

University of Naples Federico II
Department of Chemical Sciences



Ph.D. in Chemical Sciences
XXVIII Cycle

TESI DI DOTTORATO

Valutazione dei livelli ematici di diossine (PCDD/F) e policlorobifenili (PCB) in soggetti in funzione della dieta e delle abitudini alimentari.

Tutor:

Prof. Marco Trifuoggi

Co-Tutor:

Dr. Mauro Esposito

Examiner:

Prof. Mauro Iuliano

Dottorando

Dr. Pasquale Maglio

INDICE:

1. Introduzione	pag. 3
1.1. Diossine	pag. 3
1.2. Policlorobifenili (PCB)	pag. 10
1.3. Emergenza diossine in Campania	pag. 17
2. Obiettivo della tesi	pag. 24
3. Materiali e metodi	pag. 26
3.1. Popolazione e campionamento	pag. 26
3.2. Reagenti e standard	pag. 30
3.3. Metodo analitico	pag. 31
3.4. Analisi HRGC/HRMS	pag. 32
4. Risultati	pag. 33
4.1. Studio delle risposte di tre biomarkers	pag. 42
4.2. Seconda fase	pag. 45
5. Conclusioni	pag. 49
6. Bibliografia	pag. 51

1. Introduzione.

1.1 Le diossine.

Il termine “diossine” è comunemente utilizzato per indicare un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati, molecole costituite da carbonio, idrogeno, ossigeno e cloro e divise in due famiglie: policlorodibenzodiossine (PCDD più propriamente “diossine”) e policlorodibenzofuranifurani (PCDF o “furani”).

PCDD e PCDF sono composti eteroaromatici triciclici policlorurati e presentano una struttura quasi planare; il loro livello di clorosostituzione può variare da uno a otto (Figura 1.1). Ad eccezione dei cloroderivati ottasostituiti, ad ogni livello di clorosostituzione (gruppo omologo) corrispondono più isomeri strutturali: in totale, distinguiamo 75 congeneri per le PCDD e 135 per i PCDF. Tuttavia solo sette congeneri delle PCDD e dieci dei PCDF hanno rilevanza sotto il profilo tossicologico e quindi interesse nella valutazione e gestione del rischio ambientale ed ai fini della protezione sanitaria^[1,2]. I diciassette congeneri d'interesse presentano una marcata persistenza ambientale, bassissima solubilità in acqua ($7,40 \times 10^{-8}$ – $2,36 \times 10^{-4}$ mg/L), elevata lipofilia (log Kow, 6,1 – 8,2), elevata tendenza alla bioconcentrazione (fattore di bioconcentrazione, log BCF_{3,90} – 5,27) [US EPA, 2003] e alla biomagnificazione nelle catene alimentari [UNEP, 2003], e tendenza al trasporto aereo anche a lunghe distanze.

In seguito a tali caratteristiche questi composti sono stati inclusi nella Convenzione di Stoccolma sui Contaminanti Organici Persistenti (POP's) [UNEP, 2001]^[3] e nel Protocollo sui POP's all'interno della Convenzione sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero [UNECE, 1998]^[4]. Inoltre è stato osservato che i composti in questione hanno una elevata termostabilità, sono liposolubili, resistenti agli acidi ed alle basi oltre ad avere un'emivita metabolica di parecchi anni nell'essere umano, anche se sono leggermente fotosensibili nell'ambiente esterno. [IARC, 1997]^[5].

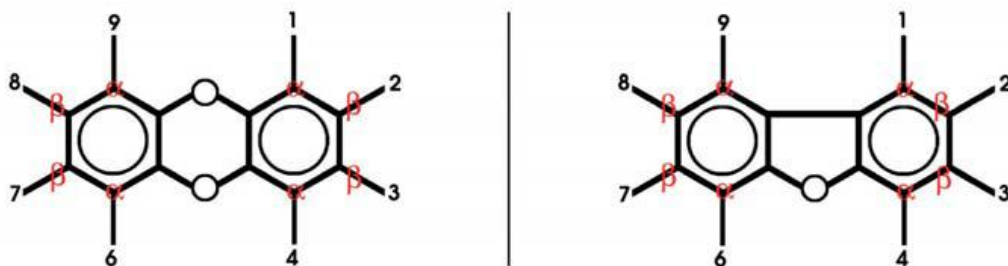
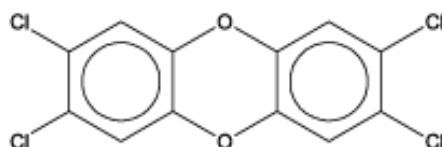


Figura 1.1: Formula di struttura delle diossine (sinistra) e dei furani (destra). I numeri indicano i possibili sostituenti clorurati

Nella terminologia corrente il termine diossina è spesso usato come sinonimo della 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina o TCDD (Figura 1.2)



2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

Figura 1.2: Formula di struttura della 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina (TCDD)

La TCDD allo stato cristallino è una sostanza inodore, di colore bianco, con punto di fusione di 307 °C, termostabile fino ad 800 °C, liposolubile e resistente ad acidi ed alcali. È chimicamente degradabile in pochi giorni se sottoposta ad attacco da parte della radiazione solare ultravioletta in presenza di donatori di ioni idrogeno (ad esempio a contatto col il fogliame verde delle piante); di contro, se dilavata nel terreno, tende a legarsi al materiale organico ivi presente e subisce un fenomeno di degradazione molto più lento, dell'ordine di parecchi mesi o anni^[6].

Le PCDD ed i PCDF sono in realtà una famiglia costituita da 210 diversi congeneri, rispettivamente, 75 per le diossine e 135 per i furani, strettamente correlati per caratteristiche e tossicità. Per congeneri si intendono i vari membri appartenenti ad una famiglia di sostanze chimiche, che differiscono tra loro per il numero e la posizione dei medesimi sostituenti. Tutti i congeneri

delle diossine presentano una struttura planare, avendo tutti gli atomi di ossigeno, carbonio, idrogeno e cloro sullo stesso piano. Dei 210 possibili congeneri di PCDDs e PCDFs, solo 17 presentano rilevanza da un punto di vista tossicologico, risultando estremamente tossici per l'uomo e gli animali; soprattutto quelli le cui molecole contengono da 4 ad 8 atomi di cloro ed in particolare sono clorate nelle posizioni 2,3,7,8^[7,8].

Al fine di stabilire un criterio di stima del rischio è stato pertanto sviluppato il concetto di Tossicità Equivalente (TEQ)^[9,10], questo permette di definire quantitativamente in maniera univoca la tossicità di una miscela complessa.

I fattori di tossicità equivalente si basano sulla considerazione che PCDD, PCDF e PCB diossina simili sono composti strutturalmente simili che presentano il medesimo meccanismo di azione (attivazione del recettore Ah) e producono effetti tossici simili: proprio il legame tra le diossine e il recettore Ah è il passo chiave per il successivo innescarsi degli effetti tossici.

I TEF vengono calcolati confrontando l'affinità di legame dei vari composti organoclorurati con il recettore Ah, rispetto a quella della 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8- tetraclorodibenzodiossina), la più tossica tra le PCDD, considerando l'affinità di questa molecola come il valore unitario di riferimento. La 2,3,7,8-TCDD è classificata dalla International Agency for Research on Cancer (IARC) nel gruppo 1 cioè tra i cancerogeni certi per l'uomo^[11,12].

Per esprimere la concentrazione complessiva di PCDD/PCDF e PCB diossina simili nelle diverse matrici si è introdotto il concetto di tossicità equivalente (TEQ), che si ottiene sommando i prodotti tra i valori TEF dei singoli congeneri e le rispettive concentrazioni, espresse con l'unità di misura della matrice in cui vengono ricercate.

Si riportano due gruppi di TEF: gli I-TEF (International TEF), attualmente utilizzati per l'espressione della concentrazione totale di PCDD/PCDF in campioni ambientali, e i WHO-TEF^[13,14,15] definiti per PCDD/PCDF e PCB dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS = WHO), attualmente

utilizzati per i campioni alimentari e, nel caso dei PCB, per i campioni ambientali (Tabella 1.1).

Moltiplicando la massa di un congenere per il suo fattore di tossicità equivalente (TEF) si ottiene la corrispondente tossicità equivalente nella miscela (TEQ). La formula utilizzata è la seguente:

$$TEQ = [(PCDD_i \times TEF_i) + (PCDF_i \times TEF_i)]_n + [(PCB_i \times TEF_i)]_n$$

DIOSSINE (PCDDs)	I-TEF (NATO/CCMS, 1998)^[1]	WHO – TEF (WHO, 2005)^[2]
2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina (TCDD)	1.000	1.000
1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzodiossina (PeCDD)	0.500	1.000
1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzodiossina (HxCDD)	0.100	0.100
1,2,3,6,7,8-Esaclorodibenzodiossina (HxCDD)	0.100	0.100
1,2,3,7,8,9-Esaclorodibenzodiossina (HxCDD)	0.100	0.100
1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzodiossina (HpCDD)	0.010	0.010
1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclordibenzodiossina (OCDD)	0.001	0.003
FURANI (PCDFs)		
2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano (TCDF)	0.100	0.100
2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano (PeCDF)	0.500	0.300
1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano (PeCDF)	0.050	0.030
1,2,3,4,7,8-Esaclorodibenzofurano (HxCDF)	0.100	0.100
1,2,3,7,8,9- Esaclorodibenzofurano (HxCDF)	0.100	0.100
1,2,3,6,7,8- Esaclorodibenzofurano (HxCDF)	0.100	0.100
2,3,4,6,7,8- Esaclorodibenzofurano (HxCDF)	0.100	0.100
1,2,3,4,6,7,8-Eptaclorodibenzofurano (HpCDF)	0.010	0.010
1,2,3,4,7,8,9-Eptaclorodibenzofurano (HpCDF)	0.010	0.010
Octaclorodibenzofurano (OCDF)	0.001	0.003
<i>Tabella 1.1: Fattori di tossicità equivalente (TEF) per le diossine ed i furani.</i>		

[1] NATO/CCMS: North Atlantic Treaty Organization/Committee on the Challenges of Modern Society.

International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxin and related compounds, 186, 1988

[2] WHO: World Health Organization

The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. Van den Berg, M. et al. , ToxSci Advance Access published July 7, 2006.

PCDD e PCDF sono composti altamente persistenti rilevati nell'acqua, nel suolo, nei sedimenti, in tessuti animali, negli alimenti ed in atmosfera. Di per sé non rivestono alcuna utilità pratica e non sono mai state un prodotto industriale; infatti, secondo la letteratura internazionale, si tratta di sottoprodotti indesiderati di reazioni chimiche, termiche (incompleta combustione di materiale organico in presenza di cloro), fotochimiche ed enzimatiche.

Le sostanze che a seguito della loro combustione producono diossine sono indicate come *precursori*, mentre quelle che presentano tracce o residui di diossine come conseguenza del loro processo di produzione sono *riserve* in grado di rilasciare diossine nell'ambiente con modalità dipendenti dal tipo di utilizzazione e gestione (pratiche e comportamenti antropici).

Tra i processi chimici emergono la produzione di materie plastiche, composti chimici, carta ed oli combustibili. Possiamo distinguere i processi di combustione in:

- Combustioni incontrollate, tra le quali:
 - Incendi accidentali ed all'aperto (materiali eterogenei, quali rifiuti urbani, pneumatici etc.), il cui contributo risulta di difficile quantificazione e valutazione,
 - Incendi boschivi in presenza di composti chimici clorurati per la combustione di lignina e cellulosa,
 - Eruzioni vulcaniche con meccanismo di produzione di diossine analogo agli incendi boschivi;
- Combustioni controllate (volontarie) di:
 - Incenerimento dei rifiuti solidi urbani (Termovalorizzatori),
 - Essiccazione ed incenerimento dei fanghi,
 - Carburante/combustibili nei processi di fusione dei metalli ferrosi e non ferrosi,
 - Carburante/combustibili nei processi di produzione del cemento;

- Altre combustione controllate per la produzione di energia:

- Trasporti (per l'utilizzo di combustibili che contengono composti clorurati),
- Combustione di legno trattato,
- Impianti che producono energia elettrica alimentati ad olio combustibile.

È importante evidenziare come siano soprattutto i precursori e le riserve a costituire le sorgenti di diossine più difficilmente controllabili e localizzabili sul territorio.

La presenza di diossine è stata rilevata in tutte le matrici ambientali, inclusi aria, acque di superficie, acque di falda, suolo e sedimenti. La produzione e l'uso di composti clorurati, come i clorofenoli e gli erbicidi fenossiclorurati, hanno rappresentato una sorgente rilevante di PCDD. Tuttavia attualmente, grazie ai divieti imposti dalla normativa vigente, si ritiene che i principali responsabili dell'immissione di diossine nell'ambiente siano i processi di combustione ed incenerimento^[16].

L'esposizione umana alle diossine può avvenire attraverso:

- Esposizione ambientale,
- Esposizione occupazionale
- Esposizione accidentale

Negli anni addietro diversi incidenti sono stati la causa di esposizione prolungata alle diossine ed ai prodotti ad esse correlati; esempi noti, e forse i più emblematici, sono: l'incidente nello stabilimento chimico della BASF in Germania (1953), l'incidente nello stabilimento chimico dell'ICMESA di Seveso (1976), l'incendio del Binghamton State Office Building di apparecchiature elettriche contenenti policlorobifenili (PCB) (1981).

Mentre l'esposizione accidentale ed occupazionale interessa limitati sottogruppi della popolazione, l'esposizione ambientale causata da sorgenti diffuse espone tutta la popolazione attraverso:

- Assorbimento dermico
- Ingestione di suolo contaminato
- Inalazione di aria e/o particelle contaminate
- Consumo di alimenti.

Tuttavia, in base ai dati di letteratura la principale fonte di esposizione per la specie umana (circa il 90%), è rappresentata proprio dalla presenza delle diossine negli alimenti^[17,18]. I maggiori *carrier* alimentari sono le matrici grasse d'origine animale e, quindi, tutti gli alimenti che le contengono (pesce, carne, latte, latticini ed uova).

Le diossine, inoltre, tendono alla bioconcentrazione e possono evidenziare anche fenomeni di biomagnificazione, cioè un aumento progressivo della concentrazione nel passaggio attraverso gli anelli della catena trofica, con il risultato finale di raggiungere concentrazioni rilevanti da un punto vista tossicologico e, conseguentemente, un'elevata pericolosità per la specie umana^[19].

