



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Marina

---

**Effetto della stagionalità sul bioaccumulo di  
idrocarburi policiclici aromatici nella triglia di  
fango (*Mullus barbatus*) del Mar Adriatico**

Effect of seasonality on the bioaccumulation of  
polycyclic aromatic hydrocarbons in red mullet  
(*Mullus barbatus*) of the Adriatic Sea

Tesi di Laurea Magistrale  
di:

**Elisa Pucci**

Matricola 1080941

*Elisa Pucci*

Relatore

**Dott.ssa Anna Annibaldi**

*Anna Annibaldi*

Correlatore

**Dott.ssa Emanuela Frapiccini**

*Emanuela Frapiccini*

Sessione Estiva

Anno Accademico 2019/2020

# Indice

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
1.1	<i>Idrocarburi policiclici aromatici .....</i>	5
1.1.1	<i>Proprietà chimico fisiche .....</i>	9
1.1.2	<i>Origine .....</i>	11
1.1.3	<i>Destino degli IPA in ambiente marino .....</i>	15
1.1.4	<i>Destino degli IPA all'interno dell'organismo .....</i>	18
1.1.5	<i>Tossicità e cancerogenicità degli IPA .....</i>	25
1.1.6	<i>Normative di riferimento .....</i>	29
1.2	<i>Mullus barbatus (Linneaus, 1758) .....</i>	38
1.2.1	<i>Alimentazione .....</i>	44
1.2.2	<i>Ciclo riproduttivo .....</i>	44
1.2.3	<i>Pesca .....</i>	46
1.3	<i>Mare Adriatico .....</i>	48
<b>2</b>	<b>OBIETTIVO DELLA TESI .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>56</b>
3.1	<i>Campionamento .....</i>	56

3.2	<i>Analisi biometriche del pesce.....</i>	58
3.3	<i>Estrazione IPA con metodo QuEChERs .....</i>	58
3.4	<i>Analisi chimica in UHPLC-FLD.....</i>	65
3.5	<i>Validazione metodo analitico.....</i>	70
3.5.1	<i>Validazione metodo QuEChERs per determinare gli IPA nel filetto di Mullus barbatus .....</i>	72
3.6	<i>Controlli bianco HPLC .....</i>	76
3.7	<i>Controlli con standard .....</i>	76
3.8	<i>Determinazione del contenuto lipidico nel filetto della specie Mullus barbatus.....</i>	76
3.9	<i>Analisi statistica .....</i>	78
<b>4</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>79</b>
4.1	<i>Concentrazione media degli idrocarburi policiclici aromatici, frequenza e rapporto percentuale .....</i>	82
4.2	<i>Distribuzione delle concentrazioni in funzione del peso molecolare .</i>	87
4.3	<i>Distribuzione delle concentrazioni in funzione dell'area di campionamento (costa-largo) .....</i>	89
4.4	<i>Distribuzione delle concentrazioni in funzione della stagionalità .....</i>	92

4.5	<i>Distribuzione della concentrazione in base al sesso .....</i>	97
4.6	<i>Determinazione della percentuale lipidica nel filetto di Mullus barbatus.....</i>	104
<b>5</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>107</b>
5.1	<i>Concentrazione media degli idrocarburi policiclici aromatici, frequenza e rapporto percentuale .....</i>	107
5.2	<i>Distribuzione delle concentrazioni in funzione del peso molecolare</i>	109
5.3	<i>Distribuzione delle concentrazioni in funzione dell'area di campionamento (costa-largo) .....</i>	110
5.4	<i>Distribuzione delle concentrazioni in funzione della stagionalità ...</i>	113
5.5	<i>Determinazione della percentuale lipidica nel filetto di Mullus barbatus.....</i>	115
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>121</b>

# 1 INTRODUZIONE

## *1.1 Idrocarburi policiclici aromatici*

Gli idrocarburi policiclici aromatici, conosciuti anche con l'acronimo IPA o dall'inglese PAHs (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), sono contaminanti organici e composti ubiquitari nell'ambiente.

Rappresentano un gruppo di diverse centinaia di composti chimicamente correlati, presenti in varie strutture che permangono nell'ambiente e con diversi gradi di tossicità.

Sono costituiti da anelli benzenici che si fondono tra loro lì dove condividono due atomi di carbonio portando alla formazione di strutture lineari, angolari o cluster.

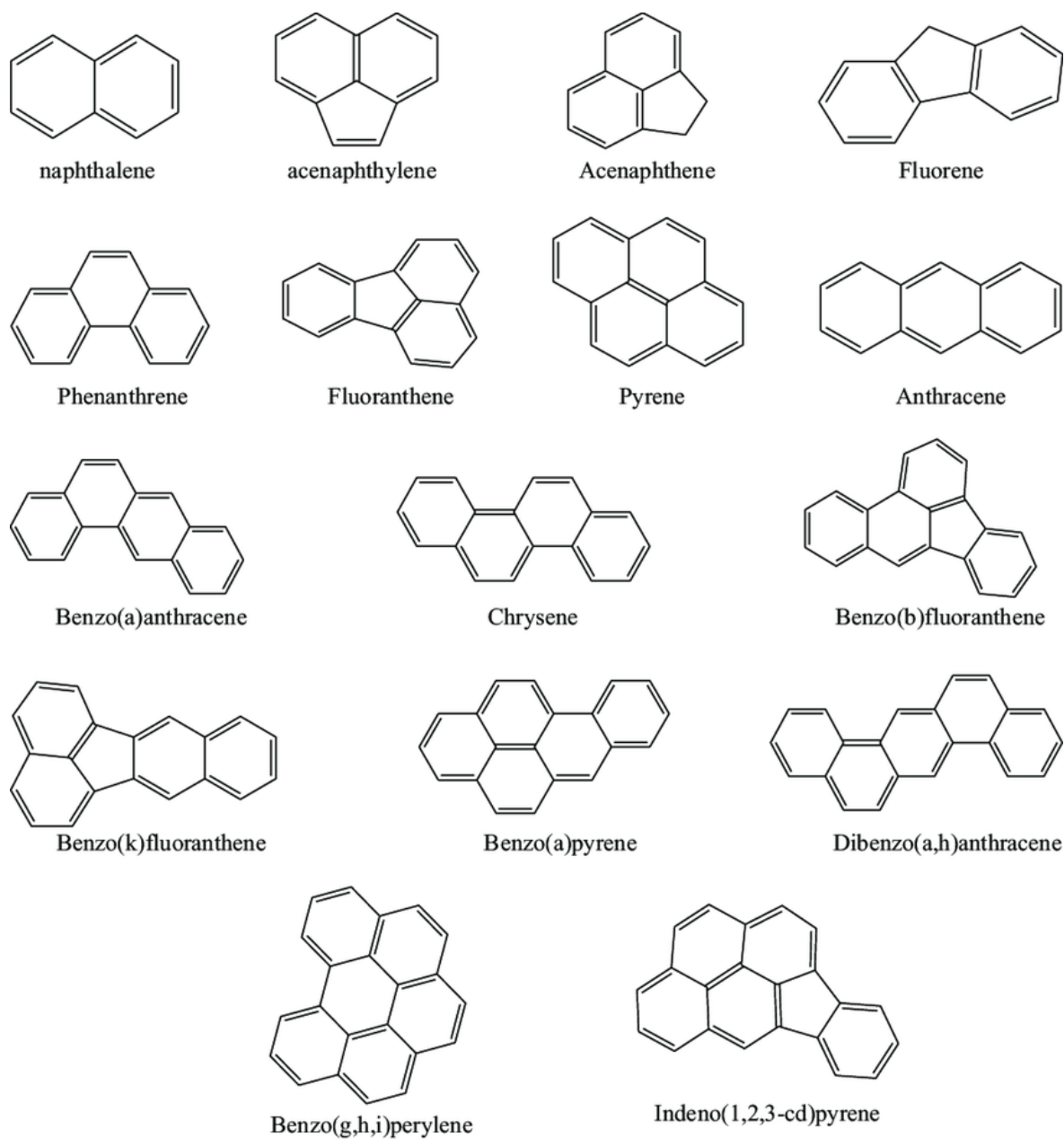


Figura 1. Struttura chimica di alcuni idrocarburi policiclici aromatici (fonte: Karishma Hussain)

Il numero di anelli benzenici varia da due a sette e, spesso, sono presenti gruppi sostituenti come i gruppi alchilici, i gruppi arilici, ecc...

In base al numero degli anelli aromatici e, quindi, al peso molecolare del

composto, possiamo distinguere: idrocarburi policiclici aromatici a basso molecolare (*Lower Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, LMW PAHs) con due o tre anelli benzenici condensati, e idrocarburi policiclici aromatici ad alto peso molecolare (*High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, HMW PAHs) con numero di anelli uguale o maggiore di quattro (Figura 1). La posizione degli anelli aromatici, il loro numero e gli atomi presenti nella molecola influenzano le caratteristiche fisico-chimiche di questi composti, il loro comportamento nell'ambiente e le interazioni con esso (Nikolaou A. et al. 2009a).

Tabella 1. Elenco con relative abbreviazioni degli IPA analizzati in questo studio

<b>IPA</b>	<b>Abbreviazione</b>
Naftalene	NaF
Acenaftene	AC
Fluorene	FL
Fenantrene	PHE
Fluorantene	FA
Pirene	PY
Benzo(a)antracene	BaA
Crisene	CHR
Benzo(b)fluorantene	BbFA
Benzo(k)fluorantene	BkFA
Benzo(a)pirene	BaP
Dibenzo(a,h)antracene	DBahA
Benzo(g,h,i)perilene	BghiP
Indeno pirene	IP



### ***1.1.1 Proprietà chimico fisiche***

Le proprietà chimico-fisiche degli IPA ne permettono la distribuzione in tutti gli ecosistemi terrestri e marini.

A temperatura ambiente gli IPA sono tutti allo stato solido e le principali caratteristiche sono un alto punto di fusione e di ebollizione e una pressione di vapore molto bassa (Abdel-Shafy and Mansour 2016).

Un'altra caratteristica importante degli IPA è il fatto che sono composti idrofobici, con una solubilità in acqua molto bassa. Sono, invece, solubili nella maggior parte dei solventi organici (Abdel-Shafy and Mansour 2016).

Alcune delle principali proprietà sono legate ai sistemi coniugati degli elettroni  $\pi$  e vengono influenzate dal numero di anelli benzenici presenti nel composto e, cioè, dal loro peso molecolare.

Le caratteristiche correlate al peso molecolare sono la resistenza all'ossidazione e alla riduzione che aumentano all'aumentare di esso e la solubilità in acqua: la quale, invece, diminuisce all'aumentare del peso molecolare (Meador et al. 1995).

IPA con basso peso molecolare saranno più solubili in acqua rispetto a IPA più pesanti e quindi i primi risulteranno maggiormente biodisponibili (Hylland 2006).

La solubilità in acqua viene espressa dal coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ( $K_{OW}$ ), parametro determinato in laboratorio, che è molto importante per determinare l'assorbimento dei composti organici.

Il  $K_{OW}$  rappresenta anche una misura della lipofilità degli IPA ed esprime la capacità di accumulo in fasi apolari, come i lipidi dei pesci.

È proprio la loro natura lipofila che consente il bioaccumulo all'interno dell'organismo.

All'aumentare del valore di  $K_{OW}$ , diminuisce la solubilità in acqua e, di conseguenza, aumenta l'assorbimento di IPA nel sedimento.

Per valutare la tendenza di accumulo nei sedimenti piuttosto che la loro presenza in fase acquosa viene utilizzato il parametro fisico  $K_{OC}$ , coefficiente di ripartizione sedimento acqua che si ottiene dividendo la concentrazione di idrocarburo per grammo di carbonio organico per la concentrazione nelle acque sovrastanti e interstiziali (Meador et al. 1995).

Può essere ricavato, per approssimazione, dalla costante di ripartizione ottanolo-acqua ( $K_{OW}$ ) in base alla formula:

$$K_{OC} = 0,63 * K_{OW}$$

La maggior parte degli IPA è in grado di emettere, se eccitato, lunghezze d'onda caratteristiche di luce, presentando fluorescenza. Questi composti hanno spettri di assorbanza UV differenti per ogni struttura ad anello, quindi saranno diversi tra i diversi isomeri ed è proprio questa caratteristica che ne consente l'identificazione.

### ***1.1.2 Origine***

Le sorgenti di IPA possono essere molteplici e la loro formazione e il loro rilascio avviene ogni qual volta si ha una combustione incompleta di materiale organico, contenente carbonio, come, ad esempio, legno, carbone, rifiuti e prodotti petroliferi.

La principale fonte in ambiente, quindi, risulta essere derivante da processi di combustione incompleta, sia di origine naturale che antropica (Abdel-Shafy and Mansour 2016).

La loro ampia distribuzione è dovuta proprio a questa caratteristica e la loro concentrazione nell'ambiente ha visto un aumento a partire dal secolo scorso dovuto allo sviluppo industriale.

Il meccanismo di formazione di IPA durante un processo di combustione è complesso e ancora poco chiaro: in seguito alla frammentazione di molecole più grandi del combustibile a contatto con il fuoco, processo noto come *cracking*, avviene una ripolimerizzazione dei frammenti che porterà alla formazione di idrocarburi policiclici.

La formazione avviene con un meccanismo radicalico nel quale due dei frammenti a due atomi di carbonio andranno a combinarsi tra loro formando un radicale C<sub>4</sub> (Figura 2, Reazione 1). Il radicale C<sub>4</sub>, a questo punto può legarsi ad un acetilene e formare un radicale ciclico con sei atomi di carbonio (Figura 2, Reazione 2), dal quale, attraverso reazioni di addizione, si formeranno anelli benzenici condensati (Figura 2, Reazione 3).

Si tratta di una reazione anaerobica, che avviene, cioè, in assenza di ossigeno e un basso rapporto ossigeno/combustibile favorisce l'aumento della velocità di reazione (Bocca, Crebelli, and Menichini 2003).

In sintesi, la resa in IPA dipende dalla composizione del materiale organico bruciato, dalla temperatura e dalla concentrazione di ossigeno (Neff, Stout, and Gunster 2005).

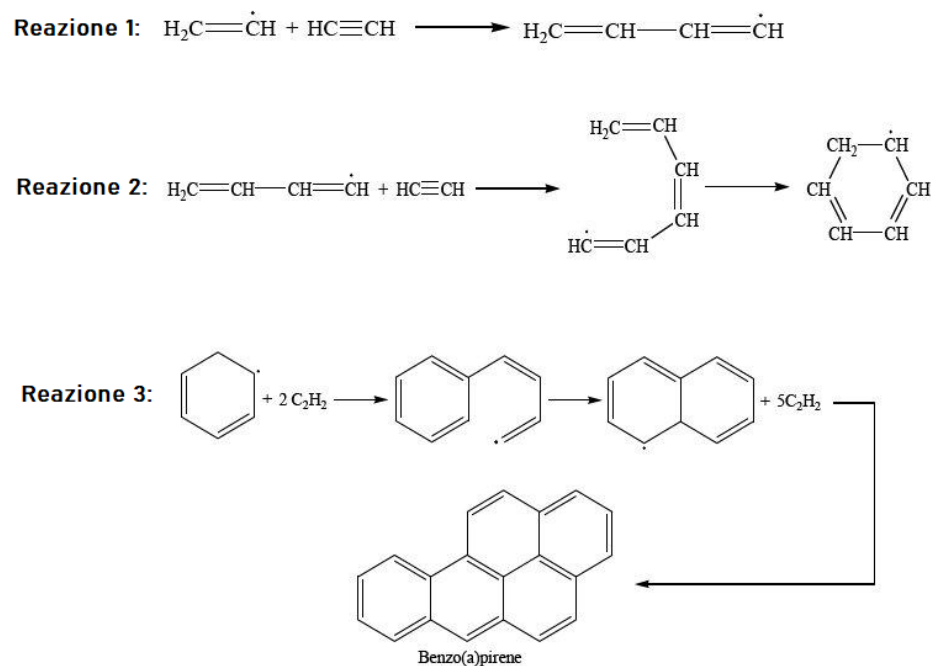


Figura 2. Reazioni di *cracking* con formazione di idrocarburi policiclici aromatici.

Gli IPA non vengono mai prodotti come composti singoli ma come classe di composti e in miscela, anche, con altri inquinanti.

Possono formarsi sia da fonti naturali, come la sintesi da parte di organismi o eventi naturali (incendi boschivi, vulcanismo e infiltrazioni di petrolio), ma anche, e soprattutto, da fonti antropiche. Gli IPA di origine antropica sono il risultato di processi industriali, come combustione e smaltimento di combustibile fossile (Perugini et al. 2007).

Derivando da molteplici fonti, ne consegue, l'impossibilità di elencarle tutte o di individuare gli IPA da esse prodotti, per cui vengono generalmente suddivise in: pirolitica, petrogenica e biologica.

Gli IPA di origine pirolitica si producono ogni qualvolta che, in condizioni di ipossia o anossia, la sostanza organica viene esposta ad alte temperature (350°C-1200°C). Le fonti pirolitiche comprendono, quindi, processi di combustione e incenerimento di rifiuti.

Quando gli IPA si formano in seguito a trasporto, stoccaggio e uso del greggio e dei suoi prodotti, vengono definiti di origine petrogenica. Questi idrocarburi derivano da versamenti di petrolio in acque marine e dulcicole, da fuoriuscite da serbatoi e da piccoli versamenti da parte di mezzi di trasporto.

In ultimo, gli IPA di origine naturale possono essere biosintetizzati da alghe e batteri o possono derivare da erosione di rocce sedimentarie e da vulcani.

### ***1.1.3 Destino degli IPA in ambiente marino***

Gli idrocarburi policiclici aromatici, una volta immessi nell'atmosfera, subiscono un trasporto a lungo raggio e, tramite precipitazioni atmosferiche, arrivano anche al suolo, in mare e nelle acque interne. La presenza ubiquitaria di questi composti comporta quindi un rischio sia per la salute umana che per molti organismi viventi (Maliszewska-Kordybach 1999).

Gli IPA possono entrare nell'ambiente marino attraverso varie vie: deposizione atmosferica, deflusso fluviale, deflussi urbani e industriali e le immissioni dirette di petrolio (Zaghden et al. 2007).

Gran parte degli idrocarburi che entrano in mare sono di derivazione antropogenica mentre gli input da fonti naturali, generalmente, contribuiscono in minor parte all'accumulo di IPA nell'ambiente marino. Una volta all'interno del suddetto ambiente, gli IPA possono andare

incontro a vari processi, tra cui, trasformazione microbica e fotolisi ma possono avvenire anche altri fenomeni come foto-ossidazione, ossidazione chimica, bioaccumulo e assorbimento (Marini and Frapiccini 2013)(Park et al.,1990).

Nella valutazione della concentrazione degli IPA, l'ambiente marino può essere suddiviso in tre matrici: sedimento, colonna d'acqua e biota; la distribuzione nelle diverse matrici dipende dall'origine del composto, dalle sue proprietà fisiche ma anche dalle condizioni ambientali e dalla granulometria dei sedimenti.

Gli IPA sono composti molto idrofobici quindi la loro concentrazione in acqua è molto bassa mentre risulterà maggiore nel sedimento. Dato il loro carattere idrofobico, gli IPA tendono ad essere adesi al particolato organico della colonna d'acqua e trasportati per effetto gravitazionale nei sedimenti marini, dove tendono ad accumulare. Infatti, con l'aumentare dell'idrofobicità l'equilibrio termodinamico favorisce il partizionamento delle molecole di IPA in ambienti non polari, come i lipidi degli organismi e il carbonio organico che circonda le particelle di sedimento (Meador et al. 1995).

La biodisponibilità è legata anche all'origine degli idrocarburi, gli IPA pirogenici sono, per lo più, associati alle particelle e, a volte, incorporati



anche in esse, mentre quelli di origine petrolifera sono più facilmente assorbibili dagli organismi marini.

Anche il peso molecolare si correla all'origine degli IPA: molti degli IPA presenti nel petrolio sono a basso peso molecolare, con due o tre anelli benzenici mentre gli idrocarburi derivanti da combustione contengono da quattro anelli in su. Nella pirolisi completa ad alta temperatura avviene la rottura delle molecole fino ad ottenere anidride carbonica e acqua, le quali, in seguito, possono condensarsi e formare nuovi prodotti chimici, tra cui gli IPA (Neff, Stout, and Gunster 2005).

La maggior concentrazione di IPA negli ecosistemi marini è localizzata nelle acque costiere e negli estuari, più nello specifico, nei pressi di centri urbani, stando a sottolineare che l'attività antropogenica è la principale fonte di IPA in mare, dato che, proprio in queste aree, le attività di traffico navale e l'utilizzo di petrolio sono più elevati (Nikolaou A. et al. 2009a)(Emanuela Frapiccini and Marini 2015).

