

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dottorato di Ricerca in

Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro - Alimentari

XX ciclo

Tesi di Dottorato

**STUDIO SULLA CONTAMINAZIONE DA POLICLORO BIFENILI NON
DIOSSINA SIMILI (NDL-PCB) E DA IDROCARBURI POLICICLICI
AROMATICI (IPA) IN LATTE E MOZZARELLA DI BUFALA PRODOTTI
NELLA REGIONE CAMPANIA.**

TUTORE

Prof.ssa Renata Amodio Cocchieri

COORDINATORE

Prof. Salvatore Spagna Musso

DOTTORANDA

Dott.ssa Viviana Viscardi

Ai miei genitori ed a mio fratello Rosario...

grazie a loro ed al loro sostegno ho potuto raggiungere i traguardi più importanti della mia vita.

NON IMPORTA CHE TU SIA UN GRANDE ALBERO CHE SVETTA IN CIMA A UNA MONTAGNA O UN FILO D'ERBA SEPOLTO NELLA VALLE. CIO' CHE IMPORTA E' CHE QUALUNQUE COSA TU SIA, TU SIA IL MEGLIO DI QUELLO CHE SEI.

Martin Luther King

A mio marito Gianfranco...

il mio presente, il mio futuro.

INDICE:

INTRODUZIONE.....	pag. 5
1. POLICLORO BIFENILI (PCB).....	pag. 7
1.1. LA CHIMICA DEI PCB.....	pag. 10
1.2. FORMAZIONE DEI PCB.....	pag. 13
1.3. ASPETTI CHIMICO-FISICI.....	pag. 14
1.4. PCB NELL'AMBIENTE.....	pag. 14
1.5. TOSSICITÀ DEI PCB.....	pag. 15
2. GLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA).....	pag. 19
2.1. LA CHIMICA DEGLI IPA.....	pag. 20
2. 2. GLI IPA NELL'AMBIENTE.....	pag. 24
2.3. TOSSICITA' DEGLI IPA.....	pag. 27
3. I CONTAMINANTI E GLI ALIMENTI.....	pag. 32
4. CENNI DI NORMATIVA SULLA PRESENZA DEI CONTAMINANTI NEGLI ALIMENTI.....	pag. 35
5. IL SETTORE DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI.....	pag. 41
6. OBIETTIVO DELLA TESI.....	pag. 43
7. MATERIALI E METODI.....	pag. 44
7.1. CAMPIONAMENTO.....	pag. 44
7.2. ALLESTIMENTO DEI CAMPIONI ANALITICI.....	pag. 45
7.3. RICERCA E DOSAGGIO DEI PCB.....	pag. 46

7.4. RICERCA E DOSAGGIO DEGLI IPA.....	pag. 48
8. RISULTATI.....	pag. 50
8.1. PCB.....	pag. 50
8.2. IPA.....	pag. 63
9. CONCLUSIONI.....	pag. 71
10. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 74

INTRODUZIONE

L'attenzione di Organismi Internazionali, come OMS e FAO, rivolta da tempo agli effetti degli Inquinanti Organici Persistenti (POPs) sull'ambiente e sulla salute umana, ha indotto la promozione di azioni internazionali per ridurre l'immissione di tali contaminanti negli ecosistemi. Nel 1996 il comitato scientifico dell' International Federation of Classification Society (IFCS) ha richiesto la messa al bando internazionale di dodici POPs, nel maggio del 2001, a Stoccolma, 92 Paesi hanno firmato l'omonima Convenzione, adottando un testo che prevede misure di controllo, restrizioni alla produzione, all'uso e la successiva eliminazione di una prima lista di sostanze o classi di sostanze tossiche, tra le quali insetticidi clorurati di prima generazione (dieldrin, DDT, toxafene, clordano), prodotti e sottoprodotti chimici industriali (PCB, PCDD e PCDF). E' stato, inoltre, stabilito l'obbligo generale di adottare misure atte a prevenire la produzione e l'uso di nuovi composti che possano avere caratteristiche chimico-fisiche e di tossicità simili a quelle dei composti messi a bando (UNEP, 2001).

Caratteristiche comuni ai POPs sono elevata stabilità e scarsa reattività con altre molecole organiche, proprietà che fanno sì che, quando questi composti vengono liberati nell'ambiente, sia estremamente difficile la loro degradazione. Pertanto i POPs, o loro metaboliti, vengono accumulati nei comparti biotici e abiotici degli ecosistemi; sono stati, infatti, individuati nella maggior parte delle matrici ambientali analizzate, come sedimenti ed aria e pressochè in qualsiasi tipologia di organismo terrestre ed acquatico, compreso l'uomo (Armitage et al., 2007).

Tramite i movimenti delle masse di acqua ed aria, i POPs sono stati trasportati anche in regioni del pianeta dove non erano mai stati utilizzati. Le elevate concentrazioni rilevate nei pesci del mar Artico (Muir et al., 1992) e nelle acque marine e organismi dell'Antartide (Corsolini et al., 2002) sono alcuni degli esempi che sottolineano l'importanza del Long Range Transport. I POPs sono composti organici per lo più di origine antropica caratterizzati da elevata lipoaffinità, semivolatilità e resistenza al degrado. Queste caratteristiche rendono tali sostanze estremamente persistenti nell'ambiente e in grado di essere trasportate per lunghe distanze. Questi composti sono tossici per gli organismi viventi, determinando un impatto negativo sulle diverse funzioni di organi e tessuti, talora anche a basse dosi. La loro pericolosità, inoltre, è legata al fatto che queste sostanze, una volta depositate a terra, resistono per lungo tempo nell'ambiente come composti di partenza o come sottoprodotti, molte volte più pericolosi dei composti iniziali. In condizioni ambientali tipiche esse tendono alla bioconcentrazione e presentano un processo di biomagnificazione, raggiungendo pertanto concentrazioni potenzialmente rilevanti sul piano tossicologico. A causa delle loro caratteristiche tossiche, queste sostanze rappresentano una minaccia per la salute umana e per l'ambiente.

Ad esempio il DDT, noto insetticida di cui ormai è vietato uso, produzione e vendita, si decompone in DDE, un composto più persistente e bioaccumulabile del DDT, che ha effetti sul sistema endocrino, interferisce sulla deposizione di calcio ed è un probabile cancerogeno. L'accumulo nell'ambiente è dovuto al fatto che né gli organismi viventi, come batteri e funghi, né i processi fisici quali l'ossidazione riescono a distruggere del tutto questi composti.

1. POLICLORO BIFENILI (PCB)

Tra i POPs, notevole importanza è rivestita dai policloro bifenili (PCB), un gruppo di composti organici di sintesi, che fanno parte della “sporca dozzina”, composti verso i quali la comunità internazionale ha posto in essere numerose azioni per ridurre o eliminare il loro rilascio nell'ambiente. I PCB, sintetizzati negli Stati Uniti verso la fine degli anni venti dall'industria agro-chimica Monsanto, vennero brevettati e subito prodotti su larga scala, raggiungendo un grande interesse commerciale verso l'inizio degli anni cinquanta. Il brevetto venne concesso ad un'azienda per ognuno dei principali Paesi industrializzati (Giappone, Germania, Inghilterra, Francia, Italia e Spagna). In Italia iniziò a produrli, dal 1938, la Caffaro di Brescia, un'industria chimica produttrice di soda caustica, composti organici, cloro e suoi derivati sorta nel 1906 (Ruzzenenti, 1993). I primi Paesi a terminare la produzione di PCB furono il Giappone nel 1972, gli Stati Uniti nel 1977, la Germania nel 1983 e l'Italia nel 1984 (Fieldler, 1994). Si stima che la produzione mondiale sia stata di 1,5 milioni di tonnellate. Solo negli Stati Uniti ne sono state prodotte 670.000 tonnellate e quantità analoghe si possono stimare per l'Europa, se si tiene conto che la Caffaro da sola ne ha messe in commercio 150.000 tonnellate.

La notevole inerzia verso altri composti e l'elevata resistenza al calore sono state sfruttate in diverse applicazioni industriali, classificate in tre categorie (Pavan et al., 2003):

- sistemi chiusi controllabili, in cui i PCB sono impiegati come fluidi dielettrici in

- accumulatori e trasformatori (77% dell'utilizzo) con scarse perdite nell'ambiente;
- sistemi chiusi non controllabili, in cui i PCB sono stati usati come fluidi in sistemi idraulici e radiatori con perdite frequenti nell'ambiente;
 - usi dissipativi, in cui i PCB sono stati utilizzati come: lubrificanti ed oli da taglio industriali, additivi di pesticidi, carta copiatrice, adesivi, composti plastici e vernici; usi che permettono il diretto contatto di PCB con l'ambiente.

Nel 1972 è stato vietato l'impiego di PCB in sistemi aperti, ossia vernici, masse di sigillatura, stoffe e carta. Nel 1996 (Direttiva 96/59/CE) è entrato in vigore il divieto generale di impiego dei PCB. Dato che la loro pericolosità è stata compresa solo in tempi recenti, i PCB sono stati smaltiti per molti anni, senza alcuna precauzione volta a contrastarne la diffusione ambientale e possono quindi continuare a giungere nell'aria-ambiente ed essere respirati; i PCB infatti, si sono ormai diffusi in ogni parte del globo: grandi quantità di PCB sono state introdotte nell'ambiente mediante combustione o parziale incenerimento, tramite evaporazione da vernici e plastiche, scarico diretto in fogne e corsi d'acqua, eliminazione in discarica in forma non controllata, senza una distruzione completa del materiale (ATDSR, 1993).

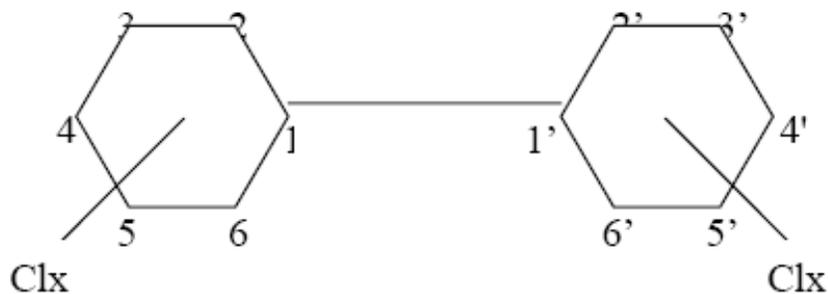
La maggior fonte di contaminazione umana è l'assunzione attraverso gli alimenti, anche se, in alcuni casi, non sono da sottovalutare l'inalazione e l'esposizione cutanea. La cronaca di recente ha riportato episodi acuti di inquinamento da PCB, il più clamoroso quello dei polli ai PCB e alla diossina in Belgio nel 1998: qui, nella produzione dei mangimi, vennero erroneamente scambiati oli idraulici destinati allo smaltimento, per oli vegetali esausti da friggitoria (Van Larebeke et al., 2001). Sebbene i segnali di avvelenamento dei polli furono individuati nel febbraio 1999, la fonte e l'estensione

della contaminazione furono scoperte solo nel maggio dello stesso anno, quando apparve evidente che più di 2500 allevamenti avevano fatto uso del mangime contaminato. Ciò comportò una grave crisi alimentare che poteva essere risolta solo attraverso l'implementazione di un ampio programma di monitoraggio di PCB e diossine. Lo screening della contaminazione da PCB fu basato sulla determinazione di sette PCB markers, considerando che laddove risultassero valori di detti PCB superiori ai limiti di tolleranza di 0,1 µg/g (latte), 0,2 µg/g (carne di pollo, di bovino e di maiale), o 1 µg/g (mangimi animali), andava eseguita anche la determinazione delle diossine.

Le concentrazioni più elevate di PCB e diossine furono riscontrate nei polli, soprattutto negli animali da riproduzione (galline e pulcini), che mostrarono evidenti segni di intossicazione. Anche i maiali risultarono contaminati, ma in misura minore e comunque non mostrarono segni evidenti di intossicazione.

1.1. LA CHIMICA DEI PCB

I PCB ($C_{12}H_{10-n}Cl_n$, con n compreso tra 1 e 10) sono una classe di idrocarburi clorurati non polari con nucleo bifenilico e sostituzione con atomi di cloro di 1 fino a 10 atomi di idrogeno.



Questa struttura fa sì che i PCB siano una numerosissima famiglia di 209 congeneri, distinti in relazione al diverso numero di atomi di cloro (da 1 a 10) e alla disposizione degli stessi (2\3\4\5\6\2'\3'\4'\5'\6'). Generalmente con il termine PCB si intende una miscela degli stessi, dai monoclorobifenili ai decaclorobifenili, essendo raggruppati secondo il loro grado di clorazione in 10 classi di omologhi. All'interno di ciascuna classe i singoli PCB, definiti isomeri, differiscono tra loro esclusivamente per la posizione assunta dagli atomi di cloro (es. 2 dei 12 triclorobifenili sono gli isomeri 2,3,4-Triclorobifenile e 3,3',5- Triclorobifenile) (Ruzzenenti, 2003).

Il termine PCB pur riferendosi ad una miscela di più congeneri, spesso viene considerato come una singola entità chimica. La maggior parte di essi si presenta in forma di solidi cristallini, insapori, inodori, incolori o tendenti al giallo, mentre le miscele di uso industriale sono liquidi viscosi, la cui viscosità è generalmente proporzionale al numero di atomi di cloro presenti. Benché le loro proprietà fisiche varino all'interno della classe, tutti i PCB sono caratterizzati da una bassa solubilità in acqua e da una bassa volatilità. Sono inoltre tutti molto solubili nei solventi organici, negli oli e nei grassi, molto stabili e persistenti nell'ambiente.

Al fine di rendere più agevole l'identificazione di un singolo congenere dal punto di vista chimico, sono state proposte nel corso degli anni diverse classificazioni; attualmente la più utilizzata è quella di Ballschmiter e Zell (1980) che assegna un numero progressivo da 1 a 209 ai singoli congeneri a seconda del minor o maggior grado di clorazione (Tabella 1) (Pavan et al., 2003).

Tabella1. Nomenclatura IUPAC di PCB-omologi (Ballschmiter e al., 1980)

No.	Struttura	No.	Struttura	No.	Struttura	No.	Struttura
Monoclorobifenili		Tetraclorobifenili		Pentaclorobifenili		Esaclorobifenili	
1	2	52	2,2',5,5'	107	2,3,3',4',5	161	2,3,3',4,5',6
2	3	53	2,2',5,6'	108	2,3,3',4,5'	162	2,3,3',4',5,5'
3	4	54	2,2',6,6'	109	2,3,3',4,6	163	2,3,3',4',5,6
		55	2,3,3',4	110	2,3,3',4',6	164	2,3,3',4',5',6
Diclorobifenili		56	2,3,3',4'	111	2,3,3',5,5'	165	2,3,3',5,5',6
4	2,2'	57	2,3,3',5	112	2,3,3',5,6	166	2,3,4,4',5,6
5	2,3	58	2,3,3',5'	113	2,3,3',5',6	167	2,3',4,4',5,5'
6	2,3'	59	2,3,3',6	114	2,3,4,4',5	168	2,3',4,4',5',6
7	2,4	60	2,3,4,4'	115	2,3,4,4',6	169	3,3',4,4',5,5'
8	2,4'	61	2,3,4,5	116	2,3,4,5,6		
9	2,5	62	2,3,4,6	117	2,3,4',5,6	Eptaclorobifenili	
10	2,6	63	2,3,4',5	118	2,3',4,4',5	170	2,2',3,3',4,4',5
11	3,3'	64	2,3,4',6	119	2,3,4,4',6	171	2,2',3,3',4,4',6
12	3,4	65	2,3,5,6	120	2,3',4,5,5'	172	2,2',3,3',4,5,5'
13	3,4'	66	2,3',4,4'	121	2,3',4,5',6	173	2,2',3,3',4,5,6
14	3,5	67	2,3',4,5	122	2',3,3',4,5	174	2,2',3,3',4,5,6'
15	4,4'	68	2,3',4,5'	123	2',3,4,4',5	175	2,2',3,3',4,5',6
		69	2,3',4,6	124	2',3,4,5,5'	176	2,2',3,3',4,6,6'
Triclorobifenili		70	2,3',4',5	125	2',3,4,5,6'	177	2,2',3,3',4',5,6
16	2,2',3	71	2,3,4',6	126	3,3',4,4',5	178	2,2',3,3',5,5',6
17	2,2',4	72	2,3',5,5'	127	3,3',4,5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
18	2,2',5	73	2,3',5',6			180	2,2',3,4,4',5,5'
19	2,2',6	74	2,4,4',5	Esaclorobifenili		181	2,2',3,4,4',5,6
20	2,3,3'	75	2,4,4',6	128	2,2',3,3',4,4'	182	2,2',3,4,4',5,6'
21	2,3,4	76	2',3,4,5	129	2,2',3,3',4,5	183	2,2',3,4,4',5',6
22	2,3,4'	77	3,3',4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	184	2,2',3,4,4',6,6'
23	2,3,5	78	3,3',4,5	131	2,2',3,3',4,6	185	2,2',3,4,5,5',6
24	2,3,6	79	3,3',4,5'	132	2,2',3,3',4,6'	186	2,2',3,4,5,6,6'
25	2,3',4	80	3,3',5,5'	133	2,2',3,3',5,5'	187	2,2',3,4',5,5',6

Come si può vedere dalla tabella 2, il numero di possibili isomeri con lo stesso grado di clorazione varia.

