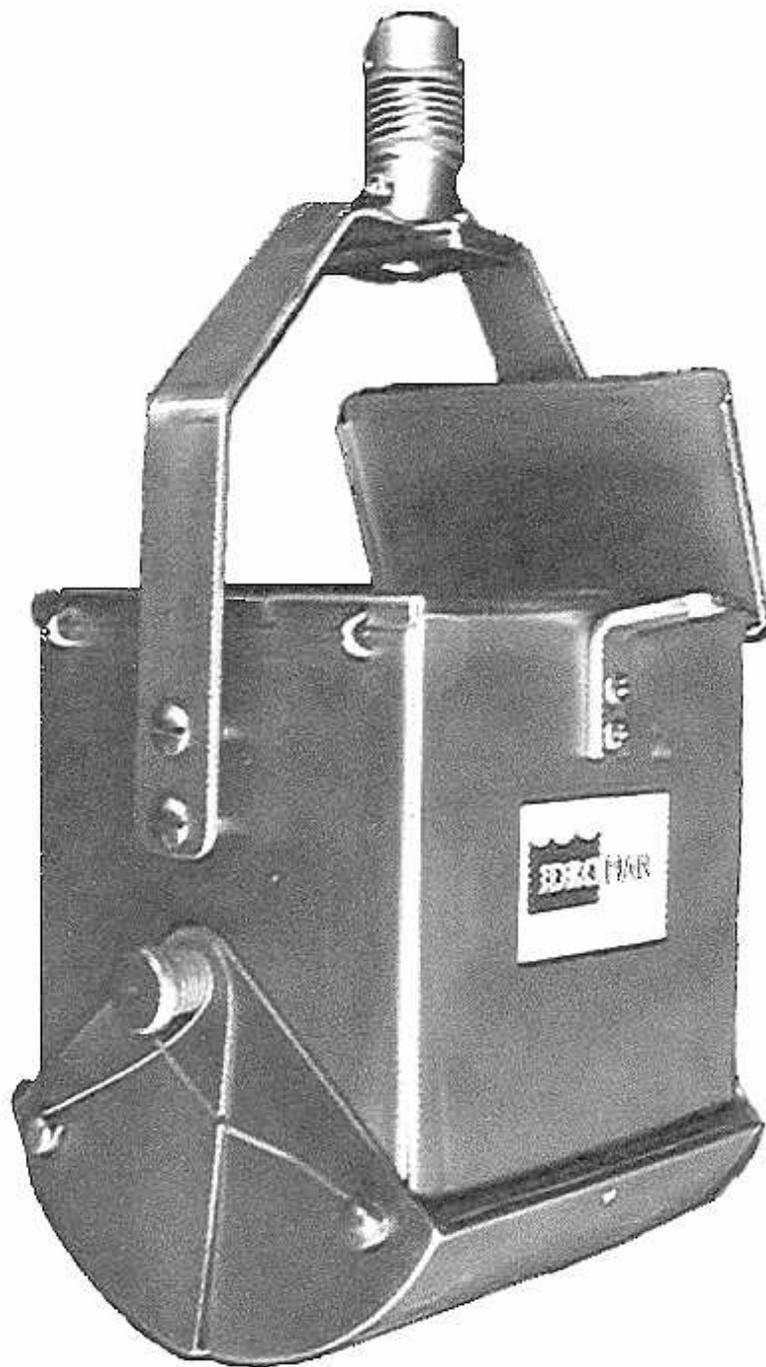


Fig. 10. Benna tipo EKMAN – BIRGE: quando appoggiato sul fondo, lo strumento in acciaio inox viene chiuso con l'invio, lungo il cavo, del peso messaggero fornito insieme alla benna.

E' utile ricordare che questo lavoro di tesi fa parte di un progetto più ampio di valutazione di esposizione, dove le specie animali esaminate erano diverse, e quindi per ogni campagna di campionamento il numero dei reperti raccolti era di gran lunga superiore a quello riportato.

I sedimenti prelevati nella campagna del 2000 (Aprile-Maggio) provengono da due zone della laguna centrale, i cui campioni sono identificati con le lettere E e F (Fig. 9). I reperti sono stati prelevati con un carotatore a mano, capace di raggiungere una profondità di circa 20 cm; sono distanti tra loro alcune decine di metri e disposti in modo da formare un triangolo regolare. I tre prelievi sono stati successivamente riuniti in *pool* in modo pressoché equiponderale. Invece i siti di Chioggia 1 e 2 sono stati caratterizzati con prelievi singoli.

Pretrattamento

Le modalità di pretrattamento e analisi utilizzate per tutti i campioni sono state in gran parte le stesse, come di seguito riportate. Le lievi differenze di trattamento verranno indicate nel testo.

I reperti di sedimento, una volta trasferiti a Roma in un'area protetta del laboratorio, sono stati trasferiti in cristallizzatori e lasciati essiccare all'aria fino al raggiungimento del peso costante (variazioni ponderali sulle 24 ore entro ± 1 %). A essiccamento raggiunto, si è proceduto al setacciamento delle matrici con setacci (25 *mesh*) in acciaio inossidabile, per la rimozione della frazione più grossolana. Dopo il setacciamento, i campioni sono stati omogeneizzati meccanicamente. Le matrici secche, setacciate e omogenee, sono state utilizzate per comporre *pool*.

Analisi

La determinazione di PCB e pesticidi organoclorurati nelle matrici ambientali e alimentari pone una serie di problemi legati alle concentrazioni estremamente basse (pg o ng/g di grasso) alle quali essi sono presenti, e alla necessità di disporre di metodi analitici estremamente selettivi e specifici. Questo vale soprattutto per i PCB che sono costituiti da centinaia di diverse molecole, o “congeneri” a differente grado e pattern di sostituzione, e quindi differente attività tossicologica. La necessità di estrarre selettivamente questi contaminanti e di separarli dalle centinaia di altri contaminanti organici persistenti presenti in campioni ambientali e alimentari presuppone tradizionalmente l’uso di procedure di estrazione selettive e di una serie di passaggi di purificazione. Il dosaggio dei pesticidi e il dosaggio congenere-specifico dei PCB sono di norma effettuati per gas cromatografia ad alta risoluzione accoppiata alla spettrometria di massa a bassa o alta risoluzione (HRGC-LRMS o HRGC-HRMS) [Pavan I. *et al.*, 2003]

Il metodo di analisi utilizzato si articola in diverse fasi:

- aggiunta di Standard Interno (SI),
- estrazione della parte lipidica,
- purificazione,
- evaporazione degli estratti e trasferimento in vial di iniezione,
- analisi strumentale.

Prima di spiegare nei dettagli il metodo di analisi, è bene precisare che per ogni matrice sono stati raccolti i campioni in batch; caratteristica del batch è che ogni suo componente deve seguire la stessa procedura analitica ed essere pretrattato, estratto, purificato e quantificato contemporaneamente agli altri componenti. Ogni batch di

campioni è composto da un numero stabilito di campioni (di solito 4-5) e da un bianco procedurale che servirà per la valutazione delle relative interferenze.

Il bianco procedurale deve seguire le stesse procedure a cui sono sottoposti i campioni. I risultati della determinazione del bianco vengono utilizzati per correggere le misure dei campioni o per rilevare errori dovuti all'interferenza di contaminanti presenti nei reagenti.

Nel nostro caso il bianco dovrebbe essere costituito da campioni di vongole e di sedimento totalmente privi delle sostanze da determinare. Tuttavia, essendo i composti di interesse altamente diffusi in natura, non esiste vongola e sedimento che non ne contenga, anche in minima parte. Pertanto si è scelto di utilizzare come bianco del solfato di sodio anidro (Na_2SO_4), estratto più volte (di solito tre) con esano per escludere la presenza d'eventuale contaminazione da PCB o pesticidi.

- **Aggiunta di Standard Interno (SI)**

Lo 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 simile 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.

Nel metodo corrente lo SI è una miscela costituita dalla maggior parte degli analiti (PCB e pesticidi) da determinare, i cui carboni sono tutti marcati isotopicamente (^{13}C).

Nella preparazione dello SI si è cercato di mantenere i rapporti tra un congenere di PCB e l'altro così come sono presenti "in natura" nelle vongole e nei sedimenti.

Nei campioni e nei bianchi, lo SI è stato aggiunto direttamente. Per campioni congelati questa operazione, che è detta marcatura o fortificazione, veniva effettuata dopo scongelamento degli stessi [di Domenico *et al.*, 1992; Bayarri *et al.*, 2001].

Le matrici fortificate erano lasciate a riposo per 12–24 ore prima dell'estrazione. In alcuni casi, che verranno precisati di seguito, i campioni di vongole sono stati liofilizzati prima dell'estrazione.

Poiché alcune operazioni relative al trattamento dei campioni, dopo l'aggiunta dello SI, sono state effettuate in maniera diversificata per le due matrici in studio e per le diverse campagne di campionamento, si riportano dettagliatamente le procedure eseguite per i campioni di biota e quelli di sedimento.

- **Estrazione e purificazione**

Biota

Gli omogeneizzati dei reperti provenienti dalle due campagne del 1995 e quella del 1996 sono stati sottoposti a liofilizzazione, ottenendo quindi una matrice secca (campioni dried weight, dw). Il liofilizzato (1–2 g), combinato con allumina pre-estratta, veniva sottoposto a estrazione con CO₂ in fase supercritica (SFE) (Supercritical Fluid Extractor). Le condizioni di lavoro dell'SFE erano tali da ottimizzare l'estrazione contemporanea di tutti i composti/congeneri d'interesse (PCB e pesticidi) [Turrio Baldassarri *et al.*, 1999]. Gli analiti estratti e bloccati dalla trappola del sistema, venivano rimossi con n-esano, filtrati su colonna di gel di silice, concentrati, e quantificati con HRGC-LRMS(SIM).

Nell'indagine del 1998, i rilevamenti sono stati eseguiti su matrici "fresche" (wet weight, ww), quindi non liofilizzate: questa variazione è stata introdotta, soprattutto per migliorare l'affidabilità delle misurazioni dei composti volatili (es., HCB), in gran parte persi durante la liofilizzazione. Ogni matrice ww veniva mescolata con eccesso di Na₂SO₄ anidro e lasciata a riposo per 12–24 ore prima di un'estrazione eseguita mediante Soxhlet. L'estrazione era effettuata con una miscela equivolumetrica di n-esano-diclorometano per oltre 16 ore. Un 5–10 % dell'estratto grezzo è stato utilizzato per la quantificazione dei pesticidi: dopo riduzione volumetrica, il volume residuo era eluito con eccesso di n-pentano su colonna multistrato contenente celite impregnata di H₂SO₄ concentrato. L'eluato veniva addizionato di n-tetradecano (1–2 µL), evaporato delicatamente, ripreso con iso-ottano, e inviato alla determinazione strumentale. La quantità rimanente d'estratto grezzo (80–90 %) era sottoposto a clean-up mediante: eluizione su colonna di Extrelut impregnato di H₂SO₄ concentrato, colonna multistrato, e colonna di Florisil adattata da Di Muccio *et al.* [2002]. Da questa veniva prelevata la frazione contenente i PCB di interesse, evaporata delicatamente, ripresa con iso-ottano, e inviata alla determinazione strumentale.

E' utile ricordare che su alcuni campioni è stata fatta la determinazione lipidica per pesata: infatti, la quantità del campione destinata all'analisi dei PCB, prima di essere sottoposta al clean-up, veniva portata delicatamente a secco e il contenuto lipidico pesato.

Nell'indagine del 2000, la matrice fresca (1–5 g ww) veniva mescolata con solfato di sodio anidro (10–20 g) ed estratta con n-esano in ASE. L'estratto era poi purificato con una colonna di Extrelut impregnato di acido solforico concentrato. L'eluato era concentrato e inviato all'analisi strumentale.

Sedimento

Gli omogeneizzati dei reperti di sedimento provenienti dalla campagna di campionamento del Maggio-Giugno 1995 sono stati sottoposti a estrazione in Soxhlet con miscela *n*-esano-acetone. Ogni estratto, prima concentrato e poi portato a volume noto, è stato sottoposto a purificazione liquido-liquido con *n*-esano, dopo aggiunta di acqua distillata. Su alcuni campioni è stata determinata la materia organica estratta (EOM), come riportato nell'Allegato 2.

La fase organica è stata separata, disidratata, e fatta eluire quantitativamente su colonna di Extrelut 20 precedentemente impregnato di acido solforico concentrato. L'eluato concentrato e purificato dallo zolfo è stato fatto percolare lentamente su colonna multistrato (strati attivi: acido solforico concentrato su celite, gel di silice), eluendo con eccesso di *n*-pentano. Questo eluato è stato concentrato e frazionato mediante passaggio su colonna di allumina attivata: dopo il lavaggio con *n*-esano (Frazione 0), la separazione degli analiti è stata ottenuta eluendo con miscela di *n*-pentano-tetracloruro di carbonio (1:1, v/v) per raccogliere PCB e pesticidi (Frazione 1). La frazione d'interesse è stata evaporata sotto flusso di azoto e ripresa con un volume noto di *iso*-ottano per la determinazione strumentale.

Le aliquote di sedimento provenienti dalla campagna dell'Ottobre 1995 sono state sottoposte a estrazione in SFE con CO₂. Per l'abbattimento dello zolfo libero, è stata utilizzata della polvere di rame, mescolata con la matrice. La miscela poi è stata introdotta nella cella d'estrazione, il cui volume residuo è stato colmato con aggiunta di allumina pre-estratta. L'estrazione in SFE, come nel caso dei campioni di biota, è stata condotta utilizzando opportune condizioni di lavoro per ottimizzare l'estrazione contemporanea di PCB, e pesticidi clorurati.

Gli estratti sono stati poi solubilizzati e asportati con *n*-esano; l'estratto esanico, dopo filtrazione su gel di silice, è stato sottoposto a quantificazione strumentale.

I campioni della campagna effettuata a Giugno-Luglio 1998 hanno subito una procedura diversa da quelle utilizzate per i reperti delle precedenti campagne. Ogni campione è stato suddiviso in quattro aliquote, ciascuna estratta in Soxhlet, utilizzando miscele diverse di solventi per il rilevamento dei differenti analiti: con toluene, PCB non-*orto*-sostituiti; con miscela *n*-esano-toluene, per 12 ore per i PCB *orto*-sostituiti (cioè il PCB 118, che è un mono-*orto* sostituito); con miscela *n*-esano-toluene, per 14 ore, per i pesticidi clorurati. Tutti gli estratti sono stati purificati utilizzando un sistema multicolonna convenzionale per il *cleanup* di PCB non-*orto*-sostituiti, e un'eluizione su colonna di gel di silice con una miscela *n*-esano-toluene per quello dei PCB *orto*-sostituiti e dei pesticidi clorurati. Anche in questo caso, per alcuni campioni veniva eseguita la determinazione dell'EOM su una parte del campione, come descritto nell'Allegato 2.

I reperti della campagna del 2000 sono stati suddivisi in due aliquote. La prima è stata estratta in ASE con una miscela di *n*-esano-acetone e successivamente concentrata. Su questa aliquota è stata determinata la Materia Organica Estratta (EOM).

La seconda aliquota, invece, è stata sottoposta a estrazione in SFE (*Supercritical Fluid Extractor*) con CO₂. La matrice pulverulenta veniva preventivamente mescolata con polvere di rame attivata per l'abbattimento dello zolfo libero (in alternativa, lo zolfo veniva rimosso mediante dibattimento con mercurio metallico dell'estratto grezzo o parzialmente purificato). La miscela era introdotta nella cella d'estrazione dell'SFE ed estratta utilizzando opportune condizioni di lavoro per ottimizzare la rimozione contemporanea di PCB, e pesticidi clorurati. Gli analiti estratti, trattenuti dalla trappola

del sistema, venivano rimossi/solubilizzati con *n*-esano; l'estratto esanico, dopo filtrazione su gel di silice, era concentrato e sottoposto a quantificazione strumentale.

- **Evaporazione degli estratti e trasferimento in vial d'iniezione**

L'eluato di ciascun campione era ridotto in volume e trasferito in vial d'iniezione; si aggiunge 1 µL di tetradecano (C₁₄H₃₀) allo scopo di evitare la perdita di analiti dovuta all'evaporazione. Si portava tutto a secco e si riprendeva con una quantità stabilita (di solito 200 µL) di una soluzione esanica di ¹³C clordano (¹³C CHD); il ¹³C CHD veniva utilizzato come Standard di Iniezione allo scopo di minimizzare le eventuali variazioni di volume nel vial di iniezione.

- **Analisi strumentale**

La determinazione degli analiti organici di interesse è stata condotta con le stesse procedure analitiche strumentali per tutti i campioni di entrambe le matrici. Essa è stata eseguita mediante gas cromatografia ad alta risoluzione (HRGC) in combinazione con la spettrometria di massa a bassa risoluzione (LRMS) (EI, 35 eV), utilizzando tecniche di diluizione isotopica adattate dal Metodo 1613 della US EPA. Lo spettrometro ad alta risoluzione (HRMS) è stato spesso utilizzato per confermare rilevamenti eseguiti in LRMS. In tutti i casi è stata impiegata la tecnica SIM (*single ion monitoring*).

Per quanto riguarda la maggior parte degli organoclorurati, la quantità di ogni composto è stata stimata relativamente al corrispondente tracciante. Per i PCB, nell'occasionale mancanza dello *standard* interno appropriato, la quantificazione è stata eseguita per confronto dell'area dell'analita con quella del più vicino tracciante avente lo stesso grado di clorosostituzione, correggendo per il fattore di risposta relativo

(RRF). Sono stati inoltre utilizzati numerosi *standard* esterni, sia per verificare l'identità degli analiti da quantificare tramite la misurazione accurata dei tempi di ritenzione, sia per il calcolo dei Fattori di Risposta Relativi (Relative Responses Factors, RRF), entrambe le grandezze essendo stimate relativamente ai traccianti pertinenti.

I dettagli dell'analisi strumentale e i controlli di qualità (interno ed esterno) del dato analitico sono riportati nell'Allegato 1.

RISULTATI E DISCUSSIONE

PCB

▪ *Biota*

I risultati dei rilevamenti analitici eseguiti sulle 22 coppie di reperti di biota sono riportati nella tabella Tab. 3.

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138+163	PCB 153	PCB 180	Σ 7-PCB
Biota								
5/2-C-2	0.32	0.40	0.85	0.39	1.2	1.1	0.64	4.9
7-C-1	0.26	0.46	0.71	0.60	1.4	1.3	0.65	5.4
7475/C	0.047	0.091	0.12	0.076	0.16	0.15	0.071	0.72
4411	0.34	1.2	2.0	1.9	2.9	2.4	0.97	12
7484	0.42	0.74	1.3	0.87	2.6	2.4	1.4	9.7
12*, 14*	—	—	—	—	—	—	—	—
SLV-B-430	0.30	0.18	0.27	0.28	0.34	0.63	0.37	2.4
SLV- α -B-480	0.97	1.3	2.1	1.9	1.5	3.5	1.3	13
SLV- β -B-491	0.38	0.28	0.39	0.41	0.44	0.72	0.32	2.9
E1-B	0.34	0.27	0.41	0.49	0.55	1.0	0.44	3.5
E2-B	0.42	0.30	0.49	0.50	0.60	1.1	0.53	3.9
E3-B	0.26	0.14	0.34	0.34	0.45	0.93	0.39	2.9
E4-B	0.26	0.16	0.29	0.30	0.37	0.71	0.37	2.5
E5-B	0.24	0.20	0.44	0.40	0.72	0.90	0.52	3.4
E6-B	0.28	0.23	0.43	0.45	0.59	1.2	0.62	3.8
F2-B	0.64	0.32	0.43	0.42	0.45	0.99	0.20	3.5
F3-B	0.23	0.21	0.35	0.43	0.29	0.64	0.22	2.4
F4-B	0.51	0.81	1.3	1.0	1.6	2.3	0.57	8.0
F5-B	0.40	0.38	0.68	0.54	0.43	0.94	0.27	3.6
X1-B	0.73	0.28	0.59	0.44	1.2	1.0	0.63	4.9
Chioggia 1-B	0.27	0.43	1.7	0.97	2.9	3.4	2.1	12
7473, 7474	0.073	0.18	0.38	0.33	0.74	0.78	0.39	2.9
media	0.37	0.41	0.74	0.62	1.0	1.3	0.61	5.1
mediana	0.32	0.28	0.44	0.44	0.60	1.0	0.52	3.6

Tab. 3. Livelli di concentrazione (ng/g ww) dei PCB nei reperti di biota lagunare. I valori sono arrotondati alla seconda cifra significativa. In grassetto i valori minimo e massimo.

I dati sono espressi su base fresca e non sulla base del contenuto lipidico, per la mancanza dei dati relativi alla percentuale di grasso di alcuni campioni. Questo è dovuto al fatto che per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati risultati di progetti di ricerca finalizzati alla valutazione dell'esposizione umana a contaminanti persistenti derivante dal consumo di prodotti ittici lagunari. Infatti la normativa vigente in materia di sicurezza alimentare (vedi <http://www.efsa.europa.eu/it>) prevede che la valutazione dell'*intake* di una sostanza tossica dagli alimenti venga effettuata sulla base del consumo reale dell'alimento in esame (grammi di matrice fresca).

Per ogni congenere si riportano i valori minimi e massimi riscontrati. Si nota che per la quasi totalità degli analiti, i campioni che risultano a contaminazione più bassa e più alta sono il 7475/C e il SLV- α -B-480, rispettivamente. Il primo è stato prelevato di fronte a Chioggia, in una zona definita a bassa contaminazione, che risulta essere di pesca o allevamento. Invece il campione SLV- α -B-480, prelevato nella prima campagna del 1998, proviene dalla zona ad esposizione mista. Situata al centro della laguna, questa area si trova di fronte al polo industriale di Porto Marghera e in prossimità della costa da dove provengono quindi sia i reflui industriali che quelli agricoli. Pertanto, i campioni provenienti da questa zona risultano in generale avere una contaminazione paragonabile, anche se inferiore, a quella dei prelievi effettuati nella zona industriale. I tre campioni "industriali" di cui si hanno i risultati, cioè 5/2-C-2, 7484 e X1-B, hanno valori in genere più elevati di quelli riscontrati nei campioni delle zone mista e di pesca, fatta eccezione per il campione prelevato nella zona antistante Chioggia, che risulta avere dei valori elevati in particolar modo per i congeneri PCB 138, PCB 153 e PCB 180. Questo è dovuto probabilmente alla contaminazione urbana derivante proprio dalla città di Chioggia, che, come trovato in letteratura, risulta avere una certa rilevanza [Losso, Volpi Ghirardini, 2009].

La somma dei livelli di contaminazione dei sette PCB è compresa nel range 0.723-12.6 ng/g ww. L'ampiezza di questo intervallo è dovuta principalmente alla presenza di campioni che derivano da zone a diversa contaminazione: è evidente che quanto riscontrato su campioni prelevati in una zona a impatto industriale influisca sul valore medio di contaminazione in maniera più marcata rispetto a quello trovato in corrispondenza dei campioni provenienti da una zona "più pulita". Proprio per questa ampiezza d'intervallo di valori, risulta più appropriato calcolare i valori di mediana piuttosto che la media al fine di una corretta rappresentazione statistica del fenomeno in studio. Si nota come in generale i valori della mediana siano più bassi rispetto ai valori medi: in particolare, questo andamento è molto marcato per la sommatoria dei sette congeneri. Da un valore medio di 5.1 ng/g ww si passa a una mediana di 3.6 ng/g ww . Questa difformità di contaminazione riscontrata in diverse zone della laguna, o per la stessa zona, in campioni diversi, potrebbe essere dovuta in parte al fenomeno della risospensione dei sedimenti industriali causata dall'intensa attività di pesca delle vongole [Sacco et al., 2005]. Difatti, ogni anno, migliaia di tonnellate di vongole vengono raccolte illegalmente da zone altamente inquinate, come i canali industriali, e destinate all'alimentazione umana [Boscolo et al., 2007].

