



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: **Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale (XXVI CICLO)**

Coordinatore: Prof. Enrico P.L. De Santis

**SICUREZZA ALIMENTARE DEI
PRODOTTI DELLA PESCA IN RELAZIONE
ALLA PRESENZA DI METALLI PESANTI
(Pb, Cd e Hg) E METALLOIDI (As) COME
CONTAMINANTI AMBIENTALI**

Docente Guida

Prof. Enrico P.L. De Santis

Correlatori

Dott.ssa Giannina Chessa

Dott.ssa Roberta Orletti

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dott. Pierluigi Piras

Ai miei figli:

Stefano (che, per età, è il mio figlio grande preferito)

e Daniele (che invece è il mio figlio piccolo preferito)

Indice

Abstract	5
1. Introduzione	5
1.1 Il profilo chimico-tossicologico di piombo, cadmio, mercurio ed arsenico come contaminanti ambientali negli alimenti	18
1.2 La valutazione del rischio da esposizione alimentare a piombo, cadmio, mercurio e arsenico nell'Unione Europea	28
1.3 Il quadro normativo dell'Unione Europea e le procedure ufficiali di campionamento ed analisi	32
Bibliografia relativa al Capitolo introduttivo	38
2. I contributi alla ricerca in 9 steps: dall'utilizzo di specie "sentinella" per il monitoraggio in aree costiere, all'analisi dei dati correnti di sorveglianza generati dal controllo ufficiale dei prodotti della pesca	46
2.1 Caratterizzazione del rischio in un ambiente costiero antistante un'area mineraria ed industriale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente) tramite campionamento a <i>cluster</i> e ricerca di contaminanti su bioti eduli (pesci e molluschi bivalvi)	51
2.2 Valutazione dell'esposizione alimentare a contaminanti presenti su bioti eduli (pesci, molluschi bivalvi e crostacei) in un ambiente costiero antistante un'area mineraria ed industriale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente)	61
2.3 Cadmium in tissue of gray mullets (<i>Mugil sp.</i> and <i>Liza spp.</i> of Mugilidae Family) from Boi Cerbus lagoon, near a mining and industrial area located in Southwestern Sardinia, Italy	82

2.4	Cadmium levels in samples of Mediterranean mussel (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) from the coasts of Sardinia (Italy): health surveillance and preliminary assessment of exposure	86
2.5	Consumo di pesce, raccomandazioni nutrizionali ed esposizioni a contaminanti persistenti: valutazione rischio-beneficio nell'esperienza del progetto Aquamax	90
2.6	Mercury occurrence in Italian seafood from the Mediterranean Sea and possible intake scenarios of the Italian coastal population	102
2.7	Variabilità dell'accumulo del cadmio in cefalopodi (<i>Octopus vulgaris</i> , <i>Sepia officinalis</i> , <i>Loligo vulgaris</i> e <i>Todarodes sagittatus</i>) campionati in Sardegna nel periodo 2008-2012	121
2.8	L'accumulo di piombo ed altri metalli pesanti (cadmio e mercurio) in molluschi bivalvi (<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Ruditapes</i> spp. e <i>Crassostrea gigas</i>) campionati in Sardegna nel quinquennio 2008-2012	134
2.9	Supply chains globalization and reliability of food testing: the Italian experience of the public veterinary laboratories accreditation system	148
3.	L'ultimo <i>step</i> della ricerca: la speciazione dell'arsenico nei prodotti della pesca come pre-condizione per il <i>Risk Assessment</i>.....	151
3.1	<i>Background</i> e obiettivi	161
3.2	Materiali e metodi	164
3.3	Risultati e conclusioni	169
3.4	Bibliografia relativa all'ultimo <i>step</i> della ricerca	174
	Ringraziamenti	178

La natura non va forzata, ma persuasa. La persuaderemo soddisfacendo i desideri necessari, ed anche quelli naturali, purché non portino danno, ma respingendo fortemente quelli che siano nocivi.

Epicuro (*Επίκουρος*) di Samo (341 - 271 a.C.)

Gnomologio Vaticano epicureo - sentenza 21.

Abstract

The fishery products are well known for their specific nutritional qualities and health authorities promote information campaigns to increase their consumption. Despite the important role in human diet, such foods may represent, to some extent, an exposure source to environmental pollution by lead, cadmium, mercury and arsenic. The toxic effect of these heavy metals and metalloids on human health is well established and their presence represents one of the main chemical risks associated with fishery products consumption. The aim of the present thesis was to provide an updated survey on the presence of these contaminants and to conduct a risk assessment on fishery products. The study was carried out in Sardinia on the coastal areas near mining territories (Sulcis-Iglesiente) and on more extensive stretches of the Mediterranean Sea. As an indication of environmental pollution various edible marine organism were monitored by the determination of contaminants bioaccumulation along the aquatic trophic chain. In addition data available from the Zooprofilattici Institutes laboratories were used to investigate the distribution of such contaminants in fishery products placed on the market. The level of exposure of the population was assessed using various approaches. Our research suggest that exposure assessment should be conducted taking into account risk/benefit ratio and differences in vulnerable groups, such as children and pregnant women, and dietary habits of coastal population.

1. Introduzione

Al di là dell'apparente omogeneità merceologica, i “prodotti della pesca” rappresentano una categoria molto variegata di alimenti, che include sia prodotti freschi che preparati e, tra questi, quelli lavorati con metodi tradizionali, oppure secondo moderne tecnologie. Soprattutto negli ultimi decenni sono stati fatti significativi progressi nelle tecniche di produzione ittica, che hanno visto, da un lato, una grande espansione e differenziazione dell'acquacoltura e, dall'altro, una continua crescita della domanda di questa tipologia di prodotti a livello mondiale. Ma la categoria dei “prodotti della pesca”

è sostanzialmente poco omogenea soprattutto sotto il profilo biologico (e, conseguentemente, anche relativamente alla loro capacità di bio-accumulare elementi in traccia”) considerato che tale generica definizione include non solo i pesci p.d., con gli Elasmobranchi (1) ed i Teleostei (2), ma anche i Celenterati (3), i Molluschi acquatici (4), i Crostacei (5), gli Echinodermi (6) ed i Tunicati (7), che a ben vedere, dal punto di vista zoologico, costituiscono categorie di organismi profondamente diversi quanto a sostanziali aspetti fisiologici, caratteristiche trofiche ed ambienti di vita. Per la normativa comunitaria (8), sono infatti “prodotti della pesca”: «tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione ... di tutti i mammiferi, i rettili e le rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali». Relativamente al complesso di tali prodotti, sono per altro note da sempre le specifiche qualità nutrizionali e, soprattutto negli anni recenti, sono state messe in particolare rilievo le proprietà biologiche degli acidi grassi essenziali Omega-3 e Omega-6 particolarmente presenti negli alimenti di origine marina. Per questo motivo le autorità sanitarie nazionali e internazionali hanno promosso numerose campagne di informazione allo scopo di incrementare il consumo di questi prodotti da parte dei consumatori. D'altra parte i prodotti della pesca sono però esposti ai contaminanti presenti nell'ambiente, sia per cause naturali che per cause riconducibili alle attività antropiche. Per tale motivo il consumo dei prodotti ittici deve essere attentamente valutato in funzione del rapporto rischio/beneficio (9, 10), soprattutto riguardo fasce di popolazione particolarmente vulnerabili, come i bambini, le donne in gravidanza ed i forti consumatori di prodotti della pesca (11, 12, 13). Quando si focalizza l'attenzione sui rischi di natura chimica nei prodotti della pesca, la presenza di metalli pesanti permane ancora oggi uno tra i più rilevanti per la sicurezza alimentare (14). L'origine, naturale o antropica, e gli effetti tossici sull'uomo di tali elementi sono oltremodo noti e la loro trattazione non rappresenta l'obiettivo principale della presente tesi che vuole piuttosto fornire (senza pretesa di esaustività) un quadro d'indagine aggiornato sulla presenza di tali contaminanti nei prodotti della pesca, provenienti sia da aree costiere dei territori prossimi allo scrivente o da tratti più estesi del *Mare Nostrum*, per farne una valutazione di impatto sulla sicurezza alimentare.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Il termine “metallo” deriva dal Latino METÀLLUM, che a sua volta deriva dal Greco antico ΜΕΤΑΛΛΟΝ, che stava ad indicare “*cava, miniera*”, ovvero “*ciò che è ritrovato nelle viscere della terra*” e quindi “*minerale*”. Etimologicamente è una voce di origine incerta e controversa, ma verosimilmente possiede la radice di METÀ “*infra, tra, in mezzo a*” e ALLON, formato sulla radice AL- [in Sanscrito AR-] “*andare, muovere, dirigersi*”, da cui il verbo AL-ÀO|MAI| “*vado errando*” ed EL-ÀÔ “*metto in movimento*”, che darebbe la nozione di “*cosa ricercata*” sotto terra. Tra gli aspetti indagati sull’etimologia complessa di “metallo” si aggiungerebbe pure una sua ulteriore spiegazione con METÀ-ALLA [in Latino INTER-ÀLIA] “*fra le altre cose*”, da cui il senso di “*miscuglio*”, essendo il metallo naturale quasi sempre frammisto a materie diverse. Ma ciò sta ad indicare quanto sia comunque stretto il legame fra minerali e metalli. Questi ultimi, di certo comunissimi nella nostra cultura “materiale”, hanno rappresentato nei secoli trascorsi la scopertaolutiva migliore ad un’infinità di esigenze sia strutturali, che strumentali e protettive originatesi nell’evoluzione delle civiltà. Appena alcuni secoli fa infatti, e a partire dai metalli, risultò vantaggioso fabbricarsi un coltello, o una pentola da camino, oppure ferrare il proprio cavallo. E solo qualche millennio fa poté sembrare invece più utile costruirsi un’ascia, o un aristocratico ciondolo, quanto piuttosto forgiare un artistico e celebrativo bronzetto nuragico. Prima che i metalli fossero scoperti, l’umanità conosceva infatti solo pochi materiali di base: fondamentalmente la pietra ed il legno (ai quali solo in tempi successivi si aggiunse la terracotta), mentre sarebbe stato utile disporre di un materiale che avesse in sé la durezza e la resistenza al fuoco della pietra, ma anche l’elasticità e la lavorabilità del legno: ed ecco quindi il “salto” con l’avvento dei metalli. L’uomo preistorico li conobbe però verosimilmente solo perché aveva avuto la fortuna di trovarne pezzi nella forma nativa, ma la fonte più significativa non era quella, poiché in natura i metalli esistono soprattutto in numerose tipologie di minerali (quasi sempre in forma ossidata), distribuiti in giacimenti non sempre economicamente vantaggiosi per la loro estrazione. Il passaggio alla metallurgia estrattiva fu sicuramente un processo lento, difficilmente collocabile in un determinato periodo ed in una precisa area, ma che ancora oggi caratterizza interi territori storicamente ad essa vocati, come il Sulcis-Iglesiente nella parte sud-occidentale della

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Sardegna, dove è ancora patrimonio culturale (e, purtroppo per i livelli occupazionali del territorio, non più una risorsa economica) la capacità tecnica di ottenere metalli dal “miscuglio” rappresentato dai minerali con parti di rocce (generalmente quarzi, silicati e calcare) presenti come impurità o “ganga”. I metalli sono infatti elementi che, generalmente (escluso i metalli nobili), si trovano combinati a formare dei composti chimici; sono solidi a temperatura ambiente (ad eccezione del mercurio) ed appartengono ad una eterogenea categoria di elementi duttili e malleabili, buoni conduttori di calore e di elettricità. Si definiscono “pesanti” quei metalli che hanno una densità superiore a 5 g/cm^3 (o, più semplicemente, quelli che hanno un numero atomico maggiore di 22). Nella crosta terrestre si ritrovano in forma cristallina e sono naturalmente presenti nei suoli e, quindi, nei sedimenti e nelle acque marine e di transizione, per ritrovarsi poi come contaminanti “naturali” negli alimenti. Tuttavia, le attività umane hanno portato ad un incremento e ad una progressiva dispersione nell’ambiente dei metalli stessi. L’uomo ha cominciato a estrarre e a lavorare i metalli non meno di 5’000 anni fa ma, con l’avvento dell’era industriale, le attività produttive minerarie e metallurgiche si sono sviluppate in maniera esponenziale fino agli anni ‘80 del secolo scorso. Le attività estrattive, metallurgiche e di lavorazione dei metalli hanno determinato una loro dispersione nell’ambiente di vita e costituiscono un fattore di rischio anche per la popolazione generale, oltre che per gli addetti alle relative lavorazioni (quindi, come specifico campo di interesse della medicina occupazionale). La maggior parte degli effetti tossici dovuti a metalli pesanti sono stati infatti osservati e descritti in lavoratori esposti a concentrazioni ambientali di gran lunga più elevate di quelle presenti negli ambienti di vita, oppure in seguito ad intossicazioni accidentali. In alcuni casi gli effetti tossici si sono verificati nel corso di vere e proprie catastrofi ambientali (come nel noto caso del mercurio nella baia di Minamata in Giappone). Gli effetti dei metalli sono molteplici: possono determinare fenomeni irritativi, intossicazioni acute e croniche, possono avere azione mutagena o cancerogena. Anche gli organi o gli apparati colpiti sono molto diversi: si va dal sangue al rene, al sistema nervoso centrale o periferico, al sistema respiratorio, agli apparati gastrointestinale e cardiovascolare ed alla cute.

Attualmente i metalli pesanti possono essere determinati anche in quantità estremamente ridotta (ricerca dei c.d. “elementi in tracce”) nelle varie matrici ambientali, come i sedimenti, le acque ed il biota (15) utilizzando fondamentalmente tecniche analitiche di spettroscopia. Una maggior conoscenza della presenza “naturale” dei metalli nei suoli (c.d. “livello di fondo”) consente infatti di valutare meglio, come si dirà in seguito, i possibili fenomeni della loro trasferibilità (e bio-disponibilità) nei comparti ambientali delle acque interne, marine e di transizione, e nei sedimenti delle aree costiere (16). Da qui l’importanza di individuare le sorgenti d’inquinamento ambientale da sottoporre a monitoraggio al fine di evitare e/o minimizzare eventuali danni alla fauna ittica e la bio-accumulazione dei contaminanti (17) attraverso la catena alimentare. La “catena alimentare” può essere definita come il percorso compiuto dall’energia e dalle sostanze nutritive nei passaggi trofici degli organismi occupanti un determinato ambiente. Gli organismi appartenenti a più catene alimentari collegano queste ultime contribuendo a formare (soprattutto negli ambienti marini) una “rete trofica”, all’interno della quale ciascuna specie occupa una determinata posizione, chiamata “livello trofico” (18) convenzionalmente ripartito su una scala di cinque posizioni. Tale rete viene denominata anche “piramide trofica” in quanto le specie che occupano il primo livello sono numerosissime e, via via che si passa ai livelli superiori, diventano sempre meno numerose. In estrema sintesi:

- il livello trofico “1” è fondamentalmente occupato dalle piante (sia unicellulari che macrofite) poiché, attraverso la fotosintesi, l’energia (direttamente quella solare) è stata trasformata in un solo passaggio;
- il livello trofico “2” è quindi occupato dagli erbivori (e rappresenta perciò il livello nel quale l’energia è stata trasformata in due passaggi di elaborazione);
- nel livello trofico “3” troviamo i primi carnivori (cioè quelli che fondamentalmente si nutrono di erbivori e nei quali, pertanto, l’energia ha subito tre passaggi);
- il livello trofico “4” ospita i carnivori che si nutrono dei primi carnivori e dove l’energia è stata trasformata in quattro passaggi;
- nel livello trofico “5” troviamo infine i “*top predators*”, cioè le specie al vertice delle catene trofiche, dove l’energia ha subito ben cinque passaggi.

Le catene trofiche rappresentano quindi anche il *target* eco-biologico per il complesso di contaminanti presenti nell'ambiente, i quali, penetrando nelle catene alimentari, possono essere trasferiti (e spesso bio-magnificati) nelle sequenze preda-predatore, fino all'uomo. Inoltre, il significato reale di "rischio associato al consumo di prodotti della pesca" può essere compreso appieno solo se, oltre alla componente biotica, sia adeguatamente noto e studiato anche l'ambiente (nel senso più ampio) potenzialmente coinvolto. Ed è quindi importante conoscere:

- la struttura fisica del territorio e delle aree costiere prospicienti (incluse quindi le caratteristiche dei sedimenti ed acque) e la distribuzione territoriale degli impianti industriali esistenti e le caratteristiche delle aree in cui esercitano il loro impatto;
- le aree adibite ad uso agricolo, all'allevamento e in genere alla produzione degli alimenti (comprendendo quindi anche le zone costiere adibite a molluschicoltura e/o quelle lagunari gestite come peschiere);
- i tipi e la distribuzione territoriale delle specie vegetali (sia naturali che coltivate) ed animali (sia raccolte/pescate che allevate) e degli ecosistemi di interesse;
- le caratteristiche e la distribuzione territoriale delle comunità umane nell'area potenzialmente coinvolta (inclusi gli eventuali gruppi particolarmente sensibili agli effetti dell'inquinamento).

Relativamente a quest'ultimo aspetto, per valutare il rischio dell'esposizione alimentare dal consumo di specifiche categorie di alimenti, può essere infine importante identificare le principali diete locali e quali e quanti degli alimenti raccolti/pescati localmente rientrano in tali diete, ovvero verificare se nell'area potenzialmente coinvolta vi siano gruppi di individui la cui alimentazione sia strettamente dipendente dalle risorse ittiche locali. Da un punto di vista strettamente sanitario, i "metalli pesanti" s.s. come il piombo, il cadmio ed il mercurio ed il "metalloide" arsenico, rappresentano elementi chimici (**Figura 1**) notoriamente capaci di residuare e/o concentrarsi nei prodotti della pesca (**19**), con una significativa variabilità, anche legata alle diverse caratteristiche e livello trofico occupato nelle catene alimentari (**20**) dalle specie e dai gruppi zoologici compresi nella eterogenea categoria merceologica, da tenere in conto e valutare (**21, 22**) anche per i risvolti di sanità pubblica e sicurezza alimentare (**23**).

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

In passato, a fronte di una realtà produttiva caratterizzata da una spiccata polarizzazione industriale, la contaminazione ambientale da metalli pesanti e metalloidi tossici è stata generalmente associata a veri e propri “incidenti” (come il riferito caso “Minamata”), per altro relativamente rari, a cui sono comunque conseguite scie di lungo periodo difficilmente valutabili, sia per l’ambiente che per la salute umana. In genere, gli interventi che sono stati messi in campo in occasione di tali emergenze avevano come obiettivo contingente il controllo reattivo (e quanto più possibile tempestivo) dei rischi associati al verificarsi dei singoli eventi, cercando di rimuovere compiutamente la contaminazione o, se ciò non fosse percorribile, confinandola in maniera adeguata.

Più di recente, con la crescita e la diffusione esponenziale dell’industrializzazione, il fenomeno si è trasformato da “incidentale” in un problema infrastrutturale e produttivo di crescente intensità, ancor più difficilmente valutabile. Inoltre, ad un sopraggiunto stato di compromissione ambientale diffusa, causato da rilasci industriali, da contaminazioni dovute ad attività minerarie (sia attive che dismesse) e da un improprio smaltimento dei rifiuti, si è anche aggiunto l’uso crescente di prodotti fertilizzanti e fitosanitari, tanto da richiedere l’adozione una normativa trasversale sul problema della contaminazione dei suoli, delle falde idriche e, di riflesso, degli ambienti acquatici.

Il Decreto Legislativo n. 152/2006 (24) rappresenta attualmente lo strumento giuridico basilare per la regolamentazione dei vari aspetti della problematica, compresa la tutela delle risorse idriche, spaziando dalla gestione dei rifiuti fino alla bonifica dei siti contaminati. Quest’ultimo aspetto è diventato senza dubbio uno dei punti più rilevanti per la gestione del territorio: da un lato, per i risvolti ambientali e sanitari che esso presenta e, dall’altro, per le ripercussioni socio-economiche derivanti dalla eventuale chiusura di stabilimenti e/o dalla compromissione degli insediamenti abitativi e agricoli presenti in prossimità dei “siti contaminati”, definibili come aree nelle quali l’apporto di uno o più inquinanti determina l’alterazione puntuale delle caratteristiche naturali del suolo e delle falde idriche. La norma ha tra l’altro affrontato, all’interno dei complessi temi in materia ambientale, anche quello specifico delle “acque destinate alla vita dei molluschi” (art. 87 e segg.), in accordo con la Direttiva n. 2006/113/CE (25) “relativa ai requisiti di qualità delle acque destinate alla molluschicoltura” che, al Punto 9

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

dell'Allegato I, riferisce sui criteri indicativi e vincolanti relativi al parametro "metalli", tra cui figurano anche piombo, cadmio, mercurio e arsenico, per i quali andrebbero considerati anche "gli effetti sinergici". Spesso con maggior impatto rispetto ai composti organici di sintesi, per altro in continuo sviluppo, sono proprio gli elementi chimici come i metalli pesanti e metalloidi tossici, sebbene divenuti una classe di contaminanti proporzionalmente inferiore tra le attuali tipologie, ad essere ancora inseriti nell'ecosistema in una miriade di vie di trasmissione e di forme (come specie chimiche) che ne determinano generalmente una rapida ed ampia diffusione. Inoltre, tali elementi chimici mostrano spesso una notevole tendenza all'accumulo e, a differenza delle sostanze organiche che possono subire una qualche degradazione, sono per loro natura persistenti. Non a caso, sono proprio il piombo, il cadmio, il mercurio e l'arsenico, ad essere stati identificati fra i primi elementi pericolosi per l'ambiente e per l'uomo, conseguendone il fatto che il livello di esposizione umana attraverso le vie tradizionali (aria, acqua e alimenti) sia oramai studiato da tempo e, per molti aspetti, sottoposto anche ad adeguato controllo.

Nell'applicazione ai metalli pesanti e metalloidi tossici dei criteri generali utilizzati per l'identificazione del rischio da sostanze chimiche, è necessario però soffermarsi su alcune altre caratteristiche che li rendono peculiari rispetto ai contaminanti organici di sintesi. In quanto componenti "intrinseci" dell'ambiente, essi sono infatti coinvolti in cicli bio-geo-chimici di grande complessità, con potenziale inquinamento dell'ambiente stesso ed esposizione dell'uomo per cause anche "naturali". Come si è detto, le fonti naturali di metalli pesanti e metalloidi nell'ambiente sono molteplici, pervenendo sia dalla deposizione atmosferica che dalla disgregazione rocciosa e, quindi, dalle attività vulcaniche fino alla stessa pre-esistente composizione geologica del suolo, per passare poi alle acque superficiali ed alla contaminazione costiera. Pertanto, anche del nostro Paese, in alcune aree non industrializzate possono essere registrate concentrazioni variabili, ma comunque significative, di metalli pesanti e metalloidi bio-disponibili, creando una situazione di maggior complessità quando sia necessario effettuare una discriminazione fra i livelli naturali o "di fondo" e quelli da "inquinamento". La geo-chimica dei metalli pesanti e metalloidi ed i vari processi di trasformazione che

avvengono all'interno dei diversi comparti ambientali, rivestono infatti un'importanza fondamentale nella comprensione dei fenomeni di trasferimento/accumulo e bio-accumulo di tali elementi tossici, sia di origine naturale che derivanti da attività antropogeniche. Inoltre, pur esistendo una grande quantità di dati riguardanti la composizione naturale delle rocce, dei suoli e delle acque, che insieme costituiscono la superficie terrestre, la complessità del ciclo bio-geo-chimico risulta ancora più evidente quando si sia costretti a considerare elementi la cui tossicità è strettamente dipendente dalle relative specie chimiche (inorganiche o no) che entrano in gioco.

Tra le attività industriali che possono generare un rilevante impatto ambientale, l'attività mineraria è, per sua stessa natura, una tra le più rilevanti, potendo comprendere, oltre ai rischi strettamente connessi all'esposizione lavorativa nelle fasi di estrazione (e ne sono riscontro gli innumerevoli incidenti sul lavoro e/o le specifiche malattie professionali), anche gli effetti sul territorio, come: le modificazioni più o meno permanenti del paesaggio, che spesso comportano la creazione di morfologie instabili, soggette a frane e crolli; la contestuale sottrazione del territorio stesso ad altre attività (per esempio quelle agro-zootecniche e/o turistiche); la possibile interferenza con la falda freatica ed il circuito idrologico in genere e la dispersione di polveri e/o gas. Ma l'impatto più rilevante è senz'altro rappresentato dalla dispersione nell'ambiente di elementi tossici, come alcuni metalli pesanti e metalloidi. Tale dispersione può essere veicolata per via meccanica (scivolamento gravitativo, ruscellamento, trasporto eolico), o per via chimica (trasporto in soluzione); in ogni caso, il circuito delle acque superficiali rappresenta la via preferenziale di dispersione di questi elementi tossici anche a distanze notevoli dalla sorgente. Va tuttavia ancora sottolineato come tali fenomeni di dispersione avvengano naturalmente ogni qualvolta rocce mineralizzate affiorino in superficie, o vengano comunque in contatto con l'ambiente esogeno; ribadito ciò, va però sottolineato con altrettanta chiarezza come l'intervento antropico mediante la coltivazione mineraria tenda ad esaltare enormemente la portata del fenomeno naturale (26). In questo contesto, la Sardegna si colloca in una posizione molto particolare. In poche altre Regioni come in questa, l'attività mineraria ha inciso infatti, attraverso i millenni, in maniera così profonda sulla propria storia, sull'economia, sulla cultura e sul paesaggio. Seppure negli

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

ultimi anni si sia assistito, in parallelo con quanto è avvenuto a livello nazionale ed europeo, ad un complessivo declino dell'attività estrattiva, ne restano come patrimonio attuale le cospicue testimonianze, che non a caso sono oggetto di consistenti iniziative di recupero e valorizzazione. Purtroppo però, è d'altro canto evidente come l'attività estrattiva si sia generalmente sviluppata, anche in tempi relativamente recenti, con poca attenzione alla prevenzione ed al contenimento dell'impatto ambientale e come, attualmente, gli interventi di bonifica e di risanamento con il cessare della coltivazione mineraria siano ancora molto limitati. Pertanto, il bilancio dell'impatto ambientale dell'attività mineraria in Sardegna risulta piuttosto pesante (27) ed appare chiaro come, nel quadro delle sopra ricordate iniziative di recupero e valorizzazione delle aree minerarie dismesse, gli studi e le misure di risanamento ambientale occupino un ruolo di particolare importanza.

Al fine di facilitare la comprensione dei successivi paragrafi, si ritiene a questo punto utile sviluppare un breve richiamo sui meccanismi che determinano e controllano il rilascio e la dispersione dei metalli pesanti e metalloidi in ambiente minerario, relativamente in particolare ai giacimenti di minerali metalliferi presenti nella richiamata area sud-occidentale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente), tenendo presente che, nella mineralizzazione primaria, i predetti elementi chimici sono in prevalenza associati a solfuri (e, solo subordinatamente, ad ossidi) e, poiché i solfuri sono generalmente instabili in condizioni esogene, l'esposizione stessa dei corpi minerari all'ambiente di superficie provoca la loro ossidazione e/o dissoluzione, con conseguente rilascio dei metalli e metalloidi in essi contenuti.

In generale, la geologia della Sardegna è largamente dominata da terreni di età paleozoica, in percentuale senz'altro superiore a quella di altre aree della penisola italiana. In particolare, nel basamento paleozoico del Sulcis-Iglesiente sono presenti il maggior numero di mineralizzazioni metallifere di tutto il territorio italiano (28). Tracce di coltivazioni metallifere di piombo e argento, già di epoca pre-romana, sono state infatti rinvenute in queste aree, dove del resto sono presenti ovunque i resti di attività minerarie antiche. Tuttavia, il vero e proprio inizio della coltivazione mineraria con metodi industriali in questi territori si deve far risalire alla metà del 19° secolo. Nel

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

complesso di quest'area, come si è detto, prevalgono i terreni di età paleozoica antica, cambriana-ordoviciano (~ 500 milioni di anni fa). Tale tipologia litologica è spesso modificata da processi di dolomitizzazione di età ercinica (350-250 milioni di anni fa), che ne hanno variato la composizione originaria, aumentandone il contenuto in metalli pesanti. I successivi sedimenti mesozoici (250-65 milioni di anni fa), essenzialmente carbonatici, tendono ad affiorare in aree molto limitate, mentre sono maggiormente diffuse le rocce sedimentarie e le vulcaniti del cenozoico (65-0,3 milioni di anni fa). In particolare, le mineralizzazioni stratiformi nei carbonati cambriani hanno rivestito la maggior importanza economica in assoluto. Si tratta di corpi a blenda (detta anche sfalerite, un minerale principalmente a base di zinco) e galena (un minerale a base di solfuro di piombo, PbS), associati talvolta a quantità residuali di pirite (anch'esso un minerale, in genere molto più comune, fondamentalmente a base di disolfuro di ferro, FeS₂), i cui tonnellaggi complessivi, dall'inizio della coltivazione con metodi industriali ad oggi, sono calcolati in almeno 150 milioni di tonnellate di grezzi (28). Mentre il piombo è costituente principale della galena, le blende sono invece abbastanza ricche in cadmio, mentre alcune generazioni di pirite contengono arsenico. Il mercurio mostra invece valori uniformemente bassi nel Sulcis-Iglesiente, fatta eccezione per concentrazioni sporadiche relativamente più alte che si riscontrano in corrispondenza di affioramenti di andesiti (complessi di rocce effusive) oligo-mioceniche (28). I siti minerari dismessi e le discariche minerarie rappresentano quindi un rischio, più o meno serio ed esteso, di contaminazione da alcuni metalli pesanti. Ed ecco perché si rende necessario lo sviluppo di un progetto di recupero, anche se ciò non appare semplice in una situazione molto articolata, come lo sono in genere le zone storicamente a vocazione mineraria. Tale progetto deve infatti poter soddisfare non solo l'aspetto ambientale e quello sanitario, ma anche l'aspetto culturale, altrettanto importante per garantire la memoria storica di ciò che è stato lo sviluppo, la cultura materiale e la vita di una parte significativa della Sardegna. In tale prospettiva è di fondamentale importanza stabilire in che modo e quanto l'attività mineraria pregressa abbia inciso e ancora incida sulla contaminazione dei suoli, dei corsi d'acqua e dell'ambiente in generale, compreso quello costiero. Sotto il profilo delle possibili ricadute sulla salute

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

umana, la contaminazione delle acque è infatti una delle conseguenze più gravi e persistenti. Si consideri tra l'altro che, nell'ambiente acquatico, i metalli possono esistere nella forma disciolta come ione idratato libero, ione complessato o chelato con leganti inorganici (inclusi OH^- , CO_3^{2-} , Cl^-), oppure con ligandi e molecole organiche. L'idrosolubilità di tali composti (o, per contro, la loro liposolubilità) riveste inoltre un ruolo tossicologico molto importante, poiché influenza la "bio-disponibilità" e l'assorbimento degli elementi chimici da parte degli organismi. Con tutta evidenza, anche per i metalli pesanti e metalloidi tossici è infatti questo un parametro molto importante che, in generale, condiziona sia la distribuzione nelle diverse fasi dei comparti abiotici e sia l'affinità tissutale in quelli biotici. La forma chimica o chimico-fisica di un determinato elemento negli ambiente acquatici è inoltre funzione di numerosi fattori, quali (ma l'elenco non è esaustivo):

- il pH ed il potenziale redox;
- la salinità, la durezza dell'acqua e l'ossigeno disciolto;
- la presenza di materia organica e di particolato e, infine,
- la stessa attività biologica (che è implicata a tutti i livelli, dai procarioti alle piante superiori ed agli organismi metazoi).

