



Università Politecnica delle Marche

Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea: Scienze Ambientali e Protezione Civile

Livelli di Idrocarburi Policiclici Aromatici in tre specie di pesci pelagici dell'Oceano Atlantico: confronti interspecifici e inter-stagionali e valutazione dei potenziali rischi per la salute pubblica

Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from Atlantic Ocean: Inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks

Tesi di laurea di:
Valentina Possanzini

Docente referente:
Prof.ssa Anna Annibaldi

Sessione Autunnale (Ottobre 2021)

Anno Accademico 20/21

Riassunto

Lo studio condotto, nell'arco di tre anni, si è concentrato sulla ricerca di 18 IPA (16 dei quali sono considerati dei contaminanti prioritari dall'US EPA) nei tessuti di tre specie di pesce pelagici, dell'Oceano Atlantico, che hanno un valore commerciale rilevante in Portogallo. Le tre specie selezionate sono: la *Sardina pilchardus* (sardina); lo *Scomber japonicus* (lanzardo) ed il *Trachurus trachurus* (sugarello). Le uniche molecole ritrovate a seguito dell'analisi sono il Naftalene (2 anelli), l'Acenaftene (3 anelli), il Fluorene (3 anelli) ed il Fenantrene (3 anelli). Gli IPA sono composti da un numero variabile di anelli benzenici ed hanno origine principalmente da combustioni incomplete e ciò può avere sia un'origine industriale che urbana, inoltre le attività che trattano petrolio e derivati ne rappresentano una fonte essendo dei componenti, ed il mare risente proprio delle suddette forme di contaminazione. Questa classe di contaminanti desta preoccupazioni non solo perché possiamo ritrovarne facilmente in tutte le matrici ambientali, ma anche perché sono composti lipofili perciò tendono a bioaccumularsi nei tessuti degli organismi che vi entrano in contatto e sono molecole riconosciute dall'AIIRC come cancerogene e mutagene. Lo studio, oltre a determinare e quantificare i contaminanti presenti nei pesci selezionati, si è anche occupato di comparare i dati ottenuti al fine di fare confronti interspecifici ed inter-stagionali così da identificare, se presenti, dei fattori in grado di modificare la concentrazione degli IPA negli organismi studiati. Infine sono state fatte delle stime per stabilire se consumare pescato contaminato rappresenti un rischio o meno per la salute.

Luogo e metodo di campionamento

I campioni sono stati acquistati casualmente e in periodi diversi dell'anno presso dei mercati nella regione di Porto in Portogallo per un periodo di tre anni tra il 2007 ed il 2009. Le tre specie selezionate sono quelle maggiormente consumate dalla popolazione portoghese (sardina > lanzardo > sugarello) che è in generale la maggior consumatrice di prodotti ittici a livello europeo.

I campioni acquistati inizialmente sono stati pari a:

- 444 sardine
- 243 sugarelli
- 166 lanzardi



Trattamento campioni

I pesci sono stati posti in buste di polietilene con ghiaccio al fine di conservarli per poi essere identificati e differenziati in relazione a sesso, peso e lunghezza.

Il materiale è stato omogenizzato tramite un frullatore e conservato in contenitori di policarbonato da 50 ml a -20°C. Inizialmente sono stati definiti anche il contenuto d'acqua e di grassi totali seguendo il metodo AOAC 2007.

Per lo svolgimento di altre analisi sono stati creati ulteriori campioni (compositi) formati da quantità uguali di parti commestibili, presi da almeno quattro pesci ognuno con un peso di almeno 200g.

I compositi ottenuti sono:

68 sardine

52 lanzardi

56 sugarelli

Metodo d'analisi

Standard:

inizialmente sono stati preparati gli standard contenenti i 18 IPA (naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene, indeno(1,2,3-cd)pirene, benzo(j)fluorantene, dibenzo(a,l)pirene) per diluizione da materiale di riferimento con acetonitrile e conservati a -20°C al buio, al fine di evitare fenomeni di volatilizzazione e fotodegradazione. Per la calibrazione esterna sono stati preparati 6 standard, ognuno dei quali presenta la stessa composizione della matrice dei campioni, ai quali sono poi stati aggiunti gli standard precedentemente preparati.