L'analisi congenere specifica ha evidenziato una prevalenza del congenere esaclorosostituito (PCB 153), seguito dai pentaclorosostituiti (PCB 138, PCB 101, e PCB 118), epta- (PCB 180), tetra- (PCB 52) e infine il triclorosostituito PCB 28. Questo stesso andamento è stato riscontrato in altri studi [Pruell et al., 1986; Binelli and Provini, 2003; Rodriguez-Ariza et al., 2003; Storelli et al., 2003; Boscolo et al. 2007]. In genere, nei molluschi bivalvi la capacità di accumulo e di conseguenza la "clearance" aumenta all'aumentare del grado di clorurazione, così come la lipofilicità, di ogni congenere

[Livingstone, 1992; Connolly, 1992]. Pertanto, gli esa-PCB e i penta-PCB sono accumulati più abbondantemente dei tetra- e dei tri-.

Quanto ritrovato sembra essere in linea con quello trovato in altri lavori riguardanti molluschi veneziani e riportato in dettaglio nella Tab. 4a.

Tab 4a. Livelli di concentrazione di PCB in reperti di biota prelevati nella laguna veneta.

Anno di campionamento	Biota	Concentrazione (ng/g ww)	Riferimento bibliografico
1998	<i>Tapes philippinarum</i>	8.2-62.3	Nasci C. <i>et al.</i> , 2000
2000	<i>Tapes philippinarum</i>	1.6-15.4	Binelli <i>et</i> Provini, 2003
2003-2004	<i>Tapes philippinarum</i>	1.68-4.01	Boscolo <i>et al.</i> , 2007

E' importante sottolineare il fatto che purtroppo i lavori raccolti non sono numerosi. D'altra parte erano stati individuati altri lavori, ma è stata impossibile la consultazione, perché richiedeva un'autorizzazione al Magistrato delle acque di Venezia (vedi MAV-CNV, 1999, 2003 e 2006).

Comunque, per quanto è possibile trarre delle conclusioni dai dati trovati in letteratura, si osserva che gli intervalli di concentrazione rilevati sono ampi, perché ottenuti da campioni di biota prelevati in zone a diverso impatto antropico. In particolare, nel lavoro di Nasci *et al.* i livelli più alti sono stati registrati per quei campioni provenienti dalla zona di Porto Marghera. L'analisi congenere-specifica ha evidenziato inoltre una prevalenza di congeneri tri- e tetra-sostituiti, indice di una contaminazione in atto. In Boscolo *et al.*, emerge invece una predominanza degli esaclorobifenili seguiti dai penta-, dagli epta-, dai tetra- e dai tri-. Anche in questo studio, come nel nostro caso, ci sono delle evidenti diversità di contaminazione tra siti di campionamento differenti. In particolare, i tre livelli più alti sono stati rilevati uno nella zona più a sud della laguna, e gli altri due nella parte più a nord. Anche nello

studio effettuato da Binelli e Provini i livelli più alti derivano da vongole pescate in prossimità della zona di Porto Marghera; come negli altri lavori, si trova un range di valori abbastanza ampio, con un grosso contributo degli esa-sostituiti, seguiti dai penta- e dagli epta-.

Nella Tab. 4b si riporta quanto trovato in letteratura riguardante i livelli di contaminazione di molluschi prelevati in diversi Paesi.

Tab 4b. Livelli di concentrazione di PCB in reperti di biota (molluschi bivalvi*) prelevati in Paesi europei ed extra-europei.

Anno di campionamento	Paese	Range di concentrazione (ng/g ww)	Riferimento bibliografico
1992	Spagna	2-51	Porte <i>et</i> Albaiges, 1993
1997-1998	Italia (Mar Adriatico)	1.2-3.9 1.3-19 (mitili)	Bayarri <i>et al.</i> , 2001
1997	Francia	21 13-38 (cannolicchi, mitili, ostriche)	Thompson S. <i>et al.</i> , 1999
2000	Italia (Sicilia e Sardegna)	2.1-11.9	Binelli <i>et</i> Provini, 2003
2001	Cina	1-13	Fung <i>et al.</i> , 2004
2001-2002	Svezia-Finlandia	1.7-4.3	Pikkarainen A.L. <i>et al.</i> , 2007

* se non specificato tra parentesi, la specie trattata è la vongola.

I risultati presentati in questo lavoro appaiono dello stesso ordine di grandezza di quelli trovati sia in altre zone d'Italia, che in altri Paesi. Si nota in tutti i lavori, l'ampio intervallo di concentrazione caratteristica proprio dell'impatto antropico della zona di campionamento. Pertanto i valori massimi di concentrazione sono sempre riferite a zone ad un maggior impatto antropico. In generale, l'analisi relativa ai singoli congeneri mostra una predominanza dei PCB esa-sostituiti, seguiti dai penta- e dagli epta- [Bayarri *et al.*, 2001; Binelli and Provini, 2003]: cioè è indice di una contaminazione pregressa.

▪ *Sedimento*

I risultati dei rilevamenti analitici eseguiti sulle 22 coppie di reperti di sedimento sono riportati nella tabella Tab. 5.

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138+163	PCB 153	PCB 180	Σ ₇ PCB
Sedimento								
5-A2	0.50	1.3	2.7	2.4	6.7	5.0	4.5	23
7-A2	0.40	0.70	1.3	1.3	2.5	2.1	1.3	9.7
Chioggia 1-2	<1	<2	<0.6	<0.2	<0.4	<0.4	<0.1	—
10	2.9	11	26	26	45	34	19	170
6A	1.0	2.1	5.3	3.9	10	9.0	6.6	38
40	7.0	4.4	13	9.8	30	24	17	105
SLV-S-230B	<0.5	0.6	1.4	2.2	3.5	3.9	2.0	14
SLV-a-S-380A	<1	0.7	1.6	2.7	3.1	3.3	1.4	13
SLV-b-S-390C	<1	0.25	0.27	0.42	<0.4	0.40	0.13	2.2
E1-S	<1	<2	1.1	1.3	2.0	2.2	0.91	9.0
E2-S	<1	3.0	1.2	1.0	1.7	1.9	0.83	10
E3-S	<1	<2	<0.6	<0.2	<0.4	<0.4	0.10	—
E4-S	<1	<2	<0.6	<0.2	<0.4	<0.4	<0.1	—
E5-S	<1	<2	<0.6	<0.2	<0.4	<0.4	<0.1	—
E6-S	<1	<2	<0.6	0.37	0.47	0.52	0.22	3.4
F2-S	<1	<2	<0.6	0.36	<0.4	<0.4	0.15	—
F3-S	<1	2.2	0.91	<0.2	<0.4	<0.4	<0.1	—
F4-S	<1	3.2	1.1	1.0	1.1	1.0	0.7	8.4
F5-S	<1	<2	<0.6	<0.2	<0.4	<0.4	<0.1	—
X1-S	<1	<2	<0.6	0.53	1.3	1.3	0.65	5.6
Chioggia 1-S	<1	<2	<0.6	<0.2	<0.4	<0.4	<0.1	—
90	0.073	0.16	0.42	0.66	1.20	0.64	0.48	3.6
media	—	2.2	4.0	3.8	7.8	6.4	4.0	29
mediana	—	1.0	1.3	1.3	2.3	2.1	1.1	9.9

Tab. 5. Livelli di concentrazione (ng/g dw) dei PCB nei reperti di sedimento lagunare. I valori sono arrotondati alla seconda cifra significativa. In grassetto i valori minimo e massimo. In grigio, i reperti con un elevato numero di congeneri non determinati.

I risultati ottenuti sono riportati su base secca. La valutazione dell'EOM è stata effettuata solo su alcuni campioni, pertanto non è stato possibile riportare i livelli di contaminazione normalizzati per il valore della materia organica totale.

Appare subito chiaro come siano diversi i congeneri non determinati (riportati in grigio), ossia al di sotto del limite di quantificazione (<LOQ), e come in alcuni casi sia

inappropriato calcolare la somma dei sette congeneri. Infatti, nel caso di valori cumulativi che includono il contributo virtuale di dati sotto il limite di quantificazione, questo *modus operandi* può generare il dubbio sulla rappresentatività dei livelli di concentrazione effettivamente presenti in una determinata matrice campionaria. Pertanto, la rappresentatività è stata valutata sulla base dell'indicatore f , quantità frazionaria che esprime il contributo relativo, sul valore cumulativo, dei livelli di concentrazione di fatto misurati [De Felip *et al.*, 1994; di Domenico *et al.*, 1995b; De Felip & Miniero, 1999]. Per definizione f varia tra 100 e 0 %, quest'ultimo valore essendo espressione di assenza di dati misurati e dunque dell'esclusiva presenza di contributi virtuali. In base alle esperienze di laboratorio del Reparto di Chimica Tossicologica, tali contributi tendono a determinare figure cumulative sovradimensionate piuttosto che sottodimensionate. In genere la sovrastima aumenta al diminuire del contributo dei dati misurati, ovvero di f : per $f < 60$ %, le figure cumulative si caratterizzano in sostanza come stime superiori. Pertanto, per campioni dove $f < 60$ %, non sono riportati i valori cumulativi. Dove possibile, invece, il calcolo dei valori cumulativi per famiglia, i risultati composto- o congenere-specifici non determinati — ovvero, espressi come limite di quantificazione ($< \text{LOQ}$) — sono stati inseriti come $\text{LOQ} \times 0.5$ (stima *medium bound*).

Come per il biota, anche per i sedimenti l'intervallo della somma delle concentrazioni dei sette congeneri è molto ampio, 2.2 – 170 ng/g dw, determinato, così come già visto per le *Tapes philippinarum*, dalla presenza di campioni a contaminazione molto diversa. Nel calcolo del valore medio (29 ng/g dw) e della mediana (9.9 ng/g dw) non sono stati inclusi i campioni con una f non idonea. In particolare, la maggioranza di questi erano stati prelevati nella zona centrale della laguna, caratterizzati da una esposizione di tipo misto. Si nota come il valore medio sia più vicino al limite inferiore

dell'intervallo di contaminazione riscontrato, rispetto al limite superiore. Addirittura, nel calcolo della mediana, il valore considerato è ancora più basso. Questo ampio intervallo di concentrazioni è dovuto alla presenza di due reperti a contaminazione molto elevata rispetto agli altri. In particolare, i reperti denominati 10 e 40 hanno rispettivamente 170 e 105 ng/g dw. Il livello più alto è stato rilevato in un sedimento prelevato nella zona ad esposizione prevalentemente urbana, mentre il secondo valore più alto è stato riscontrato in un reperto industriale. Anche l'analisi congenere-specifica conferma questo andamento di elevata contaminazione. Per tutti gli altri reperti non sembra esserci una significativa differenza nel livello di contaminazione, collegabile alla zona di prelievo del sedimento. Ad esempio, il campione SLV-b-S-390C che ha il valore di contaminazione più basso proviene da una zona ad impatto antropico misto, del tutto simile al campione 90 che invece proviene da una zona di pesca. Non troppo diverso da questi è il campione industriale X1-S, che invece era atteso più contaminato. Questa disomogeneità è stata riscontrata da altri [Secco et al., 2005] nelle stesse aree di studio. Sembra probabile che questo forte gradiente di concentrazione di contaminazione dipenda dalla continua risospensione di sedimenti contaminati che migrano da una parte all'altra della laguna. Questo è causato da diverse situazioni che contribuiscono in maniera diversa al fenomeno: la presenza di pesca illegale di molluschi in zone vietate, le continue operazioni di dragaggio e il continuo passaggio di barche [Frignani et al., 2001].

L'analisi congenere-specifica dei sedimenti mostra una prevalenza media del PCB 138 (pentasostituito), seguito dall'esasostituito PCB 153. A concentrazione più bassa si trovano poi il PCB 101 (penta-) e PCB 180 (epta-), seguiti dal PCB 118 (penta-) e infine dal tetraclorosostituito PCB 52. Si nota come il comportamento dei congeneri sia più disordinato rispetto a quanto avviene nei molluschi. Risulta comunque

mantenuta la tendenza all'accumulo e quindi alla difficile escrezione dei congeneri a un più alto grado di clorurazione.

Questa dispersione dei dati risulta evidente in altri lavori trovati in letteratura, come riportato in Tab. 6a.

Tab 6a. Livelli di concentrazione di PCB in reperti di sedimenti prelevati nella laguna veneta.

Anno di campionamento	Concentrazione (ng/g dw)	Riferimento bibliografico
1994	4-239	Moret et al., 2001
1996-1998	1-2049	Frignani M. <i>et al.</i> , 2001
1998	2.7-96	Nasci C. <i>et al.</i> , 2000
1998	0.6-12	Secco et al., 2005
2001-2004	26-810	Guerzoni et a., 2007
1990-2000	1-103	Apitz, 2007a

In particolare, in Frignani et al. si è registrata una forte variazione di concentrazione in sedimenti prelevati nella zona industriale di Porto Marghera non imputabile nè alla diversa composizione granulare del terreno, né al loro contenuto in carbonio organico totale (TOC). L'elevato range di concentrazione è dovuto principalmente a un campione prelevato nella zona di Porto Marghera con un grado di contaminazione elevatissimo rispetto agli altri sedimenti analizzati. L'analisi congeneri-specifica ha poi rilevato la presenza di congeneri a basso grado di clorurazione e l'analisi sui PCDD/F [Bellucci et al., 2000] ha dato risultati elevati di questi analiti. Questo suggerisce che il campione in questione si trovava in prossimità di una fonte espositiva.

Nel lavoro di Secco et al., i PCB più abbondanti risultano il PCB 138 e il PCB 153, seguiti dal PCB 101 e PCB 118. Anche in questo caso è chiara la diversa

contaminazione da PCB relativa alla zona di campionamento, cioè di come generalmente la contaminazione dipenda dalla distanza del campione dalla fonte di esposizione (presente e/o passata). Anche qui risulta la scarsa correlazione tra concentrazione dei contaminanti e carbonio organico totale, come pure è riportato in altri studi [Coakley et al., 1993; Edgar et al., 2002].

Nella Tab. 6b sono riportati i livelli di concentrazione di PCB riscontrati in sedimenti prelevati in diversi Paesi.

Anno di campionamento	Paese	Concentrazione (ng/g, dw)	Referimento bibliografico
1992	Italia	2.6-317	Guzzella L., 1997
1997	Francia	0.66	Thompson S. <i>et al.</i> , 1999
1997	Russia	1.11 – 37.9	Savinov V.M. <i>et al.</i> , 2003
2000	Messico	0.016-0.36	Carvalho F.P. <i>et al.</i> , 2009
2000-2001	USA (California)	116-304	Sapozhnikova Y. <i>et al.</i> , 2004
2001-2002	Russia	0.07-0.58	German and Zakonov, 2003
2001-2002	Svezia-Finlandia	0.01–6.2	Pikkarainen A.L. <i>et al.</i> , 2007
2003	India	0.18-1.49	Guzzella L. <i>et al.</i> , 2005
2004	Hong Kong	0.11-67	Moganti S. <i>et al.</i> , 2008
2007	Turchia	0.013-483	Okay O.S. <i>et al.</i> , 2009

L'ampio intervallo di concentrazione accomuna un po' tutti i lavori presenti in letteratura. D'altra parte appare evidente come in Paesi a diversa storia espositiva i sedimenti possano avere delle concentrazioni notevolmente difformi. Si osserva poi che sedimenti prelevati in una zona sufficientemente circoscritta possano dare risultati molto diversi per la presenza di una fonte espositiva ben localizzata, come ad esempio nel lavoro di Okay et al., dove il valore massimo di contaminazione risulta molto elevato per la presenza di un cantiere navale.

Comunque, in generale, i lavori riportano delle concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quelle riscontrate nella laguna di Venezia.

Elaborazione statistica

L'analisi statistica effettuata sui dati ottenuti dalle analisi di campioni di biota e sedimento per la ricerca di PCB e pesticidi organoclorurati ha previsto le elaborazioni di seguito indicate:

- scrematura dei dati (valori al di sotto del limite di quantificazione e *outlier*);
- analisi di correlazione (cumulativo e congenere-specifica);
- analisi di regressione lineare congenere-specifica (dove era positiva l'analisi di correlazione);
- analisi dei profili.

I dati sperimentali sono stati elaborati mediante il software Microsoft Excel XP, utilizzato anche per la costruzione di grafici e tabelle. Correlazioni e regressioni lineari sono state eseguite tramite il programma STATISTICA 6.0.

- ***Criterio di selezione dei dati***

Dato l'esiguo numero dei dati a disposizione (solo 22 coppie) non è stato possibile effettuare un'analisi di distribuzione di frequenza. Ad ogni modo, da quanto disponibile in letteratura da dati analoghi, e dall'esperienza scientifica del laboratorio di Chimica Tossicologica (dovuta a precedenti studi effettuati su matrici ambientali e alimentari), si può ipotizzare una distribuzione log-normale per entrambi i data set di dati, cioè per i dati delle matrici biotica e abiotica rispettivamente.

Al fine di una corretta e appropriata elaborazione, non tutti i dati ottenuti dalle 22 coppie di reperti sono stati valutati statisticamente significativi. Infatti, tutte le coppie di campioni, in cui entrambi le matrici o una delle due presentavano dei valori non determinati (<LOQ), sono stati eliminati, perché ritenuti poco rappresentativi dei livelli di concentrazione effettivamente presenti.

Inoltre, è stata eseguita una ricerca dei possibili *outlier*, applicando il test di esclusione sulla somma dei livelli di contaminazione da PCB per le due matrici, utilizzando il software STATISTICA 6.0. Il risultato del test è riportato in Fig. 11 e 12, dove sono evidenziati i campioni risultati positivi. E' utile ricordare che il test utilizzato considera *outlier* o dati estremi tutti quelli che cadono fuori dall'intervallo 25° - 75° percentile di un fattore pari o superiore a 3 (± 3).

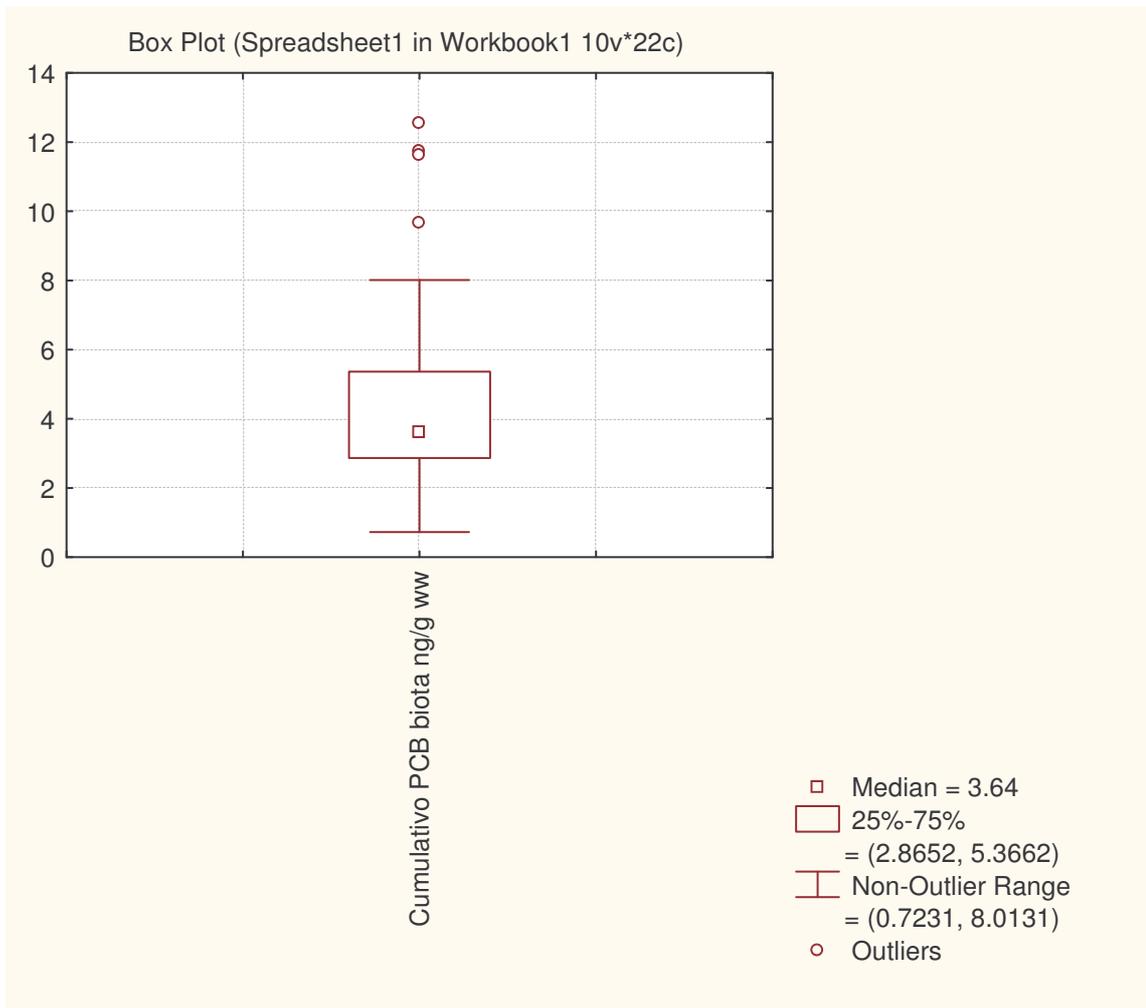


Fig. 10. Risultato del test di ricerca degli *outlier* per i campioni di biota sui valori di PCB.

I reperti risultati *outlier* sono quattro e rispettivamente il 7484 (proveniente dalla zona di Porto Marghera), il campione 4411 raccolto nella zona urbana di Venezia, il campione Chioggia 1-B (prelevato in una zona di pesca) e infine il campione SLV- α -B-480 (a esposizione mista). Il fatto che i quattro campioni provengano dalle quattro possibili tipologie di zone di prelievo riflette la diversità di contaminazione delle aree in studio; questo andamento è indice di una mancata correlazione tra tipo di zona espositiva e relativa contaminazione chimica. Infatti, come già riportato, reperti provenienti da una zona a impatto antropico misto possono avere concentrazioni di PCB maggiori di reperti provenienti dalla zona industriale.

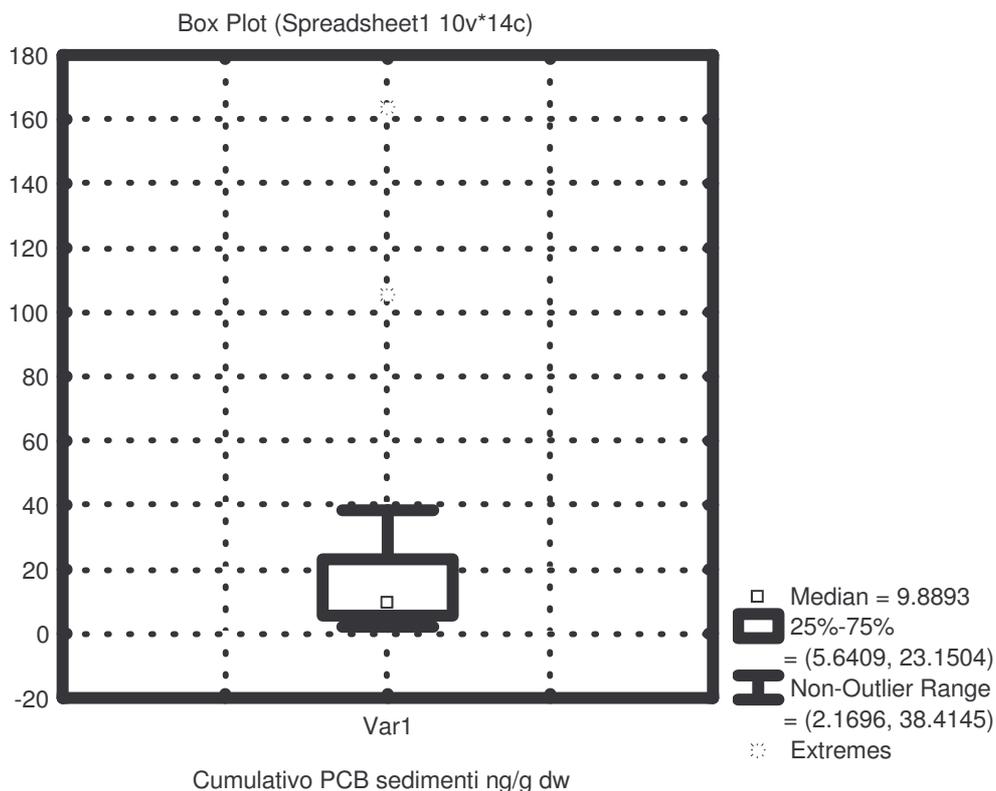


Fig. 11. Risultato del test di ricerca degli *outlier* per i campioni di sedimenti sui valori di PCB.