Gli idrocarburi di origine petrolifera entrano in mare attraverso il rilascio di prodotti petroliferi, pertanto la maggiore fonte di questi composti è riconducibile all'oil-spill, e da infiltrazioni naturali, mentre quelli derivanti da combustione arrivano nell'ambiente marino tramite aerosol

da combustione di vari materiali, sia naturali che artificiali (Meador et al. 1995).

#### ***1.1.4 Destino degli IPA all'interno dell'organismo***

Composti organici naturali e artificiali vengono dispersi da molte fonti differenti in ambiente acquatico, in particolare i contaminanti artificiali vengono prodotti sempre in più quantità e varietà.

È importante conoscere gli effetti e il destino di queste sostanze all'interno del biota, sia che queste siano naturali che antropiche.

Il monitoraggio del destino di sostanze naturali può essere utilizzato in studi ecologici ed evolutivi mentre conoscere e studiare il destino di contaminanti non naturali è fondamentale per tenere sotto controllo l'inquinamento, per la gestione ambientale e per valutare l'impatto di queste sostanze (Livingstone 1998).

L'assorbimento di xenobiotici organici, come gli IPA, dai sedimenti o dalla colonna d'acqua, è passivo in tutti gli organismi sia che essi siano vertebrati che invertebrati.

Tra i vertebrati, i pesci demersali, che vivono in stretto contatto con i fondali, sia che essi siano filtratori sia che si nutrano di organismi bentonici, sono esposti ad alte concentrazioni di questi composti e tendono a bioaccumularli.

I tassi di assorbimento, però, non differiscono molto tra i due tipi di organismi, invertebrati o vertebrati, ma dipendono per lo più dalle esposizioni prevedibili dai coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua.

Nell'analizzare il bioaccumulo è importante valutare il coefficiente di equilibrio sedimento-acqua ( $K_{OC}$ ) che considera l'assorbimento di sostanze chimiche idrofobiche come un rapporto tra acqua e frazione organica del sedimento, secondo l'espressione:

$$K_{OC} = \frac{k_S}{k_W} = \frac{C_S}{C_W}$$

dove  $S$  è in riferimento ai sedimenti e  $W$  all'acqua; e anche la ripartizione delle sostanze chimiche tra acqua e lipidi dell'organismo. Questa viene espressa come fattore di bioconcentrazione (BCF) secondo la formula:

$$BCF = \frac{k_B}{k_W} = \frac{C_B}{C_W}$$

dove  $B$  indica il biota mentre  $W$  indica l'acqua.

Entrambi, sia il coefficiente sedimento-acqua che il fattore di bioconcentrazione dipendono dall'idrofobicità della sostanza.

Se i processi di accumulo nei sedimenti e bioconcentrazione raggiungono l'equilibrio, le due equazioni possono essere combinate per definire il fattore di accumulo biota- sedimenti (BSAF), espresso con la formula:

$$BSAF = \frac{C_B}{C_S} = \frac{BCF}{K_{OC}}$$

Le deviazioni del valore di BSAF previste con i modelli di partizionamento possono essere dovute all'assorbimento di contaminanti attraverso gli alimenti (biomagnificazione) o ad una maggiore metabolizzazione dei prodotti chimici da parte del pesce.

Per questo motivo il bioaccumulo di composti idrofobici non può essere spiegato tramite semplici processi di partizionamento sedimenti, acqua e pesce (Van Der Oost et al. 1996).

La biomagnificazione è il rapporto tra l'accumulo di contaminante attraverso il cibo e la sua escrezione e può essere descritto con il fattore di biomagnificazione, espresso dalla formula:

$$BMF = \frac{k_F}{k_B} = \frac{F_F E_F}{k_B}$$

dove  $F_F$  rappresenta la quantità di cibo trasportata all'interno dell'intestino/g di pesce/giorno e  $E_F$  l'efficienza di accumulo di contaminante dal cibo (Van Der Oost et al. 1996).

La biomagnificazione è sito-specifica e dipende dalla biodisponibilità dei contaminanti che a sua volta è influenzata dalle caratteristiche dei sedimenti come le dimensioni e il contenuto di materia organica (OM).

I tassi di biotrasformazione sono invece una caratteristica intrinseca dell'organismo, dipendente dall'attività di enzimi, che sono presenti maggiormente nei pesci rispetto agli invertebrati marini.

Le differenze di biotrasformazione tra invertebrati e vertebrati marini spiegano il bioaccumulo di xenobiotici, come gli IPA, soprattutto nelle parti inferiori della catena alimentare, mentre altri xenobiotici recalcitranti come i PCB subiscono biomagnificazione lungo la catena alimentare, risultando concentrati nei livelli più alti della catena (Livingstone 1998).

Tutti gli organismi hanno una serie di enzimi per la biotrasformazione, che nei vertebrati marini si trovano a livelli maggiori nel fegato. La biotrasformazione influenza il tempo di permanenza, la disposizione e la tossicità di uno xenobiotico all'interno dell'organismo (Livingstone 1998).

È importante sottolineare che non si tratta di sistemi di detossificazione ma di biotrasformazione, infatti, a volte, queste reazioni sono associate alla comparsa di forme di tossicità.

I vertebrati marini, come i pesci, hanno sviluppato un sistema di biotrasformazione in grado di convertire gli IPA in derivati idrosolubili che possono essere più facilmente escreti (Abdel-Shafy and Mansour 2016).

La principale via di metabolizzazione degli IPA è enzimatica e coinvolge enzimi come citocromo P450-monoossigenasi, epossido idrolasi e alcuni enzimi coniuganti.

Il fine ultimo di questi enzimi è convertire xenobiotici organici liposolubili in composti idrosolubili e riescono a fare ciò attraverso un sistema di metabolizzazione e biotrasformazione diviso in due fasi: reazioni di fase I e reazione di fase II.

Nelle reazioni di fase I (ossidazione, riduzione, idratazione o idrolisi), l'enzima citocromo P450 mono-ossigenasi aggiunge un gruppo funzionale (come ad esempio  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NO}_2$ ) allo xenobiotico.

Il citocromo P450 mono-ossigenasi è una famiglia multienzimatica e multigenica, ed è un sistema inducibile, la cui risposta aumenta all'aumentare del substrato da metabolizzare. Alcuni IPA possono svolgere il ruolo di induttori.

Il cyt P450 in condizioni basali contiene ferro ferrico ( $3^+$ ), il quale, quando lo xenobiotico va a legarsi al citocromo, diventa ferroso ( $2^+$ ) e solo in queste condizioni l' $\text{O}_2$  riesce a compiere la reazione di ossidazione. Vengono ossidati due substrati: il ferro e lo xenobiotico. Successivamente, nelle reazioni di fase II, enzimi di coniugazione

aggiungono un gruppo polare (glutazione, solfato, glucuronide, amminoacido) alla molecola formatasi in fase I rendendola idrosolubile (Livingstone 1998).

Sono reazioni di coniugazione o “addizione chimica” e i principali enzimi coinvolti sono: UDP-glucuronosil-trasferasi, glutazione-trasferasi e sulfo-transferasi.

Per gli IPA, l’aumento di bioaccumulo in organismi commestibile e la valutazione degli effetti a lungo termine che la loro ingestione può causare sulla salute umana, sono motivo di preoccupazione. Ad oggi, però, molti sono gli studi che indagano sulle fonti e sulle concentrazioni di IPA negli ambienti acquatici e negli organismi marini ma al contempo manca l’indagine sui fattori che determinano il bioaccumulo e i possibili effetti che l’esposizione di IPA può causare nei pesci commestibili (E. Frapiccini et al. 2020).

È importante sottolineare che i meccanismi di assorbimento, accumulo, biotrasformazione ed eliminazione degli IPA sono complessi e specie-specifici, in più sono influenzati da fattori chimici, biologici e ambientali (E. Frapiccini et al. 2020).



### ***1.1.5 Tossicità e cancerogenicità degli IPA***

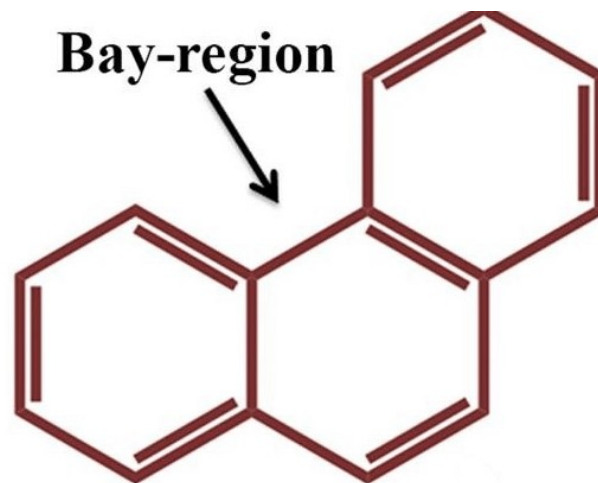
Gli IPA, insieme a molti altri composti, hanno un importante impatto sull'ambiente e sugli organismi, sia per la loro ubiquità e sia perché molti di essi sono considerati cancerogeni e mutageni.

Tra gli IPA considerati potenzialmente cancerogeni troviamo il benzo(a)antracene, crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, e benzo(g,h,i)perilene.

Il benzo(a)pirene è stato inizialmente classificato come 2B (*possibly carcinogenic to humans*) e solo successivamente, nel 2006, inserito nella classe 1 (*carcinogenic to humans*) dall'IARC (*International Agency for Research Cancer*). Ad oggi, ci sono prove evidenti che il benzo(a)pirene e altri IPA inducano tumori del tratto digestivo di alcuni animali ai quali queste sostanze sono state somministrate per ingestione a fini sperimentali ("IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans" 2010).

In esperimenti svolti sugli animali è stata visto che la posizione degli anelli aromatici svolge un ruolo determinante nella potenzialità cancerogena di questi composti. Esiste una regione, definita regione di

recesso o “bay region”, la quale si forma a causa di una ramificazione nella sequenza di atomi nell’anello benzenico e conferisce al composto un alto grado di reattività biochimica (Figura 3).



## Phenanthrene

Figura 3. Bay region del Fenantrene (fonte: Debajvoti Ghosal)

Una caratteristica delle molecole di IPA è il fatto che non sono degli agenti cancerogeni di per sé ma lo diventano in seguito a reazioni metaboliche all’interno dell’organismo.

Il benzo(a)pirene, ad esempio, viene metabolizzato all'interno di vari organi come polmoni, pelle, esofago, colon, fegato e placenta.

La prima reazione di metabolizzazione è un'ossidazione catalizzata dalla famiglia enzimatica del citocromo P450, che avviene a livello del reticolo endoplasmatico delle cellule e genera epossidi (benzo(a)piren-7,8-eossido) (Figura 4).

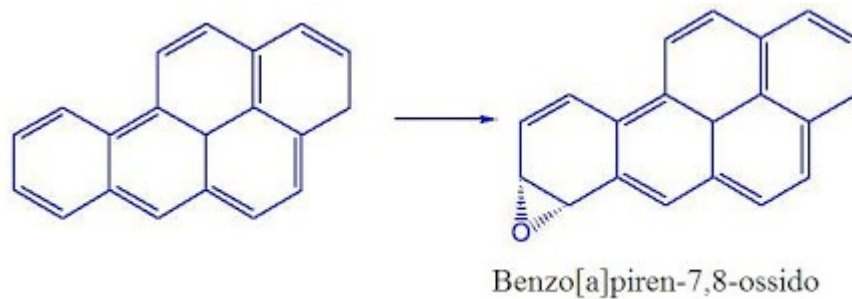


Figura 4. Prima reazione di metabolizzazione del benzo(a)pirene, reazione di epossidazione con formazione di benzo(a)piren- 7,8-eossido

L'eossido può, anch'esso, andare incontro a metabolizzazione e, infatti, può subire un attacco nucleofilo da parte dell'acqua, portando alla formazione di un diolo, sostanza più idrosolubile e quindi più eliminabile (Figura 5).

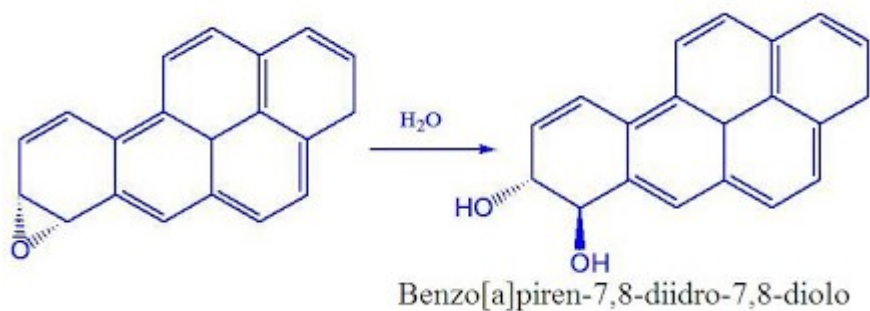


Figura 5. Seconda reazione di trasformazione metabolica del benzo(a)pirene-7,8-epossido in benzo(a)pirene-7,8-diidro-7,8-diolo

Non tutto il benzo(a)pirene-7,8-diidro-7,8-diolo viene eliminato, la restante parte subisce un'ulteriore reazione di epossidazione diventando benzo(a)pirene-7,8-diolo,9-10-epossido (Figura 6).

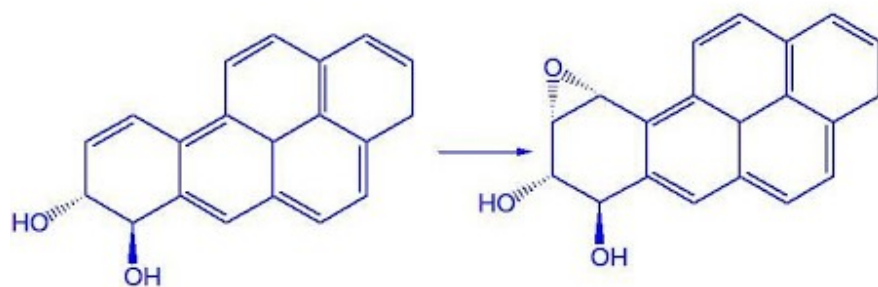


Figura 6. Reazione di epossidazione del benzo(a)pirene-7,8-diidro-7,8-diolo in benzo(a)pirene-7,8-diolo,9-10-epossido.

Il diolo-epossido può legarsi al DNA rappresentando un evidente danno che può portare mutazioni e carcinogenesi.

### 1.1.6 Normative di riferimento

Ad oggi, sedici IPA sono stati inseriti nell'elenco degli inquinanti prioritari per l'US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) e, per questo, vengono costantemente monitorati (Figura 7).

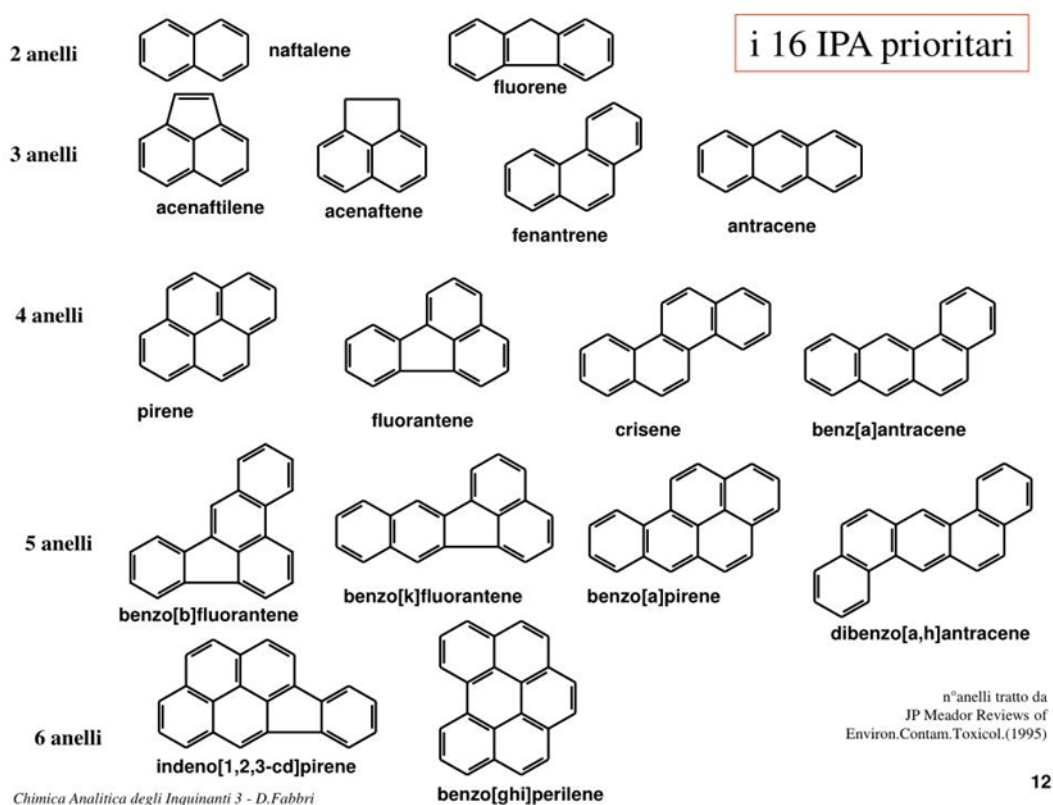


Figura 7. Elenco e strutture dei 16 IPA prioritari secondo l'US EPA, divisi in base al numero di anelli benzenici (fonte: Daniele Fabbri)

Data l'ubiquità degli IPA e la loro importanza sia a livello ambientale che sanitario, nel corso degli anni sono stati stabiliti dei livelli limite normativi per l'acqua e per gli alimenti.

## **Acqua**

Nel valutare le normative sull'acqua bisogna fare, in primo luogo, una distinzione tra acque potabili, destinate cioè al consumo umano e acque interne, costiere e transitorie.

La Direttiva UE 98/83/CE, importante per le acque destinate al consumo umano, ha impostato un limite per la concentrazione di questi composti di 0,10 µg/L (Consiglio dell'Unione Europea, 1999) mentre l'interesse scientifico per la qualità dell'acqua e dei sedimenti marini è aumentato negli ultimi anni grazie alla Direttiva Europea 2000/60/CE, la quale ha come principale obiettivo il raggiungimento del "buon stato chimico" delle acque superficiali monitorando la loro qualità (Commissione Europea, 2014).

La valutazione della qualità dell'acqua si correla alla qualità dei sedimenti, dato che, è proprio al loro interno, che si accumulano la

maggior parte degli xenobiotici, come anche gli IPA (Anastasia Nikolaou et al. 2009b).

L'articolo 16 della direttiva quadro sulle acque (2000/60/CE) (DQA) stabilisce “strategie contro l'inquinamento delle acque”, delineando le misure da adottare.

La decisione 2455/2001/CE fornisce un primo elenco di sostanze prioritarie a livello europeo importanti per valutare lo stato chimico delle acque fino a 12 miglia nautiche dalla costa (Joint Research Centre (European Commission), 2017), che rappresenta l'allegato X della Direttiva Europea 2000/60/CE.

Le sostanze presenti nell'elenco rappresentano un rischio significativo per l'ambiente acquatico e sono state selezionate seguendo l'approccio descritto nell'articolo 16 della direttiva quadro sulle acque.

Successivamente, nel 2008 la Direttiva Europea 2008/105/CE (ESSD), conosciuta anche con il nome *direttiva sulle sostanze prioritarie*, ha stabilito degli standard di qualità ambientale (SQA) per le sostanze nei fiumi, nei laghi e in ambiente transitorio e costiero (Tabella 2). In tale Direttiva Europea vengono imposti limiti di concentrazione in acque superficiali per 33 sostanze prioritarie e altri 8 inquinanti e nello

specifico, nell'articolo 9, viene stabilito che gli Stati membri sono tenuti a prendere in considerazione i sedimenti, quando opportuno, durante il monitoraggio di quelle sostanze che tendono ad accumularsi al fondo e, qualora fosse necessario, a stabilire degli EQS per i sedimenti differenti da quelli riportati per le acque superficiali (Unione Europea, 2008).

Nel 2012 la Commissione Europea con una proposta di direttiva (COM/2011/876) ha apportato modifiche all'elenco di sostanze prioritarie tra cui l'aggiunta di 15 sostanze e la modifica dell'EQS per sostanze già presenti.

Il buon stato chimico di un corpo idrico si raggiunge quando esso è conforme all'EQS per tutte le sostanze prioritarie.