Estrazione:

a 0,5 g di campione sono stati aggiunti 10 ml di acetonitrile, ed il tutto è stato trattato tramite microonde per 20' a 110°C . Gli estratti sono stati lasciati raffreddare a temperatura ambiente e filtrati con filtro in PTFE da $0,45\ \mu\text{m}$. Per ridurre il volume di solvente è stato fatto un trattamento con Rotavapor a 20°C prima e con un flusso di azoto poi.

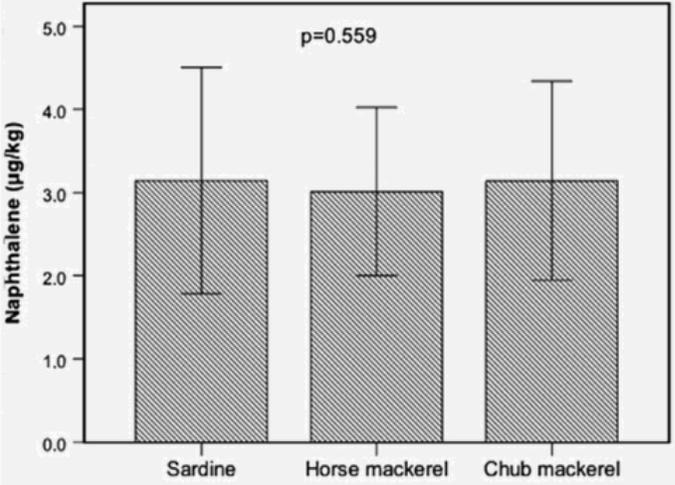
Analisi:

l'estratto è stato disciolto in 0,5 ml di acetonitrile. L'analisi è stata eseguita avvalendosi di un sistema a cromatografia liquida (LC) dotato di una pompa per l'erogazione del solvente ad alta pressione ed un degasatore e la colonna utilizzata è stata una C18. Considerando gli analiti ricercati è stato necessario impiegare due rilevatori ovvero FLD (Fluorescence Detector), utilizzato per tutte le molecole fatta eccezione per l'acenaftilene, che considerata la ridotta fluorescenza, ha richiesto l'utilizzo di un PDA (Photodiode Array).

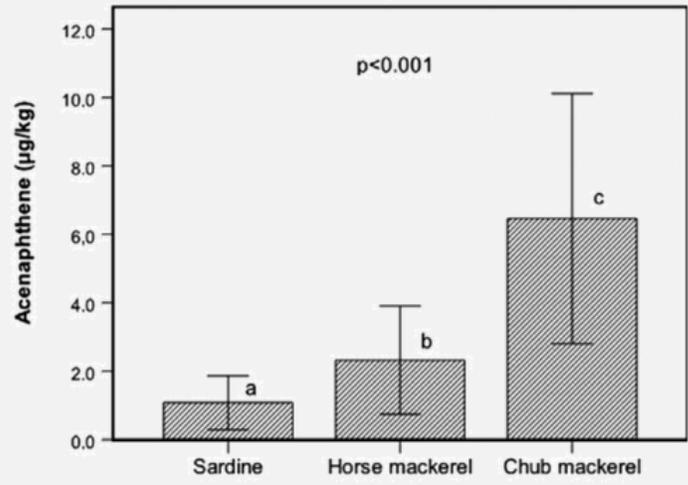
La validazione del metodo utilizzato è stata fatta sfruttando il materiale di riferimento SRM 2977 (tessuto di cozze)