Studi epidemiologici condotti sull'uomo (*Flesh-Janis et al., 1995; Finerhut et al., 1991; Bertazzi et al., 1989; Hardell et al., 1981;1988; Coggon et al., 1986; Bair et al.; 1983; Axelson et al., 1980*) evidenziano una correlazione tra l'esposizione alle diossine e la comparsa di determinati tumori, come il sarcoma dei tessuti molli, i linfomi *di Hodgkin e non Hodgkin*, alcuni tumori tiroidei, polmonari ed il mesotelioma. Non sono da trascurare e sottovalutare altri effetti tossici, tra i quali si segnala in particolare una funzione di "sregolatore" o "distruttore", o, più comunemente, interferente endocrino (*endocrine disruptor*). In seguito ad esposizione acuta alla diossina, la prima espressione clinica osservata è stata la cloracne.

Nel 1999 grandi quantità di diossine e policlorobifenili (PCB) sono stati rinvenute in mangimi ed alimenti di origine animale prodotti in Belgio. La contaminazione è stata attribuita all'uso di grassi animali, grassi di frittura riciclati ed oli minerali esausti, per la preparazione di miscele di grassi ad uso zootecnico.

In seguito a questo incidente, l'Unione Europea ha promosso l'ampliamento dei programmi di monitoraggio di questi contaminanti, fissandone i livelli massimi accettabili negli alimenti.

1.2 Policlorobifenili (PCB)

Finora abbiamo parlato solo di diossine (PCDD e PCDF), tuttavia alla famiglia dei POP's appartiene anche un'altra classe di sostanze, quella dei policlorobifenili (PCB).

I policlorobifenili (PCB) sono molecole sintetizzate all'inizio del secolo scorso e prodotte commercialmente fin dal 1930, sebbene attualmente siano in buona parte banditi a causa della loro tossicità, persistenza e tendenza a bioaccumularsi. A differenza delle diossine, quindi, i PCB sono sostanze chimiche prodotte deliberatamente tramite processi industriali. Le principali sorgenti di PCB nell'ambiente possono essere suddivise nelle seguenti quattro categorie [EMEP/Corinair, 2005]:

- 1) produzione di PCB e di prodotti (o apparecchiature) contenenti PCB;
- 2) uso di prodotti contenenti PCB;
- 3) emissioni da siti di stoccaggio/smaltimento inquinati da PCB;
- 4) processi termici

I "Policlorobifenili" (PCB) sono idrocarburi aromatici policlorurati ottenuti per sintesi attraverso la clorurazione diretta dei bifenili. In base al numero di atomi di Cl si possono avere fino a 209 congeneri. Essi hanno un bifenile come struttura base e differiscono per il grado di clorurazione dello stesso e, a parità di grado di clorurazione, per la posizione degli atomi di cloro [Figura 1.3].

In relazione al loro contenuto in cloro e al processo di produzione sono stati venduti sotto forma di miscele tecniche con diversi nomi commerciali (Aroclor, Clophen, Apirolio, etc.).

A livello comunitario la Direttiva 76/769/CE ha vietato l'uso e la produzione dei PCB, ma alcune deroghe sono state concesse a paesi dell'Europa dell'Est.

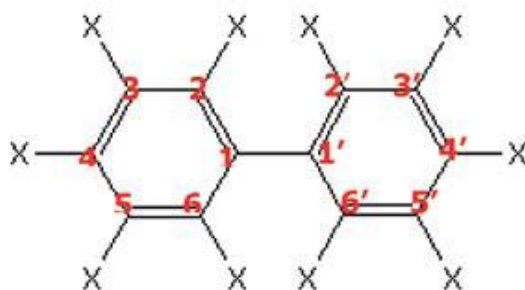


Figura 1.3: Formula di struttura dei PCB

I PCB presentano bassa solubilità in acqua ($1,0 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mg/L), lipofilia ($\log K_{ow}$, 4,3 – 8,26) [UNEP, 2003] ed elevata persistenza ambientale, cosa questa che ne favorisce il bioaccumulo. Analogamente a PCDD e PCDF, i PCB sono stati inseriti nella Convenzione di Stoccolma sui POP [UNEP, 2001] e nel Protocollo sui POP all'interno della Convenzione sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero [UNECE, 1998]. C'è da considerare che miscele commerciali di PCB contenevano già all'origine tracce tossicologicamente non trascurabili di PCDF [De Felip et al., 1994]. Tra i 209 congeneri del gruppo dei PCB rivestono interesse particolare dal punto di vista tossicologico i 12 congeneri, approssimativamente stereoisomeri della 2,3,7,8-TCDD; questi costituiscono la classe dei PCB diossina-simili (DL-PCB) e sono caratterizzati dalle quattro posizioni orto (2, 2', 6, 6') libere (DL-PCB non orto-sostituiti) o al massimo monoclorosostituite (DL-PCB mono-orto-sostituiti).

A causa della loro struttura ed in virtù della possibilità di libera rotazione intorno al legame semplice che unisce i due anelli aromatici clorosostituiti, i PCB non-orto ed i mono-orto sostituiti possono adottare una disposizione spaziale simile alla 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (2,3,7,8-TCDD); pertanto l'azione tossica di questi congeneri è analoga a quella della 2,3,7,8-TCDD, sebbene di minore intensità. Per tale motivo, in alcune norme, per valutare la tossicità complessiva di un campione, essi vengono “sommati” assieme alle diossine.

Le tabelle seguenti comprendono i congeneri DL-PCB, nonché dei PCB non diossina simili (NDL-PCB).

	I-TEF (NATO/CCMS, 1998)^[1]	WHO – TEF (WHO, 2005)^[2]
PCB non-orto		
3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl (PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126)	0.1000	0.1000
3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 169)	0.0100	0.0300
PCB mono-orto		
2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl (PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl (PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (PCB 189)	0.0001	0.00003
<i>Tabella 1.2: Elenco dei congeneri DL-PCB con relativi coefficienti di tossicità equivalente (TEF)</i>		

NDL-PCB
2,4,4'-Triclorobifenile (PCB 28)
2,2',5,5'-Tetraclorobifenile (PCB 52)
2,2',3,5',6-Pentaclorobifenile (PCB 95)
2,2',4,5,5'-Pentaclorobifenile (PCB 101)
2,2',4,4',5-Pentaclorobifenile (PCB 99)
2,3,3',4,6-Pentaclorobifenile (PCB 110)
2,2',3,5,5',6-Esaclorobifenile (PCB 151)
2,2',3,4',5',6'-Esaclorobifenile (PCB 149)
2,2',3,4',5,5'-Esaclorobifenile (PCB 146)
2,2',4,4',5,5'-Esaclorobifenile (PCB 153)
2,2',3,4,4',5'-Esaclorobifenile (PCB 138)
2,2',3,4',5,5',6-Eptaclorobifenile (PCB 187)
2,2',3,4,4',5',6-Eptaclorobifenile (PCB 183)
2,2',3,3',4',5,6-Eptaclorobifenile (PCB 177)
2,2',3,4,4',5,5'-Eptaclorobifenile (PCB 180)
2,2',3,3',4,4',5-Eptaclorobifenile (PCB 170)
<i>Tabella 1.3: Elenco dei congeneri NDL-PCB</i>

Va ribadito che i PCB ed i materiali che li contengono non sono prodotti più da diversi anni nei paesi industrializzati. Questa categoria rimane comunque importante in una visione retrospettiva della presenza di PCB nell'ambiente: va ad esempio considerato che le perdite di PCB dai condensatori elettrici durante la produzione poteva raggiungere anche il 20% della quantità di fluido dielettrico utilizzato. La seconda categoria (uso di PCB) è vasta ed eterogenea: i PCB erano usati, ed in parte lo sono ancora, in diverse applicazioni in sistemi chiusi (fluidi dielettrici in condensatori e trasformatori, sistemi idraulici e di raffreddamento, cavi) nonché come impregnanti della carta, nelle carte

autocopianti e nella produzione di vernici. [Tabella 1.4]. La terza categoria di sorgenti include diversi rifiuti contenenti PCB, come ad esempio apparecchiature e materiali fuori uso che sono tipicamente riciclati o più spesso smaltiti in discarica. Tale categoria di sorgenti include anche suoli, sedimenti ed acque che possono quindi agire come sorgenti secondarie. Infine, si possono avere emissioni di PCB anche da processi termici nel corso dei quali possono essere prodotti, al pari di PCDD e PCDF: infatti la formazione di PCB come sottoprodotto è possibile in ogni processo chimico che coinvolga cloro e carbonio organico, oppure in caso di combustione incompleta di sostanze contenenti i PCB stessi. L'inventario europeo delle emissioni di PCB [Berdowski et al., 1997] fornisce il seguente elenco di sorgenti di PCB:

- combustione di carbone,
- produzione di acciaio,
- incenerimento di rifiuti,
- apparecchiature elettriche.

Sistemi chiusi	Olio	Per trasformatori: centrali termoelettriche, navi, industrie, edifici, treni, metropolitane, tram, generatori, televisori, ecc Per condensatori: centrali, industrie, forni elettrici, navi, motori, lampade a mercurio, fluorescenti, apparecchi telegrafici, lavatrici, frigoriferi, condizionatori d'aria, televisori, elaboratori elettronici ecc.
	Altri usi	Cavi elettrici, trivelle, ecc
Sistemi aperti	Conduttori di calore	Apparecchi per riscaldamento e raffreddamento
	Olio lubrificante	Apparecchiature operanti ad alta temperatura, alta pressione, sott'acqua, pompe ad olio, compressori
	Elasticizzante	Colle, vernici, grassi sintetici, asfalto, inchiostri per stampe
	Elasticizzante ed antinfiammante	Guaine per conduttori di elettricità, nastri isolanti, altri usi in campo elettronico
	Carta	Carte autocopianti, carte carbone, carte per fotocopie
	Altri usi	Tinture per carte, tessuti, vernici per metalli, additivi per anticrittogamici, coloranti per vetro e ceramiche antipolvere, antiossidanti per fusibili, additivi per petrolio, additivi per fertilizzanti
Tabella 1.4: Produzione dei PCB		

È stato stimato che dall'inizio del XX secolo sono state prodotte e commercializzate più di un milione di tonnellate di PCB [dati European Commission, 2000]; anche se tali sostanze non vengono più prodotte in molti paesi industrializzati, tuttavia ne restano grossi quantitativi in apparecchiature elettriche, plastiche, nei materiali degli edifici e nell'ambiente.

Le apparecchiature elettriche costituiscono la principale categoria di applicazioni di PCB e pertanto costituiscono la loro principale sorgente potenziale di emissione a causa di perdite da installazioni operative o dismesse e da siti di stoccaggio o smaltimento di apparecchiature non più operative. Per

questo motivo sono considerate sorgenti prioritarie in molti inventari di emissioni di diverse agenzie ambientali. Ad esempio, nel Regno Unito si stimava negli anni '90 che circa il 90% delle emissioni di PCB originasse da perdite di trasformatori e condensatori, mentre l'Unione Europea stimava che circa il 94% delle emissioni avesse origine da questa classe di sorgenti. Va tenuto in conto che le stime di emissione di PCB da apparecchiature elettriche e da altri sistemi chiusi sono molto incerte, a tal punto che molti inventari delle emissioni non li includono.

Come per le diossine, anche per i PCB il 90% dell'esposizione nella popolazione generale avviene attraverso gli alimenti, in particolar modo quelli a maggior contenuto lipidico.

I sintomi maggiormente riscontrati a seguito di forti esposizioni ai PCB sono prevalentemente cutanei, soprattutto acne ed esantemi. Inoltre, anche queste sostanze, analogamente alle diossine, sono interferenti endocrini (*endocrine disruptor*) oltre ad essere inibitori del sistema immunitario.

In Italia va ricordato il caso "Caffaro", un'azienda chimica del bresciano, nella quale, a partire dagli anni trenta fino al 1984, si producevano PCB. L'inquinamento ambientale causato da tale impianto, ha interessato la catena alimentare, vettore predominante per la distribuzione di questi contaminanti, colpendo la popolazione che risiedeva nelle aree circostanti la zona industriale. In questa zona sono stati rilevati dati significativi relativi all'incidenza di tumori, soprattutto epatici, correlati alle sostanze prodotte dalla Caffaro e presenti in concentrazioni elevate nelle matrici ambientali.

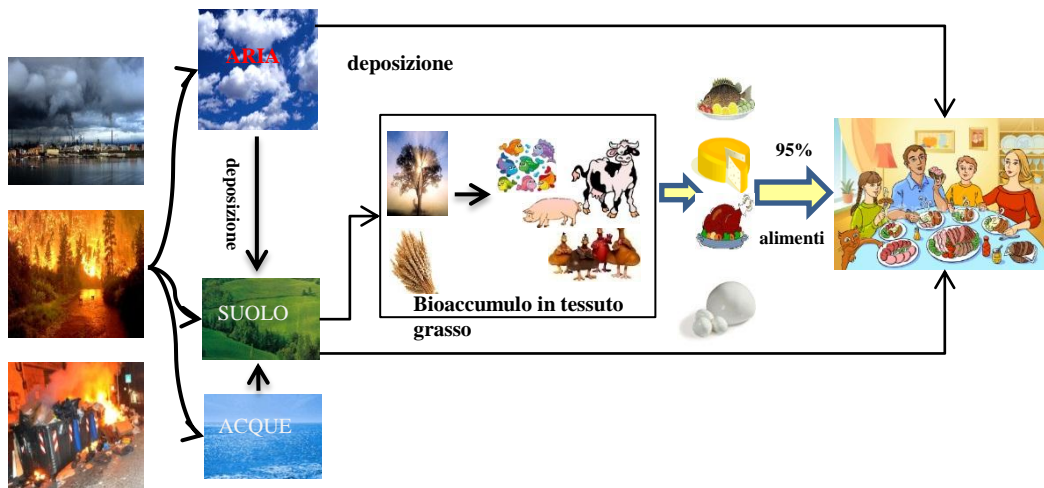


Figura 1.4: fonte di esposizione per la specie umana

1.3 EMERGENZA DIOSSINE IN CAMPANIA

L'allarme Diossina ha rappresentato in Campania una delle maggiori cause di preoccupazione tra i cittadini, in gran parte a seguito delle implicazioni sulla salute e sulla qualità dei prodotti derivati dall'industria lattiero-casearia.