Tabella 2. Standard di qualità ambientale (SQA) per gli IPA stabiliti dalla Direttiva 2008/05/CE

N.	Denominazione della sostanza	Numero CAS <sup>(1)</sup>	SQA-AA <sup>(2)</sup> Acque superficiali interne <sup>(3)</sup>	SQA-AA <sup>(2)</sup> Altre acque di superficie	SQA-CMA <sup>(4)</sup> Acque superficiali interne <sup>(3)</sup>	SQA-CMA <sup>(4)</sup> Altre acque di superficie
(28)	Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) <sup>(10)</sup>	non applicabile	non applicabile	non applicabile	non applicabile	non applicabile
	Benzo(a)pirene	50-32-8	0,05	0,05	0,1	0,1
	Benzo(b)fluorantene	205-99-2	Σ = 0,03	Σ = 0,03	non applicabile	non applicabile
	Benzo(k)fluorantene	207-08-9				
	Benzo(g,h,i)perilene	191-24-2	Σ = 0,002	Σ = 0,002	non applicabile	non applicabile
	Indeno(1,2,3-cd)pirene	193-39-5				

<sup>(1)</sup> CAS: Chemical Abstracts Service.

<sup>(2)</sup> Questo parametro rappresenta lo SQA espresso come valore medio annuo (AA-SQA). Se non altrimenti specificato, si applica alla concentrazione totale di tutti gli isomeri.

<sup>(3)</sup> Per acque superficiali interne si intendono i fiumi, i laghi e i corpi idrici artificiali o fortemente modificati.

<sup>(4)</sup> Questo parametro rappresenta lo standard di qualità ambientale espresso come concentrazione massima ammissibile (CMA-SQA). Quando compare la dicitura «non applicabile» riferita agli CMA-SQA, si ritiene che i valori AA-SQA tutelino dai picchi di inquinamento di breve termine, in scarichi continui, perché sono sensibilmente inferiori ai valori derivati in base alla tossicità acuta.

<sup>(10)</sup> Per il gruppo di sostanze prioritarie «idrocarburi policiclici aromatici» (IPA) (voce n. 28) è applicabile ogni singolo SQA, devono cioè essere rispettati lo SQA per il benzo(a)pirene, lo SQA relativo alla somma di benzo(b)fluorantene e benzo(k)fluorantene e lo SQA relativo alla somma di benzo(g,h,i)perilene e indeno(1,2,3-cd)pirene.

In aggiunta alle Direttive Europee 2000/60/CE e 2008/105/CE per la selezione di sostanze xenobiotiche in aree marine coperte da legislazione europea, compresi gli IPA, è stata introdotta recentemente la Direttiva Marina (MSFD, 2008/56/EC2) con successiva modifica nel 2017 (UE 2017/8453).

La MSFD (*Marine Strategy Framework Directive*) è una Direttiva Europea che ha come obiettivo il raggiungimento del GES: *Good Enviromental Status* (Buono stato ambientale) stabilendo 11 descrittori qualitativi illustrativi, tra cui il descrittore 8: “Le concentrazioni di contaminanti sono a livelli che non danno origine a effetti inquinanti”.

Nonostante si conosca il ruolo dei sedimenti nell'accumulo di alcuni inquinanti idrofobici in ambiente acquatico, tra cui gli IPA, non sono stati stabiliti degli standard di qualità specifici. In mancanza di normative nazionali di riferimento vengono utilizzati in maniera impropria i valori di concentrazione limite per i suoli descritti nel D. Lgs 152/06. In questo decreto troviamo standard di qualità per sostanze prioritarie e persistenti nelle diverse matrici in siti costieri e di transizione.

## **Alimenti**

La presenza di IPA negli alimenti non sottoposti a trasformazione, può essere dovuta a:

- Deposizione del particolato atmosferico, rilevabile su frutta e verdura
- Assorbimento dal suolo
- Assorbimento da acque interne e acque marine contaminate, rilevabile in molluschi, pesci e crostacei

Differentemente, negli alimenti trasformati e lavorati, la presenza di IPA è dovuta a:

- Trattamenti termici (cottura alla griglia, arrosto, al forno e frittura)
- Processi di essiccazione utilizzando fumi di combustione, negli oli vegetali
- Processi di affumicatura

I tenori massimi di IPA all'interno dei prodotti alimentari sono stati inizialmente definiti nel regolamento europeo (CE) n. 1881/2006 della Commissione Europea del 2006, il quale prende in considerazione i livelli massimi di benzo(a)pirene in prodotti alimentari.

L'utilizzo di benzo(a)pirene, negli anni passati, come marcatore di presenza ed effetto di IPA cancerogeni nei prodotti alimentari è stato decretato in base al parere dell'ex comitato scientifico dell'alimentazione umana (SCF).

Successivamente però nel 2008, fu evidenziato dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) l'inadattabilità del benzo(a)pirene come marcatore per la presenza di IPA negli alimenti e venne sostituito con un sistema di 4 sostanze (IPA<sub>4</sub>): benzo(a)pirene, crisene, benzo(a)antracene

e benzo(b)fluorantene. In aggiunta ai tenori massimi degli IPA<sub>4</sub> è stato mantenuto un tenore massimo separato per il benzo(a)pirene al fine di permettere una valutazione con i dati del passato (Commissione Europea, 2011).

I nuovi dati di occorrenza degli IPA informano che i livelli di fondo di questi composti sono inferiori a quelli precedentemente ipotizzati in alcuni alimenti, pertanto sono stati adeguati anche i tenori massimi di benzo(a)pirene in molluschi bivalvi freschi (Commissione Europea, 2011).

In pesce e carne affumicati, tenori massimi inferiori non sono stati applicati poiché sono prima necessari adeguamenti dell'attuale tecnologia di affumicatura. Il tenore massimo in muscolo di pesce affumicati e prodotti di pesca affumicati è stato impostato a 2 µg/Kg, come possiamo vedere in Tabella 3.

In passato era stato stabilito un tenore massimo di benzo(a)pirene anche nel muscolo di pesce non affumicato, utilizzato come indicatore di inquinamento ambientale, ma, dati gli alti tassi di metabolizzazione del pesce non è opportuno mantenere un tenore massimo di IPA nel pesce fresco (Commissione Europea 2011).

Tabella 3. Tenori massimi espressi in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per diversi alimenti, indicati nel regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 2006. Il riquadro rosso e la linea gialla mettono in evidenza i tenori per il benzo(a)pirene in pesci affumicati

Prodotti alimentari		Tenori massimi ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
6.1	Benzo(a)pirene, benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene e crisene	Benzo(a)pirene	Somma di benzo(a)pirene, benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene e crisene <sup>(43)</sup>
6.1.1	Oli e grassi (escluso il burro di cacao e l'olio di cocco) destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0	10,0
6.1.2	Semi di cacao e prodotti derivati	5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di grasso a decorrere dall'1.4.2013	35,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di grasso a decorrere dall'1.4.2013 fino al 31.3.2015 30,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di grasso a decorrere dall'1.4.2015
6.1.3	Olio di cocco destinato al consumo diretto nell'alimentazione umana o a essere usato come ingrediente di un prodotto alimentare	2,0	20,0
6.1.4	Carne affumicata e prodotti a base di carne affumicata	5,0 fino al 31.8.2014 2,0 a decorrere dall'1.9.2014	30 a decorrere dall'1.9.2012 fino al 31.8.2014 12,0 a decorrere dall'1.9.2014
6.1.5	Muscolo di pesce affumicato e prodotti della pesca affumicati <sup>(25)(36)</sup> , esclusi i prodotti ittici di cui ai punti 6.1.6 e 6.1.7. Il tenore massimo nei crostacei affumicati si applica al muscolo delle appendici e dell'addome <sup>(44)</sup> . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi affumicati ( <i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i> ) si applica al muscolo delle appendici.	5,0 fino al 31.8.2014 2,0 a decorrere dall'1.9.2014	30,0 a decorrere dall'1.9.2012 fino al 31.8.2014 12,0 a decorrere dall'1.9.2014

## 1.2 *Mullus barbatus* (Linneaus, 1758)

Nella seguente tesi, per valutare la concentrazione di IPA nel filetto di pesce è stata utilizzata la specie *M. barbatus*.

Questa specie è raccomandata dal FAO-UNEP come una specie bioindicatrice (Fao-Unep, 1993) poiché ha un grande contenuto di lipidi che favorisce il bioaccumulo di sostanze lipofile come gli IPA (Conti et al. 2012).



Figura 8. Esemplare di *M. barbatus* (fonte: Stefano Guerrieri)

- Classe: Actinopterygii
- Ordine: Perciformes
- Famiglia: Mullidae
- Genere: Mullus

*Mullus barbatus*, conosciuta con il nome comune di triglia di fango, è una specie demersale, gregaria, che vive su fondi fangosi, di sabbia o ghiaia della piattaforma continentale, ad una profondità che va dai 10 ai 500m (Figura 8).

Appartiene alle *Mullidae*, una famiglia di pesci demersali commercialmente molto importanti, distribuiti nelle acque di tutto il mondo, la quale comprende 15 generi di cui solo 3 (*Mullus*, *Upeneus* e *Pseudopeneus*) sono presenti nel Mar Mediterraneo.

Il genere *Mullus sp* è rappresentato da due specie: *M. barbatus* e *M. surmuletus* (Turan 2006).

Le due specie sono entrambe bentoniche ma si differenziano per il tipo di substrato da esse colonizzato: infatti, *M. barbatus*, la triglia di fango, vive su fondi fangosi e sabbiosi mentre *M. surmuletus*, la triglia di scoglio, predilige fondi rocciosi.

*M. barbatus* è diffusa in tutto il bacino Mediterraneo e nell'est Atlantico dall'isola britannica al nord del Senegal. È presente anche nel Mar Nero e nel mare d'Azov dove, però, viene classificata come una sub-specie, *M. barbatus ponticus*, anche se nessun studio genetico ha ancora confermato questa suddivisione (Turan 2006).

Le specie del genere *Mullus sp* hanno una distribuzione di areale che si sovrappone ma presentano una segregazione d'habitat ben precisa, *M. surmuletus* si trova sempre a profondità minori di 100m mentre *M. barbatus* presenta la massima abbondanza di individui adulti tra i 100m e i 300m di profondità, in fondi sabbiosi, con una colonizzazione totale delle zone di estuario anche a profondità minori. In alcuni studi è stato riscontrato che il reclutamento e le generazioni delle due specie in Mediterraneo siano separate temporalmente (Lombarte and Aguirre 1997).





Figura 9. Esemplare di *M. barbatus* con dettaglio sui barbigli  
(fonte: Marinko BABIĆ)

La caratteristica più importante delle specie appartenenti alla famiglia delle *Mullidae* è la presenza di due barbigli (in primo piano in Figura 9), i quali hanno funzione olfattiva e tattile, utilizzati come organi sensoriali per il riconoscimento del tipo di fondale marino e per l'individuazione della preda all'interno del sedimento (Bombace e Lucchetti, 2011).

I barbigli sono considerati un adattamento compensativo nelle acque torbide, nelle quali la vista è ridotta e l'individuazione della preda potrebbe essere compromessa (Lombarte and Aguirre 1997).

La lunghezza dei barbigli è maggiore in *M. surmuletus* rispetto a *M. barbatus*, nonostante la prima non sia associata con i fondi sabbiosi, e questa differenza sembra giustificata dal maggior tasso di crescita della specie; in *M. surmuletus* i barbigli sono più lunghi delle pinne pettorali. Mentre la sensibilità dei barbigli agli stimoli chimici è maggiore in *M. barbatus*, in quanto le acque sovrastanti i fondi mobili presentano una torbidità maggiore e quindi una visibilità più bassa (Lombarte and Aguirre 1997).

*M. barbatus* ha un corpo allungato, compresso lateralmente e una piccola testa; la superficie dorsale della testa è appiattita e ciò le conferisce un profilo brusco.

L'occhio si trova nella parte alta della testa e le proporzioni tra capo e corpo si modificano durante la crescita del pesce. La bocca, invece, si trova in posizione ventrale ed è piccola e poco protrattile. I denti sono villiformi nella mascella inferiore mentre sono assenti su quella superiore e sono presenti denti all'interno della bocca (vomere e palatino) (FAO, 2018).

Ha una livrea rosa con macchie rossastre che vanno dall'occhio alla pinna caudale, con tre linee giallastre sui fianchi ma senza nessuna macchia sulle pinne.

Le pinne dorsali sono due, corte e distanziate: la prima ha otto raggi spiniformi con il primo molto più piccolo degli altri, mentre la seconda ha nove raggi morbidi (FAO,2018). La pinna anale, posta ventralmente in corrispondenza della seconda dorsale, ha due spine e sei o sette raggi molli.

La superficie del corpo è ricoperta da grandi scaglie non molto aderenti, da 33 a 37 lungo la linea laterale e 2 sulla suborbitale (scaglie suborbitali) (FAO,2018).

La lunghezza massima è di 30 cm, anche se comunemente la taglia di questi pesci si aggira tra i 10cm e i 20 cm. La crescita è differente in base al sesso: i maschi crescono più lentamente e non superano mai i 20 cm mentre le femmine raggiungono dimensioni maggiori, fino ai 30 cm, e crescono molto più velocemente (Sieli et al. 2011).

Questo trend è confermato da Vrgoč (2000) nella spedizione MEDITS nell'Adriatico Centrale e Settentrionale, nella quale gli individui con dimensioni al di sotto dei 15 cm erano tutti maschi mentre al di sopra di quella taglia il genere femminile era dominante (Vrgoč N., Arneri E., Juki-Peladi S., Krstulović Šifner S., Mannini P., Marčeta B., Osmani K., Piccinetti C., and AdriaMed 2004).

### **1.2.1 Alimentazione**

La triglia di fango è una specie carnivora che si nutre prevalentemente di organismi bentonici come i crostacei, tra questi copepodi, anfipodi, isopodi e misidacei sono le prede più ambite.

Oltre i crostacei vengono predati anche policheti e molluschi bivalvi e, solo in alcuni casi, cefalopodi (Layachi et al. 2007).

In alcuni studi condotti sulle coste del Marocco è stato visto che la dieta di questa specie può subire variazioni durante le stagioni, anche se la maggior parte delle sue prede è presente durante tutto il ciclo trofico. In più, all'aumentare della taglia, *M. barbatus* ingerisce prede sempre più grandi (Layachi et al. 2007).

### **1.2.2 Ciclo riproduttivo**

La triglia di fango adriatica, considerata in questa tesi, si riproduce tra maggio e luglio. La maturità sessuale si ha ad una taglia che si aggira intorno ai 10/14cm che, per entrambi i sessi, corrisponde al primo anno di età (Haider, 1963).

I maschi, una volta raggiunta la maturità sessuale, hanno una fase riproduttiva costante che si estende per l'intero anno. Le femmine, invece, presentano sempre un ciclo sessuale annuale, il quale può essere suddiviso in quattro fasi: la deposizione, l'atresia, la maturazione lenta e, infine, la maturazione rapida. La deposizione avviene da aprile a metà luglio, l'atresia da metà luglio a metà settembre, la maturazione lenta da metà settembre a fine marzo e l'ultima fase, la maturazione rapida, si ha nel mese di aprile (Haider, 1963).

La deposizione delle uova si verifica a profondità tra i 60m e 70m e, in seguito alla schiusa, le larve si spostano verso la costa ad una profondità tra i 30m e i 40m dove trovano le condizioni ambientali adatte alla loro crescita (optimum di temperatura e disponibilità di nutrienti) (Vrgoč N., Arneri E., Juki-Peladi S., Krstulović Šifner S., Mannini P., Marčeta B., Osmani K., Piccinetti C., and AdriaMed 2004).

Le larve, le post-larve e i giovanili sono organismi pelagici, molto piccoli, con una lunghezza di 4-5 cm (FAO, 2018); mentre gli adulti diventano demersali colonizzando zone sabbiose, fangose e ghiaiose tra i 10 e i 250m di profondità (Vrgoč N., Arneri E., Juki-Peladi S., Krstulović Šifner S., Mannini P., Marčeta B., Osmani K., Piccinetti C. and AdriaMed 2004).

I giovanili si concentrano anche nelle foci dei fiumi e, a volte, possono penetrare nelle acque interne per centinaia di metri (Scaccini,1974). La livrea subisce una mutazione durante la crescita del pesce, nelle fasi larvali e giovanili tende all'azzurro-verde per poi diventare tendente al rosso nelle fasi adulte.

### **1.2.3 Pesca**

*M. barbatus* è una delle specie demersali economicamente più importanti nel Mar Mediterraneo.

Nel Mar Adriatico la triglia viene pescata quasi esclusivamente con reti a strascico, anche se individui più piccoli possono essere pescati anche con reti a tramaglio, con un totale di catture che arriva a 2000 tonnellate/anno (Vrgoč N., Arneri E., Juki-Peladi S., Krstulović Šifner S., Mannini P., Marčeta B., Osmani K., Piccinetti C., and AdriaMed 2004).

La specie è distribuita in tutto il bacino adriatico ma non uniformemente nello spazio e nel tempo e l'abbondanza della popolazione diminuisce all'aumentare della profondità.

Nella spedizione MEDITS (1996-1998) l'indice di biomassa media della triglia nell'Adriatico Centrale e Settentrionale era di 16,36 kg/km<sup>2</sup>, e la più alta densità di popolazione è stata trovata tra i 50m e 100m di profondità (28,81 kg/km<sup>2</sup>) (Vrgoč N., Arneri E., Juki-Peladi S., Krstulović Šifner S., Mannini P., Marčeta B., Osmani K., Piccinetti C. and AdriaMed 2004).

La triglia di fango viene pescata durante tutto l'anno con un picco all'inizio dell'autunno; è proprio durante questo periodo che i giovanili sono la componente dominante della popolazione. Le indagini fatte nei periodi estivi e autunnali mostrano molti soggetti vicino all'anno d'età mentre gli individui con età superiore ad un anno sono solo il 5%. In primavera, invece, la percentuale degli individui che superano l'anno di età diventa circa del 20%.

Il periodo autunnale coincide con la migrazione verso il largo delle triglie giovanili che andranno ad unirsi con gli individui adulti, fenomeno indicato con il termine di reclutamento, e quindi l'intensa pesca porta ad un'alta percentuale di morte delle reclute (*Growth overfishing*) con conseguenze sull'intera popolazione di *M. barbatus* (Bombace e Lucchetti, 2011).

Secondo quanto stabilito nel REGOLAMENTO (CE) 1967/2006, ad oggi, la taglia minima di pesca della specie *M. barbatus* è 11 cm (Consiglio dell'Unione Europea ,2006).

### ***1.3 Mare Adriatico***



Figura 10. Mappa del Mar Adriatico (fonte: Google Earth)



Il Mare Adriatico è un bacino di forma allungata, con il suo asse maggiore in direzione nordovest-sudest, racchiuso tra la penisola italiana ad occidente e la penisola balcanica ad oriente (Figura 10).

Si estende fino alla latitudine di 45° 47' Nord rappresentando la parte più settentrionale del Mar Mediterraneo; gli scambi con il resto del Mediterraneo sono garantiti dal Canale di Otranto, lungo circa 72 km e profondo 780 m.

Il Mare Adriatico deve il suo nome agli antichi greci, ispirati dalla città di Adria situata alla foce del fiume Po; è un bacino lungo circa 800 km e largo 200 km, con un'area superficiale di 138.600 km<sup>2</sup> e un volume di ~ 35.000 km<sup>3</sup> (5% dell'intero Mediterraneo).

All'interno del bacino Adriatico troviamo chiare differenze morfologiche, lungo l'asse longitudinale, che ne permettono la suddivisione in tre sottobacini: settentrionale, centrale e meridionale (Russo and Artegiani 1996).

Il bacino settentrionale si estende dal tratto più a Nord dell'Adriatico fino alla linea batimetrica dei 100 m, di fronte a Giulianova, ed è per lo più poco profondo con profondità media è di ~35 m. Il bacino centrale si

estende dal transetto di Giulianova-Sebenico a quello di Vieste-Spalato, in corrispondenza della sella di Pelagosa, e presenta condizioni di mare aperto con la massima profondità di 270 m in corrispondenza di due depressioni chiamate fosse di Pomo (o Jabuka).

Infine, il bacino meridionale procede dal transetto Vieste-Spalato fino al canale di Otranto, zona che separa il Mar Adriatico dal Mar Ionio, il quale presenta una piattaforma continentale stretta, di 20-30 km, seguita da una ripida pendenza che termina in una pianura abissale piatta intorno ai 1000 m di profondità; la profondità massima è raggiunta a livello di una depressione (South Adriatic Pit) ed è pari a 1243 m.

L'apporto fluviale è molto elevato e un gran numero di fiumi sfociano nel mar Adriatico, come il fiume Po situo nella zona settentrionale, il quale apporta 1585 m<sup>3</sup>/s di acqua dolce al bacino (~ 28% degli apporti fluviali totali che corrispondono a 5700 m<sup>3</sup>/s), e l'insieme dei fiumi albanesi che si immettono, invece, nella parte est del bacino.

Dato l'elevato apporto di acqua dolce, l'Adriatico è considerato un bacino di diluizione, nel quale l'apporto fluviale supera di gran lunga l'evaporazione, con un guadagno netto di acqua dolce di circa 1.10m annui.