I rapporti, quindi, tra ambiente e catena alimentare sono controllati sia da fattori geologici (a partire dalla composizione mineralogica di un'area) e sia da quelli geo-chimici, relativi ai processi di trasferimento degli elementi dalle rocce al terreno, poi all'acqua ed ai vegetali, quindi agli organismi acquatici erbivori e, via via, ai predatori di livello trofico superiore. La bio-disponibilità degli elementi chimici (intesa stavolta più propriamente come parametro che misura la frazione di una specie chimica che si rende disponibile per essere ingerita, o comunque assimilata, da un organismo vivente) è pertanto un prerequisito necessario, benché non rappresenti l'unico determinante per la tossicità di un elemento. Bisogna infatti sempre considerare che questa equivale solo ad una piccola porzione della quantità presente nel materiale geologico ed è funzione di una serie di fattori complessi tra i quali, come si è detto, dobbiamo considerare le caratteristiche biologiche dell'organismo animale esposto o "ricevente" e quelle dei metalli pesanti e metalloidi coinvolti, dei quali si traccia di seguito un breve profilo.

1.1 Il profilo chimico-tossicologico di piombo, cadmio, mercurio e arsenico come contaminanti ambientali negli alimenti

1.1.1 Il piombo

Il piombo è l'elemento chimico di numero atomico 82, ha una densità di $11,3 \text{ g/cm}^3$, un punto di fusione di $327,4 \text{ °C}$ e fa parte del 14° gruppo (colonna) e del 6° periodo (riga) della Tavola Periodica degli Elementi (**Figura 1**). È un metallo pesante particolarmente duttile e malleabile, che ha come simbolo "Pb" ed il cui nome [dal Latino PLÚMBUM] ha proprio come radice etimologica PLU- "scorrere, fluire" (verosimilmente per la facilità con la quale si può liquefare) ed una presumibile origine dal Greco antico πέλιος (PÉLIOS) "*blu-nerastro*". Scoperto infatti fin dall'antichità, se ne fa riferimento anche nella Bibbia, quando si narra del passaggio sul Mar Rosso nella fuga dall'Egitto (Esodo, Capitolo 15): « [8] Al soffio della tua ira si accumularono le acque, si alzarono le onde come un argine, si ruppero gli abissi in fondo al mare. [9] Il nemico aveva detto: inseguirò, raggiungerò, spartirò il bottino, se ne sazierà la mia brama; sfodererò la spada, li conquisterà la mia mano! [10] Soffiasti con il tuo alito: il mare li coprì, sprofondarono come piombo in acque profonde». Infatti, pur essendo un metallo relativamente tenero (duttile e malleabile), è invece caratteristicamente molto denso. Di colore bianco-azzurrognolo appena tagliato, si colora invece di grigio scuro dopo esposizione all'aria. Esiste infatti anche allo stato nativo, ma molto raramente, ritrovandosi invece generalmente associato allo zinco, all'argento e al rame (con i quali viene quindi normalmente estratto). Il più importante minerale del piombo è la galena (di cui si è già fatto cenno a proposito delle miniere del Sulcis-Iglesiente), che ne contiene poco più dell'85%, e a seguire la cerussite (che è carbonato di piombo, PbCO_3) e l'anglesite (solfato di piombo, PbSO_4). Più che dall'estrazione però, il piombo attualmente in uso proviene prevalentemente da fonti riciclate. È presente quindi nell'ambiente sia per motivi naturali (con i riferiti minerali contenenti piombo) sia a seguito di attività industriali, trovando vasto impiego in diversi settori, probabilmente proprio perché i suoi minerali sono ampiamente diffusi e facili da fondere, nonché perché il piombo stesso è un materiale di relativamente facile lavorazione. Strutture e tubature in piombo risalenti all'impero romano sono per altro tutt'ora esistenti e

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

funzionanti e la metallurgia del piombo è parte della storia industriale di moltissimi territori che si affacciano sul Mediterraneo. Le più ricche miniere di piombo [PLUMBARIA METALLA] conosciute fin nell'antichità si trovavano nell'Africa proconsolare, in Attica e nell'Etruria, con l'Isola d'Elba. Notissime fino ai giorni nostri sono state inoltre le miniere di piombo argentifero della Spagna meridionale e della Sardegna sud-occidentale, con la richiamata area mineraria del Sulcis-Iglesiente.

Il piombo è un componente del peltro e di leghe metalliche usate per la saldatura e, quindi, è stato ampiamente utilizzato nell'edilizia, oltre che nella produzione di proiettili per armi da fuoco e di batterie per autotrazione e, recentemente (allo stato liquido), come refrigerante nei reattori nucleari, anche in lega con il bismuto. Può essere reso più duro con l'aggiunta di piccole quantità di antimonio (come lega per lungo tempo usata per i caratteri da stampa).

Sia il piombo che i suoi composti sono nocivi (29). Le storiche esposizioni lavorative a rischio erano rappresentate dall'industria metallurgica, sia per la produzione di piombo da minerale che da materiale di recupero, ma anche dall'industria ceramica e per la costruzione/demolizione di accumulatori. Negli anni recenti, un'importante sorgente di assorbimento per la popolazione generale è stato il piombo aerodisperso proveniente dal traffico veicolare a benzina, in cui era presente come antidetonante (definitivamente eliminato nell'UE oramai da una decina d'anni). Il piombo può contaminare gli alimenti (dove, nel recente passato, era anche significativamente ceduto anche dai materiali a contatto, in particolare dalle saldature delle conserve) e ritrovarsi in particolare nei prodotti della pesca per fenomeni di bioaccumulo (30), pur rimarcando il fatto che negli ultimi decenni il livello di piombo negli alimenti in generale sia sensibilmente diminuito anche grazie alle misure adottate per ridurre le emissioni di piombo nell'ambiente (31). Attualmente sono quindi gli alimenti prodotti e lavorati in aree contaminate a rappresentare la principale fonte per l'ingestione di piombo attraverso la dieta. Il piombo è quindi presente a basse concentrazioni negli alimenti di origine animale, escluso talvolta il fegato ed i reni di alcune categorie (adulti a fine carriera) di animali da macello e la ghiandola digestiva (epatopancreas) dei Molluschi acquatici, dove invece può essere contenuto a livelli relativamente elevati. L'assorbimento del piombo

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

da parte degli organismi viventi avviene infatti soprattutto per via alimentare, accumulandosi negli organi bersaglio (parenchimi epatico e renale, ma anche nel cervello, nel caso di intossicazioni acute) e depositandosi nelle ossa, sotto forma di trifosfato, nelle esposizioni di tipo cronico. Il meccanismo d'azione tossica del piombo è infatti dovuto alla sua capacità di legarsi con i gruppi sulfidrilici, ma anche alla possibilità di ostacolare il calcio nei meccanismi di scambio ionico così come all'eventualità di disaccoppiare la fosforilazione ossidativa. L'ingestione e l'assorbimento del piombo può costituire quindi un serio rischio per la salute pubblica. I principali effetti derivanti dall'esposizione acuta al piombo sono mal di testa, irritabilità, dolori addominali fino al danno renale. Alcuni effetti cronici da avvelenamento da piombo sono anemia, aumento della pressione sanguigna e malattie cardiovascolari. I più vulnerabili agli effetti neurotossici del piombo sono in particolare i bambini (32), che possono andare incontro a disturbi del comportamento, dell'apprendimento e a difficoltà nella concentrazione (33) e, nei casi di encefalopatie più severe, si possono anche riscontrare confusione o psicosi, mentre i soggetti esposti al piombo per lunghi periodi presentano un deterioramento della memoria, nonché un prolungato tempo di reazione e ridotte capacità di apprendimento (34). La IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classifica infine il piombo e i suoi composti nel "gruppo 2B", quindi come "possibile cancerogeno per l'uomo".

1.1.2 Il cadmio

Il cadmio è l'elemento chimico di numero atomico 48, ha una densità 8,6 g/cm³, un punto di fusione di 321,07 °C e fa parte del 12° gruppo (colonna) e del 5° periodo (riga) della Tavola Periodica degli Elementi (Figura 1).

È un metallo pesante relativamente tenero, bianco-argenteo con riflessi azzurrognoli, che ha come simbolo "Cd" ed il cui nome deriva dal Latino CÀDMIA, a sua volta derivato dal Greco antico KADMEÍA, quindi KADMÍA "càdmia", essendo stato scoperto presente in tracce nella calamina (detta anche "cadamina" o "cadmina"), un minerale prevalentemente composto di ossido di zinco e silice che, originariamente, veniva scavato vicino all'acropoli di Tebe, già detta *Cadmia*, da CÀDMO il fondatore. Il cadmio

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

si trova infatti in bassissima concentrazione nella crosta terrestre, principalmente sotto forma di solfuri misti contenenti anche lo zinco (e, per molti aspetti, il cadmio assomiglia chimicamente molto allo zinco, tendendo però a formare composti più complessi di quest'ultimo). I minerali di cadmio sono pertanto rari e, quando si trovano, se ne possono raccogliere solo piccole quantità. Perciò il cadmio si ricavava generalmente come sottoprodotto dell'estrazione e della raffinazione dello zinco e, in minor misura, del piombo. Sin dall'inizio del secolo scorso è stato prodotto e utilizzato per molteplici applicazioni, leghe e composti. I più importanti composti del cadmio sono rappresentati da: l'ossido di cadmio (CdO , utilizzato nelle batterie e come catalizzatore nell'elettrodeposizione) ed il solfato di cadmio (CdSO_4 , usato come intermedio nell'elettrodeposizione), oltre che il solfuro di cadmio (CdS , utilizzato come pigmento) e lo stearato di cadmio ($\text{Cd}(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO})_2$, utilizzato come stabilizzante di sostanze plastiche). Oggi, anche il suo più recente (e prevalente) impiego nelle pile ricaricabili nickel-cadmio e la sua presenza nei fertilizzanti al fosfato hanno subito nell'Unione Europea una significativa riduzione a seguito dell'implementazione di normative più restrittive. Tuttavia, l'uso industriale che se ne è fatto nel recente passato, cui si aggiunge la permanente fonte costituita dalla contaminazione "naturale" da code minerarie (per altro da siti spesso dismessi), ha portato all'attuale livello di contaminazione di suoli, acque ed alimenti (35). Pur se generalmente a bassissime concentrazioni negli alimenti, come si è prima detto a proposito del piombo, anche il cadmio può però essere presente in (relativamente) alte concentrazioni nel fegato e nei reni degli animali di maggiore età (33) e, soprattutto, nei Molluschi cefalopodi e lamellibranchi. Negli ambienti acquatici, il cadmio si concentra infatti inizialmente nelle alghe (anche macrofite) e soprattutto nel fitoplancton, per concentrarsi quindi nei riferiti Molluschi, ma anche nei Crostacei. A differenza del mercurio, però, il cadmio non dà origine a fenomeni di biomagnificazione, ma solo di bioaccumulo (36) ed è in grado di legarsi a numerosi enzimi, alterandone struttura e funzionalità. Parimenti, i principali effetti tossici rilevabili nell'uomo sono legati all'esposizione cronica per via alimentare (oltre ad essere il cadmio uno degli agenti tossici del fumo di sigaretta), fermo restando che le varie specie ed i diversi gruppi zoologici compresi nei "prodotti della pesca"

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

denotano una diversa sensibilità al cadmio e ciò, ovviamente, può comportare variazioni anche nei fenomeni di bioaccumulo. Nei soggetti non fumatori, quindi, la fonte principale di cadmio è comunque rappresentata dagli alimenti, fermo restando che le quantità residuali varino a seconda del tipo di alimento e che, conseguentemente, l'esposizione individuale sia significativamente influenzata dalle abitudini alimentari.

Il cadmio non riveste alcun ruolo biologico nell'organismo umano e sia esso che i suoi composti sono tossici (29), anche a concentrazioni molto basse, tendendo tra l'altro ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi. Il cadmio plasmatico si lega principalmente ad una classe di proteine contenenti diversi gruppi sulfidrilici, le metallotioneine, per poi essere eliminato attraverso la filtrazione glomerulare e, quindi, essere riassorbito dalle cellule del tubulo prossimale, nelle quali determina la sua specifica tossicità. Data la patogenesi, il bersaglio principale dell'intossicazione cronica da cadmio è rappresentato dal rene, nel quale provoca una tubulopatia, ma va anche detto che, con l'evolversi del quadro patologico, si instauri generalmente anche una cospicua calciuria, che rappresenta il fattore principale dei quadri di osteoporosi e osteomalacia presenti nei soggetti cronicamente esposti al cadmio. La IARC ha inoltre classificato il cadmio nel "gruppo 1", cioè come "cancerogeno per l'uomo".

1.1.3 Il mercurio

Il mercurio è l'elemento chimico di numero atomico 80 ed è uno dei pochi (conservando però le prerogative di essere comunque un metallo e, per l'altro, "pesante") che si presenta liquido a temperatura ambiente. Ha una densità (allo stato liquido) di 13,5 g/cm³ con un punto di fusione di -38,83 °C e fa parte del 12° gruppo (colonna) e del 6° periodo (riga) della Tavola Periodica degli Elementi (**Figura 1**).

Ha un colore argenteo ed il suo nome [dal Latino MERCURIUS, omologo al Greco ERMÈS], si ritiene etimologicamente connesso a MÈRX "merce", riferendosi ad una divinità che presiedeva al commercio e proteggeva i mercanti. Com'è noto, era inoltre il messaggero degli dei e possedeva le ali sia nella testa che nei piedi per portare più velocemente le missive. Tale nome fu poi dato al pianeta più vicino al sole e più veloce e, quindi, dagli alchimisti al più "mobile" e scorrevole dei metalli (detto anche "argento vivo", proprio

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

per la sua mobilità, oltre che per il colore). L'altro nome utilizzato anticamente per indicare il mercurio era quello di idrargirio, o HYDRARGYRUM in Latino, (da cui derivano le lettere del simbolo "Hg"), che a sua volta deriva dal Greco antico HYDRARGYROS, composto da ύδωρ [HÚDOR "acqua"] e άργυρος [ÁRGYROS "argento"], per via del suo aspetto liquido e metallico. Da tale termine deriva infine quello di "idrargirismo", intossicazione cronica da mercurio per l'utilizzo di un suo minerale, il cloruro di mercurio (Hg_2Cl_2), più noto come calomelano (dal Greco antico καλός [KALÒS "bello"] e μέλαρος [MÈLANOS "nero"], perché con il contatto con gli alcali diventava di un bel colore nero) cui si faceva ricorso, tramite fumigazioni, per l'effetto diuretico e purgativo energico e, quindi, come vermifugo. In natura il mercurio si trova raramente come metallo nativo e, fino a tempi recenti, veniva principalmente ottenuto per riduzione del cinabro, detto anche cinnabrite o cinnabarite, un altro suo minerale (solfuro di mercurio, HgS) dall'aspetto rossiccio, anch'esso noto fin nell'antichità (dal Latino CINNÀBARIS e dal Greco antico KINNÀBARIS, derivante verosimilmente dal verbo KINABRÀÔ "puzzare", perché detta sostanza veniva generalmente estratta anche con delle impurità di materiale bituminoso che, bruciando, trasmetteva ai "vapori mercuriali" un odore fetido). Pur essendo un elemento raro nella crosta terrestre, i suoi minerali ne sono invece particolarmente ricchi (si consideri che persino i giacimenti più poveri hanno una concentrazione di mercurio di oltre 10'000 volte maggiore di quella media), a causa di una sua relativa inerzia nel combinarsi con gli altri elementi chimici. Ciò ha fatto del mercurio uno dei metalli meno onerosi da purificare e, per esempio, le miniere del Monte Amiata in Toscana (insieme a quelle Slovene e Algerine) hanno avuto fino agli anni '50 del secolo scorso un ruolo strategico nella produzione mondiale del mercurio. Il mercurio attualmente presente negli ambienti di vita deriva quindi sia da fonti naturali, come le emissioni dalla crosta terrestre (è infatti volatile a temperatura ambiente) in particolare dai siti mercuriferi e dalle eruzioni vulcaniche, e sia da fonti antropiche, come l'industria estrattiva e le emissioni di alcune altre industrie (in particolare da vecchi reparti cloro-soda con celle ad amalgama, ancora funzionanti fino ai primi anni '90 del secolo scorso, nonostante avessero introdotto elementi innovativi rispetto agli impianti del dopoguerra, come l'utilizzo dei cosiddetti anodi inattaccabili e

l'introduzione di modifiche d'impianto alle celle per ridurre le perdite diffuse di mercurio). Il mercurio ha trovato inoltre impiego nella preparazione di prodotti chimici industriali ed in campo elettrico ed elettronico. In tempi recenti veniva per altro usato in un'infinità di strumenti medici e di laboratorio (termometri, sfigmomanometri, barometri, pompe a diffusione, ecc...) per le sue caratteristiche di "liquido opaco" e di "alta densità". Com'è noto, sempre in campo medico, l'amalgama di mercurio con altri metalli è stato lungamente usato per realizzare le otturazioni dentali. Molti di questi e di altri usi comuni del mercurio nel recente passato (compresi quelli di componente negli erbicidi, insetticidi e farmaci), sono stati progressivamente abbandonati per la tossicità del mercurio (33). Nel 2009, in occasione della 25^a riunione del Consiglio direttivo dell'UNEP (*United Nations Environment Programme*), è stato inoltre deciso di sviluppare un accordo mondiale sul mercurio, giuridicamente vincolante, per la cui elaborazione fu istituito un apposito Comitato internazionale. Dopo quattro anni di lavoro, è stata quindi approvata la Convenzione di Minamata sul Mercurio (37), sotto forma di Trattato Internazionale che vincola legalmente le nazioni per la riduzione delle emissioni di questo metallo pesante e che è stato recentemente sottoscritto da 92 Paesi di tutto il mondo, fra cui il nostro.

Il mercurio è infatti un metallo pesante tossico (29) ed è noto da tempo come, a determinate concentrazioni, possa provocare danni al sistema nervoso. Ne troviamo una curiosa testimonianza anche nella letteratura inglese del 18° secolo: la produzione di cappelli di feltro passava allora attraverso un processo chiamato "carroting", che consisteva nell'immersione delle pelli animali in una soluzione di nitrato di mercurio, $Hg(NO_3)_2$, per separare il pelo dalla pelle e compattarlo. La tossicità di tale soluzione e dei suoi vapori causò nei fabbricanti di cappelli moltissimi casi di avvelenamento conclamato, che si manifestava fondamentalmente con sintomi come tremori, instabilità emotiva, insonnia, demenza ed allucinazioni. È perciò verosimile che a tale "evidenza epidemiologica" si ispirasse Carroll (C.L. Dodgson) per il personaggio del Cappellaio Matto in "Alice nel Paese delle Meraviglie" (1865). Quella che attualmente è conosciuta come "malattia di Minamata" (o *Minamata-byō*, 水俣病), dalla già riferita vicenda della contaminazione negli anni '50 della baia di Minamata in Giappone per scarichi

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

industriali contenenti mercurio e che ha provocato nei soggetti esposti danni cronici al cervello (38), è una sindrome complessa che comporta disturbi visivi e sordità, oltre che difetti congeniti gravi (come paralisi cerebrale, corea, atassia, tremori, crisi epilettiche e ritardo mentale) nei nati da donne che si sono trovate esposte durante la gravidanza.

Relativamente al ciclo biogeochimico del mercurio (39) e soprattutto negli ambienti acquatici marini (40), esso viene infatti in gran parte trasformato (41) in metilmercurio (CH_3Hg), la più tossica tra le specie del mercurio che, essendo tra l'altro un composto lipofilo, si accumula negli organismi acquatici (42) e viene biomagnificato lungo tutta la catena alimentare, fino a concentrazioni anche molto alte nei pesci “*top predator*” e di grossa taglia. Si consideri inoltre che la IARC ha classificato il mercurio metallico ed i suoi composti inorganici nel “gruppo 3”, ovvero come “non classificabile quanto alla sua cancerogenicità per l'uomo”, mentre il metilmercurio è incluso nel “gruppo 2B” come “possibile cancerogeno per l'uomo”. Sta tutta qui la ragione delle misure di sorveglianza messe in atto affinché le concentrazioni di metilmercurio negli alimenti di origine ittica debbano essere tenute al livello più basso possibile, tenendo conto del fatto che, essendoci popolazioni (per lo più costiere) che consumano grosse quantità di pesce, queste possano essere pesantemente esposte al metilmercurio e che, per ragioni eco-fisiologiche, determinate specie ittiche possano concentrare il metilmercurio più di altre. Com'è noto, la generalità delle Agenzie sanitarie a livello mondiale raccomanda che anche le donne in gravidanza ed i bambini nella prima fase evolutiva debbano prestare particolare attenzione, evitando o limitando in queste fasi della vita il consumo di pesci potenzialmente molto contaminati, come quelli di alto livello trofico.

1.1.4 L'arsenico

L'arsenico è l'elemento chimico di numero atomico 33, ha una densità di $5,7 \text{ g/cm}^3$, un punto di fusione di $817,2 \text{ °C}$ e fa parte del 15° gruppo (colonna) e del 4° periodo (riga) della Tavola Periodica degli Elementi (Figura 1).

È un metalloide (o un “semimetallo”) che ha come simbolo “As” e che, da un punto di vista chimico, appare molto simile al suo omologo (ovvero all'elemento dello stesso gruppo che immediatamente lo precede come periodo), il fosforo, tant'è che spesso lo

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

può sostituire in alcune reazioni chimiche e, quindi, manifestare la sua tossicità proprio attraverso tale effetto. Il termine “arsenico” [dal Latino ARSENICUM] trae origine dal Greco antico ARSENIKÒN che si ritiene formato su ÀRSEN “maschile” e, come significato figurativo, “robusto, violento” (nell’esegesi dell’Avestā, “il Fondamentale” di Zarathuštra, ARSHAN è infatti “uomo, maschio”) o, sempre dall’arabo-persiano, AZ-ZENĪKH, da cui زرنیک [ZARNIK], che sta ad indicare l’orpimento (o “arsenico giallo”), un minerale a base di solfuro di arsenico (As_2S_3), assai “violento” nel senso di corrosivo. L’arsenico può raramente trovarsi puro in natura, ma più spesso si trova associato ad argento, cobalto, nichel, antimonio e soprattutto ferro e zolfo, essendo l’arsenopirite ($FeSAs$) il più comune minerale dell’arsenico. I suoi composti hanno trovato impiego, anche nel recente passato, come fitofarmaci. In particolare gli arseniati di piombo ($Pb_3(AsO_4)_2$ e $PbHAsO_4$) ed i corrispondenti sali del calcio sono stati usati fino a buona parte del 20° secolo come insetticidi sugli alberi da frutto ed agrofarmaci erbicidi, talvolta con gravi danni neurologici per i lavoratori che lo spargevano sulle colture. Altre fonti di contaminazione sono la produzione di conservanti per il legno (34). Oltre alle forme inorganiche cui si è fatto cenno, l’arsenico può trovarsi in un certo numero di composti organici nell’ambiente: una volta entrato nella catena alimentare acquatica (43), l’arsenico viene infatti progressivamente metabolizzato in forme meno tossiche, partendo da un iniziale processo di metilazione (con l’acido metilarsonico, $CH_3AsO(OH)_2$). L’arsenico è infatti presente nei prodotti della pesca ad elevati livelli di concentrazione, benché principalmente sotto forma di composti organici dell’arsenico (44). Anche le altre forme metilate dell’elemento (per es. l’acido dimetilarsinico o cacodilico, $(CH_3)_2AsO(OH)$ e la trimetilarsina $(CH_3)_3As$) hanno un basso livello di tossicità. Tuttavia, nei pesci l’arsenico si trova prevalentemente (33) sotto forma di arsenobetaina (o 2-trimetilarsonilacetato, $(CH_3)_3AsCH_2CO_2H$) e, residualmente sempre nei pesci, ma più specificamente nei Crostacei, di arsenocolina ($(CH_3)_3As+CH_2CH_2OH$), considerate virtualmente come specie chimiche non tossiche. Nei Molluschi acquatici e nelle alghe l’arsenico è invece principalmente presente come arsenozuccheri, la cui tossicità è meno conosciuta, ma che comunque si ritiene sia ragionevolmente bassa (45). In letteratura sono già disponibili numerosi studi sulla presenza di arsenico in forma organica nei

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

prodotti ittici (46), più scarsa è invece la disponibilità di dati sulla presenza di arsenico inorganico (47), nonostante che le forme inorganiche dell'arsenico presenti negli alimenti, As(III) e As (V), siano quelle da considerarsi molto tossiche (48).

L'arsenico elementare è infatti un "metalloide" che si comporta anche come un "metallo pesante" per via della proprietà tiolo-priva (cioè quella di legarsi ai gruppi sulfidrilici di proteine, enzimi, coenzima A e glutatione ridotto) e, pertanto, viene di solito considerato alla stregua di Piombo, Cadmio e Mercurio. Un'estesa letteratura scientifica ha ormai provato che l'esposizione cronica all'arsenico ha effetti multipli sulla salute umana (29) riducendo le difese antiossidanti dell'organismo (considerato, come si è appena fatto cenno, che l'arsenico ha un'elevata affinità per i gruppi sulfidrilici delle proteine e di metaboliti endogeni come il glutatione) e provocando stress ossidativo direttamente nell'ambiente intracellulare (inattivando diversi enzimi coinvolti nelle reazioni di ossidoriduzione, come le deidrogenasi, le mono-ossigenasi, ecc...). La tossicità dell'arsenico, come si è fatto prima cenno, è inoltre spiegata in termini di "imitazione molecolare": l'arsenato ($H_2AsO_4^-$) imita infatti così bene il fosfato che viene trasportato attraverso le membrane cellulari proprio su trasportatori fosfato; conseguentemente la sua collocazione nei tessuti segue strettamente quella dei fosfati. L'arsenato sa imitare fittiziamente il fosfato endogeno in modo quasi assoluto, tanto che può sostituirlo in diverse sequenze metaboliche fino al "fallimento" dell'imitazione ed al sopraggiungere delle inevitabili conseguenze tossiche. I sintomi di avvelenamento da arsenico sono debolezza, perdita di capelli e perdita di peso. L'esposizione a lungo termine (soprattutto da acqua contaminata con arsenico) provoca un incremento del rischio di sviluppare cancro alla pelle, oltre ad altri danni cutanei come ipercheratosi e modificazioni nella pigmentazione. La IARC classifica infatti l'arsenico ed i suoi composti inorganici nel "gruppo 1", ovvero come "cancerogeno per l'uomo". Sulle base di sufficienti evidenze degli effetti causati dall'acido monometilarsonico e dimetilarsinico su animali da esperimento, entrambi i composti sono classificati nel "gruppo 2B" come "possibili cancerogeni per l'uomo", mentre l'arsenobetaina e altri composti organici che non sono metabolizzati nell'uomo sono inclusi nel "gruppo 3" come "agenti non classificabili per la cancerogenicità nell'uomo".

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

1.2 La valutazione del rischio da esposizione alimentare a piombo, cadmio, mercurio e arsenico nell'Unione Europea

L'obiettivo di assicurare il più alto standard di sicurezza alimentare rappresenta una priorità strategica per l'Unione Europea che, a partire dal “Libro bianco sulla sicurezza alimentare” varato dalla Commissione europea nel 2000, ha consolidato in modo articolato tale obiettivo proponendosi, anche attraverso lo sviluppo di un corpo legislativo che copra tutti gli aspetti della produzione alimentare, di affrontare “*from farm to fork*” tutti i problemi di sicurezza alimentare che partono dalla produzione primaria e si sviluppano fino alla tavola del consumatore. In tale logica, l'adozione di un originario Regolamento (CE) n. 466/2001, che definiva i tenori massimi di taluni contaminanti contenuti nelle derrate alimentari (49), è stata una prima e significativa risposta al forte bisogno di sicurezza espresso dai cittadini. I tenori massimi e l'elenco dei prodotti rappresentavano, così era già scritto, “... un elenco comunitario non esaustivo ...”, che in effetti è stato a più riprese rimaneggiato ed oggi completamente riscritto con una nuova normativa, subentrata con il c.d. “pacchetto igiene”. È del tutto evidente come una delle maggiori preoccupazioni dei consumatori, anche alla luce delle notizie allarmistiche veicolate dai media, risieda nel timore di utilizzare nell'alimentazione prodotti potenzialmente contaminati da sostanze chimiche pericolose per la propria salute e quella dei familiari, in particolare dei bambini. Di tale preoccupazione, indipendentemente dal fatto che alcune di queste sostanze rappresentino un rischio reale, non poteva che farsene pieno carico la stessa Unione Europea, all'interno della nuova cornice della *General Food Law* comunitaria.

Poiché l'esposizione ai contaminanti rappresentati da alcuni metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) tossici, se non può essere evitata, dev'essere per lo meno minimizzata, ne è conseguito che, relativamente alla valutazione del rischio di tali contaminanti negli alimenti e specificamente in quelli ittici (50, 51), laddove possibile (cioè quando si dispone di sufficienti informazioni), in ambito europeo venga stabilita una “dose giornaliera tollerabile”, *Tolerable Daily Intake* (TDI), o più spesso una “dose settimanale tollerabile” provvisoria, *Provisional Tolerable Weekly Intake* (PTWI), per tali sostanze. Si tratta di una stima della quantità media di un contaminante chimico che

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

le persone possono ingerire quotidianamente o settimanalmente nell'arco della vita senza rischi apprezzabili per la salute ed è, generalmente, espressa in mg/kg di peso corporeo al giorno o alla settimana.