Tabella 2. Formula molecolare, nome, numero di isomeri, numerazione IUPAC, massa molecolare, percentuale di cloro e numero di isomeri identificati.

Formula Molecolare	Nome:Clorobifenili	Numero di Isomeri	IUPAC- No.	Massa Molecolare	% di Cloro	No. di isomeri Identificati
$C_{12}H_9Cl$	Mono	3	1-3	188.65	18.79	3
$C_{12}H_8Cl_2$	Di	12	4-15	233.10	31.77	12
$C_{12}H_7Cl_3$	Tri	24	16-39	257.54	41.30	23
$C_{12}H_6Cl_4$	Tetra	42	40-81	291.99	48.65	41
$C_{12}H_5Cl_5$	Penta	46	82-127	326.43	54.30	39
$C_{12}H_4Cl_6$	Esa	42	128-169	360.88	58.93	31
$C_{12}H_3Cl_7$	Epta	24	170-193	395.32	62.77	18
$C_{12}H_2Cl_8$	Octa	12	194-205	429.77	65.98	11
$C_{12}HCl_9$	Nona	3	206-208	464.21	68.73	3
$C_{12}Cl_{10}$	Deca	1	209	498.66	71.10	1

1.2. FORMAZIONE DEI PCB

Con temperature superiori ai 750°C il benzene in presenza di piombo come catalizzatore reagisce formando bifenili. Questo per reazione con cloro gassoso e in presenza di FeCl₃ come catalizzatore, dà origine a cloroderivati per sostituzione degli atomi di H. Quanto maggiore è la quantità di Cl₂, tanto più lunga sarà la durata della reazione e tanto maggiore il grado di clorurazione con formazione dei PCB.

1.3. ASPETTI CHIMICO-FISICI

Dal punto di vista chimico-fisico, i PCB sono caratterizzati da un'elevata stabilità dipendente anch'essa dal differente grado di clorazione. In generale il punto di evaporazione e la lipofilia aumentano con il maggior grado di clorazione, la tensione di vapore e la solubilità nell'acqua invece diminuiscono.

Le caratteristiche più importanti dei PCB sono:

- stato liquido a temperatura ambiente,
- densità: 1.1821566 kg/L,
- bassa solubilità in acqua, alta solubilità in solventi organici,
- alta temperatura di evaporazione: 170-380 °C,
- non esplosivo,
- bassa conduttività elettrica,
- conducibilità termica molto alta,
- stabilità elevata: alta resistenza alla degradazione termica e chimica (Fiedler, 2001).

1.4. PCB NELL'AMBIENTE

Una volta giunti nell'ambiente, i PCB, per la loro caratteristica di essere fortemente bioaccumulabili, non sono distrutti facilmente e possono persistervi per lunghi periodi di tempo. Possono facilmente circolare tra aria, acqua e suolo. Per esempio, possono entrare nell'atmosfera attraverso l'evaporazione dall'acqua o dal suolo; nell'aria, i PCB possono essere trasportati per lunghe distanze, tanto che sono stati ritrovati nei ghiacciai e nelle acque di aree molto lontane dai siti di produzione ed utilizzo (Artico). I PCB a più basso peso molecolare possono ritrovarsi negli strati superficiali delle acque ed essere trasportati dalle correnti o evaporare nell'aria, oppure, quelli più pesanti, si

ritrovano adesi ai sedimenti più o meno profondi dove rimangono fissati, o vengono trasferiti all'acqua circostante.

Nel suolo, i PCB vi si trovano fortemente fissati ed in genere non vengono trasportati dalle piogge negli strati profondi, ma rimangono nel terreno per mesi o anni. In generale, più atomi di cloro contengono i bifenili, più lentamente vengono degradati.

L'evaporazione sembra essere la principale via attraverso la quale i PCB a più bassa clorazione riescono a lasciare il suolo; in questo modo essi si accumulano nelle foglie e nelle parti aeree delle piante e nei frutti.

1.5. TOSSICITÀ DEI PCB

La tossicità dei singoli PCB varia molto da composto a composto. Gli effetti tossici dipendono dal grado di clorazione e dal tipo di isomeri; i PCB meta e para sostituiti sarebbero maggiormente attivi rispetto agli orto-sostituiti. In base alle loro proprietà tossicologiche i PCB possono essere suddivisi in due gruppi: uno, composto da 12 congeneri, ha atomi di Cloro in posizione meta o para, rendendo i due anelli fenilici liberi di ruotare sullo stesso piano e adottare una struttura coplanare; tale gruppo possiede proprietà tossicologiche analoghe alle diossine e viene pertanto denominato gruppo di "PCB diossina-simili" (DL-PCB) andando ad agire soprattutto con effetti negativi sullo sviluppo del Sistema Nervoso Centrale e cancerogenicità; l'altro, è composto dai rimanenti congeneri denominati "PCB non diossina-simili" (NDL-PCB) che presentano uno o più atomi di Cloro in posizione orto e gli anelli fenilici non sono sullo stesso piano; questi PCB interferiscono principalmente sul funzionamento del sistema endocrino dopo bioaccumulo nell'organismo dovuto all'esposizione a lungo termine.

La natura complessa delle miscele di PCB complica la valutazione del rischio sull'uomo. A tale scopo è stato introdotto da Safe il concetto di TEF (Fattore di Tossicità Equivalente) che esprime il grado di tossicità di ciascun congenere assumendo, come valore di riferimento, la tossicità del 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD). La valutazione del rischio di tossicità da PCB tramite il valore di TEF è possibile in quanto il meccanismo attraverso il quale PCB e TCDD determinano effetti tossici, è comune; essendo entrambi idrocarburi aromatici alogenati hanno la capacità di legarsi al recettore per gli idrocarburi arilici, una proteina citoplasmatica (AHR) presente nei tessuti e negli organi bersaglio. Il TEF per i singoli composti è calcolato in riferimento al congenere più tossico 2,3,7,8-TCDD (diossina di Seveso) al quale è stato assegnato un valore di TEF pari a 1. Moltiplicando la concentrazione analitica di ciascun congenere per il TEF corrispondente e sommando i diversi contributi, si ottiene la Tossicità Equivalente (TEQ):

$$\text{TEQ} = (\text{PCDD}_i \times \text{TEF}_i) + (\text{PCDF}_i \times \text{TEF}_i) + (\text{PCB}_i \times \text{TEF}_i)$$

I criteri usati dal WHO per includere i composti chimici nello schema del TEF sono:

- devono mostrare una relazione strutturale con PCDDs e PCDFs;
- devono legarsi al recettore AhR e provocare risposte tossiche e biochimiche recettore-mediate;
- Essere persistenti ed accumularsi nella catena alimentare.

I NDL-PCB comprendono la maggioranza dei congeneri che si ritrovano generalmente nelle catene alimentare e mangimistica; la maggior parte di essi interferisce con il sistema endocrino, con le citokine e con i neurotrasmettitori, ma le differenze mostrate

nella persistenza e nei meccanismi di bioaccumulo e di tossicità, impediscono ancora oggi l'utilizzo dell'approccio basato sui TEQ (La Rocca et al., 2006).

I dati sulla contaminazione da NDL-PCB dei mangimi e degli alimenti sono spesso riportati come la somma di 6 congeneri PCB (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180) considerati "PCB indicatori" o di 7 congeneri (somma dei 6 indicatori più il PCB 118); questi congeneri sono degli indicatori appropriati dei diversi tipi di PCB nelle diverse matrici e, in base ai dati disponibili, sono i più adatti per una valutazione del rischio dovuto ai NDL-PCB. Il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) ha rilevato che la somma dei PCB indicatori rappresenta il 50% circa di tutti i NDL-PCB presenti negli alimenti (EFSA, 2005).

Gli effetti tossici maggiormente osservati e causati da forti esposizioni ai PCB riguardano la cute, come l'acne o gli esantemi. D'altra parte, però, queste sostanze sono anche degli Interferenti Endocrini per cui la loro azione si esplica a livello del sistema riproduttivo ed endocrino in generale, sullo sviluppo prenatale nonché a livello immunitario. La loro struttura li rende in grado di interferire con l'azione degli estrogeni e con i livelli di ormone tiroideo nell'organismo.

Studi di tossicologia sperimentale mostrano come gli effetti sullo sviluppo prenatale sono a carico degli organi riproduttivi e del sistema nervoso (soprattutto a partire dal secondo trimestre di gestazione). Le miscele tecniche di PCB utilizzate negli studi di tossicità contengono sia NDLPCB, sia composti diossina-simili come i DL-PCB. Gli effetti avversi osservati negli animali di laboratorio dopo l'esposizione a singoli NDL-PCB coinvolgevano le funzioni biochimiche di tiroide, fegato e cervello; accanto a questi sono stati rilevati inoltre effetti immunotossici, estrogenizzanti, riproduttivi e sullo sviluppo neurologico. Questi ultimi sono particolarmente frequenti nella prole dei

roditori dopo l'esposizione in utero. Tutti questi effetti, tuttavia, non sono specifici dei NDL-PCB ma si osservano anche dopo l'esposizione a policlorodibenzo-p-diossine, policlorodibenzofurani e DL-PCB.

I risultati degli studi di genotossicità in vitro e in vivo, comunque, indicano che i PCB non sono mutageni a livello genetico o cromosomico anche se alcuni NDL-PCB, in particolare i congeneri basso clorurati, determinano danni al DNA probabilmente in seguito alla formazione di specie reattive dell'ossigeno. La "International Agency for Research on Cancer" IARC ha pertanto classificato i PCB nel gruppo 2A (probabilmente cancerogeni per l'uomo) sulla base di limitate evidenze negli esseri umani e sufficienti negli animali (IARC, 1987). Data l'importanza relativa che si sta attribuendo ai NDL-PCB, negli ultimi anni si è rivolta una crescente attenzione a questo problema tanto che la Commissione Europea ha chiesto al Comitato Scientifico sugli Alimenti di effettuare uno studio per valutare la tossicità dei NDL-PCB per l'uomo identificando le principali fonti alimentari e la loro relativa importanza nella dieta. Inoltre, considerando che l'attuale calcolo del TEQ è effettuato considerando solo la somma della diossina e dei PCB diossina-simili, si sta cercando di rivalutare tale concetto, inserendo nel calcolo del TEQ anche il concetto di "dose additiva", data dal contributo di composti diversi dalla diossina e, primi tra tutti i NDL-PCB (EFSA Scientific Colloquium, 2004).

2. GLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresentano una famiglia di microinquinanti organici, divenuti ormai ubiquitari nell'ambiente, soprattutto a causa di attività umane. Vengono riversati nell'atmosfera attraverso combustioni spontanee (eruzioni vulcaniche, incendi...) ma principalmente attraverso attività antropiche (produzione di energia industriale, scarichi di autoveicoli, riscaldamento domestico, ecc.).

La famiglia degli IPA è costituita da idrocarburi con due o più anelli aromatici condensati; il numero totale di possibili composti è stimato superiore al migliaio.

Gli IPA si formano durante la combustione incompleta o la pirolisi di materiale organico, come carbone, legno, prodotti petroliferi e rifiuti. Di conseguenza, la loro formazione è per lo più associata alle seguenti sorgenti (IPCS, 1998):

- processi industriali vari (in particolare: produzione di alluminio, produzione di ferro e acciaio, fonderie);
- lavorazioni del carbone e del petrolio;
- impianti di generazione di energia elettrica;
- inceneritori;
- riscaldamento domestico, specialmente a legna e carbone;
- emissioni da veicoli a motore;
- incendi di foreste;
- combustioni in agricoltura;
- cottura di alimenti su fiamma;
- fumo di tabacco.

I vulcani possono inoltre rappresentare una sorgente naturale di IPA con un impatto locale rilevante. A causa di queste fonti numerose e diffuse, gli IPA sono ubiquitari e si ritrovano in tutti i comparti ambientali, nei quali essi entrano soprattutto attraverso l'atmosfera.

2.1. LA CHIMICA DEGLI IPA

Il termine IPA è l'acronimo di Idrocarburi Policiclici Aromatici, una classe numerosa di composti organici (circa 500), omologhi del benzene, tutti caratterizzati strutturalmente dalla presenza di due o più anelli aromatici condensati fra loro in un'unica struttura piana, attraverso coppie di atomi di carbonio condivisi fra anelli adiacenti; gli anelli benzenici condensati possono a loro volta avere gruppi alchilici o cicloalchilici sostituiti o eteroatomi tipo azoto o zolfo.

Gli IPA che contengono fino a 4 anelli benzenici sono detti "volatili" perché a più basso peso molecolare; quelli che contengono più di quattro anelli benzenici sono gli IPA "pesanti". Questi ultimi sono più stabili e più tossici rispetto a quelli volatili. Sono composti lipofili, anche se molti di essi si dissolvono abbastanza bene nell'acqua (ATSDR, 1995).

L'IPA più semplice dal punto di vista strutturale è il naftalene, un composto a due anelli che come inquinante aerodisperso si trova più che altro in forma gassosa a temperatura ambiente. Gli IPA costituiti da tre a cinque anelli possono essere presenti sia come gas che come particolato, mentre quelli caratterizzati da cinque o più anelli tendono a presentarsi per lo più in forma solida.

All'aumentare del peso molecolare decresce la volatilità e la già bassa solubilità in acqua, mentre cresce il punto di ebollizione e di fusione. Nella forma più pura gli IPA si

presentano solidi e trasparenti, oppure bianchi o di un colore che va dal giallo chiaro al verde pallido. Questi composti non si ritrovano mai singolarmente, ma all'interno di miscele dove sono presenti molte decine di IPA diversi e in proporzioni che, in alcuni casi, possono anche variare di molto. Nella figura ... sono riportate le strutture di 16 Idrocarburi Policiclici Aromatici inseriti nella lista dei "priority pollutants" dell'EPA (Environmental Protection Agency).

Gli IPA si formano in seguito a processi di combustione incompleta di materiali organici contenenti carbonio.

Il meccanismo è alquanto complesso: esso è dovuto principalmente alla ripolimerizzazione di frammenti di idrocarburo che si formano durante il processo noto come craking, vale a dire la frammentazione in numerose parti delle molecole del combustibile a contatto con il fuoco.

I frammenti spesso perdono qualche atomo di idrogeno, che genera acqua dopo essersi combinato con l'ossigeno durante la varie fasi della reazione: i frammenti ricchi di carbonio si combinano in modo tale da formare gli idrocarburi aromatici policiclici, che rappresentano le molecole più stabili, con un rapporto C/H elevato.

La reazione di ripolimerizzazione avviene soprattutto in condizioni di carenza di ossigeno: in genere la velocità di formazione degli IPA aumenta con il diminuire del rapporto ossigeno/combustibile.

Le temperature elevate (650-900 °C) e la carenza di ossigeno favoriscono la formazione degli IPA; tuttavia la loro produzione avviene anche quando materiale organico è tenuto a basse temperature (100-300 °C) per lunghi periodi di tempo.

Durante la reazione gli IPA più leggeri reagiscono velocemente fra loro per formare omologhi più pesanti e, all'aumentare del peso molecolare, decresce la volatilità e la già bassa solubilità in acqua, mentre cresce il punto di ebollizione e di fusione.

Sono questi i motivi per cui gli IPA più termodinamicamente stabili e persistenti sono quelli che presentano un alto grado di condensazione, ovvero un maggior numero di anelli aromatici.

Contrariamente a ciò che accade per il benzene, in cui tutti i sei atomi di carbonio hanno identica reattività, negli Idrocarburi Policiclici Aromatici le posizioni hanno differente reattività, sia nelle reazioni di ossidazione e di riduzione, sia nella reazione di sostituzione elettrofila aromatica.

La differenza di reattività delle varie posizioni aumenta all'aumentare del numero di anelli. In particolare si rileva che le posizioni relative degli anelli condensati degli IPA svolgono un ruolo importante nel determinarne il livello di potenzialità cancerogena negli animali da esperimento.

In generale la reattività chimica di questi composti è influenzata da molti fattori ambientali fra i quali la temperatura, la luce, i livelli di ossigeno e di ozono, la presenza di co-inquinanti e di materiale capace di adsorbirli. È stato osservato inoltre che la reattività degli IPA puri è maggiore rispetto a quella riscontrata negli idrocarburi adsorbiti su fuliggine; ciò suggerisce che l'adsorbimento su materiale particolato funga da protezione nei riguardi della foto-ossidazione, uno fra i più importanti processi di decomposizione degli IPA.

Le fonti degli IPA sono sia antropiche che naturali. Tuttavia si può affermare che la maggior parte degli IPA presenti nell'ambiente provengano da fonti antropiche.

Negli ambienti esterni derivano dalla combustione di combustibili fossili, dai processi industriali, dalla combustione di carburanti per trazione e trasporto, da impianti di generazione di energia elettrica e da inceneritori; altresì, possono essere sorgenti naturali gli incendi in foreste e in campi agricoli, le eruzioni vulcaniche, nonché le attività metaboliche di piante e batteri.

Negli ambienti indoor provengono dalla combustione derivante dal fumo di tabacco e dalle apparecchiature che bruciano combustibili come: riscaldamento domestico a legna o a carbone, forni e fornelli per cucina, camini.

Nella popolazione generale l'esposizione avviene essenzialmente per inalazione di aria inquinata in cui gli IPA sono presenti sotto forma di aerosol, o adsorbiti a particolato; attraverso la dieta per assunzione di cibi e bevande contaminati; per abitudini voluttuarie (fumo) o per vie accidentali, toccando del terreno contaminato o prodotti come gli oli pesanti, il catrame di carbone etc.. Il fatto che l'esposizione avvenga ad una miscela di composti, di composizione non costante, rende difficile l'attribuzione delle conseguenze sulla salute alla presenza di uno specifico Idrocarburo Policiclico Aromatico.