L'emergenza diossina è iniziata nella primavera del 2002 a seguito del riscontro, nell'ambito del Programma nazionale di controllo di residui negli alimenti predisposto dal Ministero della Salute nel 2001, di livelli di diossine superiori ai limiti previsti dalla normativa comunitaria vigente (Reg. CE n. 2375 del 2001) in alcuni campioni di latte di massa ovino ed ovicaprino.

I campioni di latte del 2002 risultati positivi erano stati prelevati dalle AA.SS.LL. competenti per territorio in allevamenti situati in tre comuni della provincia di Napoli (Marigliano, Mariglianella e Bruscianno) e tre della provincia di Caserta (Villa Literno, Castelvolturno e Casal di Principe).

Al fine di verificare se, accanto all'emergenza sanitaria descritta, ci si trovasse in presenza anche di una situazione di contaminazione ambientale, nel maggio del 2002 l'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Campania (ARPAC) realizzò una prima campagna di monitoraggio dei livelli di diossine, furani e PCB nelle matrici ambientali (suolo ed acqua) ed anche nei vegetali delle aree di pascolo frequentate dalle greggi interessate dal fenomeno

sanitario descritto. Successive indagini hanno confermato la presenza degli stessi microinquinanti in campioni di latte provenienti da altre greggi stanziate nei medesimi territori.

Il piano di interventi per l'emergenza diossine, approvato nel 2003 dalla Giunta Regionale della Campania, individuò, sulla base della localizzazione delle aziende zootecniche poste sotto sequestro, le zone a rischio entro le quali effettuare una nuova campagna di indagine su campioni di latte, ma anche sui mangimi e sulle matrici ambientali suolo ed erba. Parallelamente all'espletamento da parte dell'ARPAC della prima campagna di monitoraggio ambientale, l'amministrazione regionale dispose l'effettuazione di ulteriori analisi su matrici biologiche prelevate sull'intero territorio regionale, con maggiore intensità nei territori interessati e nei territori contigui a quelli in cui si era manifestato l'inquinamento da diossine nel latte.

In totale furono prelevati 241 campioni, di cui 128 di latte (bovino, bufalino ed ovicaprino) e 113 di altre tipologie di alimenti (carne, uova, mangimi, etc). Nel marzo 2003 pervennero i risultati dei primi 127 campioni, 52 dei quali presentavano valori di diossine superiori ai limiti di legge.

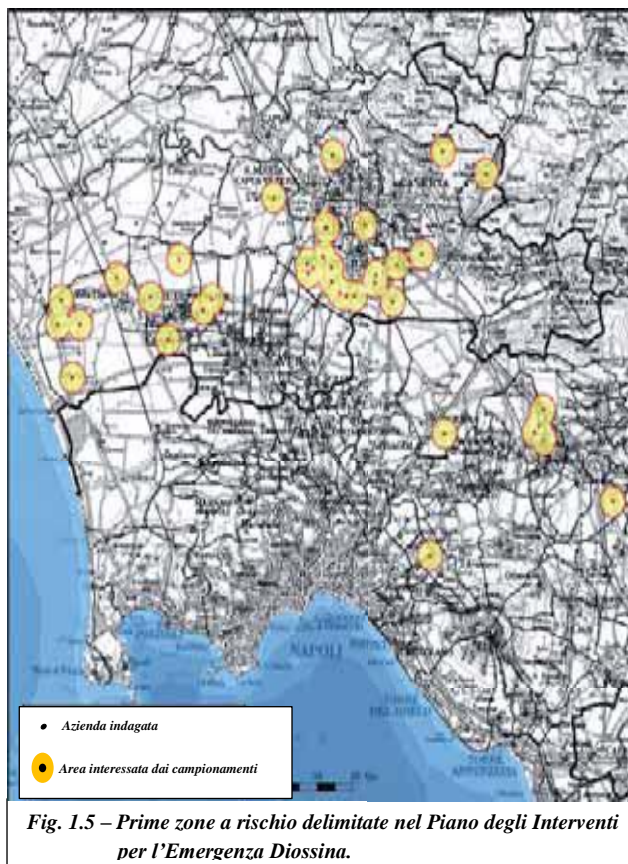
Su questa base furono poste sotto sequestro le prime 38 aziende zootecniche, in particolare:

- 31 in provincia di Caserta (nei comuni di Caserta, Macerata Campania, Recale, San Marco Evangelista, Valle Maddaloni, Maddaloni, Casal di Principe, Villa Literno, San Cipriano d'Aversa, Villa di Briano, San Tammaro, San Prisco e Marcianise) per un totale di 8633 animali di cui 1336 bufalini, 2577 bovini e 4720 ovicaprini,
- 7 in provincia di Napoli (nei comuni di Marigliano, Cercola, Acerra, Brusciiano e Nola) per un totale di 1996 animali, di cui 50 bufalini, 346 bovini e 1600 ovicaprini.

Constatata, quindi, l'estensione del fenomeno sanitario, la giunta Regionale della Campania approvò un Piano di interventi per l'Emergenza Diossine, finalizzato in primo luogo all'ottenimento di maggiori elementi relativamente

alla localizzazione ed alla grandezza dell'evento ed in secondo luogo alla rintracciabilità delle fonti e delle cause dell'inquinamento.

In particolare, nell'ipotesi che, unitamente alla situazione di emergenza sanitaria potesse essere associata una situazione ugualmente grave di emergenza ambientale, la Giunta Regionale ritenne fondamentale procedere, accanto all'esecuzione di ulteriori indagini su latte e componenti delle razioni alimentari, anche alla realizzazione di un'ulteriore seconda campagna di monitoraggio delle matrici ambientali.



In via preliminare e sulla base delle informazioni disponibili, la Regione effettuò la delimitazione delle “zone a rischio”, individuate georeferenziando le aziende zootecniche poste sotto sequestro. In particolare, per gli allevamenti con terra fu referenziato il centro aziendale, mentre per gli allevamenti senza terra furono referenziati i pascoli abitualmente frequentati dalle greggi. Fu così elaborata una prima cartografia approssimata, ottenuta disegnando intorno ad ogni punto georeferenziato una fascia di rispetto circolare del raggio di 1 km, determinando così una superficie pari a 314 ettari. In questo modo furono delimitate le prime 38 aree a rischio (fig. 1.5).

Sovrapponendo poi questo elaborato cartografico ai limiti amministrativi, si ottenne una carta nella quale fu possibile distinguere i comuni per i quali la

maggior parte della superficie risultava inclusa nelle fasce di rispetto, da quelli interessati solo parzialmente.

Le aree a rischio così identificate interessavano il territorio di 25 comuni, di cui 19 in provincia di Caserta e 6 in provincia di Napoli (come riportato in tabella 1.5)

PROVINCIA DI CASERTA		PROVINCIA DI NAPOLI	
Comuni totalmente interessati	Comuni parzialmente interessati	Comuni totalmente interessati	Comuni parzialmente interessati
Macerata Campania	Cancello ed Arnone	San Vitaliano	Acerra
Marcianise	Casapesenna		Cercola
Portico di Caserta	Casal di Principe		Nola
Recale	Caserta		Marigliano
San Marco Evangelista	Maddaloni		Pollena Trocchia
	San Cipriano d'Aversa		
	Santa Maria la Fossa		
	San Prisco		
	San Tammaro		
	Villa di Briano		
	Valle di Maddaloni		
	Villa Literno		

Tab. 1.5 – Aree a rischio (a scopo precauzionale furono aggiunti altri due comuni del casertano: San Nicola la Strada e Capodrise).

All'interno di ciascuna delle aree a rischio, a titolo precauzionale, furono sequestrati tutti gli allevamenti presenti, a meno che non fossero in possesso di una certificazione attestante un livello di diossine nel latte inferiore ai limiti di legge; contestualmente al sequestro furono effettuati prelievi di campioni di latte da sottoporre ad analisi per confermare o meno il provvedimento.

Allo scopo di dare un seguito alle attività di monitoraggio sulle matrici biologiche, nel dicembre del 2007 la Regione Campania ha finanziato un ulteriore Piano di Sorveglianza sulla contaminazione da diossine in regione Campania.

Il Piano, iniziato nel 2008 e con durata triennale, ha visto impegnato l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) per l'intensificazione

del monitoraggio dei livelli di contaminazione da diossine, furani, DL-PCB ed NDL-PCB nel latte di massa. Per quanto concerne gli aspetti del Piano, questo prevede tre tipologie di campagne di monitoraggio:

- Campagna standard di monitoraggio per diossine, furani, DL-PCB ed NDL-PCB sulla base della modalità di uso dei terreni sull'intero territorio regionale;
- Campagne straordinarie di monitoraggio nelle aree di provenienza di foraggi o *insilati* utilizzati negli allevamenti presso i quali vengono segnalate positività;
- Campagne straordinarie in presenza di eventi di natura antropogenica (dolosi e non) quali incendi boschivi, incendi di rifiuti ed incendi di materiali tossici.

A seguito dei riscontri di livelli di positività nei prodotti lattiero-caseari, su richiesta della Unione Europea, è stato attivato un ulteriore piano di Controllo per la definizione dei livelli di contaminazione da diossine nella filiera bufalina. Secondo quanto stabilito dalla UE, il Piano prevede l'esecuzione di "controlli ambientali" all'interno di un *buffer* di tre chilometri di raggio incentrato sulle aziende zootecniche nelle quali i controlli sul latte bufalino o sui mangimi mostrino concentrazioni di diossine, furani, DL-PCB ed NDL-PCB superiori ai limiti di legge.

Attualmente l'area principalmente interessata, sulla quale si sta procedendo ai campionamenti risulta essere principalmente quella compresa tra la riva sinistra del Volturno e la riva destra dei Regi Lagni, per una superficie di circa 500 chilometri quadrati (FIGURA 1.6).

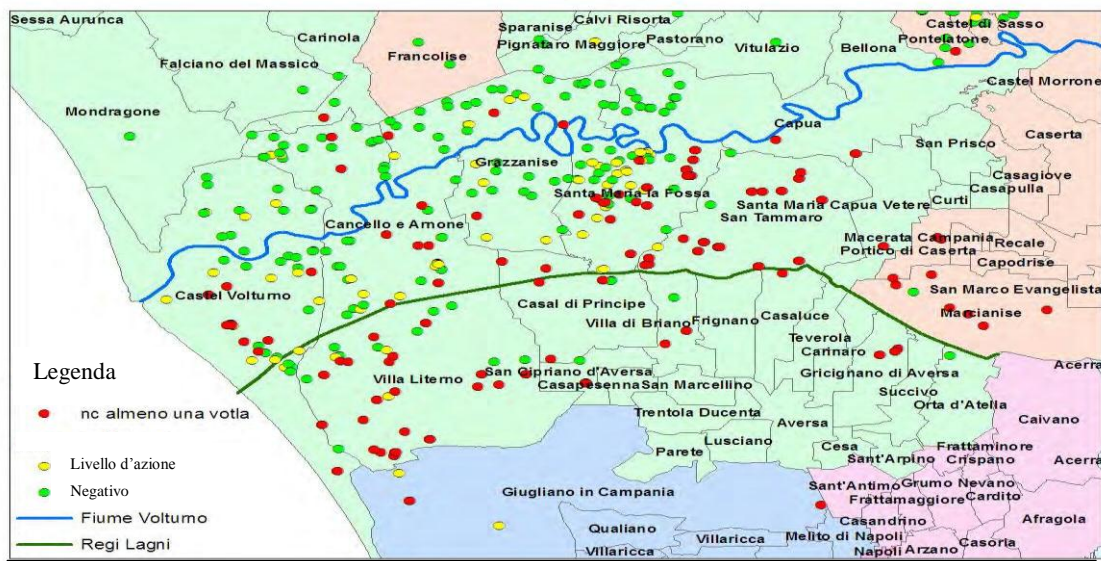


Fig. 1.6 - Distribuzione dei campionamenti e degli esiti per i prelievi di alimento ad uso zootecnico presso tutti gli allevamenti testati per diossine nell'area tra il Volturno ed i Regi Lagni.

Nell'aprile del 2009 il Ministero della Salute ha richiesto alla Regione Campania di programmare un "Extra-PNR" da eseguirsi in conformità alle indicazioni del piano UE. Nell'ambito del Piano UE e/o per altre motivazioni, risultavano testate n.872 aziende bufaline del territorio di Napoli e Caserta e che, dal riscontro effettuato in Banca Dati Nazionale n.157 aziende bufaline delle suddette province non risultavano ancora testate con campioni ufficiali per la ricerca di diossine e DL-PCB; pertanto ai fini della sicurezza alimentare è stato opportuno estendere il monitoraggio anche alle aziende bufaline non ancora testate ufficialmente (Fig. 1.7). Tutto ciò produce una nuova serie di campioni ufficiali di latte di massa che avrà la tipologia di "campione extra-piano mirato" o "campione Post piano UE", quindi senza sequestro delle aziende campionate.

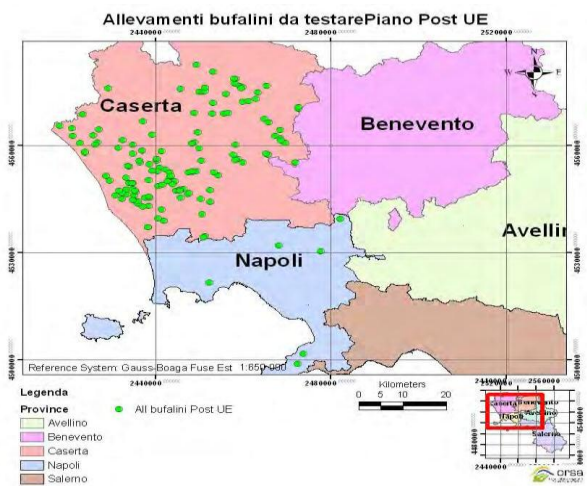


Fig.1.7 – Allevamenti bufalini da testare Piano Post UE.

per la ricerca di diossine e DL-PCB; pertanto ai fini della sicurezza alimentare è stato opportuno estendere il monitoraggio anche alle aziende bufaline non ancora testate ufficialmente (Fig. 1.7). Tutto ciò produce una nuova serie di campioni ufficiali di latte di massa che avrà la tipologia di "campione extra-piano mirato" o "campione Post piano UE", quindi senza sequestro delle aziende campionate.