Le proprietà oceaniche del Mare Adriatico sono condizionate principalmente dalla posizione geografica, dal river-off, dallo scambio idrico con il Mar Ionio e dalle condizioni climatiche. Questi fattori possono agire separatamente gli uni dagli altri o interagire andando a determinare il modello circolatorio del bacino e le sue variazioni inter-stagionali e inter-annuali (Artegiani et al. 1993).

Il Mar Adriatico è circondato da tre crinali montuosi: l'Appennino nella parte ovest, le Alpi a nord e le Alpi Dinariche ad est. Queste catene montuose operano un controllo sul vento, influenzando, in particolare, la parte settentrionale del bacino. Dall'apertura tra le Alpi e le Alpi Dinariche deriva un vento secco, freddo e forte, proveniente da nord nord-est, chiamato Bora; mentre, grazie alla presenza della catena appenninica e delle Alpi Dinariche, si incanala lungo l'asse maggiore del bacino lo Scirocco, altro principale vento che gioca un ruolo importante sulla circolazione dell'Adriatico (Zavatarelli 2002) (Russo and Artegiani 1996).

Lo Scirocco è un vento proveniente dall'Arabia che soffia da sud-est, il quale accumula umidità durante il suo passaggio sul Mediterraneo Orientale (Mar Ionio); non tende a formarsi in un mese o una stagione ben precisa anche se regimi di Scirocco evidenti sono presenti nel bacino

Adriatico in autunno-inverno. Ha un'intensità media di 10 m/s ma in inverno e primavera può arrivare anche a 30m/s. Questo vento influenza il livello del mare nella parte nord dell'Adriatico ed è responsabile del fenomeno dell'acqua alta nella città di Venezia. Durante l'inverno, il Mar Adriatico viene esposto ad un vento catabolico secco, freddo e con una velocità media di 15 m/s e una velocità massima di 50 m/s, detto Bora, il quale è importante nel processo di formazione delle masse d'acqua. Infine, in estate, il vento dominante è il Maestrale, proveniente da nord-ovest (Russo and Artegiani 1996).

I venti influenzano la circolazione generale del bacino e quest'ultima influenza a sua volta la distribuzione dei nutrienti proveniente dai fiumi lungo la costa italiana, ad ovest del bacino; avremo, quindi, lungo la costa occidentali acque meno salate e più eutrofiche rispetto a quelle presenti sul lato opposto del bacino che saranno, invece, oligotrofiche.

Il bacino Adriatico è sottoposto a forzanti atmosferiche che ne influenzano le proprietà oceanografiche; per cui, la circolazione e la distribuzione delle masse d'acqua in questo mare sono, in gran parte, dovute ai continui scambi con l'atmosfera.

Il flusso di calore annuale del Mar Adriatico ( $Q_T$  climatologico) è negativo, viene perso calore per una quantità che ammonta intorno ai 22

$W/m^2$ , con perdite maggiori in inverno e aumenti di calore in estate (Zavatarelli 2002) (Artegiani et al., 1997a). Il bilancio idrico è, invece, positivo, con i massimi guadagni in primavera dovuti sia alle precipitazioni che al deflusso fluviale.

I flussi di calore e il bilancio idrico influenzano in maniera opposta la forza di galleggiamento, incidendo sulle caratteristiche della circolazione termoalina e, anche, su quella locale.

Dai profili di temperatura e salinità dell'Adriatico sono state definite vari tipi di masse d'acqua, che hanno origine sia dal bacino stesso che dal resto del Mediterraneo.

In Adriatico sono presenti tre masse d'acqua principali: superficiale, intermedia e profonda. La massa superficiale è influenzata dal grado di diluizione, dovuta al deflusso fluviale, lo strato intermedio dipende dalla penetrazione di acqua intermedia Levantina e, infine, la massa presente in profondità deriva dalla formazione e dalla distribuzione di acqua densa (Zavatarelli 2002).

## 2 OBIETTIVO DELLA TESI

L'obiettivo della presente tesi è quello di determinare la concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici nel filetto della specie demersale *M. barbatus*. Essendo una specie target in Adriatico con un alto valore commerciale, la valutazione della sua contaminazione da IPA è importante non solo dal punto di vista ambientale ma anche alimentare.

In questa tesi la concentrazione di IPA nel filetto di *M. barbatus* è stata investigata considerando variabili relativi al contaminante (peso molecolare) e alla specie (contenuto lipidico e sesso). Inoltre, è stata considerata la diversa area di campionamento, in particolare un'area vicino alla costa e una più lontano da essa e, infine, il fattore della stagionalità attraverso un campionamento effettuato in estate e uno in inverno.

Per le analisi di determinazione degli IPA è stato utilizzato il metodo di estrazione QuEChERS, una tecnica di estrazione che mira a minimizzare i tempi e ad utilizzare quantità di solventi inferiori rispetto alle tecniche

tradizionali mentre per il contenuto lipidico è stata utilizzata l'estrazione assistita con microonde "*Microwave-Assisted Extraction*" (MAE).

### **3 MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Campionamento**

Tutti i campioni analizzati in questa tesi sono stati raccolti nell'Adriatico Centro-Settentrionale, all'interno della zona di pesca chiamata Geographical Sub Area 17 (GSA 17), in due aree differenti: una costiera e una di mare aperto ed effettuando un campionamento nel periodo invernale e in quello estivo (Figura 11).



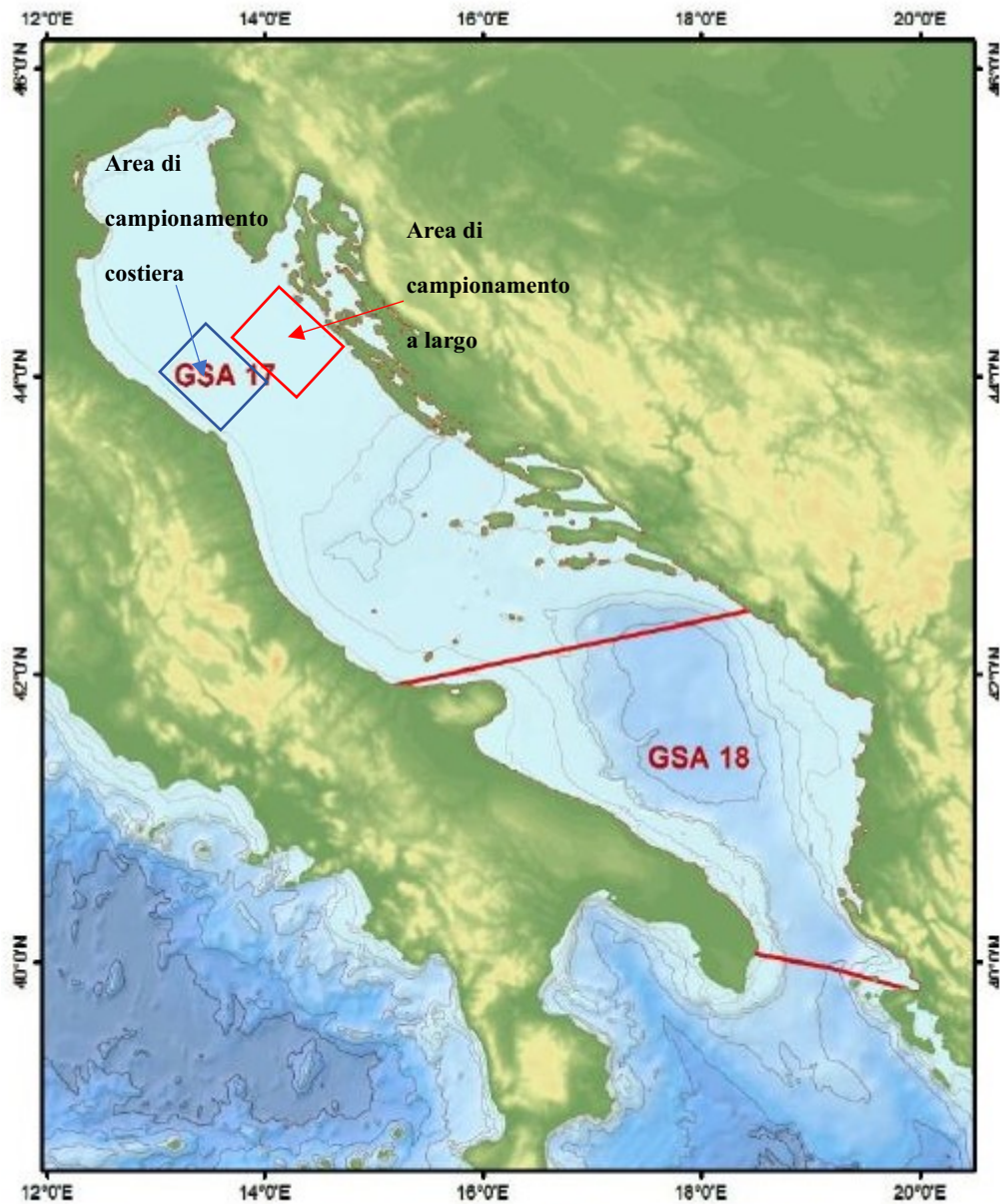


Figura 11. Mappa del Mar Adriatico con dettaglio sulla zona di pesca GSA 17 (fonte:UNEP-MAP-RAC/SPA, 2015) I riquadri blu e rosso indicano le aree di campionamento.

Sono stati pescati da pescherecci locali utilizzando pesca a strascico e

consegnati al laboratorio CNR-ISMAR dove sono state svolte le analisi.

I campioni presi in esame sono in totale 260.

### **3.2 *Analisi biometriche del pesce***

In primo luogo, precedentemente all'estrazione, sono stati valutati i parametri biometrici, lunghezza e peso, ed è stato valutato il sesso e lo stadio sessuale tramite analisi delle gonadi.

I campioni sono stati etichettati con una sigla (es: Mb 6400, dove Mb sta ad indicare la specie, in questo caso *M. barbatus*, e 6400 è il numero del campione) e posti in congelatore, ad una temperatura di -20 °C.

### **3.3 *Estrazione IPA con metodo QuEChERS***

Il metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) seguito dall'estrazione dispersiva in fase solida (d-SPE) è una tecnica di estrazione sviluppata, nel 2002, da Michelangelo Anastassiades e Steven Lehotay, che prende il nome dalle sue caratteristiche. La tecnica, infatti, è all'altezza del suo nome in ogni aspetto, mirando a semplificare le

procedure di estrazione, a discapito dei metodi tradizionali che richiedono molti passaggi, molto tempo e consistenti quantità di solventi, e minimizzando i costi, il tempo e lo spazio in laboratorio.

Questa tecnica non era del tutto nuova alla scienza, infatti, sia l'estrazione /partizionamento solido-liquido, compresa l'aggiunta di sali, veniva utilizzata, in precedenza, per l'analisi di molti analiti ma anche l'estrazione dispersiva d-SPE (*dispersive Solide Phase Extraction*) veniva impiegata per la pulizia del campione, con l'utilizzo di cartucce SPE. L'innovazione fu nel trovare la combinazione perfetta tra le due procedure e nella scelta dei sali e dei solventi (González-Curbelo et al. 2015).

Originariamente è stata introdotta per l'analisi multiresiduale di pesticidi in vari prodotti agricoli ad alto contenuto di acqua ma, successivamente, la tecnica originale fu continuamente modificata per l'analisi di un gran numero di pesticidi non polari, polari e planari sia in matrici alimentari che ambientali. Oltre che per l'analisi dei pesticidi multiresiduo, ad oggi questa tecnica è utilizzata per analizzare altri inquinanti, tra cui gli IPA (Kim et al. 2019).

Nella valutazione della presenza di IPA in matrici biologiche sono state, spesso, utilizzate tecniche di estrazione e pulizia del campione complesse atte ad ottenere estratti pronti per la determinazione analitica.

In numerosi studi, gli IPA sono stati estratti dal filetto del pesce utilizzando procedure Soxhlet, l'estrazione solido-liquido pressurizzata (PSE o ASE) o la supercritical fluid extraction (SFE) mentre, per campioni ambientali, viene utilizzata l'estrazione assistita con microonde (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE) (Ramalhosa et al. 2009).

Queste tecniche, come anche il metodo QuEChERS sono, spesso, associate con una procedura clean-up come l'estrazione in fase solida (SPE) o la *gel permeation chromatography*.

In questa tesi, gli IPA sono stati estratti dal filetto di *M. barbatus* utilizzando il metodo QuEChERS.

I pesci sono stati sviscerati e sfilettati manualmente al fine di ottenere il quantitativo di filetto necessario per l'estrazione; ogni campione è stato ottenuto da materiale derivante da un singolo pesce, solo per i pesci più piccoli, dove il filetto non era sufficiente a raggiungere la quantità

necessaria per l'analisi, il campione è stato ottenuto dall'unione di due o più pesci di uguale taglia, età e sesso e di peso simile.

Dal filetto sono stati prelevati 5 g, pesati con bilancia analitica alla quinta cifra decimale e omogenizzati manualmente così da aumentarne la superficie di contatto con il solvente. Per l'estrazione sono state utilizzate provette FALCON IPA free per evitare la contaminazione dell'analisi.

Sono stati aggiunti 10 mL di acetonitrile e si è provveduto ad agitare la provetta così da permettere al solvente di entrare bene in contatto con il campione omogeneizzato.

Nella provetta, inoltre, sono stati aggiunti dei sali, in concentrazioni note: 4 g di  $\text{MgSO}_4$  e 1 g di  $\text{NaCl}$ , per consentire l'estrazione degli IPA dal filetto di pesce utilizzando la tecnica del salting-out.

Il campione è stato, inizialmente, agitato con un vortex per 3 minuti e poi centrifugato per 3 minuti a 3400 r.p.m. a 4 °C, temperatura importante per perseverare le caratteristiche delle molecole (Figura 12).



Figura 12. Centrifuga utilizzata nello studio

Dal surnatante ottenuto dalla centrifugazione sono stati prelevati 3 mL (Figura 13), inseriti all'interno di una provetta da 15 mL IPA free con al suo interno altri Sali, in concentrazioni note: 900 mg  $\text{MgSO}_4$ , 300 mg PSA e 150 mg C18.



Figura 13. Provetta FALCON IPA free contenente il campione di filetto di *M. barbatus* dopo l'aggiunta di Sali e acetonitrile e dopo la centrifugazione del campione.

Questa fase è definita di purificazione: l'aggiunta di sali porta all'eliminazione di tutte quelle molecole (lipidi, carboidrati ed eventuali residui di acqua), presenti normalmente in una miscela complessa, che potrebbero interferire con l'analisi chimica.

Il composto è stato agitato vigorosamente in modo manuale per circa 1 minuto e, sempre per 1 minuto, è stato messo in centrifuga a 3400 r.p.m, anche in questo caso ad una temperatura di 4 °C (Figura 14).



Figura 14. Provette IPA free all'interno della centrifuga.

Il surnatante ottenuto dalla centrifugazione è stato recuperato e inserito all'interno di una provetta Vial e fatto evaporare con un flusso di azoto. Dopo l'evaporazione il campione è stato ricostituito con l'aggiunta di 400  $\mu\text{L}$  di acetonitrile ed è stata effettuata la filtrazione tramite filtro a membrana PTFE da 0,20  $\mu\text{L}$ .

Le Vial sono state chiuse con parafilm per evitare perdite accidentali di campione e sono state congelate a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino all'analisi in UHPLC-FLD.



### **3.4 *Analisi chimica in UHPLC-FLD***

Le analisi in questa tesi sono state effettuate con HPLC, cromatografia liquida ad alta prestazione o pressione, una tecnica cromatografica che utilizza dei reagenti liquidi (fase mobile).

La strumentazione analitica utilizzata è un HPLC Ultra 3000 (UHPLC 3000), equipaggiata di una pompa quaternaria e un rilevatore fluorimetrico (Figura 15).



Figura 15. HPLC Ultra 3000 (UHPLC 3000) utilizzata nello studio

La pompa quaternaria, presenta quattro vie, attraverso le quali viene iniettata la fase mobile all'interno del sistema e, durante l'analisi, una delle quattro vie deve essere sempre mantenuta libera per la pulizia, effettuata tramite una soluzione di acqua ed etanolo in rapporto 1:1. La fase mobile viene fatta eluire all'interno della colonna cromatografica con un'alta pressione, da cui il nome della strumentazione, mentre resta costante la velocità. Data la costanza della velocità, è la pressione a

cambiare in base alla polarità della fase mobile, per mantenere il flusso costante.

La fase mobile utilizzata in questo lavoro è costituita da Acetonitrile e acqua, secondo un programma a gradiente con una percentuale iniziale di ACN:H<sub>2</sub>O del 40:60 fino ad arrivare ad una presenza assoluta di acetonitrile (ACN 100%). La velocità di flusso di eluizione è di 0,3 mL min<sup>-1</sup> mentre la pressione cambia, fino ad un massimo di 250 bar (Figura 16).

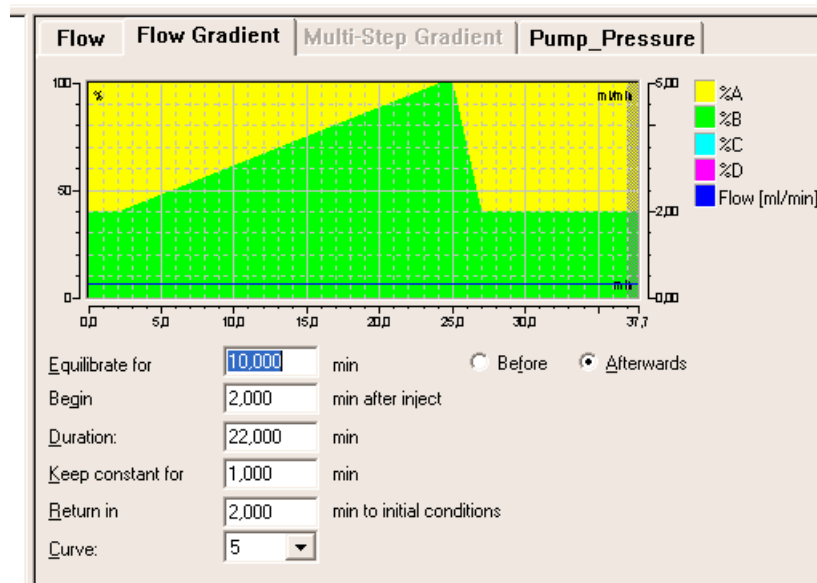


Figura 16. Grafico illustrativo del gradiente della fase mobile (ACN:H<sub>2</sub>O)

Oltre ad una fase mobile, è presente anche una fase stazionaria, costituita da una colonna cromatografica HYPERSIL Green PAH (2.1 x 150 mm, 3 µm, 120Å), utile per la separazione degli analiti e, in questo caso, specifica per gli IPA.

La separazione degli analiti, nel nostro caso IPA, è determinata dalla loro minore o maggiore affinità per la fase mobile o per la fase stazionaria e questa affinità è determinata dalle loro caratteristiche chimico-fisiche.

Ad esempio, IPA con basso peso molecolare e quindi con pochi anelli aromatici, avranno più affinità per la fase mobile (fase polare) mentre idrocarburi con peso molecolare più alto e un numero di anelli aromatici > 4, essendo molecole apolari, si legheranno maggiormente alla fase stazionaria (fase apolare).

Gli idrocarburi eluiranno quindi uno per volta e tramite il rilevatore fluorimetrico verranno identificati. L'identificazione sfrutta la capacità di molti IPA di essere fluorescenti.

In questa tesi vengono analizzati 15 IPA dei 16 considerati inquinanti prioritari, manca l'Acenaftilene che non presentando fluorescenza non può essere analizzato mediante il rilevatore utilizzato durante questa analisi.

Dalla risposta del fluorimetro si ottiene il cromatogramma, costituito da picchi che rappresentano i vari IPA e vede sull'asse delle Y la risposta del rilevatore e sull'asse delle X il tempo di ritenzione ad una determinata lunghezza d'onda (Figura 17).

Grazie al picco cromatografico è possibile quantificare gli IPA ottenuti, confrontandolo con l'area ottenuta con gli standard.