Nel 2002-2003, nel quadro consolidato della Cooperazione Scientifica, l'Unione Europea ha pertanto specificamente costituito la Task 3.2.11: “*Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States*” (52), coordinata dal nostro Paese e dalla Svezia. Ciascuno degli Stati Membri (componenti in tale data) ha inviato ai coordinatori i dati nazionali sui livelli di concentrazione di piombo, cadmio, mercurio e arsenico nei diversi alimenti; quindi combinando le concentrazioni medie dei quattro metalli con i dati nazionali sui consumi alimentari, sono state calcolate le assunzioni medie di ciascuno di tali elementi con la dieta per ciascun Paese. I risultati misero in evidenza come i livelli riscontrati di piombo, cadmio e mercurio, trattandosi di sostanze per le quali erano stati stabiliti i “tenori massimi” col citato Regolamento (CE) n. 466/2001, fossero generalmente al di sotto di detti limiti. In particolare, per il piombo l'*intake* giornaliero per la popolazione media adulta nei Paesi Membri era stato stimato pari a 0,042 mg/giorno (0,29 mg/settimana), corrispondente a una media del 17% del PTWI. I risultati indicarono che in undici Stati Membri l'ingestione media di piombo con la dieta era comunque inferiore al 25% del PTWI e che nessuno degli alimenti maggiormente consumati, prodotti ittici compresi, presentava elevati livelli di tale elemento. Per il cadmio l'*intake* giornaliero per la popolazione media adulta nei Paesi Membri risultava inferiore al 30% del PTWI (ad eccezione dell'Olanda, con il 38%). Cereali, frutta e vegetali, carne e pesce risultavano essere le fonti principali di cadmio nella dieta. Fegato e reni animali, Crostacei, Molluschi acquatici (e cefalopodi in particolare) contengono generalmente livelli molto più elevati di cadmio, ma il loro contributo alla assunzione di cadmio complessivamente con la dieta risulta scarso, perché il loro consumo relativo è basso. Anche l'*intake* giornaliero del mercurio totale (mercurio inorganico + metilmercurio) per la popolazione media adulta negli Stati Membri è risultata essere inferiore al 30% del PTWI. I valori di *intake* nei Paesi Membri hanno però spaziato con un intervallo tra 9,6 µg/settimana (dell'Irlanda, con solo 3 categorie alimentari) a 100,7 µg/settimana

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

(del Portogallo, con 4 categorie alimentari), corrispondente rispettivamente all'intervallo tra il 2,5% ed il 28,8% del PTWI del mercurio. I prodotti ittici sono risultati essere la fonte principale di mercurio nella dieta (confermando che i pesci predatori generalmente ne contengono livelli più elevati) e, naturalmente, che il loro contributo è proporzionato al loro consumo nelle diete dei diversi Stati Membri. Relativamente infine all'arsenico, l'*intake* giornaliero derivante dal consumo di pesci e di altri prodotti della pesca è stato stimato al di sotto di 0,35 mg/giorno (<2,5 mg/settimana). I prodotti ittici rappresentavano la fonte principale di arsenico totale nella dieta per la popolazione media adulta (più del 50% dell'*intake* medio, valutato però come fosse arsenico inorganico). Non è stato possibile definire una accurata stima dell'*intake* totale nella maggior parte dei Paesi Membri, anche se i forti consumatori di pesce e di altri prodotti della pesca potevano avere un *intake* di arsenico totale anche maggiore a 1 mg/giorno (>7 mg/settimana).

Erano nel frattempo maturate le condizioni perché venisse istituita l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, o EFSA (*European Food Safety Authority*) e, sempre agli effetti del Regolamento (CE) n. 178/2002 ed in particolare dell'articolo 28, comma 4 lettera g, si costituì al suo interno il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (o "*Panel on Contaminants in the Food Chain*"), denominato più semplicemente con la sigla CONTAM (53), che ha iniziato la produzione di pareri scientifici a partire dal 2004, ricevendo diverse richieste dalla Commissione europea sul *Risk Assessment* di piombo, cadmio, mercurio e arsenico nei prodotti alimentari.

Proprio sui possibili rischi per la salute relativi alla presenza di piombo negli alimenti, il Panel CONTAM dell'EFSA ha pubblicato un parere nel 2010, aggiornandolo (54) di recente. Partendo dal presupposto che il piombo sia un contaminante ambientale che si trova sia in natura e sia come risultato di attività umane quali l'estrazione mineraria, il gruppo di esperti ha concluso che gli attuali livelli di esposizione al piombo costituiscono un rischio basso o trascurabile per la salute della maggior parte degli adulti, ma che esistono potenziali preoccupazioni, in particolare per quanto riguarda gli effetti sullo sviluppo neurologico di feti, neonati e bambini. Già precedentemente a tale parere, ovvero nel 2009, sempre il Panel CONTAM dell'EFSA aveva effettuato anche

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

una prima valutazione del rischio da cadmio presente negli alimenti (55), considerato che per la popolazione nel suo complesso (fatta eccezione per i fumatori) la fonte principale di esposizione al cadmio è rappresentata proprio dagli alimenti, stabilendo una TWI di 2,5 µg/kg di peso corporeo (p.c.). A seguito di una valutazione del cadmio svolta dal *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants* (JECFA), il gruppo CONTAM nel 2011 ha nuovamente valutato (56) la TWI per il cadmio, confermando come quella di 2,5 µg/kg p.c. fosse appropriata. Anche con le conclusioni al rinnovato parere, il gruppo CONTAM ha ribadito come sia improbabile che si possano verificare effetti nocivi sul singolo individuo con l'esposizione dietetica corrente, ma come vi fosse comunque la necessità di ridurre l'esposizione al cadmio a livello della popolazione in generale, così come ha ulteriormente ribadito direttamente l'EFSA con un proprio report scientifico del 2012 (57) sull'esposizione alimentare al cadmio. Sempre nel 2012, il Panel CONTAM dell'EFSA ha anche aggiornato il proprio parere scientifico sul mercurio negli alimenti (58), stabilendo TWIs delle principali forme di mercurio negli alimenti: metilmercurio e mercurio inorganico. Considerato che il metilmercurio rappresenta la forma prevalente di mercurio nei pesci e negli altri prodotti della pesca e che è particolarmente tossico per il sistema nervoso in fase di sviluppo, il gruppo di esperti CONTAM ha esaminato nuove informazioni scientifiche riguardo alla tossicità di tale forma del mercurio e ha quindi stabilito una TWI per il metilmercurio di 1,3 µg/kg p.c., inferiore al valore fissato dal JECFA (che è di 1,6 µg/kg p.c.). Considerato infine che l'arsenico è un contaminante largamente diffuso, sia in natura che come prodotto dell'attività umana, e che i prodotti alimentari sono la principale fonte di esposizione per la popolazione europea in generale, il panel CONTAM dell'EFSA aveva già adottato nel 2009 e poi aggiornato (59) un parere sulla presenza di arsenico negli alimenti. Tale parere è incentrato principalmente sull'arsenico inorganico (che è la forma più tossica dell'arsenico) ed il gruppo di esperti ha raccomandato di ridurre l'esposizione all'arsenico inorganico. Tuttavia lo stesso gruppo di esperti scientifici ha anche evidenziato notevoli incertezze in relazione alla valutazione del rischio da tale sostanza, sottolineando la necessità di poter disporre di un maggior numero di dati sui livelli di arsenico organico ed inorganico in vari alimenti.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

1.3 Il quadro normativo dell'Unione Europea e le procedure ufficiali di campionamento ed analisi

I principi base della legislazione comunitaria sui contaminanti negli alimenti sono originariamente contenuti nel Regolamento (CEE) n. 315/93 (60) che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari, successivamente aggiornato con le integrazioni apportate dal Regolamento (CE) n. 1882/2003 (61) che, all'allegato III punto 34 (per le finalità di contestualizzazione della pre-esistente disciplina al nuovo scenario normativo generato dalla *General Food Law*), ha precisato come la Commissione Europea debba da quel momento essere "assistita dal Comitato Permanente per la Catena Alimentare (...) istituito dall'articolo 58 del regolamento (CE) n. 178/2002", anche per poter "stabilire le tolleranze massime eventualmente necessarie per contaminanti specifici", nel rispetto delle procedure introdotte dal Regolamento (CE) n. 596/2009 (62), confermando che "tali tolleranze sono adottate sotto forma di elenchi comunitari non esaurienti", nei quali è previsto che ai "valori massimi per gli stessi contaminanti a seconda dei diversi prodotti alimentari" corrisponda "il metodo di campionamento e di analisi da applicare". Viene quindi dato corso a tale previsione generale, sempre per quanto attiene l'indicazione dei "tenori massimi" o *Maximum Levels* (ML), con il Regolamento (CE) n. 1881/2006 (63) che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, tra i quali i metalli pesanti, in elenco nella Parte 3 dell'Allegato, così come specificamente modificato dal Regolamento (CE) n. 629/2008 (64) e dal Regolamento (UE) n. 420/2011 (65). Per quanto attiene i metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di tali metalli, viene inoltre data applicazione alla previsione comunitaria generale con lo specifico Regolamento (CE) n. 333/2007 (66), così come modificato dal Regolamento (UE) n. 836/2011 (67). Infine, essendo l'aspetto analitico del controllo ufficiale degli alimenti disciplinato dall'articolo 12, comma 2 lettera a, del Regolamento (CE) n. 882/2004, con il quale è richiesta la conformità alle norme della serie EN ISO/IEC 17025 (68), i laboratori preposti a questa attività devono necessariamente dedicare adeguate risorse e predisporre le necessarie procedure operative al fine di garantire la qualità dell'intero iter analitico e, quindi, la stessa affidabilità del dato

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

analitico, anche per il suo utilizzo in ambito legale. La normativa comunitaria ha, al momento, stabilito gli ML nei prodotti della pesca relativamente al piombo, al cadmio ed al mercurio (**Tabella 1**), ma, pur essendo un tema dibattuto da tempo a livello internazionale (69), l'Unione Europea non ha ancora stabilito quelli relativi all'arsenico.

Tabella 1: stralcio dell'Allegato al Regolamento (CE) n. 1881/2006 (Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari) - Parte 3: Metalli

Prodotti alimentari		Tenori massimi (mg/kg di peso fresco)
3.1	Piombo	
3.1.5	Muscolo di pesce ^{(24) (25)}	0,30
3.1.6 ^(**)	Crostacei ⁽²⁶⁾ : muscolo delle appendici e dell'addome ⁽⁴⁴⁾ . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) muscolo delle appendici.	0,50
3.1.7	Molluschi bivalvi ⁽²⁶⁾	1,5
3.1.8	Cefalopodi (senza visceri) ⁽²⁶⁾	1,0
3.2	Cadmio	
3.2.5	Muscolo di pesce ^{(24) (25)} , escluse le specie elencate nei punti 3.2.6, 3.2.7 e 3.2.8	0,050
3.2.6	Muscolo di pesce dei seguenti pesci ^{(24) (25)} : palamita (<i>Sarda sarda</i>) sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>) anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) cefalo (<i>Chelon labrosus</i>) suro o sugarello (<i>Trachurus species</i>) luvaro o pesce imperatore (<i>Luvarus imperialis</i>) sgombro (<i>Scomber species</i>) sardina (<i>Sardina pilchardus</i>) sardine del genere <i>Sardinops</i> (<i>Sardinops species</i>) tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>) sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,10
3.2.7	Muscolo di pesce dei seguenti pesci ^{(24) (25)} : tombarello (<i>Auxis species</i>)	0,20
3.2.8	Muscolo di pesce dei seguenti pesci ^{(24) (25)} : acciuga (<i>Engraulis species</i>) pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>)	0,30
3.2.9 ^(**)	Crostacei ⁽²⁶⁾ : muscolo delle appendici e dell'addome ⁽⁴⁴⁾ . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) muscolo delle appendici	0,50
3.2.10 ^(*)	Molluschi bivalvi ⁽²⁶⁾	1,0
3.2.11 ^(*)	Cefalopodi (senza visceri) ⁽²⁶⁾	1,0

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

3.3	Mercurio	
3.3.1 (**)	Prodotti della pesca ⁽²⁶⁾ e muscolo di pesce ^{(24) (25)} , escluse le specie elencate al punto 3.3.2. Il tenore massimo nei crostacei si applica al muscolo delle appendici e dell'addome ⁽⁴⁴⁾ . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) si applica al muscolo delle appendici	0,50
3.3.2 (*)	Muscolo di pesce dei seguenti pesci ^{(24) (25)} : rana pescatrice (<i>Lophius species</i>) pesce lupo (<i>Anarhichas lupus</i>) palamita (<i>Sarda sarda</i>) anguilla (<i>Anguilla species</i>) pesce specchio (<i>Hoplostethus species</i>) pesce topo (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) ippoglosso (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) abadecco del Sudafrica (<i>Genypterus capensis</i>) marlin (<i>Makaira species</i>) rombo del genere <i>Lepidorhombus</i> (<i>Lepidorhombus species</i>) triglia (<i>Mullus species</i>) abadecco (<i>Genypterus blacodes</i>) luccio (<i>Esox lucius</i>) palamita bianca (<i>Orcynopsis unicolor</i>) cappellano (<i>Trisopterus minutus</i>) squalo portoghese (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) razze (<i>Raja species</i>) scorfano del genere <i>Sebastes</i> (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>) pesce vela del Pacifico (<i>Istiophorus platypterus</i>) pesce sciabola (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) pagello (<i>Pagellus species</i>) squali (tutte le specie) tirsite (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>) storione (<i>Acipenser species</i>) pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>) tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	1,0

(24) Per il pesce indicato in questa categoria, si rimanda alla definizione di cui alla categoria a), escluso il fegato di pesce classificato con codice NC 0302 70 00, dell'elenco dell'articolo 1 del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio (GU L 17 del 21.1.2000, pag. 22.)

(25) Qualora i pesci siano destinati ad essere consumati per intero, il tenore massimo si applica all'intero pesce.

(26) Prodotti alimentari rientranti, a seconda dei casi, nelle categorie c) e f) dell'elenco di cui all'articolo 1 del regolamento (CE) n. 104/ 2000 (specie elencate nella voce pertinente).

(44) Questa definizione esclude il cefalotorace dei crostacei.

(*) Punto così modificato dal Regolamento (CE) n. 629/2008.

(**) Punto così modificato dal Regolamento (CE) n. 420/2011.

Per la determinazione del contenuto di metalli pesanti e metalloidi nei prodotti della pesca, già la varietà ed eterogeneità delle matrici da esaminare (70) richiede l'adozione di procedure relativamente più complesse, a partire dal campionamento. Infatti, le proprietà reologiche di tali prodotti sono, come si è detto, estremamente diversificate tra i diversi gruppi zoologici e un'attenta valutazione di una serie di altre variabili, sia biologiche che ecologiche (71), risulta spesso decisiva per la predisposizione di un corretto piano di campionamento. Il richiamato Regolamento (CE) 333/2007 (66), nella Parte A (Definizioni) del suo Allegato, introduce innanzitutto una serie di definizioni necessarie per la descrizione dei criteri di campionamento. Viene definita "partita": «un quantitativo identificabile di prodotto alimentare, oggetto di un'unica consegna e per il quale il funzionario accerta la presenza di caratteristiche comuni (quali l'origine, la varietà, ecc ...)», precisando in conclusione (e non è un caso!) che «Nel caso del pesce, devono essere comparabili anche le dimensioni». Al punto B.2.3. (Modalità specifiche di prelievo dei campioni di partite contenenti pesci grandi che arrivano in partite di grandi dimensioni) è inoltre specificato che: «Se la partita o sottopartita sottoposta a campionamento contiene pesci di grandi dimensioni (pesci individuali con peso superiore a circa 1 kg) e la partita o sottopartita pesa più di 500 kg, il campione elementare consiste della parte centrale del pesce». Nel caso il campionamento non fosse invece legato al controllo ufficiale, ma venisse svolto nell'ambito di attività di monitoraggio e ricerca, dovranno comunque essere adottati i criteri generali finalizzati ad assicurare la rappresentatività del campione. Le modalità di campionamento sono però stavolta determinate dalle finalità dell'indagine e la loro pianificazione richiede uno studio preliminare che tenga conto di tutte le variabili bio-ecologiche implicate. Queste, come si è detto, possono influenzare significativamente la variabilità del contenuto di metalli pesanti (e metalloidi) negli organismi acquatici da esaminare (72). Tra le variabili più importanti dobbiamo considerare:

- la specie;
- il sesso;
- la fase del ciclo vitale e la stagione;
- il peso/dimensioni e l'età.

Come esempio possono essere richiamate le condizioni di campionamento di Molluschi bivalvi e gasteropodi eduli da diversi siti per confrontarne il contenuto in metalli pesanti quali piombo e cadmio: è infatti noto come la loro concentrazione nei tessuti molli di tali organismi sia legata alla stagione ed al peso corporeo. Considerazioni analoghe si possono fare per la determinazione dei livelli di mercurio nei pesci: anche in questo caso, negli studi comparativi, la variabile “dimensione degli esemplari” (ovvero, correlativamente “peso” ed “età”) deve essere sempre considerata nella predisposizione dei piani di campionamento, esattamente come è stato precisato in norma nel caso dell’espletamento dei controlli ufficiali. Nel campionamento di prodotti della pesca occorre tenere presente, oltre alla variabilità tra gli individui legata a fattori bio-ecologici, anche la variabilità all’interno del singolo organismo, dovuta a fenomeni di distribuzione compartimentata dell’elemento nei tessuti. In alcuni casi le differenze di concentrazione possono essere anche notevoli: si pensi all’accumulo del cadmio nel fegato dei pesci o nell’omologa ghiandola digestiva (epatopancreas) dei Molluschi o, infine, nella “polpa scura” dei Crostacei. Trattandosi di matrici alimentari solide, i campioni vengono generalmente sottoposti ad un procedimento di digestione ossidativa, ricorrendo ad acidi concentrati. Sono comunque possibili varie opzioni per la digestione dei campioni (73), ma il procedimento attualmente più in uso è la mineralizzazione in recipienti chiusi ad alta pressione mediante l’impiego di forni a microonde. Per la determinazione strumentale dei quattro analiti considerati, vi sono diverse tecniche idonee allo scopo (74, 75) e, tra le principali, cui si ricorre a seguito di diversi metodi di pre-trattamento del campione di prodotti della pesca (76) troviamo: la spettrofotometria di “assorbimento atomico”, *Atomic Absorption Spectroscopy* o AAS, con fornetto di grafite (77), o con generazione di idruri, *Hydride Generation AAS* (78), o ancora a vapori freddi, *Cold Vapor AAS* (79). Oltre ai metodi di assorbimento atomico, i laboratori d’analisi si stanno da tempo orientando all’utilizzo della spettroscopia di “emissione atomica” con sorgente al plasma, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy* o ICP-OES (80) e, infine, della “spettrometria di massa” anch’essa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* o ICP-MS (81) anche per l’ampio ventaglio possibile di analisi multi-

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

elemento. Qualunque sia il metodo analitico impiegato per la determinazione di piombo, cadmio, mercurio e arsenico, è opportuno che questo sia validato (82) e, comunque, che soddisfi i criteri di prestazione di cui al punto C.3.3.1 dell'Allegato al richiamato Regolamento (CE) n. 333/2007 (66), così come modificato dal Regolamento (UE) n. 836/2011 (67). Ciò che si è finora brevemente rappresentato è però relativo alla preparativa per la determinazione del contenuto totale degli elementi considerati, mentre nel caso delle analisi di speciazione, sempre più raccomandate per lo svolgimento di una completa valutazione del rischio (83), le procedure di trattamento del campione differiscono sostanzialmente (84). In quest'altro caso, lo scopo della preparativa è la rimozione della matrice organica senza produrre alterazioni delle specie chimiche presenti, cui fa seguito la purificazione, la separazione e la pre-concentrazione delle stesse in vista della successiva quantificazione. Il primo obiettivo viene solitamente raggiunto mediante estrazione con solventi organici o acidi, mentre per separazione e pre-concentrazione si ricorre all'utilizzo di tecniche cromatografiche. Numerosi metodi sono stati proposti in letteratura, in particolare riferiti agli elementi di specifico interesse come la speciazione di metilmercurio/mercurio-totale e di arsenico-inorganico/arsenico-totale (85) sulle matrici alimentari ittiche ed è in atto, anche a livello di ricerca europea, l'individuazione di protocolli accettati e validati a livello internazionale. L'attenzione attuale degli Istituti di ricerca è rivolta soprattutto allo sviluppo e al perfezionamento di metodi basati sull'utilizzo di tecniche combinate online, in particolare dell'accoppiamento tra "cromatografia liquida ad alta pressione", *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), e ICP-MS (78, 86). Come esempio di trattamento del campione in questo ambito può essere opportunamente citata la speciazione dell'arsenico nei prodotti della pesca. Le specie chimiche che (tutte o in parte) vengono identificate in questa categoria alimentare sono quelle inorganiche (As(III), As(V)) da un lato (ed eventualmente quelle metilate) e, dall'altro, gli altri composti organici come l'arsenobetaina, l'arsenocolina e gli arsenozuccheri. Come si è detto, infatti, le specie inorganiche (e residualmente quelle metilate) sono le più importanti dal punto di vista tossicologico, mentre le altre specie organiche (complessivamente predominanti nei prodotti ittici) presentano tossicità debole o trascurabile.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

1.4 Bibliografia relativa al presente Capitolo

- (1) Eisler R. 2010. Elasmobranchs. Chapter 2: 7-38. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 2: Vertebrates. Elsevier BV [pagg. 500]
- (2) Eisler R. 2010. Fishes. Chapter 3: 39-220. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 2: Vertebrates. Elsevier BV [pagg. 500]
- (3) Eisler R. 2010. Coelenterates. Chapter 5: 123-142. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 1: Plants and invertebrates. Elsevier BV [pagg. 610]
- (4) Eisler R. 2010. Molluscs. Chapter 6: 143-398. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 1: Plants and invertebrates. Elsevier BV [pagg. 610]
- (5) Eisler R. 2010. Crustaceans. Chapter 7: 399-516. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 1: Plants and invertebrates. Elsevier BV [pagg. 610]
- (6) Eisler R. 2010. Echinoderms. Chapter 11: 553-582. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 1: Plants and invertebrates. Elsevier BV [pagg. 610]
- (7) Eisler R. 2010. Tunicates. Chapter 12: 583-598. In “Compendium of trace metals and marine biota” - Volume 1: Plants and invertebrates. Elsevier BV [pagg. 610]
- (8) Regolamento (CE) n. 853/2004 [del Parlamento e del Consiglio] del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale - G.U.C.E. 30/04/2004, L 139: 55-205
- (9) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on a request from the European Parliament related to the safety assessment of wild and farmed fish. *EFSA Journal* 2005; 236 (Question No EFSA-Q-2004-22) [pagg. 118]
- (10) Mozaffarian D, Rimm EB. 2006. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the Risks and the Benefits. *JAMA* 296(15): 1885-1899
- (11) Vahter M, Berglund M, Åkesson A, Lidén C. 2002. Metals and Women’s Health. *Environ Res - Section A* 88: 145-155
- (12) Brender JD, Suarez L, Felkner M, Gilani Z, Stinchcomb D, Moody K, Henry J, Hendricks K. 2006. Maternal exposure to arsenic, cadmium, lead, and mercury and neural tube defects in offspring. *Environ Res* 101: 132-139
- (13) De Burbure C, Buchet JP, Leroyer A, Nisse C, Haguenoer JM, Mutti A, Smerhovský Z, Cikrt M, Trzcinka-Ochocka M, Razniewska G, Jakubowski M,

- Bernard A. 2006. Renal and neurologic effects of Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environ Health Persp* 114: 584-590
- (14) Castro-González MI, Méndez-Armenta M. 2008. Heavy metals: implications associated to fish consumption. *Environ Toxicol Phar* 26: 263-271
- (15) Vicente-Martorell JJ, Galindo-Riaño MD, García-Vargas M, Granado-Castro MD. 2009. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *J Hazard Mater* 162(2-3): 823-836
- (16) Rainbow PS. 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australas J Ecotox* 12: 107-122
- (17) Neff JM. 2002. Bioaccumulation mechanisms. Chapter 2: 37-56. In “Bioaccumulation in Marine Organisms”. Elsevier Ltd [pagg. 468]
- (18) Stergiou KI, Karpouzi VS. 2002. Feeding habits and trophic levels of Mediterranean fish. *Rev Fish Biol Fisher* 11: 217-254
- (19) Jaworski JF, Lindberg S, Hutton M, Buat-Menard P et al. 1987. Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the environment. Scope 31. TC Hutchinson and KM Meema Ed. [pagg. 68]
- (20) Wang WX. 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains (Review). *Mar Ecol Prog Ser* 243: 295-309
- (21) Peakall D, Burger J. 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotox Environ Safe* 56: 110-121
- (22) Vieira C, Morais S, Ramos S, Delerue-Matos C, Oliveira MBPP. 2011. Mercury, cadmium, lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: Intra- and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food Chem Toxicol* 49: 923-932
- (23) Olmedo P, Pla A, Hernández AF, Barbier F, Ayouni L, Gil F. 2013. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ Internat* 59: 63-72
- (24) Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta*

Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96 [pagg. 373]

- (25) Direttiva 2006/113/CE [del Parlamento e del Consiglio] del 12 dicembre 2006 relativa ai requisiti di qualità delle acque destinate alla molluschicoltura - G.U.C.E. 27/12/2006, L 376: 14-20
- (26) Concas A, Ardaù C, Cristini A, Zuddas P, Cao G. 2006. Mobility of heavy metals from tailings to stream waters in a mining activity contaminated site. *Chemosphere* 63: 244-253
- (27) Boni M, Costabile S, De Vivo B, Gasparri M. 1999. Potential environmental hazard in the mining district of southern Igesiente (SW Sardinia, Italy). *J Geochem Explor* 67: 417-430
- (28) APAT – Servizio Geologico d’Italia. 2006. Cartografia geochemica ambientale e carte d’intervento per l’uso del territorio della Sardegna meridionale. Carta Geologica d’Italia - B. De Vivo Ed, Volume LXIX: 5-38
- (29) Morais S, Garcia e Costa F, De Lourdes Pereira M. 2012. Heavy metals and human health. Chapter 10: 227-246. In “Environmental Health - Emerging Issues and Practice”. J. Oosthuizen Ed. [pagg. 324]
- (30) Neff JM. 2002. Lead in the oceans. Chapter 9: 161-173. In “Bioaccumulation in Marine Organisms”. Elsevier Ltd [pagg. 468]
- (31) Pokras MA, Kneeland MR. 2008. Lead poisoning: using transdisciplinary approaches to solve an ancient problem. *Ecohealth* 5(3): 379-385
- (32) Lidsky TI, Schneider JS. 2003. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain* 126: 5-19
- (33) Protasowicki M. 2005. Heavy metals. Chapter 10: 232-244. In “Toxins in Food”. WM Dabrowski & ZE Sikorski Ed. [pagg. 335]
- (34) Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit Med Bull* 68: 167-182
- (35) Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. 2010. Cadmium, Environmental Exposure and Health Outcomes. *Environ Health Persp* 118(2): 182-190
- (36) Neff JM. 2002. Cadmium in the oceans. Chapter 5: 89-102. In “Bioaccumulation in Marine Organisms”. Elsevier Ltd [pagg. 468]
- (37) UNEP. 2013. The Minamata Convention for Mercury (Global Treaty to protect

human health and the environment from the adverse effects of mercury). Agreed at the fifth and final session of the Intergovernmental Negotiating Committee in Geneva, 19.01.2013 [pagg. 30]

- (38) Harada M. 1995. Minamata Disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25(1): 1-24
- (39) Selin NE. 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: a review. *Annu Rev Environ Resour* 34:43–63
- (40) Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR. 2007. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. *Chem Rev* 107: 641-662
- (41) Jackson TA. 1998. Mercury in aquatic ecosystems. Chapter 5: 77-158. In “Metal metabolism in aquatic environments”. *Ecotox Series 7* - Chapman & Hall [pagg. 438]
- (42) Neff JM. 2002. Mercury in the oceans. Chapter 6: 103-130. In “Bioaccumulation in Marine Organisms”. Elsevier Ltd [pagg. 468]
- (43) Neff JM. 2002. Arsenic in the oceans. Chapter 3: 57-78. In “Bioaccumulation in Marine Organisms”. Elsevier Ltd [pagg. 468]
- (44) Edmonds JS, Francesconi KA. 1998. Arsenic metabolism in aquatic ecosystems. Chapter 6: 159-184. In “Metal Metabolism in Aquatic Environments”. *Ecotoxicology Series 7* - Chapman & Hall [pagg. 438]
- (45) Borak J, Hosgood HD. 2007. Seafood arsenic: Implications for human risk assessment. *Regul Toxicol Pharm* 47: 204-212
- (46) Rahman MA, Hasegawa H, Lim RP. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain (Review). *Environ Res* 116: 118-135
- (47) Moreda-Piñeiro J, Alonso-Rodríguez E, Romarís-Hortas V, Moreda-Piñeiro A, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D, Bermejo-Barrera P. 2012. Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples. *Food Chem* 130: 552-560
- (48) Francesconi KA. 2010. Arsenic species in seafood: origin and human health implications. *Pure Appl Chem* 82(2): 373-381
- (49) Biagi G, Nannipieri S, Signorini G. 2003. Contaminazione e fattori ambientali.