Pur essendo lo studio di queste miscele particolarmente complicato, è stato comunque dimostrato che l'esposizione alle miscele di IPA comporta un aumento dell'insorgenza del cancro, soprattutto in presenza di benzo(a)pirene, l'unico che finora è stato studiato approfonditamente e più spesso determinato nelle diverse matrici.

2. 2. GLI IPA NELL'AMBIENTE

A causa della loro elevata idrofobicità, gli IPA che raggiungono l'acqua si adsorbono velocemente al particolato, grazie al quale finiscono velocemente nel sedimento, che diventa così una riserva di inquinanti. Nella maggior parte dei siti inquinati, non si ritrova un singolo idrocarburo della classe ma, generalmente miscele di più componenti, diverse a seconda della fonte che li ha originati. In questo modo cambiamenti di composizione relativa dei diversi composti, riflettono cambiamenti nella fonte che ha prodotto l'emissione. Il sedimento si presenta quindi come il comparto da cui trarre le maggiori informazioni riguardo l'andamento temporale dell'inquinamento o dei processi naturali che hanno originato gli IPA.

Solitamente nell'aria non si ritrovano mai come composti singoli, ma all'interno di miscele dove sono presenti molte decine di IPA diversi e in proporzioni che, in alcuni casi, possono anche variare di molto. Il fatto che l'esposizione avvenga ad una miscela di composti, di composizione non costante, rende difficile l'attribuzione delle conseguenze sulla salute alla presenza di uno specifico idrocarburo policiclico aromatico.

All'interno dell'atmosfera gli IPA subiscono reazioni chimiche e fotochimiche degradative. Queste reazioni includono ossidazioni da parte di ossidi di azoto, di zolfo, ossigeno, ozono, radicali ossidrilici e idroperossido.

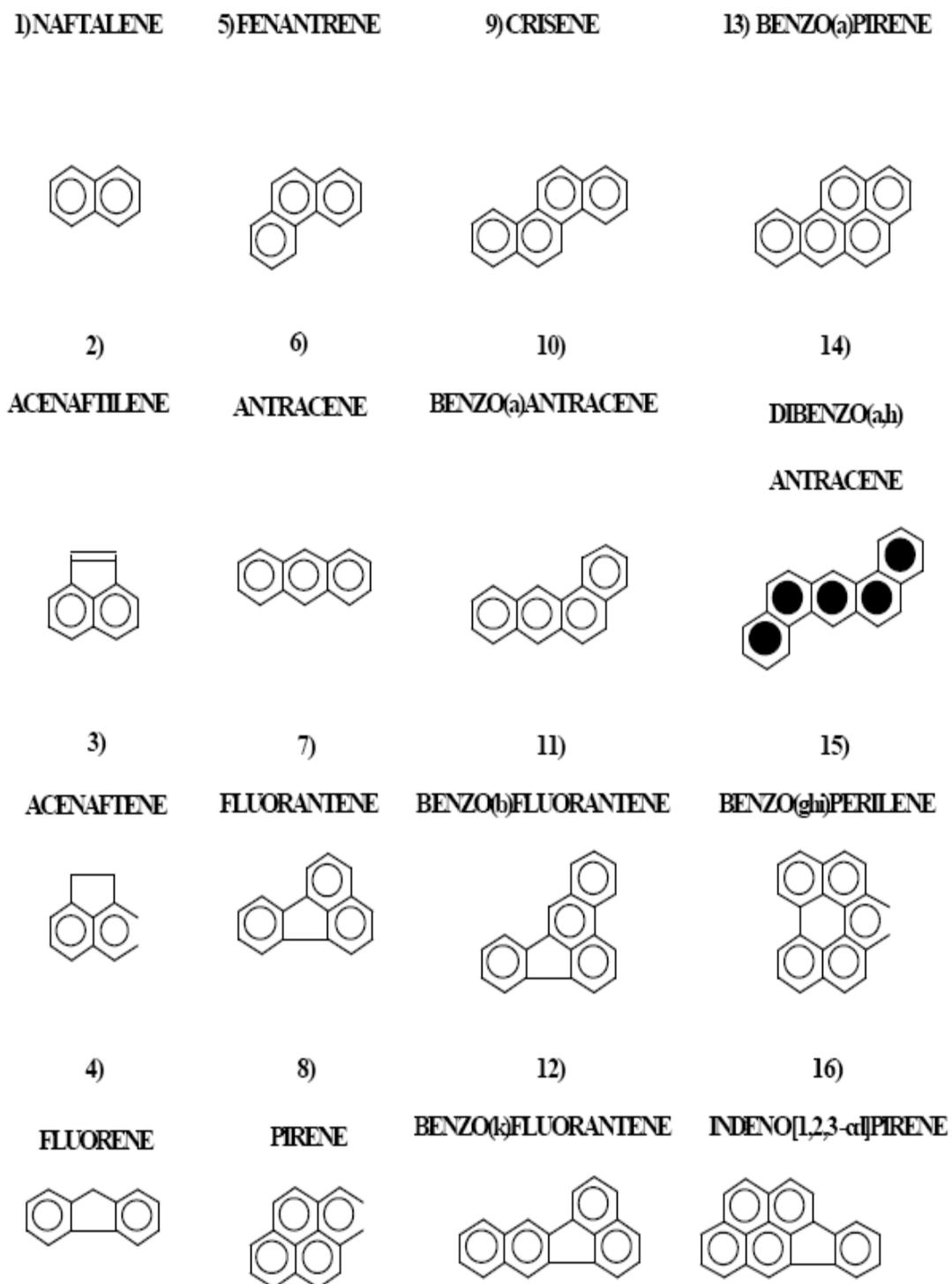
Sebbene si producano principalmente prodotti biologicamente inerti, esistono evidenze che mostrano la formazione di idrocarburi policiclici nitro sostituiti, riconosciuti mutageni e tumorigeni nel topo.

Livelli significativi di IPA sono stati trovati nei suoli di tutte le regioni terrestri. Nelle zone più remote, derivano principalmente da incendi di biomasse vegetali, o da ricadute

di inquinanti presenti in atmosfera. In quelle maggiormente industrializzate la ricaduta è significativamente superiore. Nell'ambiente acquoso, l'origine principale è data dalla ricaduta di materiale particolato, trasportato dalle correnti gassose dalla zona di produzione ai fiumi, laghi e quindi al mare o agli oceani. La quantità di IPA presenti nei sedimenti marini riflette l'industrializzazione del territorio limitrofo. Questi sedimenti presentano un profilo verticale in cui le maggiori concentrazioni sono riscontrabili nella zona superficiale o subsuperficiale. La concentrazione totale diminuisce con la profondità fino ad arrivare ai livelli minimi, dovuti a fenomeni naturali sempre presenti, riscontrabili nei sedimenti depositati in periodo pre-industriale. Al contrario, il profilo di sedimenti incontaminati da fonti antropogeniche, presenta profili verticali con quantità relativamente costanti di fenantreni alchil-sostituiti, tipici della fossilizzazione di piante terrestri.

Livelli non trascurabili sono stati trovati in molti cibi comuni, la contaminazione interessa principalmente piante di cui si consumano le foglie come ad esempio la lattuga, gli spinaci, il tè, il tabacco. Gli idrocarburi ritrovati derivano quasi sicuramente da una contaminazione atmosferica, grazie alla ricaduta di particolato sulle foglie che vengono successivamente utilizzate come cibi. Come conseguenza dell'accumulo lungo la catena trofica, anche gli alimenti di origine animale risultano essere contaminati da IPA; tale contaminazione inoltre, può diventare significativa per prodotti quali carne e lattiero caseari quando sono sottoposti a processi tecnologici come la cottura su grill, l'arrostimento e l'affumicatura.

Figura 1. Struttura molecolare dei 16 IPA definiti dall'US EPA “inquinanti prioritari”



2.3. TOSSICITA' DEGLI IPA

-Aspetti generali

La presenza di più anelli aromatici conferisce agli IPA bassa reattività, alti punti di fusione ed ebollizione e carattere lipofilo. La tossicità degli IPA è legata alla capacità di ogni composto di ripartirsi nelle diverse fasi: acquosa e solida. Fino a quando gli IPA rimangono adsorbiti nella fase solida, sono meno disponibili e quindi meno pericolosi.

Gli IPA sono composti lipofili e si accumulano nei tessuti degli organismi esposti; la loro eliminazione dipende dalla capacità dell'organismo stesso di trasformarli in metaboliti idrosolubili, eliminabili attraverso l'escrezione. L'effetto tossico si manifesta principalmente attraverso due tipi di interazione con le strutture cellulari:

- formazione di legami reversibili con siti lipofici che possono impedire i normali processi della cellula (tossicità acuta);
- formazione di metaboliti idrofilici, reattivi ed elettrofili, che si legano alle strutture cellulari, provocando danni a lungo termine (tossicità cronica).

-Tossicità acuta:

Per tossicità acuta si intende l'insorgenza dell'effetto, dopo l'esposizione dell'organismo, in un breve lasso di tempo.

- Una volta ingeriti (o inalati), gli IPA sono rapidamente assorbiti attraverso il tratto gastro-intestinale o l'epitelio polmonare, e distribuiti in vari tessuti (soprattutto quelli più ricchi di grasso), compresi quelli fetali. In particolare è stato osservato che concentrazioni misurabili sono riscontrate in quasi tutti gli organi interni, anche se i tessuti dove di preferenza si accumulano sono quello mammario, pancreatico e, in misura maggiore, quello adiposo; l'apparato

intestinale contiene alte concentrazioni di IPA anche quando essi entrano da altre vie, a causa sia dell'escrezione biliare sia dell'intrappolamento nel muco dell'apparato respiratorio (che viene poi deglutito).

gli organi ricchi di tessuto adiposo possono fungere da riserva dalla quale gli IPA sono gradualmente rilasciati;

L'esposizione agli idrocarburi policiclici aromatici può avvenire per inalazione, per ingestione di cibo o di bevande contaminate, oppure per via cutanea toccando del terreno contaminato o prodotti come gli oli pesanti, il catrame di carbone o il creosoto. Una volta nel corpo, gli IPA si diffondono rapidamente per la loro liposolubilità che li rende in grado di attraversare le membrane cellulari e di penetrare e depositarsi nei tessuti adiposi. Gli organi target includono i reni, il fegato ed il grasso. La metabolizzazione è però abbastanza rapida e, nel giro di pochi giorni, gli IPA vengono eliminati tramite le urine e le feci. Gli IPA vengono metabolizzati in vari tessuti e organi (polmone, pelle, esofago, colon, fegato, placenta, ecc.). In genere il primo passo del metabolismo degli IPA, finalizzato ad aumentarne la idrofilicità e facilitarne l'escrezione, è una ossidazione. Il composto originale viene sottoposto ad ossidazione da parte degli enzimi della famiglia del citocromo P450, con formazione di epossidi e specie idrossilate in varie posizioni, che subiscono a loro volta ulteriori trasformazioni metaboliche; in particolare un'aril-idrocarbossilasi catalizza l'ossidazione degli IPA a prodotti fenolici ed epossidi; gli epossidi così formati vengono idratati a trans-diidrodoli che possono essere escreti o possono essere successivamente ossidati a dioloepossidi, composti instabili che vengono idrolizzati a tetrololi (intermedi elettrofili) in grado di legarsi all'albumina, all'emoglobina e al DNA, formando degli addotti responsabili dell'attività cancerogena, conseguente il danneggiamento del materiale genetico.

Un'altra via di detossificazione di questi metaboliti è rappresentata dalla coniugazione con glutatione, reazione catalizzata dalla glutatione-S-transferasi presente nel fegato, nel polmone e nel rene.

In questo caso la metabolizzazione è abbastanza rapida e, nel giro di pochi giorni, gli IPA vengono eliminati attraverso escrezioni epato-biliari, urine e feci.

Mentre gli IPA in sé sono chimicamente inerti, nel corso di queste reazioni metaboliche possono formarsi degli intermedi elettrofili capaci di interagire con varie macromolecole biologiche, compreso il DNA (IPCS, 1998).

Gli effetti tossici degli IPA sono ascrivibili sia alla generazione di intermedi metabolici reattivi, che alla attivazione da parte della molecola parentale del recettore AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*). Tra gli effetti tossici degli IPA, l'immunosoppressione, gli effetti teratogeni e sulla riproduzione, e l'effetto promotore nella cancerogenesi sono mediati dalla attivazione del recettore AhR (Dertinger *et al.*, 2001). In genere gli IPA mostrano bassa tossicità acuta, con NOAEL (*No Observed Adverse EffectLevel*) per somministrazione orale superiori ai 100 mg/kg p.c. Anche altri effetti tossici, diversi da quelli cancerogeni (immunotossicità, effetti sulla riproduzione), sono stati osservati solo in seguito ad esposizione ad alte dosi. La caratteristica tossicologica di maggiore rilievo in relazione ai possibili rischi posti dalla presenza di IPA negli alimenti è quindi senz'altro l'attività genotossica e cancerogena, per le quali si ritiene che non esista dose soglia. Alcuni IPA hanno dimostrato in test di laboratorio di essere in grado di causare il cancro per inalazione (ai polmoni), per ingestione (allo stomaco) e per contatto dermico (alla pelle). Secondo l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) sono probabili cancerogeni per l'uomo il benzo(a)pirene, il benz(a)antracene e il dibenz(a,h)antracene; mentre sono possibili cancerogeni il benzo(b)fluorantene, il

benzo(k)fluorantene e l'indeno(1,2,3,-c,d)pirene.

La frazione di IPA più implicata nello sviluppo del tumore è quella caratterizzata da 3 a 7 anelli aromatici. Sembra che gli IPA, di per sé, non siano tossici; una volta nel corpo vengono però attivati in vari processi mediati da alcuni sistemi enzimatici presenti nei tessuti bersaglio. Questa biotrasformazione comporta la formazione di intermedi reattivi (carcinogeni genotossici) in grado di legarsi covalentemente a macromolecole come il DNA e l'RNA. Il materiale genetico viene così danneggiato e questo comporterebbe l'insorgenza dei tumori.

In ogni caso, non vi è praticamente niente di certo sull'azione tumorigenica dei singoli IPA presenti all'interno di miscele complesse. Gli studi inerenti hanno dimostrato che gli idrocarburi policiclici aromatici interagiscono metabolicamente in un'enormità di modi determinando di volta in volta effetti sinergici, additivi o addirittura antagonistici.

Per quanto riguarda gli alimenti è comunque difficile ascrivere un aumento nell'incidenza di cancro a ben precisi componenti nei cibi; poiché varia è la risposta dell'organismo ai differenti IPA, alle loro differenti concentrazioni ed alla durata dell'esposizione, non sono ancora presenti in letteratura dati correlati fra l'assunzione di IPA mediante gli alimenti e il rischio di sviluppare tumori gastrointestinali.

Lo IARC (International Agency for Research on Cancer, 1987) inserisce alcune di queste sostanze nelle liste dei probabili cancerogeni per l'uomo (**Gruppo 2 A**) o dei possibili cancerogeni dell'uomo (**Gruppo 2 B**) come riportato in Tabella 3.

Tabella 3. Classificazione dei principali IPA e loro cancerogenicità secondo lo IARC, (1987)

Nome	Cancerogenicità (secondo IARC)	Cancerogenicità relativa rispetto al benzo(a)pirene
Naftalene	3	0
Acenaftene	3	0
Acenaftilene	3	0
Fluorene	3	0
Fenantrene	3	0
Antracene	3	0
Fluorantene	3	0
Pirene	3	0
Benzo(a)antracene	2A	0.006
Crisene	3	0
Benzo(b)fluorantene	2B	0.11
Benzo(k)fluorantene	2B	0.03
Benzo(a)pirene	2A	1
Dibenzo(a,h)antracene	2A	0.6
Benzo(g,h,i)perilene	3	0
Indeno(1,2,3-c,d)pirene	2B	0.08

Nota. 1: cancerogeno per l'uomo; 2A: probabile cancerogeno per l'uomo; 2B: possibile cancerogeno per l'uomo; 3: non classificabile come cancerogeno per l'uomo; probabilmente non cancerogeno.

3. I CONTAMINANTI E GLI ALIMENTI

Uno dei punti focali della sicurezza alimentare riguarda la presenza di contaminanti chimici negli alimenti.

La contaminazione chimica dei prodotti alimentari costituisce, ancora oggi, un problema estremamente complesso, strettamente collegato allo sviluppo economico, industriale, urbano e all'uso non sempre corretto di sostanze xenobiotiche, per cui un alimento può essere contaminato in vari momenti del suo ciclo di vita: dalla produzione alla trasformazione, dalla conservazione al trasporto, dalla preparazione al consumo; in altri termini, "dal campo alla tavola".