Risultati della contaminazione

sardina ≈ lanzardo ≈ sugarello



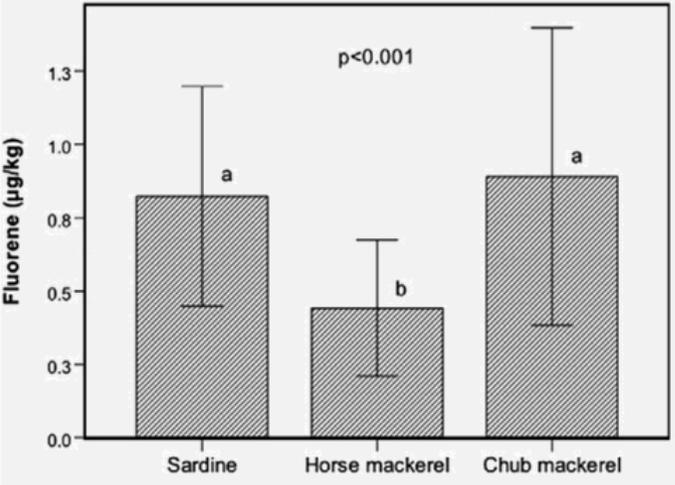
lanzardo > sugarello > sardina



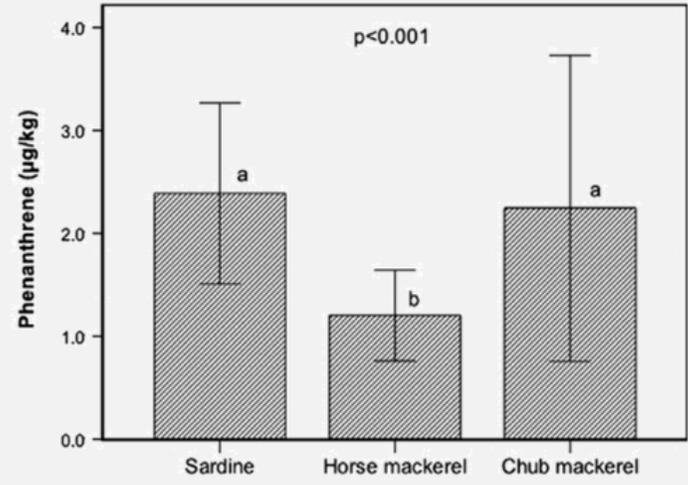
Il lanzardo è il pesce più contaminato con una media di $7,33 \pm 3,86 \mu\text{g/Kg ww}$ seguito poi dalla sardina con $5,58 \pm 2,40 \mu\text{g/Kg ww}$ ed infine il sugarello con una media di $5,44 \pm 1,94 \mu\text{g/Kg ww}$. I grafici mostrano anche che il naftalene è l'IPA più abbondante nella sardina e nel sugarello essendo così il contenuto dei singoli contaminanti:

- naftalene > fenantrene > acenaftene > fluorene sardina
- naftalene > acenaftene > fenantrene > fluorene sugarello
- acenaftene > naftalene > fenantrene > fluorene lanzardo

Fatta eccezione per il naftalene, sono presenti delle differenze statistiche nella distribuzione della concentrazione dei tre contaminanti, e si è ipotizzato possa essere collegato alla selettività degli organismi nei confronti delle molecole in questione.