- Disposizioni comunitarie (*Pollution and environmental factors. European rules*).
Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria (ISSN 0365-4729), LVI/20: 241-256
- (50) Falcó G, Llobet JM, Bocio A, Domingo JL. 2006. Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *J Agric Food Chem* 54: 6106-6112
- (51) Storelli MM, Barone G. 2013. Toxic metals (Hg, Pb, and Cd) in commercially important demersal fish from Mediterranean Sea: Contamination Levels and Dietary Exposure Assessment. *J Food Sci* 78(2): 362-366
- (52) Reports on tasks for scientific cooperation Report of experts participating in Task 3.2.11. Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States. Directorate General Health and Consumer Protection (March 2004) [pagg. 125]
- (53) Capelli F, Silano V, Klaus B. 2006. Funzioni, compiti, Organi e competenze dell'EFSA. Comitato scientifico e Gruppi di esperti scientifici. Sez. III, Cap. 1, par. 4: 361-363. In "Nuova disciplina del settore alimentare e Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare", Giuffrè Editore [pagg. 599]
- (54) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on lead in food. *EFSA Journal* 2010; 8(4): 1570 (published on 22 March 2013, replaces the earlier version published on 20 April 2010) [pagg. 151]
- (55) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on cadmium in food. *EFSA Journal* 2009; 980 (Question No EFSA-Q-2007-138) [pagg. 139]
- (56) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal* 2011; 9(2): 1975 (Question No EFSA-Q-2010-01008) [pagg. 19]
- (57) EFSA Scientific Report of European Food Safety Agency. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 2012; 10(1): 2551 (Question No EFSA-Q-2011-01249) [pagg. 37]
- (58) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on statement on the risk for public health related to the presence of mercury and

- methylmercury in food. EFSA Journal 2012; 10(12): 2985 (Question No EFSA-Q-2011-00923) [pagg. 241]
- (59) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on arsenic in food. EFSA Journal 2009; 7(10): 1351 (published on 1 February 2010, replaces the earlier version published on 22 October 2009) [pagg. 199]
- (60) Regolamento (CEE) n. 315/93 [del Consiglio] dell'8 febbraio 1993 che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 13/02/1993, L 37: 1-3
- (61) Regolamento (CE) n. 1882/2003 [del Parlamento e del Consiglio] del 29 settembre 2003 recante adeguamento alla decisione 1999/468/CE del Consiglio delle disposizioni relative ai comitati che assistono la Commissione nell'esercizio delle sue competenze (...) - G.U.C.E. 31/10/2003, L 284: 1-53
- (62) Regolamento (CE) n. 596/2009 [del Parlamento e del Consiglio] del 18 giugno 2009 che adegua (...) determinati atti soggetti alla procedura di cui all'articolo 251 del trattato, per quanto riguarda la procedura di regolamentazione con controllo - G.U.C.E. 18/07/2009, L 188: 14-92
- (63) Regolamento (CE) n. 1881/2006 [della Commissione] del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 20/12/2006, L 364: 5-24
- (64) Regolamento (CE) n. 629/2008 [della Commissione] del 2 luglio 2008 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 03/07/2008, L 137: 6-9
- (65) Regolamento (CE) n. 420/2011 [della Commissione] del 29 aprile 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 30/04/2011, L 111: 3-6
- (66) Regolamento (CE) n. 333/2007 [della Commissione] del 28 marzo 2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 29/03/2007, L 88: 29-38
- (67) Regolamento (CE) n. 836/2011 [della Commissione] del 19 agosto 2011 che

- modifica il regolamento (CE) n. 333/2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 20/08/2011, L 215: 9-16
- (68) Regolamento (CE) n. 882/2004 [del Parlamento e del Consiglio] del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali - G.U.C.E. 30/04/2004, L 165: 1-77
- (69) Larsen EH, Berg T. 2001. Trace element speciation and international food legislation – a Codex Alimentarius Position Paper on arsenic as a contaminant. Chapter 17: 251-260. In “Trace element speciation for environment, food and health”. *Roy Soc Ch* [pagg. 403]
- (70) Oehlenschläger J. 2010. Importance of analysis in seafood and seafood products, variability and basic concepts. Chapter 1: 3-10. In “Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis”. Taylor & Francis Group [pagg. 910]
- (71) DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat Toxicol* 84: 236-246
- (72) Jakimska A, Konieczka P, Skóra K, Namieśnik J. 2011. Bioaccumulation of metals in tissue of marine animals (*part I*: the role and impact of heavy metals on organisms) and (*part II*: metal concentration in animal tissue). *Pol J Environ Stud* 20(5): 1117-1125 and 1127-1146
- (73) Ashoka S, Peake BM, Bremner G, Hageman KJ, Reid MR. 2009. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Anal Chim Acta* 653(2): 191-199
- (74) Capar SG, Mindak WR, Cheng J. 2007. Analysis of food for toxic elements (Review). *Anal Bioanal Chem* 389:159-169
- (75) Locatelli C. 2008. Metals. Chapter 16: 571-598. In “Food contaminants and residue analysis”. *Compr Anal Chem*, Vol. 51. Wilson & Wilson – Elsevier [pagg. 821]
- (76) Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A. 2001. Sample pre-

- treatment methods for the trace elements determination in seafood products by atomic absorption spectrometry. *Talanta* 57(5): 969-984;
- (77) Jorhem L, Engman J. 2000. Determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL collaborative study. *JAOAC Int* 83: 1189-1203
- (78) Francesconi KA, Kuehneit D. 2004. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* 129: 373-395
- (79) Perring L, Andrey D. 2001. Optimization and validation of total mercury determination in food products by cold vapor AAS: comparison of digestion methods and with ICP-MS analysis. *Atom Spectrosc* 22(5): 371-378
- (80) Sen I, Shandil A, Shrivastava VS. 2011. Study for determination of heavy metals in fish species of the River Yamuna (Delhi) by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). *Adv Appl Sci Res* 2(2): 161-166
- (81) Chamberlain I, Adams K, Le S. 2000. ICP-MS Determination of Trace Elements in Fish. *Atom Spectrosc* 21(4): 118-122
- (82) Thompson M, Ellison SLR, Wood R. 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 74: 835-855
- (83) Francesconi KA. 2007. Toxic metal species and food regulations making a healthy choice. *Analyst* 132, 17-20
- (84) Van Dael P. 2001. Trace element speciation in food: a tool to assure food safety and nutritional quality. Chapter 15: 232-240. In "Trace element speciation for environment, food and health". *Roy Soc Ch* [pagg. 403]
- (85) Baer I, Baxter M, Devesa V, Vélez D, Raber G, Rubio R, Llorente-Mirandes T, Sloth JJ, Robouch P, De La Calle B. 2011. Performance of laboratories in speciation analysis in seafood - Case of methylmercury and inorganic arsenic. *Food Control* 22: 1928-1934
- (86) Vallant B, Kadnar R, Goessler W. 2007. Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection. *J Anal At Chem* 22: 322-325

2. I contributi alla ricerca in 9 steps: dall'utilizzo di specie "sentinella" per il monitoraggio in aree costiere, all'analisi dei dati correnti di sorveglianza generati dal controllo ufficiale dei prodotti della pesca

È possibile ricorrere a varie metodologie d'indagine per la valutazione del rischio sanitario, oltre che ambientale, legato ai contaminanti nei prodotti della pesca, tuttavia, sotto il profilo generale sono fondamentalmente due gli approcci praticabili:

- lo sviluppo di studi di popolazioni animali acquatiche, ancora meglio se appartenenti a specie edibili e oggetto di pesca o raccolta, attraverso campionamenti analitici *ad hoc*, finalizzati e rappresentativi di aree marino-costiere ed ecosistemi esposti al rischio di contaminazione da metalli pesanti e metalloidi (1);
- l'analisi ai fini epidemiologico-informativi (ovviamente, sotto il profilo della esposizione al rischio) delle banche-dati di lungo periodo relative a determinazioni analitiche svolte per varie altre finalità (per es. di monitoraggio/sorveglianza, ma in genere legate ai controlli ufficiali per la verifica puntuale della conformità di tali prodotti ai limiti di legge) su prodotti della pesca già immessi in commercio (2).

Relativamente al primo approccio, si parte dal presupposto che gli animali, sia domestici che selvatici, siano ovviamente esposti al pari dell'uomo agli stessi contaminanti presenti nell'aria, nel suolo, nell'acqua ed in tutto ciò che ciascuna specie animale assume come alimento nel dipanarsi della catena trofica. Gli animali possono offrire quindi, attraverso lo studio degli effetti biologici e sanitari, anche limitati al rilievo di condizioni pre-patologiche com'è il caso del bio-accumulo, un modello (diretto o indiretto) per la stima del rischio per la salute umana (3). Le popolazioni animali naturalmente esposte a contaminanti nei loro ambienti ed i cui dati possono essere raccolti (meglio se con sistematicità) ed analizzati regolarmente, sono com'è noto definiti "sistemi sentinella animali" ed essere utilizzati, con buona *Evidence-Based* (4), per l'identificazione (e poi il monitoraggio) di un'ampia varietà di contaminanti ambientali, pericolosi per le diverse specie animali, per gli ecosistemi e, sia per esposizione diretta che indiretta, per la salute umana (5). Gli animali possono infatti monitorare ogni tipo di ambiente, sia antropizzato che naturale e, tra questi, sia ecosistemi terrestri che acquatici, consentendone un'osservazione nella loro globalità e

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

complessità, sia a i fini della tutela ambientale che della salute pubblica (6).

Mentre più in generale si va via via consolidando, nel mondo scientifico e non, il modello concettuale dell'uso appropriato di "animali sentinella", si sta parallelamente affermando, come necessità "di campo", l'inserimento organico e sistematico di un punto d'osservazione sul fronte animale anche nelle esperienze e nei piani d'indagine correnti dei Servizi di Sanità Pubblica, e non solo della Veterinaria. In particolare i Dipartimenti di Prevenzione delle Aziende Sanitarie Locali, anche a seguito di una più aggiornata visione della salute legata all'ambiente, sollecitano sempre più gli Enti deputati alla ricerca applicata e la stessa comunità scientifica affinché le conoscenze dei diversi comparti ambientali possano confluire in un organico sistema di valutazione. Tali informazioni, su dati disponibili *ad hoc*, possono quindi offrire una prima lettura ed aprire alle potenzialità d'indagine statistica su dati correnti dei sistemi informativi di lungo periodo, anche per effettuare indagini epidemiologiche retrospettive. E qui si innesta con tutta evidenza il secondo approccio metodologico. A fronte delle considerazioni svolte, emerge infatti l'interesse scientifico di partire da un punto di osservazione in prossimità di aree "ad alto rischio di impatto ambientale" che, spesso, proprio per tale motivo sono oggetto di numerosi studi multidisciplinari, sia ambientali che sanitari. È infatti ampiamente condiviso il significato strategico degli studi epidemiologici mirati, sia di patologia che di *bio-markers*, su popolazioni animali in natura, i cui risultati possono fornire informazioni utili per un'analisi integrata volta ad acquisire dati sul rischio derivante da sostanze tossiche, come i metalli pesanti ed i metalloidi, presenti in tali aree. Ovviamente, anche nell'ambito dei sistemi sentinella animali valgono le precondizioni (e le cautele) dettate per la tossicologia sperimentale, ovvero la disponibilità di sufficienti informazioni sull'ecologia, biologia e fisiopatologia delle specie animali "sentinella", in particolare sulle caratteristiche di comparabilità tra una specie e l'altra e tra queste e l'uomo. Una moderna visione della "sorveglianza sanitaria", che nasce allo scopo di raccogliere, analizzare e diffondere dati utili per le l'adozione di misure di Sanità Pubblica, nel caso di rischi associati a fattori ambientali non può quindi fare a meno del "monitoraggio ambientale", con un binomio inscindibile che rappresenta la necessaria evoluzione del classico concetto di

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

sorveglianza come mera osservazione di individui in relazione ad una specifica patologia. Ne consegue che, anche attraverso una corretta elaborazione della, spesso notevole, mole di informazioni sulle concentrazioni di contaminanti ambientali nei prodotti della pesca, sia su specifici ambiti regionali che su quello più vasto nazionale, è possibile affinare e rendere sempre più robusti anche gli strumenti metodologici della “analisi del rischio”, concepiti come asse portante della sicurezza alimentare da applicarsi specificamente anche nelle filiere dei prodotti della pesca, secondo modelli validati anche a livello internazionale (7). Coerentemente con l’orientamento strategico dell’ultimo decennio sulla *Food Safety*, la stessa Unione Europea ha promosso tale sviluppo attraverso recenti linee-guida e report scientifici dell’EFSA. In particolare, nel 2009 sono stati pubblicati i “principi generali” per la raccolta nei singoli Paesi Membri dei dati sui consumi alimentari (8), acquisendo per l’Italia i dati del *Survey* INRAN-SCAI 2005-06 (9) e, nel 2011, in rapida successione, sono state invece pubblicate: le linee-guida per l’utilizzo del Data-base EFSA sui consumi alimentari ai fini degli studi di *Exposure Assessment* (10); le linee-guida, in *joint* con FAO e WHO, per un approccio armonizzato ai *Total Diet Studies* (11) ed il *Report* scientifico sulla rassegna delle procedure attualmente in uso presso l’EFSA per la valutazione dell’esposizione alimentare a diverse sostanze chimiche (12), compresi piombo, cadmio, mercurio e arsenico.

È apparso dunque coerente e di assoluto interesse procedere, oltre che allo svolgimento di indagini *ad hoc* secondo modelli di “animali sentinella” campionati nel triennio in una specifica area (il Sulcis-Iglesiente) soggetta a forte impatto ambientale da metalli pesanti e metalloidi, anche analizzare se e quanto le banche-dati attualmente disponibili presso i laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, a partire da quello di riferimento della Sardegna, fossero già di per sé stesse sufficienti, oltre che ad alimentare i flussi informativi di competenza, anche a fornire informazioni utili per l’analisi del rischio “metalli pesanti e metalloidi tossici come contaminanti nei prodotti della pesca”. Il contributo alla tutela della salute dei consumatori attraverso la garanzia dei controlli analitici sulla sicurezza degli alimenti di origine animale è infatti uno dei principali compiti istituzionali degli Istituti Zooprofilattici. Ma limitare il loro ruolo alla

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

sola attività laboratoristica, seppure caratterizzata da livelli d'eccellenza tecnico-scientifica, sarebbe (soprattutto nell'attuale contesto europeo) assolutamente riduttivo, in quanto proprio la strategia nel settore della sicurezza alimentare è mirata ad affrontare le diverse problematiche in modo completo e integrato, come richiede ed è stato più volte rimarcato, la normativa comunitaria in quest'ambito, meglio nota come "pacchetto igiene". Unitamente alle attività di *auditing* svolte dai Servizi Veterinari e, in sinergia con questi, si palesa infatti il sistema di competenze di tipo epidemiologico per la messa a punto dei piani di campionamento e per l'analisi dei risultati, soprattutto in termini di andamento dei livelli di contaminazione e di definizione di profili di rischio di specifici prodotti o tipologie di prodotti della pesca, anche al fine di fornire informazioni utili per la comunicazione ai consumatori e per indirizzare in modo mirato (ed efficace) l'attività di controllo ufficiale a seguito dello svolgimento di un corretto processo di analisi del rischio. La "valutazione del rischio", com'è noto, è la parte più propriamente scientifica di tale processo e consiste nell'identificazione e caratterizzazione del rischio, nella raccolta di informazioni e nella loro elaborazione attraverso l'utilizzo di modelli statistici.

Lo sviluppo della ricerca che verrà presentato nei paragrafi che seguono ha quindi cercato di coprire, durante l'arco di un triennio e attraverso la ricerca e sperimentazione di modelli appropriati, i principali approcci alla valutazione del rischio nello specifico ambito della sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza dei richiamati piombo, cadmio, mercurio ed arsenico come contaminanti ambientali.

Bibliografia

- (1) Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem (Review). *Analytica Chimica Acta* 606: 135-150
- (2) Sioen I, Van Camp J, Verdonck FA, Van Thuyne N, Willems JL, De Henauw SW. 2007. How to use Secondary Data on seafood contamination for probabilistic exposure assessment purposes? Main problems and potential solutions. *Human and Ecological Risk Assessment* 13: 632-657
- (3) Van der Schalie WH, Gardner HS Jr, Bantle JA, De Rosa CT, Finch RA, Reif JS,

- Reuter RH, Backer LC, Burger J, Folmar LC, Stokes WS. 1999. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives* 107(4): 309-315
- (4) Rabinowitz PM, Gordon Z, Holmes R, Taylor B, Wilcox M, Chudnov D, Nadkarni P, Dein FJ. 2005. Animals as sentinels of human environmental health hazards: an Evidence-Based Analysis. *EcoHealth* 2: 26–37
 - (5) Rabinowitz P, Scotch M, Conti L. 2009. Human and animal sentinels for shared health risks. *Veterinaria Italiana* 45(1): 23-34
 - (6) Reif JS. 2011. Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Reports* 126(1): 50-57
 - (7) Fazil AM. 2005. A primer on risk assessment modelling: focus on seafood products. FAO Fisheries Technical Paper 462. FAO [pagg. 56] (<http://www.leb.fmvz.usp.br/ensino/manuais/a0238e.pdf>)
 - (8) EFSA Guidance of European Food Safety Agency. General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA Journal* 2009; 7(12): 1435 (Question No EFSA-Q-2009-00758) [pagg. 51]
 - (9) Leclercq C, Arcella D, Piccinelli R, Sette S, Le Donne C, Turrini A, 2009. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005-06: main results in terms of food consumption. *Pub Health Nutr*, 12(12): 2504-2532
 - (10) EFSA Guidance of European Food Safety Agency. Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. *EFSA Journal* 2011; 9(3): 2097 (Question No EFSA-Q-2010-01471) [pagg. 34]
 - (11) EFSA Joint guidance of FAO and WHO. Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document. *EFSA Journal* 2011; 9(11): 2450 (Question No EFSA-Q-2010-00058) [pagg. 66]
 - (12) EFSA Scientific Report of European Food Safety Agency. Overview of the procedures currently used at EFSA for the assessment of dietary exposure to different chemical substances. *EFSA Journal* 2011; 9(12): 2490 (Question No EFSA-Q-2010-01143) [pagg. 33]

2.1 Caratterizzazione del rischio in un ambiente costiero antistante un'area mineraria ed industriale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente) tramite campionamento a *cluster* e ricerca di contaminanti su bioti eduli (pesci e molluschi bivalvi)

Applied study, 2011. *Ital J Food Safety* 1(0): 31-36 [DOI: 10.4081/ijfs.2011.1S.31] (<http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/download/ijfs.2011.1S.31/498>)

“Risk characterization of a coastal environment facing a mining and industrial area in Sardinia (Sulcis-Iglesiente) by means of cluster sampling and contaminants research o edible fish and clams”

Piras Pierluigi, Mulas Gianfranco*

* Servizio Ambiente del Comune di Portoscuso (con finanziamento dell'Assessorato Difesa Ambiente della Regione Sardegna per il Piano di Disinquinamento del Sulcis-Iglesiente)

Summary

On the basis of the results obtained from the analysis carried out on various environmental substrates (sediments, sea water and bio-indicators), it can be assumed that there has been a transfer of contaminants from sediments to edible “biota” in the Boi Cerbus lagoon (Sulcis-Iglesiente). It has also been verified that the benthic clams, in particular the *Cerastoderma glaucum*, is the species mainly affected by heavy metals contamination, in particular Lead, even if the role of Cadmium in the lagoon would need further investigation.

Keywords

Food-safety, marine polluting agents, biological indicators.

Studio applicato

Sulla base dell'approccio generale alla valutazione e alla gestione dei siti costieri vulnerabili (1, 2), le sorgenti di contaminazione si distinguono in puntuali (o locali) e non puntuali (o diffuse). Le sorgenti “puntuali” sono fonti di contaminanti la cui origine è circoscritta e facilmente identificabile. Su tali fonti di contaminazione è concettualmente possibile agire direttamente, sia riducendo le concentrazioni degli inquinanti, sia impedendone la migrazione nei diversi comparti ambientali. Le sorgenti di contaminazione “diffuse” hanno un'origine non circoscritta e rappresentano la

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

sovrapposizione di più eventi e/o attività contaminanti. Le sorgenti vengono poi distinte in primarie e secondarie.

La sorgente primaria è rappresentata dall'elemento che è causa di inquinamento (per es. scarichi); quella secondaria è identificata con il comparto ambientale oggetto di contaminazione (per es. i suoli, l'acqua, i sedimenti e, di particolare interesse sotto il profilo della presente indagine, il livello trofico). Nell'ambito della laguna di Boi Cerbus, è senza dubbio riconoscibile come sorgente diffusa il noto *fall out* determinato dall'area industriale di Portovesme (3, 4) e, più in generale, le ricadute persistenti delle vicine aree minerarie dismesse (5). La laguna di Boi Cerbus può inoltre assumere il ruolo di sorgente secondaria, in quanto la sua esposizione ai contaminanti è da mettere in relazione, oltre che all'apporto di particolato aerodisperso (ciminiera), anche ai sedimenti (trasporto solido) e alle acque fluviali (o di ruscellamento) e di falda contaminate, ed è quindi causa di ulteriore diffusione dei contaminanti nelle acque marine, nei sedimenti e nei bioti e, in ultima analisi, nell'uomo. L'obiettivo del piano di caratterizzazione svolto nella zona umida di Boi Cerbus è stato quindi quello di evidenziare le interazioni tra le possibili fonti dell'inquinamento del territorio ed i potenziali "bersagli biologici" presenti nelle sue acque di transizione (o "salmastre"), ponendo in evidenza i contaminanti più significativi ed i loro percorsi di migrazione. Porre cioè in relazione le possibili fonti di inquinamento da siti minerari dismessi (dove, lo ricordiamo, venivano prevalentemente estratti Solfuri di Pb e Zn), nonché l'impatto ambientale dell'area industriale ad alto rischio di Portovesme, con lo stato di contaminazione della prospiciente laguna e relativa peschiera, tutt'ora attiva e da valutarsi come possibile sorgente di contaminazione, secondaria (6).

Le lagune infatti, nella loro generalità, assumono la funzione di mero veicolo d'inquinamento per i sistemi biologici in esse compresi e, su un livello trofico superiore, anche per l'uomo che si dovesse alimentare degli organismi acquatici lì pescati o raccolti. L'obiettivo d'indagine è stato raggiunto sviluppando i seguenti aspetti:

- a) disegnare un profilo fisico-chimico del sito e delle sorgenti di contaminazione,
- b) rilevare quali siano nello specifico contesto le sostanze inquinanti significative,
- c) analizzare la distribuzione di tali contaminanti e d) confrontarli con i modelli noti

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

della loro migrazione verso i bersagli biologici finali che, nel nostro caso, sono rappresentati dagli animali acquatici edibili. Relativamente all'uso di animali "sentinella" come validi indicatori biologici, l'area di indagine era infatti già stata monitorata, ma in ambienti di terraferma, tramite il campionamento di miele fresco ed api bottinatrici (7) di cinque stazioni posizionate però nell'area più ampia di tutta la Provincia del Sulcis-Iglesiente. L'area marino-costiera ora indagata (8) ricade invece interamente nel solo territorio comunale di Portoscuso e comprende essenzialmente la parte terminale del bacino idrografico del rio Flumentepido e la laguna di Boi Cerbus, nella quale insiste l'omonima peschiera, dotata del tipico graticcato per la cattura dei pesci eurialini, mugilidi in particolare. Il sito si sviluppa su una superficie di circa 3,5 km² ed è delimitato, ad Ovest, dalla striscia litorale denominata "Punta S'Aliga" e, a Sud, dal braccio di mare che separa il territorio di Porto-scuso dall'isola di S. Antioco,

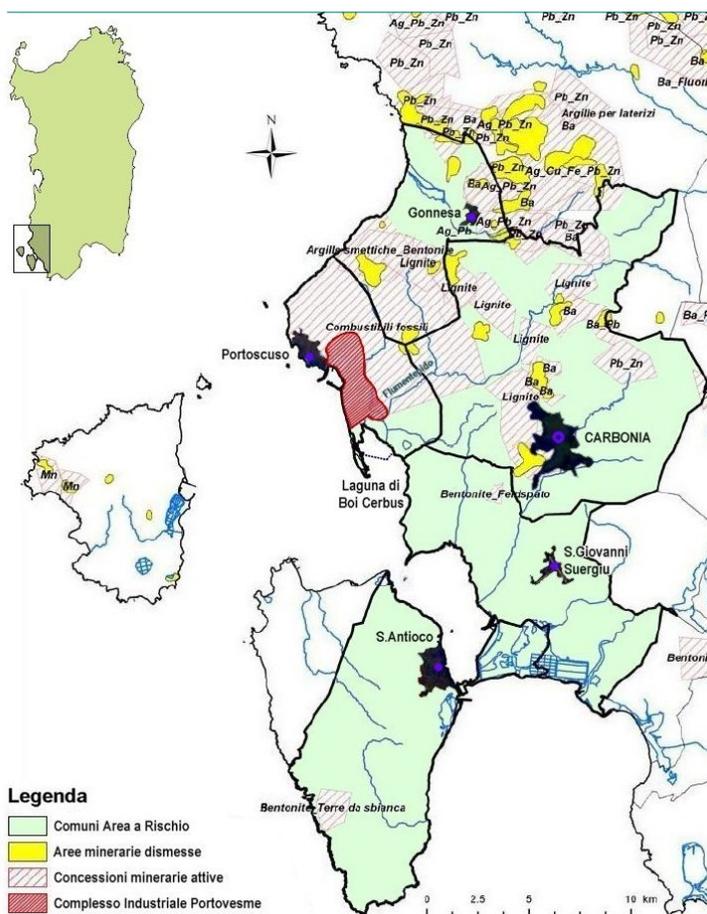


Figura 1. Mappa del sito costiero di indagine, dove sono evidenziate le antistanti aree estrattive (sia dismesse che attive) e l'area industriale ad alto rischio (10).

mentre a Nord confina con il complesso industriale di Portovesme (Figura 1).

Le attività di analisi eseguite sui campioni delle diverse matrici ambientali (sedimenti, acque salmastre ed organismi "sentinella") della laguna di Boi Cerbus sono state eseguite secondo i Protocolli ICRAM (9), a partire da una rigorosa procedura di posizionamento dei punti di campionamento mediante DGPS (Sistema Differenziale di Posizionamento Satellitare), che l'ARPAS (10) ha validato. Il campionamento delle acque

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

di transizione e, per carotaggio, dei sedimenti della laguna, secondo una maglia di 500 m di lato (con 18 punti di intersezione), ha consentito di restituire arealmente i risultati ottenuti.

La variabilità areale dei parametri chimico-fisici è stata inoltre svolta, nel caso dei sedimenti, per quattro profondità campionate: 0-20 cm, 30-50 cm, 100-120 cm e 180-200 cm. Per il campionamento dei bioti “indicatori ambientali” ci si è avvalsi delle metodiche di pesca e raccolta in uso nella laguna, attraverso l’ausilio della Cooperativa pescatori del Boi Cerbus, titolare della concessione regionale di sfruttamento ittico all’interno dell’omonima peschiera. Tra le specie edibili riportate nello specifico Protocollo ICRAM (9), le attività di pesca hanno riguardato le seguenti specie acquatiche: a) per il gruppo degli organismi nectonici e parzialmente necto-bentonici (in quanto anche limivori di fondo) tipici lagunari, i pesci mugilidi o “Cefali” (con le specie prevalenti *Liza ramada* e *L. aurata*, denominate in Italiano rispettivamente: “Cefalo o Calamita o Botolo” e “Cefalo o Cefalo dorato o Lotregano”, più occasionalmente il *Chelon labrosus*, commercialmente denominato “Cefalo o Bosega”, ed il *Mugil cephalus*, denominato “Cefalo o Volpina”, raro in ragione del periodo tardo estivo scelto per il campionamento, coincidente con la sua fase riproduttiva in mare aperto) e b) per il gruppo degli organismi strettamente bentonici, con habitat cioè nel sedimento stesso, un mollusco bivalve (specificamente il *Cerastoderma glaucum*, commercialmente denominato “Cuore” e relativamente abbondante negli ambienti lagunari della Sardegna).

Tabella 1. Specifiche spazio-temporali per i tre cluster di campionamento dei pesci (procedendo dall’interno della laguna verso il mare aperto) ed indicazione dei punti della cala di pesca, della profondità e delle caratteristiche del pescato.

Punti di prelievo	Coordinate Nord-Est	prof. acque	data del prelievo	quantità pescate	taglia media
a) interno graticciato (punti 7-10)	N39°09'55" E8°25'04"	0,5 m	25/07/2008	circa 9 kg	25 cm
b) esterno graticciato (punti 15-18)	N39°08'58" E8°24'58"	0,6 m	08/09/2008	circa 10 kg	25 cm
c) esterno laguna (loc. Matzaccara)	N39°08'57" E8°26'11"	0,6 m	10/09/2008	circa 11 kg	25 cm

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Tabella 2: specifiche spatio-temporali per i tre cluster di campionamento dei molluschi bivalvi e dei punti di loro raccolta dal sedimento, oltre che della profondità della colonna d'acqua sovrastante e delle quantità (nette) analizzate.

Punti di prelievo	Coordinate Nord-Est	prof. acque	data prelievo	quantità raccolte (senza guscio)
a) interno graticciato (punti 5-7)	N39°10'07" E8°24'53"	0,5 m	20/08/2008	185,2 grammi
b) esterno graticciato (punti 11-14)	N39°09'51" E8°25'32"	0,5 m	29/08/2008	155,0 grammi
c) esterno laguna (loc. Matzaccara)	N39°08'57" E8°26'11"	0,4 m	11/09/2008	256,8 grammi

Le determinazioni analitiche eseguite sui sedimenti hanno consentito di tratteggiarne lo stato qualitativo. Non esistendo attualmente limiti legali di riferimento per questo tipo di sedimenti si è ricorso a “valori indicativi” o “di intervento” sito-specifici (*background* di zona costiera) ricavati dall'ICRAM per l'area confinante di Sant'Antioco attraverso le metodiche analitiche di riferimento reperibili in bibliografia per la “determinazione del contenuto di alcuni elementi chimici nei sedimenti marini” (9). Si passa da valori medi di Piombo pari a 42 mg/kg s.s. del livello profondo (180-200 cm) a valori medi di 142 in superficie (0-20 cm), avendo come valore indicativo di riferimento ICRAM quello di 100 mg/kg s.s. Analogamente, il Cadmio passa da concentrazioni medie di 2,7 mg/kg s.s. in profondità, a quelle medie di 20,7 nello strato più superficiale, avendo come valore indicativo di riferimento ICRAM quello di 1,4 mg/kg s.s. Anche il Mercurio aumenta nelle concentrazioni medie passando dagli strati profondi a quello superficiale, con valori rispettivamente di 0,08 e di 0,4 mg/kg s.s., ma in ogni caso significativamente al di sotto del valore indicativo di riferimento ICRAM, fissato in 1,3 mg/kg s.s. Relativamente agli inquinanti organici, riferendoci al Benzo(a)pirene (generalmente utilizzato come “marcatore” della presenza e degli effetti della generalità degli I.P.A., o “Idrocarburi Policiclici Aromatici” cancerogeni), si è passati da concentrazioni non rilevabili (<0,001 mg/kg s.s.) negli strati profondi del sedimento, a valori medi di 0,04 mg/kg s.s. in quello superficiale, con valore indicativo di riferimento ICRAM pari a 0,76 mg/kg s.s. Nel caso infine degli “Inquinanti Organici Persistenti”, dosando i diversi congeneri delle diossine e dei PCB diossino-simili (con risultati comunque espressi in Diossine-totali-WHO-TE-upper-bond), si è passato da valori non

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

rilevabili in profondità, a concentrazioni di 0,47 ng/kg s.s., significativamente al di sotto del valore indicativo di riferimento ICRAM, fissato in 30 ng/kg s.s. Nel senso della profondità, i campioni che presentano concentrazioni più alte di contaminanti sono quindi i campioni appartenenti al livello più superficiale del carotaggio. A ciò si aggiunga come sia stata rilevata una maggior frequenza di campioni che presentano le concentrazioni più elevate anche procedendo in senso longitudinale, cioè dall'interno del graticciato verso l'esterno dello stesso.

Anche le determinazioni analitiche eseguite sui campioni della colonna d'acqua lagunare hanno consentito di definirne lo stato qualitativo, ricorrendo stavolta a limiti normati (D.Lgs n. 152/2006). Mentre per Benzo(a)pirene, Diossine-totali-WHO-TE-upper-bond e Mercurio si è rimasti sotto i rispettivi limiti di rilevabilità, nel caso del Piombo è stato rilevato un valore medio di 1,38 µg/l (limite 10 µg/l) ed in quello del Cadmio di 0,3 µg/l (limite 1 µg/l), significativamente al di sotto dei valori raccomandati. Infine, le analisi chimico-fisiche eseguite sui campioni di biota hanno consentito di completare la caratterizzazione dell'ambiente, ricorrendo stavolta ai limiti previsti dalla regolamentazione comunitaria che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (11). Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi eseguite sulle diverse matrici ambientali (sedimenti, acque di transizione e bioti eduli) si possono quindi confermare i bersagli individuati dai modelli concettuali noti in letteratura (12).

Tabella 3: risultati analitici sulla parte edibile (muscolo fresco) dei mugilidi.

Contaminanti nel biota (pesce)	Limite di riferim. (muscolo di pesce)	a) interno graticciato (c/o i punti 7-10)			b) esterno graticciato (c/o i punti 15-18)			c) esterno laguna (Matzaccara)		
		pool 1	pool 2	pool 3	pool 4	pool 5	pool 6	pool 7	pool 8	pool 9
Piombo (Pb)	mg/kg 0,30	0,21	0,09	0,12	0,17	0,36	0,20	0,13	0,19	0,23
Cadmio (Cd)	mg/kg 0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Mercurio (Hg)	mg/kg 0,50	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Benzo(a)pirene	µg/kg 2,0	0,13	0,17	0,17	0,12	0,12	0,12	0,14	0,13	0,12
Diossine totali	pg/kg 4,0	0,06	0,04	0,04	0,09	0,08	0,07	0,06	0,26	0,14

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Tabella 4: risultati analitici riferiti alla matrice edibile (polpa) dei bivalvi.