I campioni di sedimento risultati *outlier* sono rispettivamente un reperto della zona industriale (40) e un campione urbano di Venezia (10), come evidenziato in Fig. 11.

Si osserva che i componenti la coppia biota-sedimento 10-4411 risultano degli *outlier* anche singolarmente.

Come già detto, i dati considerati inappropriati (cioè i valori non determinati e gli *outlier*) sono stati eliminati. Pertanto, le coppie di reperti rimaste si sono ridotte a 11, come risulta dalla Tab. 7.

Tab. 7

Reperti di biota	Σ PCB (ng/g ww)	Reperti di sedimento	Σ PCB (ng/g dw)
5/2-C-2	4.91	5-A2	23.15
7-C-1	5.37	7-A2	9.69
7484	9.67	6A	38.41
SLV-B-430	2.37	SLV-S-230B	13.94
SLV-b-B-491	2.94	SLV-b-S-390C	2.17
E1-B	3.50	E1-S	8.96
E2-B	3.94	E2-S	10.09
E6-B	3.80	E6-S	3.38
F4-B	8.01	F4-S	8.36
X1-B	4.91	X1-S	5.64
7473, 7474	2.87	90	3.63

Lo studio dei livelli della concentrazione dei PCB è proseguito quindi proprio sulle coppie rimaste.

▪ *Analisi di correlazione e regressione lineare*

Cumulativo PCB

Utilizzando ancora il software STATISTICA 6.0, è stata trovata una correlazione tra i due set di dati (pearson $r = 0.69$, $p < 0.01$) che ha portato alla regressione in campo lineare riportato nella Fig. 13.

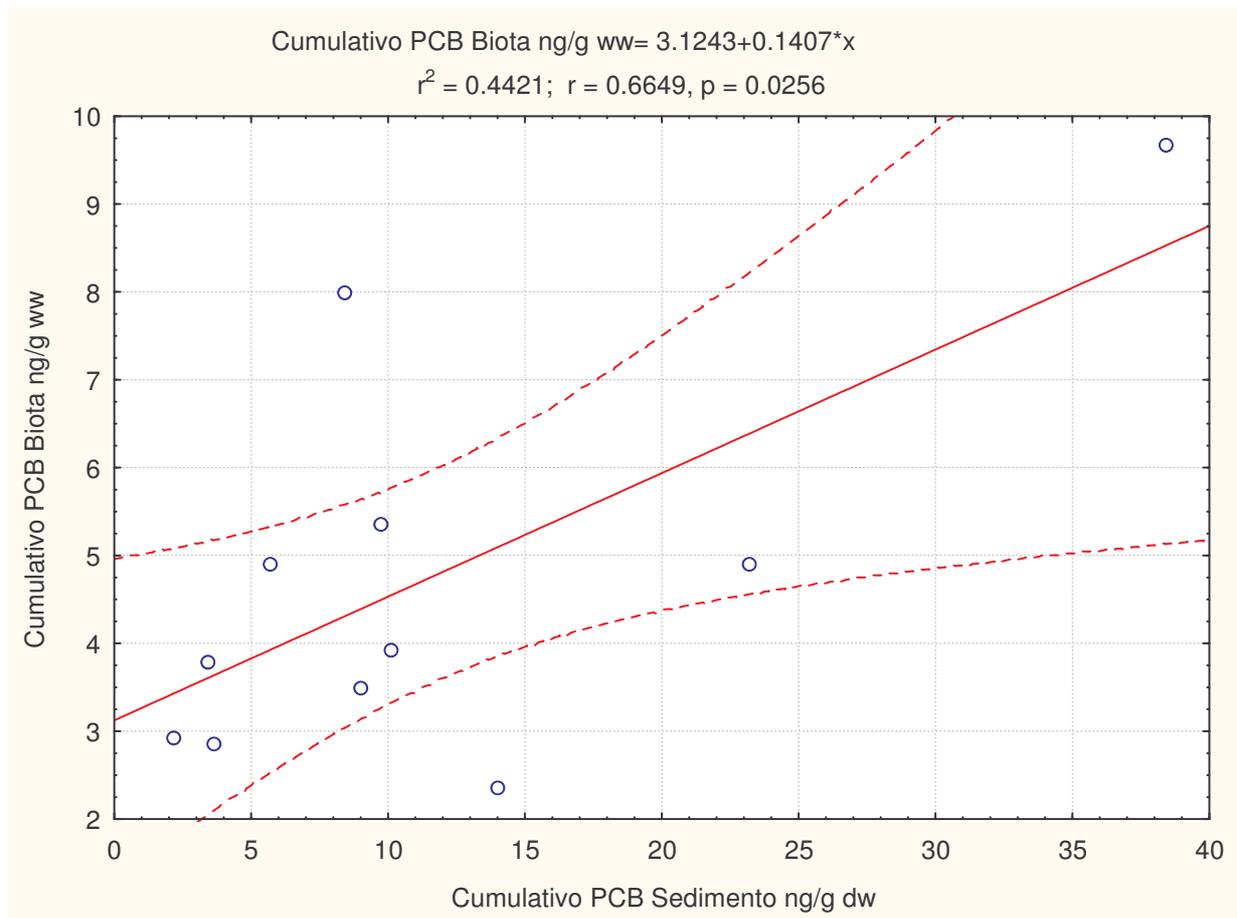


Fig. 12. Risultato dell'analisi di regressione lineare (in campo lineare) sul cumulativo dei PCB eseguita dopo l'analisi di correlazione.

Si osserva che i campioni rimasti al di fuori dell'intervallo di confidenza (95%) sono le coppie F4-B/F4S e SLV-B-430/SLV-S-230B, entrambi provenienti dalla zona considerata a impatto antropico misto. Questo riflette ancora una volta la grande distribuzione di contaminazione lagunare.

La funzione lineare relativa all'analisi di correlazione è:

$$Y = 3.12 + 0.14 X$$

Analisi congenere specifica

L'analisi di correlazione congenere specifica è stata condotta utilizzando lo stesso approccio avuto con i livelli cumulativi dei PCB. Isolando ciascun congenere, però, è stata necessaria un'ulteriore scrematura dei dati, poiché molti campioni presentavano dei valori al di sotto dei limiti di quantificazione, che come già detto, non sono utilizzabili ai fini di una corretta analisi statistica.

L'ulteriore scrematura dei dati è stata particolarmente frequente nella matrice sedimenti e soprattutto per i congeneri a un più basso grado di clorurazione. Pertanto per ciascun congenere è diverso il numero di coppie prese in considerazione nella valutazione dell'analisi di correlazione prima e di regressione poi.

Hanno dato esito positivo le analisi di correlazione dei PCB 101 ($r = 0.7$, $p < 0.05$), PCB 138 ($r = 0.68$, $p < 0.05$) e PCB 180 ($r = 0.8$, $p < 0.05$).

Non è stata invece trovata una correlazione per i PCB 52 ($r = 0.68$, $p > 0.05$), PCB 118 ($r = 0.29$, $p > 0.05$), PCB 153 ($r = 0.47$, $p > 0.05$).

Per il PCB 28 non è stata effettuata nessuna analisi di correlazione, poiché erano pochi i dati determinati relativi alla concentrazione del congenere nei sedimenti.

Quindi, è stata eseguita l'analisi di regressione sui congeneri PCB 101, PCB 138 e PCB 180, che ha portato alle funzioni in campo lineare, come riportato sotto.

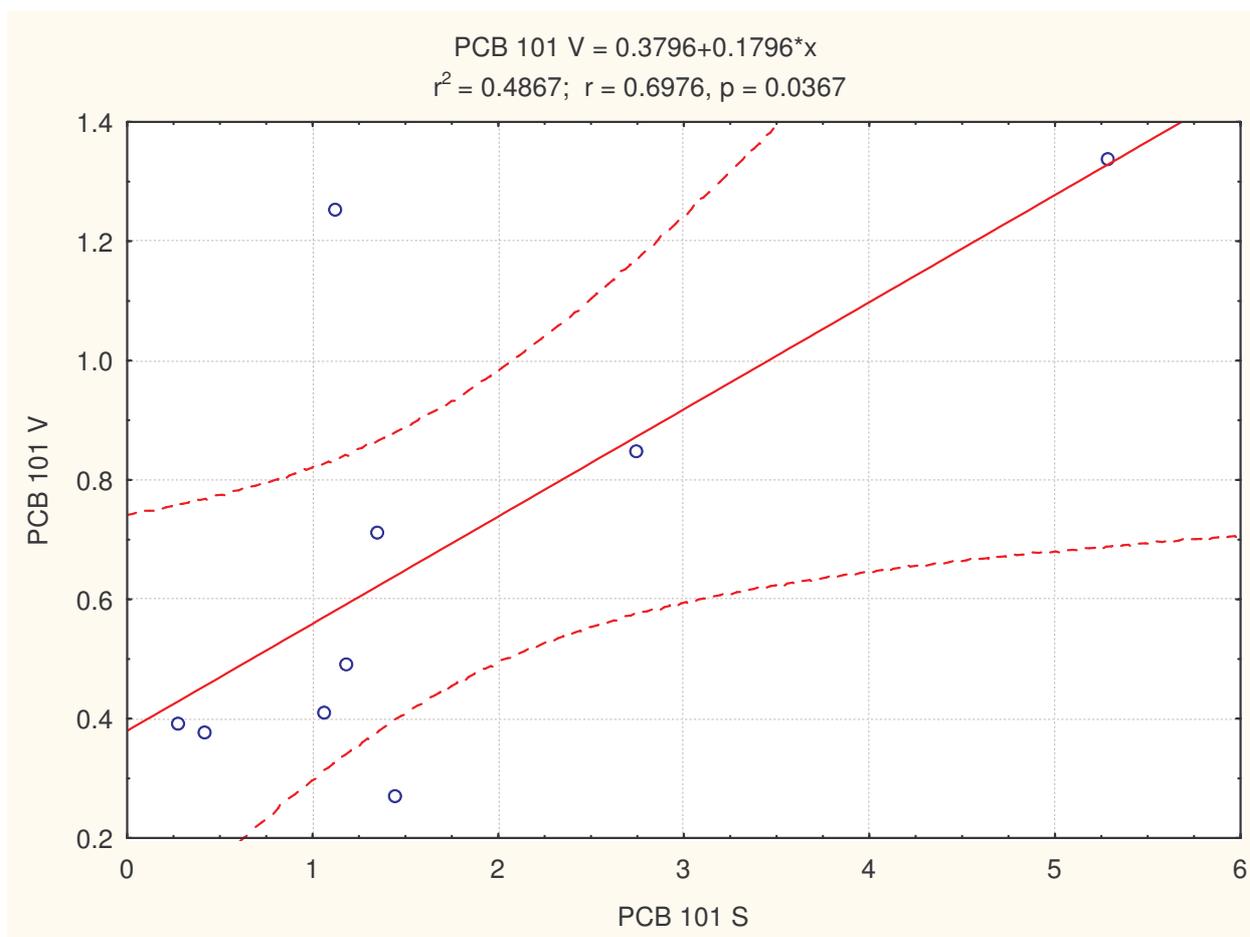


Fig. 14. Risultato dell'analisi di regressione lineare sul congenere PCB 101.

La retta di regressione risultante per il PCB 101 ha dato un coefficiente di correlazione soddisfacente: infatti i valori sono tutti relativamente vicino alla retta di interpolazione, ad eccezione di due coppie che fuoriescono dall'interno di confidenza (95%): F4B/F4S e SLV-B-430/SLV-S-230B entrambe prelevate nella zona centrale della laguna, a impatto antropico di tipo misto.

La retta di regressione del PCB138 è quella della Fig. 15.

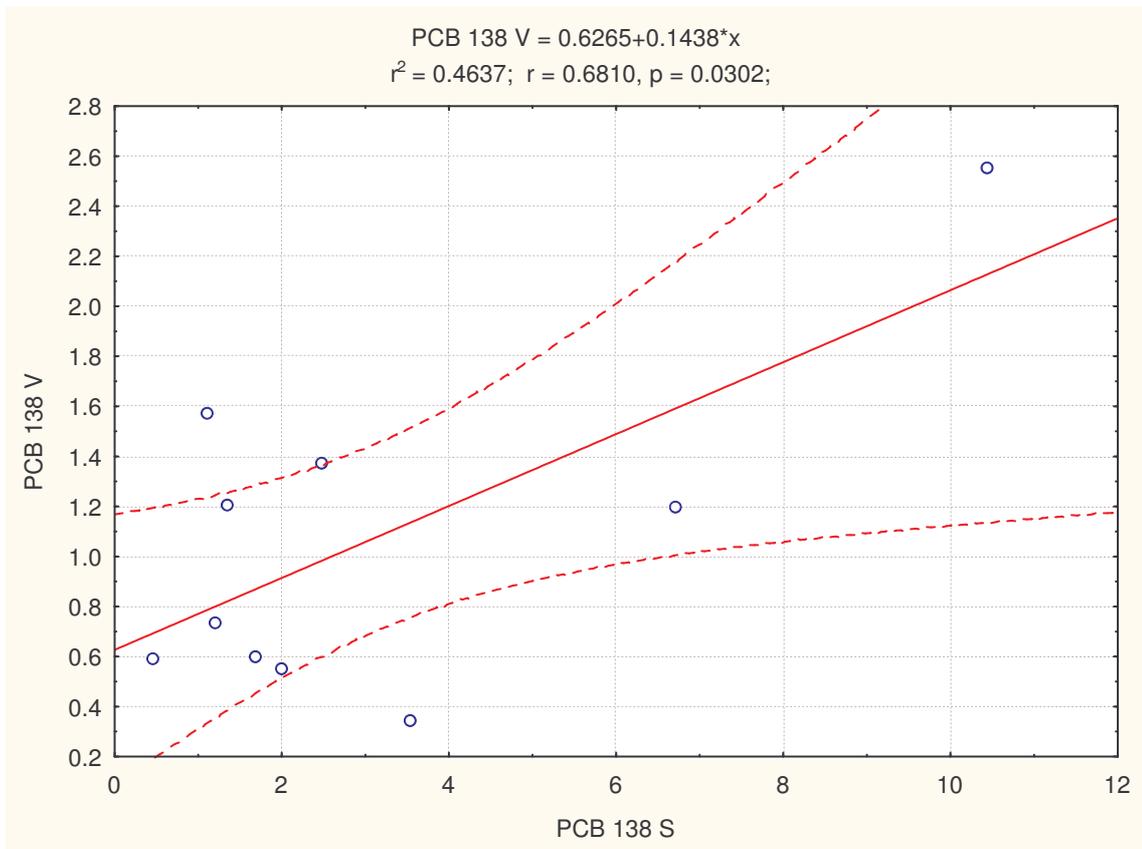


Fig. 15. Risultato dell'analisi di regressione lineare sul congenere PCB 138.

Il coefficiente di correlazione è $r = 0.68$; non tutti i valori si distribuiscono lungo la retta di regressione, ma comunque la maggior parte di loro rientra nell'intervallo di confidenza tracciato. Infatti fanno eccezione due coppie F4B-F4S e SLV-B-430/SLV-S-230B, che risultano fuori dell'intervallo di confidenza anche nell'analisi di regressione del PCB 101.

La retta di regressione del congenere PCB 180 è riportata in Fig. 16.

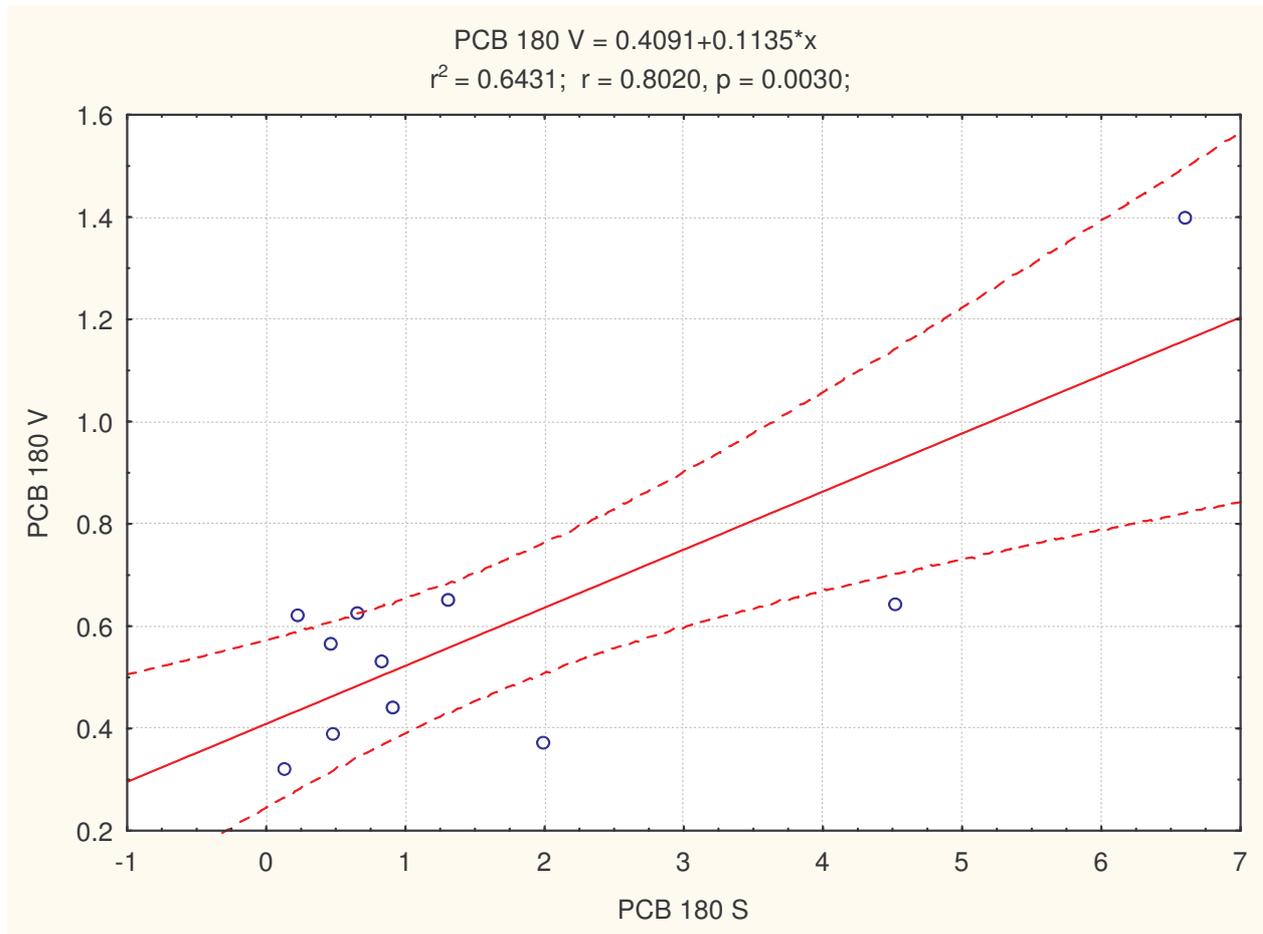


Fig. 16. Risultato dell'analisi di regressione lineare sul congenere PCB 180.

Come si può notare anche per questo congenere si è ottenuto un buon coefficiente di correlazione. I dati sono tutti molto vicini alla retta ad eccezione di tre coppie di campioni che comunque non distano troppo dalla linea di demarcazione che raffigura l'intervallo di confidenza scelto. Le coppie rimaste fuori dall'intervallo di confidenza sono 5/2-C-2/5-A2, E6B/E6S e SLV-B-430/SLV-S-230B, prelevati rispettivamente nella zona industriale la prima, e nella zona miste le altre due.

Una correlazione attesa, sulla base della letteratura scientifica di settore [Binelli et al., 2003; Bayarri et al., 2001], non è stata trovata per i due congeneri 118 e 153. Tale risultato può essere spiegato analizzando i rispettivi profili, campione per campione.

Analisi dei profili

- ***Biota***

Per poter completare l'analisi congenere-specifica e valutare se esiste una relazione struttura dipendente, che correla cioè caratteristiche chimico-fisiche dell'analita con il fenomeno del bioaccumulo è stato necessario riportare i profili dei reperti di vongole e sedimenti prese in considerazione nell'elaborazione statistica.

I profili dei campioni di biota sono riportati nelle Fig. 17, 18, e 19. Sull'asse delle ascisse si riportano i congeneri di interesse, mentre sull'asse delle ordinate sono riportate delle unità arbitrarie. In pratica i valori vengono normalizzati a 100, dividendo ogni valore per il più alto congenere relativo a ciascun campione.