I PCB, come altri composti organici alogenati, sono ubiquitari nell'ambiente, ed in seguito alla loro persistenza ed accumulo nella catena alimentare, sono presenti nella dieta degli esseri umani. Nella popolazione generale più del 90% dell'esposizione ai NDL-PCB avviene attraverso gli alimenti. L'assunzione giornaliera media dei NDL-PCB totali con la dieta si può stimare nell'ordine di 10-45 ng/kg di peso corporeo per giorno. I pochi dati disponibili sull'esposizione dei bambini fino ai sei anni di età indicano un'assunzione media (escluso l'allattamento) di NDL-PCB totali di circa 27-50 ng/kg di peso corporeo per giorno. Tuttavia, laddove sono disponibili dati riferiti sia agli adulti sia ai bambini in una popolazione specifica, in generale si osservano nei bambini livelli di esposizione 2,5 volte superiori rispetto agli adulti. In sottopopolazioni specifiche con elevata esposizione alimentare ai PCB, come i pescatori del mar Baltico, l'assunzione giornaliera della somma dei sei NDL-PCB tramite il pesce può essere di circa 40 ng/kg di peso corporeo, corrispondente ad un'assunzione di NDL-PCB totali di 80 ng/kg di peso corporeo al giorno, senza contare le altre componenti della dieta.

Il report finale della Scientific Cooperation Task (EU SCOOP, 2000) fornisce informazioni circa l'intake con la dieta di PCDD/F e DL-PCB per la popolazione europea e sulle concentrazioni di questi microinquinanti nei prodotti alimentari. Il maggior contributo all'esposizione media con la dieta a questi composti è dato da alimenti quali latte e prodotti caseari (16-39%), carne e prodotti carnei (6-32%), pesci e prodotti della pesca (11-63%); altri prodotti quali vegetali, cereali e frutta, contribuiscono per circa il 6-26%.

Lo Scientific Panel on Contaminants dell'EFSA ha stimato un intake giornaliero medio di NDL-PCB di circa 15 ng/Kg di peso corporeo (assumendo un peso corporeo di 60 Kg) al giorno, per il consumatore "medio", di 20 ng/Kg di peso corporeo al giorno per i grandi consumatori di prodotti carnei e di circa 35 ng/Kg di peso corporeo al giorno per i grandi consumatori di pesce e prodotti della pesca.

Anche per quanto riguarda gli IPA, attualmente si stima che l'assunzione da parte dell'uomo avvenga principalmente attraverso la dieta (Bocca et al., 2003).

Negli alimenti non sottoposti a trasformazione, la presenza degli IPA è essenzialmente dovuta a contaminazione ambientale: deposizione di particolato atmosferico (es. su grano, frutti e verdure), assorbimento da suolo contaminato (es. per le patate), assorbimento da acque di fiume e di mare contaminate (es. per mitili, pesci e crostacei). Sorgenti comuni negli alimenti trasformati o lavorati sono i trattamenti termici, in particolare: la cottura alla griglia, arrosto e al forno, e la frittura, e i processi di lavorazione. Questi ultimi riguardano specialmente i processi di essiccazione attraverso i fumi di combustione, ad esempio nel caso degli oli vegetali, e i processi di affumicatura con i metodi tradizionali. Negli alimenti non sottoposti a trasformazione, la presenza degli IPA è essenzialmente dovuta a contaminazione ambientale. Nel caso di alimenti di

origine vegetale (grano, frutta, verdure e ortaggi), la contaminazione si verifica inseguito a deposizione di materiale particolato atmosferico sulle colture situate in aree agricole inquinate o per assorbimento da suolo contaminato (es. per le patate); nei vegetali a foglia larga coltivati in prossimità di siti inquinati per attività industriale o per traffico veicolare si verificano tassi di contaminazione tra 10 e 100 µg/kg.

Nei prodotti ittici (mitili, pesci e crostacei) la contaminazione ambientale si verifica per assorbimento da acque inquinate dalle deposizioni atmosferiche, dal dilavamento della rete stradale, dalle raffinerie, da prodotti petroliferi e da riversamenti di scarichi industriali; pesci che vivono in acque non contaminate contengono ridottissime concentrazioni di IPA, mentre in aree inquinate il loro contenuto può aumentare da 1000 a 100.000 volte, specialmente in crostacei e molluschi bivalvi che non metabolizzano apprezzabilmente gli IPA e possono dunque accumularne elevate quantità.

L'eventuale presenza di IPA nell'acqua potabile è generalmente dovuta alla cessione dai rivestimenti, in catrame o bitume, delle condutture di distribuzione dell'acqua stessa (WHO,1998).

L'assunzione globale media è stata calcolata in riferimento al benzo(a)pirene (BaP), il quale è da tempo utilizzato come indicatore della classe degli IPA, per quanto riguarda sia i livelli di contaminazione, che il rischio cancerogeno.

L'assunzione globale media di BaP risulta essere approssimativamente intorno a 0,2 µg/persona al giorno. L'ingestione degli alimenti contribuisce a questa dose per circa il 90%; l'ingestione di acqua per meno dell'1%, risultando dunque una via di esposizione relativamente trascurabile. Il resto è attribuibile all'inalazione di aria.

Il WHO ha stimato un'assunzione totale di benzo(a)pirene di 104-307 ng/persona/giorno. Da alcuni studi di dieta totale condotti in cinque Paesi europei sui

singoli IPA, risultano assunzioni fino a 10 µg/persona/giorno per il benzo(a)pirene, il benzo(g,h,i)perilene, il pirene ed il fluorantene, e fino a 0,5 µg/persona/giorno per il dibenzo(a,h)antracene, l'indeno (1,2,3-cd)pirene, il benzo(k)fluorantene ed il benzo(a)antracene. In Italia, in particolare, si è stimata un'assunzione media di 3 µg/persona/giorno per gli IPA totali e di 1,4 µg/persona/giorno per gli IPA cancerogeni (Lodovici *et al.*, 1995).

4. CENNI DI NORMATIVA SULLA PRESENZA DEI CONTAMINANTI NEGLI ALIMENTI

L'UE si pone il difficile obiettivo di salvaguardare al massimo i consumatori senza per questo porre inutili difficoltà e limiti alla libera circolazione delle merci.

- contaminazione attraverso i prodotti chimici

L'atto comunitario di riferimento è Direttiva n. 76/769/CEE del Consiglio, del 27.07.76, (GU L 262, 27.09.1976), entrata in vigore il 03.08.79, emanata per tutelare la popolazione e l'ambiente nei confronti di alcune sostanze e preparati pericolosi e per garantire il buon funzionamento del mercato comune, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati Membri relative alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi. La Direttiva n. 76/769/CEE dà la definizione di sostanze (gli elementi chimici allo stato naturale ovvero ottenuti mediante lavorazioni industriali) e di preparati (i miscugli o le soluzioni composti da due o più sostanze); definisce il campo di applicazione e quando la direttiva non viene applicata; nell'Allegato riporta l'elenco dei prodotti disciplinati e le condizioni previste per l'immissione nel mercato; vieta l'uso e la commercializzazione dei PCB e dei PCT;

-Eliminare e limitare la produzione e l'uso degli inquinanti organici persistenti (POP)

Poiché i POP sono sostanze chimiche dotate di alcune proprietà tossiche che, contrariamente ad altri inquinanti, resistono alla degradazione e sono quindi particolarmente nocive per la salute umana e per l'ambiente; poiché si accumulano negli organismi viventi e si propagano per mezzo dell'aria, dell'acqua e delle specie migratrici, concentrandosi negli ecosistemi terrestri e acquatici, il problema che essi determinano oltrepassa le frontiere nazionali, rendendo indispensabile un intervento a livello internazionale.

La Decisione del Consiglio, del 14.05.2001, relativa alla firma, per conto della Unione Europea, della Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants – POP) ha essenzialmente lo scopo di proteggere la salute umana e l'ambiente dai POP garantendo l'eliminazione o la limitazione della produzione e dell'uso di dodici POP prioritari, prodotti intenzionalmente e non (la produzione involontaria di queste sostanze è legata a fonti di vario tipo, quali la combustione domestica o l'uso dei forni crematori), anche se nel lungo periodo la convenzione consentirà di individuare altri POP.

-Strategia comunitaria su diossine, furani e PCB

Le diossine, i furani ed i policlorobifenili (PCB), sostanze chimiche recentemente implicate in incidenti che hanno sottolineato i pericoli che comportano, sono al primo posto delle preoccupazioni dei cittadini europei perché hanno incidenze gravi e multiple sull'ambiente e la salute umana. Persistenti al degrado e particolarmente tossiche per le persone e l'ambiente, esse si accumulano negli organismi viventi alterandone le funzioni endocrine ed incidendo sulla riproduzione; esse hanno riconosciuti effetti cancerogeni: costituiscono 3 dei 12 POP registrati a livello internazionale. Nonostante esista già una

legislazione comunitaria in materia, la Commissione, con la Comunicazione del 24.10.2001, al Consiglio, al Parlamento europeo ed al Comitato economico e sociale su una strategia comunitaria su diossine, furani e policlorobifenili [COM(2001) 593 def. – non pubblicato nella Gazzetta ufficiale] ritiene comunque che vi siano lacune e sia urgente adottare misure supplementari per proteggere la salute umana e l'ambiente. È ritenuta necessaria una strategia integrata che dovrebbe permettere di controllare il problema delle diossine e dei PCB nei prossimi dieci anni valutando lo stato attuale dell'ambiente e dell'ecosistema; riducendo a breve termine l'esposizione umana a queste sostanze mantenendola a medio e lungo termine a livelli inoffensivi; riducendo gli effetti sull'ambiente. La strategia stabilisce anche un obiettivo quantitativo: riportare la quantità di queste sostanze assorbita settimanalmente dall'uomo al di sotto di 14 picogrammi OMS-TEQ/Kg di peso corporeo. Vengono previste azioni a breve, medio e lungo termine. Le azioni a breve e a medio termine, previste per un periodo di cinque anni, hanno come scopo la prosecuzione del censimento delle fonti di diossine e di PCB; la valutazione dei progetti; la gestione dei rischi; la ricerca; l'informazione; la cooperazione con i paesi terzi e le organizzazioni internazionali.

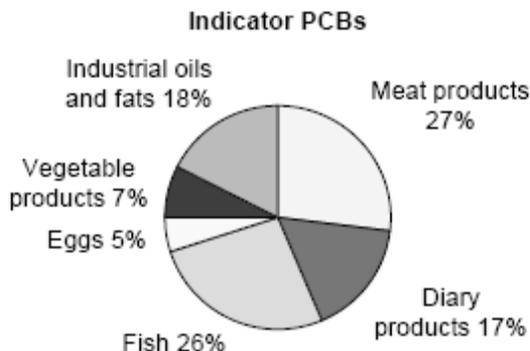
Le azioni a lungo termine, della durata di dieci anni, hanno lo scopo di raccogliere dati riguardanti il livello di contaminazione da diossine/PCB dell'aria, dell'acqua (sedimenti) e del suolo; di sorvegliare il livello di contaminazione dell'aria, dell'acqua (sedimenti) e del suolo; di elaborare altre misure relative alle fonti di diossine e di PCB e di misure per rafforzare la tutela dei consumatori, in particolare rispetto ai prodotti alimentari. Poiché i prodotti alimentari di origine animale sono una delle principali fonti di esposizione dell'essere umano alle diossine ed ai PCB, una parte della strategia globale concerne le misure volte a ridurre la presenza di queste sostanze lungo la catena alimentare. Le

disposizioni legislative emanate riposano su tre elementi essenziali: la fissazione di concentrazioni massime nei prodotti per l'alimentazione animale ed i prodotti alimentari; la fissazione di soglie di contaminazione che fungono da dispositivi d'allarme rapido per segnalare concentrazioni di diossine superiori ai valori ammissibili; la definizione di obiettivi di concentrazione da raggiungere nel tempo per riportare l'esposizione della maggior parte della popolazione ai limiti raccomandati dai comitati scientifici.

Per quanto riguarda la presenza dei PCB 7 congeneri target negli alimenti di origine animale, la Decisione della Commissione n. 449 del 9 luglio 1999 stabilisce un limite (somma dei 7 congeneri) di 200 ng/g grasso in pollo e derivati e di 100 ng/g grasso in latte e derivati. La Commissione delle Comunità Europee raccomanda che gli Stati membri assicurino, a partire dall'anno 2007 e fino al 31 dicembre 2008, il monitoraggio dei livelli di base di diossine, furani e bifenili policlorurati (PCB) diossina-simili nelle derrate alimentari e che gli Stati membri procedano anche all'analisi dei PCB non diossina-simili nelle medesime matrici (2006/794/CE).

In uno studio condotto da Baars et al. (2004) è riportato il contributo medio stimato per alcuni tipi di alimenti, all'intake dei PCB target.

Figura 2. Contributo medio di alcuni gruppi di alimenti all'intake di NDL-PCB (7 congeneri target)



-Idrocarburi Policiclici Aromatici

Per quanto concerne gli Idrocarburi Policiclici Aromatici, lo Scientific Committee for Food (SCF) ha concluso nel parere del 4 dicembre 2002 (35) che vari IPA sono agenti cancerogeni genotossici. Secondo l'SCF, il benzo(a)pirene può essere utilizzato come marcatore della presenza e dell'effetto di IPA cancerogeni negli alimenti, quali il benzo(a)antracene, il benzo(b)fluorantene, il benzo(j)fluorantene, il benzo(k)fluorantene, il benzo(g,h,i)perilene, il crisene, il ciclopenta(c,d)pirene, il dibenz(a,h)antracene, il dibenzo(a,e)pirene, il dibenzo(a,h)pirene, il dibenzo(a,i)pirene, il dibenzo(a,l)-pirene, l'indeno(1,2,3-cd)pirene e il 5-metilcrisene.

L'importanza del problema della contaminazione degli alimenti da benzo (a) pirene, è evidenziata dall'attenzione rivolta recentemente dall'Unione Europea alla definizione di limiti di concentrazione in diverse categorie di alimenti (2006/1881/CE). Tali limiti

risultano compresi tra 1,0 µg/kg (alimenti per l'infanzia) e 10,0 µg/kg (molluschi bivalvi). Tra questi, non sono stati ancora presi in considerazione i derivati del latte.

Tabella 4. Limiti massimi di concentrazione di IPA in diverse categorie di alimenti(2006/1881/CE)

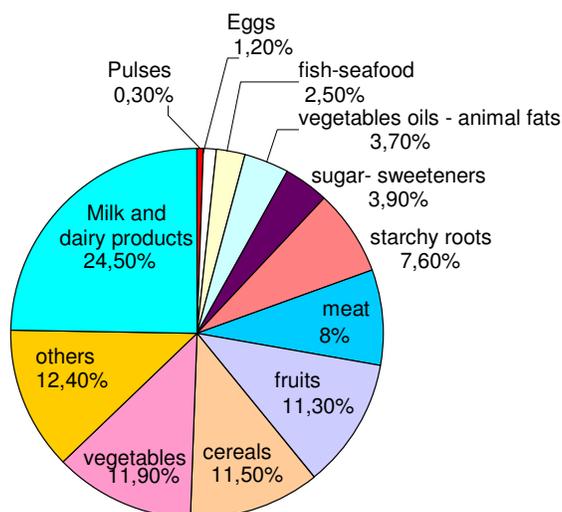
Parte 6: Idrocarburi policiclici aromatici

Prodotti alimentari		Tenori massimi (µg/kg di peso fresco)
6.1	Benzo(a)pirene ⁽³⁵⁾	
6.1.1	Oli e grassi (escluso il burro di cacao) destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0
6.1.2	Carni affumicate e prodotti a base di carni affumicate	5,0
6.1.3	Muscolo di pesce affumicato e prodotti della pesca affumicati ⁽²⁵⁾ ⁽³⁶⁾ , esclusi i molluschi bivalvi. Il tenore massimo si applica ai crostacei affumicati, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>).	5,0
6.1.4	Muscolo di pesce ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ non affumicato	2,0
6.1.5	Crostacei e cefalopodi non affumicati ⁽²⁶⁾ . Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>).	5,0
6.1.6	Molluschi bivalvi ⁽²⁶⁾	10,0
6.1.7	Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini ⁽³⁾ ⁽²⁹⁾	1,0
6.1.8	Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento ⁽⁸⁾ ⁽²⁹⁾	1,0
6.1.9	Alimenti dietetici a fini medici speciali ⁽⁹⁾ ⁽²⁹⁾ destinati specificatamente ai lattanti	1,0

5. IL SETTORE DEI PRODOTTI LATTIERO–CASEARI

Il settore dei lattiero–caseari, riveste notevole importanza nell'alimentazione Europea, come si evince dai dati FAO (2002) rappresentati in Figura 3.

Figura 3. Consumo percentuale di gruppi di alimenti negli stati membri (15 Paesi)UE (FAO, 2002)



Il latte nell'immaginario del consumatore è un alimento puro e naturale che insieme ai suoi derivati costituisce fin dai tempi remoti, una parte importante della dieta, o addirittura "la dieta". Tradizionalmente sottoposto ad attenzione in quanto potenziale veicolo di agenti patogeni, è un fedele specchio dell'ecosistema che lo circonda, dell'ambiente e delle pratiche che portano alla produzione di alimenti per animali (Pinelli et al., 2005). Alcune sostanze indesiderate, sia che abbiano o meno effetti

negativi sulla salute animale, possono essere secrete dopo la metabolizzazione attraverso l'animale stesso ed il suo apparato emuntorio: i loro residui potrebbero in alcuni casi incidentali avere effetto sulla sicurezza dei consumatori.

La via alimentare di trasmissione dei contaminanti riguarda particolarmente le aflatossine ed in genere le micotossine, ma incidenti più o meno recenti hanno riguardato metalli pesanti, diossine, pesticidi e policlorobifenili (PCB).