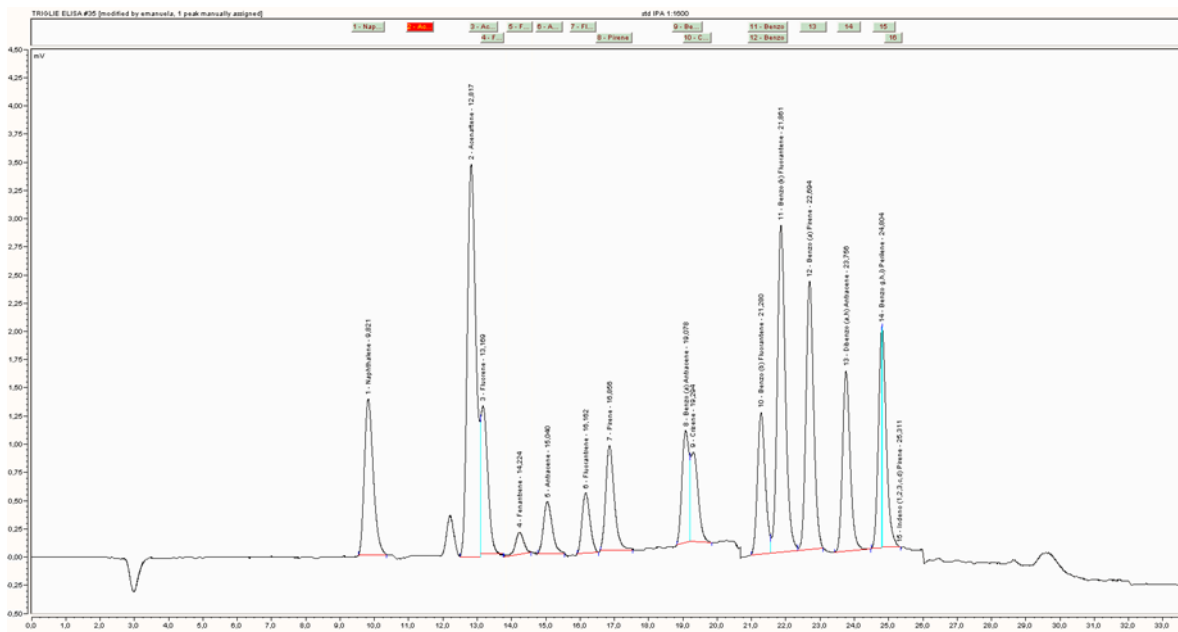


Figura 17. Esempio di un cromatogramma dello standard

### 3.5 Validazione metodo analitico

La “validazione del metodo” è il processo di definizione dei requisiti analitici e di conferma che il metodo considerato sia in grado di soddisfare quanto richiesto per quella specifica applicazione. Inclusa in questo processo c’è la necessità di valutare le prestazioni del metodo.

La validazione permette agli analisti di dimostrare che un metodo è “idoneo per lo scopo” e ciò significa che il risultato ottenuto avrà un grado di affidabilità tale da garantire che ogni decisione basata su di esso possa essere presa con sicurezza (Guida Eurachem, 2014).

La ISO 9000 definisce la validazione come “*conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti, relativi a un utilizzo o ad un’applicazione specifici previsti, sono stati soddisfatti*”.

Durante un processo di validazione del metodo vengono valutate alcune caratteristiche di prestazione, tra cui:

- Selettività: “*misura in cui un metodo può essere usato per determinare particolari analiti in miscele o matrici senza interferenze da parte di altri componenti con comportamento simile*”.

- Accuratezza: che misura la concordanza della media dei dati con il valore vero.
- Limite di rivelabilità (LOD) e Limite di quantificazione (LOQ)
- Sensibilità analitica: *“cambiamento della risposta dello strumento in corrispondenza del cambiamento della grandezza misurata”*.
- Precisione: è una misura di quanto i risultati siano vicini tra loro.
  - Ripetibilità: è una misura della variabilità nei risultati quando la misurazione è condotta da un singolo analista utilizzando la stessa strumentazione, in un breve intervallo di tempo. Ci si aspetta che fornisca una variazione nei risultati molto piccola.
  - Riproducibilità: è una misura della variabilità nei risultati fra laboratori, per questo ci si aspettano variazioni più grandi nei risultati.
- Robustezza: è una *“misura delle sue capacità di non essere influenzata da piccole variazioni ai parametri del metodo. Fornisce un’indicazione dell’affidabilità del metodo durante il normale utilizzo”* (Guida Eurachem , 2014).

### ***3.5.1 Validazione metodo QuEChERs per determinare gli IPA nel filetto di *M. barbatus****

Per la validazione del metodo, in questa tesi, è stata valutata l'accuratezza, attraverso l'utilizzo di un campione certificato ed è stata calcolata la retta di taratura e i limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ).

La retta di taratura è stata costruita utilizzando quattro soluzioni con concentrazione nota, preparando differenti diluizioni dello standard degli analiti indagati (Figura 18).

Tutti gli standard avevano un volume finale di 400  $\mu$ L e come solvente è stata utilizzata una soluzione di diclorometano: metanolo in rapporto 1:1. Al solvente sono state aggiunte quantità note di soluzione standard 1:100 al fine di ottenere le quattro soluzioni con rapporto di concentrazione 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600.



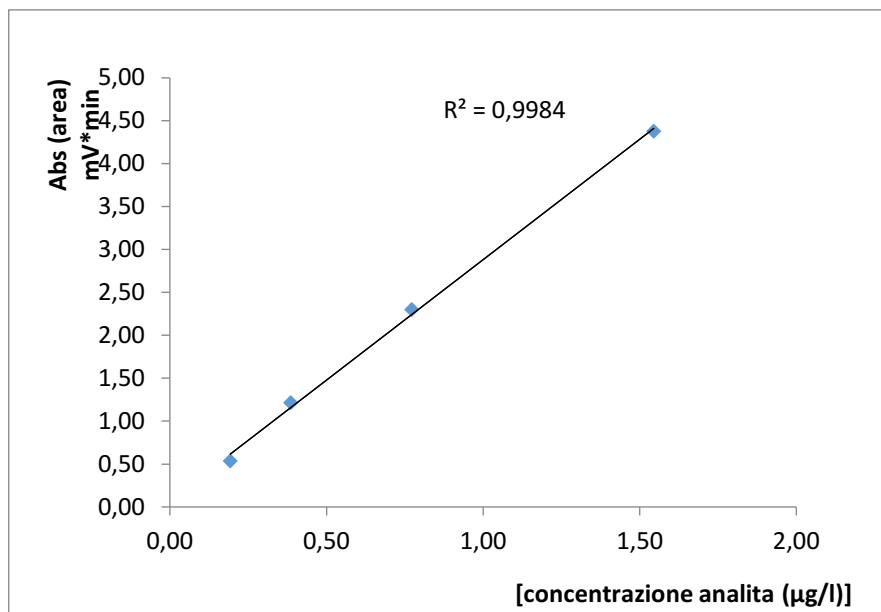


Figura 18. Esempio di retta di taratura

Il LOD e il LOQ sono un'importante caratteristica per la valutazione del metodo analitico.

Il Limite di Rivelabilità (*Limit of Detection*- LOD) è il valore minimo di concentrazione al di sotto del quale il campione non può essere rivelato, mentre il Limite di Quantificazione (*Limit of Quantification*- LOQ) è il livello più basso a cui la prestazione è accettabile per una certa tipologia di applicazione (Guida Eurachem, 2014).

Esistono vari modi per calcolare LOD e LOQ riportati in Tabella 4, in questa tesi si è utilizzato quello basato sulle curve di calibrazione,

descritto da ICH (Procedures Analytical, 1996), mediante l'utilizzo delle formule:

$$LOD = \frac{3.3Sa}{b}$$

$$LOQ = \frac{10Sa}{b}$$

Nelle quali  $Sa$  è la deviazione standard dell'intercetta della retta di regressione e  $b$  è la pendenza della curva di calibrazione.

Tabella 4. Tabella riportante tempo di ritenzione, pendenza della retta di taratura, R<sup>2</sup> (%), LOD e LOQ degli IPA analizzati nello studio

<b>Analita</b>	<b>Tempo di ritenzione (min)</b>	<b>Pendenza della retta di taratura</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	<b>LOD (µg/l)</b>	<b>LOQ (µg/l)</b>
<i>NaF</i>	9,81	0,7960	99,97	0,012	0,035
<i>AC</i>	12,81	2,0339	99,90	0,004	0,013
<i>PHE</i>	14,21	0,9197	99,82	0,010	0,030
<i>AN</i>	15,02	2,4499	99,85	0,004	0,011
<i>FA</i>	16,13	1,4075	99,84	0,007	0,020
<i>PY</i>	16,83	5,1072	99,85	0,002	0,005
<i>BaA</i>	19,05	4,0735	99,81	0,002	0,007
<i>BkFA</i>	21,85	5,9800	99,80	0,002	0,005
<i>BaP</i>	22,68	9,4010	99,78	0,001	0,003
<i>DBahA</i>	23,75	3,2658	99,94	0,003	0,009
<i>BghiP</i>	24,80	2,8071	99,84	0,003	0,010

### **3.6 Controlli bianco HPLC**

Prima di costruire la curva di taratura e dopo alcune serie di campioni abbiamo iniettato un bianco per valutare la pulizia della colonna ed evitare anomalie nell'analisi. Il bianco è costituito da solvente puro.

### **3.7 Controlli con standard**

Inizialmente, per costruire la retta di taratura, e periodicamente, per verificare il funzionamento del sistema sono state iniettate le quattro soluzioni standard.

### **3.8 Determinazione del contenuto lipidico nel filetto della specie *Mullus barbatus***

In questa tesi è stata svolta un'ulteriore analisi per valutare il quantitativo lipidico all'interno del filetto della specie *M. barbatus*.

Prima di procedere con la fase di estrazione si è provveduto alla preparazione del campione.

In primo luogo, il campione è stato omogeneizzato, congelato a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 1 ora e, infine, liofilizzato per 24 ore. A questo punto è stata svolta la procedura di estrazione utilizzando l'estrazione assistita con microonde "*Microwave-Assisted Extraction*" (MAE), la quale si basa sull'impiego del microonde per riscaldare la miscela campione/solvente per facilitare l'estrazione dell'analita.

Il solvente era costituito da una soluzione di etere di petrolio e acetone in rapporto 2:1 con concentrazioni di 10 mL di etere e 5mL di acetone, ottenendo un volume finale di 15 mL.

Nella provetta contenente il campione liofilizzato e la soluzione di etere e acetone è stata aggiunta una piccola quantità di  $\text{Na}_2\text{SO}_2$  (solfato di sodio) anidro che ha la funzione di eliminare l'acqua residua sia nel campione che nei contenitori, che potrebbe interferire con l'analisi.

A questo punto il campione è stato inserito in microonde con una temperatura di  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti.

Una volta estratto, il campione è stato filtrato mediante utilizzo di un filtro in fibra di vetro al di sopra del quale è stato spolverato  $\text{Na}_2\text{SO}_2$ .

Il filtro è stato, inoltre, bagnato con una soluzione di etere e acetone in rapporto 2:1 con concentrazioni di 50 mL di etere e 25 mL di acetone. Una volta filtrato, il campione è stato fatto evaporare in stufa a 80 °C per circa 1 ora. L'estratto ottenuto in seguito all'evaporazione è stato pesato per valutare il quantitativo lipidico con una bilancia microanalitica alla quinta cifra decimale (AT261 Mettler Toledo Greifensee, Switzerland).

### **3.9 *Analisi statistica***

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software R di Windows v. 3.5.1 e sono state utili per valutare gli effetti delle differenti variabili sulla concentrazione degli IPA.

Sui dati è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) e nel caso in cui  $p$  risultava significativo veniva applicato un confronto Turkey post-hoc.

La correlazione tra la concentrazione di IPA e il contenuto lipidico è stata valutata con il coefficiente di correlazione di Pearson.

## 4 RISULTATI

Nel seguente studio sono state analizzate le concentrazioni di 15 idrocarburi policiclici aromatici all'interno del filetto della specie *Mullus barbatus* campionato nell'anno 2018 nel Mar Adriatico Centro-Settentrionale.

L'analisi degli idrocarburi policiclici aromatici è stata effettuata tenendo conto di alcune variabili:

- il peso molecolare degli idrocarburi, suddivisi in basso peso molecolare (LMW PAHs) e alto peso molecolare (HMW PAHs);
- l'influenza della stagionalità, suddividendo i campioni in base a due stagioni: inverno ed estate;
- la distanza dalla costa, analizzando individui provenienti da due aree di pesca differenti, una a costa e una a largo.

Inoltre, essendo gli IPA dei composti altamente lipofili, in questa tesi è stata analizzato il contenuto dei lipidi totali presente nel filetto.

I campioni di *M. Barbatulus* sono stati suddivisi in base al sesso, alla distanza dalla costa e alla stagionalità così da permetterne la comparazione con le analisi svolte per gli IPA.

Tutte le concentrazioni riguardanti gli IPA sono riportate in ng/g di peso umido del campione, mentre la valutazione lipidica è riportata in % sempre considerando il peso fresco del campione.

In Tabella 5 è riportata la distribuzione dei campioni utilizzati nella presente tesi tenendo conto di alcune variabili (sesso, area di campionamento e stagionalità), il loro peso medio e la loro lunghezza media.



Tabella 5. Distribuzione dei campioni analizzati tenendo conto di alcune variabili (sesso, area di campionamento e stagionalità) e lunghezza media e peso medio dei medesimi campioni

		Femmine			Maschi		
		NUMERO	LUNGHEZZA	PESO	NUMERO	LUNGHEZZA	PESO
			(L <sub>T</sub> ) (mm)	(W <sub>T</sub> ) (g)		(L <sub>T</sub> ) (mm)	(W <sub>T</sub> ) (g)
<b>COSTA</b>	<b>INVERNO</b>	47	15,05 ± 1,95	38,26 ± 15,28	11	12,95 ± 1,54	23,58 ± 8,56
	<b>ESTATE</b>	62	14,81 ± 1,73	37,70 ± 12,57	11	11,63 ± 1,00	17,46 ± 5,83
<b>LARGO</b>	<b>INVERNO</b>	37	16,19 ± 1,80	46,17 ± 17,81	14	13,00 ± 1,45	22,07 ± 7,15
	<b>ESTATE</b>	53	15,88 ± 1,78	41,04 ± 15,99	24	12,56 ± 1,43	18,97 ± 6,30

#### 4.1 Concentrazione media degli idrocarburi policiclici aromatici, frequenza e rapporto percentuale

In Figura 19 è riportata la concentrazione media di ogni singolo congenere e la somma delle concentrazioni dei 15 IPA analizzati ( $\Sigma 15$  PAHs).

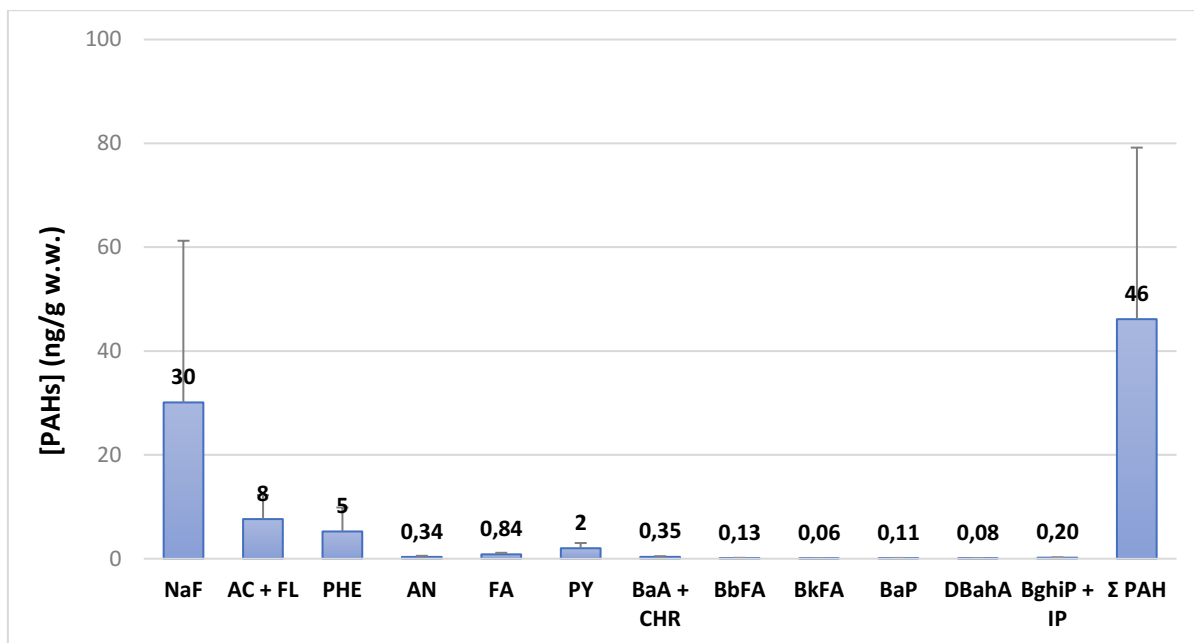


Figura 19. Concentrazione media dei singoli IPA e concentrazione media di  $\Sigma 15$  PAHs

La media delle concentrazioni di  $\Sigma 15$  PAHs è di  $46 \pm 33$  ng/g mentre entrando nello specifico dei singoli IPA, risulta evidente una dominanza

del naftalene con una concentrazione media di  $30 \pm 31$  ng/g seguito dall'acenaftene + fluorene con una concentrazione media di  $8 \pm 5$  ng/g e dal fenantrene con una concentrazione media di  $5 \pm 5$  ng/g.

Mentre gli idrocarburi con la concentrazione media più bassa sono il benzo(k)fluorantene con  $0,06 \pm 0,03$  ng/g e il dibenzo (a,h) antracene con  $0,08 \pm 0,00001$  ng/g (Figura 19).

In Tabella 6 è riportato il rapporto in percentuale di ogni singolo IPA sul totale. La percentuale è stata calcolata facendo il rapporto tra la concentrazione media del singolo IPA e la concentrazione media dei totali moltiplicata per 100.

Tabella 6. Rapporto in percentuale dei singoli IPA sul totale

<b>IPA</b>	<b>RAPPORTO (%)</b>
<i>NaF</i>	65,23 %
<i>AC + FL</i>	16,53 %
<i>PHE</i>	11,35 %
<i>AN</i>	0,73 %
<i>FA</i>	1,82 %
<i>PY</i>	4,35 %
<i>BaA + CHR</i>	0,75 %
<i>BbFA</i>	0,28 %
<i>BkFA</i>	0,13 %
<i>BaP</i>	0,23 %
<i>DBahA</i>	0,17 %
<i>BghiP + IP</i>	0,43 %

Come è ben visibile dalla Tabella 6, il naftalene ha una percentuale più alta sul totale (65,23%), seguito da acenaftene + fluorene con il 16,53% e dal fenantrene con 11,35%.

Seguono pirene (4,35%) e fluorantrene (1,82%) mentre i restanti idrocarburi, in particolare, quelli ad alto peso molecolare, sono al di sotto dell'1% (il benzo(k)fluorantrene con lo 0,13% e il dibenzo(a,h)antracene con lo 0,17%).

In Tabella 7 è riportata la frequenza di ciascun IPA sul totale dei campioni. La frequenza viene calcolata dividendo il numero di volte che l'IPA è presente in un campione, per il numero totale dei campioni e moltiplicando il tutto per 100.

Tabella 7.Frequenza percentuale dei singoli IPA sul totale dei campioni

<b>IPA</b>	<b>FREQUENZA (%)</b>
<i>NaF</i>	100,00%
<i>AC + FL</i>	100,00%
<i>PHE</i>	99,23%
<i>AN</i>	52,30%
<i>FA</i>	96,15%
<i>PY</i>	100%
<i>BaA + CHR</i>	33,43%
<i>BbFA</i>	97,69%
<i>BkFA</i>	45%
<i>BaP</i>	46,92%
<i>DBahA</i>	0,38%
<i>BghiP + IP</i>	3,8%

Analizzando quanto riportato in Tabella 7 alcuni idrocarburi hanno frequenza del 100%: naftalene, acenaftene + fluorene e pirene, seguiti

dal fenantrene con 99,23%, dal benzo(b)fluorantrene con 97,69% e fluorantrene con 96,15%.

Mentre, il dibenzo(a,h)antracene presenta la frequenza più bassa (0,38%).

#### ***4.2 Distribuzione delle concentrazioni in funzione del peso molecolare***

In Figura 20 è riportata la distribuzione delle concentrazioni di IPA riscontrate in tutti i pesci analizzati suddivisa sulla base del peso molecolare degli IPA, dunque, sommando le concentrazioni appartenenti ai LMW-PAHs (naftalene, acenaftene + fluorene, fenantrene, antracene) e quelle appartenenti ai HMW PAHs (fluorantene, pirene, benzo(a)antracene + crisene, benzo(b)fluorantene, benzo(a)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene + indeno pirene).