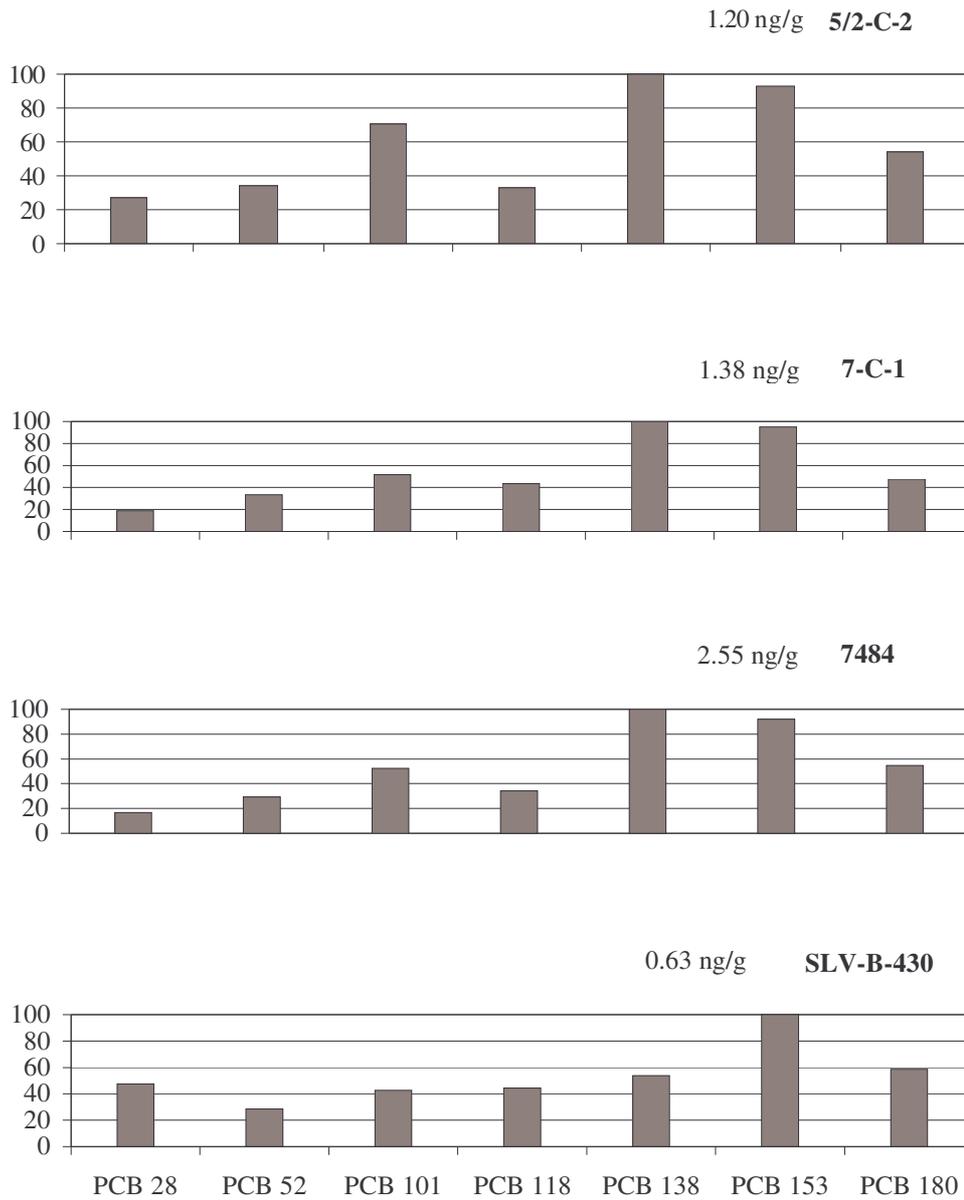


Fig. 17. Concentrazioni relative ai PCB in campioni di biota. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

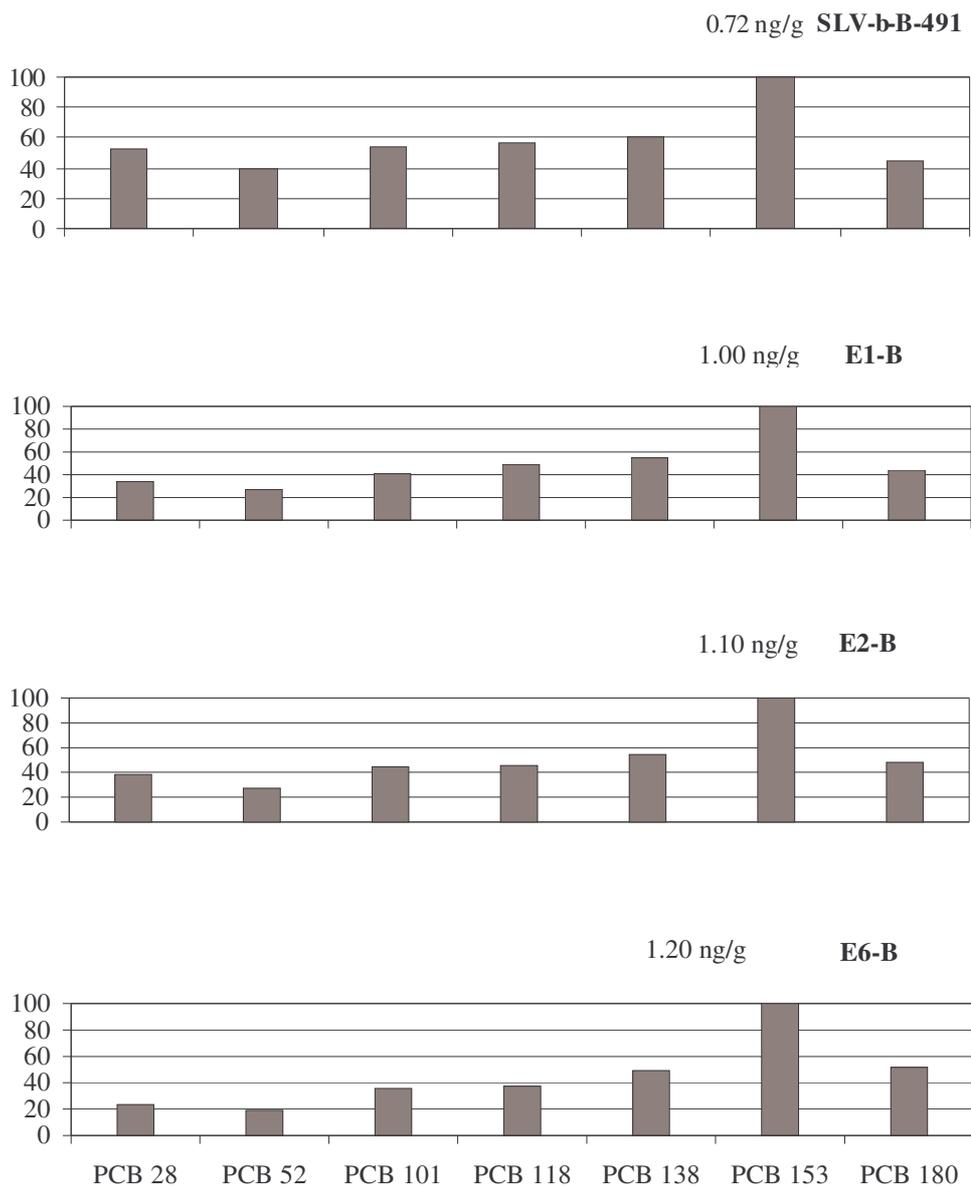


Fig. 18. Concentrazioni relative ai PCB in campioni di biota. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

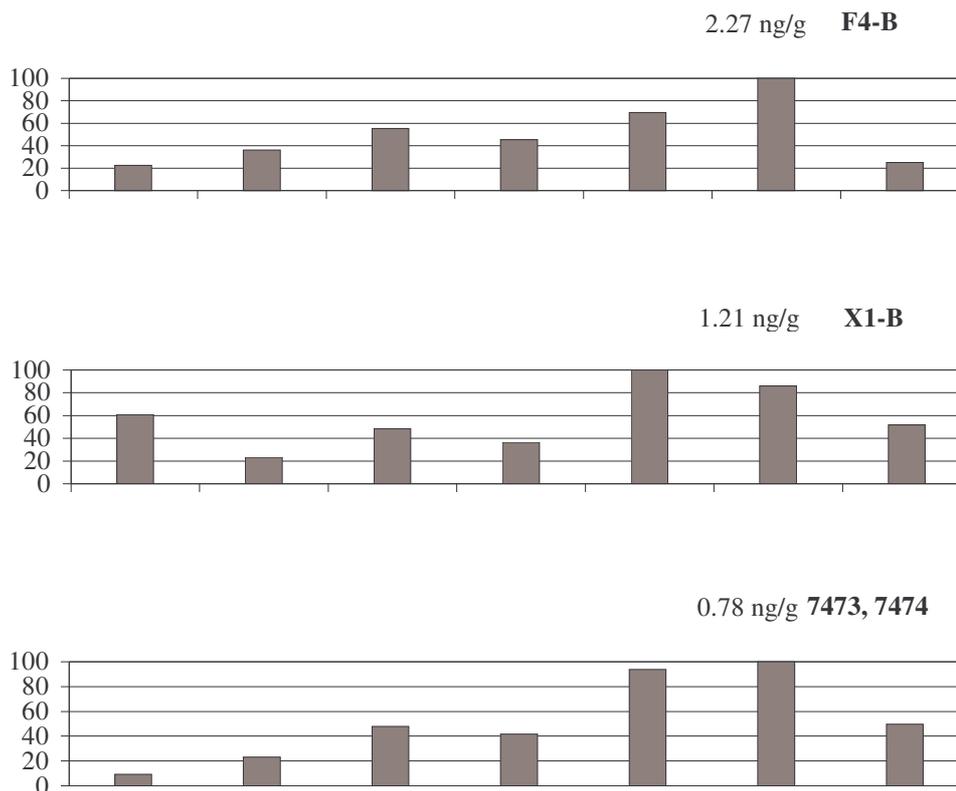


Fig. 19. Concentrazioni relative ai PCB in campioni di biota. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

Per tutti gli 11 reperti di *Tapes philippinarum* si nota un andamento molto simile, così come già spiegato nella discussione dei risultati dell'analisi congenere specifica. Comunque si evidenzia che, nella maggior parte dei casi, il congenere predominante risulta essere l'esaclorurato PCB 153, seguito dal pentaclorurato PCB 138. Solo in alcuni campioni c'è un'inversione tra questi due congeneri. In generale si ha comunque un contributo importante da parte dei congeneri a più alto grado di sostituzione (penta-, esa- e epta-) che, come noto, è indice di una contaminazione dovuta a un'esposizione pregressa [Pruell et al., 1986; Storelli et al., 2003; Binelli and Provini, 2003; Rodriguez-Ariza et al., 2003; Boscolo et al. 2007.].

In alcuni campioni (SLV-B-430, SLV-B-491, E1, E2 e X1) sembra esserci un contributo importante dei congeneri PCB 28 e PCB 52, che comunque rimangono in concentrazione più bassa dei penta- e esasostituiti.

Quanto riscontrato trova conferma in letteratura. [Hoekstra P.F. *et al.*, 2002; McLeod P.B. *et al.*, 2007 ; Nasci C. *et al.*, 2000].

▪ **Sedimento**

Diverse sono le considerazioni da fare osservando con attenzione i profili ottenuti per gli 11 campioni di sedimento (Fig. 20, 21 e 22).

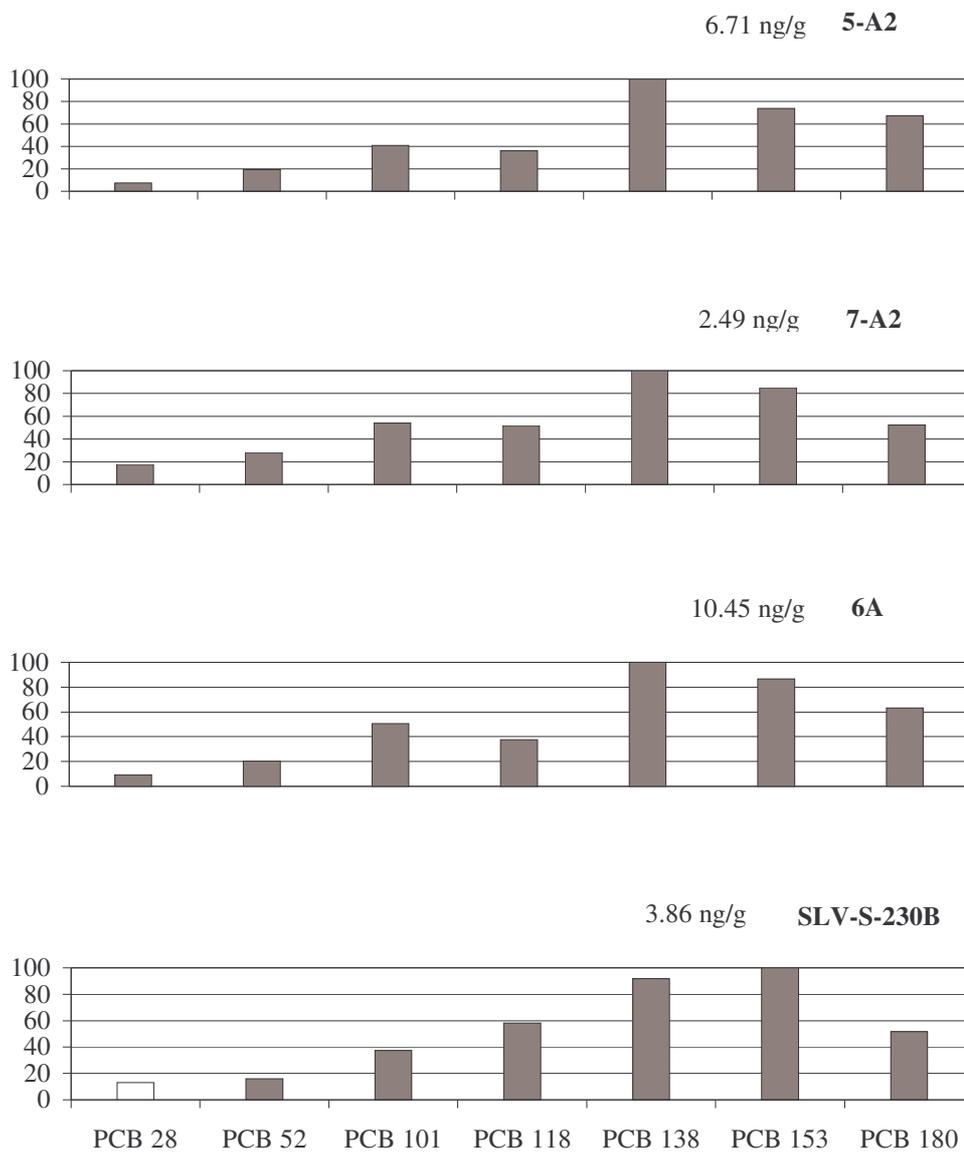


Fig. 20. Concentrazioni relative ai PCB in campioni di sedimento. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

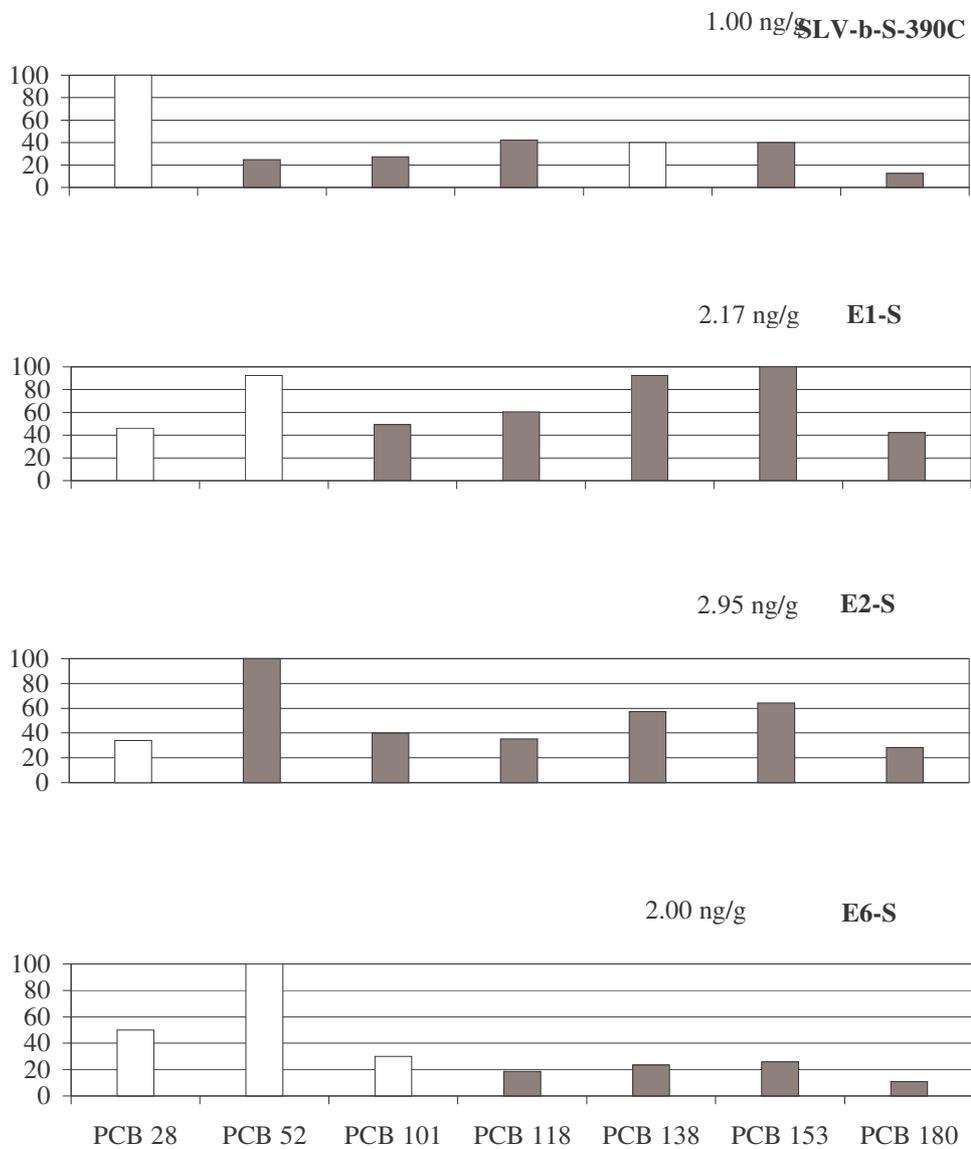


Fig. 21. Concentrazioni relative ai PCB in campioni di sedimento. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

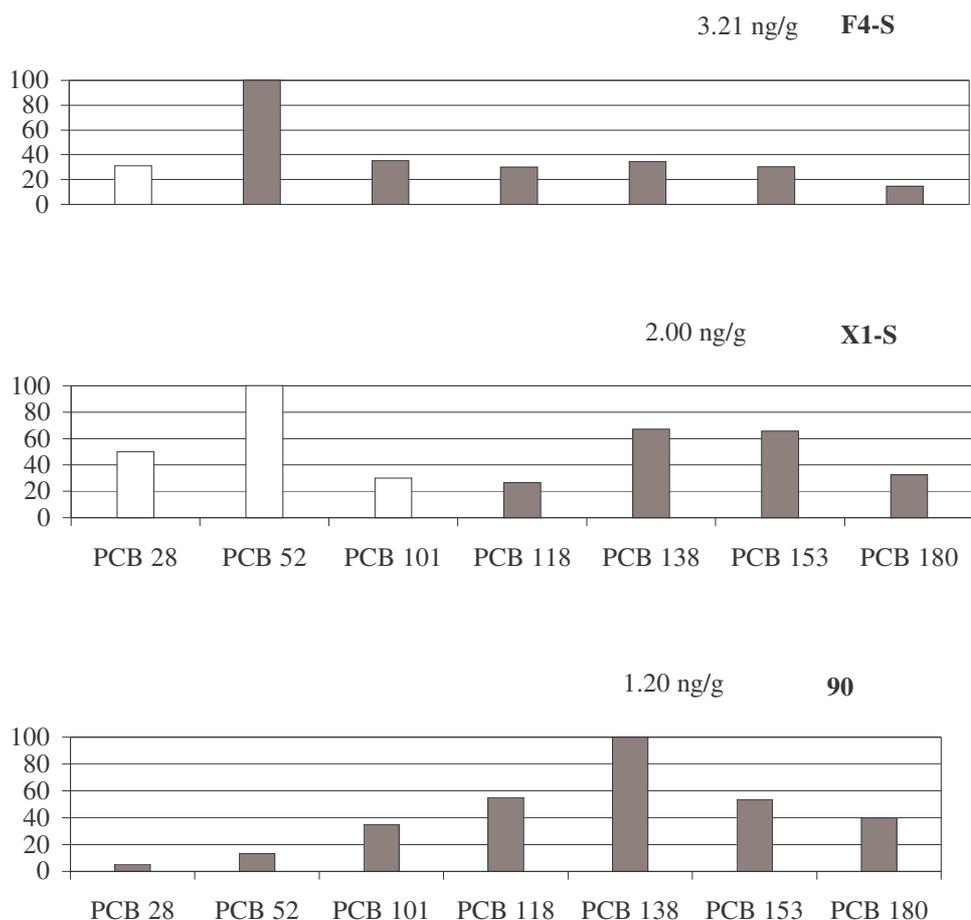


Fig. 22. Concentrazioni relative ai PCB in campioni di sedimento. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

I profili mostrano differenze interessanti tra i diversi reperti di sedimento: infatti, i campioni 5-A2, 7-A2, 6A, SLV-S-203B, e 90 hanno un profilo congenere specifico caratteristico con una chiara predominanza dei PCB 138 e PCB 153, come riscontrato nei reperti di biota. I campioni sopra citati erano stati raccolti in diverse zone lagunari a diverso impatto antropico. In particolare i campioni 5-A2 e 6A provengono dalla zona di Porto Marghera, il campione 90 dalla zona di pesca antistante Chioggia e gli altri due campioni dalla zona cosiddetta mista.

Gli altri reperti mostrano pertanto dei profili diversi, con una predominanza dei congeneri a un basso grado di clorurazione. Questo potrebbe essere indice di un contributo da sorgenti diverse rispetto a quello dovuto al fondo [Frignani et al., 2001]. Si nota che i reperti provengono tutti dalla zona centrale della laguna, a impatto antropico definito misto. Come già ricordato, la zona centrale della laguna è sottoposta al carico inquinante industriale (Porto Marghera), civile (città di Venezia) e agricolo (terraferma); quindi, probabilmente questi possono rappresentare uno stato di contaminazione dovuto alla miscela di più possibili fonti [Frignani et al., 2001].

E' probabile che questa differenza tra i *pattern* possa giustificare la mancata correlazione di alcuni congeneri, in particolare il PCB 153, tra biota e sedimento, come riportato nel paragrafo "Analisi congenere specifica".

▪ **Profili medi**

Analizzando, invece, i profili ottenuti dai valori medi delle 11 coppie di biota e sedimenti si nota come questi siano molto simili tra le due matrici, con una predominanza dei PCB 138 e 153 (Fig. 23).

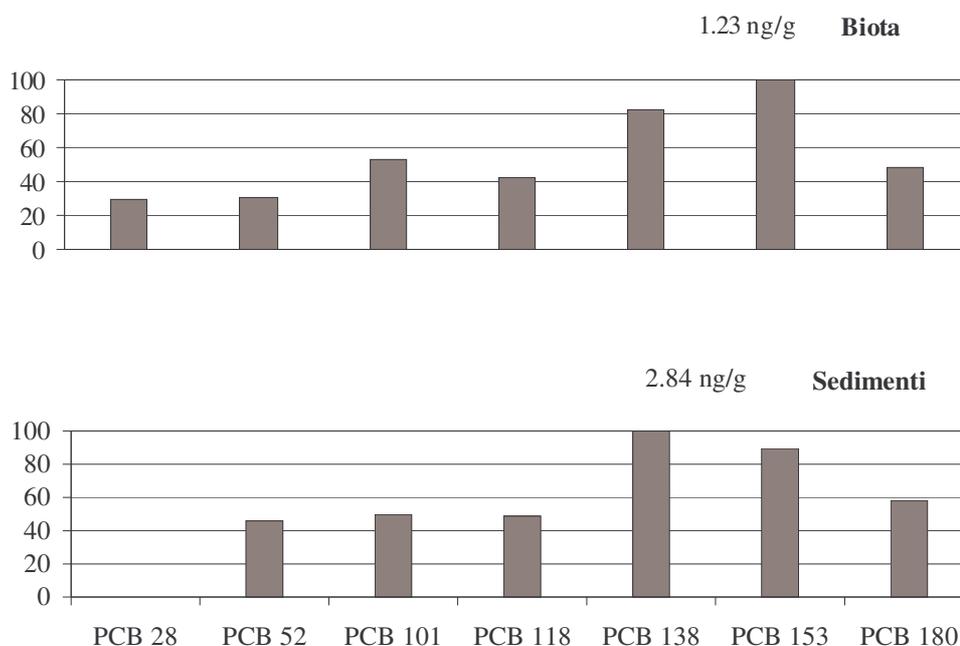


Fig. 23. Concentrazioni medie relative di NDL-PCB indicatori in campioni di biota e sedimento. Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca.