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) vengono citati fra i possibili inquinanti derivanti dalla preparazione di mangimi complementari. Residui di medicinali ed antibiotici, utilizzati senza idonea gestione per la cura degli animali, oltre certi limiti possono anche avere effetti negativi sulla produzione di prodotti fermentati o assumere una certa importanza sanitaria per il consumo. E' importante che la presenza di residui e contaminanti nel latte e nei suoi derivati sia la più bassa possibile e venga pertanto monitorata in modo mirato con frequenza adeguata al rischio.

Insieme al latte, anche i suoi derivati costituiscono alimenti di spicco nella dieta generale, in particolare yogurt e bevande fermentate, nonché formaggi di diversa natura, siano essi freschi, stagionati, molli, a pasta dura...

Così come in Paesi come Francia e Olanda, in Italia sono prodotti molti formaggi tradizionali; la mozzarella di bufala è uno dei più noti formaggi italiani, prodotta nelle regioni italiane del sud come Campania (province di Caserta, Salerno, Benevento e Napoli) e basso Lazio (province di Frosinone e Latina). Dal 1996 la "mozzarella di bufala campana" ha ottenuto il marchio DOP (Reg. 1107/96) e di conseguenza la sua produzione è regolamentata da un disciplinare di produzione nel quale è stabilito che la mozzarella deve essere prodotta a partire esclusivamente da latte proveniente da bufale

allevate nella suddetta zona. Essa rappresenta un fiore all'occhiello del prodotto "made in Italy".

6. OBIETTIVO DELLA TESI

Tale lavoro di tesi scaturisce dall'interesse che frequentemente è suscitato dai tanti episodi di contaminazione (vera o presunta) attribuita ai prodotti della nostra Regione ed in particolare a quelli provenienti dall'areale del casertano. Nella Regione Campania, infatti, fra Napoli e Caserta ci sono 12.000 ettari di terreno a rischio dove si sono registrati numerosi episodi di incenerimento di rifiuti anche tossici. Nel 2002, nell'ambito del Programma Nazionale di Controllo di Residui negli Alimenti, predisposto dal Ministero della Salute in Campania, sono stati riscontrati livelli di diossina superiori ai limiti previsti dalla normativa comunitaria vigente (Reg.CE 2375/01) in due campioni di latte di massa ovicaprino. Successivamente, a seguito di ulteriori analisi effettuate dalle autorità sanitarie, si è constatato che la contaminazione del latte riguardava anche altre specie animali, come bovini e bufalini, all'interno di un'area geografica più estesa comprendente il territorio di 24 comuni del napoletano e del casertano.

Tale emergenza sanitaria ha fatto emergere l'interesse nell'indagare sull'eventuale contemporanea presenza di NDL-PCB in tale zona. Sette congeneri non diossina simili, sono infatti ritrovati principalmente nelle matrici alimentari di origine animale e sono considerati "congeneri target" e quindi "indicatori" di una diffusa presenza di PCB nelle matrici considerate. Come precedentemente riportato, l'UE ha proposto un limite per la presenza dei 7 congeneri target espressi come somma, in alcuni alimenti ed in particolare ha stabilito un limite di 100 ng/g grasso per latte e derivati, indicando che un

eventuale superamento di tali valori, deve indurre ad indagare sulla eventuale contemporanea presenza delle diossine.

Il presente lavoro di tesi è stato volto a valutare la eventuale esistenza e l'entità del fenomeno della contaminazione di latte e mozzarelle di bufala provenienti dai tipici areali di produzione campani, in particolare per quanto attiene la presenza dei 7 PCB congeneri target e di altri contaminanti di origine ambientale quali gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sul cui profilo tossicologico è stato detto precedentemente.

7. MATERIALI E METODI

7.1. CAMPIONAMENTO

Nel periodo febbraio 2005 – marzo 2006 è stato effettuato il campionamento presso caseifici situati nei due areali del casertano e del salernitano. Sono stati contattati i funzionari dei Servizi Veterinari ed i Servizi di Igiene degli Alimenti e della Nutrizione delle AASSLL competenti per territorio, in collaborazione con i quali è stato steso un programma operativo, che consentisse: a) visite alle aziende; b) rilevamento di dati inerenti i processi produttivi applicati in azienda; c) prelievo di campioni. I caseifici considerati producevano tutti mozzarella di bufala a marchio DOP e la produzione era destinata alla vendita al mercato locale e nazionale (caseifici di piccola-media dimensione) o in alcuni casi anche estero (caseifici di media-grande dimensione). Tra le aziende contattate nel casertano, hanno aderito all'iniziativa 15 caseifici, rappresentanti il 25% dei caseifici aderenti al consorzio DOP dell'areale, di cui 2 di media dimensione, 3 di piccola dimensione e 10 di dimensione industriale; analogamente si è proceduto al campionamento di 15 caseifici del salernitano, rappresentanti il 30% dei caseifici a

marchio DOP della zona, di cui 4 di piccola dimensione, 9 di media dimensione e 2 industriali. Sono stati effettuati sopralluoghi in azienda e studiati i processi applicati, gli ambienti utilizzati, le attrezzature e le modalità di lavoro. Per ciascuna azienda, si è proceduto al campionamento di mozzarella di bufala prodotta in giornata e del latte della lavorazione corrispondente, prelevato prima dell'avvio della lavorazione, dai contenitori di stoccaggio. In totale si sono collezionati 30 campioni di latte di bufala e 30 campioni di mozzarella di bufala.

7.2. ALLESTIMENTO DEI CAMPIONI ANALITICI

Tutti i campioni sono stati opportunamente etichettati, posti in contenitori di vetro e refrigerati fino all'arrivo in laboratorio dove sono stati sottoposti alla procedura di allestimento del campione analitico. I campioni di latte sono stati suddivisi in aliquote da 10 ml e liofilizzati. I campioni di mozzarella, pesati e classificati, sono stati omogeneizzati e suddivisi in aliquote da 5 g. I campioni analitici così ottenuti sono stati liofilizzati e conservati a temperatura ambiente per la successiva determinazione analitica dei PCB e degli IPA.

Sui campioni di mozzarella è stata determinata l'umidità sottoponendo i campioni omogeneizzati al riscaldamento in muffola a 102°C misurando le variazioni di peso fino al raggiungimento di un peso costante.

7.3. RICERCA E DOSAGGIO DEI PCB

I campioni liofilizzati sono stati sottoposti alla metodica analitica per la ricerca ed il dosaggio dei 7 congeneri PCB target adottando il metodo dell'Istituto Superiore di Sanità con alcune modifiche. Sono stati ricercati i 7 congeneri IUPAC PCB n. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180.

a) Estrazione della fase lipidica.

La fase lipidica è stata estratta dai campioni di latte e di mozzarella mediante estrazione in etere di petrolio ed acetone, seguita da centrifugazione in tre tempi successivi a 1600 r.p.m. per 15 minuti. Il surnatante è stato fatto passare su una colonna impaccata con Na₂SO₄ anidro, raccolto in un pallone precedentemente condizionato e pesato, e concentrato sottovuoto a 40°C con evaporatore rotante. Il pallone contenente l'estratto è stato pesato ed è stata calcolata la quantità di grasso estratto per differenza. L'estratto così ottenuto, è stato addizionato di 1 ml di etere di petrolio ed è stato sottoposto ad una doppia purificazione.

b) Purificazione

La prima purificazione è stata effettuata mediante passaggio su colonnine preimpaccate Extrelut NT1 ed Extrelut NT3 a cui sono stati aggiunti 0,36 g di C18, usando acetonitrile come eluente. L'estratto così purificato è stato concentrato sottovuoto a 50°C con evaporatore rotante e successivamente disciolto in 1 ml di esano. Nel frattempo è stata preparata la colonna cromatografica con Florisil (attivato per 12 ore) e Na₂SO₄, su cui gli estratti sono stati caricati e successivamente eluiti con 30 ml di esano. Il campione così purificato è stato concentrato sottovuoto a 40°C previa aggiunta di 1 ml di isoottano, e ad esso è stato aggiunto lo standard interno, il PCB 209.

c) Dosaggio

La ricerca ed il dosaggio dei PCB sono stati effettuati per mezzo di gas cromatografia capillare, utilizzando un gas-cromatografo Hewlett-Packard 5890 serie II, munito di rilevatore a cattura di elettroni, con colonna capillare HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane) di 30 metri di lunghezza, diametro interno 0.32 mm e spessore del film di 0.25 μm . Di ciascun campione purificato è stato iniettato 1 μl . L'analisi è stata effettuata nelle seguenti condizioni: Temperatura iniettore 300°C, Temperatura Detector ECD 320°C. I gradienti di temperatura sono stati programmati secondo il seguente schema: Temperatura iniziale 60°C per 2 minuti, incremento di 10°C/minuto fino a 170°C; incremento di 2°C/minuto, fino a 210°C ; incremento di 15°C/minuto, fino a 260°C; resta a 260°C per 20 minuti. Come gas di trasporto è stato impiegato l'elio, con un flusso in colonna di 1.8 ml/minuto e come gas di make up argon-metano (95+5), con flusso di 30.5 ml/minuto. Per la calibrazione dello strumento, per la determinazione dei recuperi e per la quantificazione sono state usate soluzioni standard di riferimento dei singoli congeneri di PCB (Dr. Ehrenstorfer GmbH Labservice Analitica S.r.l. Angola Emilia, Bologna). Per determinare la percentuale di recupero, sono stati estratti ed analizzati campioni di latte e di mozzarella addizionati di miscela standard a tre diverse concentrazioni; il recupero ottenuto è stato di $80 \pm 7\%$.

Il limite di rilevabilità (LOD) dei PCB è variato tra 0,09 ng/g grasso per i congeneri 52, 101, 138, 153, 180 e 0,60 ng/g grasso per i congeneri 28, 118, mentre il limite di quantificazione (LOQ) è variato tra 0,1 ng/g grasso per i congeneri 101, 138, 153, 180 e 0,85 ng/g grasso per i congeneri 28, 118. I risultati relativi alle due zone di campionamento considerate sono espressi in ng/g di peso fresco ed in ng/g di grasso; i

risultati sono riportati come non detectable dosabili (n.d.) quando le concentrazioni sono risultate inferiori al LOD.

7.4. RICERCA E DOSAGGIO DEGLI IPA

Latte e mozzarella sono stati analizzati per la ricerca ed il dosaggio di 16 IPA (naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, benzo(g,h,i)perilene, dibenzo(a,h)antracene, indeno(1,2,3cd)pirene), secondo il seguente protocollo analitico:

a) Estrazione della fase lipidica.

Ai campioni liofilizzati posti in appositi tubi digestori sono stati addizionati 20 ml di EtOH, 0,4 ml di Na₂S e 3,5 ml di una soluzione di KOH al 50 % in H₂O; la miscela è stata riscaldata a 100° C a ricadere in apparecchio digestore ECO 6 Velp Scientifica, Microtech srl, Napoli, per 150 minuti.

Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la fase liquida è stata accuratamente decantata in imbuto separatore ed il residuo presente nel tubo digestore è stato lavato in sequenza con 15 ml di n-esano, 15 ml di H₂O distillata e 4 ml di EtOH che sono stati a loro volta trasferite nell'imbuto separatore. Si è proceduto, quindi, all'estrazione, aggiungendo 15 ml di n-esano, agitando vigorosamente per 2 min, lasciando separare la fase organica, che è stata trasferita in un secondo imbuto separatore. L'estrazione è stata ripetuta per altre due volte con analoghe modalità, rispettivamente con 15 ml e 10 ml di n-esano. Gli estratti organici riuniti sono stati dibattuti con 10 ml di H₂O distillata, la fase acquosa eliminata, mentre quella organica, filtrata su Na₂SO₄ anidro, è stata trasferita in un palloncino e concentrata ad un volume di 3-5 ml in rotavapor a 40 °C.

b) Purificazione

La purificazione dell'estratto è stata effettuata mediante cromatografia su gel di silice ottenuta impaccando una colonna di vetro (h 30 cm, Ø 1,5 cm) con 8 g di gel di silice attivato a 140 °C per 180 minuti sospeso in 10 ml di n-esano; dopo aver caricato l'estratto, questo è stato eluito lentamente con 30 ml di etil-etero in esano al 10 %, raccogliendo l'eluato in un palloncino da rotavapor. Il solvente è stato fatto evaporare, prima sottovuoto a 40 °C fino a circa 5 ml e, poi, portato a secco sotto un flusso blando di azoto e ripreso con 1 ml di acetonitrile.

c) Dosaggio

La ricerca ed il dosaggio degli IPA negli estratti purificati e concentrati è stata effettuata mediante HPLC su colonna di acciaio da 25 cm, di. 4,6 mm (Supelcosil-LC IPA C18 5 µm) utilizzando un apparecchio SHIMADZU LC 10 ATVP con rivelatore UV-Visibile (modello SPD-10 AVP) a 254 nm e con fluorimetro (modello RF-10 AXL) a lunghezza d'onda di eccitazione 300 nm e di emissione 425 nm.

L'eluizione è avvenuta ad un flusso di 1 ml/min in gradiente mediante miscela binaria acqua/acetonitrile nelle seguenti condizioni: 50:50 (v:v) per 5 min, fino al 100% di acetonitrile in 25 minuti; per 15 minuti al 100 % di acetonitrile; ritorno al 50:50 (v:v) acqua/acetonitrile in 5 minuti.

La determinazione qualitativa è stata effettuata per confronto dei tempi di ritenzione con quelli di una miscela di composti standard (RESTEK CORPORATION – Benner Circle, PA, USA). La determinazione quantitativa è effettuata per confronto con una apposita curva di calibrazione. I limiti di determinazione (LOD) sono variati da un minimo di 0,010 ng/g peso fresco (p.f.) per il benzo(a)pirene) ad un massimo di 0,200 ng/g p.f. per il naftalene, mentre il limite di quantificazione (LOQ) è variato tra un valore minimo di

0,02 ng/g p.f. per il benzo(a)pirene) ad un massimo di 0,5 ng/g p.f. per il naftaline. I risultati inferiori al LOD sono definiti non dosabili (n.d.).

8. RISULTATI

I risultati relativi ai tassi di grasso ed all'umidità sui campioni di mozzarella, sono riportati in Tabella 5.

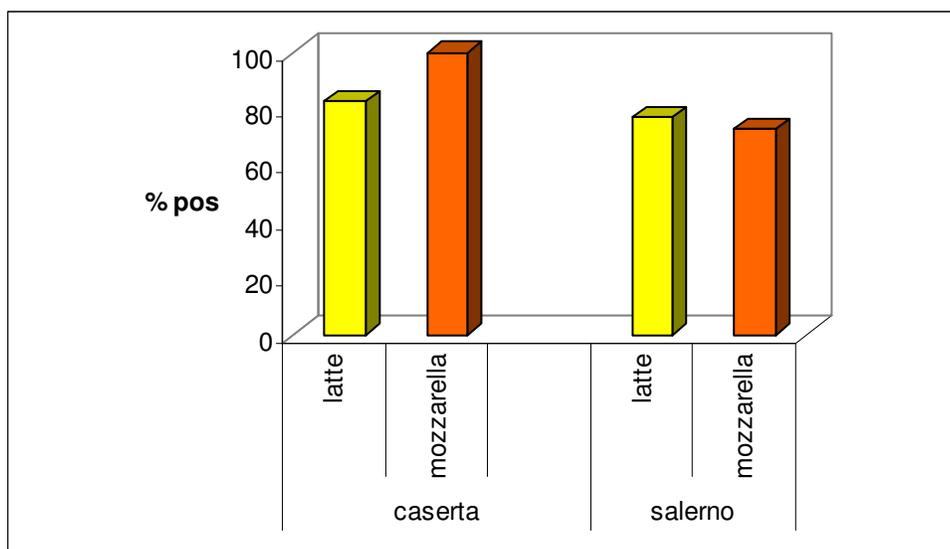
Tabella 5. Percentuale media di grasso estratto (g %) e percentuali di umidità riscontrate nei campioni di mozzarella analizzati.

	Grasso estratto g % (media ± D.S.)	Umidità g % (media ± D.S.)
Mozzarella Caserta	27,00 ± 2,95	53,00 ± 1,73
Mozzarella Salerno	30,00 ± 3,81	50,00 ± 2,15

8.1. PCB

Considerando la percentuale di contaminazione da PCB in tutti i campioni considerati (figura 4), si può notare che i campioni di Caserta hanno presentato una maggiore prevalenza di contaminazione rispetto ai campioni di Salerno. In particolare, considerando l'area di Caserta, l'83% dei campioni di latte e il 100% di quelli di mozzarella sono risultati contaminati da almeno uno di PCB indagati, mentre per i campioni prelevati presso le aziende di Salerno, il 77% di quelli di latte ed il 73% di quelli di mozzarella hanno presentato contaminazione da almeno uno di PCB indagati.

Figura 4. Prevalenza della contaminazione da Σ NDL-PCB in tutti i campioni analizzati



Le concentrazioni di PCB riscontrate nei campioni di latte e di mozzarella di bufala analizzati, per la somma dei 7 congeneri target, sono riportate in Tabella 6. In tale tabella sono riportati i risultati relativi alle due zone di campionamento considerate, espressi in ng/g di peso fresco ed in ng/g di grasso.

La concentrazione dei congeneri considerati (Σ PCB), espressa come mediana, nei campioni di latte campionati nel casertano, è stata pari a 12,75 ng/g grasso, ed il range di contaminazione compreso tra n.d. e 43,71 ng/g grasso. Nei campioni di latte del salernitanola Σ PCB ha mostrato concentrazione mediana pari a 13,54 ng/g grasso in un range di valori di contaminazione compreso tra n.d. e 34,00 ng/g grasso. Nei campioni di mozzarella di Caserta le concentrazioni della Σ PCB hanno mostrato valori di mediana pari a 30,60 (range compreso tra 5,87 ng/g grasso e 99,83 ng/g grasso), mentre nei campioni di Salerno si sono riscontrati valori di mediana pari a 9,66 ng/g grasso (range tra n.d. e 67,74 ng/g grasso).