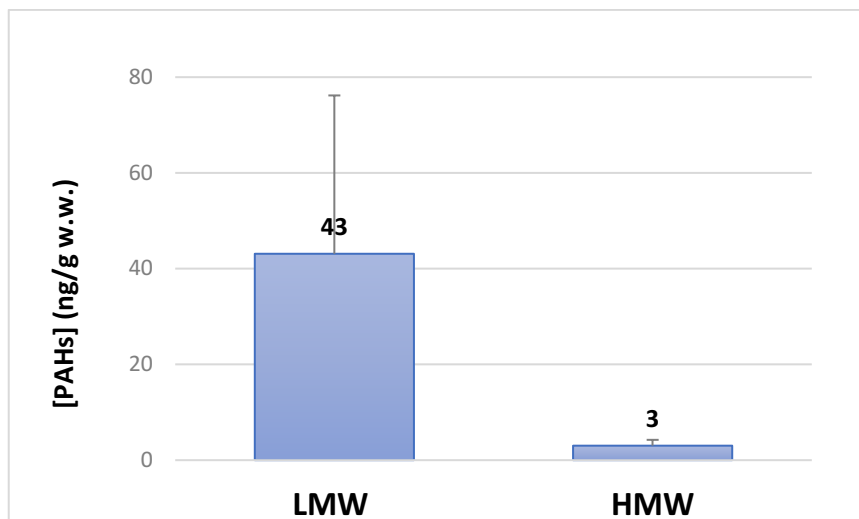


Figura 20. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs e HMW PAHs nei campioni di *M. barbatus* esaminati

La concentrazione media degli IPA a basso peso molecolare, pari a  $43 \pm 33$  ng/g è maggiore di quella riscontrata per idrocarburi ad alto peso molecolare ( $3 \pm 1$  ng/g) (Figura 20).

Questa differenza è statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



### 4.3 Distribuzione delle concentrazioni in funzione dell'area di campionamento (costa-largo)

In Figura 21 è riportata la distribuzione delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs in tutti i campioni analizzati tenendo conto dell'area di campionamento e quindi, della distanza dalla costa.

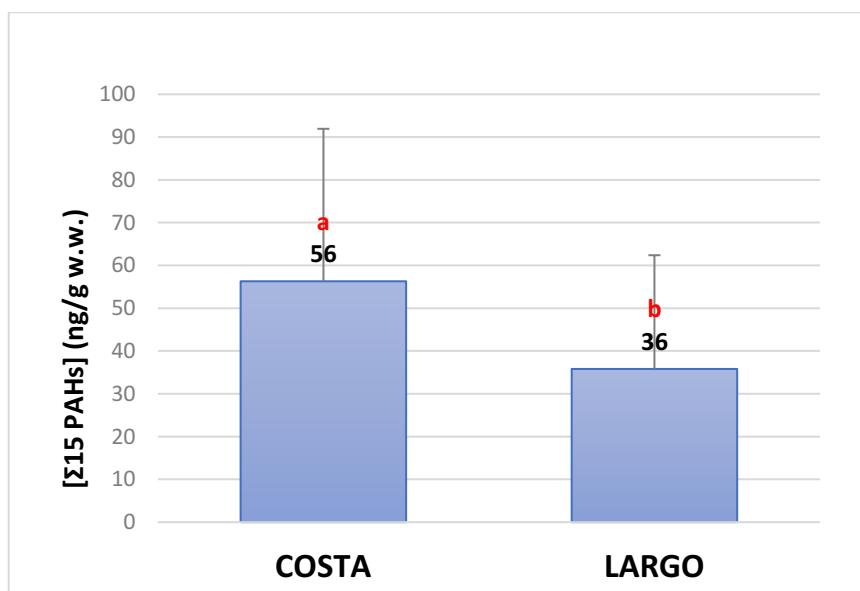


Figura 21. Distribuzione delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs nei campioni di costa e di largo

La concentrazione media di  $\Sigma 15$  PAHs in campioni costieri è di  $56 \pm 36$  ng/g, ed è maggiore rispetto a quanto ottenuto in campioni di mare aperto che presentano una concentrazione pari a  $36 \pm 27$  ng/g (Figura 21).

Questa differenza, dai risultati dell'analisi statistica, risulta significativa ( $p < 0,05$ ).

La distribuzione rispetto alla distanza della costa è stata applicata anche sulle concentrazioni medie di LMW PAHs e HMW PAHs (Figure 22 e 23).

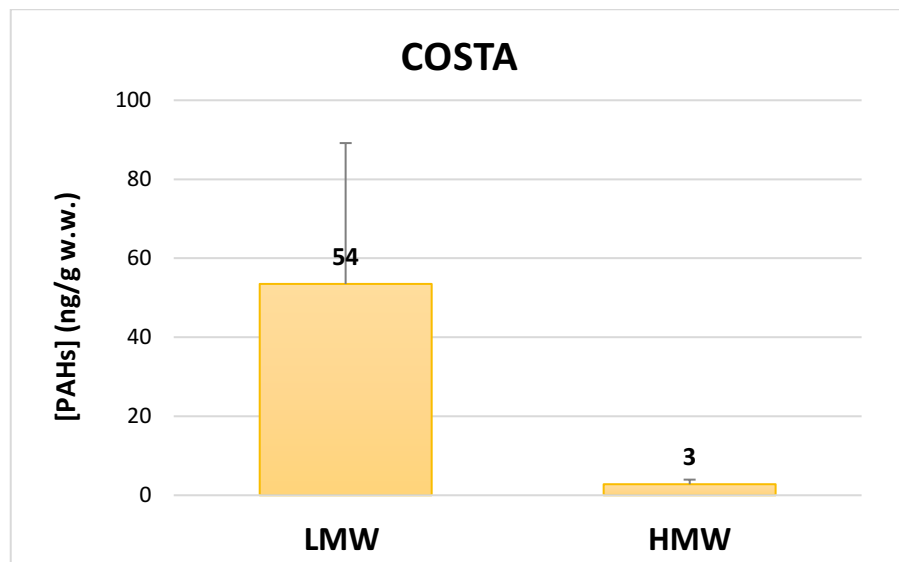


Figura 22. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs e HMW PAHs, nei campioni di *M.barbatus* pescati nella zona costiera

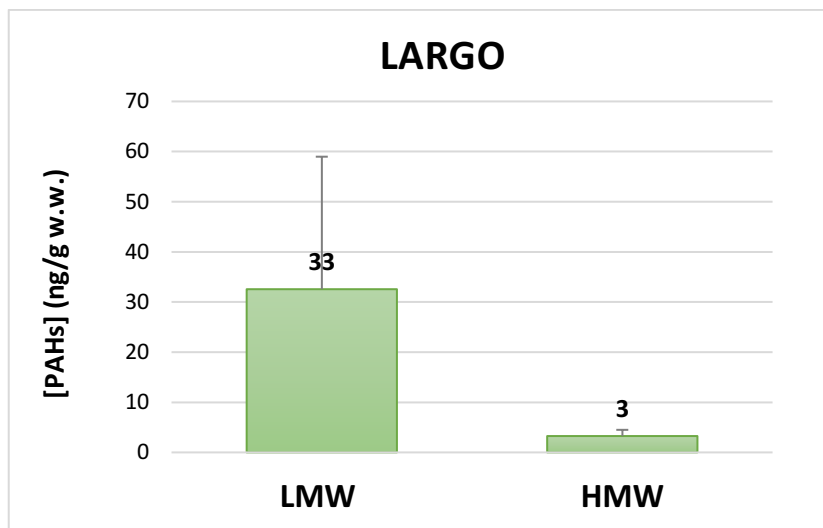


Figura 23. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs e HMW PAHs, nei campioni di *M.barbatus* pescati nella zona a largo

Considerando campioni costieri è stato possibile osservare che la concentrazione media di LMW PAHs è pari a  $54 \pm 36$  ng/g mentre la concentrazione media di HMW PAHs è di  $3 \pm 1$  ng/g (Figura 22).

Per i campioni a largo la concentrazione media di LMW PAHs è pari a  $33 \pm 26$  ng/g mentre la concentrazione media riscontrata per gli HMW PAHs è di  $3 \pm 1$  ng/g (Figura 23).

Confrontando i risultati ottenuti è possibile affermare che gli LMW PAHs presentano una concentrazione maggiore in esemplari pescati a costa rispetto che in quelli a largo ( $p < 0,05$ ) mentre HWM PAHs

hanno la stessa concentrazione sia nei campioni pescati a largo che sotto costa.

#### 4.4 Distribuzione delle concentrazioni in funzione della stagionalità

In Figura 24 e 25 sono riportate le distribuzioni delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs in funzione della stagione, suddividendo il campionamento in campioni pescati in inverno e campioni pescati in estate, sia a costa (Figura 24) sia a largo (Figura 25).

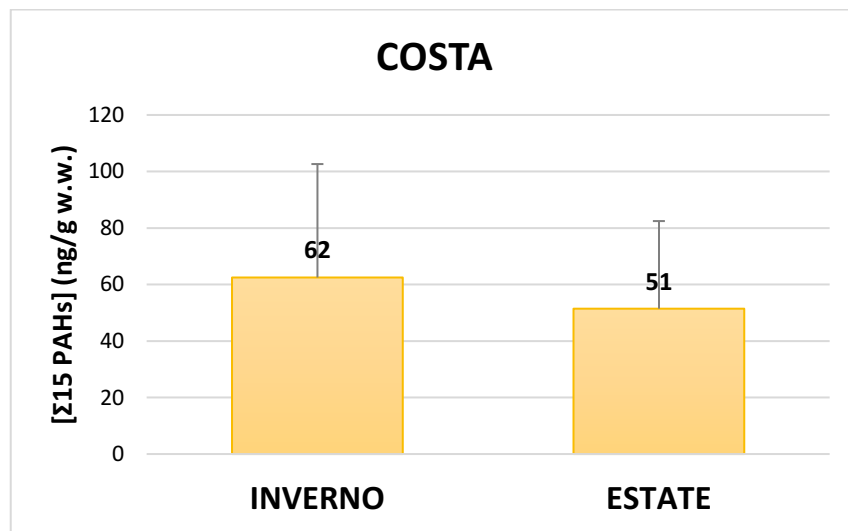


Figura 24. Distribuzione delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs a costa in funzione della stagione

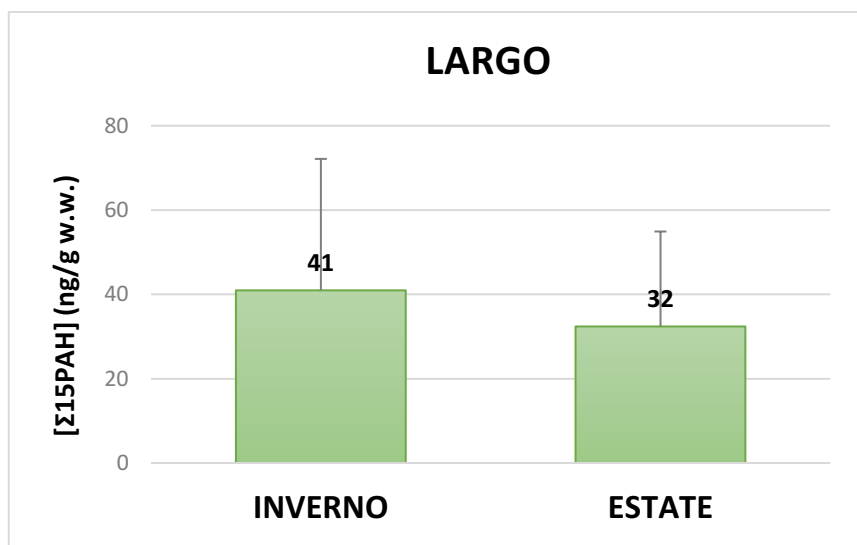


Figura 25. Distribuzione delle concentrazioni medie di Σ15 PAHs a largo in funzione della stagione

Nei campioni prelevati vicino alla costa, in inverno, troviamo una concentrazione media di Σ15 PAHs pari a  $62 \pm 40$  ng/g mentre, in estate,  $51 \pm 31$  ng/g (Figura 24).

A largo, in inverno, è stata riscontrata una concentrazione media di Σ15 PAHs pari a  $41 \pm 31$  ng/g mentre, in estate,  $32 \pm 23$  ng/g (Figura 25).

Sia nell'area costiera che nell'area a largo la concentrazione media degli IPA presenta una tendenza ad aumentare in inverno piuttosto che in estate, tuttavia, dall'analisi statistica, tale differenza non risulta significativa.

È stato analizzato anche l'effetto della stagionalità sulle concentrazioni medie di LMW PAHs e HMW PAHs (Figura 26, 27, 28 e 29).

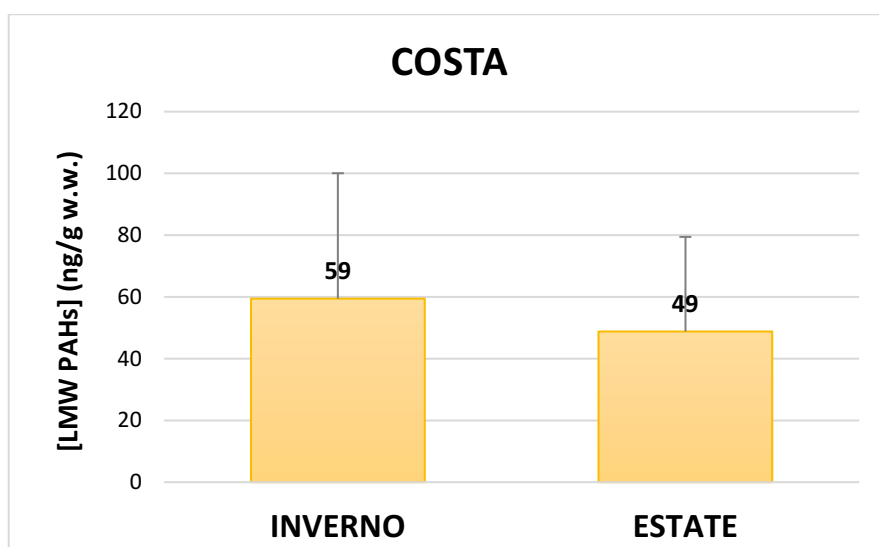


Figura 26. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs a costa in funzione della stagionalità

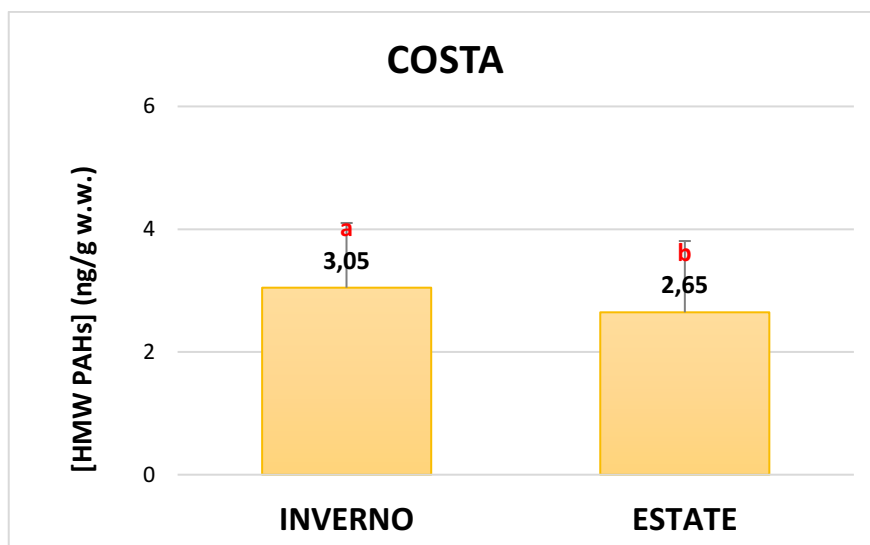


Figura 27. Distribuzione delle concentrazioni medie di HMW PAHs a costa in funzione della stagionalità

In campioni costieri la concentrazione media di LMW PAHs tende ad essere più alta in inverno ( $59 \pm 41$  ng/g) piuttosto che in estate ( $49 \pm 31$  ng/g), tuttavia non è stata vista una differenza statisticamente significativa (Figura 26).

Per quanto riguarda la concentrazione media dei HMW PAHs nei campioni di pesce prelevati sotto costa, in inverno la concentrazione è maggiore ( $3,05 \pm 1,05$  ng/g) mentre in estate è di  $2,65 \pm 1,16$  ng/g, tale differenza risulta statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 27).

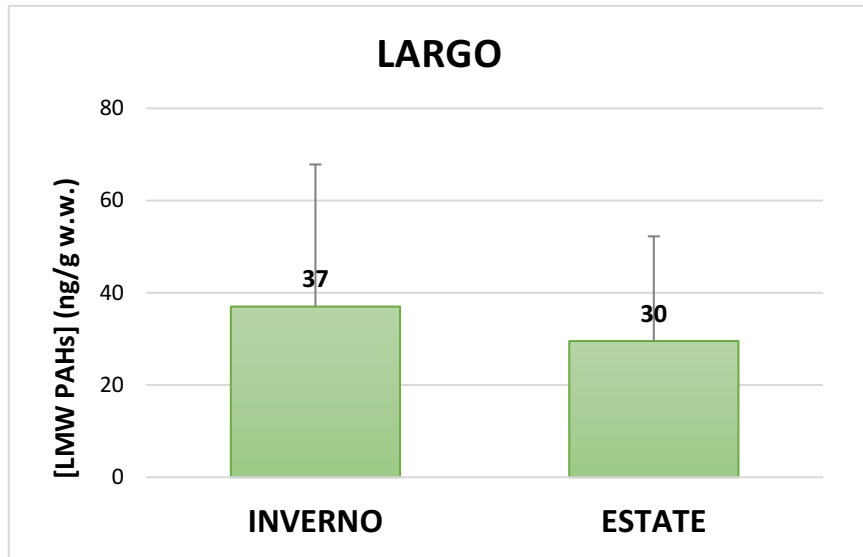


Figura 28. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs a largo in funzione della stagionalità

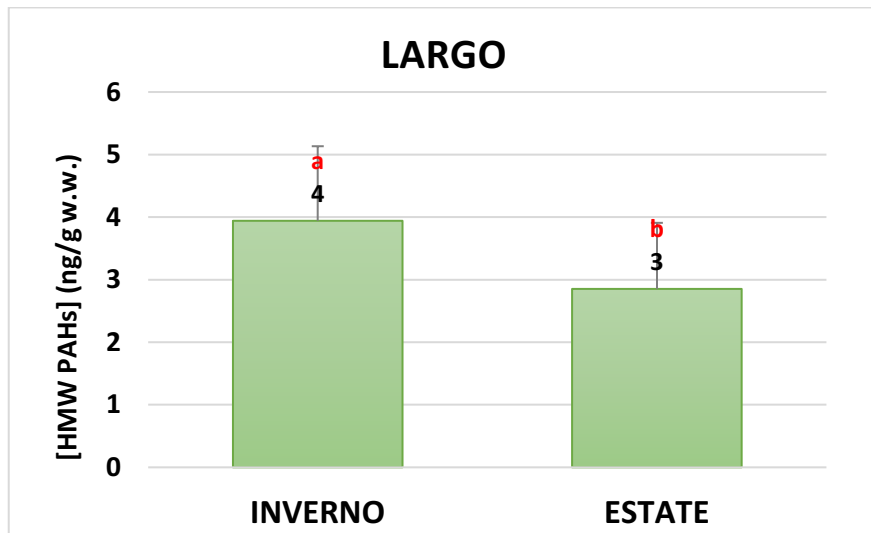


Figura 29. Distribuzione delle concentrazioni medie di HMW PAHs a largo in funzione della stagionalità



I campioni di *M.barbatus* catturati nell'area lontano dalla costa, hanno registrato una concentrazione media di LMW PAHs, in inverno, è di  $37 \pm 31$  ng/g mentre, in estate, è di  $30 \pm 23$  ng/g (Figura 28).

Anche in questo caso, come per i campioni costieri, la concentrazione tende ad aumentare in inverno piuttosto che in estate ma tale differenza non è statisticamente significativa.

La concentrazione di HMW PAHs nei campioni pescati a largo in inverno è di  $4 \pm 1$  ng/g mentre in estate è pari a  $3 \pm 1$  ng/g, pertanto, si riconferma il risultato che nei mesi invernali tali concentrazioni sono maggiori rispetto ai mesi estivi ( $p < 0.05$ ) (Figura 29).

#### ***4.5 Distribuzione della concentrazione in base al sesso***

In Figura 30 e 31 è riportata la distribuzione delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs raggruppando gli esemplari in maschi e femmine prelevati nelle due aree di studio (costa e largo) ed in entrambe le stagioni indagate.

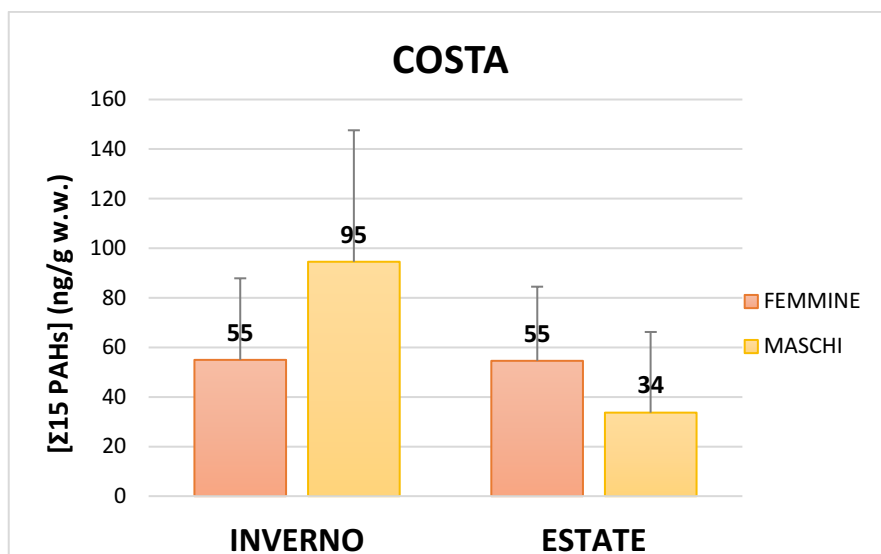


Figura 30. Distribuzione delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs a costa sia in inverno che in estate in funzione del sesso

La concentrazione media di  $\Sigma 15$  PAHs a costa in inverno per esemplari di sesso femminile è di  $55 \pm 33$  ng/g mentre per esemplari maschili è di  $95 \pm 53$  ng/g (Figura 30).