A seguito di tutto ciò nel triennio 2008 – 2011 si è dato vita ad un nuovo Piano di Sorveglianza Diossine in Campania, i cui punti principali possono essere così rappresentati:

- Controlli su alimenti di origine animale (latte) ed alimenti zootecnici (campionamenti “PNR – extrapiano” e “PNAA – extrapiano”);
- Inserimento del “*rischio diossine*” nei programmi di autocontrollo aziendali;
- Controllo sull’igiene dei mangimi da parte dei conduttori delle aziende zootecniche a vocazione lattifera;
- Informativa immediata all’ARPAC (Agenzia Regionale Protezione Ambientale Campania) nel caso di riscontro di positività, per l’analisi tempestiva delle matrici ambientali circostanti;
- Programmi di formazione sulle Buone Pratiche Agricole finalizzate al contenimento del rischio contaminazione.

Sulla base della valutazione del rischio eseguita dall’Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno in collaborazione con l’ORSA (Osservatorio Regionale per la Sicurezza Alimentare) a partire dai dati sanitari ed ambientali, sono state identificate 50 aziende zootecniche a vocazione lattifera definibili “a rischio”. Presso queste aziende sono stati prelevati contestualmente sia campioni di latte di massa che campioni di alimenti zootecnici. Successivamente, a distanza di almeno sei mesi, presso le stesse aziende sono stati prelevati di nuovo, un campione di latte ed un campione di alimento per animali allo scopo di monitorare l’andamento dei livelli di diossine.

2. Obiettivo della tesi.

Questo lavoro di tesi scaturisce dall'interesse suscitato dai tanti episodi di contaminazione (vera o presunta) attribuita ai prodotti della regione Campania ed in particolare a quelli provenienti dall'area conosciuta come il “triangolo della morte” che ha le sue tre punte nelle città di Nola, Marigliano ed Acerra (Fig.: 2.1).



Fig.: 2.1- Il “triangolo della morte”.

In considerazione del fatto che la principale fonte di esposizione degli esseri umani avviene tramite il consumo di alimenti contaminati ed in particolar modo attraverso i prodotti di origine

animale, costituendo più del 90% della fonte di esposizione, ed osservando che tali contaminanti si accumulano nella catena alimentare, assorbendosi ed immagazzinandosi nel tessuto adiposo, tale emergenza sanitaria ha fatto emergere l'esigenza di indagare sulla relazione esistente tra l'eventuale presenza di diossine, furani, DL-PCB ed NDL-PCB negli alimenti e l'esposizione degli esseri umani a questi contaminanti ambientali.

Infatti diversi studi hanno evidenziato come questi contaminanti lipofili a riconosciuta attività carcinogenica, possono accumularsi nel tessuto adiposo e possono poi essere rilasciati dagli adipociti direttamente durante la lipolisi e/o indirettamente, durante i fenomeni di apoptosi, una volta raggiunta una concentrazione intracellulare tossica. Inoltre, numerose evidenze sperimentali hanno consentito di stabilire un legame tra obesità e carcinogenesi, definendo l'obesità come un importante fattore di rischio per il cancro^[20].

Questi contaminanti persistenti inoltre sono annoverati tra gli interferenti endocrini coinvolti nel possibile sviluppo di obesità e sindrome metabolica^[21].

Pertanto l'obiettivo di questo progetto di dottorato è stato quello di valutare la portata e gli effetti dell'esposizione umana alle diossine e PCB (policlorobifenili) attraverso la determinazione di questi contaminanti nei campioni di sangue in soggetti normopeso, obesi e sovrappeso^[22] che vivono in aree della regione Campania ad alto rischio di contaminazione ambientale (la cosiddetta "area a rischio": Acerra, Nola, Marigliano) e, per scopo di confronto, nei residenti in un'area urbana di Napoli e dei suoi dintorni (Pompei, Portici, Pozzuoli, Torre del Greco) al fine di verificare se l'inquinamento ambientale aumenti l'esposizione umana interna (fig.: 2.2).

Inoltre, è stato valutato come nel tempo una terapia dietetica, in funzione della variazione ponderale o meno, possa modificare la concentrazione di diossine e PCB nel sangue, ripetendo la determinazione di questi contaminanti dopo un periodo di dieta.

A causa della complessità delle procedure di estrazione e successiva

quantificazione di diossine e PCB dal sangue, è stata sviluppata una metodica analitica per la determinazione delle concentrazioni di questi contaminanti mediante gascromatografia ad alta risoluzione/spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS)^[23].

Considerando come determinanti ai differenti livelli di esposizione, caratteristiche della popolazione quali l'età, il sesso e l'indice di massa

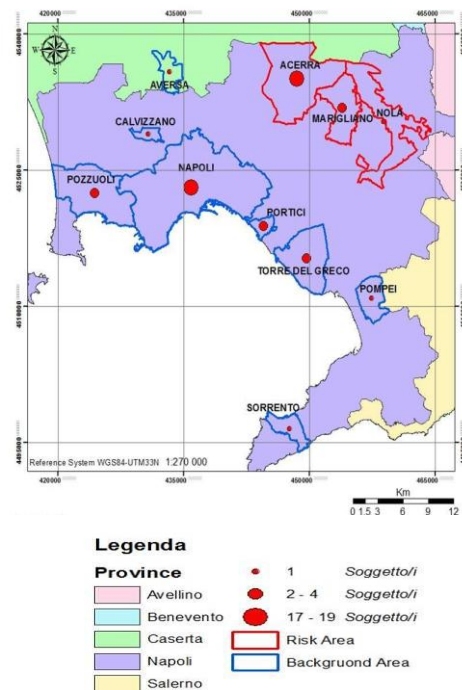
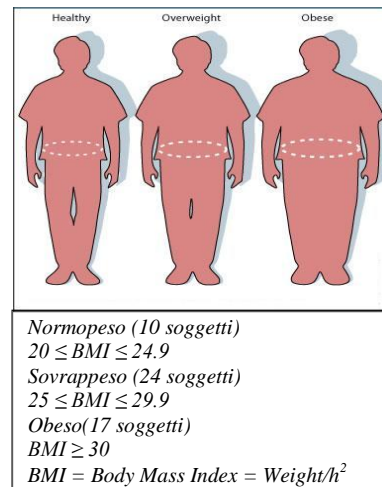


Fig.: 2.2 - Aree residenziali dei soggetti coinvolti nello studio.

corporea (BMI), lo studio ha preso in considerazione anche tali parametri (tab.: 2.1).

	Età	Nr. Soggetti
DONNE	Under 30	4
	30 – 39	7
	40 – 49	7
	Over 50	5
Totale		23
UOMINI	Under 30	7
	30 – 39	4
	40 – 49	10
	Over 50	7
Totale		28

Tab.:2.1 – Soggetti divisi per classi di sesso ed età.

In seguito sono stati stabiliti i livelli medi di diossine e PCB circolanti in un campione di popolazione campana in relazione alle aree di residenza; sono state valutate le correlazioni tra diossine e PCB circolanti e variabili quali:

- genere (maschio/femmina),
- indice di massa corporea (BMI),
- livelli di biomarcatori.

Infine è stato verificato se la mobilizzazione del grasso in condizioni di regime alimentare controllato porti ad un aumento dei livelli di diossine e PCB circolanti.

3. Materiali e metodi

3.1 Popolazione e campionamento.

Tutti i soggetti coinvolti nel progetto sono volontari apparentemente sani che avevano vissuto nella zona di Napoli per più di un anno e nessuno di loro era

stato consapevolmente esposto, da un punto di vista professionale, a tali contaminanti.

I volontari hanno dato per iscritto il loro consenso informato a partecipare a studi di biomonitoraggio su sangue.

Inoltre sono stati intervistati ed è stato loro sottoposto un questionario allo scopo di valutare i seguenti aspetti, estremamente utili per la futura analisi dei risultati sperimentali:

- Registrazione dell'anamnesi familiare e personale, prossima e remota, atta a verificare l'assenza di gravi patologie nonché un'eventuale predisposizione ereditaria;
- Raccolta di informazioni sulla condotta alimentare e sull'attività fisica praticata su base settimanale;
- Tipologia di lavoro svolto, luogo e numero di ore, per assicurare la non esposizione professione a tali contaminanti.

In collaborazione con la Seconda Università degli Studi di Napoli, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Dipartimento di Fisiologia, ognuno dei partecipanti al progetto è stato sottoposto ad un'accurata visita medica allo scopo di evidenziare l'assenza di gravi patologie, confermata dall'esecuzione di analisi chimico-cliniche (tab. 3.1).

	Glicemia	Trigliceridi	Colesterolo totale	Colesterolo a bassa densità (LDL)	Colesterolo ad alta densità (HDL)
Media	88	96	194	116	59
Mediana	89	89	192	116	61
Max	119	183	289	186	95
Min	55	40	120	43	30

Tab. 3.1 – Risultati delle analisi clinico-chimiche.

Inoltre è stata effettuata una valutazione antropometrica ed un esame impedenziometrico per la determinazione della quantità di acqua presente nell'organismo (TBI = *Total Body Water*) e la sua distribuzione intracellulare

(ICW = *Intracellular Water*) ed extracellulare^[24,25]. Da questi valori è possibile ricavare la quantità di massa magra (FFM = *Fatty Free Mass*) o massa magra alipidica che rappresenta tutto ciò che resta dell'organismo dopo averlo privato di tutta la sua componente lipidica, compreso il grasso primario; dalla FFM, sottraendo il peso corporeo, otteniamo una stima della massa grassa (FM = *Fat Mass*).

I volontari sono stati sottoposti ad un prelievo venoso per la determinazione di diossine, PCB e dei marcatori metabolici. Da ognuno dei soggetti partecipanti allo studio è stato prelevato un campione di circa 60 ml di sangue mediante *Vacutainer* senza aggiunta di anticoagulanti; il campione è stato immediatamente trasferito in provette di vetro per centrifugazione.

Per ottenere il siero, il sangue prelevato è stato lasciato riposare a temperatura ambiente per circa 60'...75' min fino alla formazione di coaguli. Il campione è stato centrifugato a 1500g per 15' min, fino ad avvenuta separazione, ed il siero è stato prelevato mediante pipetta *Pasteur*; la parte di sangue coagulato non è stata utilizzata.

Il siero così ottenuto è stato suddiviso in due aliquote: la prima di circa 1ml, è stata impiegata per la determinazione dei livelli di tre *biomarkers* (leptina, adiponectina ed interleuchina, IL-6); la seconda di circa 15...30ml è stata utilizzata per la determinazione delle diossine e dei PCB. Le due aliquote sono state congelate alla temperatura di - 80 °C e trasferite al laboratorio di riferimento.

Molto importante è la determinazione dei tre *biomarker* in relazione all'esposizione a diossine e PCB ed in funzione del diverso BMI. Infatti il tessuto adiposo bianco, che rappresenta più del 10% del peso corporeo, è un tessuto che oltre ad avere una funzione di riserva energetica, ha anche un'intensa attività

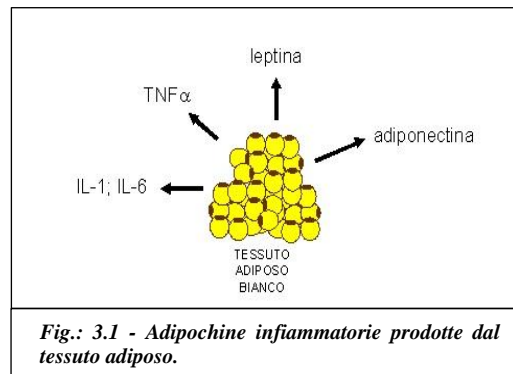


Fig.: 3.1 - Adipochine infiammatorie prodotte dal tessuto adiposo.

endocrina in grado di modulare la propria attività e quella di altri organi e tessuti quali quello muscolo scheletrico, fegato, sistema nervoso centrale, cellule β -pancreatiche, gonadi, organi linfatici ed apparato cardiovascolare. In particolare numerose molecole proinfiammatorie ed antiinfiammatorie, la cui produzione nel tessuto adiposo degli obesi appare sregolata, sembrano essere coinvolte nello sviluppo dell'insulino-resistenza e nell'aumento del rischio cardiovascolare associato all'obesità.

Esso infatti produce un gran numero di peptidi, le adipochine, che intervengono in una serie di attività endocrine, autocrine e paracrine; queste sono la leptina, l'adiponectina e l'interleuchina (IL-6).

Il ruolo primario della leptina è il controllo dell'appetito e la regolazione della funzione endocrina ipotalamica. Essa esercita anche azioni immunitarie ed infiammatorie. Protegge i linfociti T dal processo di apoptosi e regola la proliferazione a attivazione delle cellule T e la produzione di citochine, influenza inoltre l'attivazione di monociti, la fagocitosi. L'adiponectina modula alcuni processi metabolici, inclusa la regolazione del glucosio, e il catabolismo degli acidi grassi, e svolge azione anti-aterogena ed anti-infiammatoria, in particolare inibendo la produzione di IL-6. I suoi livelli sono inversamente correlati all'obesità ed all'insulino-resistenza. Il fattore di necrosi tumorale α (*Tumor Necrosis Factor α* , TNF α) e le interleuchine (IL-1 e IL-6) sono noti mediatori della risposta infiammatoria. Determinano cambiamenti metabolici, come iperlipidemia e aumento della gluconeogenesi,

destinati a rifornire il sistema immunitario dei necessari supporti energetici. L'espressione del $TNF\alpha$ è aumentata nel tessuto adiposo degli obesi. Esso riduce la sensibilità all'insulina sia in modo indiretto, stimolando la produzione degli ormoni dello stress, che in modo diretto diminuendo la fosforilazione del recettore dell'insulina (IRS-1) indotta dall'insulina. L'IL-6 ed il $TNF\alpha$ sono le citochine ad azione pro-infiammatoria meglio caratterizzate, i cui livelli risultano aumentati, sia nel siero, sia nel tessuto adiposo bianco degli obesi. L'aumento dell'IL-6 è correlato all'aumento delle proteine di fase acuta osservate nei soggetti obesi che rappresentano un *marker* dell'aumentato rischio cardiovascolare.