In particolare, il profilo medio dei sedimenti è in accordo con quello trovato in due campioni di particolato sospeso, prelevato nella campagna di campionamento del 1998 in una zona molto vicina a quella della coppia di campioni SLV- α -B-480, SLV- α -S-380A e SLV- β -B-491, SLV- β -S-390C. Quanto detto è raffigurato in Fig. 24. Anche in questo caso è evidente la predominanza dei congeneri a più alto grado di clorurazione. Molto diversa è invece la situazione riscontrata nei campioni di acqua che, filtrata, ha dato origine ai due campioni di particolato sospeso: in questi reperti è elevata

la presenza dei congeneri a bassa clorurazione, quali i congeneri PCB 28 e PCB 52, che risultano più idrofili.

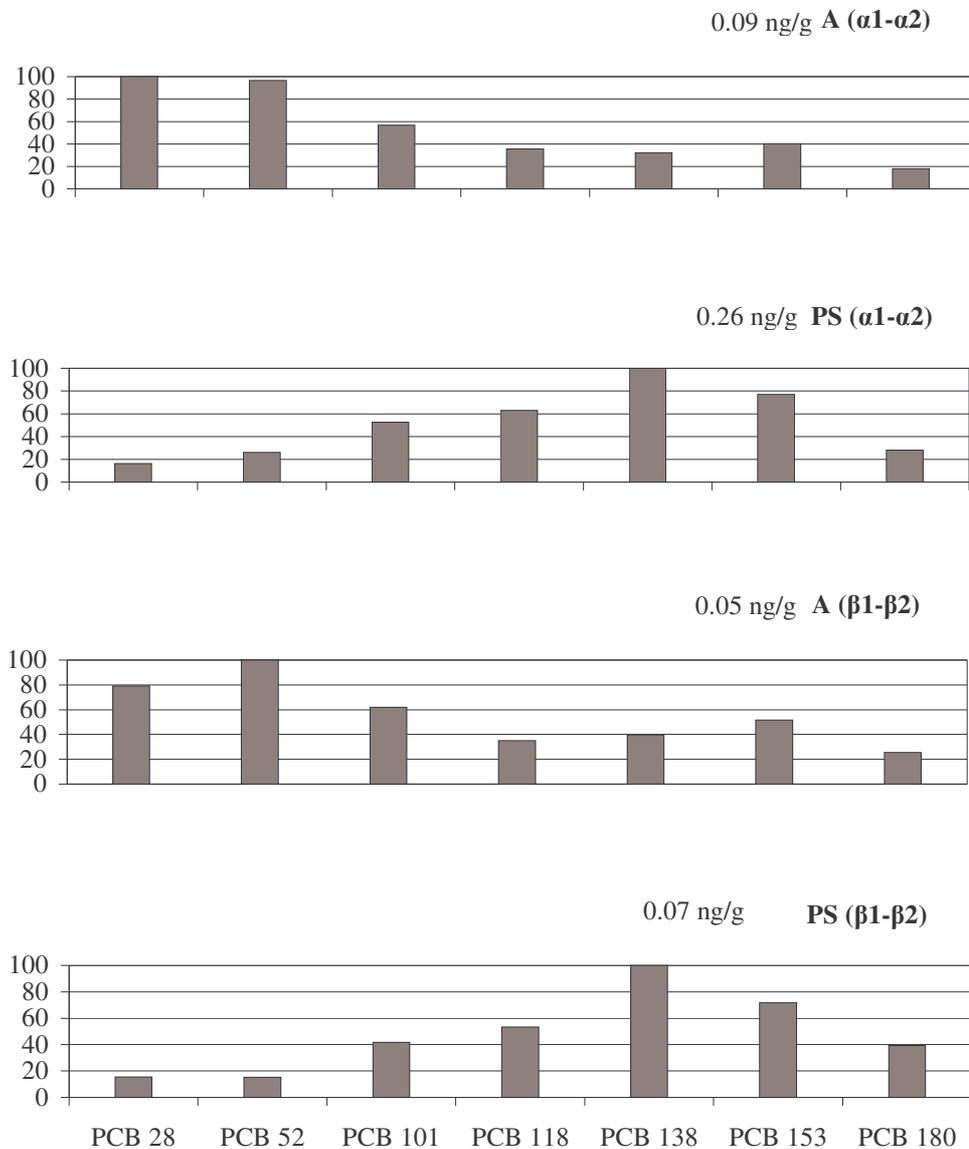


Fig. 24. Concentrazioni relative di NDL-PCB indicatori in campioni di acqua (A) e particolato sospeso (PS). Tutti i valori sono riferiti all'unità in peso di matrice fresca. Le barre chiare corrispondono ai LOQ.

Stima del BAF

Per la valutazione della capacità di bioaccumulo delle vongole dai sedimenti è indispensabile la determinazione del fattore di bioaccumulo (BAF). In realtà, come già espresso nelle pagine precedenti, appare più corretto parlare di fattore di bioaccumulo biota-sedimento (BSAF), che, come ricordato è dato dal rapporto della concentrazione dell'inquinante nel tessuto del biota, espressa su base grassa, e della concentrazione della stessa sostanza chimica determinata nel sedimento, espressa su carbonio organico totale (TOC). Come detto in precedenza, però, non si hanno a disposizione i dati delle concentrazioni dei PCB del biota su base grassa, né quelli riferiti ai valori di TOC per ciascun sedimento. Pertanto, per la valutazione del fenomeno del bioaccumulo viene considerato il BAF anziché il BSAF. Si ritiene comunque che tale semplificazione non dovrebbe modificare in maniera sostanziale la descrizione del fenomeno del bioaccumulo.

In questo lavoro sono stati stimati i BAF relativi ai congeneri di interesse delle 11 coppie di campioni in studio. Sono stati considerati solo i congeneri per i quali è stata trovata la retta di regressione (PCB101, PCB 138 e PCB 180), poiché il fattore di bioaccumulo è rappresentato dal valore del coefficiente angolare della retta migliore che descrive l'andamento lineare per ciascun congenere, come riportato nella Tab. 8.

Congenere	BAF stimato	$K_{ow}^{(a)}$
PCB 101	0.19	6.38
PCB 138	0.14	6.83
PCB 180	0.11	7.36

Tab. 8. Confronto dei valori di BAF stimati con il K_{ow} dei congeneri di interesse.

(a) D.W. Hawker and D.W. Connell. Octanol-water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. Environ. Sci. Technol., 22 (1988) 382-387.

Come si può notare tutti i valori di BAF sono al di sotto di 1. Questo sta a significare che per le coppie biota-sedimento prese in considerazione non sembrerebbe esserci un bioaccumulo dei contaminanti in studio. Tale comportamento era già stato osservato confrontando i valori di concentrazione ottenuti per ogni coppia. Difatti, nella stragrande maggioranza dei casi, sono più alte le concentrazioni dei congeneri nei campioni di sedimento che nel biota, come già riportato nel paragrafo della discussione dei risultati. Come riportato in letteratura [Nasci et al., 2000] la causa di questo potrebbe essere dovuta al tempo di esposizione necessario per raggiungere lo *steady state* indispensabile per il passaggio dei contaminanti dal sedimento al biota. Mentre nello studio sopra citato questo fenomeno si verificava per i soli campioni di Porto Marghera, nel nostro studio invece il fenomeno si ripete indipendentemente dall'origine del campione. E' ipotizzabile che il non raggiungimento dello *steady state* potrebbe essere dovuto al continuo movimento del sedimento lagunare e della popolazione di vongole che vi risiede.

Confrontando i valori stimati dei BAF con i valori del K_{ow} si nota un andamento inverso. Infatti, mentre dai valori dei coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua ci si aspetterebbe un maggiore accumulo da parte dei congeneri più sostituiti, dai valori stimati di BAF l'accumulo invece sembra essere inversamente proporzionale all'aumentare del numero degli atomi di cloro. Questa apparente contraddizione può essere spiegata considerando il fatto che il K_{ow} è un parametro termodinamico che indica la tendenza di una sostanza a legarsi alla frazione organica, o lipidica, di una matrice piuttosto che alla frazione acquosa. D'altra parte, però, non tiene conto di altre proprietà fisiche, quali ad esempio l'ingombro sterico di una molecola, che è poi alla base del meccanismo con cui una sostanza riesce a penetrare la membrana cellulare. Tale processo è legato essenzialmente alle dimensioni di una molecola: molecole più

piccole riusciranno ad attraversare le barriere cellulari con più facilità delle molecole più ingombranti.

Pertanto, alla luce di quanto detto, e considerando che i valori ottenuti per il BAF sono stati ricavati da un andamento, è ipotizzabile concludere che i valori di BAF stimati derivino da una sorta di equilibrio tra i due processi in gioco: da una parte, l'aumentare del grado di lipofilità dei congeneri corrisponde ad un aumento del grado di clorurazione, d'altra parte però all'aumentare del grado di clorurazione aumenta anche l'ingombro sterico.

Pesticidi

I risultati dei rilevamenti analitici eseguiti sulle 22 coppie di reperti di biota e di sedimento sono riportati nella Tab. 9.

Biota (B)	Sedimento (S)	DDE		DDT		HCB	
		B	S	B	S	B	S
5/2-C-2	5-A2	0.82	3.0	—	—	12.5	340
7-C-1	7-A2	0.73	0.057	<0.3	0.080	4.8	0.28
7475/C	Chioggia 1-2	0.18	0.17	<0.3	<0.2	0.29	<0.1
4411	10	1.2	14	<0.5	2.4	0.73	3.7
7484	6A	2.1	1.6	<1	2.7	4.0	70
12*, 14*	40	—	5.1	—	2.9	—	49
SLV-B-430	SLV-S-230B	0.050	0.99	<0.1	0.31	0.084	2.1
SLV- α -B-480	SLV-a-S-380A	0.20	0.33	<0.1	<0.2	0.38	0.87
SLV- β -B-491	SLV-b-S-390C	0.53	<0.2	<0.1	<0.2	0.034	<0.1
E1-B	E1-S	0.13	1.0	<0.1	0.35	0.84	3.5
E2-B	E2-S	0.060	1.0	<0.1	0.25	1.1	4.0
E3-B	E3-S	<0.05	<0.2	<0.1	<0.2	0.43	0.44
E4-B	E4-S	<0.05	0.78	<0.1	0.36	0.21	0.27
E5-B	E5-S	0.22	1.0	<0.1	<0.2	1.0	0.37
E6-B	E6-S	0.72	0.42	<0.1	0.20	2.2	0.52
F2-B	F2-S	0.050	0.53	<0.1	0.30	0.083	0.28
F3-B	F3-S	0.050	0.45	<0.1	0.38	0.037	0.10
F4-B	F4-S	1.1	0.83	<0.1	0.28	1.2	0.86
F5-B	F5-S	0.13	<0.2	<0.1	<0.2	0.044	<0.1
X1-B	X1-S	0.57	2.0	<0.1	1.0	7.8	6.4
Chioggia 1-B	Chioggia 1-S	0.61	0.13	<0.1	<0.2	0.77	<0.1
7473, 7474	90	0.35	0.93	<0.3	<0.3	0.31	0.29
	media	0.47	1.6	—	0.63	1.8	23
	mediana	0.22	0.81	—	0.29	0.73	0.52

Tab. 9. Livelli di concentrazione dei tre pesticidi organoclorurati nei reperti di biota (ng/g ww) e di sedimento (ng/g dw) lagunari. I valori sono arrotondati alla seconda cifra significativa. In grassetto i valori minimo e massimo. In grigio i valori non determinati (<LOQ).

E' interessante notare che nella coppia 5/2-C-2 / 5-A2 è stata riscontrata la concentrazione più alta per il pesticida HCB. Si ricorda che la coppia sopraddetta è stata prelevata in prossimità della zona industriale di Porto Marghera. Si nota, inoltre, che il sedimento 7-A2 (zona a esposizione mista) presenta i valori più bassi per i DDT e il suo metabolita DDE.

- **Biota**

Il valore medio del *p,p'*-DDE calcolato sulle 22 coppie di reperti (i valori al di sotto del limite di quantificazione sono stati trattati con approccio *medium bound* ($LOQ \times 0.5$)) è pari a 0.47 ng/g ww, con un range pari a 0.05-2.1 ng/g ww. L'intervallo trovato è sufficientemente ampio da rendere l'uso della mediana un miglior approccio per la descrizione della tendenza centrale della distribuzione dei dati. Il valore calcolato di 0.22 ng/g ww è circa la metà del valore medio.

Il valore più alto è stato riscontrato nel campione 7484, derivante dalla zona industriale di Porto Marghera, mentre il campione meno contaminato (SLV-B-430) è stato raccolto nella zona a esposizione mista, relativamente vicino alla costa (Fig. 8).

I livelli di concentrazione del DDT riscontrati nei reperti di biota sono tutti al di sotto del limite di quantificazione. Poiché l'uso del DDT è stato abolito negli anni settanta nella Comunità Europea, è presumibile trovare nell'ambiente dei valori piuttosto bassi [Herrera et al., 1994; Bayarri et al., 2001], addirittura al di sotto dei limiti di quantificazione, soprattutto nelle matrici che appartengono ai livelli superiori della catena alimentare. Infatti, avendo un'emivita di circa 4 anni nell'uomo, questo pesticida degrada nei suoi maggiori metaboliti, il DDE e il DDD. Generalmente nelle matrici ambientali e alimentari sono determinabili i livelli del primo metabolita, mentre il DDD non viene quasi mai rilevato, perché viene velocemente escreto.

In letteratura sono pochi i lavori consultabili che trattano la contaminazione dei due pesticidi nel biota della laguna, come riportato nelle Tab. 10a e b. Nasci et al., e Binelli e Provini riportano i valori di concentrazione del DDT trovato in reperti di *Tapes philippinarum* campionate tra il 1998 e il 2000 in prossimità del polo industriale di Porto Marghera. I livelli indicati appaiono in linea con quanto trovato da altri in diversi Paesi. Bayarri et al. ritrovano in vongole pescate nel Mar Adriatico delle concentrazioni

di DDE del tutto simili a quelle riportate in questa tesi; livelli più alti si registrano per i mitili. Lo stesso si verifica in Thompson et al., dove il valore dei mitili è decisamente più alto di quello delle vongole e di altri molluschi bivalvi.

Il valore medio del pesticida HCB riscontrato nei reperti in studio è pari a 1.8 ng/g ww, con un intervallo di 0.034-12.5 (mediana = 0.73 ng/g ww). L'ampiezza dell'intervallo dei valori trovati dipende essenzialmente dalla concentrazione massima trovata nel campione 5/2-C-2 raccolto nella campagna di campionamento del 1995 in prossimità della zona industriale di Porto Marghera. Anche i campioni 7484 (zona industriale) e 7-C-1 (zona mista) contribuiscono all'allargamento del range di concentrazione. Gli altri, invece, campioni hanno una contaminazione abbastanza omogenea e dello stesso ordine di grandezza, ad esclusione di qualche campione che risulta a bassissima contaminazione.

Anche in letteratura (Tab. 10a e b) i valori di concentrazione del pesticida HCB non risultano molto diversi da quelli di questo studio, mantenendo però dei valori sempre molto contenuti, senza cioè riscontrare mai valori alti come quelli registrati nei campioni indicati sopra.

Tab 10a. Livelli di concentrazione di pesticidi organoclorurati in reperti di biota prelevati nella laguna veneta.

Anno di campionamento	Biota	Concentrazione (ng/g dw)	Riferimento bibliografico
1998	<i>Tapes philippinarum</i>	DDT = 1.2-3.7	Nasci C. et al., 2000
2000	<i>Tapes philippinarum</i>	DDT = 0.4-3.4 HCB = 0.03-0.15	Binelli et Provini, 2003

Tab 10b. Livelli di concentrazione di pesticidi organoclorurati in reperti di biota (molluschi bivalvi) prelevati in Paesi europei ed extra-europei.

Anno di campionamento	Paese	Range di concentrazione (ng/g dw)	Riferimento bibliografico
1997-1998	Italia (Mar Adriatico)	DDE = 0.7-0.8 (vongole) DDE = 1.6-3.0 (mitili)	Bayarri <i>et al.</i> , 2001
1997	Francia	DDE = 2.6 (vongole) DDE = 2-18 dw (cannolicchi, ostriche, mitili)	Thompson S. <i>et al.</i> , 1999
2000	Italia	DDT = 1.0-1.9 HCB = 0.03-0.1	Binelli <i>et Provini</i> , 2003
2001	Cina	DDT = 14-640	Fung <i>et al.</i> , 2004
2001-2002	Svezia-Finlandia	DDT = 0.13-0.47 DDE = 1.0-3.0 HCB = 0.07-0.15	Pikkarainen A.L. <i>et al.</i> , 2007

▪ **Sedimento**

I rilevamenti analitici effettuati su campioni di sedimento hanno portato ai risultati mostrati nella Tab. 9.

Il valore medio di DDE rilevato nei sedimenti è pari a 1.6 ng/g dw, con un range di concentrazione di 0.057-14 ng/g dw. L'ampiezza dell'intervallo permette l'uso della mediana, che risulta pari a 0.81 ng/g dw e che descrive in modo più appropriato la contaminazione generale. In particolare, il valore massimo di contaminazione è stato trovato nel campione 10, prelevato nella zona urbana di Venezia. Il valore minimo, invece, si è avuto per il campione 7-A2, proveniente dalla zona mista. Come già osservato nell'analisi dei PCB, anche per quella dei pesticidi, si nota una certa difformità di contaminazione particolarmente evidente negli ampi intervalli di concentrazione riscontrati e nei valori trovati nei campioni della zona cosiddetta mista, che, come più volte ricordato, si trova al centro di una serie diverse di fonti di contaminazione (industriale, urbana e agricola).

Per quanto riguarda la presenza del DDT nei sedimenti, si osserva che il range di concentrazione è abbastanza ampio, 0.080-2.9 ng/g dw, con una media di 0.63 ng/g dw e una mediana di 0.29 ng/g dw. I dati appaiono distribuiti uniformemente con un valore massimo per il campione 40 di provenienza “industriale”, seguito dai campioni 6A e 10, che hanno dei valori molto vicini al massimo riscontrato. In particolare il campione 10 deriva dalla zona urbana di Venezia, dimostrando quindi la presenza di una fonte espositiva. Si è osservato, inoltre, che per molti campioni si hanno dei valori al di sotto del limite di quantificazione.

La differenza più alta tra i valori massimo e minimo è stata registrata nella determinazione del pesticida HCB: 0.10-340 ng/g dw. Il valore medio è 23 ng/g dw, mentre il valore della mediana si abbassa drasticamente fino a 0.52 ng/g dw. L'enorme differenza tra la media e la mediana è dovuta a tre campioni, a contaminazione molto elevata. Infatti, i reperti 5-A2 (340 ng/g dw), 6A (70 ng/g dw) e 40 (49 ng/g dw) mostrano una contaminazione enormemente più grande rispetto agli altri reperti analizzati. Tutti e tre i campioni provengono dalla zona industriale di Porto Marghera; infatti l'esaclorobenzene, usato principalmente come fungicida, è stato rilasciato abbondantemente (infatti la sua concentrazione nei sedimenti è in media più alta di tutti gli altri pesticidi organoclorurati tra quelli cercati in questo studio) nell'ambiente lagunare come sottoprodotto proprio dalle industrie di Porto Marghera [Secco et al., 2005].

In generale i POP nei sedimenti possono raggiungere delle concentrazioni rilevanti. Infatti, grazie all'enorme affinità per i composti lipofili, i sedimenti tendono ad accumulare i contaminanti soprattutto in corrispondenza di fonti espositive. Pertanto, i sedimenti assumono un ruolo importantissimo nello studio dei processi fisici, geochimici e biologici dell'ambiente [Secco et al., 2005]. Nei sedimenti marini in

particolare la grande quantità di materia organica sospesa facilita l'assorbimento dei composti organici lipofili dalla colonna d'acqua [Karickhoff et al., 1979; Grathwohl, 1990]. Fondali bassi e scarsa energia idrodinamica favoriscono la deposizione sul fondo di questi composti che si accumulano nei sedimenti [Secco et al., 2005]. Nella laguna di Venezia, l'alta percentuale di particelle colloidali (< 1 µm) e l'ampia superficie specifica dei minerali nella frazione argillosa, facilita l'assorbimento dei contaminanti organici [Menegazzo Pitturi et Molinaroli, 1984].

Da un confronto con la letteratura, emerge che i dati da noi ottenuti sono in linea con altri studi effettuati in laguna, come riportato nella Tab. 11a. In particolare l'ampio range di concentrazioni trovato in altri tre lavoro, appare giustificato dall'alta contaminazione di alcuni campioni prelevati nella zona industriale di Porto Marghera. Si sottolinea, inoltre, la difficoltà di trovare studi in laguna comparabili allo studio riportato in questa tesi.

Decisamente più semplice è stato raccogliere lavori riguardanti la contaminazione di sedimenti prelevati in diversi Paesi. La tab. 11b mostra come la contaminazione da pesticidi organoclorurati dei sedimenti lagunari sia paragonabile a quella registrata in altri Paesi. Fa eccezione l'HCB: in nessuno dei Paesi europei ed extra europei si sono registrati valori alti quanto quelli riscontrati nei sedimenti della zona industriale di Porto Marghera.

Tab 11a. Livelli di concentrazione di pesticidi organoclorurati in reperti di sedimenti prelevati nella laguna veneta.

Anno di campionamento	Concentrazione (ng/g dw)	Riferimento bibliografico
1996-1998	HCB = 0.3-13	Frignani M. <i>et al.</i> , 2005
1990-2000	HCB = 0.05-25	Apitz, 2007a
2001-2004	HCB = 0.2-260	Guerzoni et al., 2007

Tab. 11b. Livelli di concentrazione di pesticidi organoclorurati in reperti di sedimento prelevati in Paesi europei ed extra-europei.

Anno di campionamento	Paese	Concentrazione (ng/g dw)	Referimento bibliografico
1993-1999	USA	DDE = 0.81 DDT = 0.31	Grabe and Barron, 2004
1997	Francia	DDE = 0.78	Thompson S. <i>et al.</i> , 1999
1997	Russia	DDT = 0.10-31.3 DDE = 0.09-1.34 HCB = 0.28-1.76	Savinov V.M. <i>et al.</i> , 2003
2000	Messico	DDT = 0.001-0.043 DDE = 0.0013-0.3 HCB = 0.00087-0.0053	Carvalho F.P. <i>et al.</i> , 2009
2000-2001	USA (California)	DDT = 1.5-4 DDE = 6.2-31 HCB = 0.7-1.8	Sapozhnikova Y. <i>et al.</i> , 2004
2001-2002	Svezia-Finlandia	DDT = 0.012-0.62 DDE = 0.045-2.5 HCB = 0.0022-0.36	Pikkarainen A.L. <i>et al.</i> , 2007
2003	India	DDT = 0.12-1.29 DDE = 0.04-0.39 HCB = 0.06-0.98	Guzzella L. <i>et al.</i> , 2005
2004	Hong Kong	DDT = 0.02-14	Moganti S. <i>et al.</i> , 2008
2004-2005	India	DDT = 19 DDE = 0.99 HCB = 0.12	Malik A. <i>et al.</i> , 2009

Elaborazione statistica

- **« Criterio di selezione dei dati**

Al fine di una corretta e appropriata elaborazione, i dati ottenuti dalle 22 coppie di reperti per i tre pesticidi non sono stati valutati tutti statisticamente significativi, così come è stato visto per i PCB. Infatti, tutte le coppie di campioni in cui entrambi le matrici o una delle due presentavano dei valori non determinati (<LOQ) sono stati

eliminati, perché ritenuti poco rappresentativi dei livelli di concentrazione effettivamente presenti. Pertanto con questo approccio sono stati eliminati, tra gli altri, tutti i valori relativi alla contaminazione da DDT del biota e, di conseguenza, non verranno elaborati i valori trovati nei sedimenti. E' comunque importante sottolineare il fatto che, mentre non è possibile fare una valutazione diretta dell'esposizione delle vongole al DDT (perché valori in soglia), si può invece fare una valutazione del bioaccumulo dello stesso pesticida in maniera indiretta, attraverso lo studio del bioaccumulo del DDE, maggior metabolita del DDT.