Tabella 6. Contaminazione da Σ NDL-PCB in campioni di latte e mozzarella di bufala prodotti nelle province di Caserta e di Salerno

Σ PCBs (7 congeneri target)							
Zona di origine	campioni	Mean \pm S, D, ng g ⁻¹ p.f.	Median ng g ⁻¹ p.f.	Range ng g ⁻¹ p.f.	Mean \pm S, D, ng g ⁻¹ grasso	Median ng g ⁻¹ grasso	Range ng g ⁻¹ grasso
Caserta	latte	0,97 \pm 0,83	0,77	*n.d. – 3,06	16,21 \pm 12,20	12,75	**n.d. – 43,71
	Mozzarella	8,91 \pm 6,59	6,25	1,41 – 23,37	42,27 \pm 38,61	30,60	5,87- 99,83
Salerno	latte	0,70 \pm 0,41	0,68	*n.d. – 1,28	13,54 \pm 9,24	13,54	**n.d. – 34,00
	Mozzarella	4,28 \pm 5,67	2,82	0,55 – 22,56	13,49 \pm 17,34	9,66	**n.d. – 67,74

Si sono poi considerate la prevalenza e le concentrazioni medie dei singoli 7 congeneri target riscontrate in tutti i campioni (figure 5, 6). Considerando i congeneri basso clorurati, nei campioni di Caserta il PCB 28 è stato riscontrato nel 58% dei campioni di latte e nell'86% dei campioni di mozzarella, con valori mediani di concentrazione di 1.72 ng/g grasso e 10.63 ng/g grasso rispettivamente per latte e mozzarella. Il PCB 52 è risultato presente nel 42% dei campioni di latte e nel 46% dei campioni di mozzarella, con valori mediani di concentrazione rispettivamente di 0,62 ng/g grasso (latte) ed a 0,37 ng/g grasso (mozzarella). Il PCB 101 ha mostrato una prevalenza del 16% nei campioni di latte (mediana 0,52 ng/g grasso) e del 40% in quelli di mozzarella (mediana 0,33 ng/g grasso). Per quanto riguarda i congeneri a più alto grado di clorazione della molecola, il PCB 138 si è riscontrato nel 50% dei campioni di latte e nel 66% di quelli di mozzarella, con valori mediani di concentrazione pari a 0.62 ng/g grasso nel latte e 1.48 ng/g grasso nella mozzarella. Per il PCB 153, si è riscontrata una prevalenza di contaminazione del 58% nei campioni di latte e del 56% nei campioni di mozzarella, con valori mediani di concentrazione pari rispettivamente a 0,62 ng/g grasso (latte) ed a 0,31 ng/g grasso (mozzarella). La percentuale di contaminazione nei campioni di Caserta è risultata più bassa per i congeneri PCB 118 (1% latte e 7% mozzarella) e PCB 180 (0% latte e 7% mozzarella); i valori di contaminazione mediana per il PCB 118 sono stati pari a 0.87 ng/g grasso nei campioni di latte e 0.42 ng/g grasso nei campioni di mozzarella, mentre per il PCB 180 sono stati pari rispettivamente a 0.52 ng/g grasso e 0.29 ng/g grasso.

Figura 5. Prevalenza dei singoli congeneri di PCB nei campioni di Caserta

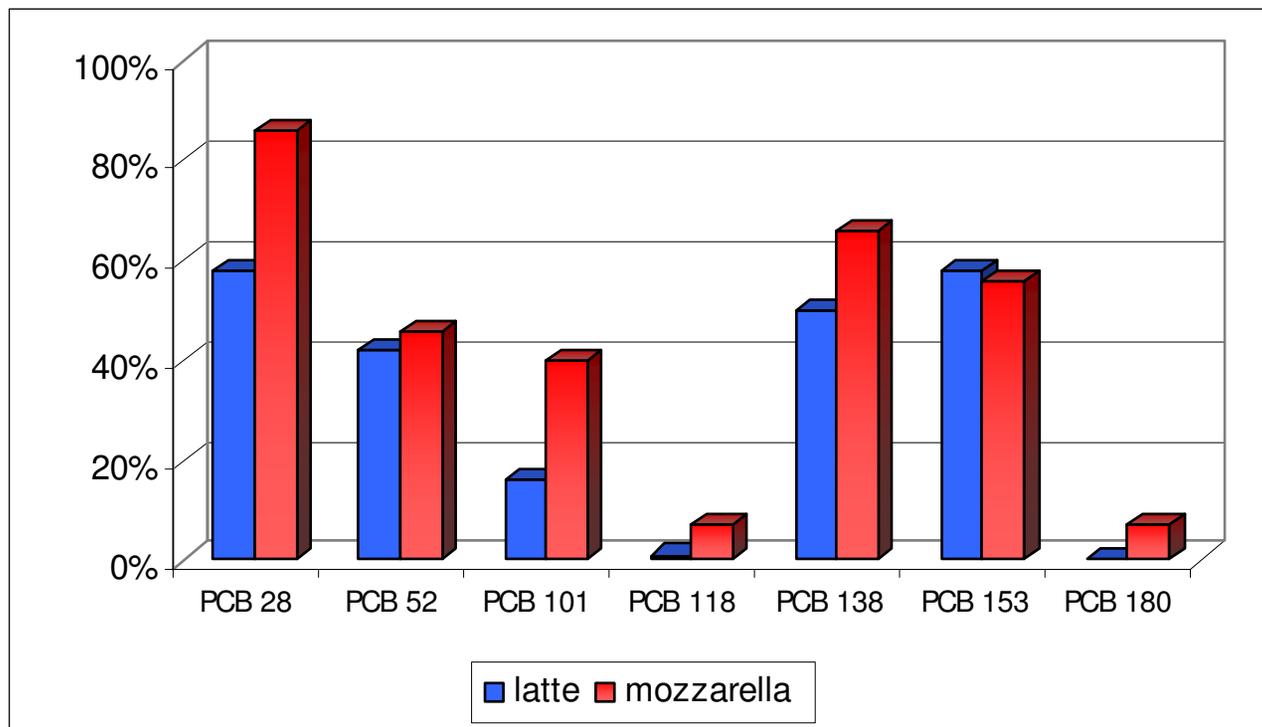
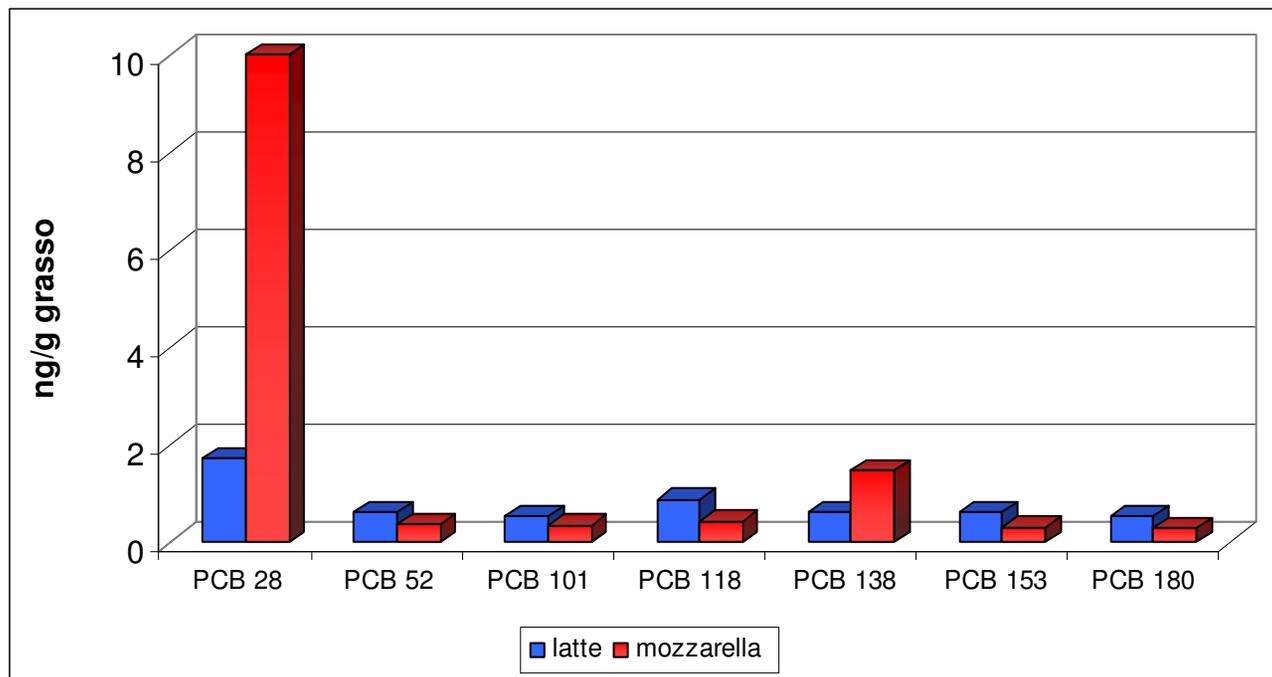


Figura 6. Concentrazione media (ng/g grasso) dei singoli congeneri PCB nei campioni di Caserta



Le stesse considerazioni sulla presenza dei singoli congeneri, sono state effettuate per i campioni prelevati nel salernitano (figure 7, 8). Per i congeneri basso clorurati, il PCB 28 è stato riscontrato nel 7% dei campioni di latte e nel 40% di quelli di mozzarella, con valori di concentrazione pari rispettivamente a 0.85 ng/g grasso e 0.35 ng/g grasso; il PCB 52 ha presentato una prevalenza di contaminazione del 23% nei campioni di latte e del 20% in quelli di mozzarella con valori di concentrazione mediana pari rispettivamente a 0,53 ng/g grasso ed a 0,24 ng/g grasso. Il PCB 101 ha mostrato una prevalenza del 38% nei campioni di latte (mediana 0,61 ng/g grasso) e del 46% in quelli di mozzarella (mediana 0,31 ng/g grasso). Per quanto riguarda i congeneri che presentano un numero maggiore di atomi di Cloro sull'anello bifenilico, il PCB 138 si è riscontrato nel 69% dei campioni di latte e nel 60% di quelli di mozzarella, con valori medi di concentrazione pari a 1,50 ng/g grasso nel latte e 1.16 ng/g grasso nella mozzarella. Per il PCB 153, si è riscontrata una prevalenza di contaminazione del 69% nei campioni di latte e del 50% nei campioni di mozzarella, con valori medi di concentrazione pari rispettivamente a 1,34 ng/g grasso (latte) ed a 1,31 ng/g grasso (mozzarella). Nei campioni di Salerno si è riscontrata una maggiore presenza dei congeneri PCB 118 e 180 rispetto ai campioni di Caserta ed in particolare, il PCB 118 è stato riscontrato nel 30% dei campioni di latte (mediana 0.96 ng/g grasso) e nel 6% di quelli di mozzarella (mediana 0.34 ng/g grasso); il PCB 180 ha mostrato una prevalenza del 54% nei campioni di latte (mediana 0.77 ng/g grasso) e del 26% nei campioni di mozzarella (mediana 0.24 ng/g grasso).

Figura 7. Prevalenza dei singoli congeneri di PCB nei campioni di Salerno

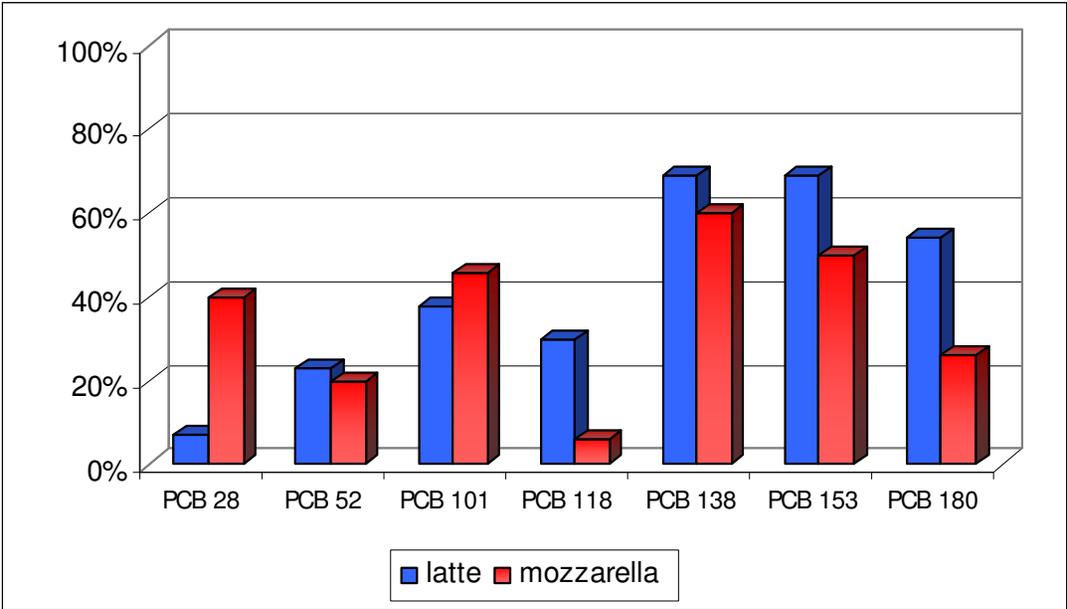
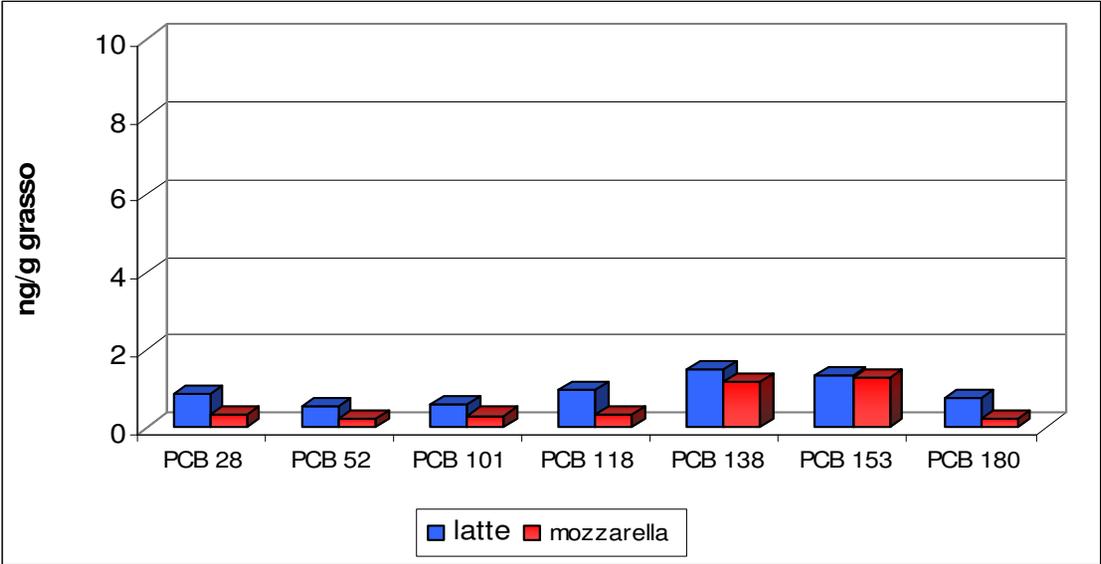


Figura 8. Concentrazione media (ng/g grasso) dei singoli congeneri PCB nei campioni di Salerno



Da quanto osservato emerge che in tutti i campioni considerati i congeneri più presenti sono risultati il PCB 138 ed il PCB 153; questi sono congeneri che hanno un alto grado di clorazione della molecola (esa-cloro bifenili) e per tale caratteristica, una volta introdotti, tendono ad essere più difficilmente degradati dagli organismi animali e, di conseguenza, ad essere eliminati più lentamente a causa della mancanza sul loro anello aromatico di posizioni non sostituite disponibili per l'attacco enzimatico. Quindi, i PCB esa ed epta sostituiti subiscono una clearance più lenta rispetto a quelli a più bassa clorazione e tendono perciò a rimanere più a lungo nell'organismo (per il PCB 153 è stata stimata un'emivita nel corpo umano di 27,5 anni); per questo motivo essi tendono ad accumularsi nei tessuti adiposi degli animali e ad essere trasferiti nel latte (Zuccato et al., 1999).

Nei campioni analizzati in questo lavoro, anche il PCB 28 è stato rinvenuto frequentemente a concentrazioni dosabili, soprattutto nei campioni di latte e mozzarella di Caserta, anche se rappresenta un congenere a basso grado di clorazione (tri-cloro); la sua presenza potrebbe essere messa in relazione all'età degli animali da cui deriva il latte, come conseguenza della loro esposizione. Infatti, è stato dimostrato che dopo molte settimane di esposizione ai NDL-PCB, nell'organismo si raggiunge uno stato di equilibrio in cui i PCB non vengono eliminati, dopodiché ha inizio la loro eliminazione che porta in un primo momento ad una riduzione dei livelli del 50%, per poi attestarsi su una fase di eliminazione più lenta. Negli animali in cui si ha un maggiore accumulo di grasso corporeo, come per esempio i vitelli o i pesci da allevamento, un livello costante non viene mai raggiunto perché essi sono macellati in giovane età.