Successivamente i campioni sono stati analizzati per misurare la concentrazione di sette congeneri di PCDD, di dieci congeneri di PCDF cloro-sostituiti nelle posizioni 2,3,7,8, di otto DL-PCB mono-orto-sostituiti (105,114,118,123,156,157,167 e 189), di quattro DL-PCB non-orto-sostituiti (77,81,126 e 129) e di sei NDL-PCB (28,52,101,138,153 e 180).

3.2 Reagenti e standard.

Tutti i solventi utilizzati (toluene, n-esano, diclorometano e nonano) sono di elevata purezza, mentre le colonne multistrato silice, allumina e carbon preconfezionate (fig. 3.2) utilizzate nel sistema di purificazione Power Prep (fig. 3.3) sono state ottenute da Fluid Management System (Waltham, USA). Per l'analisi di PCDD e PCDF sono state utilizzate le soluzioni di standard di calibrazione (EPA-1613CVS) diluite 1/5 con n-nonano, uno standard interno (EPA-1613LCS) marcato con ^{13}C ed uno standard di iniezione (EPA-8280RS). Per l'analisi dei DL-PCB sono state utilizzate le soluzioni di standard di calibrazione (WP-CVS), uno standard interno (WP-LCS) marcato con ^{13}C ed uno standard di iniezione (P48-RS-STK). Per



l'analisi di ND-L-PCB sono state utilizzate le soluzioni di standard di calibrazione (P48-MCVS), uno standard interno (P48-M-ES) marcato con ^{13}C ed uno standard di iniezione (P48-RS-STK). Tutte le soluzioni sono state fornite da Wellington Laboratories (Toronto, Canada).



Fig.: 3.3 – Sistema di purificazione Power Prep

3.3 Metodo analitico.

Per determinare le concentrazioni di diossine e PCB è stato utilizzato il metodo della diluizione isotopica e le misurazioni sono state effettuate su due Trace Serie 2000 GC accoppiati ad un DFSTM High-Resolution Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry (HRGC/HRMS) (fig.3.4).

Il metodo utilizzato è un adattamento *in-house* del metodo EPA 1613.

I campioni di siero (10...40mL) sono stati scongelati a temperatura ambiente e ad essi è stata aggiunta una miscela di congeneri tutti marcati con ^{13}C , costituita da quindici PCDD/F, dodici DL-PCB e



Fig.: 3.4 – Trace Serie 2000 GC e DFSTM

sei ND-L-PCB. L'apporto di ogni congenere era di 0,1 ng per PCDD/F (tranne OCDD marcata sul ^{13}C che era di 0,2 ng) e 1,0 ng per tutti i PCB analizzati.

I campioni di siero sono stati sottoposti a denaturazione delle proteine aggiungendo etanolo (25 mL) ed una soluzione satura di solfato d'ammonio (25 mL). La soluzione così ottenuta è stata sottoposta ad estrazione liquido/liquido, mediante aggiunta di dietilere (25 mL) ed etere di petrolio (25 mL). Dopo agitazione, l'estratto organico è stato filtrato e anidrificato mediante passaggio su lana di vetro e solfato di sodio anidro; il filtrato è stato portato a secchezza in evaporatore rotante alla temperatura di 45 °C.

L'estratto ottenuto è stato solubilizzato in n-esano e poi purificato utilizzando, in sequenza, colonne cromatografiche di gel di silice, allumina neutra e carbone attivo mediante il sistema di purificazione semi-automatico Power Prep (System Management Fluid, Waltham (USA) (fig. 3.3).

I contaminanti sono stati così separati e raccolti in due frazioni, i PCB sono stati eluiti dalla colonna di allumina, mentre le diossine sono state eluite dalla colonna di carbone attivo. Ogni estratto finale è stato portato a secchezza in corrente di azoto ed immediatamente disciolto in 20 µL dello standard di iniezione. Come standard di iniezione per l'analisi dei PCB è stata utilizzata una miscela di composti costituita dai congeneri PCB 70, PCB 111 e PCB 170 ad una concentrazione di 50 ng/mL, mentre per l'analisi delle diossine è stata utilizzata una miscela di composti costituita dai congeneri 1,2,3,4-TCDD e 1,2,3,7,8,9-HxCDD ad una concentrazione di 10 ng/mL; la prima soluzione aggiunta serve per determinare il recupero degli isomeri tetra e penta PCDD/PCDF; l'altra soluzione è necessaria per determinare il recupero degli isomeri esa, epta ed octa PCDD/PCDF; tutti i congeneri sono marcati con ¹³C. Ad ogni lotto di campioni è stato associato un bianco di processo che è stato sottoposto allo stesso processo di estrazione.

3.4. Analisi HRGC/HRMS.

Le misurazioni sono state eseguite su due Trace Serie 2000 GC accoppiati ad un DFSTM *High-Resolution Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry* (HRGC/HRMS) (Thermo Fisher). Per l'analisi delle diossine la separazione gas-cromatografica è stata effettuata utilizzando una colonna DB-5 MS della lunghezza di 60 m, diametro interno di 0.25 mm, spessore del film di 0.10 µm, mentre per l'analisi dei PCB la separazione gas-cromatografica è stata effettuata utilizzando una colonna VF-5 MS della lunghezza di 60 m, diametro interno di 0.25 mm, spessore del film di 0.25 µm. Durante la determinazione dei congeneri viene mantenuta, in modalità SIM (*Select Ions Monitoring*) una risoluzione di massa dinamica pari a 10000.

La valutazione è basata sulla presenza di tutte le 7 PCDD e dei 10 congeneri PCDF con gli atomi di cloro nelle posizioni 2,3,7 ed 8 così come le seguenti DL-PCB: otto PCB mono-orto sostituite (105,114,118,123,156,157,167 e 189) e quattro PCB non-

orto sostituiti (77,81,126 e 169). Allo stesso modo sono stati determinati i sei NDL-PCB (28,52,101,138,153 e 180). Per ogni congenere sono state misurate due masse di isotopi.

Le determinazioni quantitative di PCDD/F e PCB sono state eseguite utilizzando standard interni e le concentrazioni di PCDD/F e DL-PCB sono state espresse in pgTEQ/g di lipidi (*Toxic Equivalent, TEQ*) utilizzando i fattori di tossicità equivalente (*Toxic Equivalency Factor, TEF* 1998) stabiliti dall' Organizzazione Mondiale della Sanità (*Van den Berg et al, 1998*), al fine di confrontare i risultati di questo studio con quelli riportati in letteratura^[26]. Per gli NDL-PCB le concentrazioni nel siero del sangue sono state espresse in ng/g di lipidi. Per i valori dei congeneri presenti in concentrazione inferiore al limite di rivelabilità (LOD, *Limit Of Detection*) i calcoli sono stati effettuati adottando un valore della concentrazione pari al corrispondente valore LOD; per determinare i valori sulla base del peso lipidico, il tenore totale di lipidi è stato determinato secondo la "formula Phillips"^[27,28] che utilizza le concentrazioni di colesterolo totale e dei trigliceridi.

4.Risultati.

In questo studio sono stati raccolti 51 campioni di siero di sangue da donatori volontari che vivono nella regione Campania (fig. 2.2); di questi 23 soggetti provenivano dalla cosiddetta "area a rischio" (costituita dai comuni di Acerra, Nola e Marigliano), mentre 28 soggetti erano residenti nella città di Napoli e nei suoi dintorni (Pompei, Portici, Pozzuoli, Sorrento e Torre del Greco), definita come area urbana o "area background".

La popolazione in studio era costituita da 23 donne (F) di età compresa tra 24 e 64 anni con un'età media di 41 anni, e 28 uomini (M) di età compresa tra i 18 ed 64 anni con un'età media di 40 anni. L'indice di massa corporea medio (BMI medio) era di 29 kg/m² sia per le donne che per gli uomini. Tuttavia nel gruppo dei maschi il numero di soggetti obesi (BMI > 30) era maggiore, n=14, rispetto al gruppo delle femmine, n=7, mentre il numero dei soggetti sovrappeso (25.0 < BMI < 29.9) era lo stesso in entrambi i gruppi (n=13). Infine il gruppo dei soggetti normopeso era costituito da 5 uomini e 6 donne. Nessun donatore svolgeva un lavoro che avrebbe potuto farlo considerare come potenzialmente sottoposto ad esposizione

professionale di diossine e PCB. L'analisi dei diari alimentari dei soggetti in esame ha mostrato che non esistono differenze sostanziali nello stile di vita o nelle abitudini alimentari; infatti tutti erano consumatori abituali dei prodotti lattiero-caseari (mozzarella, formaggi in genere ed altri formaggi tipici della regione Campania) con un consumo medio settimanale di tali prodotti di circa 400 g.

Tutti i campioni sono stati analizzati per determinare i livelli di PCDD/F, DL-PCB ed NDL-PCB. I risultati delle analisi chimiche per la determinazione di PCDD/F e PCB, sono riportati considerando per le tre classi di contaminanti solo il valore calcolato con l'approccio *Upper Bound* (UB). Il calcolo del WHO-TEQ è stato effettuato considerando i TEF 98 malgrado dal 2012 le normative comunitarie prevedano l'utilizzo dei TEF 2005 nelle attività di controllo ufficiale degli alimenti e dei mangimi, per un più agevole confronto con i dati pregressi.

In tabella 4.1 vengono riportati i valori di PCDD/F e PCB determinati, nella prima fase, sui soggetti di sesso femminile, ed in tabella 4.2 vengono riportati i valori di PCDD/F e PCB determinati, nella prima fase, sui soggetti di sesso maschile.

n	BMI	peso kg	trig (mg/dl)	col.tot (mg/dl)	Volume in mL di siero prelevato (ml)	Stima dei Lipidi Totali (Phillips et al. 1989) (mg/dl)	PCDD/F-WHO- TEQ98 (UB) (pg/g grasso)	DL-PCB-WHO- TEQ98 (UB) (pg/g grasso)	Somme PCB (ICES 6) (pg/g grasso)
1	25	69,8	156	198	15,4061	667,8	13,50	23,79	307285
3	27	60	101	224	18,8837	671,8	17,00	15,05	318233
4	24	66,2	40	147	22,9545	436,0	12,85	7,26	141380
6	23	64,9	78	138	30,5305	453,6	13,34	20,93	348065
11	36	93,3	88	224	24,2573	658,8	2,09	1,84	33704
13	26	64,6	124	289	33,7564	842,3	3,97	3,73	64660
15	24	64,6	132	180	31,9296	602,9	6,59	10,14	107845
16	22	61,8	41	184	31,6248	521,0	8,05	8,75	135119
18	26	65,9	67	238	30,0693	669,6	13,13	11,24	220477
19	25	69	55	150	19,4205	457,8	6,49	4,82	69597
21	26	66,9	62	217	34,5655	616,9	10,26	8,89	198286
26	28	75,9	54	172	15,7798	506,7	9,80	13,54	451483
27	24	62	63	184	24,9745	543,0	11,87	7,99	127216
28	42	123	75	168	26,6501	518,7	2,14	0,98	36251
30	32	94	49	180	19,3609	519,9	2,76	1,62	31657
32	28	70	50	183	37,7182	527,7	1,43	1,76	32253
33	35	100	91	236	17,1096	689,0	2,80	3,08	47513
41	26	69,5	90	213	12,4081	635,8	3,18	3,07	71640
42	27	69	110	226	24,7429	685,3	6,65	3,72	64842
43	39	94,4	95	199	25,1270	609,0	15,39	17,47	179737
44	28	69,9	96	206	17,8859	625,9	8,83	3,54	114546
46	25	69	76	225	11,4393	649,1	5,17	8,96	127720
50	40	99,8	170	233	31,1727	761,2	7,92	6,43	73198

Tab. 4.1–Valori PCDD/F, DL-PCB ed NDL-PCB (ICES 6) –Fase I – Soggetti femminili

n	età	BMI	peso kg	trig (mg/dl)	coll.tot (mg/dl)	Volume siero prelevato (ml)	Stime dei Lipidi Totali (Phillips et al. 1989) (mg/dl)	PCDD/F-WHO- TEQ98 (UB) (pg/g grasso)	DL-PCB-WHO- TEQ98 (UB) (pg/g grasso)	Somma PCB (ICES 6) (pg/g grasso)
2	58	29	88,7	154	204	22,0632	679,4	17,38	25,45	482899
5	34	23	71	128	194	23,9883	630,7	15,68	10,84	230750
7	52	29	84,8	49	180	21,2630	519,9	13,94	23,86	333245
8	43	30	91,4	151	219	35,8453	710,4	5,05	5,33	82055
9	47	25	76,6	143	185	27,5414	625,3	8,68	8,33	122478
10	30	29	99,6	123	180	14,7699	593,9	5,10	6,11	74874
12	52	31	103	129	238	10,4430	731,6	3,04	1,32	47100
16bis	57	37	110	136	141	25,5870	518,4	15,64	17,05	290006
17	43	32	91,1	155	206	21,2455	684,9	2,43	1,64	46622
20	59	32	92	72	191	32,6809	267,9	8,48	8,30	142508
22	47	33	112	107	199	24,4707	621,0	10,70	7,29	120908
23	15	27	97,5	70	153	15,2262	479,6	3,31	1,10	37662
24	19	22	69,8	56	120	29,3863	390,7	8,96	6,51	64455
25	23	25	84	62	131	10,1195	421,7	6,16	4,07	118960
29	24	23	81	54	138	23,3522	429,6	2,46	1,27	58238
31	43	26	76	163	190	24,4640	656,6	3,99	5,15	113278
34	40	22	63,5	76	232	17,1278	664,9	5,12	5,50	149836
35	40	29	90,1	134	245	21,7575	752,5	6,75	2,08	43885
36	31	29	84	64	259	12,4539	714,2	5,40	2,03	71633
37	30	25	76	49	218	15,0170	606,2	2,10	13,08	369332
38	44	33	106	83	163	19,8529	513,3	6,30	3,87	95705
39	28	24	70,7	48	185	11,4373	530,3	5,58	3,84	128865
40	27	36	129	183	190	7,0525	676,6	3,95	1,82	120854
45	29	30	100	126	209	17,8606	662,7	4,87	1,81	56471
47	47	25	75	54	141	19,5422	436,4	13,88	20,93	301093
48	53	28	81,7	121	192	14,5276	619,1	6,70	14,54	373840
49	56	30	82	108	234	14,5020	701,5	7,24	12,57	230573
51	48	33	98	42	154	25,6857	453,9	8,22	9,02	176687

Tab. 4.2–Valori PCDD/F, DL-PCB ed NDL-PCB (ICES 6) – Fase I – Soggetti maschili

Una sintesi dei risultati ottenuti, relativi alla prima fase del progetto, sono riportati nella tabella 4.3, che riassume le concentrazioni di PCDD/F, esprimendo i risultati in pg/g di grasso, per ciascuno di 17 congenere più tossici; viene inoltre riportato anche il livello del valore di TEQ totale per PCDD/F.