Dopo una prima scrematura dei dati, è stata eseguita una ricerca dei possibili *outlier*, applicando il test di esclusione sulla somma dei livelli di contaminazione da DDE e HCB per le due matrici, utilizzando il software STATISTICA 6.0.

I risultati del test effettuato per il DDE sui campioni di vongole e sui sedimenti è riportato in Fig. 26a e b.

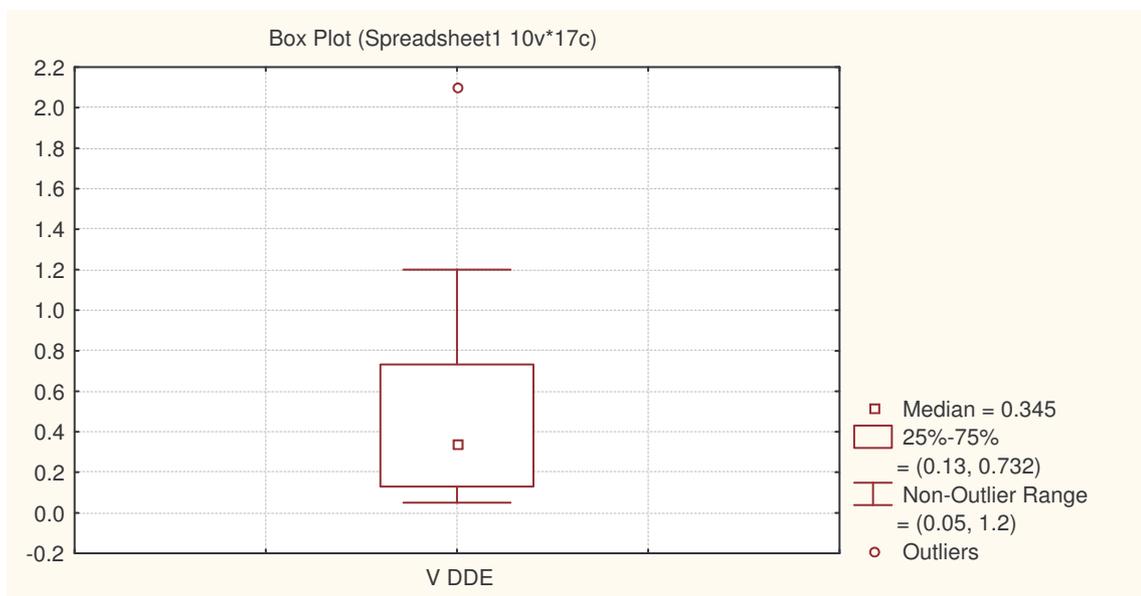


Fig. 26a. Risultato del test di ricerca degli *outlier* per i campioni di biota sui valori di DDE.

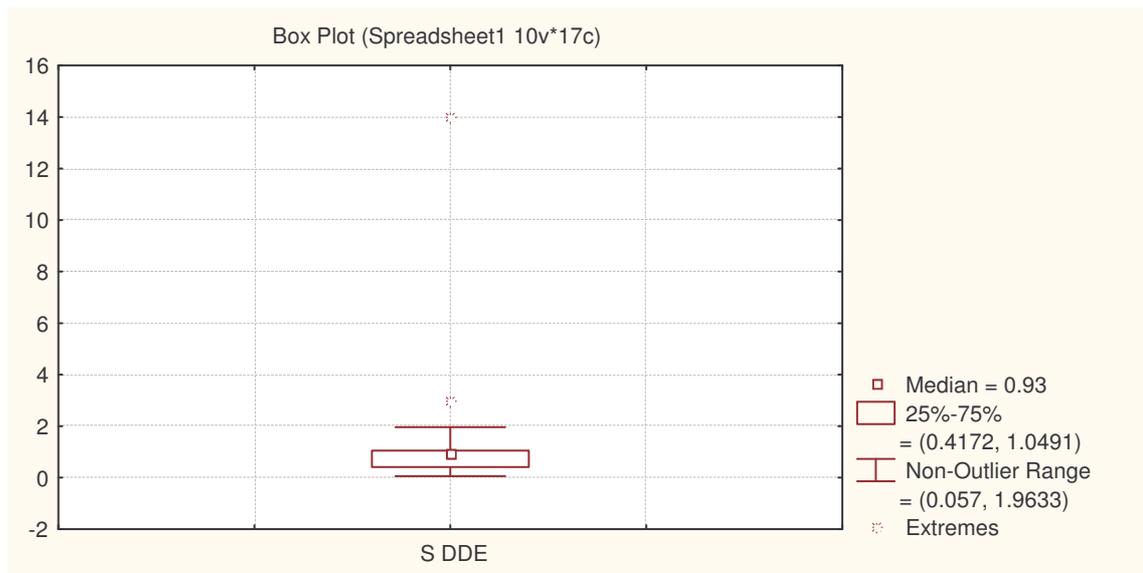


Fig. 26b. Risultato del test di ricerca degli *outlier* per i campioni di sedimento sui valori di DDE.

Solo un campione di biota è risultato *outlier*: infatti in seguito al test, proprio il reperto di tipo industriale avente il valore massimo di DDE (7484) è stato scartato dalla successiva analisi statistica.

Invece, i reperti di sedimenti scartati dopo il test degli *outlier* sono due, il 10 e il 5-A2.

I risultati del test effettuato per il pesticida HCB sui campioni di vongole e sui sedimenti è riportato in Fig. 27a e b.

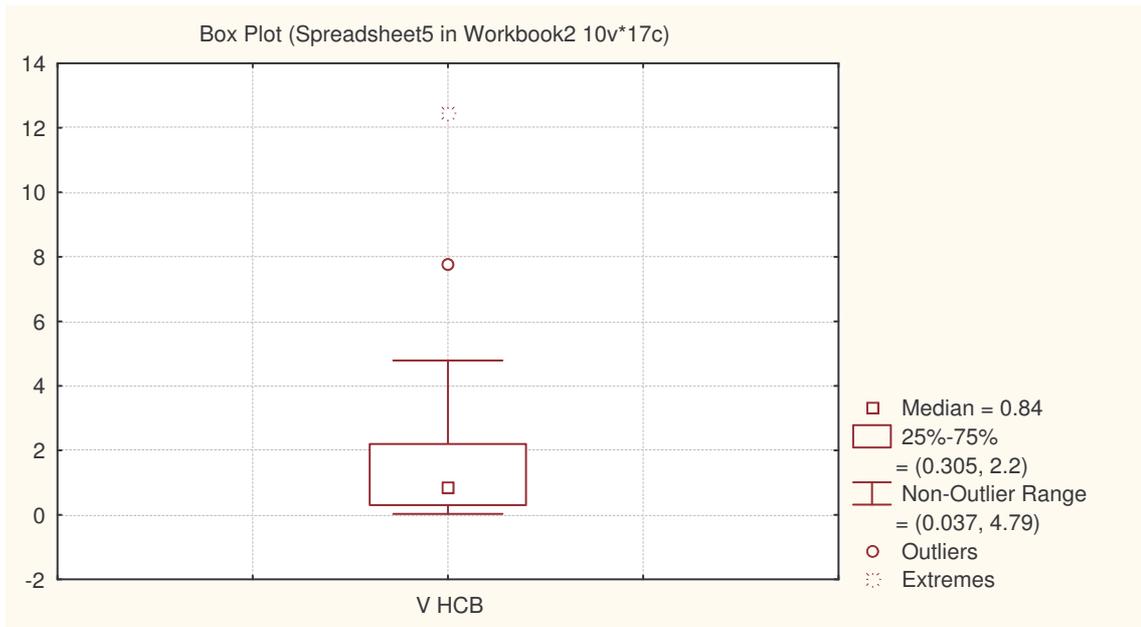


Fig. 27a. Risultato del test di ricerca degli *outlier* per i campioni di biota sui valori di HCB.

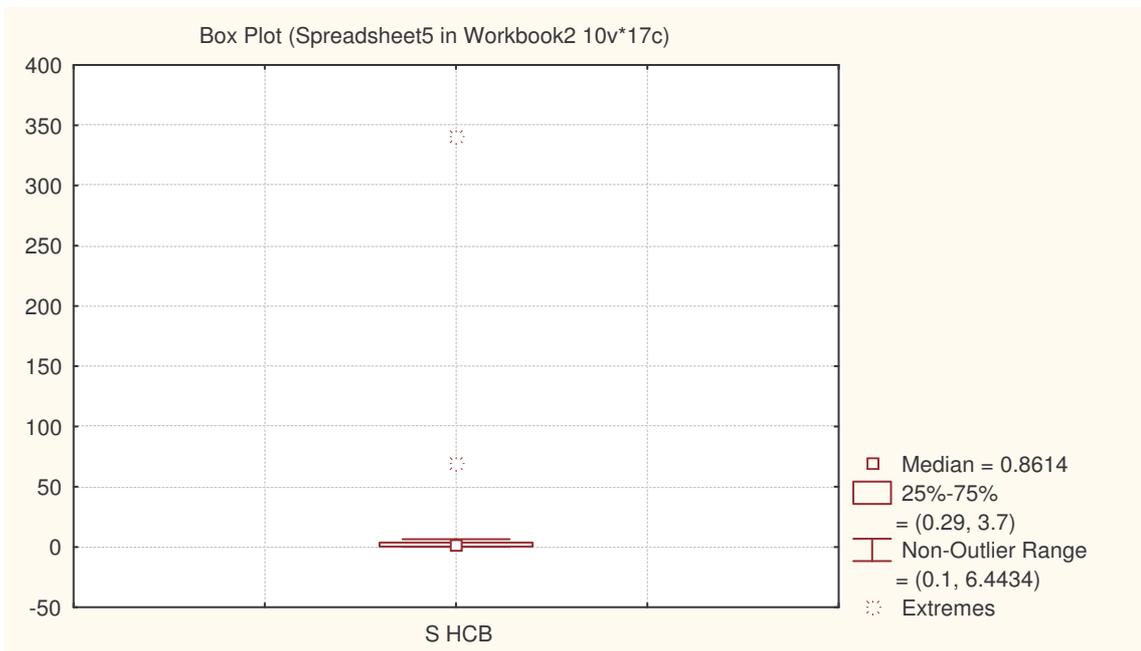


Fig. 27b. Risultato del test di ricerca degli *outlier* per i campioni di sedimento sui valori di HCB.

Il test effettuato sui campioni di vongole ha evidenziato la presenza di due valori da scartare, 5/2-C-2 e X1-B, mentre per i sedimenti sono risultati *outlier* i campioni 5-A2 e 6A.

Dopo l'eliminazione dei dati non determinati e degli *outlier*, le coppie di reperti rimaste per l'elaborazione statistica dei dati si sono ridotte a 14 per entrambi i pesticidi, come riportato nella Tab. 12 e nella Tab. 13.

Tab. 12

Reperti di biota	Reperti di sedimento	DDE	
		B	S
7-C-1	7-A2	0.73	0.057
7475/C	Chioggia 1-2	0.18	0.17
SLV-B-430	SLV-S-230B	0.050	0.99
SLV-a-B-480	SLV-a-S-380A	0.20	0.33
E1-B	E1-S	0.13	1.0
E2-B	E2-S	0.060	1.0
E5-B	E5-S	0.22	1.0
E6-B	E6-S	0.72	0.42
F2-B	F2-S	0.050	0.53
F3-B	F3-S	0.050	0.45
F4-B	F4-S	1.1	0.83
X1-B	X1-S	0.57	2.0
Chioggia 1-B	Chioggia 1-S	0.61	0.13
7473, 7474	90	0.35	0.93

Tab. 13

Reperti di biota	Reperti di sedimento	HCB	
		B	S
7-C-1	7-A2	4.8	0.28
4411	10	0.73	3.7
SLV-B-430	SLV-S-230B	0.084	2.1
SLV- α -B-480	SLV-a-S-380A	0.38	0.87
E1-B	E1-S	0.84	3.5
E2-B	E2-S	1.1	4.0
E3-B	E3-S	0.43	0.44
E4-B	E4-S	0.21	0.27
E5-B	E5-S	1.0	0.37
E6-B	E6-S	2.2	0.52
F2-B	F2-S	0.083	0.28
F3-B	F3-S	0.037	0.10
F4-B	F4-S	1.2	0.86
7473, 7474	90	0.31	0.29

L'elaborazione statistica dei dati è quindi proseguita sulle coppie rimaste.

▪ **Analisi di correlazione**

Utilizzando ancora il software STATISTICA 6.0, si è cercata una correlazione tra i due set di dati. Purtroppo, sia per il DDE che per l'HCB i dati sperimentali sembrano non correlare.

Quindi non è stata possibile poi fare un'analisi di regressione.

Analisi dei profili

Come si deduce dai livelli di contaminazione riscontrata in tutti i reperti, appare evidente come in generale siano più alti i valori nei sedimenti rispetto ai corrispondenti campioni di biota. Questo andamento è ben visibile nel grafico di Fig. 28, dove sono riportati i profili medi dei due analiti nelle due matrici. Tale andamento, come già detto in precedenza, trova riscontro in letteratura [Nasci et al., 2000].

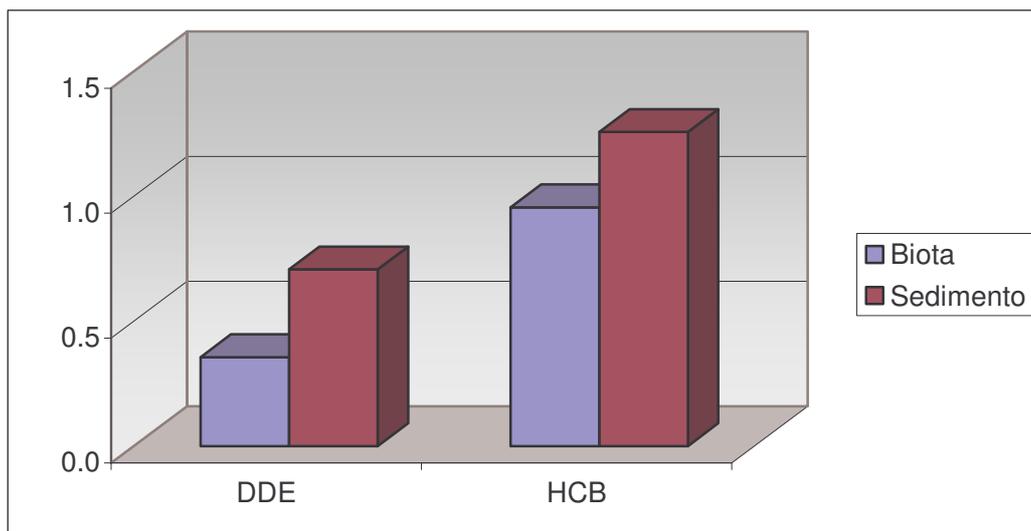


Fig. 28. Profili medi dei pesticidi organoclorurati DDE e HCB in campioni di biota e sedimento lagunari.

Stima del BAF

La stima del BAF dei tre pesticidi organoclorurati non è stata possibile, per la mancanza di correlazione tra le coppie di reperti analizzati. Però, considerando concentrazioni dei pesticidi rilevati nelle coppie riportate rispettivamente nelle Tab. 12 e 13, e dal grafico di Fig. 28, è evidente che un probabile valore di BAF sarebbe certamente superiore all'unità. Infatti, sono molti i casi dove la concentrazione nel sedimento è maggiore di quella trovata nel rispettivo campione di biota. Questo tipo di andamento è del tutto inaspettato alla luce di un processo di bioaccumulo, ma, come riportato anche in altri studi [Nasci et al., 2000] la causa di questo potrebbe essere dovuta sia alla mancanza di un adeguato tempo di esposizione necessario per raggiungere lo steady state indispensabile per il passaggio dei contaminanti dal sedimento al biota, che alla risospensione continua del sedimento e dei contaminati in esso contenuti [Frignani et al., 2001] .

VALUTAZIONE DELL'INTAKE

Alla luce dei risultati ottenuti, si possono fare delle considerazioni importanti: esiste un pericolo reale per il consumatore di molluschi veneziani? Si può azzardare una valutazione del rischio? Rispondere a queste domande implica una serie di conoscenze, come riportato di seguito.

Valutazione del rischio

L'alta resistenza alla degradazione chimica e biologica, la persistenza nell'ambiente e l'accumulo nella catena alimentare animale e umana e infine le caratteristiche tossicologiche, rendono gli analiti in studio particolarmente pericolosi per la salute pubblica. Oltre il 90% dell'esposizione dell'uomo ai PCB e pesticidi è dovuta agli alimenti [Mes et al., 1991; Svensson et al., 1991; Anderson et al., 1998; Safe, 1998; Schlummer et al., 1998 Tsutsumi et al., 2001], in particolar modo a quelli di origine animale [Furst et al., 1990]. Pertanto per garantire la tutela dei consumatori è importante e necessario ridurre l'esposizione dell'uomo derivante proprio dal consumo alimentare.

La Commissione Europea (Scientific Committee on Food (SCF)) ha raccomandato un impegno continuo al fine di limitare ai più bassi livelli possibili le emissioni nell'ambiente degli inquinanti organici persistenti. A tal proposito ha emesso diversi Regolamenti con cui ha fissato dei livelli massimi di concentrazione di alcuni inquinanti in vari alimenti d'origine zootecnica.

La World Health Organization (WHO) ha stabilito una dose tollerabile giornaliera (TDI) per i composti diossina-simili (1-4 pg TEQ/kg di massa corporea) [European Commission, 1999, 2000; WHO, 1998], mentre lo stesso non è stato ancora fatto per i PCB-NDL e pesticidi organoclorurati.

Tuttavia la FAO (Food and Agriculture Organization) sui residui di pesticidi (JMPR) ha calcolato una dose giornaliera per il DDT pari a 0.01 mg/kg di peso corporeo [The EFSA Journal (2006) 433]. Per l'HCB è disponibile un valore guida di tutela sanitaria pari a 170 ng/kg di peso corporeo al giorno [The EFSA Journal (2006) 402].

Anche se i PCB-NDL hanno una rilevanza tossicologica inferiore ai PCB-DL e al gruppo delle "diossine", risulta sempre più importante avere dei valori massimi accettabili, sia per una corretta valutazione di esposizione che per una valida gestione del rischio. Pertanto la EC ha richiesto al Laboratorio Comunitario di Riferimento (CRL) per diossine e PCB nei mangimi e alimenti di sviluppare un documento in collaborazione con i Laboratori Nazionali di Riferimento (NRLs) degli Stati membri che contenga criteri per l'analisi di PCB-NDL da utilizzare poi come base per una possibile futura legislazione [Malisch R. *et al.*, 2009].

I livelli massimi per i PCB rappresenterebbero uno strumento efficace per evitare un'esposizione inammissibilmente elevata della popolazione ed impedire la distribuzione di prodotti alimentari caratterizzati da un livello inammissibilmente elevato di contaminazione, ad esempio per via di un inquinamento o di un'esposizione accidentali. È inoltre indispensabile fissare livelli massimi per l'attuazione di un sistema di controllo regolamentare e per garantire un'applicazione uniforme.

Calcolo del LADD

Pertanto, per stabilire se un'esposizione alimentare prolungata costituisca elemento di eccessivo rischio per la salute pubblica è sufficiente stimare l'*intake* e confrontarla con la dose tollerabile pertinente definita dall'SCF.

Al momento, questo confronto può essere effettuato solo per i pesticidi, ma non per i PCB-NDL.

Tuttavia, i risultati elaborati in questo lavoro di tesi consentono di fare una stima del potenziale apporto di contaminanti dato dal consumo di vongole lagunari. Pertanto, con riferimento all'assunzione dell'alimento i -esimo, l'equazione che può essere utilizzata per il calcolo dell'esposizione alimentare prolungata a uno specifico contaminante della tipologia d'interesse è [US EPA, 1994]:

$$\blacksquare \text{ LADD}_i = (C_i \text{ CR}_i \Delta_E) \times (\text{bw} \Delta_L)^{-1},$$

dove:

- LADD_i è la *lifetime average daily dose*, ovvero la dose giornaliera media di contaminante associata all'assunzione di un determinato alimento, espressa in peso per unità di peso corporeo (bw, in media pari a 60 kg);
- C_i , concentrazione nel mezzo di esposizione (alimento) i -esimo;
- CR_i , quota di contatto (rappresentata dal consumo);
- Δ_E , durata dell'esposizione (es., 40–70 anni);
- Δ_L , lunghezza della vita (es., 70 anni).

Per semplicità l'equazione può essere ridotta a:

$$\blacksquare \text{ LADD}_i = C_i \text{ CR}_i \text{ bw}^{-1}$$

Infatti, si può stabilire di limitare Δ_E e Δ_L ad una determinata finestra temporale d'osservazione, per esempio 20 anni in età adulta, sufficiente a consentire il rilevamento sia di (improbabili) effetti acuti sia di effetti a lungo termine.

Se le abitudini alimentari e il peso corporeo si mantengono ragionevolmente costanti durante il periodo di rilevamento, la $LADD_i$ risulta dipendere linearmente dalla concentrazione C_i del contaminante nell'alimento i -esimo. La LADD alimentare complessiva è fornita dalla somma di tutti i contributi i -esimi, $\Sigma_i(LADD_i)$, determinati come sopra indicato.

Il consumo medio nazionale giornaliero di molluschi freschi e surgelati è approssimativamente stimato in 4.6 g/persona, (le stime dei consumi di prodotti alimentari in Italia sono reperibili presso varie fonti ufficiali (es., Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN), Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT)))

Considerando un valore medio della ΣPCB stimati di 5.10 ng/g fw risulta un $LADD_v = 23.5$ ng/kg-bw. Pertanto in media una persona di circa 60 kg assumerebbe 23.5 ng di PCB derivante da un consumo medio di vongole provenienti dalla laguna veneta, mangiate nei venti anni di vita considerata. Poichè la quantità di grasso nei molluschi bivalvi analizzati era pari all' 1%, si può affermare che il LADD calcolato su base grassa risulti pari a 2350 ng/kg-bw.

Lo stesso calcolo può essere applicato per il DDE e l'HCB, ottenendo rispettivamente 166 ng/kg-bw e 442 ng/kg-bw.

E' da notare, però, che i calcoli effettuati considerano, come già detto, un consumo medio nazionale. E' noto però, che le abitudini alimentari variano al variare della popolazione, della cultura e dello stato geografico. In Italia, ad esempio, si hanno situazioni diverse: nel nord del Paese si ha, in generale, un più basso consumo di pesce se comparato con quello della popolazione del sud o delle isole [Storelli and Marcotrigiano, 2001]. Nella zona della laguna veneta, invece, il consumo di pesce e, specialmente di molluschi, è particolarmente elevato. Infatti è stimato in 30 g per

persona al giorno [Boscolo et al., 2007], cioè circa quattro volte superiore al consumo nazionale. Pertanto i valori di LADD ricalcolati risultano:

LADD (PCB) = 15300 ng/kg-bw

LADD (DDE) = 1080 ng/kg-bw

LADD (HCB) = 2878 ng/kg-bw

Si nota come i valori ottenuti siano decisamente più alti di quelli che si hanno in media per la popolazione italiana.