E' inoltre importante sottolineare che il PCB 28 è un mono-orto sostituito e quindi con caratteristiche del tutto identiche ai PCB diossina-simili, anche se non riconosciuto come

tale (Baars et al., 2004); tra i congeneri di PCB target, vi è il PCB 118 che rappresenta un PCB diossina-simile ed in quanto tale indicatore della presenza di diossine è considerato quindi il più tossico dei congeneri indagati, a cui è stato attribuito un valore di TEF (Fattore di Tossicità Equivalente) di 0,0001; il TEF viene calcolato in riferimento alla diossina che assume il valore di 1. Dal TEF è possibile calcolare il TEQ (Tossicità Equivalente) che rappresenta la tossicità del singolo congenere considerato ed è data dal prodotto tra la concentrazione del singolo composto ed il relativo TEF. Con riferimento ai campioni analizzati in questo lavoro, si può affermare che la presenza del PCB 118 è risultata piuttosto modesta; in particolare, è stata considerata la concentrazione mediana riscontrata per il PCB 118 nei campioni di latte e di mozzarella delle 2 zone considerate ed è stato calcolato il contributo del PCB 118 al valore del TEQ, come riportato in Tabella 7.

Tabella 7. Valori di contaminazione (mediana) da PCB 118 e Tossicità Equivalente

Zona di produzione	Prodotto	Mediana ng g⁻¹grasso	PCB 118 TEQ
Caserta	Latte	0,87	0,000087
	Mozzarella	0,42	0,000042
Salerno	Latte	0,96	0,000096
	Mozzarella	0,34	0,000034

E' stata poi effettuata l'analisi statistica sui campioni considerati al fine di evidenziare eventuali differenze significative tra i campioni provenienti dalle due diverse zone di produzione. Non sono emerse differenze significative di contaminazione da NDL-PCB tra i campioni di latte prelevati a Caserta e quelli prelevati a Salerno ($p=0.5$); tale differenza è invece emersa dal confronto tra i campioni di mozzarella ($p=0.014$). Ciò potrebbe essere messo in relazione al fatto che durante il campionamento, non si è avuta la possibilità di seguire per intero il ciclo produttivo, i campioni sono stati prelevati a random ed il latte campionato era quello contenuto nei contenitori di stoccaggio; per tale motivo non si può essere del tutto sicuri che la mozzarella sia stata ottenuta esclusivamente dal latte campionato, o se in fase di lavorazione siano state effettuate aggiunte di latte di altra provenienza o di cagliata grassa, visto che tale tecnica è spesso utilizzata per aumentare la resa del prodotto finale.

E' importante ribadire che, il settore preso in considerazione è soggetto ad una carenza in campo legislativo ed a tutt'oggi esiste un solo limite proposto per la presenza dei NDL-PCB nei prodotti alimentari. Tale limite, proposto dalla Commissione Europea (1999/449/EC), è pari a 100 ng/g di grasso per la somma dei 7 PCB target in prodotti quali latte e derivati; ciò è sicuramente legato al fatto che non sono stati effettuati molti studi sull'argomento e quindi c'è una relativa carenza di dati anche perché solo recentemente si sta cominciando a focalizzare l'attenzione su questo tipo di contaminanti, in relazione alla maggiore consapevolezza del loro contributo alla tossicità equivalente. Negli ultimi anni si è infatti rivolta una crescente attenzione a questo problema tanto che la Commissione Europea ha chiesto al Comitato Scientifico sugli Alimenti di effettuare uno studio per valutare la tossicità dei NDL-PCB per l'uomo identificando le principali fonti alimentari e la loro relativa importanza nella dieta.

Inoltre, considerando che l'attuale calcolo del TEQ è effettuato considerando solo la somma della diossina e dei PCB diossina-simili, si sta cercando di rivalutare tale concetto, inserendo nel calcolo del TEQ anche il concetto di "dose additiva", data dal contributo di composti diversi dalla diossina e, primi tra tutti i NDL-PCB (EFSA Scientific Colloquium, 2004).

Dall'analisi dei dati ottenuti su tutti i campioni analizzati in questo studio, si può affermare comunque che le concentrazioni di NDL-PCB riscontrate sono risultate tutte inferiori al limite.

8.2. IPA

I risultati riscontrati nei campioni considerati, per la presenza dei 16 IPA oggetto di analisi sono riportati in Tabella 8, espressi come somma dei 16 IPA (Σ IPA) in ng/g di peso fresco (p.f.) e gli stessi sono riportati come non dosabile (n.d.) quando le concentrazioni sono risultate inferiori al LOD. La prevalenza della contaminazione dalla dai 16 IPA indagati (Σ IPA) è riportata in Figura 9.

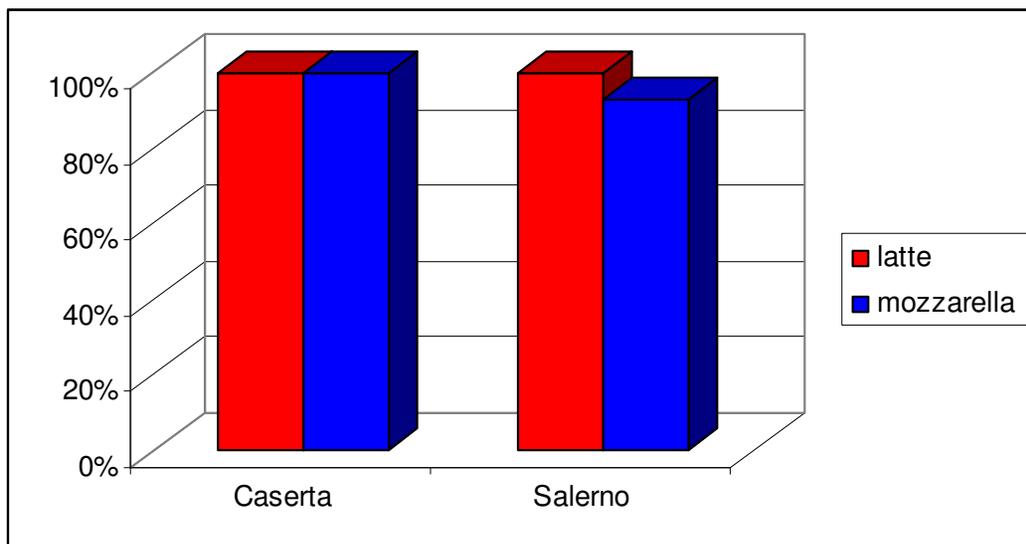
Tutti i campioni prelevati a Caserta sono risultati contaminati da almeno uno dei 16 IPA con concentrazioni mediane pari a 0,82 ng/g p.f. nei campioni di latte ed a 0,84 ng/g p.f. nei campioni di mozzarella. Per i campioni di Salerno, il 100% dei campioni di latte ed il 93% di quelli di mozzarella sono risultati contaminati da almeno uno dei 16 IPA con valori di concentrazione mediana pari a 0,84 ng/g p.f. nel latte ed a 1,53 ng/g p.f. nella mozzarella di bufala. La contaminazione ha mostrato un range di valori poco variabile, in particolare compreso tra valori inferiori al limite di rilevabilità, ad un massimo di 4,9 ng/g p.f.

Tabella 8. Contaminazione da $\Sigma 16$ IPA in campioni di latte e mozzarella di bufala prodotti nelle province di Caserta e di Salerno

Zona di origine	campioni	Media \pm D.S. ng g⁻¹p.f.	Mediana ng g⁻¹p.f.	Range ng g⁻¹p.f.
Caserta	Latte	0,82 \pm 0,34	0,82	0,29 – 1,38
	Mozzarella	1,053 \pm 0,63	0,84	0,29 – 2,27
Salerno	Latte	0,85 \pm 0,33	0,84	0,22– 1,62
	Mozzarella	1,95 \pm 1,70	1,53	n.d. – 4,90

n.d.< LOD

Figura 9. Percentuale di contaminazione da $\Sigma 16$ IPA in campioni di latte e mozzarella di bufala prodotti nelle province di Caserta e di Salerno



Sono stati poi considerati i valori di contaminazione relativi alla somma dei 7 IPA cancerogeni negli stessi campioni (Tabella 9); in particolare tale somma è costituita da: benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, dibenzo(a,h)antracene, indeno(1,2,3cd)pirene). E' risultato che i valori di contaminazione sono variati da valori inferiori al limite di rilevabilità ad un valore massimo pari a 0,79 ng/g riscontrato nei campioni di mozzarella di Salerno. Il latte e la mozzarella di Caserta hanno presentato valori di contaminazione mediana da Σ IPA cancerogeni pari rispettivamente a 0,05 ng/g p.f. ed a 0,33 ng/g p.f.; per i campioni di Salerno le concentrazioni per la somma degli IPA cancerogeni sono risultate pari a 0,07 ng/g p.f. nei campioni di latte ed a 0,11 ng/g p.f. nei campioni di mozzarella.

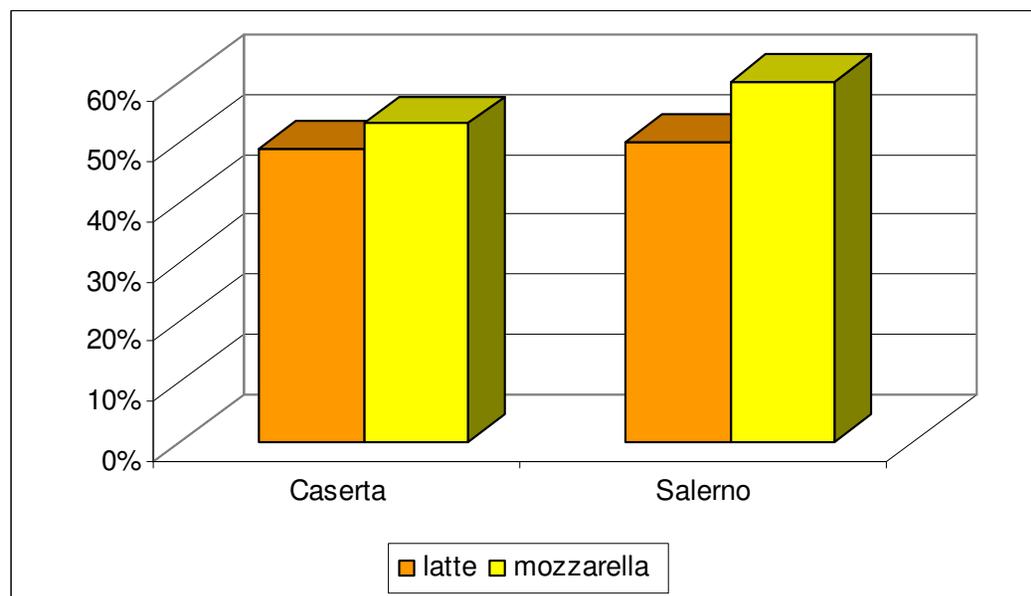
Dagli IPA cancerogeni, sono stati estrapolati i dati relativi alla contaminazione da benzo(a)pirene, composto più tossico della famiglia a provata cancerogenicità. I livelli di tale composto cancerogeno sono risultati simili per tutti i campioni considerati (Figura 10); in particolare, il 49% dei campioni di latte ed il 53% di quelli di mozzarella di Caserta hanno presentato contaminazione da benzo(a)pirene, così come il 50% dei campioni di latte ed il 60% di quelli di mozzarella di Salerno.

Tabella 9. Contaminazione da Σ IPA cancerogeni (7 IPA) in campioni di latte e mozzarella di bufala prodotti nelle province di Caserta e di Salerno

Zona di origine	campioni	Media \pm D.S. ng g⁻¹p.f.	Mediana ng g⁻¹p.f.	Range ng g⁻¹p.f.
Caserta	Latte	0,06 \pm 0,02	0,05	0,03 – 0,12
	Mozzarella	0,27 \pm 0,20	0,33	n.d. – 0,57
Salerno	Latte	0,07 \pm 0,02	0,07	0,02– 0,11
	Mozzarella	0,18 \pm 0,21	0,11	0,04 – 0,79

n.d.< LOD

Figura 10. Percentuale di contaminazione da benzo (a) pirene nei campioni di latte e di mozzarella analizzati.



I valori riscontrati per la contaminazione da benzo(a)pirene sono comunque risultati simili per tutti i campioni, in un range variabile tra quantità non dosabili ad un massimo di 0,03 ng/g (Tabella 10).

L'importanza del problema della contaminazione degli alimenti da benzo(a)pirene, è evidenziata dall'attenzione rivolta recentemente dall'Unione Europea alla definizione di limiti di concentrazione in diverse categorie di alimenti. Tali limiti risultano compresi tra 1,0 µg/kg (alimenti per l'infanzia) e 10,0 µg/kg (molluschi bivalvi). Tra questi, non sono stati ancora presi in considerazione i derivati del latte, ma fortunatamente i valori riportati per le altre tipologie di alimenti sono molto più elevate rispetto ai valori riscontrati nel latte e nelle mozzarelle di bufala analizzate in questo lavoro.

Infine, anche in questo caso è stata effettuata l'analisi statistica sui campioni considerati, per valutare l'eventuale esistenza di differenze significative tra i campioni delle due diverse zone. E' emerso che non ci sono differenze significative di contaminazione da IPA tra i campioni di latte prelevati a Caserta e quelli prelevati a Salerno ($p=0.5$) e tra i campioni di mozzarella prelevati Caserta e quelli prelevati a Salerno ($p=0.5$).

Tabella 10. Contaminazione da benzo(a) pirene in campioni di latte e mozzarella di bufala prodotti nelle province di Caserta e di Salerno

Zona di origine	campioni	Media \pm D.S. ng g⁻¹p.f.	Mediana ng g⁻¹p.f.	Range ng g⁻¹p.f.
Caserta	Latte	0,01 \pm 0,01	0,01	n.d. – 0,02
	Mozzarella	0,01\pm 0,01	n.d.	n.d. – 0,02
Salerno	Latte	0,01 \pm 0,01	n.d.	n.d. – 0,03
	Mozzarella	n.d.	n.d.	n.d. – 0,03

n.d.< LOD

9. CONCLUSIONI

Dall'osservazione dei dati ottenuti si può affermare che i livelli di contaminazione riscontrati nei campioni delle due diverse zone indagate sono risultati pressoché paragonabili, sia per quanto attiene alla presenza di NDL-PCB, che per quella di IPA.

I livelli di contaminazione riscontrati nel presente lavoro sono paragonabili a quanto riportato in letteratura su matrici alimentari quali latte e formaggi, anche se non esistono molti lavori riguardanti la presenza dei NDL-PCB negli alimenti, in quanto maggiore attenzione è posta sulla contaminazione da DL-PCB.

Per quanto riguarda la contaminazione da PCB, i valori medi riscontrati nel presente lavoro sono risultati più alti rispetto a quelli riportati in uno studio riguardante la contaminazione del burro in alcuni Paesi (Malish et al. 2007). In particolare il lavoro di Malish et al. riporta concentrazioni di 8,11 ng/g grasso in campioni di burro della Repubblica Ceca, e di 9,42 ng/g grasso in campioni di burro in Slovenia. I congeneri PCB 138 e 153 rappresentano il 60-70% dei congeneri riscontrati in tali campioni, in accordo con quanto si è verificato nei campioni analizzati a Caserta ed a Salerno.

I valori riscontrati nei campioni indagati in questo studio risultano più elevati anche rispetto a quanto riportato da Baars et al. (2004) in cui sono riscontrati valori medi di 4 ng/g grasso nel latte e di 4,7 ng/g grasso nei formaggi.

In un lavoro effettuato da Zuccato et al. (1999) circa i livelli e le fonti di PCB nella dieta italiana, è riportato che, così come nei Paesi del Nord Europa, la principale fonte di esposizione ai PCB attraverso la dieta è costituita dai prodotti caseari, seguita da altri prodotti di origine animale, carne, pesce ed infine vegetali, anche se con questi ultimi si assumono principalmente i PCB con un più elevato valore di TEF (i più tossici); in tali

prodotti è stata sempre evidenziata una prevalenza dei congeneri a più alta clorazione della molecola, quindi PCB 138 e 153, come riscontrato nei campioni di Caserta e Salerno.

In un lavoro di Pinelli et al. (2005) sono stati analizzati campioni di latte provenienti da 7 stalle nel nord Italia e si è riscontrata una situazione del tutto simile a quella riscontrata nel presente lavoro, con concentrazioni di PCB che non hanno mai superato la soglia allarmante dei 100 ng/g grasso, e con una prevalenza negli stessi dei congeneri PCB 28, 138, 153, 180.

Per la presenza degli IPA, nello stesso lavoro di Pinelli et al. (2005), non sono state riscontrate quantità di IPA superiori al limite di rilevabilità. In un lavoro condotto dall'Istituto Superiore di Sanità, riguardante la presenza di IPA negli alimenti, sono stati riscontrati valori di BaP di 0,02 ng/g p.f. in alcuni alimenti di origine animale tra cui il burro (Bocca et al., 2003), paragonabili ai valori riscontrati nel presente lavoro, in cui la concentrazione da BaP è variata tra valori non dosabili ad un massimo di 0,03 ng/g p.f.