In estate, a costa, la concentrazione media di  $\Sigma 15$  PAHs in esemplari di sesso femminile è pari a  $55 \pm 30$  ng/g mentre in esemplari di sesso maschile è  $34 \pm 33$  ng/g (Figura 30).

Dalle analisi statistiche le differenze tra maschi e femmine non risultano statisticamente significative.

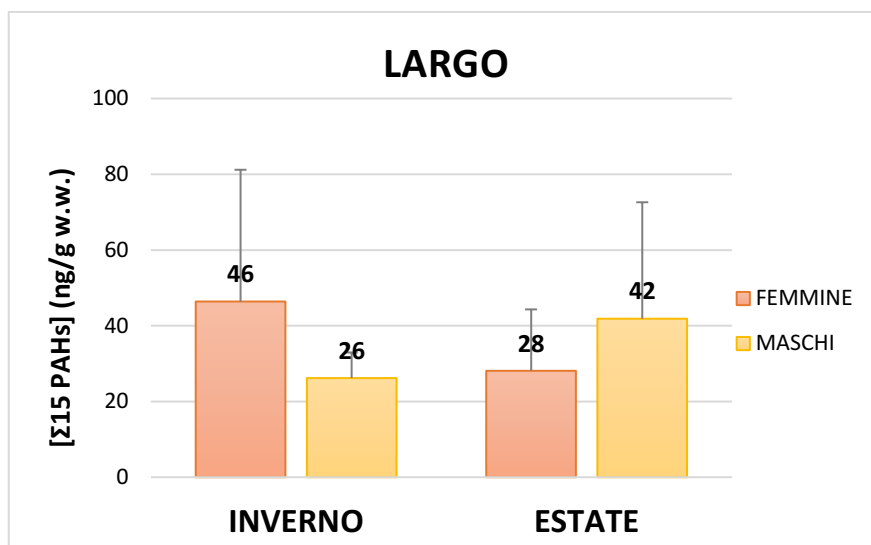


Figura 31. Distribuzione delle concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs a costa sia in estate che in inverno in funzione del sesso

La concentrazione media di  $\Sigma 15$  PAHs a largo in inverno in esemplari femmine è di  $46 \pm 35$  ng/g mentre in esemplari maschi è pari a  $26 \pm 7$  ng/g (Figura 31).

In estate, invece, la concentrazione di  $\Sigma 15$  PAH a largo per esemplari femmine è di  $28 \pm 16$  ng/g mentre per esemplari maschi è pari a  $42 \pm 31$  ng/g (Figura 31).

Dalle analisi statistiche si evince che queste differenze in base al sesso non sono significative.

Anche in questo caso la distribuzione in funzione del sesso è stata analizzata sulle concentrazioni medie di LMW-PAHs e HMW-PAHs (Figura 32,33,34 e 35).

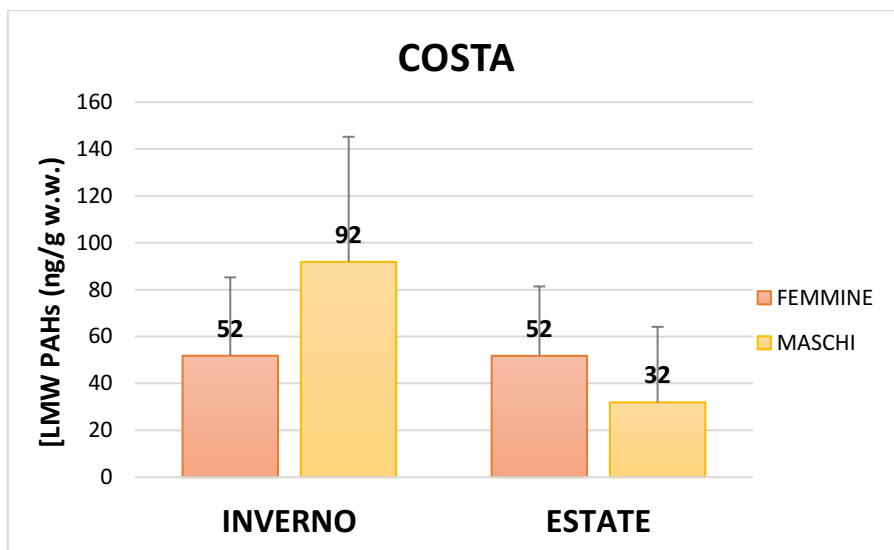


Figura 32. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs a costa sia in inverno che in estate in funzione del sesso

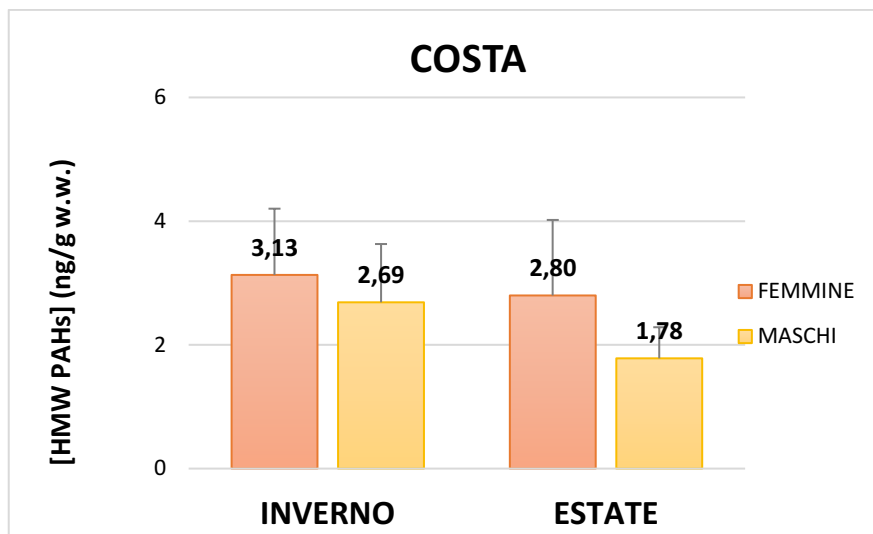


Figura 33. Distribuzione delle concentrazioni medie di HMW PAHs a costa sia in inverno che in estate in funzione del sesso

La concentrazione media di LMW PAHs a costa in inverno in esemplari femmine è  $52 \pm 33$  ng/g mentre in esemplari maschi è pari a  $92 \pm 53$  ng/g (Figura 32).

In estate, invece, la concentrazione media di LMW PAHs a costa per esemplari femmine è di  $52 \pm 30$  mentre per esemplari maschi è di  $32 \pm 32$  ng/g (Figura 32).

Le differenze tra maschi e femmine non sono statisticamente significative.

Per gli HMW PAHs la concentrazione media a costa in inverno in esemplari femmine è di  $3,13 \pm 1,07$  ng/g mentre in esemplari maschi è pari a  $2,69 \pm 0,94$  ng/g (Figura 33).

In estate, a costa, la concentrazione media di HMW PAHs per esemplari femmine è di  $2,80 \pm 1,22$  ng/g mentre per esemplari maschi è pari a  $1,78 \pm 0,50$  ng/g (Figura 33).

In questo caso, le differenze tra maschi e femmine risultano, dalle analisi statistiche, significative ( $p < 0,05$ ).

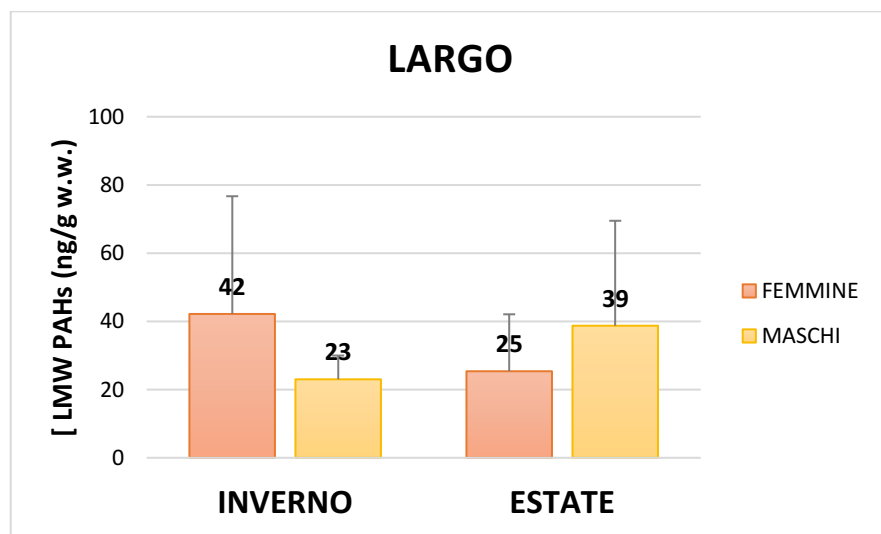


Figura 34. Distribuzione delle concentrazioni medie di LMW PAHs a largo sia in inverno che in estate in funzione del sesso

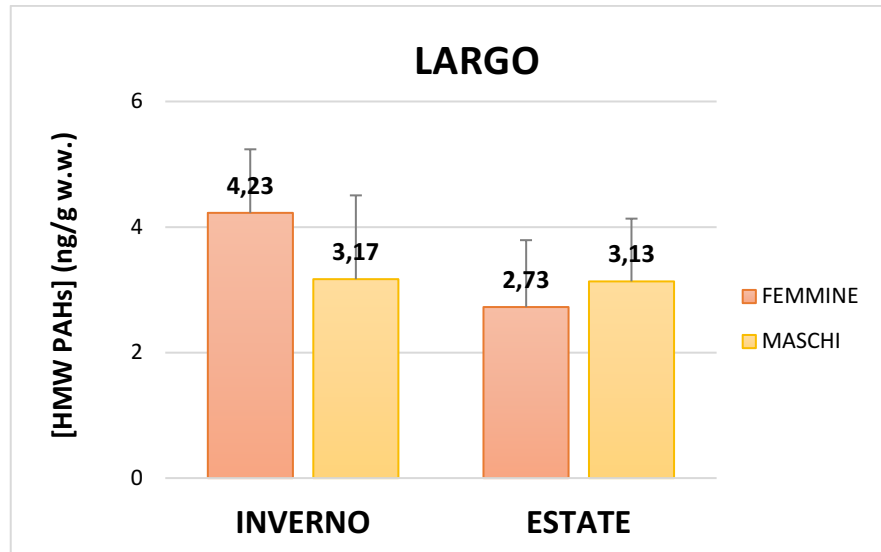


Figura 35. Distribuzione delle concentrazioni medie di HMW PAHs a largo sia in inverno che in estate in funzione del sesso

La concentrazione media di LMW PAHs a largo in inverno in esemplari femmine è di  $42 \pm 35$  ng/g mentre in esemplari maschi è pari a  $23 \pm 7$  ng/g (Figura 34).

A largo, in estate, la concentrazione media di LMW PAHs in esemplari femmine è di  $25 \pm 17$  ng/g mentre in esemplari maschi è di  $39 \pm 31$  ng/g (Figura 34).

Le differenze tra maschi e femmine non risultano essere statisticamente significative.

La concentrazione media di HMW PAHs a largo in inverno per esemplari femmine è pari a  $4,23 \pm 1,01$  ng/g mentre per esemplari maschi è di  $3,17 \pm 1,33$  ng/g (Figura 35).

In estate, a largo, la concentrazione media di HMW PAHs in esemplari femmine è  $2,73 \pm 1,07$  ng/g mentre in esemplari maschi è di  $3,13 \pm 1,00$  ng/g (Figura 35).

Anche per la concentrazione media di HMW PAHs le differenze tra maschi e femmine non risultano essere statisticamente significative.

#### ***4.6 Determinazione della percentuale lipidica nel filetto di *Mullus barbatus****

In Tabella 8 è riportata la percentuale del contenuto lipidico dei campioni analizzati, questa è stata valutata prendendo in considerazione le stesse variabili analizzate per gli IPA (sesso, area di campionamento e stagionalità), per consentire una valutazione della loro correlazione.



Tabella 8. Percentuale del contenuto lipidico del filetto di *M. barbatus*, analizzato raggruppando i campioni a seconda del sesso, dell'area di campionamento e della stagionalità

	Costa		Largo	
	Inverno	Estate	Inverno	Estate
<b>Femmine</b>	7,85%	2,59%	5,11%	0,53%
<b>Maschi</b>	6,49%	1,82%	2,97%	0,44%

La percentuale lipidica, sia in inverno che in estate, è più elevata nelle femmine sia a costa che a largo e, in entrambi i sessi, è più alta a costa rispetto a largo.

Confrontando la percentuale lipidica ottenuta per le due stagioni è evidente un aumento di essa in inverno rispetto all'estate, sia per esemplari maschi che femmine e sia a costa che a largo.

Dunque, è stata valutata una possibile correlazione tra le concentrazioni di IPA e la percentuale lipidica contenuto nel filetto del pesce.

Dai risultati si evince che in esemplari maschi a costa la correlazione tra IPA e lipidi è sempre positiva e statisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

mentre in esemplari femmina non è stata trovata nessuna correlazione significativa tra IPA e lipidi.

Per quanto riguarda gli esemplari di largo: negli individui maschi non è stata trovata nessuna correlazione statisticamente significativa tra IPA e lipidi, al contrario nelle femmine di mare aperto è stata trovata una correlazione sempre positiva e significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSIONE

### 5.1 *Concentrazione media degli idrocarburi policiclici aromatici, frequenza e rapporto percentuale*

La concentrazione dei 15 IPA riscontrata nel filetto della specie *M. barbatus* è compresa tra 9 ng/g e 175 ng/g w.w. in accordo con altri studi condotti in precedenza sia nel Mar Adriatico che in altre zone del Mar Mediterraneo su varie specie ittiche demersali e non (Baumard et al. 1998)(Perugini et al. 2007)(Della Torre et al. 2010)(Conti et al. 2012)(E. Frapiccini et al. 2020).

Le concentrazioni di IPA nel muscolo dei pesci possono essere raggruppate in quattro categorie sulla base di quanto deciso dal National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (Tabella 9) (Ranjbar Jafarabadi et al. 2019).

Applicando i criteri di classificazione NOAA sui campioni presi in analisi nella presente tesi questi possono essere considerati per lo più minimamente contaminati (concentrazione media pari a  $46 \pm 33$  ng/g).

Tabella 9. Criterio di classificazione NOAA per la contaminazione da PAH nel filetto di pesce, adattata da Varanasi et al., 1993 (Ranjbar Jafarabandi et al., 2018)

<b>CLASSE</b>	<b>Concentrazione IPA (ng/ g)</b>
<b>Non contaminata</b>	< 10
<b>Minimamente contaminata</b>	10 – 99
<b>Moderatamente contaminata</b>	100 – 1000
<b>Altamente contaminata</b>	> 1000

L'idrocarburo che presenta la concentrazione media più alta, rappresentando più del 50% degli idrocarburi presenti, è il Naftalene.

Il Naftalene (NaF) è considerato un possibile cancerogeno per l'uomo, inserito nel gruppo 2B dall' International Agency for Research on Cancer- IARC) poiché presenta inadeguate evidenze di cancerogenicità nell'uomo ma sufficienti evidenze di cancerogenicità negli esperimenti sugli animali (IARC Summary & Evaluation, 2002).

Nei campioni di filetto indagati, il benzo(a)pirene e la somma di quattro IPA<sup>4</sup> (BaP, BaA, CHR e BbF), considerati indicatori di presenza di IPA

cancerogeni e genotossici nel cibo, in base a quanto deciso nel Regolamento UE N. 835/2011, sono sempre risultati al di sotto dei tenori massimi stabiliti.

## ***5.2 Distribuzione delle concentrazioni in funzione del peso molecolare***

Diversi studi scientifici hanno riscontrato concentrazioni di LMW PAHs maggiori rispetto agli HMW PAHs nel filetto della specie *M.barbatus* (Perugini et al. 2007)(Della Torre et al. 2010)(Conti et al. 2012)(E. Frapiccini et al. 2020) e anche in questo studio di tesi gli LMW PAHs sono maggiormente rappresentati.

Questo risultato può essere sostenuto dal fatto che HMW PAHs sono meno solubili e vengono quindi assorbiti nel particolato, accumulandosi nei sedimenti mentre, LMW PAHs, caratterizzati da una più alta solubilità in acqua, vengono assorbiti dall'organismo attraverso le acque interstiziali (Perugini et al. 2007)(E. Frapiccini et al. 2020).

La predominanza di LMW PAHs può essere spiegata anche dal fatto che, all'interno dell'organismo, gli IPA vanno incontro a reazioni di trasformazione metabolica attraverso il sistema enzimatico Cyt P-450 e

gli HMW PAHs sono più propensi ad essere biotrasformati (E. Frapiccini et al. 2020).

### ***5.3 Distribuzione delle concentrazioni in funzione dell'area di campionamento (costa-largo)***

La differente distribuzione di IPA tenendo conto delle due differenti aree di campionamento e, dunque distanza dalla costa, evidenzia una maggiore concentrazione di IPA in zone costiere piuttosto che a largo.

Questi risultati possono essere spiegati dalle caratteristiche dell'area di studio. Il Mar Adriatico, infatti, è un bacino di diluizione in cui sfociano alcuni fiumi tra cui il Po.

La parte medio-bassa di questo fiume attraversa circa 350 km di Pianura Padana, importante regione agricola e industriale e caratterizzata da un'alta densità di popolazione, situa nel Nord Italia (Marini and Frapiccini 2013).

Il deflusso fluviale porta con sé una grande quantità di detriti, un aumento di corrente e una riduzione significativa della salinità concentrate maggiormente lungo la costa occidentale del Mar Adriatico.

Gli IPA, date le loro proprietà chimico-fisiche vengono assorbiti nelle particelle organiche e nei sedimenti argillosi di origine fluviale e vengono trasportati nel bacino Adriatico mediante le correnti.

Questo potrebbe spiegare le concentrazioni medie maggiori di IPA a costa piuttosto che a largo.

Considerando l'influenza della distanza dalla costa sulle concentrazioni medie di LMW PAHs e HMW PAHs si osserva una concentrazione di LMW PAHs maggiore a costa piuttosto che a largo mentre nessuna influenza sugli HMW PAHs. La persistenza di IPA in un determinato ambiente e la loro biodisponibilità può essere influenzata da molti fattori come le caratteristiche chimico-fisiche dell'IPA stesso e le caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente (temperatura, salinità, granulometria dei sedimenti) (Marini and Frapiccini 2013).

Una possibile spiegazione può essere fornita dall'analisi della fonte di derivazione degli IPA. La difficoltà nell'identificare l'origine dei composti sta nel fatto che possono coesistere molte fonti di IPA e quest'ultimi possono, una volta prodotti, subire varie trasformazioni prima di depositarsi nei sedimenti o essere assorbiti dagli organismi marini (Soclo, Garrigues, and Ewald 2000).

Per distinguere tra IPA di origine petrogenica e pirolitica vengono utilizzati come indicatori dei rapporti diagnostici (Tabella 10) suddivisi in due categorie: la prima in cui i IPA pirogenici (HMW-PAHs) vengono messi a confronto o con gli IPA totali o con i LMW PAHs e la seconda in cui vengono correlati IPA termodinamicamente più stabili con IPA termodinamicamente meno stabili (Arienzo et al. 2017).

Tabella 10. Indicatori della fonte di IPA e rispettivi rapporti diagnostici (Arienzo et al. 2017)

<b>Rapporti</b>	<b>Petrogenica</b>	<b>Pirogenica</b>
<b>PHE/ ANT</b>	>15	<10
<b>FLT/PYR</b>	>1	≤ 1
<b>CHR/ BaA</b>	>1	<1
<b>LMW/HMW</b>	>1	<1
<b>ΣCOMB/ΣPAHs</b>	<1	-1
<b>ANT/ (ANT + PHE)</b>	<0,10	>0,10
<b>FLR / (FLR + PYR)</b>	<0,50	>0,50
<b>FLT/ (FLT + PYR)</b>	<0,40	>0,40
<b>BaA/ BaA + CHR</b>	< 0,20	>0,35
<b>Rinf456 / TPAS</b>	< 0,40	>0,50



L'indice utilizzato per stimare la fonte di derivazione degli idrocarburi in questo lavoro è il rapporto tra LMW PAHs e HMW PAHs (PHE + AN + PY + FA/BaA + CHR + BbFA + BkFA + BaP + DBahA + IP + BghiP) che risulta essere >1 quindi la fonte degli idrocarburi è petrogenica.