lanzardo ≈ sardina > sugarello



lanzardo ≈ sardina > sugarello

Species	Year	Season ^a	Gender ^b	Length (cm)		Weight (g)		Moisture (%)	Fat content (%)
Sardine (n=444; c=68)				Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Mean ± SD
	2007	S/S	F	19.6±0.6	19.0-20.6	81.8±5.8	75-91	46.5±4.2	18.4±6.6
			M	19.4±0.5	18.8-20.4	78.4±4.2	71.8-82.4	53.8±3.0	17.9±6.7
	2007	A/W	F	21.4±0.2	21.2-21.5	115.2±2.6	113.3-117.0	49.2±1.1	22.2±2.0
			M	20.0±0.4	19.7-20.4	102.8±2.7	100.3-105.7	52.5±1.2	21.5±1.1
	2008	S/S	F	20.5±0.3	20.1-21.0	71.9±9.0	61.5-88.0	70.4±9.2	10.0±10.5
			M	20.2±0.3	19.4-20.7	71.1±8.9	55.6-83.8	70.5±10.1	9.4±11.1
	2008	A/W	F	21.2±0.5	20.8-21.5	105.5±9.2	99.0-112	58.8±1.0	19.6±1.5
			M	20.9±0.1	20.8-21.0	99.6±6.0	95.3-103.8	61.0±0.3	19.2±1.3
	2009	S/S	F	20.9±0.8	19.8-21.9	75.0±3.7	69.7-78.9	74.3±0.6	3.8±0.4
		M	20.4±0.3	19.9-20.6	75.3±2.9	71.3-79.1	75.8±0.1	3.6±0.3	
Chub mackerel (n=166; c=52)	2007	A/W	F	33.0±4.3	28.5-39.5	361.2±148.8	230.7-620.5	59.7±0.2	11.7±0.7
			M	32.7±4.2	28.7-39.2	369.0±135.7	193.5-560.5	65.2±0.9	9.5±0.7
	2008	S/S	F	35.4±3.4	30.5-39.3	428.2±43.0	372.3-478.5	67.2±0.1	10.4±0.5
			M	36.8±2.3	32.3-38.5	396.0±27.2	357.0-440.0	69.6±0.5	10.2±0.4
	2008	A/W	F	28.0±0.9	26.9-29.7	183.3±17.0	169.0-218.0	61.2±3.8	16.4±3.1
			M	28.5±0.6	27.8-29.0	196.2±14.5	178.0-209.7	63.6±0.6	15.4±4.0
2009	S/S	F	34.2±3.8	27.6-37.4	342.1±110.1	154.8-440.8	68.6±0.4	8.5±0.6	
		M	30.4±0.6	29.5-30.8	207.0±12.3	192.0-217.3	75.6±0.4	4.1±0.2	
Horse mackerel (n=243; c=56)	2007	S/S	F	33.4±3.4	31.0-35.8	327.0±99.0	257.0-397.0	75.6±0.4	4.3±0.3
			M	36.0±2.1	34.5-37.5	406.5±79.9	350.0-463.0	74.8±0.9	3.6±0.2
	2007	A/W	F	30.1±1.7	27.1-32.9	246.3±51.0	183.5-337.0	68.4±4.7	7.7±5.7
			M	30.1±1.7	27.6-33.9	242.2±57.2	193.5-376.5	71.3±5.1	6.2±4.7
	2008	S/S	F	27.4±1.4	24.9-29.0	200.3±46.5	141.5-294.0	68.8±5.5	4.7±1.7
			M	27.1±1.5	25.1-29.7	184.6±21.0	138.8-214.0	70.9±4.0	3.9±0.8
	2008	A/W	F	33.4±1.0	32.4-34.4	366.7±41.2	337.6-395.8	71.3±0.2	11.1±0.3
		M	34.7±0.6	34.0-35.5	427.5±19.6	406.3-451.5	72.1±0.3	7.0±0.3	
2009	A/W	F	31.5±3.6	28.9-34.0	291.8±45.3	259.8-323.8	77.3±0.3	3.3±0.3	
		M	31.3±3.1	29.1-33.5	288.9±8.3	283.0-294.7	75.7±0.8	4.7±0.5	