Infine, recentemente è stato condotto dall' ARPAC una articolata indagine territoriale nell'areale casertano, che ha focalizzato lo studio sulla ricerca di contaminanti quali diossine, furani e PCB nelle matrici ambientali (suolo, vegetali ed acqua). I risultati hanno evidenziato che nelle aree indagate la distribuzione delle concentrazioni degli inquinanti risulta piuttosto omogenea e vicina ai valori di fondo riportati nella letteratura internazionale per le aree soggette a pressioni antropiche, non evidenziando la presenza di importanti fonti di contaminazione identificabili con certezza. La contaminazione del latte dovrebbe, quindi, essere messa in relazione con più fattori, tra cui anche la effettiva valutazione della dieta degli animali, compreso l'utilizzo di mangimi che come ben noto,

potrebbero costituire una delle principali fonti di trasferimento di composti tossici agli animali.

Ancora una volta occorre dunque sottolineare che i valori medi riscontrati per la contaminazione da IPA e da PCB dei prodotti analizzati sono risultati sempre inferiori ai limiti proposti dalle normative vigenti, anche se la ancora scarsa presenza di dati relativa a questo settore non consente di affermare che si è al di sotto della soglia di sicurezza per il consumatore. Per questo motivo tale settore deve essere più approfonditamente indagato, per consentire, da un lato, una sempre crescente accertata sicurezza per il consumatore, e dall'altra anche una rivalutazione dei prodotti genuini della nostra terra. Sulla base delle evidenze raccolte, si può infatti considerare che, nonostante la "fama" che la zona del Casertano si è conquistata nel tempo, e nonostante la mozzarella di bufala prodotta in tale zona sia da tempo al centro della cronaca "nera", dall'indagine eseguita non risulta che i prodotti considerati siano "inquinati", e soprattutto non a livello tale da poter essere considerati pericolosi per la salute del consumatore.

10. BLIOGRAFIA

- 1) Abad E., Llerena J.J., Saulo´ J., Caixach J., Rivera J., (2002). Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs content in food samples from Catalonia (Spain). *Chemosphere* 46:1435–1441.
- 2) Allsopp M., Costner P. and Johnston P. (2001). Incineration and human health. State of the knowledge of the impacts of waste incinerators on human health. Greenpeace Research Laboratories, University of Exeter, UK.
- 3) Armitage J.M., Gobas F.A. (2007) A terrestrial food-chain bioaccumulation model for POPs. *Environ Sci Technol.* 41 (11): 4019-25.
- 4) ATSDR (1995). Chemical and Physical Information, in: Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), ATSDR, Atlanta, Georgia, USA, pp. 209-221.
- 5) ATSDR (2000). Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (Update). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Public Health Service, Atlanta (GA), USA.
- 6) Baars A.J., Theelen R.M.C., Janssen P.J.C.M., Hesse J.M., Van Apeldoorn M.E., Meijerink M.C.M., Verdam L., and Zeilmaker M.J. (2001). Re-evaluation of human toxicological maximum permissible risk levels. Report no. 711701025, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands. SCF. European Commission, Scientific Committee on Food.
- 7) Baars A.J., Bakker M.I., Baumann R.A., Boon P.E., Freijer J.I., Hoogenboom L.A., Hoogerbrugge R., van Klaveren J.D., Liem A.K., Traag W.A., de Vries J.

- (2004). Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol Lett.* 151 (1): 51-61.
- 8) Baldassarri L., Bocca A., Di Domenico A., Fulgenti A. and Lacovella N. (1994). GC-MS isomer-specific determination of PCBs and some chlorinated pesticides in milk and cheese samples. *Organohalogen Compounds* 20: 221-224.
- 9) Ballschmiter K. and Zell M. (1980). Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Glass Capillary Gas Chromatography. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 302: 20-31.
- 10) Beckman Sundh U., Thuvander A., Andersson C. (1998). Review of PAHs in food – potential health effects and contents in food. Report 8/98. Uppsala (Sweden): National Food Administration.
- 11) Bocca B., Crebelli R., Menichini E. (2003). Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. Istituto Superiore di Sanità. Rapporti ISTISAN 03/22.
- 12) Buckland, S.J., Scobie, S., Heslop, V., (1998). In: Report “Concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for New Zealanders”, Organochlorines Programme, Ministry for the Environment, Wellington, New Zealand.
- 13) Butler J.P., Post G.B., Lioy P.J., Waldman J.M., Greenberg A. (1993). Assessment of carcinogenic risk from personal exposure to benzo(a)pyrene in the total human environmental exposure study (THEES). *J Air Waste Manage Assoc.* 43:970-7.
- 14) Chovancova´ J., Kocan A., Jursa S., (2005). PCDDs, PCDFs and dioxinlike PCBs in food of animal origin (Slovakia). *Chemosphere.* 61: 1305–1311.

- 15) Corsolini S., Ademollo N., Mariottini M., Fossi S., Guerranti C., Perra G., Duhamel G., and Focardi, S. (2002). Polychlorinated biphenyls, polychlorinated-dibenzodioxin and -dibenzofurans in mackerel icefish and marbled rock cod from the Kerguelen Islands (Antartica). *Organohalogen Compounds*. 57: 161-164.
- 16) Corsolini S., Ademollo N., Romeo T., Greco S., Focardi S. (2005). Persistent organic pollutants in edible fish: a human and environmental health problem. *Microchemical Journal*. 79: 115-123.
- 17) Dalla Valle M., Codato E., Marcomini A. (2007). Climate change influence on POPs distribution and fate: a case study. *Chemosphere*. 67 (7): 1287-1295.
- 18) Dennis M.J., Massey R.C., Cripps G., Venn I., Howarth N., Lee G. (1991). Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Addit Contam*. 8 (4): 517-530.
- 19) Dertinger S.D., Nazarenko D.A., Silverstone A.E., Gasiewicz T.A. (2001). Aryl hydrocarbon receptor signalling plays a significant role in mediating benzo[a]pyrene- and cigarette smoke condensate-induced cytogenic damage in vivo. *Carcinogenesis*. 22:171-177.
- 20) Direttiva 96/59/CE del Consiglio del 16 settembre 1996 concernente lo smaltimento dei policlorodifenili e dei policlorotriifenili (PCB/PCT). (*Gazzetta Ufficiale* 24 settembre 1996 n. L 243).
- 21) Durand B., Dufour B., Fraisse D., Defour S., Duhem K., Le-Barillec K. (2007). Levels of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in raw cow's milk collected in France in 2006. *Chemosphere*. [Article in press].

- 22) EFSA, 2005. European Food Safety Agency (EFSA) opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food, *The EFSA Journal* (2005) 284: 1–137.
- 23) Eom I.C., Rast C., Veber A.M., Vasseur P. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)- contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 67(2): 190-205.
- 24) European Commission (EC), 2001. Opinion of the scientific committee on food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. CS/CNTM/DIOXIN/20 final. Health & Consumer Protection Directorate-General. Brussels, Belgium.
- 25) European Commission, (2006a). Commission Regulation (EC) No. 199/2006 of 3 February 2006 amending Regulation (EC) No. 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards dioxins and dioxin-like PCBs, *Official Journal of the European Communities* L 32/34–38.
- 26) European Commission, (2006b). Commission Recommendation of 6 February 2006 on the reduction of the presence of dioxins, furans and PCBs in feedingstuffs and foodstuffs, *Official Journal of the European Communities* L 42/26–28.
- 27) EU-SCOOP (2000). European Commission, Scientific Co-operation on Questions Relating to Food. Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of the EU Member States. Task 3.2.5, Final Report SCOOP / DIOX / REPORT / 1, 7 June 2000. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Brussels, Belgium.

- 28) Falcó G., Domingo J.L., Llobet J.M., Teixidó A., Casas C., Müller L. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J Food Prot.* 66 (12): 2325-2331.
- 29) Fontcuberta M., Arqués J.F., Martínez M., Suárez A., Villalbí J.R., Centrich F., Serrahima E., Duran J., Casas C. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples collected in Barcelona, Spain. *J Food Prot.* 69 (8): 2024-2028.
- 30) Furst P., (2001). Contribution of dioxin-like PCB to total toxic equivalents of dairy products. *Organohalogen Compounds* 51: 279–282.
- 31) Giesy JP, Kannan K., (1998). Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*; 28(6): 511-569.
- 32) Grova N., Feidt C., Crépineau C., Laurent C., Lafargue P.E., Hachimi A., Rychen G. (2002). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *J Agric Food Chem.* 31; 50 (16): 4640-4642.
- 33) Guillén M.D., Palencia G., Sopelana P., Ibargoitia M.L. (2007). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in artisanal Palmero cheese smoked with two types of vegetable matter. *J Dairy Sci.* 90(6): 2717-2725.
- 34) Haws L., Harris M., Su S., Walker N., Birnbaum L., DeVito M., Farland W., Connor K., Santamaria A., Finley B., (2004b). A preliminary approach to characterizing variability and uncertainty in the mammalian PCDD/F and PCB TEFs. *Organohalogen Compounds* 66: 3439–3445.
- 35) Huisman M., Koopman-Esseboom C., Fidler V., Hadders-Algra M., Van der Paauw C.G., Tuinstra L.G., Weisglas-Kuperus N., Sauer P.J.J., Touwer B.C. and

- Boersma E.R. (1995). Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins and its effect on neonatal neurological development. *Early Hum Dev* 41(2):111-127.
- 36) IPCS (1998). Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria 202. Geneva: International Programme on Chemical Safety - World Health Organization.
- 37) Kang H.G., Jeong S.H., Cho M.H., Cho J.H. (2007). Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. *J Vet Sci* 8(4): 361-368.
- 38) Kazerouni N., Sinha R., Hsu C.H., Greenberg A., Rothman N. (2001). Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol*. 39 (5): 423-436.
- 39) Krokos F., Creaser C.S., Wright C., Startin J.R. (1996). Levels of selected ortho and non -ortho polychlorinated biphenyls in UK retail milk. *Chemosphere* 32 (4): 667-673.
- 40) La Rocca C., Mantovani A. (2006). From environment to food: the case of PCB. *Ann Ist Super Sanità*. 42 (4): 410-416.
- 41) Lee B.M., Shim G.A. (2007). Dietary exposure estimation of benzo[a]pyrene and cancer risk assessment. *J Toxicol Environ Health A*. 70 (15-16): 1391-1394.
- 42) Li Q.Q., Loganath A., Chong Y.S., Tan J., Obbard J.P. (2006). Persistent organic pollutants and adverse health effects in humans. *J Toxicol Environ Health A*. 69 (21): 1987-2005.
- 43) Liem A.K., Furst P. and Rappe C. (2000). Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit Contam*, 17 (4): 241-259.

- 44) Lodovici M., Dolara P., Casalini C., Ciappellano S., Testolin G. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit Contam.* 12 (5): 703-713.
- 45) Lundstedt S., White P.A., Lemieux C.L., Lynes K.D., Lambert I.B., Oberg L., Haglund P., Tysklind M. (2007). Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *Ambio.* 36 (6): 475-485.
- 46) Malisch R., Bruns-Weller E., Knoll A., Furst P., Mayer R., Wiesmuller T., (2000). Results of an ‘‘emergency quality control study’’ as confirmation of a PCDD/PCDF-contamination of milk and butter samples. *Chemosphere.* 40: 1033–1040.
- 47) Malisch R., Wambold C., Fraisse D., Durgeil A., Defour S., Abad E., Abalos M., Rivera J., Furst P., (2004). PCDD/Fs and PCBs in food samples from Germany, France and Spain – data and proposals for EU legislation. *Organohalogen Compounds.* 66: 2046–2052.
- 48) Malisch R., Dilara P. (2007). PCDD/Fs and PCBs in butter samples from new European Union member states and a candidate country: analytical quality control, results and certain PCB-specific aspects. *Chemosphere.* 67 (9): 579-589.
- 49) Miniero R., De Felip E., Magliuolo M., Ferri F., Di Domenico A. (2005). Selected persistent organic pollutants (POPs) in the Italian environment. *Ann Ist Super Sanita.* 41 (4): 487-492.
- 50) National Academy of Sciences/National Research Council (NAS/ NRC), (2003). *Dioxins and Dioxin-like Compounds in the Food Supply: Strategies to Decrease Exposure.* National Academy Press. Washington, DC.

- 51) Near R, Matulka RA, Mann KK, Schneider AM, Golgate SU, Trombino AF, Sherr DH. (1999). Regulation of pre-B cell apoptosis by AhR/transcription factor expressing stromal/adherent T-cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 221:242-252.
- 52) Nesnow S, Ross JA, Stoner GD, Mass MJ. (1995). Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice. *Toxicology.* 105: 403-413.
- 53) Nesnow S, Ross JA, Mass MJ, Stoner GD. (1998). Mechanistic relationships between DNA adducts, oncogene mutations, and lung tumorigenesis in strain A mice. *Exp Lung Res.* 24:395-405.
- 54) Nwaneshiudu O.C., Autenrieth R.L., McDonald T.J., Donnelly K.C., Degollado E.D., Abusalih A.A. (2007). Risk of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure from ingested food: the Azerbaijan case study. *J Environ Sci Health B.* 42 (2): 201-209.
- 55) Ohura T., Morita M., Makino M., Amagai T., Shimoi K. (2007). Aryl hydrocarbon receptor-mediated effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol.* 20 (9): 1237-1241.
- 56) SCF (2000). Opinion on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food (update based on the new scientific information available since the adoption of the SCF opinion of 22 November 2000, 30 May 2001), at http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out90_en.pdf.
- 57) Papadopoulos A., Vassiliadou I., Costopoulou D., Papanicolaou C., Leondiadis L., (2004). Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food samples on the Greek market. *Chemosphere.* 57: 413–419.

- 58) 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.
- 59) Pinelli C., Dallaturca E., Schianchi L., Venè F. (2005). Il latte: residui e contaminanti. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia*, 56 (4): 273-293.
- 60) Raccomandazione 2006/794/CE del 16 novembre 2006. Raccomandazione della Commissione del 16 novembre 2006 sul monitoraggio dei livelli di base di diossine, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili nelle derrate alimentari. *Gazz. Uff. dell'Unione Europea n. L 322 del 22 novembre 2006*.
- 61) Ramos L, Eljarrat E, Hernandez LM, Alonso L, Rivera J, Gonzalez MJ. (1997) Levels of PCDDs and PCDFs in farm cow's milk located near potential contaminant sources in Asturias (Spain). Comparison with levels found in control, rural farms and commercial pasteurized cow's milks. *Chemosphere*. 35(10): 2167-2179.
- 62) Regolamento 1107/96/CE della Commissione del 12 giugno 1996. Registrazione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine nel quadro della procedura di cui all'articolo 17 del regolamento (CEE) n. 2081/92 del Consiglio. *Gazzetta ufficiale n. L 148 del 21/06/1996*.
- 63) Regolamento 466/2001/CE della Commissione dell'8 Marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle L 77 del 16.3.2001 p 1-13*.
- 64) Regolamento 2006/1881/CE della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 364/5 del 20.12.2006*.

- 65) Reinik M., Tamme T., Roasto M., Juhkam K., Tenno T., Kiis A. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat products and estimated PAH intake by children and the general population in Estonia. *Food Addit Contam.* 24 (4): 429-437.
- 66) Roveda AM, Veronesi L, Zoni R, Colucci ME, Sansebastiano G. (2006). Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) in food and cancer risk: recent advances. *Ig Sanita Pubbl.* 62 (6): 677-696.
- 67) Ruzzenenti M. (2003). La storia dei PCB (policlorobifenili). *Miracoli e disastri della tecnica del novecento.* Altrionovecento. N.6 febbraio 2003.
- 68) Safe S. (1994). Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses and Implications for Risk Assessment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 24: 87-149.
- 69) Safe S.H. (1998). Development Validation and Problems with the Toxic Equivalency Factor Approach for Risk Assessment of Dioxins and Related Compounds. *J Anim Sci.* 76 (1): 134-141.
- 70) Santillo D., Fernandes A., Stringer R., Johnston P., Rose M., White S., (2001). Concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in samples of butter from 24 countries. *Organohalogen Compounds* 51: 275–278.
- 71) Schmidt P. and Schlatter Ch. (1992). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in cow's milk from Switzerland. *Chemosphere* 24 (18): 1013-1030.
- 72) Schneider K., Roller R., Kalberlah F., Schuhmacher-Wolz U. (2002). Cancer risk assessment for oral exposure to PAH mixtures. *J Appl Toxicol.* 22: 73-83.

- 73) Seegal RF. (1996). Epidemiological and laboratory evidence of PCB-induced neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 26(6): 709-737.
- 74) UNEP (2001). United Nations Environmental Programme. Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs). www.chem.unep.ch.
- 75) Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Bosveld, A.T.C., Brunström, B., Cook, Ph., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Wærn, F., and Zacharewski, T. (1998). Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Env. Health Persp.* 106: 775-792.
- 76) Van Larebeke N., Hens L., Schepens P. et al. (2001). The Belgian, PCB and dioxin incident of January-June 1999: exposure data and potential impact on health. *Environmental Health Perspectiv.* 109 (3): 265-273.
- 77) Wania F. and Mackay D. (1996). Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 30: 390-396.
- 78) Weiss J., Papke O., Bergman A., (2005). A worldwide survey of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and related contaminants in butter. *Ambio* 34: 589-597.
- 79) 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.
- 80) 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.

81) 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.

82) Zanieri L, Galvan P, Checchini L, Cincinelli A, Lepri L, Donzelli GP, Del Bubba M.(2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere*.67 (7): 1265-1274.

83) Zhong W., Wang M. (2002). Some polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables from Northern China. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*.37 (2): 287-96.

84) Zuccato E., Calvarese S., Mariani G. et al. (1999). Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere*. 38 (12): 2753-2765.