IPA di origine petrogenica sono, in genere, costituiti da LMW PAHs e sono concentrati nelle aree costiere, urbane e limitrofe ai fiumi dove il traffico nautico e l'influenza antropica sono più elevati.

#### ***5.4 Distribuzione delle concentrazioni in funzione della stagionalità***

Gli esemplari utilizzati nella presente tesi sono stati pescati nell'anno 2018 e per valutarne la distribuzione in funzione della stagionalità, il campionamento annuale è stato suddiviso in esemplari pescati in inverno e in estate. L'andamento stagionale delle concentrazioni medie è stato valutato sia a costa che a largo.

È stato, dunque, riscontrato che, sia a costa che a largo, le concentrazioni medie erano più elevate nella stagione invernale. Questo trend è stato confermato sia valutando la concentrazione di  $\Sigma 15\text{PAH}$  sia quella di LMW- PAHs e HMW PAHs anche se, dalle analisi statistiche, l'unica

comparazione significativa risulta essere quella riguardante gli HMW PAHs.

Questo risultato può essere attribuito a vari fattori, quali mareggiate e cambiamenti in temperatura dell'ambiente.

Eventi di mareggiata, associati a risospensioni di sedimenti, possono essere la causa dell'aumento di idrocarburi nella stagione invernale, dove questi eventi sono maggiormente concentrati. In studi precedenti (Dong et al. 2016) è stato analizzato l'effetto di eventi di risospensione sulla concentrazione degli IPA ed è risultato che la loro concentrazione nell'acqua sovrastante era molto superiore a quella misurata in precedenza all'evento. Questa evidenza non si limitava solo al periodo di sospensione ma veniva osservata anche nel periodo successivo ad esso.

Questi risultati indicano che il potenziale rischio di contaminazione da IPA durante un evento di risospensione potrebbe essere più alto per gli organismi demersali, come *M. barbatus*.

Un'ulteriore spiegazione può essere fornita dalla variazione di temperatura, infatti, questa influenza la biodegradazione degli IPA. All'aumentare della temperatura aumenta anche la biodegradazione del

composto e quindi, nei mesi invernali in cui la temperatura tende a diminuire, potrebbe verificarsi un aumento in biodisponibilità degli IPA poiché meno degradati (K. H. Kim et al. 2013)(Marini and Frapiccini 2013).

La bassa temperatura può influire sulla biodegradazione degli IPA con un effetto sull'attività biologica (degradazione microbica) (K. H. Kim et al. 2013).

### **5.5 *Determinazione della percentuale lipidica nel filetto di *Mullus barbatus****

Una spiegazione nella distribuzione degli IPA può essere fornita anche dalla concentrazione lipidica, poiché essendo sostanze lipofile tendono ad accumularsi nei lipidi.

Per questo motivo, nella presente tesi è stata analizzata anche la percentuale lipidica nel filetto della specie *M. barbatus* prendendo in considerazione alcune variabili: il sesso, la stagionalità e l'area di campionamento (costa-largo).

Considerando il sesso degli esemplari, la percentuale lipidica è sempre maggiore nelle femmine rispetto ai maschi e questo risultato potrebbe

essere spiegato da una taglia maggiore degli esemplari di sesso femminile. Mentre se consideriamo la distanza dalla costa avremo che la percentuale lipidica di esemplari costieri è sempre maggiore rispetto a quella presente in esemplari a largo, probabilmente dovuto a una maggiore presenza di nutrienti nelle zone costiere.

In ultimo, se si prende in considerazione la stagionalità troviamo una percentuale lipidica maggiore nella stagione invernale piuttosto che in estate. Ciò può essere legato al ciclo riproduttivo di *M. barbatus*, infatti, è stato visto in precedenti studi (León et al. 2014) che la concentrazione lipidica nel muscolo aumenta nei periodi precedenti alla deposizione (stagione invernale) mentre diminuisce durante la deposizione delle uova (stagione estiva).

Tuttavia, anche se la percentuale lipidica nel filetto rispetto alla gonade nel periodo riproduttivo risulta minore, la triglia di fango non sperimenta l'esaurimento dei lipidi muscolari, quindi una differenza nelle riserve lipidiche può essere anche legata ad una diversa abbondanza di prede (León et al. 2014).

Data la percentuale lipidica nel filetto e le concentrazioni di idrocarburi nello stesso, si è provato a cercare una correlazione tra i due risultati ma

ciò non ha fornito un modello coerente se si confrontano i valori maschili e femminili tenendo conto della stagionalità.

Anche nello studio sopracitato, svolto da W.M. Leon nel 2014, si è cercata una correlazione tra contenuto lipidico nel filetto di *M. barbatus* e concentrazione di IPA ma ciò non ha fornito nessun risultato significativo.

Una risposta non univoca nelle analisi svolte su lipidi e concentrazione di IPA può essere riconducibile al fatto che, pur essendo molecole lipofile, il bioaccumulo di IPA all'interno di un organismo non può essere spiegato da una singola variabile ma che le concentrazioni possono essere influenzate da molteplici fattori (es: cambiamenti nella dieta, cambiamenti nelle caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente, differenze biometriche negli esemplari) e sarebbe necessarie ulteriori analisi per avere un quadro esaustivo della situazione.

## 6 CONCLUSIONI

In conclusione, in questo lavoro di tesi è stata effettuata una valutazione del bioaccumulo di IPA all'interno del filetto della specie *M. barbatus* considerando alcune variabili biometriche e ambientali: peso molecolare, area di campionamento, stagionalità, sesso e contenuto lipidico.

Per quanto concerne la valutazione della concentrazione di IPA nel muscolo di *M. barbatus* prendendo in considerazione il peso molecolare dei composti è stato confermato quanto già descritto in letteratura, cioè una prevalenza di LMW PAHs.

Questo risultato può essere spiegato da trasformazioni metaboliche all'interno del pesce e dalla maggiore biodisponibilità di questi composti nell'ambiente.

L'influenza dell'area di campionamento sulla concentrazione di IPA nel filetto è particolarmente evidente se si considera la concentrazione media di  $\Sigma 15$  PAHs e di LMW PAHs mentre ciò non è riscontrabile sulle concentrazioni medie degli HMW PAHs. La concentrazione media di LMW PAHs nel filetto risulta più alta in esemplari pescati a costa e

questo può essere spiegato dalla fonte di provenienza degli IPA e dalla morfologia dell'area di studio.

La stagionalità ha un'importante influenza sulla concentrazione di IPA nel filetto le quali risultano più alte in inverno rispetto all'estate sia per i  $\Sigma 15$  PAHs che per i LMW PAHs e HMW PAHs. Una maggiore concentrazione in inverno può essere spiegata da eventi di risospensione dei sedimenti e variazioni di temperatura nell'ambiente.

Per quanto riguarda le concentrazioni medie di IPA presenti nel filetto di esemplari femmine e maschi, queste non presentano un andamento costante: esemplari pescati in zone costiere presentano concentrazioni medie di IPA nei maschi più alte nella stagione invernale e nelle femmine in quella estiva. Tuttavia, questo andamento è confermato solo per le concentrazioni di  $\Sigma 15$  PAHs e per i LMW PAHs, ma non lo è per gli HMW PAHs.

Nei campioni pescati a largo, invece, si riscontrano concentrazioni medie di IPA più alte nelle femmine nella stagione invernale e nei maschi nella stagione estiva e questo sia se si considerano le concentrazioni medie di  $\Sigma 15$  PAHs che quelle di LMW PAHs e HMW PAHs.

La concentrazione media degli IPA analizzata in funzione del sesso non è correlata statisticamente con la percentuale lipidica nel filetto che presenta, al contrario, un andamento costante essendo sempre più alta in inverno rispetto all'estate sia in esemplari maschi che femmine e sia a costa che a largo.

Dai risultati ottenuti possiamo dedurre che il bioaccumulo di IPA nel filetto di *M. barbatus* può essere influenzato da molteplici fattori relativi al contaminante, alla specie e all'ambiente in cui essa vive.

La sua valutazione risulta quindi complessa ed è necessario indagarla prendendo in considerazione molteplici variabili, in particolar modo quando si trattano, come in questo studio di tesi, dei campioni selvatici.



## 7 BIBLIOGRAFIA

Abdel-Shafy, Hussein I. and Mona S.M. Mansour. 2016. “*A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source, Environmental Impact, Effect on Human Health and Remediation.*” *Egyptian Journal of Petroleum* 25 (1): 107–23.

Arienzo Michele, Carlo Donadio, Olga Mangoni, Francesco Bolinesi, Corrado Stanislao, Marco Trifuoggi, Maria Toscanesi, Gabriella Di Natale, and Luciano Ferrara. 2017. “*Characterization and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in the Sediments of Gulf of Pozzuoli (Campania, Italy).*” *Marine Pollution Bulletin* 124 (1): 480–87.

Artegiani A., M. Gacic, A. Michelato, V. Kovacevic, A. Russo, E. Paschini, P. Scarazzato, and A. Smircic. 1993. “*The Adriatic Sea Hydrography and Circulation in Spring and Autumn (1985-1987).*” *Deep-Sea Research Part II* 40 (6): 1143–80.

Artegiani A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A., 1997a: *The Adriatic Sea General Circulation. Part I: Air Sea interaction and water mass structure*, Journal of Physical Oceanography., 27: 1515-1532.

Bombace, G., Lucchetti, A. 2011. *Elementi di biologia della pesca*. Edagricole, Milano (MI)

Baumard P., H. Budzinski, P. Garrigues, J. C. Sorbe, T. Burgeot, and J. Bellocq. 1998. “*Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to Those in Sediments and to Trophic Level.*” Marine Pollution Bulletin 36 (12): 951–60.

Bocca Beatrice, Riccardo Crebelli and Edoardo Menichini. 2003. “*Presenza Degli Idrocarburi Policiclici Aromatici Negli Alimenti (Rapporti ISTISAN 03/22),*” no. c: 45.

Bombace, G., Lucchetti, A. 2011. *Elementi di biologia della pesca*. Edagricole, Milano (MI)

Commissione Europea. 2011. “*CE Regulation n. 835/2011*” no. 2008: 4–8.

Commissione Europea. 2014. “*2000/60/CE Del Parlamento Europeo E Del Consiglio*” 37: 1–282.

Consiglio dell’Unione Europea. 1999. “*DIRETTIVA 98/83/CE DEL CONSIGLIO Del 3 Novembre 1998 Concernente La Qualità Delle Acque Destinate Al Consumo Umano.*” Gazzetta Ufficiale L 330: 5.

Consiglio dell’Unione Europea. 2006. “*Regolamento (CE) n.1967/2006 del Consiglio del 21 Dicembre 2006 relativo alle misure di gestione per lo sfruttamento sostenibile delle risorse della pesca nel mar Mediterraneo*” L: 409/9

Conti Gea Oliveri, Chiara Copat, Caterina Ledda, Maria Fiore, Roberto Fallico, Salvatore Sciacca, and Margherita Ferrante. 2012. “*Evaluation of Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Mullus Barbatus from Sicily Channel and Risk-Based Consumption Limits.*” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88 (6): 946–50.

Della Torre Camilla, Ilaria Corsi, Francesco Nardi, Guido Perra, Maria Paola Tomasino and Silvano Focardi. 2010. “*Transcriptional and Post-Transcriptional Response of Drug-Metabolizing Enzymes to PAHs Contamination in Red Mullet (Mullus Barbatus, Linnaeus, 1758): A Field Study.*” *Marine Environmental Research* 70 (1): 95–101.

Dong Jianwei, Xinghui Xia, Minghu Wang, Hui Xie, Jiaojiao Wen, and Yimeng Bao. 2016. “*Effect of Recurrent Sediment Resuspension-Deposition Events on Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aquatic Environments.*” *Journal of Hydrology* 540: 934–46.

Fao-Unep. 1993. *Report of the FAO/UNEP/IAEA training workshop on the design of monitoring programmes and management of data concerning chemical contaminants in marine organisms*. Athens, p 247

FAO, 2018 <http://www.fao.org/fishery/species/3208/en>

Frapiccini, E., M. Panfili, S. Guicciardi, A. Santojanni, M. Marini, C. Truzzi, and A. Annibaldi. 2020. “*Effects of Biological Factors and Seasonality on the Level of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Red Mullet (Mullus Barbatus)*.” *Environmental Pollution* 258.

Frapiccini Emanuela, and Mauro Marini. 2015. “*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation and Sorption Parameters in Coastal and Open-Sea Sediment*.” *Water, Air, and Soil Pollution* 226 (8).

González-Curbelo, M., B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, and M. Rodríguez-Delgado.

2015. “*Evolution and Applications of the QuEChERS Method.*” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 71: 169–85.

Guida Eurachem di Emanuela Gregori, Marina Patriarca, and Michela Sega. 2014 “*ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ Idoneità per Lo Scopo Dei Metodi Analitici Guida per i Laboratori Sulla Validazione Dei Metodi e Argomenti Correlati*”

Haidar Z. 1963. *Ecologie du rouget barbet (Mullus barbatus L.) en Adriatique orientale. Rapports et Procès Verbaux des Réunions* (International Commission for the Scientific Exploration of the Mediterranean Sea) 17:363-364.

Hylland Ketil. 2006. “*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems.*” *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 69 (1–2): 109–23.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010. *“IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans”* 93: 9–38.

IARC Summary & Evaluation. 2002. *Naphthalene* (Volume 82, 2002).

Joint Research Centre (European Commission). 2017. *Potential Chemical Contaminants in the Marine Environment: An Overview of Main Contaminant Lists*.

Kim Ki Hyun, Shamin Ara Jahan, Ehsanul Kabir, and Richard J.C. Brown. 2013. *“A Review of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Human Health Effects.”* *Environment International* 60: 71–80.

Kim Leesun, Danbi Lee, Hye Kyung Cho, and Sung Deuk Choi. 2019. *“Review of the QuEChERS Method for the Analysis of Organic Pollutants: Persistent Organic Pollutants, Polycyclic Aromatic*

*Hydrocarbons, and Pharmaceuticals.*” Trends in Environmental Analytical Chemistry 22.

Layachi, Mostafa, Mohammed Melhaoui, Mohammed Ramdani, and Abdellah Srour. 2007. “*Etude Préliminaire Du Régime Alimentaire Du Rouget-Barbet (Mullus Barbatus L.) de La Côte Nord-Est Méditerranéenne Du Maroc (Nador) Au Cours de l’Année 2001 (Poissons, Mullidae).*” Bulletin de l’Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de La Vie 29 (1979): 35–41.

León, V. M., I. García, C. Martínez-Gómez, J. A. Campillo, and J. Benedicto. 2014. “*Heterogeneous Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments and Red Mullet along the Spanish Mediterranean Coast.*” Marine Pollution Bulletin 87 (1): 352–63.

Livingstone D. R. 1998. “*The Fate of Organic Xenobiotics in Aquatic Ecosystems: Quantitative and Qualitative Differences in Biotransformation by Invertebrates and Fish.*” Comparative



Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology  
120 (1): 43–49.

Lombarte Antoni and Hugo Aguirre. 1997. “*Quantitative Differences in the Chemoreceptor Systems in the Barbels of Two Species of Mullidae (Mullus Surmuletus and M. Barbatulus) with Different Bottom Habitats.*” Marine Ecology Progress Series 150 (1–3): 57–64.

Maliszewska-Kordybach, B. 1999. “*Sources, Concentrations, Fate and Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Environment. Part A: PAHs in Air.*” Polish Journal of Environmental Studies 8 (3): 131–36.

Marini Mauro and Emanuela Frapiccini. 2013. “*Persistence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments in the Deeper Area of the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea).*” Chemosphere 90 (6): 1839–46.

Meador, J. P., J. E. Stein, W. L. Reichert, and U. Varanasi. 1995. *“Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Marine Organisms.”* Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 143: 79–165.

Neff, Jerry M., Scott A. Stout, and Donald G. Gunster. 2005. *“Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments: Identifying Sources and Ecological Hazard.”* Integrated Environmental Assessment and Management 1 (1): 22–33.

Nikolaou A., M. Kostopoulou, G. Lofrano and S. Meric. 2009a. *“Determination of PAHs in Marine Sediments: Analytical Methods and Environmental Concerns.”* Global Nest Journal 11 (4): 391–405.

Nikolaou Anastasia, Maria Kostopoulou, Andreas Petsas, Maria Vagi, Giusy Lofrano and Sureyya Meric. 2009b. *“Levels and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediments.”* TrAC - Trends in Analytical Chemistry 28 (6): 653–64.

Park, K.S., Sims, R.C., Dupont, R.R., Doucetre, W.J., Matthews, J.E., 1990. *Fate of PAH compounds in two soil types: influence of Volatilization, Abiotic Loss and Biological Activity*. Environ. Toxicol. Chem. 9, 187–195.

Perugini M., P. Visciano, A. Giammarino, M. Manera, W. Di Nardo and M. Amorena. 2007. “*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Organisms from the Adriatic Sea, Italy*.” Chemosphere 66 (10): 1904–10.

Procedures Analytical. 1996. “*Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*” 20857 (November): 301–827.

Ramalhosa, Maria João, Paula Paíga, Simone Morais, Cristina Delerue-Matos, and Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira. 2009. “*Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish: Evaluation of a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Extraction Method*.” Journal of Separation Science 32 (20): 3529–38.

Ranjbar Jafarabadi, Ali, Alireza Riyahi Bakhtiari, Zeinab Yaghoobi, Chee Kong Yap, Maria Maisano, and Tiziana Cappello. 2019. “*Distributions and Compositional Patterns of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Derivatives in Three Edible Fishes from Kharg Coral Island, Persian Gulf, Iran.*” *Chemosphere* 215: 835–45.

Russo, Aniello, and Antonio Artegiani. 1996. “*Adriatic Sea Hydrography.*” *Scientia Marina* 60 (SUPPL. 2): 33–43.

Scaccini A. (1974). *Contributo alla conoscenza della biologia dei Mullidi nell'Adriatico medio occidentale.* Note Laboratorio Biologia Marina Fano, 1(3), 17-24.

Sieli, G., C. Badalucco, G. Di Stefano, P. Rizzo, G. D’Anna, and F. Fiorentino. 2011. “*Biology of Red Mullet, Mullus Barbatulus (L. 1758), in the Gulf of Castellammare (NW Sicily, Mediterranean Sea) Subject to a Trawling Ban.*” *Journal of Applied Ichthyology* 27 (5): 1218–25.

Soclo, H. H., Ph Garrigues, and M. Ewald. 2000. “*Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas.*” *Marine Pollution Bulletin* 40 (5): 387–96.

Turan Cemal. 2006. “*Phylogenetic Relationships of Mediterranean Mullidae Species (Perciformes) Inferred from Genetic and Morphologic Data.*” *Scientia Marina* 70 (2): 311–18.

Unione Europea, 2008. “*Directive 2008/105/CE Du Parlament Européen et Du Conseil Du 16 Décembre 2008.*” *Gazzetta Ufficiale Dell’Unione Europea*, 84–97.

Van Der Oost Ron, Antoon Opperhuizen, Karel Satumalay, Henk Heida, and Nico P.E. Vermeulen. 1996. “*Biomonitoring Aquatic Pollution with Feral Eel (Anguilla Anguilla) I. Bioaccumulation: Biota-Sediment Ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs.*” *Aquatic Toxicology* 35 (1): 21–46.

Varanasi, U., Brown, D.W., Hom, T., Burrows, D.G., Sloan, C.A., Field, L.J., Stein, J.E., Tilbury, K.L., McCain, B.B., Chan, S., 1993. *Survey of Alaskan Subsistence Fish, Marine Mammal, and Invertebrate Samples Collected 1989–91 for Exposure to Oil Spilled from the Exxon Valdez*, vol. 1. NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-12.

Vrgoč N., Arneri E., Juki-Peladi S., Krstulović Šifner S., Mannini P., Marčeta B., Ungaro N. Osmani K., Piccinetti C. and AdriaMed. 2004. “*Review of Current Knowledge.*” AdriaMed Technical Documents, no. 12: 91.

Zaghden, Hatem, Monem Kallel, Boubaker Elleuch, Jean Oudot, and Alain Saliot. 2007. “*Sources and Distribution of Aliphatic and Polyaromatic Hydrocarbons in Sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean Sea.*” *Marine Chemistry* 105 (1–2): 70–89.

Zavatarelli, M. 2002. “*Diagnostic and Prognostic Model Studies of the Adriatic Sea General Circulation: Seasonal Variability.*” *Journal of Geophysical Research* 107 (C1).