	Sardine					Chub mackerel					Horse mackerel				
	Female		Male		P ^a	Female		Male		P ^a	Female		Male		P ^a
	Mean ± SD (range)	Median (1 st quartile- 3 rd quartile)	Mean ± SD (range)	Median (1 st quartile- 3 rd quartile)		Mean ± SD (range)	Median (1 st quartile-3 rd quartile)	Mean ± SD (range)	Median (1 st quartile-3 rd quartile)		Mean ± SD (range)	Median (1 st quartile-3 rd quartile)	Mean ± SD (range)	Median (1 st quartile- 3 rd quartile)	
Naphthalene	3.21±1.15 (n.d.-7.30)	3.57 (3.39-3.75)	3.13±1.51 (n.d.-7.84)	1.98 (1.81-2.32)	0.739	3.17±1.35 (1.29-5.26)	2.98 (2.93-3.67)	2.97±1.19 (n.d.-4.91)	3.14 (1.50-3.81)	0.116	3.07±1.06 (1.03-5.39)	2.13 (2.05-4.40)	2.98±0.98 (1.06-4.95)	2.61 (2.16-4.14)	0.578
Acenaphthene	0.76±0.34 (n.d.-1.11)	0.25 (0.24-0.25)	1.28±0.87 (n.d.-2.35)	1.47 (0.25-2.04)	0.147	6.04±5.06 (n.d.-13.46)	6.26 (0.33-10.06)	6.83±1.69 (n.d.-9.69)	6.07 (5.71-7.04)	0.285	1.63±1.22 (n.d.-4.39)	1.11 (0.94-1.49)	2.65±1.64 (n.d.-5.99)	2.30 (1.73-3.64)	0.034
Fluorene	0.92±0.42 (0.28-2.10)	0.35 (0.32-0.38)	0.73±0.30 (0.21-1.66)	0.44 (0.37-0.50)	<0.001	0.94±0.57 (0.18-1.77)	0.75 (0.57-1.07)	0.83±0.44 (0.17-3.12)	0.49 (0.42-0.68)	0.439	0.50±0.31 (0.20-1.69)	0.72 (0.53-1.17)	0.31±0.12 (n.d.-0.61)	0.41 (0.33-0.48)	0.008
Phenanthrene	2.41±0.69 (n.d.-4.84)	1.59 (1.54-1.63)	2.37±1.04 (0.56-4.98)	1.50 (1.41-1.63)	0.751	2.26±1.31 (0.32-5.09)	1.48 (1.27-1.72)	2.22±1.65 (0.40-5.78)	1.26 (1.10-1.73)	0.842	1.31±0.49 (n.d.-2.34)	1.39 (1.06-1.79)	1.13±0.35 (n.d.-1.85)	1.12 (0.91-1.65)	0.008
Total PAHs	5.26±2.26 (2.43-13.57)	5.76 (5.57-5.95)	5.88±2.49 (2.29-14.18)	5.49 (4.57-6.34)	0.075	7.39±3.95 (1.80-19.90)	12.06 (4.97-8.89)	7.27±3.78 (1.94-16.34)	10.64 (8.89-13.39)	0.857	5.18±1.58 (2.73-9.98)	5.78 (4.67-9.27)	5.78±2.22 (3.16-10.00)	8.15 (4.43-8.86)	0.060

Effetto del genere

Dai dati ottenuti è possibile vedere come per sardina e lanzardo ci sia una differenza rilevante tra maschi e femmine nell'accumulo di fluorene.

Il sugarello presenta delle le differenze rilevanti per:

- acenafte ne maschio > femmina
- fluorene femmina > maschio
- fenantrene femmina > maschio

Queste variazioni sono imputabili alla differenza di contenuto di grasso tra esemplari maschi e femmine come si evince nella Tabella SI, oltre a delle differenze relative a ciclo vitale, bisogni ecologici o attività metaboliche.