Contaminanti nel biota (bivalve)	Limite di riferim. (su polpa sgusciata)	a) interno graticciato (c/o i punti 5-7)			b) interno graticciato (c/o i punti 11-14)			c) esterno laguna (Matzaccara)		
		pool 1	pool 2	pool 3	pool 4	pool 5	pool 6	pool 7	pool 8	pool 9
Piombo (Pb)	mg/kg 1,5	2,62	2,24	1,81	3,71	4,74	6,05	4,06	4,14	7,83
Cadmio (Cd)	mg/kg 1,0	0,23	0,20	0,40	0,36	0,49	0,61	0,39	0,40	0,71
Mercurio (Hg)	mg/kg 0,50	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,05
Benzo(a)pirene	µg/kg 10,0	0,09	0,10	0,07	0,10	0,10	0,12	0,11	0,10	0,12
Diossine totali	pg/kg 4,0	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,03	0,06

Come è noto, nel caso di sedimenti contaminati da sostanze con proprietà di bioaccumulo, il percorso di esposizione dominante in termini di rischio sanitario è la catena alimentare, ed in particolare l'ingestione di prodotti ittici pescati o raccolti da pescatori occasionali (attività ricreativa) o dai pescatori di sussistenza (attività lavorativa). In funzione dell'uso del sito indagato, non possono infatti essere ritenuti significativi i percorsi di contatto diretto con i sedimenti, quali l'ingestione accidentale e il contatto dermico, non svolgendovisi alcuna attività ricreativa (per esempio nuoto, canottaggio, ecc.). Per quel che concerne le modalità di esposizione dei recettori ecologici, si possono prendere in considerazione entrambe le tipologie di esposizione ai sedimenti contaminati: l'esposizione diretta e quella indiretta. La prima risulta dalla possibile ingestione del sedimento stesso (per esempio da parte di pesci limivori come i mugilidi), oppure da quella che si verifica negli organismi che vivono all'interno dei sedimenti, che sono invece esposti soprattutto attraverso "captazione" (*uptake*) dei contaminanti dall'acqua interstiziale (come avviene nel caso dei molluschi bivalvi che vivono sui sedimenti). L'esposizione indiretta si realizza invece attraverso la catena alimentare, ovvero tramite il consumo di una preda contaminata. Le comunità bentoniche sembrerebbero quindi quelle maggiormente esposte alla contaminazione diretta in ambiente lagunare, vivendo in contatto continuo con il sedimento.

Fondamentale nella valutazione del modello di distribuzione dei contaminanti è stata inoltre la valutazione quali-quantitativa del trasporto dei contaminanti stessi presenti

nella matrice sedimento, oltre che dell'effetto che tali meccanismi di trasporto possono avere sull'esposizione e sul rischio. Tale valutazione risulta essere particolarmente complessa in quanto deve tener conto dei processi che condizionano il movimento dei sedimenti e dei contaminati in essi presenti. Inoltre tali fenomeni sono variabili nel tempo e condizionano l'andamento temporale della distribuzione dei contaminanti nelle varie matrici ambientali. In generale il movimento dei sedimenti può avere effetti favorevoli o non favorevoli l'esposizione ed il rischio (per esempio, gli eventi alluvionali o i regimi di corrente possono determinare il trasporto di sedimenti, sia contaminati che non, i quali si depositano successivamente). Nello specifico della laguna di Boi Cerbus l'afflusso di sedimenti è possibile per la presenza di vari canali e ruscelli di apporto d'acqua dolce, generalmente però di scarsa portata. Risulterebbe pertanto fortemente limitato sia il fenomeno tramite il quale la movimentazione dei sedimenti possa disperdere la contaminazione ambientale, sia il fenomeno c.d. dell'isolamento (mediante interrimento) di altri sedimenti contaminati o, infine, la ipotetica riduzione delle concentrazioni di inquinanti (mediante diluizione). In questo quadro, di tendenziale ridotta dinamica dei flussi abiotici, si può dunque ragionevolmente ipotizzare che il contributo della movimentazione dei sedimenti determini unicamente un effetto sfavorevole per quanto concerne l'esposizione ed il rischio nell'ambiente lagunare di Boi Cerbus. Tra le ipotetiche cause di movimentazione dei sedimenti all'interno della laguna (che, oltre ai profili di corrente generati dal, pure scarso, apporto di acque dolci superficiali, come si è detto, dovrebbe riconoscere anche il regime di marea interno alla laguna, comunque fortemente influenzato nella sua dinamica dalla presenza del graticciato della peschiera) si dovrebbe aggiungere anche ogni tipo di bio-turbazione. Tale tipo di cause, tuttavia, non è da ritenersi significativamente impattante. L'importanza della bio-turbazione, infatti, come meccanismo di trasporto nelle lagune è principalmente determinato da fattori come: le caratteristiche del corpo idrico (profondità del letto, salinità e temperatura dell'acqua e loro variazioni stagionali), le caratteristiche del sedimento (per esempio, la sua granulometria e la sua composizione) e la tipologia di organismi (sotto il profilo sia della micro- che della macrofauna). Si può quindi al momento affermare che nella laguna di Boi Cerbus la movimentazione dei

contaminanti e prevalentemente legata a quella dei suoi sedimenti e che il biota maggiormente esposto come bersaglio ecologico sia, nel nostro caso, rappresentato dai molluschi bivalvi bentonici, in particolare la specie *Cerastoderma glaucum*. E di tutta evidenza, infine, come il rischio sia soprattutto associato ai metalli pesanti, in particolar modo al Piombo, anche se il ruolo del Cadmio andrebbe ulteriormente esplorato, ricorrendo anche al contributo di altri bioti “sentinella” come ad es. i crostacei (granchi di estuario).

Bibliografia e documenti di riferimento

- (1) European Environment Agency, 2000. Relazione su “Stato e pressioni sull’ambiente marino e costiero del Mediterraneo” - Ufficio delle pubblicazioni ufficiali delle Comunità Europee [44 pp.] (http://www.eea.europa.eu/it/publications/medsea/at_download/file)
- (2) European Environment Agency, 2006. Relazione (No 4) su “Problemi prioritari per l’ambiente mediterraneo” - Ufficio delle pubblicazioni ufficiali delle Comunità Europee [90 pp.] (http://www.eea.europa.eu/it/publications/eea_report_2006_4/at_download/file)
- (3) Istituto dell’Ambiente del Centro Comune di Ricerca della Commissione Europea, 2000. Valutazione preliminare dello stato di inquinamento dei suoli, delle acque e dei sedimenti marini nella zona ad alto rischio ambientale di Portoscuso - Definizione di un sistema di controllo permanente della contaminazione ambientale [107 pp.] (<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/9056/1/EUR%2019045%20IT.pdf>)
- (4) CNR, 2007. Relazione sullo stato delle conoscenze in tema di ambiente e salute nelle aree ad alto rischio in Italia - Relazione del per la VIII Commissione Permanente della Camera dei Deputati - Consiglio Nazionale delle Ricerche [135 pp.] (http://www.cnr.it/documenti/83_Relazione_aree_a_rischio.pdf)
- (5) Rapporti ISTISAN 04/28, 2004. Contaminazione ambientale da metalli pesanti connessa con attività mineraria dismessa in Sardegna - Studio preliminare. Istituto Superiore di Sanità [72 pp.] (http://dspace.iss.it/dspace/bitstream/2198/211831/1/ISSA04_1123-3117_2004_I_04_28.pdf)

- (6) Regione Autonoma della Sardegna, Assessorato Difesa Ambiente, 2008. Piano di bonifica delle aree minerarie dismesse del Sulcis-Iglesiente. Direzione Generale Servizio Tutela dell'Atmosfera e del Territorio [58 pp.] (http://www.regione.sardegna.it/documenti/1_19_20080403121548.pdf)
- (7) Massidda MA, Tradori M, Fiori G, Chessa G, 2007. Honey bees as bioindicators of environmental contamination in the industrial and mining area of Sulcis-Iglesiente, Sardinia. Insect Social Life, XII National Meeting, Redia XC: 115-119 (http://www.redia.it/images/stories/Abstract_Redia_2007/19_massidda.pdf)
- (8) Regione Autonoma della Sardegna, Comitato Istituzionale dell'Autorita di Bacino, 2009. Caratterizzazione dei corpi idrici della Sardegna” - Deliberazione n. 4 - Relazione Generale ex D.M. n. 131/2008 [83 pp.] (http://www.regione.sardegna.it/documenti/1_73_20091210120722.pdf)
- (9) Ministero Ambiente e Tutela del Territorio, Servizio Difesa del Mare - ICRAM, 2001. Metodologie analitiche di riferimento del programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero” - triennio 2001-2003 [114 pp.] (http://www.apat.gov.it/site/_files/icram/MetodologieAnaliticheDiRiferimento_icram.pdf)
- (10) Regione Autonoma della Sardegna, Direzione Generale ARPAS, 2007. Determinazione dei valori di fondo nelle matrici ambientali dell'area ad alto rischio di Portoscuso - Progetto operativo. Agenzia Regionale Protezione Ambiente Sardegna [28 pp.] (http://www.sardegnaambiente.it/documenti/21_46_20080214155345.pdf)
- (11) Regolamento (CE) n. 1881/2006 [della Commissione] del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - G.U.C.E. 20/12/2006, L 364 [26 pp.] (<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20090701:IT:PDF>)
- (12) Rapporti ISTISAN 05/24, 2005. Piombo, cadmio, arsenico e mercurio negli alimenti di origine ittica: livelli di presenza e stima delle assunzioni in Italia e nell'Unione Europea” - Workshop sulle problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. Istituto Superiore di Sanità [104 pp.] (http://dspace.iss.it/dspace/bitstream/2198/-211745/1/ISSA05_11233117_2005_I_05_24.pdf)

2.2.1 Valutazione dell'esposizione alimentare a contaminanti presenti su bioti eduli (pesci, molluschi bivalvi e crostacei) in un ambiente costiero antistante un'area mineraria ed industriale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente)

Original Article, 2011. *Ital J Food Safety* 1(2): 61-69 [DOI: 10.4081/ijfs.2011.2.61] (<http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/download/ijfs.2011.2.61/439>)

“Exposure assessment to food contaminants on edible fish, clams, and crustaceans in a coastal environment facing a mining and industrial area in Sardinia (Sulcis-Iglesiente)”

Piras Pierluigi, Mulas Gianfranco*

* Servizio Ambiente del Comune di Portoscuso (con finanziamento dell'Assessorato Difesa Ambiente della Regione Sardegna per il Piano di Disinquinamento del Sulcis-Iglesiente)

Summary

The risk assessment following exposure of the local population to the consumption of fishery products caught in the Boi Cerbus lagoon, located in country of Portoscuso (Sardinia), followed the phase of sampling, analysis and data-collection “site-specific”. Overall, the fishery products samples are part of the following zoological groups: fish (grey mullets, soles and gobies), bivalve (cockles) and crustaceans (crabs). It was also agreed that further investigation were implemented in a targeted way, directing attention to critical issues that emerged from the first phase, represented by heavy metals such as Lead, Cadmium, Mercury and the (metalloid) Arsenic that, for the purposes of food safety, are still contaminants with high concern for the potential impact on human health. For the risk analysis through food intake, three different procedures for exposure assessment were considered: the regulation by law, the assessment according to US-EPA approach and the assessment according to EU harmonized method. For a wider opportunity for exposure assessment through ingestion of food from contaminated areas, also for their risk management, a single approach to the risk analysis is not be considered sufficient.

Keywords

Food safety, heavy metals such as marine pollutants, dietary exposure assessment.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Introduzione

Il Comune di Portoscuso ha da tempo avviato, in accordo con obiettivi di bonifica a più ampio raggio promossi dalla Regione Sardegna, un programma di monitoraggio in una delle aree, già storicamente connotate come estrattivo-minerarie ed industriale-metallurgiche, che sono considerate perciò a maggior rischio per contaminazioni da metalli pesanti: il Sulcis-Iglesiente. Relativamente alla valutazione del rischio sanitario in ambiente agricolo, cioè sui suoli e sui prodotti ortofrutticoli lì coltivati, l'area di indagine è già stata valutata attraverso uno studio svolto su mandato del Comune di Portoscuso dal Reparto Suolo e Salute del Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità, tramite il monitoraggio per campionamento di di-verse matrici vegetali (comprese le essenze spontanee) e valutando anche i dati forniti alla ASL 7 di Carbonia dall'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna (ARPAS). Nel presente studio, la laguna di Boi Cerbus (e relativa peschiera) è stata invece individuata come sito strategico per valutare anche le contaminazioni su bioti eduli, quali: pesci, molluschi bivalvi e crostacei, utilizzati come specifici bioindicatori del comparto ambientale mari-no e delle acque di transizione. Nell'ambito del piano di caratterizzazione e biomonitoraggio è stata pertanto sviluppata anche una valutazione del rischio sanitario potenziale conseguente all'esposizione a microinquinanti metallici per consumo di prodotti ittici pescati/raccolti nella laguna di Boi Cerbus. Lo studio ha fatto quindi seguito ad una estesa fase di campionamento, analisi e raccolta-dati "sito-specifici", progettata ad hoc e che ha interessato matrici ambientali (sedimenti, acque) e prodotti della pesca, come definito nel diagramma di flusso del modello concettuale riportato nella figura 1.

Figura 1. Modello concettuale per la valutazione dell'esposizione alimentare ai contaminanti.



La prima parte dello studio, condotta nella stagione estiva 2008, era finalizzata alla caratterizzazione del rischio sito-specifico ed ha prodotto risultati già oggetto di un primo contributo pratico (1). In tale prima fase, l'attenzione è stata posta sull'appropriato monitoraggio dei sedimenti e dei corpi idrici, oltre che delle matrici animali (bioti indicatori). Il protocollo è stato replicato nel 2010 e rivisitato (con ampliamento delle specie di bioti oggetto di indagine) anche alla luce dei risultati ottenuti nella prima fase. Sempre sulla scorta delle evidenze risultanti dalle analisi della prima fase dello studio e, particolarmente, in relazione al tenore relativo di contaminanti rilevato per ciascuna categoria dei medesimi, si è deciso inoltre di proseguire l'indagine in modo mirato, focalizzando cioè l'attenzione sulle criticità emerse, rappresentate dai microinquinanti metallici quali: il Piombo (Pb), il Cadmio (Cd), il Mercurio (Hg) e l'Arsenico (As), che da un punto di vista sanitario rappresentano gli elementi "in traccia" che destano particolare attenzione per il potenziale impatto sulla salute umana. Si consideri che, a tal proposito, nel 2002-2003 l'UE ha infatti costituito, nel quadro della Cooperazione Scientifica, la *Task 3.2.11* su "*Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States*" (9).

Nello specifico, come aveva già fatto notare anche il *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and Contaminants*, l'As è spesso presente nei prodotti ittici anche ad elevati livelli di concentrazione, benché esso si trovi principalmente sotto forma di composti organici, decisamente meno tossici dell'As inorganico (3), in accordo con le valutazioni (4) degli esperti francesi sugli aspetti scientifici dell'inquinamento marino (IFREMer) e con la recente Opinione scientifica (5) del *Panel on Contaminants in the Food Chain* dell'EFSA (CONTAM). Su problematiche analoghe legate al Cd si è espressa sia il JECFA (6), sia il CONTAM in diverse occasioni (7, 8, 9), raccomandando maggiori sforzi per ridurre l'esposizione al Cd attraverso la dieta, poiché per l'uomo gli alimenti rappresentano la fonte principale dell'*Intake* di tale elemento. Il Pb è generalmente presente a basse concentrazioni negli alimenti (10), mentre nell'epatopancreas dei prodotti ittici può essere contenuto a livelli significativi (11); inoltre, anche per il CONTAM (12), gli alimenti prodotti e lavorati in aree contaminate rappresentano la principale fonte per l'ingestione di Pb con la dieta.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Relativamente all'assunzione alimentare del Hg, come è noto, sono principalmente implicati i prodotti ittici (13) ed alcuni in particolare. Il metilmercurio, la principale forma in cui il mercurio è presente nei pesci, è la più tossica tra le specie del mercurio. Il contenuto di metilmercurio nei prodotti ittici varia, ma si assume che generalmente, oltre il 90% del mercurio totale sia presente sotto forma di metilmercurio (14).

Materiali e metodi

I prodotti ittici campionati erano costituiti da: teleostei appartenenti alla famiglie mugilidi (specie *Mugil cephalus*, *Liza ramada* e *Liza aurata*), soleidi (*Solea vulgaris*) e gobidi (*Zosterisessor ophiocephalus*), molluschi bivalvi (“cuori” della specie *Cerastoderma glaucum*) e crostacei brachiuri (granchi della specie *Carcinus aestuarii*). Sono stati esaminati complessivamente 41 pool o “campioni globali” originati da “campioni elementari” rappresentativi di ogni singola calata di pesca/raccolta e precisamente: n. 20 pool di solo muscolo (o di corpo intero nel caso dei gobidi) dei pesci considerati (provenienti dal raggio di cala di 7 punti georeferenziati), n. 15 pool di parte edibile di bivalvi “cuori” (raccolti da 5 punti georeferenziati) e n. 6 pool di granchi, escluse le “carni scure” (raccolti da 2 punti georeferenziati). Le analisi sono state eseguite dal laboratorio R&C Lab S.r.l. (<http://www.rclabsrl.it>), accreditato Uni Cei En 17025 e con prove accreditate riferite ai seguenti metodi standard: EPA (*Environmental Protection Agency*) 6020A/2007 con tecnica ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) per la determinazione di As, Cd e Pb, mentre per il Hg si è ricorso al metodo EPA 7473/2007 con tecnica DMA (*Direct Mercury Analyzer; prod. Milestone, Inc.*). Poiché la tipologia ambientale monitorata col presente studio ed i relativi prodotti della pesca campionati sono assimilabili ad una produzione primaria, è da ritenersi pienamente applicabile la legislazione alimentare che fissa i limiti nelle derrate alimentari degli analiti indagati (15). Si è quindi calcolato il valore medio delle loro concentrazioni sulle diverse matrici e, per gli analiti regolamentati (Pb, Cd e Hg), è stato effettuato il confronto con tale normativa; è stato però calcolato anche il valore medio per l'As (non normato nelle derrate alimentari considerate) per conoscerne comunque il relativo tenore al fine di poter comunque procedere ad una valutazione dell'esposizione. La valutazione dell'esposizione svolta per i quattro analiti

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

investigati ha utilizzato, sia l'approccio secondo il modello statunitense (US-EPA), sia quella secondo l'approccio armonizzato europeo (EU). Si è ritenuto opportuno utilizzare e confrontare i tre approcci (cioè, in primis, quello dei limiti normati e, quindi, dell'approccio valutativo secondo i due modelli US-EPA ed EU), sia per consentire la confrontabilità della valutazione dell'esposizione con le analisi di rischio sanitario sviluppate in altri contesti (che generalmente si basano proprio sulle procedure statunitensi), sia per uniformarci a quanto definito dagli esperti EFSA per la valutazione del rischio in ambito comunitario.

Risultati

Relativamente all'approccio preliminare, rappresentato dal confronto dei tenori rilevati con quelli massimi consentiti, in tabella 1 sono riportati i valori medi che si ricavano (\pm D.S.) per singolo analita e per matrice/biota (con l'indicazione quantitativa dei pool da cui sono stati estratti i campioni) ed il riferimento ai limiti legali nei prodotti considerati, se normati. Nel monitoraggio sui prodotti ittici della Laguna di Boi Cerbus le risultanze analitiche sono state restituite dal laboratorio d'analisi riferite al peso secco della matrice; i dati utilizzati per i vari approcci di valutazione dell'esposizione sono stati quindi corretti per il valore dell'umidità (cioè riportati a valori "su peso fresco"), come richiesto dal Regolamento al fine di valutare la matrice alimentare così come viene normalmente consumata.

Tabella 1. Tenori (mg/kg) di microinquinanti metallici rilevati nei prodotti pescati/raccolti nella laguna di Boi Cerbus.

mg/ kg	specie di Mugilidi			Bivalvi "Cuori"		Granchi da moleca		
	Limiti legali	Valore medio su peso fresco	Valore medio su peso fresco	Valore medio su peso fresco	Limiti legali	Valore medio su peso fresco	Limiti legali	Valore medio su peso fresco
Pb	0,30	0,12 (\pm 0,10)	0,08 (\pm 0,01)	0,11 (\pm 0,02)	1,5	4,11 (\pm 1,46)	0,50	0,67 (\pm 0,11)
Cd	0,050	0,013 (\pm 0,001)	0,012 (\pm 0,000)	0,012 (\pm 0,000)	1,0	0,44 (\pm 0,13)	0,50	0,18 (\pm 0,06)
Hg	0,50	0,01 (\pm 0,00)	0,01 (\pm 0,00)	0,02 (\pm 0,00)	0,50	0,02 (\pm 0,01)	0,50	0,02 (\pm 0,00)
As	n.n.	4,10 (\pm 2,08)	5,90 (\pm 0,78)	23,41 (\pm 4,28)	n.n.	19,32 (\pm 5,03)	n.n.	29,11 (\pm 3,63)

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Per il Cd il valore limite per il “muscolo di pesce” delle specie oggetto della presente indagine è stabilito al codice 3.2.5 dell’Allegato al Regolamento comunitario (15) pertinente, con due apposite note in calce a tale Regolamento che indicano, nell’ordine, che per “pesce” indicato in tale categoria è «escluso il fegato di pesce» e che solo: «Qualora i pesci siano destinati ad essere consumati per intero, il tenore massimo si applica all’intero pesce». Il significato non equivoco di quest’ultima estensione si coglie meglio ricorrendo al testo in lingua francese del Regolamento, che recita testualmente: *«Lorsque le poisson doit être consommé entier, la teneur maximale s’applique au poisson entier»*, quindi la previsione si applica ai pesci che per ragioni predeterminate (in relazione alla specie, alla taglia e quindi alle condizioni di praticità di preparazione per il consumo alimentare) “devono” per loro natura essere consumati interi, ovvero compresi di fegato (come, ad esempio, le specie relativamente minute, tipo lo *Z. ophiocephalus* o “Ghiozzo go” del presente lavoro). Si consideri che l’esclusione di tale parenchima rappresenta spesso una condizione significativa ai fini dell’analisi valutativa di diversi contaminanti; nel caso del Cd, per esempio, dai dati aggiuntivi delle analisi svolte separatamente sull’epatopancreas dei mugilidi campionati per la presente indagine è emerso un tenore relativo dell’ordine di 50 volte superiore rispetto al solo muscolo.

Per le stesse ragioni il valore limite del Cd nei Crostacei è stabilito al codice 3.2.9 dell’Allegato al Regolamento, con la specifica «ad eccezione delle carni scure del granchio» che funge da parenchima omologo al fegato dei pesci.

Per il Pb valgono le stesse considerazioni di massima, essendo d’altronde identici i richiami in norma ai relativi codici 3.1.5 e 3.1.6 dell’Allegato al Regolamento, salvo l’evidenziazione, a seguito dei risultati delle analisi svolte, di un tenore relativo sul fegato rispetto al solo muscolo di ordine più basso rispetto al Cd, comunque pari ad almeno 10 volte.

In sintesi, il superamento dei tenori massimi stabiliti in norma si è verificato solo in riferimento al Pb: in misura relativamente elevata nei molluschi bivalvi esaminati (Cuori) e, seppur con grado inferiore, anche nei granchi di estuario. I restanti valori tabulati, Hg compreso, sono al di sotto dei limiti previsti e quindi vanno letti come

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

accettabili, mentre non è possibile applicare il criterio del “limite legale” di questo primo approccio all’As, in quanto allo stato attuale non è disciplinato normativamente per le matrici alimentari considerate. Tuttavia, va registrato un tenore di As significativamente dissimile tra i bioti campionati, dell’ordine di 4-5 volte maggiore fra quelli a stretto rapporto col fondale lagunare (specie bentoniche) rispetto alle altre (totalmente o parzialmente nectoniche) a causa, verosimilmente, proprio della loro ecologia a contatto con i sedimenti, risultati decisamente più carichi di micro-inquinanti rispetto alla colonna d’acqua sovrastante.

Oltre alla semplice valutazione dei livelli di concentrazione dei contaminanti nelle matrici ittiche campionate nella Laguna di Boi Cerbus, è stata effettuata una valutazione del rischio sanitario da consumo alimentare delle medesime matrici da parte dell’uomo. Tale valutazione è stata svolta prendendo in considerazione l’esposizione per diverse fasce d’età (“Bambini” [3-9 anni], “Giovani” [10-17 anni] e “Adulti” [18-64 anni]), con riferimento al “peso corporeo medio” ed ai “consumi alimentari medi” ricavabili dai dati del *survey* svolto sulla popolazione italiana dall’INRAN (16).

Dopo aver raccolto e selezionato i dati di monitoraggio sui prodotti ittici, la procedura di “valutazione dell’esposizione” (*Exposure Assessment*) secondo l’approccio US-EPA (17), può essere schematizzata come segue: a) stima dell’*Intake* alimentare procapite (*Intake Rate* = IR) e della “quantità complessiva di contaminante che viene assunta quotidianamente tramite dieta” ($C \times IR$); b) stima della “dose media giornaliera” (*Average Daily Dose* = ADD); c) calcolo del rischio valutando la “dose media giornaliera” integrata con i parametri tossicologici caratteristici dei diversi microinquinanti considerati.

Relativamente all’IR, il richiamato *survey* svolto e pubblicato dall’INRAN (16) fornisce una specifica stima dei consumi alimentari medi della popolazione italiana nel suo complesso, cui si è soliti ricorrere anche nelle stime svolte su una popolazione locale, come nel caso in studio, in-tendendo tali livelli di assunzione alimentare di determinate categorie di alimenti come “valori standardizzati” (utili in particolare nei confronti tra sottopopolazioni diversamente esposte, ma assumendo per le medesime, ai precipui fini dello studio, consumi alimentari simili o sovrapponibili).

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Poiché le “categorie di alimenti” utilizzate nel *survey* sono ampie ed, in particolare i prodotti ittici sono raggruppati nella voce generica di “*Fish and seafood, fresh and frozen*”, quindi senza discriminazione delle componenti quantitative di apporto specifico nella dieta di: pesci, molluschi (bivalvi) e crostacei, appare necessario scegliere il “Valore rappresentativo di concentrazione” (C), espresso in mg/kg di sostanza umida per ogni analita, ricorrendo al calcolo di una media ponderata dei tenori rilevati, sulla base della frazione che ciascun sottocomponente della categoria “prodotti ittici” ragionevolmente rappresenta nello specifico apporto alimentare del consumatore medio. Per esempio, i molluschi bivalvi (Cuori) ed granchi di estuario rappresentano sicuramente solo una piccola parte di tutte le matrici possibilmente afferenti alla relativa ed ampia “voce alimentare” di appartenenza e, perciò, un’attribuzione sovrastimata del consumo alimentare a tali due sottocomponenti non apparirebbe essere realisticamente rappresentativa. È necessario quindi ipotizzare proporzioni verosimili, mantenendosi comunque ragionevolmente al riparo dal rischio di una sottostima. Se si assume prudentemente che le proporzioni nel consumo locale di pesce, da un lato, e di molluschi bivalvi (Cuori) e granchi di estuario, dall’altro, possa ripartirsi nelle percentuali rispettivamente del 80% e nel complementare 20%, otteniamo le seguenti stime dei “Valori rappresentativi di concentrazione” (C) espressi in mg/kg di analita microinquinante presente nella parte edibile del mix considerato di prodotti ittici: As = 9,81; Cd = 0,072; Pb = 0,57; Hg = 0,01.

Ai fini della valutazione dell’esposizione è necessario infine disporre, sempre dai dati di letteratura (16) e per ciascuna delle tre classi d’età considerate, sia del corrispondente peso corporeo medio di riferimento, espresso in kg, sia dell’IR per la categoria “prodotti ittici”, espresso in grammi/giorno (g/d). Si può a questo punto calcolare la quantità di contaminante assunta quotidianamente, mediante l’apporto alimentare della voce “prodotti ittici” della Laguna di Boi Cerbus, moltiplicando i “Valori rappresentativi di concentrazione” (C) per l’Intake alimentare (IR) procapite. Nella tabella 2 è infatti riportata la stima della quantità di contaminante (C x IR) assunta quotidianamente tramite il consumo di prodotti ittici della Laguna di Boi Cerbus, espressa in mg/giorno (mg/d), per ciascun analita e per ciascuna delle tre fasce d’età considerate.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Tabella 2. Stima delle quantità di contaminanti assunti quotidianamente tramite la dieta per fasce d'età.