	Mean	Median	Min	Max
PCDDs				
2378-TCDD	0.77	0.68	0.01	2.60
12378-PeCDD	1.82	1.61	0.01	7.37
123478-HxCDD	0.76	0.34	0.01	3.50
123678-HxCDD	6.32	4.74	0.04	17.67
123789-HxCDD	1.12	0.46	0.02	11.81
1234678-HpCDD	9.53	6.98	0.34	54.34
OCDD	72.85	56.19	11.68	329.35
PCDFs				
2378-TCDF	1.43	0.85	0.01	17.42
12378-PeCDF	0.53	0.35	0.01	2.41
23478-PeCDF	6.90	6.63	1.79	14.34
123478-HxCDF	2.98	2.68	0.08	14.60
123678-HxCDF	3.01	2.74	0.01	9.54
234678-HxCDF	1.04	0.69	0.02	3.39
123789-HxCDF	0.26	0.05	0.01	2.43
1234678-HpCDF	4.33	3.24	0.01	26.76
1234789-HpCDF	0.48	0.05	0.01	3.84
OCDF	1.95	0.78	0.02	16.68
ΣPCDD/Fs	116.09	101.15	26.82	409.26
WHO-TEQ PCDD/F	7.91	7.00	1.43	17.38

Tab. 4.3 – Livelli di congeneri PCDD/F nel siero espressi in pg/g di lipidi e concentrazione totale di PCDD/F espressa come pg-TEQ/g di grasso.

La tabella 4.4 riassume le concentrazioni di PCB (DL-PCB ed NDL-PCB), esprimendo i risultati in pg/g di grasso, e viene inoltre riportato anche il livello del TEQ totale per i DL-PCB.

	Mean	Median	Min	Max
DL-PCB non-orto				
PCB-77	60.05	27.97	6.09	1137.68
PCB-81	2.23	1.76	0.01	13.88
PCB-126	29.87	21.74	0.05	124.00
PCB-169	28.59	25.00	0.01	94.25
DL-PCB mono-orto				
PCB-105	1635.50	1309.85	356.59	5547.75
PCB-114	509.88	430.63	69.56	1406.99
PCB-118	9000.11	7220.39	1086.81	29293.27
PCB-123	142.56	101.27	13.21	1087.29
PCB-156	5608.30	4414.45	822.51	15975.49
PCB-157	1219.82	1019.13	174.77	3826.70
PCB-167	2363.26	1747.89	444.08	8294.62
PCB-189	790.31	522.30	75.07	2623.25
ΣDL-PCB	21390.48	17679.82	4387.81	66831.94
WHO-TEQ DL-PCB	8.15	7.25	0.98	25.45
NDL-PCB				
PCB-28	4443.0	3539.1	804.7	14936.5
PCB-52	966.0	727.6	213.7	7332.0
PCB-101	3208.9	2048.6	622.3	49371.1
PCB-138	36886.1	28498.1	6678.6	117740.5
PCB-153	56310.2	42264.4	10097.6	195290.5
PCB-180	72811.2	43062.5	5629.1	1137680.0
ΣNDL-PCB	155098.0	124847.0	31656.8	482898.9

Tab. 4.4 – Livelli di congeneri PCB nel siero espressi in pg/g di lipidi e concentrazione totale di DL-PCB espressa come pg-TEQ/g di grasso.

I livelli ottenuti per PCDD/F ed i congeneri dei PCB, sono dati sia come media, sia come mediana, inoltre sono stati determinati anche i valori minimi e massimi. Infatti, dall'analisi statistica è emerso che i campioni non hanno mostrato una distribuzione gaussiana, ciò è da attribuirsi al fatto che tutti i tre tipi di contaminanti erano distribuiti in maniera fortemente asimmetrica. Pertanto nel caso di dati asimmetrici la media non è una buona misura di tendenza centrale, in quanto risulta essere influenzata soprattutto dai valori

outliers. In fig. 4.1 è riportata la distribuzione di frequenza dei tre diversi contaminanti.

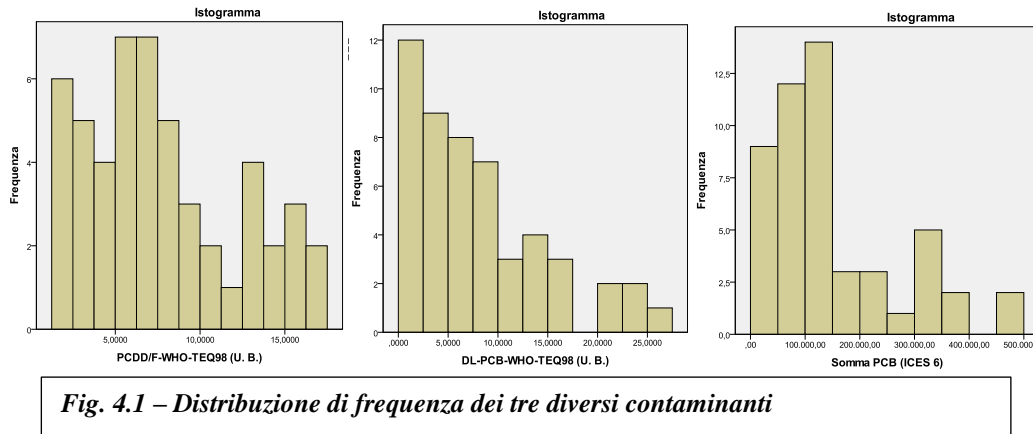


Fig. 4.1 – Distribuzione di frequenza dei tre diversi contaminanti

I dati dei soggetti appartenenti alle due aree e sono stati confrontati in funzione di sesso, età ed indice di massa corporea, al fine di evidenziare eventuali effetti della contaminazione ambientale sul carico corporeo. I livelli interni totali ottenuti per i soggetti residenti nell'area urbana spaziano da 1.43 pg-TEQ/g di grasso a 17.38 pg-TEQ/g di grasso per PCDD/F, da 1.32 pg-TEQ/g di grasso a 25.45 pg-TEQ/g di grasso per i DL-PCB e da 32.25 ng/g di grasso a 482.90 pg/g di grasso per gli NDL-PCB; mentre per i soggetti presenti nell'area a rischio i valori vanno da 2.14 pg-TEQ/g di grasso a 15.68 pg-TEQ/g di grasso per PCDD/F, da 0.98 pg-TEQ/g di grasso a 23.86 pg-TEQ/g di grasso per i DL-PCB e da 31.66 pg/g di grasso a 451.5 pg/g di grasso (tab. 4.5).

	Area Urbana				Area a rischio			
	<i>Mean</i>	<i>Median</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Mean</i>	<i>Median</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
PCDD/F	7.23	6.55	1.43	17.38	8.81	9.20	2.14	15.68
DL-PCB	8.00	6.11	1.32	25.45	8.34	7.41	0.98	23.86
NDL-PCB	151.32	122.48	32.25	482.90	159.88	127.22	31.66	451.48

Tab. 4.5 – Concentrazioni di PCDD/F, DL-PCB (pg-TEQ/g di grasso) ed NDL-PCB (ng/g di grasso) in campioni di siero umano delle due aree in Campania

La maggiore concentrazione di contaminanti viene rilevata nelle donne dell'area a rischio, mentre nell'area urbana (area *background*) i valori tra maschi e femmine sono prossimi tra di loro (tab. 4.6), mentre i valori delle

mediane di DL-PCB ed NDL-PCB totali per gli uomini residenti nell'area a rischio risultavano inferiori rispetto a quelli degli uomini residenti nell'area urbana.

	Area Urbana		Area a rischio	
	FEMMINE (N=13)	MASCHI (N=17)	FEMMINE (N=10)	MASCHI (N=11)
PCDD/F WHO –TEQ UB	6.65	5.58	10.03	8.48
DL-PCB WHO –TEQ UB	3.73	5.50	8.44	6.51
∑ NDL-PCB	73.20	122.48	134.30	118.96

Tab. 4.6 – Valori delle mediane per PCDD/F, DL-PCB (pg-TEQ/g di grasso) ed NDL-PCB (ng/g di grasso) in campioni di siero umano delle due aree in Campania, suddivisi per genere.

Tuttavia il confronto dei livelli di contaminanti tra i soggetti residenti nell'area urbana con quelli residenti nell'area a rischio, non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa.

Inoltre dai grafici si evince che l'area a rischio contiene la maggiore concentrazione di contaminanti, in quanto il *range* medio è sempre superiore a quello dell'altro gruppo; tuttavia i *p-values* del test risultano essere non significativi, per cui non sembrerebbe esserci una differenza sostanziale tra le due aree. Confrontando numericamente le mediane, in base al valore di BMI, il gruppo degli obesi sembrerebbe presentare i valori più bassi per tutte e tre le categorie di contaminanti (tab. 4.7). Suddividendo i soggetti in base all'età si è visto che nei soggetti più giovani si riscontra che le concentrazioni di contaminanti sono inferiori e tendono ad aumentare con l'aumentare dell'età. Questa differenza risulta essere statisticamente significativa nei soggetti dell'area a rischio per i valori di DL-PCB e per la somma degli NDL-PCB (tab. 4.8).

Allo scopo di individuare i valori atipici oltre che potrebbero ostacolare l'analisi statistica, sono stati utilizzati i grafici *box-plot* (fig. 4.2).

BMI	PCDD/F		DL-PCB		NDL-PCB	
	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana
<i>Normopeso</i>	8.93	8.05	8.21	7.26	147.56	131.56
<i>Sovrappeso</i>	8.22	6.73	9.61	8.61	186.11	120.72
<i>Obeso</i>	6.99	6.30	6.30	5.42	120.39	120.65
<i>Totale</i>	7.91	7.00	8.15	7.25	155.01	124.85

Tab. 4.7 – Concentrazione di PCDD/F, DL-PCB (pg-TEQ/g di grasso) ed NDL- PCB (ng/g di grasso) in campioni di siero umano suddivisi per BMI.

	PCDD/F		DL-PCB		NDL-PCB	
	Media	Mediana	Media	Mediana	Media	Mediana
<i>Femmine</i>						
<i>< 30</i>	8.11	7.17	6.11	6.03	95.06	81.48
<i>30 – 39</i>	4.53	2.80	4.68	3.08	66.26	47.51
<i>40 – 49</i>	7.87	8.83	8.65	7.99	181.06	127.22
<i>Over 50</i>	13.18	13.32	13.98	13.14	237.19	209.81
<i>Maschi</i>						
<i>< 30</i>	5.04	4.87	2.92	1.82	83.62	64.46
<i>30 – 39</i>	7.07	5.25	8.01	8.47	186.65	152.81
<i>40 – 49</i>	7.30	6.75	7.24	5.50	137.82	120.91
<i>Over 50</i>	10.04	8.59	12.65	11.06	241.80	224.19

Tab. 4.8 – Concentrazione di PCDD/F, DL-PCB (pg-TEQ/g di grasso) ed NDL- PCB (ng/g di grasso) in campioni di siero umano suddivisi per età e sesso.

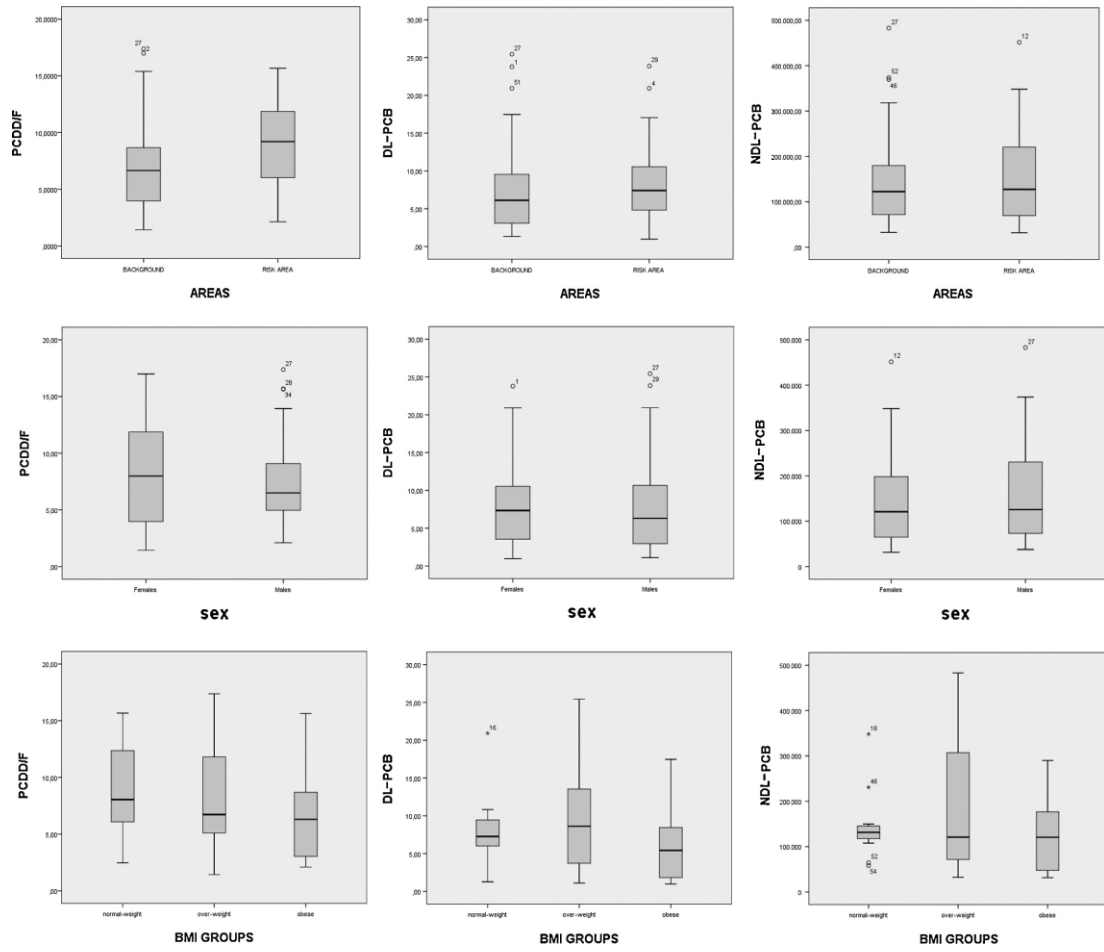


Fig. 4.2 – Box-plot dei valori delle mediane di PCDD/F, DL-PCB ed NDL-PCB suddivisi per area, sesso e BMI.