Species	Naphthalene	Acenaphthene	Fluorene	Phenanthrene	Total PAHs
Sardine	+0.176 (p=0.052) _{total}	+0.636 (p=0.001) ^a _{total}	+0.002(p=0.978) _{total}	+0.349 (p<0.001) ^a _{total}	+0.127 (p=0.095) _{total}
	-0.005 _{female}	+0.886 ^a _{female}	-0.153 _{female}	+0.313 _{female}	+0.414 ^a _{female}
	+0.320 ^a _{male}	+0.939 ^a _{male}	+0.050 _{male}	+0.426 ^a _{male}	-0.034 _{male}
Chub mackerel	+0.414 (p<0.001) ^a _{total}	+0.003 (p=0.987) _{total}	+0.407 (p<0.001) ^a _{total}	+0.723 (p<0.001) ^a _{total}	+0.236 (p=0.005) ^a _{total}
	+0.325 ^a _{female}	+0.022 _{female}	+0.651 ^a _{female}	+0.685 ^a _{female}	-0.246 ^a _{female}
	+0.542 ^a _{male}	+0.250 _{male}	+0.204 _{male}	+0.770 ^a _{male}	+0.227 _{male}
Horse mackerel	-0.333 (p<0.001) ^a _{total}	+0.081 (p=0.557) _{total}	+0.067 (p=0.413) _{total}	-0.359 (p<0.001) ^a _{total}	-0.206 (p=0.011) ^a _{total}
	-0.118 _{female}	-0.326 _{female}	+0.259 ^a _{female}	-0.346 ^a _{female}	-0.200 _{female}
	-0.484 ^a _{male}	+0.151 _{male}	-0.023 _{male}	-0.298 ^a _{male}	-0.212 ^a _{male}

Effetto della lunghezza

Osservando la tabella è possibile evidenziare delle correlazioni significative negative per il sugarello, a differenza degli altri due pesci che presentano delle correlazioni significative positive. Le correlazioni positive più rilevanti si hanno proprio per i due pesci più grassi e ciò può essere ricollegato alla lipofilità di questi composti. Il fenantrene inoltre presenta le correlazioni positive più elevate rispetto agli altri composti, e ciò dimostra una chiara dipendenza tra la sua concentrazione e la lunghezza dei pesci studiati.

Le precedenti valutazioni sono però controverse, considerando che i pesci vertebrati sono in grado di eliminare questi composti velocemente.

	Sardine			Chub mackerel			Horse mackerel		
	Autumn-Winter	Spring-Summer	p^a	Autumn-Winter	Spring-Summer	p^a	Autumn-Winter	Spring-Summer	p^a
Naphthalene	4.53 (1.45-7.84)	2.37 (n.d-6.20)	<0.001	2.73 (n.d.-4.58)	3.69 (1.29-5.26)	<0.001	2.70 (1.06-4.84)	3.38 (1.03-5.39)	<0.001
Acenaphthene	0.27 (n.d.-0.44)	1.31 (n.d.-2.35)	0.002	6.46 (n.d.-13.46)	n.d. -	^b	2.37 (n.d.-5.99)	2.29 (n.d.-5.16)	0.865
Fluorene	1.15 (0.48-1.70)	0.77 (0.21-2.10)	<0.001	0.76 (0.19-3.12)	1.08 (0.17-1.77)	<0.001	0.41 (0.19-1.69)	0.48 (n.d.-1.18)	0.101
Phenanthrene	3.10 (1.73-4.98)	2.28 (n.d.-3.93)	<0.001	1.58 (0.58-3.56)	3.17 (0.32-5.78)	<0.001	1.05 (n.d.-1.83)	1.38 (n.d.-2.34)	<0.001
Total PAHs	8.85 (3.98-14.18)	5.08 (2.29-11.80)	<0.001	6.90 (2.25-19.90)	7.94 (1.80-11.90)	0.163	4.73 (2.73-10.00)	6.26 (3.66-9.98)	<0.001

Effetto della stagione

Analizzando i valori ottenuti è chiaro che le stagioni influenzano la concentrazione degli IPA nei pesci, anche se i dati relativi ad acenafte e fluorene nel sugarello risultano non essere statisticamente significativi.

Da queste valutazioni è possibile vedere anche come le sardine tendono ad accumulare maggiormente IPA in A/I rispetto agli altri due pesci che tendono ad avere un accumulo maggiore in P/E, il che si è ipotizzato possa essere collegato alle variazioni di fattori biotici ed abiotici, che ne influenzano sia bioaccumulo che eliminazione come ad esempio la temperatura dell'acqua, le variazioni comportamentali dell'organismo, lo stress, l'ossigeno ecc. Un altro fattore da considerare per le differenze osservate sono le migrazioni compiute da lanzardo e sugarello.