	C (mg/kg)	Bambini (3-9 anni d'età)		Giovani (10-17 anni d'età)		Adulti (18-64 anni d'età)	
		IR (g/d)	C x IR (mg/d)	IR (g/d)	C x IR (mg/d)	IR (g/d)	C x IR (mg/d)
Pb	0,57	37,2	0,0212	44,2	0,0252	39,9	0,0227
Cd	0,072		0,0027		0,0032		0,0029
Hg	0,01		0,0004		0,0004		0,0004
As	9,81		0,3649		0,4336		0,3914

La fase successiva della valutazione dell'esposizione prevede il calcolo del "Carico della dose media giornaliera" o *Average Daily Dose* (ADD), che rappresenta una stima quantitativa dell'esposizione dovuta potenzialmente all'ingestione di alimenti contaminati, espressa in termini di massa di contaminante per unità di peso corporeo per giorno (mg/Kg p.c. / giorno), ovvero la "dose giornaliera assunta attraverso la via alimentare"; si ottiene correlando la "quantità di contaminante assunta quotidianamente tramite la dieta" (C x IR) con altri parametri di esposizione. L'ADD è stata calcolata separatamente per le tre fasce d'età per le quali è stata effettuata la valutazione dell'esposizione, secondo la formula in uso come *Standard Time-Averaging* da parte dell'US-EPA (17):

$$ADD = \frac{(C \times IR) \times EF \times ED}{BW \times AT}$$

In tale formula, i restanti parametri rappresentano le seguenti variabili: EF (*Exposure Frequency*) indica la "Frequenza di esposizione", cioè il numero di giorni dell'anno in cui una persona viene a contatto con l'inquinante (esprimibile in giorni/anno); ED (*Exposure Duration*) indica la "Durata di esposizione" (esprimibile in anni di vita); BW (*Body Weight*) indica il peso corporeo in kg; AT (*Averaging Time*) indica il "Tempo sul quale l'esposizione è mediata" e si esprime in giorni vissuti. Osservando nel dettaglio tali parametri, si evidenzia che, relativamente alla variabile EF, è necessario prendere in considerazione una "Frequenza di esposizione" effettiva, o quanto più realistica possibile, per non sovrastimare il rischio oltre ogni ragionevole cautela. A tale proposito, si

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

consideri che in pratica nessuna delle specie campionate rappresenta un stock ittico disponibile/pescabile durante tutto l'anno ed è ragionevole attribuire al parametro EF un valore (anche cautelativamente largo) di non più di 4 mesi (120 giorni/anno) poiché lo sfruttamento produttivo della laguna è assimilabile ad una produzione primaria di tipo naturale, quindi con consumo dei prodotti ivi pescati/raccolti secondo un andamento assolutamente di tipo stagionale, anche se differenziato a seconda delle specie considerate. La "Durata di esposizione" (ED) è pari al numero effettivo di anni nei quali la popolazione è, o è stata, esposta all'ingestione di alimenti potenzialmente contaminati: nel caso in studio sono stati utilizzati i valori estremi (64 anni per gli "Adulti", 17 anni per i "Giovani" e 9 anni per i "Bambini") ovvero, cautelativamente, il valore massimo di ciascun arco nelle fasce d'età considerate. Per i "Pesi corporei" (BW) di riferimento sono stati utilizzati, per coerenza, i valori riportati nella richiamata letteratura scientifica (16) che: per gli "Adulti" di 18-64 anni fissa un peso corporeo medio di 69,7 kg, per i "Giovani" di 10-17 anni fissa quello di 52,6 kg ed, infine, per i "Bambini" di 3-9 anni fissa un peso medio di 26,1 kg. Il "Tempo sul quale l'esposizione è mediata" (AT) è pari alla durata effettiva dell'esposizione espressa in giorni; quindi, il valore da utilizzare per ciascuna fascia d'età sarà semplicemente quello ottenuto dal prodotto matematico dei giorni di un anno per la durata di esposizione ($365 \times ED$), ovvero: n° 23'360 giorni per la classe "Adulti", n° 6'205 giorni per i "Giovani" e n° 3'285 giorni per i "Bambini". Nell'ultima fase della procedura di valutazione dell'esposizione e calcolo del rischio, il fattore "esposizione" viene correlato con i "parametri tossicologici" al fine di stimare quantitativamente il rischio stesso. Il calcolo del rischio viene effettuato integrando la dose media giornaliera (ADD) con la *Reference Dose* (RfD), cioè il parametro tossicologico caratteristico dei microinquinanti considerati. Con RfD si intende la dose (concentrazione) di riferimento di sostanza tossica per la quale, in letteratura, non vengono riportati effetti avversi per l'uomo esposto alla sostanza medesima. La stima quantitativa del rischio inerente gli effetti tossici viene quindi effettuata con il rapporto ADD / RfD , dal quale otteniamo un "Indice di rischio" o HI (*Hazard Index*), che esprime il "valore relativo di quanto la dose media giornaliera assunta superi la dose di riferimento". I parametri tossicologici

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

devono necessariamente essere reperiti in Banche-Dati validate, aggiornate e riconosciute a livello internazionale e nel presente studio i valori di RfD sono stati reperiti nella banca dati ISS/ISPESL (18). Il valore di rischio così calcolato viene poi confrontato con i criteri di accettabilità del rischio stesso: per il rischio derivante da effetti tossici, il criterio di accettabilità consiste nel “non superamento del valore di RfD” (cioè $HI < 1$). Nella tabella 3 sono riportati i valori di *Average Daily Dose* (ADD) suddivisa per le tre fasce d’età, il parametro tossicologico caratteristico di ciascun microinquinante ed il valore di *Hazard Index* (HI) calcolato, anch’esso relativo a ciascuna fascia di età. Dai riportati si rileva che, per quanto attiene alle matrici comprese nella categoria alimentare dei “prodotti ittici” considerate nella valutazione del rischio, per ogni microinquinante considerato e per ciascuna delle tre fasce d’età, non si osserva il superamento del valore RfD e, quindi, potremo esprimere una giudizio favorevole relativamente al rischio da esposizione valutato secondo l’approccio US-EPA, ovviamente nelle condizioni sito-specifiche indagate.

Tabella 3. *Average Daily Dose* (ADD) suddivisa per fasce d’età, *Reference Dose* (RfD) per i microinquinanti considerati e calcolo dell’*Hazard Index* (HI) relativo.

	Fasce d’età	<i>Average Daily Dose</i> – ADD (mg/kg p.c. / giorno)	<i>Reference Dose</i> - RfD (mg/kg p.c. / giorno)	<i>Hazard Index</i> (HI = ADD / RfD)
Pb	Adulti (18-64 anni)	1,62E-5	3,50E-3 (*)	0,005
	Giovani (10-17 anni)	2,37E-5		0,007
	Bambini (3-9 anni)	4,03E-5		0,012
Cd	Adulti (18-64 anni)	4,23E-6	5,00E-4 (**)	0,01
	Giovani (10-17 anni)	6,21E-6		0,01
	Bambini (3-9 anni)	1,05E-5		0,02
Hg	Adulti (18-64 anni)	5,18E-8	3,00E-4 (***)	0,0002
	Giovani (10-17 anni)	7,61E-8		0,0003
	Bambini (3-9 anni)	1,29E-7		0,0004
As	Adulti (18-64 anni)	4,48E-5	3,00E-4 (****)	0,15
	Giovani (10-17 anni)	6,58E-5		0,22
	Bambini (3-9 anni)	1,12E-4		0,37

(*) **Pb**: fonte “Drinking Water Guidelines” (WHO, 1993);
(**) **Cd**: fonte IRIS - Integrated Risk Information System (US-EPA, last revised 1994);
(***) **Hg**: fonte IRIS - Integrated Risk Information System (US-EPA, last revised 1995);
(****) **As inorganico**: fonte IRIS - Integrated Risk Information System (US-EPA, last revised 1993).

Sulla base della vigente disciplina comunitaria sulla sicurezza alimentare, è stata effettuata un'ulteriore valutazione dell'esposizione, per i microinquinanti considerati, secondo l'approccio armonizzato europeo (EU) utilizzando il para-metro tossicologico *Provisional Tollerable Weekly Intake* (PTWI), che rappresenta la "Quantità massima di contaminante tollerabile settimanalmente" in funzione del peso corporeo dell'individuo. Per la valutazione secondo l'approccio EU, si è moltiplicato il valore di PTWI di ciascun analita per il peso corporeo ottenendo, così, la quantità settimanale tollerabile pro capite. Moltiplicando poi la quantità di contaminante assunta quotidianamente con la dieta (C x IR) per sette giorni, si ottiene il valore confrontabile con la quantità settimanale pro capite tollerabile. Già nei "considerato" del preambolo al Regolamento comunitario che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (15) sono richiamati i PTWI per Pb, Cd e Hg approvati a livello internazionale, nella misura rispettivamente di 25 µg/kg di peso corporeo (12), di 7 µg/kg di peso corporeo (7) e di 1,6 µg/kg di peso corporeo (14), per settimana. Pur se non considerato nel predetto Regolamento comunitario, la valutazione dell'esposizione secondo l'approccio EU è stata effettuata anche per l'As, per il quale il JECFA ha stabilito un PTWI di 15 µg/kg di peso corporeo (5), sempre per settimana.

Tabella 4. Confronto tra i valori di PTWI e gli Intake stimati per Pb, Cd, Hg e As.

	Fasce d'età	PTWI x kg di peso corporeo (µg/pro capite / settimana)	Intake settimanale stimato (µg/pro capite / settimana)	Valore dell'Intake rispetto al PTWI
Pb	Adulti (18-64 anni)	1'743	53	0,03
	Giovani (10-17 anni)	1'315	58	0,04
	Bambini (3-9 anni)	653	49	0,08
Cd	Adulti (18-64 anni)	488	7	0,01
	Giovani (10-17 anni)	368	7	0,02
	Bambini (3-9 anni)	183	6	0,03
Hg	Adulti (18-64 anni)	112	1	0,01
	Giovani (10-17 anni)	84	1	0,01
	Bambini (3-9 anni)	42	3	0,06
As	Adulti (18-64 anni)	1'046	900	0,86
	Giovani (10-17 anni)	789	998	1,26
	Bambini (3-9 anni)	392	840	2,15

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Nella tabella 4 sono stati quindi riportati i predetti valori del PTWI espressi in funzione dei pesi corporei relativi a ciascuna delle tre fasce d'età, l'*Intake* pro capite stimato settimanalmente ed il valore relativo dell'*Intake* stesso rispetto ai valori di PTWI. Affinché sia giudicato accettabile, tale rapporto non deve superare, anche in questo caso, l'unità (cioè $Intake/PTWI < 1$). Si rileva che il valore di PTWI è superato solamente per l'As nei "Bambini", per oltre il doppio, e nella fascia d'età "Giovani", per un 26% in più della dose accettabile. I valori dell'*Intake* stimati per gli altri analiti, nelle tre fasce d'età considerate sono relativamente bassi, compresi tra il valore minimo del Cd per gli "Adulti", pari all'1% del PTWI, a quelli del Pb nei "Bambini", pari all'8% del relativo PTWI.

Considerazioni e conclusioni

Per l'analisi del rischio sanitario attraverso l'assunzione alimentare, sono state considerate tre diverse procedure di valutazione dell'esposizione: la valutazione secondo normativa, la valutazione secondo l'approccio US-EPA e la valutazione secondo l'approccio armonizzato EU. Va considerato innanzitutto che la normativa disciplinante i tenori massimi sulle derrate alimentari di alcuni contaminanti non comprende tutti gli analiti indagati nel caso in studio (è infatti escluso l'As) e, pertanto, la valutazione dell'esposizione secondo normativa deve essere comunque integrata con altri approcci valutativi. Inoltre, riferendoci al Pb, le matrici per le quali si riscontra una concentrazione media superiore al valore limite normato (molluschi bivalvi e granchi), assume invece un profilo di relativa "accettabilità" qualora si proceda con altri approcci, meglio ponderati (ai fini della valutazione dell'esposizione) sull'*Intake* alimentare effettivo e su "gruppi a rischio", come possono esserlo le diverse fasce d'età. Si tenga inoltre presente che si è implicitamente partiti dall'assunzione (estremizzata) che il consumo locale dei prodotti ittici provenga unicamente dall'area oggetto di indagine, attribuendo quindi l'intero valore dei consumi (IR) ai prodotti alimentari monitorati. È stato invece ponderato il consumo delle sottocategorie di prodotti ittici: relativamente alla voce "molluschi bivalvi / Cuori" e "granchi di estuario" (già valutati "critici" sotto il profilo dei limiti normati, per i tenori di Pb) e a quella dei "ghiozzi go", a cui si uniscono in ragione dei relativi alti tenori di As (non speciato) riscontrati, si è infatti

ritenuto eccessivo attribuire loro l'intero IR della "Voce alimentare" alla quale afferiscono. Tuttavia, allo stato attuale delle informazioni sito-specifiche e dall'insieme delle valutazioni effettuate, appare appropriato sotto il profilo della "gestione del rischio" non consentire, cautelativamente, la pesca/raccolta di molluschi bivalvi e di granchi di estuario nella laguna di Boi Cerbus e zone limitrofe.

In sintesi quindi, per una più ampia possibilità di valutazione del rischio sanitario connesso all'ingestione di alimenti provenienti da aree compromesse a livello ambientale, anche ai fini della gestione del rischio considerato, non è da ritenersi sufficiente il ricorso ad un unico approccio valutativo del rischio stesso. Infatti, con il presente lavoro si è potuto evidenziare che, dalla valutazione secondo la vigente normativa, si ha il superamento dei limiti fissati per il Pb in alcune matrici monitorate; dalla valutazione del rischio sanitario effettuata secondo l'approccio US-EPA, con i parametri utilizzati, non si evidenzia invece rischio per nessuno degli analiti considerati; mentre con la valutazione secondo l'approccio EU si evidenzia il rischio ipotetico dovuto all'As per le fasce d'età più basse (identificabili quindi come "gruppi a rischio"). Tuttavia, relativamente a tale rischio ipotetico va rimarcata l'assoluta importanza di effettuare la speciazione chimica dei composti dell'As per ogni valutazione del rischio ad esso associato in quanto, come è noto, la sua tossicità è strettamente connessa con la forma chimica in cui tale elemento si presenta: i composti organici sono infatti generalmente molto meno tossici di quelli inorganici. Nei pesci e nei crostacei l'As si trova infatti principalmente sotto forma organica di arsobetaina, considerata virtualmente non tossica, mentre nei molluschi e nelle alghe l'As è presente principalmente come arsenozuccheri, la cui tossicità è meno conosciuta, ma si ritiene sia anch'essa ragionevolmente molto bassa.

Bibliografia e documenti di riferimento

- (1) Piras PL, Mulas GF, 2011. *Ital J Food Safety* 1: 31-36
- (2) Cooperation on questions relating to food, 2004. Report of experts participating in Task 3.2.11 - Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States [125 pp.] (http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf)

- (3) WHO Food Additives Series, 1989. Safety evaluation of certain food additives and contaminants - Prepared by the Thirty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 24 - Arsenic: 155-219 (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je08.htm>)
- (4) Michel P, 1993. L'arsenic en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) - Reperes Ocean 4 [65 pp.] (<http://archimer.ifremer.fr/doc/1993/rapport-1448.pdf>)
- (5) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food (EFSA-Q-2008-425) - EFSA Journal 7(10): 1351 [199 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/1351.pdf>)
- (6) WHO Food Additives Series, 2004. Safety evaluation of certain food additives and contaminants - Prepared by the Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 52 - Cadmium: 505-563 (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052x.pdf>)
- (7) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2009. Scientific Opinion of the Cadmium in food (EFSA-Q-2007-138) - EFSA Journal 9(8): 1-139 (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/980.pdf>)
- (8) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2011. Statement on tolerable weekly intake for cadmium (EFSA-Q-2010-01008) - EFSA Journal 9(2): 1975 [19 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/1975.pdf>)
- (9) EFSA Scientific Report, 2011. Comparison of the Approaches Taken by EFSA and JECFA to Establish a HBGV for Cadmium (EF-SA-Q-2010-01135) - EFSA Journal 9(2): 2006 [28 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/2006.pdf>)
- (10) WHO Food Additives Series, 2000. Safety evaluation of certain food additives and contaminants - Prepared by the Fifty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 44 - Lead: 965-986 (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec12.htm>)
- (11) Cossa D, El-baz-Poul F, Gnassia-Barelli M, Romeo M, 1993. Le plomb en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) - Reperes Ocean 3 [77 pp.] (<http://archimer>.

ifremer.fr/doc/1993/rapport-1449.pdf)

- (12) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2010. Scientific Opinion on Lead in Food (EFSA-Q-2007-137) - EFSA Journal 8(4): 1570 [147 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/1570.pdf>)
- (13) WHO Food Additives Series, 2004. Safety evaluation of certain food additives and contaminants - Prepared by the Sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 52 - Methylmercury: 565-623 (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052x.pdf>)
- (14) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2004. Scientific Opinion related to mercury and methylmercury in food (EFSA-Q-2003-030) - EFSA Journal 34, 1-14 (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/34.pdf>)
- (15) Regolamento (CE) n. 1881/2006 [della Commissione] del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - (G.U.C.E. 20/12/2006, L 364: 5-24) modificato dal Regolamento (CE) n. 629/2008 (G.U.C.E. 03/07/2008, L 137: 6-9) - testo consolidato (<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701IT:PDF>)
- (16) Leclercq C, Arcella D, Piccinelli R, Sette S, Le Donne C, Turrini A, 2009. The Italian National Food Consumption Survey INRAN-SCAI 2005-06: main results in terms of food consumption. *Pub Health Nutr* 12(12): 2504-2532 (<http://journals.cambridge.org/action/displayFulltext?type=1&fid=6574248&jid=PHN&volumeId=12&issueId=12&aid=6574240&bodyId=&membershipNumber=&societyETOCSession>)
- (17) Risk Assessment Guidance for Superfund: Volume III - Part A, 2001. Process for Conducting Probabilistic Risk Assessment - Appendix D - Advanced Modeling Approaches for Characterizing Variability and Uncertainty - Office of Emergency and Remedial Response - U.S. EPA 540-R-02-002 [27 pp.] (<http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/rags3adt/pdf/appendixd.pdf>)
- (18) APAT (Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i Servizi Tecnici), 2008. Criteri metodologici per l’applicazione dell’analisi assoluta di rischio ai siti contaminati - Appendice O (Rev. 2): 11-16 (http://www.isprambiente.gov.it/site/_files/temi/Banca_dati_ISS_ISPESL_Maggio_2009.xls)

2.2.2 Valutazione comparativa tra diversi approcci nell'analisi del rischio da esposizione per via alimentare a contaminanti presenti su bioti marini eduli in un'area estrattivo-industriale del Sulcis-Iglesiente

Short communication / poster, 2011. VI Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria. *ISTISAN Congressi 11/C8*: 128-129 (http://www.iss.it/binary/publ/cont/11_C8.pdf)

Piras Pierluigi, Mulas Gianfranco*

* Servizio Ambiente del Comune di Portoscuso (con finanziamento dell'Assessorato Difesa Ambiente della Regione Sardegna per il Piano di Disinquinamento del Sulcis-Iglesiente)

Valutazione comparativa tra diversi approcci nell'analisi del rischio da esposizione per via alimentare a contaminanti presenti su bioti marini eduli in un'area estrattivo-industriale del Sulcis-Iglesiente

Pierluigi Piras⁽¹⁾, Gianfranco Mulas⁽²⁾

⁽¹⁾ Scuola di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Univ. Sassari
⁽²⁾ Servizio Ambiente del Comune di Portoscuso (per il Piano E.A.S. di Disinquinamento del Sulcis-Iglesiente)

⁽³⁾ Facoltà di Med. Veterinaria - Dip. Biologia Animale - Istituto di Ispazione degli Alimenti di Origine Animale sede: Via Vienna n. 2 - 07100 - Sassari; tel. +39 079 227464; fax +39 079 227458; E-mail: dottofood@uniss.it

Introduzione

L'indagine interessa un'area storicamente conosciuta come estrattivo-mineraria (Sulcis-Iglesiente) ed industriale-metalurgica (Polo di Portovesme) ad alto rischio di contaminazione da metalli pesanti. In tale area (fig. 1), la laguna di Boi Cerbus (e relativa peschiera) è stata individuata come sito strategico per la valutazione di tali contaminazioni su bioti marini eduli. L'indagine, inizialmente orientata alla "caratterizzazione del rischio", con un numero consistente di analisi e raccolta-dati "sito-specifici", nel 2008-2009 aveva riguardato principalmente le matrici ambientali (sedimenti ed acque) e solo integrativamente i prodotti ittici. Con i protocolli di campionamento svolti nel 2010 e replicati nel 2011, il piano di bio-monitoraggio si è quindi affinato includendo la valutazione del rischio sanitario da esposizione alimentare ai c.d. elementi "in traccia", quali: Arsenico (As), Cadmio (Cd), Piombo (Pb) e Mercurio (Hg), che continuano a destare particolare preoccupazione per il potenziale impatto sulla salute, come dimostra la costituzione nel 2002-2003 della Task 3.2.11 su "Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States". Nel presente lavoro sono state considerate in parallelo due diverse procedure: l'approccio valutativo secondo il modello statunitense (US-EPA) e quello secondo il modello armonizzato europeo (CE), al fine di farne una valutazione, anche comparativa, del loro utilizzo "sul campo".

Metodi

Sono stati campionati: pesci (cefali, bivalvi e teleostei), spigole, sogliole e ghiozzi, molluschi bivalvi (cochi) e crostacei (granchi), analizzando in totale n. 65 pool (tab. 1), rappresentativi di ogni singola colata di pesca raccolta. Il campionamento e la preparazione dei pool sono stati svolti da TecnoLab S.r.l. in Associazione Temporanea d'Impresa con RSC Lab S.r.l., accreditato UNI CEI EN 17025 per l'esecuzione di analisi con prove su diverse matrici, anche biologiche, per studi ambientali con le seguenti metodiche: EPA-4020A/2007 con tecnica ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) per l'analisi di As, Cd e Pb, ed EPA-1631/2007 con tecnica DMA (Direct Mercury Analyzer; prod. Milestone, Inc.) per l'analisi del Hg.

Il primo approccio di "Exposure Assessment" adottato è conosciuto come "Standard Time-Averaging US-EPA" e segue le tappe di: stima dell'Intake alimentare procapite IR (Intake Rate) e della "quantità complessiva di contaminante quotidianamente assunta tramite dieta" (C x IR), completata dalla stima della "dose media giornaliera" ADD (Average Daily Dose) che pondera un complesso di altre variabili (vedi formula qui sopra). Il calcolo del rischio viene effettuato rapportando la ADD con la Reference Dose (RD), cioè la dose di riferimento (reperibile nella banca dati ISS/EFSA) di sostanza tossica per la quale, in letteratura, non vengono riportati effetti avversi.

L'approccio CE utilizza invece il Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI), che rappresenta la "quantità massima di contaminante tollerabile settimanalmente", sempre in funzione del peso corporeo. I valori di PTWI per As, Cd, Pb e Hg, sono pubblicati dall'EFSA sulle relative Opinion del Panel CONTAM. Si quantifica il rischio rapportando l'Intake settimanale (C x IR x 7) con i valori di PTWI.

Risultati

Relativamente alle matrici ittiche considerate nell'analisi del rischio, per ogni microcontaminante e per ciascuna delle 3 fasce d'età, dai risultati ottenuti col metodo US-EPA (tab. 2) non si osserva il superamento della RD, potendo quindi orientare il giudizio verso l'accettabilità del rischio, ovviamente nelle condizioni sito-specifiche indagate. Secondo l'approccio CE si è invece rilevata (tab. 3) che il valore di PTWI risulta superato, relativamente all'As, di quasi il doppio (153) nei "bambini" ed eccedente per un 1,5 la dose accettabile nella fascia di età "giovani".

Conclusioni

Anche la valutazione "sul campo" del rischio connesso al consumo di alimenti provenienti da aree compromesse a livello ambientale richiede il ricorso a diversi approcci. Ris è potuto infatti evidenziare come l'approccio CE risulti comparativamente più "sensibile" tra le due procedure. Tuttavia, relativamente al rischio potenziale dell'As per le fasce d'età più basse (identificati quindi come "gruppi a rischio") nella fattispecie va precisato l'impostazione di valutazione o ricerca provvedendo ad effettuare anche la speciazione chimica dei composti del Pb in quanto, come è noto, la sua tossicità è strettamente connessa con la forma chimica nella quale si presenta nelle matrici alimentari ittiche.

Tab. 1

specie di Matriglii	bivalvi "Cochi"	granchi di estivo	Gobidi (ghiozzi go)	spigole o branzini	sogliole comuni
da n° 21 pool	da n° 21 pool	da n° 18 pool	da n° 3 pool	da n° 3 pool	da n° 2 pool
As 4,31 (± 2,33)	20,66 (± 4,77)	31,75 (± 3,74)	23,41 (± 4,28)	1,14 (± 0,26)	5,90 (± 0,78)
Cd 0,013 (± 0,001)	0,286 (± 0,137)	0,125 (± 0,062)	0,012 (± 0,000)	0,012 (± 0,000)	0,012 (± 0,000)
Pb 0,12 (± 0,09)	4,16 (± 1,24)	0,64 (± 0,16)	0,11 (± 0,02)	0,02 (± 0,00)	0,05 (± 0,01)
Hg 0,01 (± 0,00)	0,02 (± 0,01)	0,05 (± 0,04)	0,02 (± 0,00)	0,05 (± 0,02)	0,01 (± 0,00)

Tab. 2

Fasce d'età	ADD	RD	Percentuale (ADD/RD)
As			
Adulti (18-64 anni)	4,14E-5	0,14	0,29
Giovani (10-17 anni)	6,09E-5	3,00E-4	0,20
Bambini (3-9 anni)	1,05E-4	0,26	0,40
Cd			
Adulti (18-64 anni)	3,59E-4	0,01	0,01
Giovani (10-17 anni)	5,27E-4	5,00E-4	1,05
Bambini (3-9 anni)	1,89E-5	0,02	0,09
Pb			
Adulti (18-64 anni)	1,40E-5	0,005	0,28
Giovani (10-17 anni)	2,35E-5	3,50E-3	0,67
Bambini (3-9 anni)	3,98E-5	0,011	0,36
Hg			
Adulti (18-64 anni)	1,02E-7	0,0003	0,03
Giovani (10-17 anni)	1,49E-7	3,00E-4	0,05
Bambini (3-9 anni)	2,54E-7	0,0008	0,03

Tab. 3

Fasce d'età	PTWI (mg/kg peso corporeo/anno)	Valore accettabile (PTWI)
As		
Adulti (18-64 anni)	1,046	0,77
Giovani (10-17 anni)	789	1,14
Bambini (3-9 anni)	392	1,93
Cd		
Adulti (18-64 anni)	468	5,01
Giovani (10-17 anni)	348	6,02
Bambini (3-9 anni)	183	5,03
Pb		
Adulti (18-64 anni)	743	5,02
Giovani (10-17 anni)	1,315	6,03
Bambini (3-9 anni)	653	4,7
Hg		
Adulti (18-64 anni)	112	2,03
Giovani (10-17 anni)	64	2,04
Bambini (3-9 anni)	42	0,07

Introduzione. In accordo col piano di bonifica sostenuto dalla Regione Sardegna, il Comune di Portoscuso ha avviato un programma di monitoraggio in un'area storicamente conosciuta come estrattivo/mineraria (Sulcis-Iglesiente) ed industriale/metalurgica (Polo di Portovesme) ad alto rischio di contaminazione da metalli pesanti. In tale area, la laguna di Boi Cerbus (e relativa peschiera) è stata individuata come sito strategico per la valutazione di tali contaminazioni su bioti marini eduli. Una

vasta indagine orientata alla "caratterizzazione del rischio", con un numero consistente di analisi e raccolta-dati "sito-specifici" conclusasi nel 2009, ha riguardato principalmente le matrici ambientali (sedimenti, acque) e solo integrativamente i prodotti ittici. Con i protocolli di campionamento svolti nel 2010 e replicati nel 2011, il piano di bio-monitoraggio si è quindi affinato includendo la valutazione del rischio

sanitario da esposizione alimentare ai c.d elementi “in traccia”, quali: Piombo (Pb) Cadmio (Cd), Mercurio (Hg) e Arsenico (As), che continuano a destare particolare preoccupazione per il potenziale impatto sulla salute, come dimostra la costituzione nel 2002-2003 della Task 3.2.11 su “Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States”. Nel presente lavoro sono state considerate in parallelo due diverse procedure: l’approccio valutativo secondo il modello statunitense (US) dell’Environmental Protection Agency (EPA) e quello secondo il modello armonizzato della Comunità Europea (CE), al fine di poterne fare una valutazione, anche comparativa, del loro utilizzo “sul campo”.

Metodi. Sono stati campionati: pesci (cefali, botoli e lotregani, spigole, sogliole e ghiozzi), molluschi bivalvi (cuori) e crostacei (granchi), analizzando n. 65 pool (rappresentativi di ogni singola calata di pesca/raccolta). Campionamento e preparazione dei pool sono stati svolti dalla TecnoLab S.r.l. (<http://www.tecno-chem.it>) in A.T.I. (Associazione-Temporanea-d’Impresa) con R&C Lab S.r.l. (<http://www.rclabsrl.it>) accreditato Uni/Cei/En 17025, per l’esecuzione delle analisi con prove su matrici varie, anche biotiche, per studi ambientali con metodiche: EPA-6020A/2007 (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/6020a.pdf>) con tecnica ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) per l’analisi di As, Cd e Pb, e EPA-7473/2007 (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7473.pdf>) con tecnica DMA (*Direct Mercury Analyzer; prod. Milestone, Inc.*) per il Hg, valutate nel contesto dall’ISPRA come idonee allo scopo. Il primo approccio di “Exposure Assessment” adottato è conosciuto come “Standard Time-Averaging US-EPA” e segue le tappe di: stima dell’Intake alimentare procapite IR (Intake Rate) e della “quantità complessiva di contaminante quotidianamente assunta tramite dieta” ($C \times IR$), completata dalla stima della “dose media giornaliera” ADD (Average Daily Dose) che pondera un complesso di altre variabili (Exposure Frequency and Duration, Averaging Time, ecc.). Il calcolo del rischio viene effettuato rapportando la ADD con la Reference Dose (RfD), cioè la dose di riferimento (reperibile nella banca dati aggiornata ISS/ISPESL) di sostanza tossica per la quale, in letteratura, non vengono riportati effetti avversi per l’uomo. L’approccio CE utilizza invece il Provisional Tollerable Weekly

Intake (PTWI), che rappresenta la “quantità massima di contaminante tollerabile settimanalmente”, sempre in funzione del peso corporeo. I valori di PTWI per Pb, Cd, Hg e As, sono pubblicati dall’EFSA sulle relative Scientific Opinion del Panel CONTAM. Si quantifica il rischio rapportando l’Intake settimanale ($C \times IR \times 7$) con i valori di PTWI. Affinché siano giudicati accettabili, i rapporti conclusivi dei due approcci considerati non devono superare l’unità (cioè $ADD/RfD < 1$ ed $Intake\text{-}sett./PTWI < 1$). In entrambi gli approcci è stata considerata l’esposizione per tre fasce d’età: 3-9, 10-17 e 18-64 anni, con riferimento al “peso corporeo medio” ed ai “consumi alimentari medi” degli italiani ricavabili dal survey INRAN-SCAI del 2005-2006.

Risultati. Relativamente alle matrici della categoria “prodotti ittici” considerate nell’analisi del rischio, così come normativamente definite (muscolo di pesce, parte edibile di molluschi bivalvi e carni bianche dell’addome di granchi), per ogni microinquinante considerato e per ciascuna delle tre fasce d’età, dai risultati ottenuti col metodo US-EPA, non si osserva il superamento della RfD, potendo quindi orientare il giudizio verso l’accettabilità del rischio, ovviamente nelle condizioni sito-specifiche indagate. Secondo l’approccio CE si è invece rilevato che il valore di PTWI risulta superato, relativamente all’As, di quasi il doppio (1,93) nei “Bambini” ed eccedente per un 14% la dose accettabile nella fascia d’età “Giovani”.

Conclusioni. Anche la valutazione “sul campo” del rischio sanitario connesso all’ingestione di alimenti provenienti da aree compromesse a livello ambientale richiede, anche ai fini della gestione del rischio, il ricorso a diversi approcci. Con il presente lavoro si è potuto rilevare che la valutazione del rischio sanitario effettuata secondo l’approccio US-EPA non ha evidenziato rischio per nessuno degli analiti considerati, mentre con la valutazione secondo l’approccio CE, dimostratosi comparativamente più “sensibile”, si è evidenziato il rischio potenziale dovuto in particolare all’As per le fasce d’età più basse (identificabili quindi come “gruppi a rischio”). Tuttavia, nella fattispecie va precisata l’importanza di sviluppare la ricerca provvedendo ad effettuare anche la speciazione chimica dei composti dell’As in quanto, come è noto, la sua tossicità è strettamente connessa con la forma chimica nella quale si presenta nelle matrici alimentari ittiche.