4.1 Studio della risposta di tre *biomarkers*.

Oltre alla determinazione delle diossine e dei PCB è stato effettuato lo studio della risposta dei tre *biomarkers*, leptina, adiponectina ed interleuchina (IL-6), in funzione del diverso BMI.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 4.9.

N	Sesso	Età	Peso (Kg)	BMI	Leptina (pg/mL siero) LOD 43.76 pg/mL	IL-6 (pg/mL siero) LOD 7.8 pg/mL	Adiponectina (ng/mL siero) LOD 0.73 pg/mL	N	Sesso	Età	Peso (Kg)	BMI	Leptina (pg/mL siero) LOD 43.76 pg/mL	IL-6 (pg/mL siero) LOD 7.8 pg/mL	Adiponectina (ng/mL siero) LOD 0.73 pg/mL
normopeso								normopeso							
18	F	35	61.3	22	3070	7.8	3874	24	M	19	69.8	26	402	34.1	4333
6	F	49	64.9	23	4106	7.8	1543	34	M	40	63.5	22	221	7.8	9662
4	F	28	66.2	24	4288	7.8	8293	6	M	34	71	23	23.83	7.8	6824
16	F	36	64.6	24	4607	13.62	6236	29	M	24	81	23	15.23	7.8	10772
27	F	44	62	24	4072	11.01	15707	39	M	23	70.7	24	2.64	7.8	8974
soprappeso								soprappeso							
1	F	55	69.8	26	3104	7.8	9292	9	M	47	76.6	26	17153	7.8	10665
19	F	26	69	26	3925	7.8	10079	26	M	23	84	26	2596	7.8	18253
48	F	44	69	26	3441	12.8	10208	37	M	30	76	26	1291	7.8	9774
13	F	47	64.6	26	9691	33.2	9092	47	M	47	75	26	1067	7.8	7047
18	F	57	66.9	26	3614	7.8	12935	31	M	43	76	26	350	7.8	5002
21	F	52	66.9	26	3225	7.8	14180	23	M	15	97.5	27	3787	93.03	5619
41	F	24	69.5	26	3173	36.4	22900	48	M	53	81.7	28	2353	7.8	5132
3	F	59	60	27	3610	7.8	11524	2	M	58	88.7	29	609	7.8	4303
42	F	25	69	27	9745	7.8	12582	7	M	52	84.8	29	3610	24.75	7047
28	F	40	75.9	28	1853	7.8	24839	10	M	30	99.6	29	3813	7.8	9409
32	F	34	70	28	11731	43.5	8927	36	M	40	90.1	29	2042	7.8	8387
44	F	48	69.9	28	3493	7.8	11407	38	M	31	84	29	1490	23.74	9669
obesi								obesi							
30	F	33	94	32	5902	7.8	7870	8	M	43	91.4	30	5142	7.8	5802
33	F	35	100.1	36	11722	7.8	10913	46	M	29	100	30	1568	7.8	3169
11	F	43	93.3	36	10054	14.04	9339	49	M	56	82	30	1291	7.8	15015
43	F	64	94.4	39	24666	7.8	13793	12	M	52	102.9	31	3493	14.45	9997
50	F	35	99.3	40	21721	7.8	6666	17	M	43	91.1	32	5605	7.8	7470
23	F	31	123	42	11173	7.8	4662	20	M	59	92	32	2215	15.8	10890
								22	M	47	112.2	33	3662	30.41	4203
								38	M	44	105.8	33	5747	21.32	4932
MIN (BMI < 24.9)					3070	7.8	3874	40	M	27	129.2	36	7146	7.8	4286
MAX					4607	14	16707	16	M	57	109.8	37	3251	7.8	3475
MIN (25 < BMI 29.9)					1853	7.8	8927	51	M	48	98	33	4331	7.8	7668
MAX					11731	43.5	24839								
MIN (BMI > 30)					5902	7.8	4662								
MAX					24666	14	13793	MIN (BMI < 24.9)					221	7.8	4333
								MAX					2863	34.1	10772
								MIN (25 < BMI 29.9)					350	7.8	4303
								MAX					17153	93	18258
								MIN (BMI > 30)					1291	7.8	3169
								MAX					7145	158	15015

Tab. 4.9 - Valori di leptina, IL-6 e adiponectina (biomarkers) determinati nella I fase

I livelli plasmatici di leptina sono dovuti principalmente alla quantità di adipociti, che aumentando in numero e in volume per accumulo di trigliceridi, incrementano la secrezione di leptina. Questa a sua volta agisce a livello ipotalamico nella regolazione dell'appetito. Gli obesi, infatti, hanno valori più alti e significativamente diversi da quelli riscontrati nei soggetti normopeso e soprappeso (*p-value* 0.0104 nelle donne e 0.077 negli uomini), comunque maggiori nelle donne (14208 vs 3931 pg/ml) (fig. 4.3).

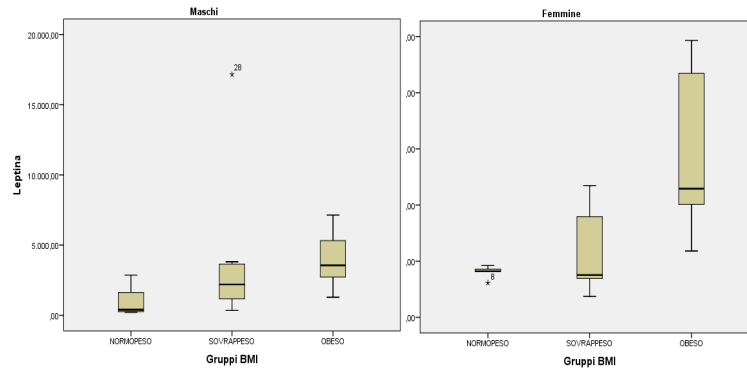


Fig. 4.3 – Livelli di leptina in funzione di sesso e BMI

L'adiponectina, risulta essere significativamente maggiore nelle donne rispetto agli uomini (11376 vs 7759 ng/ml), sebbene, suddividendo la popolazione per genere e per stato di salute, non mostri valori statisticamente differenti.

I valori medi all'interno dei due gruppi femminile e maschile sono stati rilevati superiori tra la popolazione di soggetti sovrappeso (fig. 4.4).

Inoltre nelle donne in sovrappeso i valori della leptina aumentano mentre quelli dell'adiponectina diminuiscono. Anche negli uomini all'aumentare del peso aumenta la leptina e diminuisce l'adiponectina.

Tuttavia in questo studio i livelli medi di leptina sono risultati maggiori nelle donne che negli uomini con una differenza significativa, confermando dati di letteratura che attribuiscono questa circostanza al fatto che nella donna è maggiore il grasso viscerale deputato alla secrezione dell'ormone.

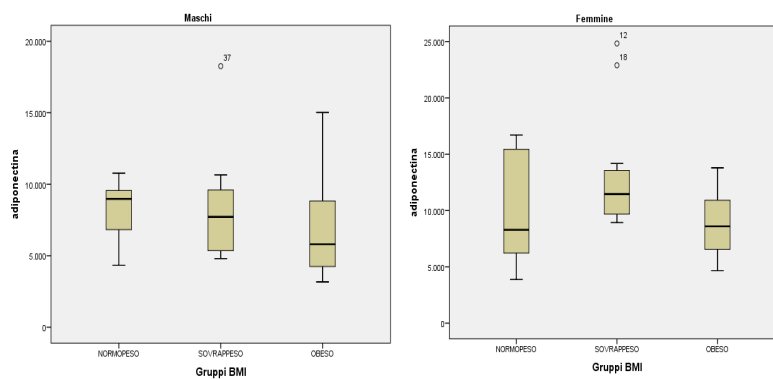


Fig. 4.4 – Livelli di adiponectina in funzione di sesso e BMI.

Per quanto riguarda l'adiponectina si rileva che i valori superiori si riscontrano all'interno del gruppo maschile degli obesi, mentre nelle donne accade che i valori più elevati si riscontrano nel gruppo delle normopeso. Tuttavia questa differenza non è statisticamente significativa.

Pertanto si è visto che il peso in ingresso risulta direttamente correlato con la leptina, mentre è negativamente correlato con l'adiponectina. Gli obesi presentano valori più alti e significativamente diversi da quelli riscontrati nei soggetti normopeso e sovrappeso (*p-value* 0.0104 nelle donne e 0.077 negli uomini), comunque valori maggiori nelle donne (14208 vs 3931 pg/ml). Le correlazioni con l'interleuchina (IL-6) non sono state prese in considerazione poiché il numero delle determinazioni al di sopra del LOD (2%) è molto basso.

Negli obesi, donne ed uomini, il livello di leptina è significativamente più alto che negli altri due gruppi ed inoltre l'analisi di regressione lineare mostra nelle donne la correlazione positiva tra livelli di PCDD/F, DL-PCB ed NDL-PCB e livelli di leptina. Pertanto possiamo affermare che all'aumento di contaminanti corrisponde un aumento di leptina.

Questo farebbe supporre un possibile effetto dei PCDD/F, DL-PCB ed NDL-PCB sugli adipociti nei quali si accumulano, promuovendo la produzione di leptina.

La leptina risulta essere correlata negativamente con la somma dei PCB, e l'interleuchina (IL-6) è inversamente correlata coi valori di PCDD/F, mentre tra leptina e la somma dei PCB si rileva una lieve correlazione negativa.

Nelle donne in sovrappeso gli NDL-PCB sono direttamente correlati all'adiponectina, mentre negli uomini l'unica associazione tra contaminanti ed ormoni si ritrova nel gruppo dei normopeso per i quali PCDD/F hanno una correlazione inversa con l'adiponectina.

Pertanto i risultati del presente studio hanno dimostrato, in particolar modo sulla popolazione femminile, che quando il BMI comincia ad aumentare e quindi si è in una situazione di sovrappeso, i contaminanti in studio,

maggiormente gli NDL-PCB, hanno una correlazione inversa con la leptina, mentre raggiungendo valori più elevati ($BMI > 30$) tutte e tre le classi di contaminanti sono correlate con la leptina in maniera diretta.

La leptina sovrintende nel tempo breve al meccanismo di regolazione dell'appetito e della spesa energetica, ma l'effetto dei contaminanti in studio è un effetto a lungo termine per un'esposizione a basse dosi e prolungata nel tempo attraverso l'ingestione di alimenti e per esposizione continua dovuto al bioaccumulo.

In questa condizione espositiva l'omeostasi della leptina può essere perturbata e, innescando il fenomeno della leptino-resistenza, dar luogo a obesità.

Si può ipotizzare quindi, che quando si determina una condizione di sbilanciamento tra massa grassa e spesa energetica i contaminanti presenti nell'organismo possano contribuire all'accumulo di grassi deprimendo la produzione di leptina, che ha come conseguenza la produzione di adipociti e l'attivazione dei centri della fame, quindi stimolando la necessità di ingestione di cibo.

Questo circuito determina ulteriore aumento di peso: nello stato di obesità i contaminanti sono direttamente associati alla produzione di leptina, che però a questo stadio sembra aver perso la sua caratteristica di inibizione dei centri della fame e lo stimolo della spesa energetica.

4.2 Seconda fase.

A distanza di un periodo di tempo di 15...18 mesi dal primo prelievo e quindi dall'inizio di un regime alimentare tale da promuovere la mobilizzazione delle riserve di grasso dal tessuto adiposo, si è dato il via alla Fase II.

In questa fase tuttavia sono emersi alcuni problemi dovuti in primo luogo alla difficoltà di convincere i pazienti a sottoporsi ad un regime alimentare controllato ed a ridotto apporto di calorie e soprattutto di tenere sotto controllo il regime alimentare adottato, non trattandosi di pazienti ospedalizzati. Non trascurabile, inoltre, è stato l'aspetto psicologico dovuto alla necessità di

sottoporsi ad un nuovo prelievo venoso di sangue tale da assicurare almeno 25...30mL di siero.

Per questi motivi, dei 51 soggetti campionati nella prima fase del progetto soltanto 25 hanno deciso di seguire una dieta e si sono sottoposti ad un secondo prelievo.

Dei 25 soggetti che si sono sottoposti alla terapia dietetica: 18 hanno subito un calo di peso, 2 non hanno subito alcuna variazione di peso. Tra il primo ed il secondo prelievo, il peso medio è passato da 80 Kg a 76 Kg. Tra i due prelievi il numero degli obesi è passato da 7 a 5, ed i sovrappeso sono rimasti invariati, mentre i normopeso sono aumentati da 6 a 7. La maggior parte ha subito un decremento di peso dai 2 kg ai 3 kg, mentre un solo soggetto ha incrementato il peso di 1 kg. Pertanto non sono state osservate variazioni di peso tali da far presumere una forte riduzione della massa magra.

In tabella 4.10 sono riportati i risultati analitici delle concentrazioni dei contaminanti relativi a tutti i soggetti che si sono sottoposti al prelievo sia nella Fase I, sia nella Fase II.