Al fine di accertare che i dati ottenuti fossero attendibili è stata anche condotta un'analisi multivariata dalla quale sono emerse le medesime considerazioni.

Effetti sulla salute

Il benzo(a)pirene è sempre stato l'IPA definito come marker per la presenza e la tossicità di questa classe di contaminanti, ma recentemente al suo posto sono stati definiti altri 7 IPA che possono essere utilizzati come indicatori. L'EFSA e l'OMS hanno anche definito un differente approccio per questa determinazione che si basa sul margine di esposizione (MOE). Considerando che gli unici IPA ritrovati nei pesci non rientrano nella lista di molecole utilizzabili per questa analisi è stato necessario avvalersi di un altro metodo per la definizione del rischio.

Inizialmente è stata effettuata una stima settimanale basata sul consumo mondiale pro-capite di pesce del 2005 pari a 16.4 Kg/anno, prendendo ad esempio un soggetto di 70 Kg (periodo A/I e relativo a \sum IPA):

sardina	0.064 $\mu\text{g}/\text{Kg}_{\text{pro-capite}}$ per settimana
lanzardo	0.089 $\mu\text{g}/\text{Kg}_{\text{pro-capite}}$ per settimana
sugarello	0.045 $\mu\text{g}/\text{Kg}_{\text{pro-capite}}$ per settimana

Al fine di valutare l'impatto sulla salute è stato necessario determinare il TEF (Toxic Equivalency Factor) che secondo Nisbet e LaGoy (1992) per i quattro IPA analizzati è pari a 0.001 e con ulteriori elaborazioni sono stati ottenuti i seguenti dati (relativi a $\sum_{\text{TEF-IPA}}$):

0.0040 – 0.0142	A/I	0.0023 – 0.0118	P/E	$\mu\text{g}/\text{Kg ww}$	sardina
0.0027 – 0.0100	A/I	0.0037 – 0.0100	P/E	$\mu\text{g}/\text{Kg ww}$	sugarello
0.0023 – 0.0199	A/I	0.0018 – 0.0119	P/E	$\mu\text{g}/\text{Kg ww}$	lanzardo

Essendo questo studio focalizzato su una regione del Portogallo, i dati sono stati riadattati al consumo di pesce di questo paese pari a 55.6 Kg/anno_{pro-capite} e i risultati ottenuti sono in linea con quelli a livello globale.

Conclusioni

Le specie ittiche selezionate sono pelagiche e tendono ad essere più esposte ad IPA solubili in acqua, o che si adsorbono a materiale in sospensione come fitoplancton o particolato, dato il basso peso molecolare. I contaminanti possono perciò essere assimilati per ingestione, diffusione passiva attraverso branchie e pelle, oltre all'assorbimento diretto dall'acqua, a differenza degli IPA con peso molecolare maggiore che si ritrovano principalmente nei sedimenti. La maggiore fonte di contaminazione per questi organismi alla luce delle precedenti osservazioni, può essere identificata nel petrolio, e le analisi effettuate rafforzano ciò, considerando che le uniche molecole ritrovate in concentrazioni significative hanno un numero di anelli inferiore a 4. I dati ottenuti mostrano come la percentuale di grasso presente negli organismi sia un fattore determinante per il livello di contaminazione degli stessi. I confronti effettuati hanno permesso di vedere, come una serie di fattori propri delle specie selezionate o dell'ambiente circostante, influenzino significativamente quella percentuale, oltre alla biodisponibilità e al bioaccumulo dei contaminanti, difatti le correlazioni statistiche più rilevanti sono presenti tra la concentrazione degli IPA, il contenuto totale di grassi e le stagioni. Le stime fatte al fine di determinare se ci fossero rischi o meno nel consumare pescato contaminato hanno dato esito negativo e non sono perciò necessarie restrizioni nel consumo di tali alimenti.