Commenti

Dai valori di LADD per i PCB-NDL non si possono trarre delle conclusioni pertinenti, atte a stabilire una pericolosità per la salute pubblica derivante dal consumo di molluschi bivalvi provenienti dalla laguna veneta. Tuttavia, se confrontati con le dosi massime giornaliere ammissibili in alimenti di origine animale (100-3000 µg/kg per prodotti ittici) stabilite da alcuni Paesi della Comunità Europea, si nota che, mentre si hanno dei risultati al di sotto dei limiti massimi [The EFSA Journal (2005)] per un consumo medio nazionale, si riscontrano invece dei valori che superano i livelli massimi proprio per un elevato consumo di molluschi, come avviene in laguna. Questo è un aspetto molto importante, che sottolinea il fatto che non bastano limiti di legge atti a preservare l'alimento in sé, ma molto può dipendere dal consumo che si fa dell'alimento stesso. Infatti, pericoli per la salute umana possono derivare sia da un consumo elevato di un alimento contaminato a livelli di background, che da un consumo limitato di alimenti particolarmente contaminati [Matthews et al., 2009].

In particolare, in laguna è pertinente pensare che possano coesistere due situazioni di una certa importanza ai fini di una corretta valutazione espositiva: grossi

consumatori di prodotti ittici, in particolare vongole, e la reale possibilità di consumare molluschi bivalvi altamente contaminati, se pescati in zone proibite (pesca illegale). Pertanto, in laguna è necessario l'utilizzo di qualunque azione di controllo idonea a evitare la pesca dove non consentito, per evitare la possibilità di situazioni rischiose per la salute umana.

I valori di LADD calcolati per il DDT (e DDE) e HCB, sia nel caso di consumo nazionale che di quello lagunare, sono al di sotto dei valori guida riportati nel precedente paragrafo. Infatti, nonostante le elevate concentrazioni, soprattutto per l'HCB, riscontrate nei campioni di sedimento, nelle vongole non si registrano valori così alti da mettere in pericolo la salute del consumatore.

Pertanto, sulla base dei dati utilizzati per questo lavoro di tesi e sulla base delle considerazioni fatte, si può affermare che, al momento, il consumo di molluschi bivalvi provenienti dalla laguna non sembrerebbe presentare un pericolo per la salute del consumatore.

Anche altri studi hanno portato alla mancanza di pericolosità per la salute umana derivante dal consumo di biota della laguna [Binelli and Provini, 2003; Storelli et al., 2003; Boscolo et al., 2007]. In particolare, Boscolo et al. 2007 danno indicazione sul possibile apporto giornaliero di composti diossina-simili derivante dal consumo di *Tapes philippinarum* allevate in laguna.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata eseguita una valutazione dell'esposizione della laguna veneta da PCB e pesticidi organoclorurati attraverso lo studio di dati già disponibili sui livelli di concentrazione rilevati in reperti di vongole (*Tapes philippinarum*) e sedimenti.

Lo studio, condotto separatamente per le due famiglie di analiti, ha portato alle conclusioni riportate di seguito.

I reperti di sedimento e biota risultano avere, in generale, gli stessi profili di contaminazione per quanto riguarda l'analisi dei PCB. I congeneri predominanti sono gli esaclorosostituiti PCB 138 e PCB 153.

Tuttavia, sono state riscontrate delle eccezioni per alcuni campioni di sedimento, dove è stato notato un aumento dei livelli dei congeneri con un grado di clorurazione più basso (PCB 28 e PCB 52), a discapito dei PCB normalmente più abbondanti. Questo andamento è risultato molto atipico, se confrontato sia con i profili noti dalla letteratura, sia dai profili ottenuti dall'analisi di campioni di particolato sospeso e di acqua. In particolare, da questo secondo confronto è emerso che il pattern del particolato sospeso riflette del tutto l'andamento ottenuto per il biota e alcuni campioni di sedimento, come atteso. Infatti, la vongola vive a contatto con la matrice abiotica, ma si nutre di ciò che rimane adeso al particolato presente nella colonna d'acqua sovrastante. L'acqua, d'altra parte, ha dato valori più elevati per i congeneri più idrofili (PCB 28 e 52) e più bassi per i congeneri a più alto peso molecolare e quindi più lipofili.

D'altra parte la presenza nei sedimenti di congeneri a più basso grado di clorurazione potrebbe dipendere da un contributo derivante da sorgenti diverse rispetto a quello dovuto al fondo (sembrano risentire della vicinanza di una sorgente di

contaminazione). Comunque, le anomalie riscontrate hanno portato ripercussioni nelle analisi di correlazione prima e di regressione poi, eseguite per ogni congenere.

E' utile osservare che i dati utilizzati per l'elaborazione posseggono una certa quota di incertezza dovuta al fatto che vongole e sedimenti sono stati associati sulla base di aree di rischio compatibili dal punto di vista quali-quantitativo, ma spesso non risultano essere stati campionati esattamente nello stesso sito (soprattutto per una carente disponibilità delle vongole).

Dalle curve ottenute dall'analisi di regressione dei PCB 101, 138 e 180 sono stati stimati i valori di BAF che sembrano contraddire quanto riportato finora e quanto sostenuto dai valori di K_{ow} . Infatti, mentre dai profili e dai valori del coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, sembra chiara una maggiore capacità delle vongole di bioaccumulare i PCB 138 e 153, dalla stima dei BAF risulta invece che questa predisposizione sia orientata verso i congeneri in modo inversamente proporzionale al grado di clorosostituzione. Questa apparente contraddizione è stata spiegata considerando che i valori di BAF stimati (che per la verità non differiscono numericamente in modo sostanziale) sono il frutto di un andamento che tiene conto sia delle caratteristiche chimico fisiche delle molecole in studio, sia dei processi biologici in corso. D'altra parte come è noto poi dalla letteratura, non è facile la determinazione dei valori sperimentali di BAF. Uno studio mirato potrebbe prevedere infatti un maggior numero di coppie di reperti e condizioni ambientali standardizzate e controllabili.

L'analisi dei pesticidi ha evidenziato invece la possibilità di cercare una correlazione solo per due dei tre pesticidi: infatti tutti i reperti di biota hanno dato dei valori di DDT al di sotto del limite di quantificazione e pertanto tutti le coppie di reperti sono stati esclusi dall'analisi statistica. Dopo la scrematura dei dati dei DDE e HCB per le coppie rimaste è stata eseguita un'analisi di correlazione che ha dato risultati negativi.

Pertanto non è stato possibile fare un'analisi di regressione, mentre è stato fatto uno studio dei livelli medi per i due pesticidi, che ha evidenziato valori più alti nei sedimenti rispetto ai corrispondenti reperti di vongole.

Questo andamento è confermato dai valori di BAF stimati (tutti al di sotto dell'unità) per i PCB. Questo tipo di andamento è del tutto inaspettato alla luce di un processo di bioaccumulo, ma, come riportato anche in altri studi [Nasci et al., 2000] la causa di questo potrebbe essere dovuta sia alla mancanza di un adeguato tempo di esposizione necessario per raggiungere lo *steady state* indispensabile per il passaggio dei contaminanti dal sedimento al biota, che alla risospensione continua del sedimento e dei contaminati in esso contenuti [Frignani et al., 2001], dovuta a continue operazioni di dragaggio dei fondali lagunari, al passaggio di barche (è utile ricordare che la profondità media della laguna è 1 m), e alla incessante pesca di vongole.

Alla luce di queste considerazioni, pertanto, la *Tapes philippinarum* risulta essere un buon indicatore per la quantità totale di un processo di contaminazione, ma non per l'individuazione della sorgente espositiva.

Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti e del calcolo dell'*intake*, al consumo di molluschi provenienti dalla laguna, non sembra associato al momento nessun rischio per la salute pubblica se si considera un consumo medio nazionale.

Ringraziamenti

Il lavoro sperimentale di questa tesi è stato svolto presso il Reparto di Chimica Tossicologica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ed è stato reso possibile grazie alla partecipazione dei colleghi di reparto.

In particolare desidero ringraziare Fabiola Ferri, Valentina Marra e Silvia Valentini per il loro preziosissimo aiuto in fase di stesura finale della tesi.

Un ringraziamento particolare va inoltre ad Alessandro di Domenico e Elena De Felip per i loro insostituibili contributi scientifici, per il loro sostegno e la loro pazienza.

Infine, un pensiero particolare va alla mia amica Anna Maria Ingelido, che ha condiviso con me questa avventura.

BIBLIOGRAFIA

Alcock, R.E., Behnisch, P.A., Jones, K.C., Hagenmaier, H., 1998. Dioxin-like PCBs in the environment-human exposure and the significance of sources. *Chemosphere* 37, 1457-1472.

Ahlborg, U.G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C.C., Hanberg, A., Baron, J., Trichopoulos, D., Adami, H.O., 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, H.A., Falk, C., Hanrahan, L., Olson, J., Burse, V.W., Needham, L., Paschal, D., Patterson, H.R., Hill Jr., R.H., 1998. Profiles of Great Lakes critical pollutants: a sentinel analysis of human blood and urine. *Environ. Health Persp.* 106, 279 - 289.

Apitz, S.E., Barbanti, A., Bocci, M., Carlin, A., Montobbio, L., Bernstein, A.G., 2007. Sediments of the Venice Lagoon evaluated in a screening risk assessment approach to inform risk management strategies: Part I - Application of international sediment quality guidelines (SQGs). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

Apitz, S.E., Barbanti, A., Bocci, M., Carlin, A., Montobbio, L., Bernstein, A.G., 2007. Sediments of the Venice Lagoon (Italy) evaluated in a screening risk assessment approach: Part II - Lagoon sediment quality compared to hotspots, regional and international case studies. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

Barbera, J.L., Review., 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Sci. Total Environ.* 349, 1 - 44.

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 - 610.

Bellucci, L.G., frignani. M., Racanelli, S., Carraro, C., 2000. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in surficial sediments of the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 40, 65 – 76.

Beyer, A., Mackay , D., Matthies, M., Wania, F., and Webster, E., 2000. Assessing Long-Range Transport Potential of Persistent Organic Pollutants. *Environ. Sci. Technol* 34, 699 - 703.

Binelli, A., Provini, A., 2003. Pops in edible clams from different Italian and European markets and possible human health risk. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 879 - 886.

Boese, B.L., Lee II, H., and Echols, S., 1997. Evaluation of a first-order model for the prediction of the bioaccumulation of PCBs and DDT from sediment into the marine deposit-feeding clam *macoma nasuta*. *Environ. Toxic. and Chem.* Vol. 16 No. 7, 1545 - 1553.

- Borgå, K., Fisk, A.T., Hargrave, B., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., 2005. Bioaccumulation Factors for PCBs Revisited. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4523 - 4532.
- Boscolo, R., Cacciatore, F., Berto, D., Giani, M., 2007. Polychlorinated biphenyls in clams *Tapes philippinarum* cultured in the Venice Lagoon (Italy): contamination levels and dietary exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 45; 1065 - 1075.
- Bruggeman, W.A., Opperhuizen, A., Wijnbenga, A., Hutzinger, O., 1984. Bioaccumulation of Super-Lipophilic Chemicals in Fish . *Toxic. and Environ. Chem.* Vol. 7, 173 - 189.
- Carvalho, F.P., Villeneuve, J.P., Cattini, C., Rendón, J., Mota de Oliveira, J., 2009. *Chemosphere* 74 (7), 988 - 995.
- Casarett & Doull's. *Tossicologia: i fondamenti dell'azione delle sostanze tossiche*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali (Roma, 2000).
- Chen, P.H., Luo, M.L., Wong, D.K., Chen, C.J., 1982. Comparative rates of elimination of some individual PCBs from the blood of PCB poisoned patients in Taiwan. *Food Chem. Toxicol.* 20, 417 - 425.
- Coakley, J.P., Nagy, E., Serodes, J.B., 1993. Spatial and vertical trends in sediment-phase contaminants in the upper estuary of the St. Lawrence River. *Estuaries* 16, 653-669.
- Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC), 2000. Discussion paper on dioxins and PCBs. CX/FAC 99/23-Add.1, February 1998 (revised 2000).
- Colombo, J.C., Brochu, C., Bilos, C., Landoni, P., and Moore, S., 1997. Long-Term accumulation of individual PCBs, dioxins, furans, and trace metals in Asiatic clams from the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3551 - 3557.
- Connolly, J.P., 1992. The relationship between PCBs in biota and in water and sediment from New Bedford harbour: a modelling evaluation. In: Walker, C.H., Livingstone, D.R. (Eds), *Persistent pollutants in marine ecosystem*. Pergamon Press, Oxford, 63 - 80.
- Cooper, K., 1991. Effects of pesticides in wildlife. In: Hayes, W.J., Lawes, E.R. (Eds), *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego.
- Da Ros, L., Marin, M.G., Nesto, N., Ford, S., 1998. Preliminary results of a field study on some stress-related parameters in *Tapes philippinarum* naturally infected by the protozoan *Perkinsus* sp. *Mar. Environ. Res.* 46, 249 - 252.
- Debiec, C., Ylitalo, G., Weise, M., Gulland, F., Costa, D., Le Boeuf, B., De Tillesse, T., Larondelle, Y., 2005. PCBs and DDT in the serum of juvenile California sea lions: Associations with vitamins A and E and thyroid hormones. *Environ. Pollut.* 134, 323 - 332.

De Felip E., di Domenico A., Falleni M., Ferri F., Iacovella N., Menale G., Tafani P., Tommasino G., & Turrio Baldassarri L., 1994. Polychlorodibenzodioxin and polychlorodibenzofuran levels in dielectric fluids containing polychlorobiphenyls. *Toxic. Environ. Chem.* 46, 239 - 260.

De Felip E. & Miniero R., 1999. *Procedimenti Analitici Adottati per il Rilevamento di Microcontaminanti in Sedimenti Lagunari*. ISTISAN99/28. Istituto Superiore di Sanità (Roma).

di Domenico, A., De Felip, E., Ferri, F., Iacovella, N., Miniero, R., Scotto di Tella, E., Tafani, P., & Turrio Baldassarri, L., 1992. Determination of the composition of complex chemical mixtures in the soil of an industrial site. *Microchem. J.* 46, 48 - 81.

di Domenico A., Lupi C., De Felip E., Ferri F., Iacovella N., Miniero R., Scotto di Tella E., Tafani P., Turrio Baldassarri L., & Volpi F., 1995b. Clusters of kin analytes: Detection thresholds of individual components and representativeness of cumulative results. *Organohalogen Comp.* 23, 165 - 170.

di Domenico, A., Turrio Baldassarri, L., & Ziemacki, G., 1996. *La qualità e la quantità dell'impatto antropico nella laguna Veneta, Volumi I e II. Relazione di perizia tecnica, procedimento No. 7105/95/N RGNR. Procura della Repubblica presso la Pretura Circondariale di Venezia, Venezia.*

Di Muccio, A., Stefanelli, P., Funari, E., Attard Barbini, D., Generali, T., Pelosi, P., Girolimetti, S., Amendola, G., Vanni, F., & Di Muccio S., 2002. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in 12 edible marine organisms from the Adriatic sea, Italy, Spring 1997. *Food Additives and Contaminants* 19, 1148 - 1161.

Edgar, P.J., Hursthouse, A.S., Matthews, J.E., Davies, I.M., 2002. An investigation of geochemical factors controlling the distribution of PCBs in intertidal sediments at a contamination hot spot, the Clyde Estuary, UK. *Appl. Geochem.* 18, 327-338.

Edmunds, J.S.G., McCarthy, R.A., and Ramsdell, J.S., 2000. Permanent and Functional Male-to-Female Sex Reversal in d-rR Strain Medaka (*Oryzias latipes*) Following Egg Microinjection of o,- DDT.). *Environ. Health Persp.* 108, 219 - 224.

EPA, 1994. Health Assessment Document for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and Related Compounds. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA-600-BP-92-001 a-c.

EPA Method 1668, 1999. Revision A: "Chlorinated Biphenyl congeners in water, soil, sediment, tissue by HRGC/HRMS".

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.

Erickson MD, 1992. Physical, chemical, commercial, environmental and biological properties. *Analytical Chemistry of PCBs*. Lewis publisher, Inc., Michigan, 1 - 62.

- European Commission, 1999. DG Environment. Compilation of EU dioxin exposure and health data – Task 4 Annex 2 Human Exposure. October, 1999.
- European Commission, 2000. Health and consumer protection scientific committee on food opinion of SCF on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in foods. November, 2000.
- Eveleigh, L.J., Ducauze, C.J., 1997. Optimization of the dwell-time for the quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 765, 241 - 245.
- Falck Jr, F., Ricci, Jr, A., Wolff, M.S., Godbold, J., Deckers, P., 1992. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch. Environ. Health* 47, 143-146.
- Frignani, M., Bellucci, L.G., Carraro, C., Raccanelli, S., 2001. Polychlorinated biphenyls in sediments of the Venice Lagoon. *Chemosphere* 43 ,567 - 575.
- Frignani, M., Bellocci, L.G., Fagotto, M., Albertazza, S., 2005. Pollution historical trends as recorded by sediments at selected sites of the Venice Lagoon. *Environ. Intern.* 31, 1011 - 1022.
- Fung, C.N., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., Connell, D.W., Monirith, I., Tanabe, S., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2004. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis*. *Environ. Poll.* 127, 203 - 216.
- 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.
- German, A.V., and Zakonov, V.V., 2003. Accumulation of polychlorinated biphenyls in the Sheksninskii pool of the Rybinsk reservoir. *Water resources*, 30; (5), 524 - 528.
- Gocmen, A., Peters, H.A., Cripps, D.J., Bryan, G.T., Morris, C.R., 1989. Hexachlorobenzene episode in Turkey. *Biomed Environ Sci* 2(1), 36 - 43.
- Grabe, S.A., Barron, J., 2004. Sediment contamination, by habitat, in the Tampa bay estuarine system (1993-1999): PAHs, pesticides and PCBs. *Environ. Monitor. Assess.* 91, 105 - 114.
- Grathwohl, P., 1990. Influence of organic matter from soil and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons: implications on *K_{oc}* correlations. *Environm. Sci. Techn.* 24, 1687-1693.
- Gray, K.A., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Zhou, H., Darden, R., Needham, L., Longnecker, M.P., 2005. In Utero Exposure to Background Levels of Polychlorinated Biphenyls and Cognitive Functioning among School-age Children. *Amer. J. Epidem.* Jul. 162(1), 17 - 26.
- Guerzoni, S., Rossigni, P., Sarretta, A., Raccanelli, S., Ferrari, G., Molinaroli, E., 2007. POPs in the Lagoon of Venice: budgets and pathways. *Chemosphere* 67, 1776 - 1785.

Guzzella L., 1997. PCBs and organochlorine pesticides in lake Orta (Northern Italy) sediments. *Water, Air and Soil Pollution*. 99, 245 - 254.

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

Harrison, H., Peak, J.D., de Germ, M.G., Gleade, A., Startin, J., Thorpe, S., Wright, C., Kelly, M., 1998. Time trends in human dietary exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs in the UK. *Chemosphere* 37, 1657 - 1670.

Hawker, D.W., and Connell, D.W., 1988. Octanol-water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environ. Sci. Technol.* 22, 382 - 387.

Hebert, C.E., Keenleyside, K.A. 1995. To normalize or not to normalize? Fat is the question. *Environ. Toxic. Chem.* 14 (5), 801 - 807

Herrera, A., Ariño, A.A., Conchello, M.P., Lázaro, R., Bayarri, S., Pérez, C., 1994. Organochlorine pesticide residues in Spanish meat products and meat of different species. *J. Food Prot.* 57 (5), 441-444.

Hoekstra, P.F., Todd, M., O'Hara, Teixeira, Backus, S., Fisk, A.T., and Muir, D.C.G., 2002. Spatial trends and bioaccumulation of organochlorine pollutants in marine zooplankton from the Alaskan and Canadian Arctic. *Environ.Toxic. Chem.* Vol. 21 No. 3, 575 - 583.

IARC (International Agency for Research on Cancer), 1987. Polychlorinated biphenyls. [1336-36-3]. Vol. 18, Suppl. 7.

IARC (International Agency for Research on Cancer), 1991. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 53: 440 Lyon, France.

IARC, 1997. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans, vol. 69. International Agency for Reseach on Cancer, Lyon.

IARC, 2001. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Some Thyrotropic Agents, Summary of Data Reported and Evaluation, Volume 79.

IPCS, 1989. International Programme on Chemical Safety Glossary of Terms for Use in IPCS Publications, WHO, Geneva.

IPCS, 1993. Environmental health criteria 140. Polychlorinated biphenyls and terphenyls, WHO, Geneva.

ISTITUTO VENETO. <http://www.istitutoveneto.it> (ultima visita 2/01/2010).

JOINT WHO/CONVENTION, 2003. "Task force on the health aspects of air pollution health risks of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution" WHO.

Kannan K., Tanabe, S., Ramesh, A., Subramanian, A., Tatsukawa, R., 1992. Persistent organochlorine residues in foodstuffs from India and their implication on human dietary exposure. *J. Agric. Food Chem.* 40, 518 - 524.

Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Resource* 13, 241-248.

Lake, J.L., Rubinstein, N.I., Lee II, H., Lake, C.A., Heltshe, J., Pavignano, S., 1990. Equilibrium Partitioning and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Infaunal Organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 9, 1095 - 1106.

Livingstone, D.R., 1992. Persistent pollutants in marine invertebrates. In: Walker, C.H., Livingstone, D.R. (Eds), *Persistent pollutants in marine ecosystem*. Pergamon Press, Oxford, 3 - 34.

Losso, C., Volpi Ghirardini, A., 2009. Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). *Chemosphere*, *in press*.

MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of UK, 1999. Dioxins and PCBs in UK and imported marine fish. Number 184, August 1999.

Malik, A., Ojha, P., Singh, K.P., 2009. Levels and distribution of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments of Gomti River (India) — a tributary of the Ganges River. *Environ. Monit. Assess.* 148, 421 - 435.

Matthews, V., Paepke, O., Burns, D., Gaus, C., 2009. PCDD/F and dioxin-like PCB exposure in a coastal community via consumption of local seafood. *Organohalogen Compounds*, 71; 1407-1412.

MAV (MAGISTRATO ALLE ACQUE DI VENEZIA)-CNV, 1999. Mappatura dell'inquinamento dei fondali lagunari. Studio ed indagini, relazione finale, luglio 1999.

MAV (MAGISTRATO ALLE ACQUE DI VENEZIA)-CNV, 2003. STUDIO ARTISTA (Analisi delle reti Trofiche, Inquinamento dei sedimenti e Tossicità Ambientale) che a sua volta si inserisce nelle Attività di monitoraggio ambientale della laguna di Venezia (progetto esecutivo del primo stralcio—2000/2003).

MAV (MAGISTRATO ALLE ACQUE DI VENEZIA)-CNV, 2006. PROGETTO ICSEL. Rapporto finale sull'attività svolta nel triennio 2003-2006. Rel T068.

McLeod, P.B., Van Den Heuvel-Greve, M.J., Luoma, S.N., and Luthy R.G., 2007. Biological uptake of Polychlorinated biphenyls by *macoma balthica* from sediment amended with activated carbon. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 26 No. 5, 980 - 987.

Menegazzo Vitturi, L., Molinaroli, E., Il ruolo delle caratteristiche mineralogiche e fisiche dei sedimenti nei processi d'inquinamento in un'area tipo della Laguna Veneta. *Rapporti e studi* 9, 353-367.

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 Addit. Contam.* 8 , 351 - 361.

Micheletti, C., Critto, A., Carlon, C., and Marcomini, A., 2004. Ecological risk assessment of persistent toxic substances for the clam *Tapes Philippinarum* in the lagoon of Venice, Italy. *Environ. Toxic. Chem.* Vol. 23 No. 6, 1575 - 1582.

Milne, D., 1992. Small study implicates PCBs in breast cancer (news). *J. Nat. Cancer. Inst.* 84, 834 - 835.

Miniero, R., Dellatte, E., Lupi, C., di Domenico, A., 2005. Problematiche sperimentali inerenti la conduzione di saggi biotossicologici sui sedimenti. *Ann Ist Super Sanità* 41 (3), 381 - 387.