Soggetti	Peso ingresso	Peso uscita	Variazione di peso kg	Variazione BMI	Differenza * PCDDF	Differenza * dl-PCB	Differenza * SommaPCB
1	70	68	2	0	7,38	9,55	100.127,12
2	89			1	12,84	11,71	296.967,69
3	60	57	3	2	8,93	5,21	46.578,06
4	66	64	2	1	7,42	3,43	77.851,66
5	71	69	2	1	6,42	5,82	102.107,98
6	65	63	2	1	6,12	13,31	179.284,13
7	85			0	3,53	7,28	32.682,79
9	77			1	5,64	4,53	42.794,22
10	100	96	4	1	-1,56	-3,01	-48.163,45
13	65			0	-5,24	-6,8	-98.848,39
15	65	66	-1	-1	-15,48	-20,59	-354.108,78
16	62	57	5	2	-8,32	-7,64	-183.513,69
16bis	110	104	6	2	5,77	5,56	58.734,33
20	92	85	7	3	-2,98	-3,77	-126.062,31
21	67	66	1	0	1,45	0,78	-22.208,83
22	112	108	4	1	-1,95	-3,71	-72.269,70
26	76	73	3	1	0,56	7,07	328.378,25
30	94	89	5	2	-0,84	-1,04	-13.946,05
31	76	76	0	1	-0,55	0,31	26.163,05
32	70	62	8	4	-3,76	-4,21	-43.971,23
33	100	94	6	2	-2	-2,08	-12.562,97
39	71	65	6	2	-3,73	-1,33	29.795,90
43	94				0,36	0,68	-34.670,96
44	70	63	7	3	-0,34	-4,48	-44.316,66
50	100	91	9	4	2,6	-1,22	-50.036,11

*la differenza è stata calcolata sottraendo ai valori del primo prelievo quelli del secondo

Tab. 4.10 – Differenza della concentrazione dei contaminanti tra la Fase I e la Fase II

Considerando nella Fase I solo i soggetti che hanno completato anche la Fase II, i risultati ottenuti sono riportati in tabella 4.11.

	Primo prelievo N=25					Secondo prelievo N=25				
	Media	Mediana	Minimo	Massimo	SD	Media	Mediana	Minimo	Massimo	SD
PCDDF	9,59	8,83	1,43	17,38	4,82	8,70	8,81	3,04	22,07	4,39
PCBdl	10,49	8,33	1,62	25,45	7,24	9,87	8,11	2,66	30,73	6,04
Somma ICES6	183.642,74	135.119,32	31.656,80	482.898,90	127.897,85	174.971,30	163.508,13	45.602,85	461.953,97	97.994,75

Tab. 4.11 – Concentrazione dei contaminanti tra la Fase I e la Fase II

Tra il primo ed il secondo prelievo, in entrambe le aree considerate, i valori mediani dei contaminanti sono diminuiti, anche se non si rileva una differenza statisticamente significativa. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4.12 dove sono indicati i valori di PCDD/F e DL-PCB (in pg/g di grasso) e gli NDL-PCB (ICES6 – in ng/g di grasso), suddivisi per prelievo (Fase I e Fase II) e per area geografica (area urbana o *background* ed area a rischio o *risk area*)

	PCDDF					dl-PCB					Somma (ICES 6)				
	Media	Mediana	Max	Min	SD	Media	Mediana	Max	Min	SD	Media	Mediana	Max	Min	SD
BACKGROUND primo prelievo	8,89	8,05	17,38	1,43	5,36	9,79	6,43	25,45	1,76	8,05	160.127,64	122.477,86	482.898,90	32.252,69	132.063,63
secondo prelievo	7,91	6,66	16,37	3,04	3,99	9,72	9,12	16,79	3,80	4,38	160.113,83	158.862,19	318.633,01	60.075,68	78.201,55
RISK AREA primo prelievo	10,34	10,48	15,68	2,76	4,27	11,24	9,52	23,86	1,62	6,53	209.117,43	170.396,69	451.482,72	31.656,80	123.701,62
secondo prelievo	9,55	9,25	22,07	3,60	4,81	10,04	7,86	30,73	2,66	7,66	191.066,88	180.979,50	461.953,97	45.602,85	117.204,95

Tab. 4.12 – Valori mediani dei contaminanti tra la Fase I e la Fase II

Considerando soltanto le persone il cui BMI è diminuito di almeno 2 punti, si evince che circa la metà dei soggetti esaminati, dopo la dieta, riporta livelli superiori di contaminanti rispetto al primo prelievo.

Un soggetto dopo terapia dietetica ha registrato il maggior aumento di tutti e tre i tipi di contaminanti (PCDD/F aumento di 15.48 punti, DL-PCB aumento di 20.59 punti, somma PCB aumento di 354.109); questo è anche il soggetto che ha subito un incremento di peso durante la terapia dietetica.

Per quanto riguarda gli effetti in seguito al regime di dieta, la fase II sebbene non abbia dato luogo ad una variazione significativa ed univoca dei livelli ematici dei contaminanti, ne ha comunque indicato una variazione ed evidenziato anche un cambiamento nei valori di leptina ed adiponectina che possono essere ritenuti come indicatori precoci di cambiamenti metabolici.

5. Conclusioni

Questo progetto ha permesso di determinare i livelli medi di contaminazione da diossine e composti diossino-simili di una popolazione di individui residenti in Campania, in due aree di elevato interesse ambientale e sanitario.

Dall'analisi dei risultati è emerso che i valori medi di PCDD/F, dl-PCB e PCB non diossina simili (PCB ICES) sono sensibilmente inferiori a quelli riportati in letteratura scientifica per altre popolazioni residenti in Italia^[29] e nel resto d'Europa, ad eccezione della Grecia^[30,31]. Non esistono differenze significative nelle due aree individuate nella regione, soprattutto in considerazione dell'elevato livello di attenzione per quello che è stato definito "il triangolo della morte" corrispondente alla zona di Acerra, per cui l'apporto all'uomo sembra derivare esclusivamente dal regime alimentare^[32].

Tali dati suggeriscono che queste sostanze chimiche inquinanti, che negli ultimi anni hanno provocato allarme nel settore lattiero-caseario, non hanno un impatto significativo sulla salute pubblica nella zona di studio. I risultati dell'ultimo programma di controllo ufficiale ha mostrato che i livelli di PCDD/F e PCB nel latte, proveniente da varie specie animali era diminuito, indice di una minore contaminazione ambientale.

I bassi livelli di questi contaminanti trovati in questa zona potrebbero essere principalmente spiegati dall'assenza di impianti industriali ed altre fonti riconosciute di PCDD/F e PCB.

Esiste una differenza significativa con l'età ma non è stato considerato il cambiamento nella distribuzione ambientale dei contaminanti i livelli di PCDD/F, DL-PCB e NDL-PCB misurati nelle donne e negli uomini non

risultano statisticamente differenti, sebbene nelle donne i livelli di PCDD/F e DL-PCB siano maggiori e con variabilità più ampia. Considerando la suddivisione della popolazione in relazione al BMI, si nota che le donne obese presentano livelli ematici di contaminanti più bassi. Questa osservazione fa supporre che, a parità di tipologia alimentare tra i gruppi, nelle donne l'aumentata massa grassa nella condizione di obesità funzioni da sistema di cattura dei contaminanti circolanti ma con differenze metaboliche legate al genere.

Obiettivo dello studio è stato anche quello di determinare eventuali variazioni nei livelli di questi contaminanti cercando di promuovere la loro mobilizzazione attraverso una dieta con conseguente lipolisi e immissione nel torrente ematico delle sostanze ivi accumulate.

Lo studio nel suo complesso ha dato indicazioni importanti sul possibile effetto dell'esposizione ad Interferenti Endocrini persistenti sulla secrezione di ormoni del tessuto adiposo implicati nella regolazione di processi metabolici, infiammatori e, per quanto riguarda la leptina, anche riproduttivi e dell'accrescimento.

In letteratura non ci sono studi di popolazione che mettono in relazione i livelli di esposizione della popolazione di PCDD/F DL-PCB e NDL-PCB in relazione alla risposta di adipochine e allo stato di salute riguardante l'obesità. Negli obesi, donne e uomini, il livello di leptina è significativamente più alto che negli altri due gruppi e inoltre l'analisi di regressione lineare mostra nelle donne la correlazione positiva tra livelli di PCDD/F, DL-PCB e NDL-PCB e leptina perciò alla diminuzione di contaminati corrisponde l'aumento di leptina. Questo farebbe supporre un possibile effetto dei PCDD/F, DL-PCB e NDL-PCB sugli adipociti nei quali si accumulano, promuovendo la produzione di leptina. Questa osservazione è supportata da risultati ottenuti in studi in vitro sugli adipociti 3T3-L1^[33]. La correlazione significativa tra PCDD/F DL-PCB e NDL-PCB e leptina e adiponectina suggerisce una

possibile azione dei composti sull'equilibrio ormonale che può indurre patologie metaboliche.

Anche se questo studio ha interessato un numero limitato di soggetti, quest'indagine mette in evidenza la rilevanza di indagare sull'esposizione umana al fine di valutare l'impatto della contaminazione ambientale, tenendo conto le determinanti della popolazione, ma indica anche che è necessario quantificare nuovamente i livelli di questi inquinanti in un futuro non molto lontano, al fine di valutare il possibile impatto della contaminazione da PCDD/F e PCB sulla salute umana.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Environmental Health Criteria 210 –Principles for the Assessment of Risk to Human Health from Exposure to Chemicals. World Health organization, Genevre,1999
2. Environmental Health Criteria 239 –Principles for Modeling Dose-Response for the Risk Assessment of Chemicals. World Health organization, Genève, 2009.
3. United Nations Environmental Programme. Conference of plenipotentiaries on the Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs) – Stockholm 22-23 May 2001.
4. The 1998 Aarhus Protocol on persistent organic pollutants (POPs) – UNECE 1998.
5. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: <http://monographs.iarc.fr>
6. Abelson PH. Chlorinated dioxins. Science 1983; 220: 1337
7. USEPA, “Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Related Compounds”, 2000 Washington (DC): National Center for Environmental Assessment, US Environmental Protection Agency.
8. EC, 2006. European Commission recommendation on the monitoring of background levels of dioxins, dioxinlike PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs.
http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm
9. Safe S., “Development validation and limitations of toxic equivalency factors”, Chemosphere, 1992, 25, 61-64.
10. Ahlborg U.G., Becking G.C., Birnbaum L.S., Brouwer A., Derks H.J.G.M. Feely M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen J.C., Liem A.K.D., Safe S.H., Schlatter C., Wern F., Younes M., Yrjanheikki E., “Toxic

- equivalency factors for dioxin-like PCBs”, *Chemosphere* 1994, 28, 1049-1067.
11. Kodavanti P.R., Ward T.R., Derr-Yellin E.C., Mundy W.R., Casey A.C., Bush B., Tilson H.A., “Congener-specific distribution of polychlorinated biphenyls in brain regions, blood, liver, and fat of adult rats following repeated exposure to Aroclor 1254”, *Toxicol. Appl. Pharm.* 1998, 153, 199-210
 12. WHO, “PCDD/Fs and Their Effects on Human Health” Fact sheet No: 225. Geneva: World Health Organization 1999.
 13. WHO (1993). World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series no. 837. World health Organization, Geneva.
 14. WHO (1997). World Health Organization and International Agency for research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated dibenzofurans. Vol. 69
 15. WHO (2000). World Health Organization, European Centre for Environment and Health. Interlaboratory quality assessment of levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in human milk and plasma; fourth round of a WHO-coordinated study. WHO European Centre for Environment and Health, Bilthoven, The Netherlands.
 16. Zook DR, Rappe C. 1994, Environmental sources, distribution, and fate of polychlorinated dibenzodioxins, dibenzofurans, and related organochlorines. In: Schechter A, ed. *Dioxins and health*. New York: Plenum Press)
 17. Furst P, Beck H, Theelen RMC. Assessment of human intake of PCDDs and PCDFs from different environmental sources. *Toxic Substance Journal*. 1992.

18. EC, 2001. European Commission, Scientific Committee on Food. Opinion on the Risk Assessment of Dioxins and Dioxin-like PCBs in food. 22 November 2000. Brussels
19. Fries G.F., "A review of the significance of animal food products as potential pathways of human exposure to dioxins", *J. Anim. Sci.*, 1995, 73, 1639-1650.
20. Irigaray P, Newby JA, Lacomme S, Belpomme D. – Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. *Biomed Pharmacother* 61: 665-678
21. J.L. Tang-Péronard, H.R. Andersen, T.K. Jensen, B.L. Heitmann. – Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans.
22. Esposito M., Serpe F.P., Diletti., G., Messina G., Scortichini G., La Rocca C., Baldi L., Amorena M., Monda M., "Serum levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in a population living in the Naples area, southern Italy", *Chemosphere*, 2014, 94, 62-69.
23. EPA Method 1613 Rev. B, 1994, "Tetra-through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS".
24. Owens S., Litaker M., Allison J, Riggs S, Ferguson M, Gutin B, "Prediction of Visceral Adipose Tissue from Simple Anthropometric Measurements in Youths with Obesity", *Obes Res.* 1999, 7, 16-22
25. Wells J.C.K., M.S. Fewtrell, "Measuring body composition" *Arch Dis Child.*, 2006,91, 612-617.
26. Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X., Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T., "Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife", *Environ Health Perspect.* 1998 , 106, 775-792.

27. Phillips D.L., Pirkle J.L., Burse V.W., Bernert J.T., Jr, Henderson L.O., Needham L.L., "Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding", *Arch Environ Contam Toxicol.* 1989, 18, 495-500.
28. Bernert J.T., Turner W.E., Patterson D.G., Jr, Needham L.L., "Calculation of serum total lipid concentrations for the adjustment
29. Abballe A., Barbieri P.G., di Domenico, A., Garattini S., Iacovella N., Ingelido A.M., Marra V., Miniero R., Valentini S., De Felip, E., "Occupational exposure to PCDDs, PCDFs, and PCBs of metallurgical workers in some industrial plants of the Brescia area, northern Italy. *Chemosphere*", *Chemosphere* 2013, 90, 49-56.
30. Costopoulou D., Vassiliadou I., Papadopoulos A., Makropoulos V., Leondiadis L., "Levels of dioxins, furans and PCBs in human serum and milk of people living in Greece", *Chemosphere* 2006, 65, 1462-1469.
31. Gonzalez C.A., Kogevinas M., Huici A., Gadea E., Ladona M., Bosch A., Bleda M.J., "Blood levels of polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in the general population of a Spanish Mediterranean city". *Chemosphere* 1998, 36, 419-426.
32. Fiorito F., Serpe F.P, Maglio P., Messina G., Monda M., Esposito M., "Study on serum concentrations of PCDD/F and DL-PCB in overweight women subjected to dietary restriction". 36th International Symposium on Halogenated Organics Pollutants. Dioxin 2016 Firenze.
33. Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, Swanson H, Cassis LA.- Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis.- *Environ Health Perspect.* 2008.