2.2.3 Caratterizzazione del rischio e valutazione dell'esposizione alimentare a microinquinanti ambientali monitorati su biota acquatico: esperienze di campo nel SIN del Sulcis-Iglesiente

Oral communication, 2012. 1° Forum Internazionale Sviluppo-Ambiente-Salute. Atti *Forum Risk Management*: 195-197

(http://www.forumriskmanagement.it/immagini/2013/AS_ATTI_2012.pdf)

Piras Pierluigi

Abstract

Il tema specifico dei “microinquinanti e catena alimentare: valutazione del rischio sanitario” si inserisce in quello vasto della prevenzione primaria. Oggi, più che mai, incombente la *spending review*, è necessario chiedersi non solo quanto costa la prevenzione (intesa come sistema di servizi), ma anche quanto costa la mancata prevenzione (in termini di malattie evitabili). Non di meno, anche le pratiche “inutili” (intese come “prive di efficacia” scientificamente dimostrabile) e/o “obsolete” in uso ancora nei servizi di prevenzione, non vogliamo considerarle come costi immotivati? Le pratiche di prevenzione “inefficaci” rappresentano infatti un costo che distoglie dall’utilizzo appropriato delle risorse. Il problema infatti non è tagliare, ma ri-orientare le risorse. Il primo aspetto del mio intervento è infatti finalizzato a recuperare la nostra *mission*: ricercare ed implementare gli strumenti più idonei (buone pratiche) per diminuire l’incidenza/prevalenza di malattie. Questo è in tutta onestà il lavoro “di campo” dei Servizi di Prevenzione, compresi ovviamente quelli Veterinari. Il secondo aspetto è correlato col primo: alcuni approcci di ampio respiro nelle azioni di Sanità Pubblica Veterinaria, come lo è il quadro concettuale dell’analisi del rischio nell’ambito della sicurezza alimentare, possono apparire (ed essere di fatto considerati) temi “accademici”, ma che, secondo me (sto infatti svolgendo un Dottorato di Ricerca), se opportunamente declinati in un ambito locale, vanno a caratterizzare il profilo epidemiologico locale, che è premessa e strumento principe per fare prevenzione efficace. I Servizi Veterinari del Sistema Sanitario non possono essere concepiti e comportarsi solo come un “servizio d’attesa”, con scarsa o nulla pro-attività e quindi

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

(ricorrendo ad una efficace figura retorica) lavorando fondamentalmente come il “giorno della pentolaccia”, bendati e colpendo al buio. È necessario invece caratterizzare il rischio ed avere le priorità locali, all’interno ovviamente di uno scenario nazionale ed internazionale di politiche per la salute. Passando dalla caratterizzazione del rischio alla valutazione del rischio, attraverso percorsi metodologici codificati, è importante avere chiaro come l’analisi del rischio sia necessariamente la premessa alla gestione del rischio. Se non vogliamo colpire alla cieca, la gestione del rischio significa che dobbiamo opportunamente caratterizzare e valutare il rischio. Da tale modello concettuale (cioè di come dalla sorgente, con il trasporto e l’impatto col “bersaglio”) l’attenzione spazia dal livello ambientale verso il rischio effettivo sulla persona. La mia relazione, che è quindi anche il tentativo metodologico di lavorare in ambito locale, si basa quindi su tali considerazioni. L’idea è stata quindi valutare in che termini la focalizzazione dell’attenzione sulla laguna di Boi Cerbus e sugli organismi acquatici che ci abitano possa rappresentare sia l’obiettivo di un eventuale inquinamento, ma anche la misura e la “lettura” di un eventuale inquinamento. Un altro elemento di riflessione è legato all’utilizzo dei sistemi di sorveglianza. Spesso non sono i dati l’elemento che scarseggia in tali sistemi, ma è il fatto che non si sappiano “interrogare” efficacemente (sempre ricorrendo a una figura retorica, si dice che bisogna “torturarli fino a che non parlino”). Un’altra delle fonti di risparmio (ed efficace utilizzo) della prevenzione è infatti quella di utilizzare i dati generati dai flussi correnti dei vari piani di monitoraggio e sorveglianza per poter ricavare informazioni utili per le azioni di sanità pubblica. Nella caratterizzazione e valutazione del rischio per esposizione alimentare da produzioni primarie situate in aree contaminate, anche ai fini della gestione del rischio stesso, non appare quindi sufficiente verificare solo il rispetto dei tenori massimi di alcuni contaminanti così come normativamente definiti. Dobbiamo “osare” di più: la valutazione del rischio, anche ai fini della gestione del rischio, è infatti anche compito dell’autorità competente, su tutti i livelli (nazionale, regionale e territoriale), ricorrendo a metodologie che garantiscano rigore scientifico, validate a livello internazionale e che aggiungano informazioni, in particolare, su aspetti quantitativi del rischio e sulla individuazione dei gruppi di popolazione a rischio.

2.3.1 Cadmium in tissue of gray mullets (*Mugil sp.* and *Liza spp.* of Mugilidae Family) from Boi Cerbus lagoon, near a mining and industrial area located in Southwestern Sardinia, Italy

Short communication / poster, 2012. International Cadmium Symposium. *Abstract book*: 49 [Topic: Food chain, ID: 7] (<http://www.cadmiumsymposium2012.uniss.it/>)

Piras Pierluigi, Mulas Gianfranco¹, Cossu Maurizio²

¹ Servizio Ambiente del Comune di Portoscuso (con finanziamento dell'Assessorato Difesa Ambiente della Regione Sardegna per il Piano di Disinquinamento del Sulcis-Iglesiente)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

CADMIUM IN TISSUE OF GRAY MULLET (*Mugil cephalus* AND *Liza* spp. OF MUGILIDAE FAMILY) FROM BOI CERBUS LAGOON, NEAR A MINING AND INDUSTRIAL AREA LOCATED IN SOUTHWESTERN SARDINIA, ITALY

Pierluigi Piras¹, Gianfranco Mulas¹ and Maurizio Cossu²

¹Scuola di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Univ. Sassari
²Servizio Ambiente del Comune di Portoscuso (per il Piano R.A.S. di Disinquinamento del Sulcis-Iglesiente)
³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff", Via Vienna n. 2 - 07100 - Sassari, Italy
⁴Facoltà di Med. Veterinaria - Dip. Biologia Animale - Istituto di Ispazione degli Alimenti di Origine Animale sede: Via Vienna n. 2 - 07100 - Sassari; tel:39 079 229466, fax: +39 079 229456, E-mail: dottfood@uniss.it

Background and aims
 The Boi Cerbus lagoon is a place in the Sulcis-Iglesiente coastal zone in the southwestern Sardinia (map 1). It is located within a wide region characterized by a industrial and mining activity that has produced in the past a high chemical contamination and environmental risk. Heavy metals are the main chemical contaminants and also the main source of risk for health population and for the quality of the environment. This is the reason why the living organisms have become a very important instrument, to performing monitoring planes. Gray mullets fishes are well recognized as bioindicators (1) of the environmental changes and for chemical pollution individuation. Since they have various living habits and feed with a wide variety of foods, they are exposed to chemical contamination from different sources, including the water and sediments. Therefore they are an important link between the environment and public health. As the other heavy metals, Cadmium (Cd) is susceptible to bioaccumulation (2), accounting a risk to food safety (3). In literature are reported numerous studies of Cd analysis in fishes (4), in particular Mugilidae, performed in different coastal and lagoon areas of Mediterranean sea, such as Italian (5,6) and Tunisian (7), Libyan (8), Egyptian (9) and Turkish (10).

The aim of this study was to investigate the Cd levels in sediments, water and tissue of gray mullets (identified as *Mugil cephalus* or 'flathead mullet', *Liza ramada* or 'thinlip mullet' and *Liza aurata* or 'golden gray mullet', of Mugilidae Family) for evaluating the environmental contamination of the Boi Cerbus lagoon.

Methods
 The studied area of Boi Cerbus lagoon has an extension of about 3.5 km². It receives contribution from a small stream Paringianu. The sampling was conducted seasonally during 3 years, from autumn 2008 to spring 2011. Are been collected 18 samples of superficial sediments, 18 samples of lagoon water and 30 pool samples of Mugilidae fishes. Sampling, analysis and statistical reports has been performed in according to standard procedures of ICRAM (Italian Central Institute for Applied Marine Research) by certified laboratories (TechnoLab S.r.l. in consortium enterprise with R&C Lab S.r.l.). Analytical procedures used were EPA-3052/1996 with EPA-6010C/2007 for Cd in sediments and EPA-6020A/2007 for water and biological tissues.

Results
 Cd was detected in all samples analyzed, concentrations range were 0.304 ± 1.217 µg/l in lagoon saltwater and 20.68 ± 20.38 mg/kg DW in surface sediments. The spatial variability of physical-chemical parameters is represented by contouring with the method of interpolation 'kriging' as shown in map 2. The zones 16M and 7M show the larger amount of fraction clay/silt, respectively of 73% and 68.5%. The highest values of Cd were found in same spots (map 3), confirming that the metal is concentrated in the silt fractions of the sediment and in the overlying water column.

Conclusions
 The investigations carried out in the plan of survey of the Boi Cerbus lagoon confirmed a conceptual model of migration of Cd. A punctual source of contamination was detected in the immission point of stream Paringianu. Concentration of Cd in liver of gray mullets, much higher (not less than ≈50 times) than the corresponding muscle, can be correlated to the level of the environmental contamination. Therefore, high level found in the sediment produces a significant concentration of this heavy metal in liver of benthic feeding and limnorous species as Mugilidae Family. The results obtained also indicate that these kind of gray mullets species could be used as biological indicators. All sample values don't exceed the European regulatory limit (11) for Cd in muscle meat of fish (<0.050 mg/kg FW). Therefore results obtained show that the metal contents in muscles of species analyzed are not of concern for human health.

References
 (1) Bologna C. et al. (2020) Ecot Ind. 6: 712-732. (2) Scientific Opinion of the EFSA Panel on CONTAM (2008) Contaminants in Food. The EFSA Journal 6(1): 1-134. (3) Scientific Report of EFSA (2012) Cadmium: dietary exposure in the European population. The EFSA Journal 14(11): 2911-2927. (4) Ciceri R. (2016) Contamination of three metals and arsenic in the fish species *Sparus aurata* (L.) and *Liza aurata* (L.) from the Sicilian coast. (5) Costa P. et al. (2003) Chemosphere 52: 2313-2318. (6) Chouaki L. et al. (2007) Harm. Environ. Bull. 4: 45-52. (7) Mennedy M.A. et al. (2006) Global Vet 2(3): 305-311. (8) Zahreddine M. et al. (2008) J Appl Sci Res 3(7): 965-972. (9) Chouaki L. et al. (2007) Harm. Environ. Bull. 4: 45-52. (10) Ghazal L.M. et al. (2008) Global Vet 2(3): 305-311. (11) Commission Regulation (EC) No 1831/2003 of October 24, 2003 concerning the maximum permitted levels of certain contaminants in or on food of animal origin.

Sassari - 2012
 Cadmium Symposium

Background and aims. The Boi Cerbus lagoon is a place located in the Sulcis-Iglesiente, coastal zone in the southwestern Sardinia. It is located within a wide region characterized by a industrial and mining activity that has produced in the past a high chemical contamination and environmental risk. Heavy metals are the main chemical contaminants and also, the main source of risk for health population and for the quality of the environment. The detection and the effects in the living organisms

has become a very important instrument to performing monitoring planes. Gray mullets fishes are well recognized as bioindicators (1) of the environmental changes and for chemical pollution individuation. Since they have various living habits and feed with a wide variety of foods, they are exposed to chemical contamination from different sources, including the water and sediments. Therefore they are an important link

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

between the environment and public health. As the other heavy metals, Cadmium (Cd) is susceptible to bioaccumulation (2), accounting a risk to food safety (3). In literature are reported numerous studies of Cd analysis in fishes, in particular Mugilidae, performed in different coastal and lagoon areas of Central and Eastern Mediterranean sea, such as Italian (4, 5) and Tunisian (6), Libyan (7), Egyptian (9) and Turkish (9). The aim of this study was to investigate the Cd levels in sediments, water and tissue of gray mullets (identified as *Mugil cephalus* or “flathead mullet”, *Liza ramada* or “thinlip mullet” and *Liza aurata* or “golden gray mullet”, of Mugilidae Family) for evaluating the environmental contamination of the Boi Cerbus lagoon.

Methods. The studied area of Boi Cerbus lagoon has an extension of about 3.5 km², it receives contribution from a small stream Paringianu. The sampling was conducted seasonally during 3 years, from autumn 2008 to spring 2011. Are been collected 18 samples of superficial sediments, 18 samples of lagoon water and 30 pool samples of Mugilidae fishes. Sampling, analysis and statistical reports has been performed in according to standard procedures of ICRAM (Italian Central Institute for Applied Marine Research) by certified laboratories (Tecnolab S.r.l. in consortium enterprise with R&C Lab S.r.l.). Analytical procedures used were EPA-3052/1996 + EPA-6010C/2007 for Cd in sediments and EPA-6020A/2007 for water and biological tissues.

Results. Cd was detected in all samples analyzed, concentrations range were 0.304 ± 0.217 µg/l in lagoon saltwater and 20.68 ± 20.38 mg/kg DW in surface sediments. The spatial variability of physical-chemical parameters is represented by countouring with the method of interpolation “kriging”. The zones 16M and 7M show the larger amount of fraction clays/silt, respectively of 73% and 68.5%. The highest values of Cd were found in same spots, confirming that the metal is concentrated in the silt fractions of the sediment and in the overlying water column. Concentration of Cd detected in samples of fishes, collected in Boi Cerbus lagoon, are similar to levels found in literature for Mulletts. The highest values, among the tissues analyzed, were observed in the liver as compared to the muscle. Levels found for liver samples were in the range of 0.858 to 1.118 mg/kg FW, with an average of 1.278 ± 0.438 mg / kg FW, and for all the samples of muscle were always below the detection limit (<0.025 mg/kg FW).

Conclusions. The investigations carried out in the plan of investigation of the lagoon Cerbus Boi confirmed a conceptual model of migration of Cd. Concentration of Cd in liver of gray mullets, much higher (not less than ≈ 50 times) than the corresponding muscle, can be correlated to the level of the environmental contamination. Therefore, high level found in the sediment produces a significant concentration of this heavy metal in liver of benthic feeding and limivorous species as Mugilidae Family. The results obtained also indicate that these kind of gray mullets species could be used as “biological indicators”. All sample values don’t exceed the European regulatory limit for Cd in muscle meat of fish (≤ 0.050 mg/kg FW). Therefore results obtained show that the metal contents in muscles of species analyzed are not of concern for human health.

References

(1) Bogliione C *et al.*, 2006. Biological monitoring of wild thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*), golden grey mullet (*Liza aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*) and flathead mullet (*Mugil cephalus*) (Pisces: Mugilidae) from different Adriatic sites (...). *Ecol Indic.* 6: 712-732; (2) Scientific Opinion of the EFSA Panel on CONTAM, 2009. Cadmium in food. *The EFSA Journal* 980: 1-139; (3) Scientific Report of EFSA (2012) Cadmium dietary exposure in the European population. *The EFSA Journal* 10(1) 2551: 1-37; (4) Kandem SS *et al.*, 2008. Assessment of Safety (...) Characteristics of Different Lagoon Grey Mulletts (*Liza ramada*, *Liza aurata*, and *Liza saliens*). *J Food Protect.* 71(12): 2572-2577; (5) Licata P *et al.*, 2003. (...) heavy metals in tissues of the mullet *Liza aurata* in lake Ganzirri and Straits of Messina (Sicily, Italy). *Chemosphere.* 52: 231-238; (6) Chouba L *et al.*, 2007. Seasonal variation of heavy metals (Cd, Pb and Hg) in sediments and in mullet, *Mugil cephalus* (Mugilidae), from the Ghar El Melh Lagoon (Tunisia). *Transit Waters Bull.* 4: 45-52; (7) Metwally MAA *et al.*, 2008. Biochemical Changes Induced by Heavy Metal Pollution in Marine Fishes at Khomse Coast, Libya. *Global Vet.* 2(6): 308-311; (8) Bahnasawy M *et al.*, 2009. Seasonal Variations of Heavy Metals Concentrations in Mullet, *Mugil cephalus* and *Liza ramada* (Mugilidae) from Lake Manzala, Egypt. *J Appl Sci Res.* 5(7): 845-852; (9) Canli M *et al.*, 2003. The relationships between heavy metal (...) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Envir Pollut.* 121: 129-136.

2.3.2 More about Cadmium

Article, 2012. EuroFishMarket (ISBN 2281-4051) 18: 92-94 - Dossier / Environmental contaminants (<http://www.eurofishmarket-magazine.com/rivista.php>)

Orletti Roberta*, [Piras Pierluigi](#)

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e della Marche

Abstract. Different environmental contaminants can be found inside fish products and often they cause extremely species-specific problems. To prove the relevance of some environmental contaminants and the development of the research on these issues, the “Cadmium symposium 2012” was held this year in Sassari. The research in this sector is fundamental to understand the problems the fish products could present and which the solutions to adopt to fight these problems might be. We report an excerpt from a research based on the use of cefali as environmental contamination indicators. The Boi Cerbus lagoon is located inside the coastal area of Sulcis-Iglesiente in the south-western part of Sardinia. Many industries and extracting activities are present in this area which became highly contaminated and was at environmental risk in the past. The presence of heavy metals can be a risk for the population’s health and the environment quality. The use of live organisms (cefali in this case) as bio-indicators has become a very important instrument in the improvement of monitoring plans. Fish of the Mugilidae family have been used in different researches as bio-indicators because they colonize various environments and have a particularly varied diet. Cadmium has been found in every analysed sample: it was proved in particular that it tends to accumulate in the mud and in the area of water above it. As for the concentrations found in cefali, the highest levels have been found in the liver, whereas in the edible muscle portion with levels below the instrument detection. The obtained results confirm the hypothetical model of Cadmium migration. A higher concentration of this contaminant has been found at the mouth of a small river (Paringianu). Cadmium concentration in the liver was at least 50 times higher than in the muscles and this is linked to the environmental contamination level. The high level found in the sediment determines a relevant concentration of this metal inside the liver in particular in limivorous and benthonic species such as the Mugilidae family which therefore are important environmental indicators.

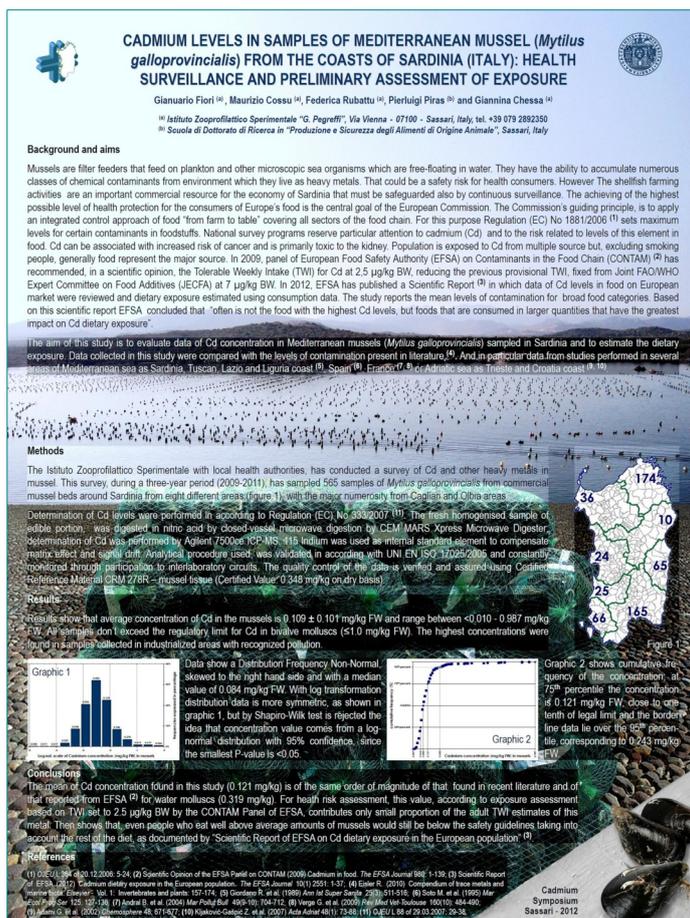
Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metallioidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

2.4 Cadmium levels in samples of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the coasts of Sardinia (Italy): health surveillance and preliminary assessment of exposure.

Short communication / poster, 2012. International Cadmium Symposium. *Abstract book*: 51 [Topic: Food chain, ID: 9] (<http://www.cadmiumsymposium2012.uniss.it/>)

Fiori Gianuario*, Cossu Maurizio*, Rubattu Federica*, Piras Pierluigi, Chessa Giannina*

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna



Background and aims. Mussels are filter feeders that feed on plankton and other microscopic sea organisms which are free-floating in water. They have the ability to accumulate numerous classes of chemical contaminants from environment which they live as heavy metals. That could be a safety risk for health consumers. However The shellfish farming activities are an important commercial resource for the economy of Sardinia that must be safeguarded also by continuous

surveillance. The achieving of the highest possible level of health protection for the consumers of Europe's food is the central goal of the European Commission. The Commission's guiding principle, is to apply an integrated control approach of food "from farm to table" covering all sectors of the food chain. For this purpose Regulation (EC) No 1881/2006 (1) sets maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. National survey programs reserve particular attention to cadmium (Cd) and to the risk

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

related to levels of this element in food. Cd can be associated with increased risk of cancer and is primarily toxic to the kidney. Population is exposed to Cd from multiple source but, excluding smoking people, generally food represent the major source.

In 2009, panel of European Food Safety Authority (EFSA) on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) (2) has recommended, in a scientific opinion, the Tolerable Weekly Intake (TWI) for Cd at 2,5 µg/kg BW, reducing the previous Provisional TWI, fixed from Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) at 7 µg/kg BW.

In 2012, EFSA has published a Scientific Report (3) in which data of Cd levels in food on European market were reviewed and dietary exposure estimated using consumption data. The study reports the mean levels of contamination for broad food categories. Based on this scientific report EFSA concluded that “often is not the food with the highest Cd levels, but foods that are consumed in larger quantities that have the greatest impact on Cd dietary exposure”. The aim of this study is to evaluate data of Cd concentration in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sampled in Sardinia and to estimate the dietary exposure. Data collected in this study were compared with the levels of contamination present in literature. And in particular data from studies performed in several areas of Mediterranean sea as Sardinia, Tuscan, Lazio and Liguria coast (4), Spain (5), France (6, 7) or Adriatic sea as Trieste and Croatia coast (8, 9).

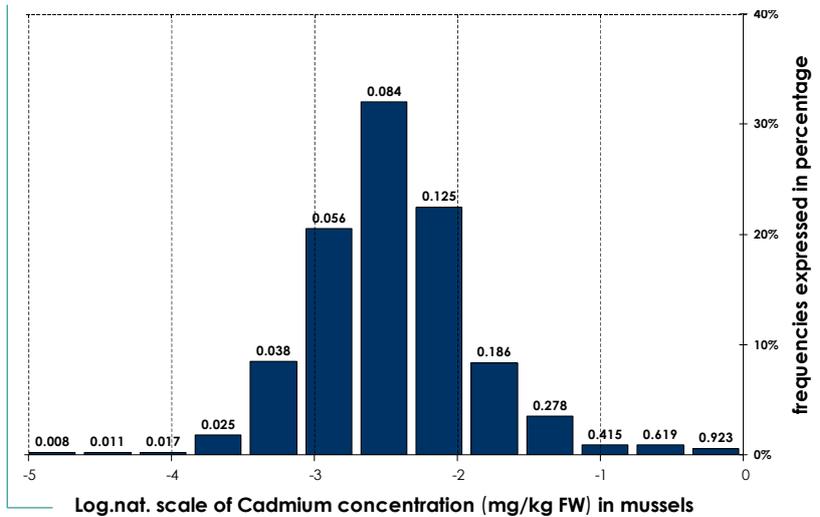
Methods. The Istituto Zooprofilattico Sperimentale with local health authorities, has conducted a survey of Cd and other heavy metals in mussel. This survey, during a three-year period (2009-2011), has sampled 565 samples of *Mytilus galloprovincialis* from commercial mussel beds around Sardinia from eight different areas, with the major numerosity from Cagliari and Olbia areas. Determination of Cd levels were performed in according to Regulation (EC) No 882/2004 (10) and Regulation (EC) No 333/2007 (11). The fresh homogenised sample of edible portion, was digested in nitric acid by closed-vessel microwave digestion by CEM MARS Xpress Microwave Digester; determination of Cd was performed by Agilent 7500ce ICP-MS. 115 Indium was used as internal standard element to compensate matrix effect and signal drift. Analytical procedure used, was validated in according with UNI EN ISO 17025/2005 and constantly monitored through participation to interlaboratory circuits. The quality control of the

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

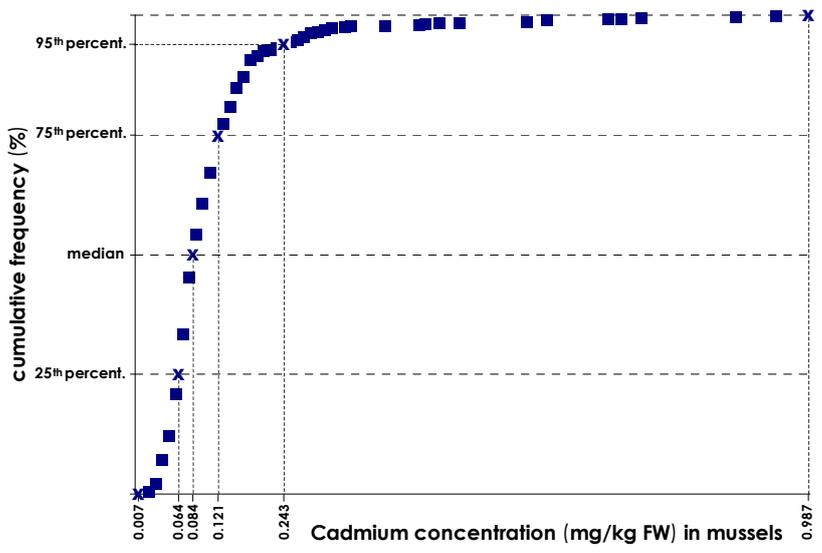
data is verified and assured using Certified Reference Material CRM 278R - mussel tissue (Certified Value: 0.348 mg/kg on dry basis).

Results. Results show that average concentration of Cd in the mussels is 0.109 ± 0.101 mg/kg FW and range between $<0.010 - 0.987$ mg/kg FW. All samples don't exceed the regulatory limit for Cd in bivalve molluscs (≤ 1.0 mg/kg FW). The highest concentrations were found in samples collected in industrialized areas with recognized pollution. Data show a Distribution Frequency Non-Normal, skewed to the right hand side and with a median value of 0.084 mg/kg FW. With log transformation distribution

data is more symmetric, as shown in the graphic at right, but by Shapiro-Wilk test is rejected the idea that concentration value comes from a log-normal distribution with 95% confidence, since the smallest P-value is <0.05 .



The following graphic shows cumulative frequency of the concentration, at 75th percentile the concentration is 0.121 mg/kg FW, close to one tenth of legal limit and the



border line data lie over the 95th percentile, corresponding to 0.243 mg/kg FW.

Conclusions. The mean of Cd concentration found in this study (0.121 mg/kg) is of the same order of magnitude of that fo-

und in recent literature and of that reported from EFSA (2) for water molluscs (0.319 mg/kg). For health risk assessment, this value, according to exposure assessment based on TWI set to 2.5 µg/kg BW by the CONTAM Panel of EFSA, contributes only small proportion of the adult TWI estimates of this metal. Then shows that, even people who eat well above average amounts of mussels would still be below the safety guidelines taking into account the rest of the diet, as documented by “Scientific Report of EFSA on Cd dietary exposure in the European population” (3).

References.

(1) Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. OJEU 20/12/2006, L 364: 5-24; (2) Scientific Opinion of the EFSA Panel on CONTAM, 2009. Cadmium in food. *The EFSA Journal* 980: 1-139; (3) Scientific Report of EFSA (2012) Cadmium dietary exposure in the European population. *The EFSA Journal* 10(1) 2551: 1-37; (4) Giordano R *et al.*, 1989. Mercury, Cadmium and Lead levels in marine organism (*Mytilus galloprovincialis* LMK.) collected along the Italian coast. *Ann Ist Super Sanita.* 25(3): 511-516; (5) Soto M *et al.*, 1995. Bioavailable heavy metals in estuarine waters as assessed by metal/shell-weight indices in sentinel mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser.* 125: 127-136; (6) Andral B *et al.*, 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar Pollut Bull.* 49(9-10): 704-712; (7) Verge G *et al.*, 2009. Contamination des organismes marins du littoral français par le Cadmium: évaluation et gestion du risque. *Rev Med Vet-Toulouse.* 160(10): 484-490; (8) Adami G *et al.*, 2002. Levels of cadmium (...) in hepatopancreas of reared *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Trieste (Italy). *Chemosphere.* 48: 671-677; (9) Kljaković-Gašpić Z *et al.*, 2007. Biomonitoring of trace metals (...) in Mali Ston Bay (eastern Adriatic) using the Mediterranean blue mussel (1998-2005). *Acta Adriat.* 48(1): 73-88; (10) Regulation (EC) No 882/2004 of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law (...). OJEU 30/04/2004, L 165: 1-141; (11) Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, (...) in foodstuffs. (OJEU 29/03/2007, L 88: 29-38.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

2.5 Consumo di pesce, raccomandazioni nutrizionali ed esposizioni a contaminanti persistenti: valutazione rischio-beneficio nell'esperienza del progetto Aquamax

Review, 2012. Rapporti ISTISAN 12/50: 10-22 [ISSN 1123-3117]. Modelli per la valutazione rischio-beneficio in sicurezza alimentare [[stralcio](http://www.iss.it/binary/publ/cont/12_50_web.pdf)] (http://www.iss.it/binary/publ/cont/12_50_web.pdf)

Maranghi Francesca¹, Tassinari Roberta¹, Alessi Eva², Brizio Paola³, Piras Pierluigi, Rabozzi Giulia⁴

¹ ISS, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma

² WWF Italia, Ufficio Sostenibilità, Roma

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

⁴ International Centre for Rural Health, WHO Collaborating Centre, Università degli Studi di Milano

Abstract

The development of new food safety starts from the European strategy “from farm to fork”. Risk assessment is now a consolidated approach, even though applications need being modified and updated according to fresh experimental evidence. The risk-to-benefit assessment is a further step forward, aiming at a comprehensive and balanced evaluation of the whole food (or food production process). Risk-to-benefit assessment supports, therefore, the synthesis between data on consumer's safety issues that are both scientifically robust as well as contrasting. With the help of examples, the Report describes approaches and possible perspectives of this innovative field of food safety.

Keywords

Toxicology, Nutrition, Exposure, Vulnerability

Introduzione: la valutazione rischio-beneficio legata al consumo di pesce

Elaborata dall'EFSA, la valutazione rischio-beneficio fornisce risposte basate sull'evidenza scientifica sia in merito al “beneficio” derivante dall'assunzione di un alimento sia del “rischio” associato all'esposizione ad un determinato contaminante in esso contenuto, ove per rischio si intende anche il possibile effetto negativo sulla salute dovuto all'eliminazione dalla dieta di un determinato alimento e/o principio attivo. Infatti, nell'esposizione attraverso l'ambiente, si parlerà sempre di “rischio” associato

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

ad un determinato xenobiotico con specifiche caratteristiche tossicologiche - individuate nel processo di valutazione del rischio - e potenzialmente riducibile.