Miniero, R., Brambilla, G., Dellatte, E., De Luca, S., Ferri, F., Fulgenzi, A.R., Iacovella, N., In gelido, A.M., di Domenico, A., 2005. Organohalogen Compounds Vo. 67, 2452 - 2454.

Miniero, R., Brambilla, G., Dellatte, E., De Luca, S., Ferri, F., Fulgenzi, A.R., Iacovella, N., In gelido, A.M., di Domenico, A., 2005. Correlazione between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran levels in sediments and clams (*Tapes* sp.) from the Venice lagoon. *Organohalogen Compounds* Vol. 67, 2452 - 2454.

Miniero, R., Brambilla, G., Dellatte, E., Ferri, F., Fochi, I., Fulgenzi, A.R., Iacovella, N., Iamiceli, A.L., In gelido, A.M., and di Domenico, A., 2007. PCDD and PCDF contamination patterns in clam and sediment samples collected from congruent sampling sites in the Venice lagoon. I. Sediments. *Organohalogen Compounds* Vol. 69, 1352 - 1355.

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.

Moganti, S., Richardson, B.J., McClellan, K., Martin, M., Lam, P.K.S., Zheng, G.J., 2008. Use of the clam *Asaphis deflorata* as a potential indicator of organochlorine bioaccumulation in Hong Kong coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin.* 57, 672 - 680.

Moret, I., Piazza, R., Benedetti, M., Gambaro, A., Barbante, C., Cescon, P., 2001. Determination of polychlorobiphenyls in Venice Lagoon sediments. *Chemosphere* 43, 559 - 565.

Nasci, C., Da Ros, L., Nesto, N., Sperti, L., Passarini, F., Pavoni, B., 2000. Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice Lagoon, Italy. *Mar. Environ. Res.* 50, 425 - 430.

- Neff, J.M., 1984. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fres. Z. Anal. Chem.* 319, 132 - 136.
- Niimi, A.J., 1996. Evaluation of PCBs and PCDD/F retention by aquatic organisms. *The Science of the Total Environment* 192, 123 - 150.
- Oliver, B.G., Niimi, A.J., 1988. Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 22, 388 - 397.
- Okay, O.K., Karacik, B., Başak, S., Henkelmann, B., Bernhöft, S., Schramm, K.-W., 2009. PCB and PCDD/F in sediment and mussels of the Istanbul strait (Turkey). *Chemosphere.* 76, 159 - 166.
- Pavan, I., Baroffio, C., Passini, V., Bilei, T., Pira, E., Minoia, C., 2003. Policlorobifenili: valori di riferimento. *G. Ital Med Lav Erg* 25:1, 61 - 67.
- Porpora, M.G., Ingelido, A.M., di Domenico, A., Ferro, A., Crobu, M., Pallante, D., Cardelli, M., Cosmi, E.V., De Felip, E., 2006. Increased levels of polychlorobiphenyls in Italian women with endometriosis. *Chemosphere* 63 (2006) 1361–1367.
- Porpora, M.G., Medda, E., Abballe, A., Bolli, S., De Angelis, I., di Domenico, A., Ferro, A., Ingelido, A.M., Maggi, A., Benedetti Panici, P., De Felip, E., 2009. Endometriosis and Organochlorinated Environmental Pollutants: A Case–Control Study on Italian Women of Reproductive Age. *Environ. Health Persp.* 117 (7), 1070-1075.
- Porte, C., Albaiges, J., 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 273 - 281.
- Pruell, R.J., Lake, J.L., Davis, W.R., Quinn, J.G., 1986. Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to environmentally contaminated sediment. *Mar. Biol.* 91, 497 - 507.
- Rand G.M. Wells P.G., McCarty L.S., 1995. Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand G.M. (Ed.), *Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Taylor and Francis, Washington, DC, Chapter 1.
- Rappe C., Andersson, R., Bergqvist, P.A., Brohede, Ch., Hansson, M., Kjeller, L.O., Lindstrom, G., Markhund S., Nygren, M., Swanson, S.E., Tysklind, M., Wiberg, K. 1987. Overview on environmental fate of chlorinated dioxins and dibenzofurans. Sources, levels and isomeric pattern in various matrices. *Chemosphere* 16, 1603 -1618.
- Rodriguez-Ariza, A., Rodriguez-Ortega, M.J., Marenco, J.L., Amexcua, O., Alhama, J., Lopez-Barea, J., 2003. Uptake and clearance of PCB congeners in *Chamaelea gallina*: response of oxidative stress biomarkers. *Comp. Biochem. Phys. C.* 134, 57 - 67.

Rossi, R., Paesanti, F., 1992. Successful clam farming in Italy. In: Proceedings of the Twenty-third Annual Shellfish Conference, Shellfish Association of Great Britain, 62 - 68.

Safe, S., 1989. Polychlorinated biphenyls (PCBs): mutagenicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 220, 31 - 47.

Safe, S.H., 1998. Development validation and problems with the toxic equivalency factor. Approach of risk assessment of dioxins and related compounds. *J. Anim. Sci.* 76, 134 - 141.

Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Schlenk, D., 2004. Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere.* 55 (6), 797 - 809.

Scarponi, G., Buretta, C., Capodoglio, G., Toscano, G., Barbante, C., Moret, I., and Cescon, P. 1998. Chemometric studies in the Lagoon of Venice, Italy. 1. The Environmental quality of water and sediments matrices. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 38, 552 - 562.

Schlummer, M, Moser, G.A., McLachlan, M., 1998. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs, and HCB in humans: mass balance and mechanistic considerations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 128 - 137.

Skoog, D.A., West, D., Holler, F.J. . 1996. *Chimica Analitica una introduzione* III ed. EdiSES.

Storelli, M. M., and Marcotrigiano, G.O., 2001. Consumption of bivalve mollusco in Italy: estimated intake of cadmium and lead. *Food Addit. Contam.* 18, 303 - 307.

Storelli, M.M., Giacomelli-Stuffler, R., Storelli, A., Marcotrigiano, G.O., 2003. Polychlorinated biphenyls in seafood: contamination levels and human dietary exposure. *Food Chemistry* 82, 491 -496.

Svensson, B.G., Nilsson, A., Hanson, M., Rappe, C., Akesson, B., 1991. Exposure to dioxins and dibenzofurans through the consumption of fish. *New Engl. J. Med.* 324, 8 - 12.

The EFSA Journal (2005) 284. www.efsa.europa.eu (ultima visita il 30/11/2009)

The EFSA Journal (2006) 402 www.efsa.europa.eu (ultima visita il 30/11/2009)

The EFSA Journal (2006) 433 www.efsa.europa.eu (ultima visita il 30/11/2009)

Thompson, S., Budzinski, H., Garrigues, P., and Narbonne, J.F., 1999. Comparison of PCB and DDT distribution between water-column and sediment-dwelling bivalves in Arcachon Bay, France . *Marine Pollution Bulletin* Vol. 38 No. 8, 655 - 662.

Tsutsumi, T., Yanagi, T., Nakamura, M., Konon, Y., Uchibe, H., Iida, T., Huri, T., Nakagawa, R., Tubiishi, K., Matsuda, R., Sasaki, K., Toyoda, M., 2001. Update of daily

intake of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere* 45, 1129 - 1137.

Turrio Baldassarri L., Bayarri S., di Domenico A., Iacovella N., & La Rocca, 1999. Supercritical fluid extraction of bivalve samples for simultaneous GC-MS determination of polychlorobiphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 75, 217 - 227.

Turusov V., Rakitsky V. & Tomatis L., 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence and Risks. *Env. Health. Persp.* 110: 2.

US EPA, 1994. The 1994 EPA dioxin reassessment — Health assessment — Volume III: Risk characterization. EPA/600/BP-92/001c Draft. Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency (Washington).

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

Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R.E., 2006. The 2005 World Health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalent factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 93 (2), 223 - 241.

Van Metre, P., Callender, E., and Fuller, C., 1997. Historical trends in organochlorine compounds in river basins identified using sediment cores from reservoirs. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2339 - 2344.

Van Noort P.C.M., 2009. Estimation of amorphous organic carbon/water partition coefficients, subcooled liquid aqueous solubilities, and n-octanol/water partition coefficients of nonpolar chlorinated aromatic compounds from chlorine fragment constants. *Chemosphere* 74, 1024 -1030.

Yasunobu Aoki., 2001. Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters—What We Have Learned from Yusho Disease. *Environmental Research Section A* 86, 2 - 11.

Wentz D.A., Waite I.R. and Rinella F.A., 1998. Comparison of streambed sediment and aquatic biota as media for characterizing trace elements and organochlorine compounds in the Willamette basin, Oregon. *Environmental Monitoring and Assessment* 51, 673 - 693.

WHO-IPCS (World Health Organization – International Programme on Chemical Safety), 1979.

DDT and its derivatives, Environmental Health Criteria 9. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc009.htm> (ultima visita il 30/11/2009)

WHO, 1993. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition).

WHO, 1998. Assessment of the health risk of dioxins: reevaluation of the tolerable daily intake (TDI) WHO Consultation May 25-29 1998, Geneva, Switzerland. WHO European Center for Environment and Health International Programme on Chemical Safety.

WHO, 2003 - Health risks of Persistent Organic Pollutants from Long-Range Transboundary Air Pollution. Copenhagen (Denmark), Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution 2003. <http://www.euro.who.int>. (ultima visita il 26/11/2009)

Wolff, M.S., Toniolo, P.G., Lee, E.W., Rivera, M., Dubin, N., 1993. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. J. Nat. Cancer. Inst. 85, 648 - 652.

Allegato 1.

Si riportano i dettagli dell'analisi strumentale e i controlli di qualità (interno ed esterno) del dato analitico.

Analisi cromatografica

➤ Scelta della colonna

È stata utilizzata una colonna capillare HT-5 (5% phenyl (equiv) polysiloxane-carborane; lunghezza di 25 m, con diametro interno 0.22 mm; lo spessore del film interno è di 0.1 µm) o equivalente.

➤ Scelta delle condizioni operative della colonna e dell'iniettore

Le condizioni operative della colonna e dell'iniettore (temperatura e velocità di riscaldamento) sono state selezionate in base alla necessità di ottenere una buona risoluzione dei picchi cromatografici e di consentire contemporaneamente il minor tempo di analisi possibile.

Le condizioni di lavoro dell'autocampionatore, dell'iniettore (PTV) e del GC (programmate di temperatura e di flusso) sono quelle riportate in Tab.3 e Tab.4).

➤ Scelta della fase mobile

Come gas di trasporto è stato utilizzato l'elio, un gas a basso peso molecolare e di conseguenza con una bassa resistenza al flusso.

➤ Scelta del rivelatore

Per il riconoscimento degli analiti è stato utilizzato come rivelatore uno spettrometro di massa, perché nel caso di miscele complesse, per la possibile presenza

di composti coeluenti, il solo tempo di ritenzione, non è sufficiente per l'identificazione univoca della sostanza. Infatti la spettrometria di massa fornisce ottime garanzie sull'identificazione della sostanza, perché, oltre al tempo di ritenzione, produce lo spettro di massa. Questo, costituito dall'insieme di frammenti che si ottengono bombardando la molecola con un fascio di elettroni, costituisce l'impronta digitale di ogni sostanza ed è proprio in base a questo che avviene il riconoscimento.

Nel sistema gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC/MS), 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 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 decomporre 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 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 sono

accelerate e convogliate verso l'analizzatore che consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica.

➤ *Analizzatore*

L'analizzatore di massa utilizzato per questo lavoro è un quadrupolo. È schematicamente costituito da quattro barre di metallo (Fig. 25). Alle barre opposte del quadrupolo è applicata una differenza di potenziale, generata da una corrente continua ed alternata. Gli ioni, a causa di tale differenza, subiranno nel loro transito delle oscillazioni, che potranno essere stabili, permettendo così allo ione uscire dal quadrupolo, o instabili e porteranno alla collisione dello ione con le barre del quadrupolo. A determinati valori della tensione applicata, solo ioni aventi un certo rapporto m/z usciranno dal quadrupolo stesso. Variando nel tempo la tensione applicata, tutti gli ioni saranno messi in condizione di uscire (a tempi diversi) dal quadrupolo. La risoluzione questi analizzatori generalmente è nell'ordine di 5-10.000).

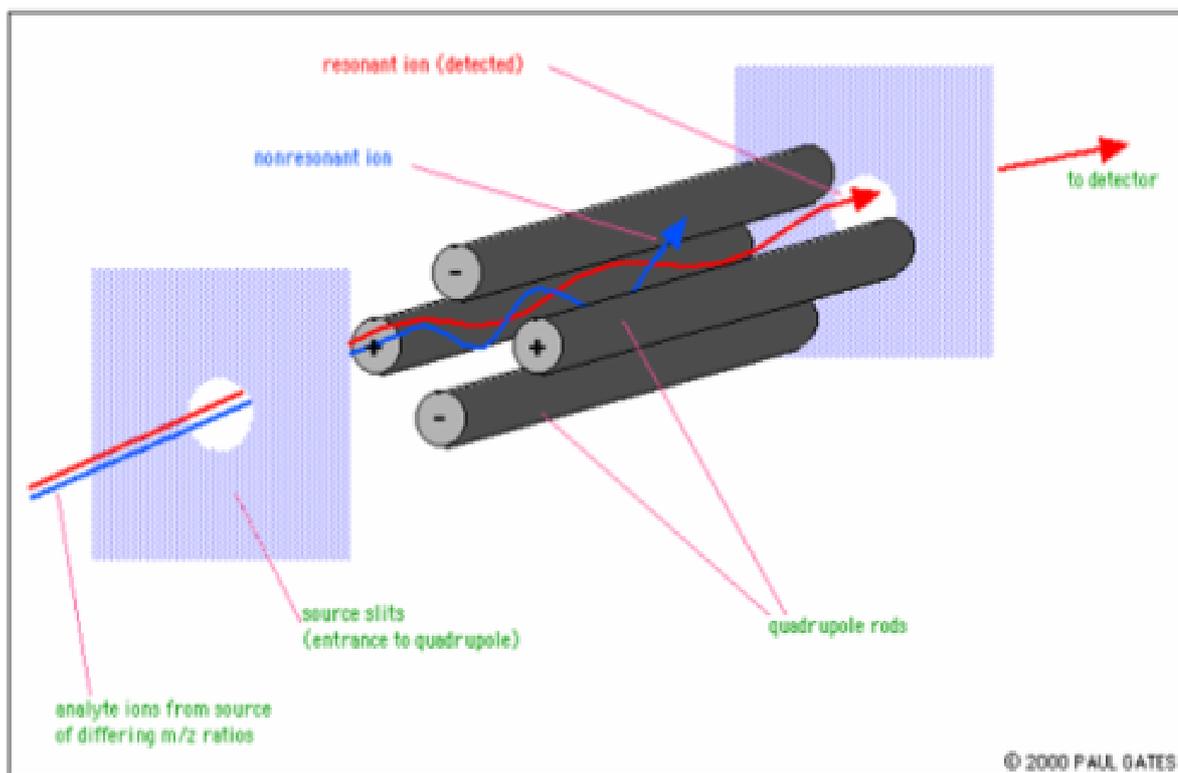


Fig. 25. Principio funzionamento dell'analizzatore quadrupolo

➤ *Metodi di acquisizione*

Esistono varie tecniche di analisi (acquisizione dati) in spettrometria di massa: il più comune di questi è il full scan che registra lo spettro completo di una sostanza. In full scan, si ottiene uno spettro di massa caratterizzato da tutti gli ioni formati entro un periodo di tempo e una finestra di massa ben definiti. La sensibilità richiesta per registrare lo spettro dipende da un fattore molto importante quale il dwell time [Eveleigh J. *et al.*, 1997] che è il tempo in cui il rivelatore rimane fermo su uno ione, acquisendo più scansioni per la costruzione dello spettro, ma maggiore è il numero di ioni e minore sarà il dwell time per ciascuno ione, e di conseguenza le scansioni [Skoog *et al.*, 1996]. In conseguenza di ciò per aumentare la sensibilità dell'analisi è possibile acquisire selezionare alcune masse specifiche (SIM) e trattenere gli ioni caratterizzati

dalle masse selezionate all'interno della trappola, eliminando tutti gli altri. In questo modo si ottiene uno spettro più pulito e una maggiore sensibilità dovuta all'ottimizzazione del rapporto segnale–rumore e al fatto che il rivelatore ha più tempo a disposizione per acquisire gli ioni scelti.

Questa tecnica è stata utilizzata per il dosaggio degli analiti nei campioni oggetto di questa tesi.

Analisi quantitativa

Tutti i parametri fin qui descritti vengono registrati sul software dello strumento e riuniti nel metodo strumentale usato per l'acquisizione dei dati.

Nelle stesse condizioni di acquisizione del campione viene iniettata una miscela standard definita Standard, composta dallo SI marcato isotopicamente e dall'analogo standard composto dai nativi (SI ^{12}C).

Questo affinché il software dello strumento possa calcolare, e utilizzare per la quantitativa, i Relative Responses (RR, le risposte relative dei nativi rispetto agli analoghi ^{13}C).

L'analisi quantitativa viene effettuata sui campioni per diluizione isotopica, ovvero dosando il singolo analita non per interpolazione sulla retta di calibrazione, ma contro il relativo SI marcato presente in matrice. La tecnica della diluizione isotopica prevede che vengano variati i rapporti isotopici dell'analita nel campione, mediante l'aggiunta di un'aliquota nota dell'elemento di interesse, ma di composizione isotopica differente. Dato che in MS è possibile misurare l'abbondanza di ciascun singolo isotopo, la quantità originale dell'analita è perciò ricavabile dalla misura dei nuovi rapporti isotopici.

$$\text{RR} = \frac{A_n \times C_1}{A_1 \times C_n}$$

dove:

A_n = Area dello ione primario del composto nativo nella soluzione standard di calibrazione

C_l = Concentrazione dello ione primario del composto marcato ^{13}C (l=abeled) nella soluzione standard di calibrazione

A_l = Area dello ione primario del composto marcato ^{13}C (l=abeled) nella soluzione standard di calibrazione

C_n = Area dello ione primario del composto nativo nella soluzione standard di calibrazione

RR = le risposte relative dei nativi rispetto agli analoghi ^{13}C

Il software dello strumento usa anche in questo caso i dati ricavati dell'iniezione dello Standard di calibrazione per il calcolo dei fattori di Risposta (RF), secondo la formula:

$$\text{RF} = \frac{A_n \times C_{\text{ISI}}}{A_{\text{ISI}} \times C_n}$$

dove:

A_n = Area dello ione primario del composto nativo nella soluzione standard di calibrazione

C_{ISI} = Concentrazione dello ione primario dello SI ^{13}C di riferimento nella soluzione standard di calibrazione

A_{ISI} = Area dello ione primario dello SI ^{13}C di riferimento nella soluzione standard di calibrazione

C_n = Concentrazione dello ione primario del composto nativo nella soluzione standard di calibrazione

Su ogni campione iniettato viene calcolato il recupero percentuale degli SI e vengono esclusi dalla successiva fase di quantificazione i campioni che presentano un recupero percentuale dopo estrazione e purificazione inferiore al 40%.

Il recupero percentuale (R%) viene così calcolato:

$$R\% = \frac{A_1(SC)}{A_1(C)} \times 100$$

dove:

$A_1(SC)$ = Area dello ione primario del composto marcato ^{13}C (labeled) nella soluzione standard di calibrazione

$A_1(C)$ = Area dello ione primario del composto marcato nel campione

Sui campioni con un R% > 40% l'analisi quantitativa strumentale viene fatta dal software dello strumento tenendo conto di quanto detto sopra, utilizzando per ogni analita l'area dello ione primario [EPA Method 1668, 1999].

Controllo di qualità dei dati

Il controllo di qualità dei dati è stato eseguito attraverso due modi paralleli e indipendenti: il controllo esterno e quello "in house".

Controllo esterno

Una porzione di alcuni campioni di biota e sedimento sono stati inviati a due diversi laboratori per essere analizzati e fornire utili elementi di valutazione in merito all'affidabilità dei risultati analitici [di Domenico *et al.*, 1996]. I risultati ottenuti sono stati abbastanza soddisfacenti. Bisogna distinguere però che il controllo interlaboratorio ha interessato sia replicati analitici reali (cioè porzioni della stessa matrice), che replicati analitici presunti (cioè campioni diversi prelevati nello stesso sito). Per i primi, l'accordo tra i tre laboratori è apparso significativo, soprattutto in considerazione del fatto che sono state utilizzate tre procedure analitiche distinte, applicate in totale autonomia e senza intercalibrazione reciproca.

Una situazione decisamente diversa si è avuta nel caso dei replicati presunti raccolti nella campagna dell'Ottobre 1995: alcuni campioni hanno dato risultati con differenze numeriche molto marcate, indipendentemente dal sito di provenienza. Questo può essere in parte giustificato dalle modalità di campionamento; tuttavia, l'esistenza di queste marcate differenze tra coppie di campioni provenienti da punti presumibilmente molto vicini tra loro è un dato che va sottolineato in quanto tenderebbe a evidenziare la presenza di forti irregolarità, almeno occasionali, nella distribuzione della contaminazione.

Controllo "in house"

L'affidabilità dei procedimenti analitici adottati dai laboratori dell'ISS è stata valutata soprattutto in base alla loro *efficienza di recupero* e all'*incertezza analitica* associata ai risultati. Inoltre, a ulteriore verifica dei risultati ottenuti e dell'attendibilità dei metodi impiegati, e in particolare per individuare eventuali errori sistematici, su alcuni dei campioni raccolti sono state eseguite delle verifiche interlaboratorio come già detto. L'*efficienza di recupero (R)* degli analiti organici rilevati è stata valutata sulla base dei valori di R, cioè dei recuperi, accertati per i traccianti aggiunti alle matrici predisposte per l'analisi. Per un valore di $R < 20 \%$ il risultato dell'analisi doveva essere sottoposto a una valutazione di affidabilità; invece, per $R < 10 \%$, il dato veniva comunque rigettato e l'analisi ripetuta.

L'*incertezza analitica* sulle determinazioni dei microcontaminanti organici è stata stimata mediamente pari a $\approx | \pm 10 | \%$ per segnali nettamente superiori al limite di determinazione e ancora accettabile (in genere, $CV < | \pm 30 | \%$) per segnali vicini al limite predetto. Il limite di determinazione comunemente utilizzato dal laboratorio corrisponde a $S/N > \approx 3$, dove il rumore di fondo N viene misurato in riferimento alla

deviazione *standard* σ_N ($N \approx 4\sigma_N$); ne consegue che ogni analita affidabilmente quantificato è caratterizzato da un segnale $S > 12\sigma_N$.

Come già riportato, nel calcolo dei valori cumulativi per famiglia, ma anche nella trattazione dei dati singoli dove necessario (calcolo dei livelli medi dei singoli congeneri/analiti), i risultati composto- o congenere-specifici non determinati, ossia, espressi come limite di quantificazione ($< LOQ$), sono stati inseriti come $LOQ \times 0.5$ (stima *medium bound*). E' chiaro che questo tipo di approccio può generare dei dubbi sulla rappresentatività dei livelli di concentrazione effettivamente presenti laddove ci siano molti contributi virtuali.

Allegato 2.

La determinazione della materia organica estratta (EOM) è stata eseguita come segue: il campione estratto, veniva prima concentrato e poi portato a volume noto. Successivamente veniva suddiviso in due aliquote, per le determinazioni, parallele e indipendenti, della materia organica estratta (EOM) e dei composti clorurati.

L'EOM è stata determinata trasferendo in una *vial* di Pyrex, di volume appropriato e di peso noto, una modesta aliquota dell'estratto organico non trattato. Il solvente è stato lasciato evaporare sotto cappa, fino al raggiungimento di peso costante: la quantità dell'EOM è stata successivamente calcolata sottraendo il peso della *vial* vuota.