In sicurezza alimentare, invece, si deve tener conto del fatto che l'alimento in se stesso è, in prima istanza, veicolo di sostanze nutritive, biologicamente attive, la cui eliminazione o riduzione potrebbe provocare effetti avversi sulla salute. In sicurezza alimentare, dunque la possibile presenza di contaminanti o comunque di sostanze estranee all'alimento stesso rende necessaria, con un approccio basato sul principio del "caso per caso", una attenta valutazione sia del "beneficio" derivante dall'assunzione di tale alimento sia del "rischio" associato all'esposizione ad un determinato contaminante in esso contenuto (1). La valutazione del rischio tossicologico è un processo che ha lo scopo di calcolare o stimare il rischio per una determinata (sotto)popolazione, compresa l'identificazione delle incertezze concomitanti, relativo all'esposizione ad un particolare agente, tenendo in considerazione sia le caratteristiche intrinseche dell'agente che caratteristiche dello specifico sistema bersaglio. La valutazione del rischio si articola in quattro fasi: identificazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio. La valutazione del beneficio è speculare alla valutazione del rischio comprendendo, infatti, l'identificazione dell'effetto positivo o riduzione dell'effetto avverso sulla salute, la caratterizzazione dell'effetto positivo o riduzione dell'effetto avverso sulla salute, la valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del beneficio. Le due procedure sono separate e indipendenti ma comparabili e hanno lo scopo di identificare, calcolare la probabilità e comparare l'entità sia del rischio che del beneficio. Due documenti EFSA descrivono le modalità e definiscono metodi e/o modelli per effettuare tale valutazione al fine di gestire il dato da essa generato e consentire una comparazione sia qualitativa che quantitativa dei risultati (1, 2). Il pesce rappresenta un modello emblematico della valutazione di tipo rischio-beneficio (3). Infatti, mentre il consumo di pesce è raccomandato nelle diete bilanciate in tutte le fasce di popolazione, di contro l'ambiente acquatico può essere variamente contaminato da sostanze di origine antropica presenti nell'acqua stessa e/o nei sedimenti che possono talvolta concentrarsi nei tessuti di pesci e altri organismi usati nell'alimentazione, creando allarme per la sicurezza del consumatore (4).

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

I messaggi salutistici spingono la popolazione a mantenere alto il consumo di pesce, senza tenere conto della qualità e tipologia di pescato oltre che della sua origine in funzione del tipo di pescato, essendo scarsa la percezione di potenziali livelli di rischio nella popolazione generale; questi fattori tuttavia possono in larga misura influire sul contenuto di potenziali contaminanti (5). Al fine di garantire la sicurezza del consumatore, per quanto riguarda il pesce pescato è importante la tracciabilità del prodotto mentre per il pesce di allevamento risulta chiave il controllo sulla filiera del mangime. A tale proposito, la ricerca a livello internazionale ha dato un contributo importante con il finanziamento del progetto europeo Aquamax (6) che ha valutato la sicurezza, la sostenibilità ambientale e la salubrità del pesce allevato; scopo principale del progetto è stato quello di trovare il giusto equilibrio fra la necessità di diminuire la presenza di contaminanti nel pesce allevato, la sostenibilità ambientale legata all'utilizzo di risorse marine in acquacoltura e, nel contempo, la necessità di preservare i benefici per la salute del consumo di pesce.

Contaminanti potenzialmente presenti nel pesce pescato e allevato

È indispensabile, a questo punto, introdurre alcuni concetti base della valutazione del rischio tossicologico. La TDI (*Tolerable Daily Intake* ovvero la dose tollerabile giornaliera) è una stima della quantità di sostanza in varie matrici (alimenti, aria, acqua) che può essere assunta giornalmente per tutta la vita senza effetti apprezzabili per la salute. Si può anche parlare di una TWI (*Tolerable Weekly Intake*, ovvero dose tollerabile settimanale) - con lo stesso significato della giornaliera - o di PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake*) ove con il termine “provisional”, si vuole enfatizzare il fatto che si tratta generalmente di sostanze che bioaccumulano nell'organismo, che i dati a disposizione per la valutazione del rischio sono scarsi e di conseguenza tali valori vengono continuamente rivalutati e rimodulati.

Contaminanti “tradizionali” inseriti nel Piano Nazionale Integrato (2011-2014)

Il pesce, come altri alimenti di origine acquatica (molluschi, crostacei, ecc.), può contenere contaminanti inorganici quali il cadmio (Cd), il piombo (Pb) e il mercurio (Hg). Il Hg organico è considerato la forma più tossica a seguito di esposizione attraverso gli alimenti. Il metilmercurio (MetHg) in particolare è la forma predominante

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

di Hg nel pesce con valori compresi fra circa il 75 e il 100% di Hg totale nel tonno e nello squalo e superiori all'85% nelle sardine (7). Il bersaglio primario e principale della tossicità del MetHg è il sistema nervoso, in particolare il cervello in via di sviluppo, con gravi conseguenze (ritardo mentale, danni cerebrali) a seguito di esposizioni *in utero* (8). Dunque, il sistema nervoso e la fase dello sviluppo intrauterino sono considerati come maggiormente suscettibili all'azione del MetHg da cui il più basso valore tollerabile stabilito a livello EFSA (PTWI) di 1,6 µg/kg *body weight* (b.w.)/settimana per proteggere appunto tale fasi vulnerabili. Ultimamente, tuttavia, anche l'aumentata esposizione dell'adulto a MetHg attraverso il pesce è stata associata ad un aumento di rischio di malattie cardiovascolari e mortalità da esse derivante (9).

Per quanto riguarda gli altri elementi inorganici, il Cd induce numerosi effetti avversi sulla salute umana quali nefrotossicità, osteoporosi, neurotossicità, cancerogenicità, genotossicità e teratogenicità, effetti endocrini e riproduttivi. I livelli massimi di cadmio stabiliti dalla Unione Europea per il muscolo di pesce sono di 0,050 mg/kg per la maggior parte delle specie e di 0,10 mg/kg per altre specie, fino ad un massimo tollerabile di 0,30 mg/kg nelle acciughe e nel pesce spada - Regolamento (CE) n. 1881/2006 e Regolamento (CE) n. 629/2008. La PTWI è pari a 7 µg/kg b.w. (10, 11).

Gli effetti neurotossici dell'esposizione a Pb durante il periodo dello sviluppo sono ben documentati. Nell'adulto l'esposizione è associata ad effetti cardiovascolari, riproduttivi, renali e potenzialmente cancerogeni. I livelli massimi ammissibili di piombo nei filetti di pesce sono pari a 0,30 mg/kg per tutte le specie di pesce (Regolamento (CE) n. 1881/2006). Il PTWI è di 25 µg/kg b.w./settimana per i bambini poiché è importante evitarne l'accumulo (12). Tuttavia sia il Cd sia il Pb non accumulano nei tessuti edibili del pesce nella stessa misura del Hg, di qui i valori di PTWI superiori. Fra i contaminanti organici, i più rappresentativi nelle matrici acquatiche sono i contaminanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, POP), che includono i policlorobifenili (PCB), le diossine, i ritardanti di fiamma bromurati, gli insetticidi organoclorurati (DDT, chlordan, HCH), gli organostannici. Tali sostanze, oltre a possedere proprietà tossiche, sono resistenti alla degradazione chimica e biologica, sono lipofile, bioaccumulano e biomagnificano così da risultare persistenti nell'ambiente e

nella catena alimentare. Pertanto, anche controllandone/riducendone le emissioni, i POP possono raggiungere livelli di concentrazione di cui è difficile valutare le conseguenze. Essi sono presenti principalmente nel pesce a più elevato contenuto di grasso come aringhe, trote, sgombri, sardine, tonno fresco, salmone (13).

Contaminanti “emergenti” non inseriti nel Piano Nazionale Integrato (2011-2014)

Fra i contaminanti inorganici, il pesce e altri alimenti acquatici possono contenere l'arsenico (As). L'As è classificato come cancerogeno umano dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*). I livelli di As negli organismi acquatici sono di solito più elevati rispetto a quelli misurati negli organismi terrestri. Tuttavia, esso viene accumulato sotto forma di *arsenobetaine* e *arsenocholine*: tali composti organici dell'As non vengono convertiti *in vivo* in As inorganico (più tossico) bensì vengono eliminati come tali dall'organismo. Per questi motivi non vengono considerati come un rischio significativo per la salute umana. Il PTWI per l'As inorganico è stabilito in 15 µg/kg b.w./settimana (14).

I ritardanti di fiamma polibromurati, quali il tetrabromobisfenolo A, l'esabromociclododecano (HBCD) e i polibromo difenil eteri (PBDE) sono POP e, per le loro caratteristiche tossicologiche, IE. Tra i principali bersagli dell'effetto dei ritardanti di fiamma troviamo la tiroide dell'organismo in via di sviluppo con effetti neurocomportamentali potenzialmente mediati dalla diminuzione di ormoni tiroidei circolanti. Inoltre, i metaboliti idrossilati dei ritardanti di fiamma hanno effetti estrogeno-simili (15).

Nutrienti essenziali presenti nel pesce e possibili interazioni con i contaminanti

Per il pesce pescato, a differenza di quanto accade per quello proveniente dalle pratiche di acquacoltura, la qualità nutrizionale è condizionata dall'ambiente e dalle fasi del ciclo vitale; ciò implica che una stessa specie, pescata e consumata in diversi periodi dell'anno, oltre a possedere valori nutrizionali diversi, può presentare caratteristiche organolettiche diverse per quanto riguarda, ad esempio, la consistenza delle carni, il loro aspetto, il gusto al palato. Il pesce, sia pescato sia allevato, viene consigliato in tutti i regimi dietetici e nelle differenti fasce di età come fonte di nutrienti essenziali. In particolare, le principali indicazioni salutistiche (*health claim*) sul consumo di pesce

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

derivano dalla ricerca sugli acidi grassi poli-insaturi (*Poli Unsaturated Fatty Acids*, PUFA) della famiglia n-3: l'acido eicosapentaenoico (EPA) e il docosahexaenoico (DHA). Entrambi sono presenti nel pesce sia pescato sia allevato soprattutto nella carne dei pesci grassi ma anche in quella dei più magri. L'essere umano non ha sorgenti endogene di PUFA. Esiste una consolidata evidenza scientifica sugli effetti benefici a carico del sistema cardiovascolare (16) sebbene ultimamente i PUFA sembrano agire anche nella prevenzione dell'artrite, dell'Alzheimer, dell'asma e di alcuni tipi di tumore (17). Inoltre, sembrano anche esercitare effetti benefici durante lo sviluppo fetale, in particolare sul sistema nervoso (18). Di contro, nel pesce, il contenuto di PUFA n-6 è generalmente inferiore a quello degli organismi terrestri eccetto che per i pesci allevati, dove i mangimi per acquacoltura possono contenerne livelli elevati.

Le proteine del pesce sono presenti nel tessuto muscolare in quantità variabile di 15-20 g/100 g di peso, sebbene tale contenuto possa talvolta diminuire a favore dei lipidi all'aumentare dell'età del pesce. Esse hanno un elevato valore biologico, il contenuto in aminoacidi essenziali è maggiore rispetto alla carne e sono più facilmente digeribili rispetto a quelle derivate dal consumo di animali terrestri.

Fra le vitamine, il pesce è ricco di vitamina D (importante nel metabolismo osseo) e vitamina A (importante per la crescita e la salute cellulare e nella trasmissione degli impulsi nel nervo ottico, ecc.) e - fra le idrosolubili - la vitamina B12 (protettiva nei confronti dello stress ossidativo). Il pesce di acqua dolce contiene inoltre da 5 a 15 µg di iodio per 100 g di parte fresca edibile mentre il pesce di mare da 8 a 1210 µg per 100 g. Il consumo ottimale suggerito di due porzioni di pesce marino a settimana supplisce al fabbisogno raccomandato di iodio per l'individuo adulto. Tutte le specie di pesce contengono discrete quantità di selenio (tra 0,02 e 0,06 mg per 100 g di muscolo di pesce) sebbene esistano dati controversi sulla biodisponibilità del selenio derivante dagli alimenti di origine acquatica. Lo iodio è elemento chiave per il corretto funzionamento della tiroide e il selenio è il cofattore di enzimi legati a sequenze di reazioni (*pathway*) legate allo stress ossidativo. Interessante notare come i meccanismi d'azione dei contaminanti e dei principi nutritivi presenti nel pesce possano talvolta coinvolgere gli stessi *pathway*: ad esempio, i ritardanti di fiamma hanno come bersaglio

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

principale la tiroide, e lo iodio contenuto nel pesce rappresenta un elemento essenziale per l'omeostasi tiroidea. Inoltre, i POP sembrano essere coinvolti nel danno mitocondriale (stress ossidativo) alla base della sindrome metabolica (19): il selenio e i PUFA agiscono proprio come antiossidanti di origine naturale (20, 21). Altri studi hanno evidenziato un potenziale effetto antagonistico del selenio nei confronti di mercurio e arsenico presenti nei prodotti ittici (22). Inoltre, lo iodio contenuto nel pesce sembra avere un effetto protettivo nei confronti degli effetti tossici indotti da composti organoclorurati a seguito di esposizione *in utero* (23).

Come evidenziato da studi epidemiologici e metanalisi, il corretto consumo di pesce nella dieta (due porzioni/settimana) è considerato un elemento chiave per il corretto sviluppo intrauterino del sistema nervoso centrale del concepito e nelle prime fasi di vita post-natale.

Anche il sistema visivo trae giovamento dall'apporto di PUFA-3. Risultati non conclusivi derivano da studi effettuati sul consumo di pesce associato a malattie neurodegenerative e salute mentale; un effetto positivo sembrerebbe essere invece associato alla degenerazione maculare legata all'età (24). Passando alla fase adulta, numerosi studi evidenziano i benefici del consumo di pesce sull'insorgenza di malattie metaboliche (25) e cardiovascolari, nonché il potenziale effetto protettivo nei confronti di alcuni tipi di tumore (cancro colon-retto).

Nuove frontiere in acquacoltura: il progetto Aquamax

Attualmente, circa i due terzi del pesce consumato all'interno della Comunità Europea deriva dalla pesca. Fattori legati alla specie, alla stagione, alla dieta, alla localizzazione geografica e allo stadio del ciclo vitale possono condizionare in maniera significativa sia i livelli di nutrienti che di potenziali contaminanti presenti nel pesce. Questi livelli possono anche variare ampiamente all'interno della stessa specie e tra specie diverse sia nel pesce pescato che allevato. Tuttavia, tenendo conto di tali fattori, le differenze fra specie pescate e allevate sono di norma piuttosto basse fatta eccezione per la localizzazione geografica ove possono incorrere fenomeni di particolare contaminazione ambientale (es. il mar Baltico). I contaminanti nel pesce derivano principalmente dalla dieta e i livelli di POP sono maggiori nei pesci che si trovano ai gradini più alti della

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

catena alimentare. Nel pesce allevato è possibile influire sia sui nutrienti, ma soprattutto sui contaminanti attraverso il controllo del mangime. Infatti, la carne e l'olio di pesce utilizzati nella produzione dei mangimi per acquacoltura rappresentano la principale fonte di contaminazione, soprattutto per quanto riguarda i POP.

L'obiettivo strategico del progetto finanziato dalla Commissione Europa nell'ambito del VI Programma Quadro Aquamax è stato quello di sostituire per quanto possibile le farine e l'olio di pesce attualmente utilizzati per mangimi di acquacoltura con altre matrici derivate da risorse sostenibili e alternative che fossero nel contempo il più possibile prive di contaminanti indesiderati e che portassero a massimizzare le performance di crescita, l'efficienza di conversione del cibo nonché i benefici nutrizionali, la sicurezza, la qualità e la palatabilità del prodotto finale (pesce allevato) per il consumatore.

Quindi lo scopo principale di Aquamax è stato quello di sviluppare mangimi basati su risorse alternative alle farine e all'olio di pesce che risultassero sostenibili da un punto di vista ambientale e salubri in merito ai potenziali contaminanti. Inoltre, la ricerca di Aquamax ha focalizzato l'interesse non solo sui benefici per la salute umana derivanti dal consumo regolare di pesce nella popolazione generale ma soprattutto su gruppi vulnerabili di popolazione come le donne in gravidanza (importanza dei fattori presenti nel pesce per lo sviluppo del concepito) e i bambini (focus sullo sviluppo di allergie). Largo spazio anche alla comunicazione, con studi sulla percezione dell'impatto che il pesce allevato può avere a livello del pubblico/consumatore e della comunità scientifica.

Conclusioni e raccomandazioni

Numerosi studi suggeriscono che una alimentazione "sana" possa controbilanciare i rischi per la salute umana derivati dall'esposizione a miscele di contaminanti ambientali. La ricerca corrente - non solo nell'ambito della sicurezza alimentare - è sempre più orientata a considerare le relazioni fra nutrizione e stili di vita, inquinamento e patologie ad esso potenzialmente associabili. Infatti, gli interventi nutrizionali potrebbero rappresentare uno strumento prezioso e sensibile per sviluppare strategie di prevenzione primaria in sicurezza alimentare, abbassando notevolmente i costi a carico del sistema sanitario nazionale dovuti all'incidenza di patologie a lungo termine legate

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

alla presenza di sostanze potenzialmente dannose negli alimenti e nell'ambiente.

Si consideri che attualmente l'acquacoltura incide per circa il 30% sulla produzione ittica mondiale. Secondo le previsioni della FAO, nel 2030 la produzione di pesce oltrepasserà i 150 milioni di t mentre già a partire dal 2020 il pesce allevato supererà di gran lunga quello proveniente dalla pesca. Per quanto riguarda la domanda di pesce, le previsioni elaborate dalla FAO variano a seconda dell'ipotesi di base: che si sia già raggiunto il limite massimo di crescita dei consumi nel 1999 (ipotesi ritenuta scarsamente probabile) oppure che, viceversa, essi continuino ad aumentare. Le previsioni per il 2030 oscillano tra una domanda di 123, nel primo scenario, e di 245 milioni di t, nel secondo scenario (26).

La valutazione rischio/beneficio dell'EFSA raccomanda e sostiene l'assunto che il consumo regolare di pesce possa contribuire in maniera positiva alla prevenzione di malattie cardiovascolari e allo sviluppo del feto, sebbene - per quest'ultimo caso - non sia stato ancora stabilito nel dettaglio il consumo ottimale. Il pesce tuttavia può contribuire in maniera significativa all'*intake* di contaminanti persistenti soprattutto se proveniente da siti particolarmente a rischio.

Stabilito che per il *pesce pescato* importante è la tracciabilità del prodotto, valutata attraverso strumenti specifici elaborati in ambito Comunitario, per il *pesce di allevamento* risulta invece chiave il controllo sulla filiera del mangime per modulare la presenza di contaminanti nel prodotto finito, garantendo al consumatore un prodotto sano e sicuro.

Inoltre, importante in questo ambito la comunicazione, ovvero fornire informazioni al consumatore sulle differenze che esistono nei diversi tipi di pesce in quanto a presenza sia di fattori nutrizionali che di potenziali contaminanti; infatti, si è visto che - a parte fattori di natura ambientale e legati al ciclo vitale - anche le caratteristiche intrinseche del pesce ad esempio maggiore o minore contenuto lipidico nelle carni possono modularne la presenza.

Da non sottovalutare inoltre il trattamento "domestico" del pesce: rimozione di parti particolarmente grasse, come la pelle, possono diminuire notevolmente l'impatto dei contaminanti senza alterare il contenuto di nutrienti essenziali.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Dalla ricerca in sicurezza alimentare emergono inoltre messaggi importanti quali l'importanza di inserire contaminanti "emergenti" nei programmi di monitoraggio di mangimi e alimenti di origine animale. Gli effetti sottili registrati ai livelli di dose compatibili con l'esposizione umana e in un modello animale che ricalca le fasi del ciclo vitale più vulnerabili e suscettibili agli effetti di contaminanti - evidenziati come prioritari nell'ambito dei prodotti ittici - forniscono solide basi scientifiche per allargare gli orizzonti del controllo in vista di una migliore e più mirata valutazione delle conseguenze per la salute del consumatore.

Bibliografia

- (1) EFSA Scientific Colloquium 6 - Summary Report, 2006. Risk-benefit analysis of foods: methods and approaches [157 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/colloquiariskbenefit.pdf>)
- (2) EFSA Scientific Committee, 2010. Scientific opinion: Guidance on human health risk-benefit assessment of foods. *EFSA Journal* 8(7):1673 [40 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/1673.pdf>)
- (3) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2005. Scientific Opinion related to the safety assessment of wild and farmed fish. *EFSA Journal* 236: 1-118 (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/236.pdf>)
- (4) Loring PA, Duffy LK, 2011. Managing environmental risks: the benefits of a place-based approach. *Rural Remote Health* 11(3): 1800 [40 pp.] (http://www.rrh.org.au/publishedarticles/article_print_1800.pdf)
- (5) Genuis SJ, 2008. To sea or not to sea: Benefits and risks of gestational fish consumption. *Repr Toxicol* 6: 81-85;
- (6) Aquamax, 2010. Sustainable Aquafeeds to Maximise the Health Benefits of Farmed Fish for Consumer [32 pp.] (<http://www.aqua.stir.ac.uk/public/nutrition/publications/aquamaxfinal.pdf>)
- (7) Storelli MM, Giacomini-Stuffler R, Marcotrigiano GO, 2002. Total and methylmercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 44(12): 1354-1358;
- (8) Drouillet-Pinard P, Huel G, Slama R, Forhan A, Sahuquillo J, Goua V, Thiébau-

- georges O, Foliguet B, Magnin G, Kaminski M, Cordier S, Charles MA, 2010. Prenatal mercury contamination: relationship with maternal seafood consumption during pregnancy and fetal growth in the 'EDEN motherchild' cohort. *Br J Nutr* 104(8): 1096-1100;
- (9) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2004. Scientific Opinion related to mercury and methylmercury in food (EFSA-Q-2003-030) - EFSA Journal 34, 1-14 (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/34.pdf>)
- (10) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2009. Scientific Opinion of the Cadmium in food (EFSA-Q-2007-138) - EFSA Journal 980: 1-139 (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/980.pdf>)
- (11) Storelli MM, 2008. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs). *Food Chem Toxicol* 46(8):2782-2788;
- (12) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2010. Scientific Opinion on Lead in Food (EFSA-Q-2007-137) - EFSA Journal 8(4): 1570 [147 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/1570.pdf>)
- (13) Bushkin-Bedient S, Carpenter DO, 2010. Benefits versus risks associated with consumption of fish and other seafood. *Rev Environ Health* 25(3):161-191;
- (14) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food (EFSA-Q-2008-425) - EFSA Journal 7(10): 1351 [199 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/1351.pdf>)
- (15) Shaw SD, Blum A, Weber R, Kannan K, Rich D, Lucas D, Koshland CP, Dobraca D, Hanson S, Birnbaum LS, 2010. Halogenated flame retardants: do the fire safety benefits justify the risks? *Rev Environ Health* 25(4): 261-305;
- (16) Wennberg M, Strömberg U, Bergdahl IA, Jansson J-H, Kauhanen J, Norberg M, Salonen JT, Skerfving S, Tuomainen T-P, Vessby B, Virtanen JK, 2012. Myocardial infarction in relation to mercury and fatty acids from fish: a risk-benefit analysis based on pooled Finnish and Swedish data in men. *Am J Clin Nutr* 15: 1-8;

- (17) Solfrizzi V, Panza F, Frisardi V, Seripa D, Logroscino G, Imbimbo BP, Pilotto A, 2011. Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence. *Expert Rev Neurother* 11(5): 677-708;
- (18) Coletta JM, Bell SJ, Roman AS, 2010. Omega-3 Fatty acids and pregnancy. *Rev Obstet Gynecol* 3(4): 163-171;
- (19) Lim S, Cho YM, Park KS, Lee HK, 2010. Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1201: 166-176;
- (20) Ayotte P, Carrier A, Ouellet N, Boiteau V, Abdous B, Sidi EA, Château-Degat ML, Dewailly E, 2011. Relation between methylmercury exposure and plasma paraoxonase activity in inuit adults from Nunavik. *Environ Health Perspect* 119(8): 1077-1083;
- (21) Ström S, Helmfrid I, Glynn A, Berglund M, 2011. Nutritional and toxicological aspects of seafood consumption an integrated exposure and risk assessment of methylmercury and polyunsaturated fatty acids. *Environ Res* 111(2): 274-280;
- (22) Li L, Wu G, Sun J, Li B, Li Y, Chen C, Chai Z, Iida A, Gao Y, 2008. Detection of mercury-, arsenic-, and selenium-containing proteins in fish liver from a mercury polluted area of Guizhou Province, China. *J Toxicol Environ Health A* 71(18): 1266-1269;
- (23) Dallaire R, Dewailly E, Ayotte P, Muckle G, Laliberté C, Bruneau S, 2008. Effects of prenatal exposure to organochlorines on thyroid hormone status in newborns from two remote coastal regions in Québec, Canada. *Environ Res* 108(3): 387-392;
- (24) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments [AFSSA], 2008. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux bénéfices/risques liés à la consommation de poissons. [31 pp.] (<http://www.cancer-environnement.fr/LinkClick.aspx?fileticket=OYvk8wJDKIM%3D&tabid=217&mid=1125>)
- (25) Baik I, Abbott RD, Curb JD, Shin C, 2010. Intake of fish and n-3 fatty acids and future risk of metabolic syndrome. *J Am Diet Assoc* 110: 1018-1026;
- (26) Food and Agriculture Organization [FAO], 2010. The state of world fisheries and aquaculture. [218 pp.] (<http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>).

2.6 Mercury occurrence in Italian seafood from the Mediterranean Sea and possible intake scenarios of the Italian coastal population

Original Article, 2013. *Regul Toxicol Pharm* 65(2): 269-277 [DOI: 10.1016/j.yrtph.2012.12.009] (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230013000020>)

Brambilla Gianfranco¹, Abete Maria Cesarina², Binato Giovanni³, Chiaravalle Eugenio⁴, Cossu Maurizio⁵, Dellatte Elena¹, Miniero Roberto¹, Orletti Roberta⁶, Piras Pierluigi, Roncarati Alessandra⁷, Ubaldi Alessandro⁸, Chessa Giannina⁵

¹ ISS, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Roma

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata

⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

⁶ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

⁷ Università degli Studi di Camerino, Scuola di Scienze Mediche Veterinarie

⁸ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana

Abstract

Mercury (Hg) settlements in the Mediterranean Sea determine a potential toxicological relevance of seafood intakes for coastal populations. To assess this possibility, fish, mollusks, and crustaceans of commercial size of 69 different species were sampled and analyzed for total mercury (Hg_{TOT}) from georeferenced areas and evaluated for their compliance with the European Union Maximum Residue Limits of 0.5 and 1.0 mg/kg ww. Accounting for the weekly estimated seafood intake in the Italian coastal population (mean 469-626 g/person/week) it was then possible to recover threshold contamination values in seafood. Under a Tolerable Weekly Intake of 1,3 µg/kg/bw/week, a threshold seafood contamination <0.10 mg/kg ww has been derived for sensitive groups. A suitable algorithm based on the parallel MeHg and Hg_{TOT} analysis on the most consumed species, helped to refine the uncertainties related to the conservative assumption in seafood all the Hg_{TOT} present is in form of MeHg. This work aims to improve the link between the risk management and risk assessment strategies, with the

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

identification of those fish and seafood species, that, when regularly consumed, could determine or prevent potential $Hg_{TOT}/MeHg$ overintakes in sensitive groups.

Keywords

Mercury, Methyl mercury, Mediterranean seafood, Maximum residue limits, Tolerable intakes, Advisories

Introduction

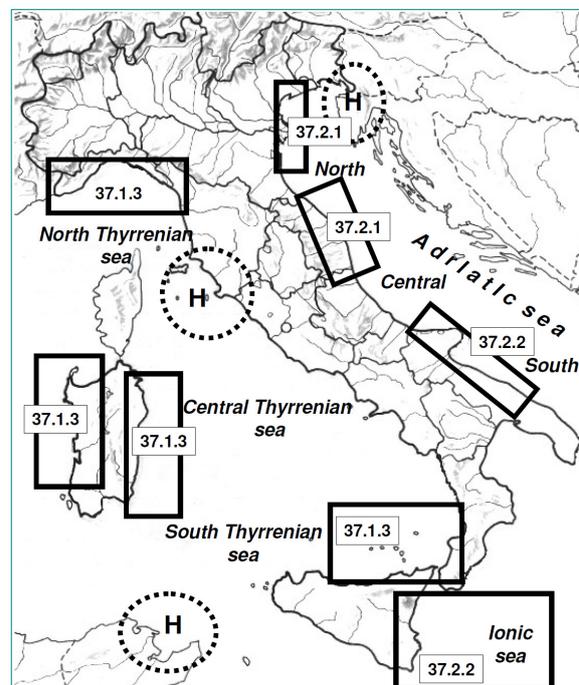
It is generally acknowledged that the Mediterranean Sea represents a geological hot spot for mercury (Hg): about half the world's Hg resources are located in this area, with abundant deposits in sites facing the Italian seas (1, 2, 3, 4). Because of the natural presence of mercury and the development of related industrial and anthropogenic activities since ancient times, the release of mercury into the marine environment is recognized as the main determinant of the bio-magnification of its predominant organic form - methyl mercury (MeHg) - in Mediterranean seafood from different trophic levels (TLs) (5, 6). A previous evaluation by the (US) National Research Council established an intake limit of 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight per week (7). Very recently, the EFSA revised its former opinion on mercury and methylmercury in food: a Tolerable Weekly Intake (TWI) of 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (bw) for MeHg is now proposed lower than the former one of 1,6 (8), on the basis of multiple epidemiological studies that observed adverse effects in children as consequence of maternal exposures. Other Agencies, in Japan, USA, New Zealand, Australia, UK, and Canada, have proposed MeHg Reference Doses (RfD) ranging from 0,1 to 0,47 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, based on multiple endpoints (9). Recent papers have focused on biota sampled from Mediterranean industrial hot spots in Southern Italy, such as the gulf of Taranto (10, 11) and the Augusta basin (12). The findings indicate that the presence of MeHg in local seafood of a low trophic level (TL) may represent a potential health concern for the population. A detailed biomonitoring study of fishermen and their families in a Northern Africa Mediterranean coastal village (13) found a correlation between the number of seafood meals based on anchovies and pilchards and methyl-mercury levels in hair. The same correlation with fish consumption was described (14) in a study carried out on 237 subjects recruited in the urban population of Neaples (Italy); other authors reported a possible association

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

between fish consumption and cognitive development in a Spanish cohort of preschool children (15). When extrapolated to dietary intakes, the Hg levels in hair indicated potential overexposure with respect to the oral reference dose. Plenty of data are available on Hg_{TOT} and MeHg levels for Italian marine species; however, some of the investigations were restricted to few species of seafood, or limited geo-referenced areas (16, 17, 18, 19, 20). In some cases, the reported contamination data were biased by being expressed only on a dry basis (21). In other studies, the sampling was affected by a strict environmental approach: this is the case for species that are not of commercial size and/or interest (22) or for fish as bioindicators of the environmental status in known highly polluted sites (23). In this study, we aim to give a more comprehensive picture of the occurrence of Hg_{TOT} and MeHg in seafood recovered from fishing and aquaculture activities in areas of Italy presumed to be not impacted. Together with a better definition of MeHg levels on a geo-referenced basis, the final aim is to give a first ranking of the contributions of commercial fish and seafood species to MeHg exposure in the coastal populations, as already done in other countries (24, 25). The information will be then translated into intake advice for sensitive groups, without compromising the nutritional benefits of seafood based diets (6).

2. Materials and methods

2.1. Sampling. Fish and seafood of market size belonging to 69 different seafood species were sampled in the period 2009-2011 from the following national fishing areas belonging to FAO Area 37: North Tyrrhenian (NT), Central Tyrrhenian (CT), South Tyrrhenian (ST), Ionian (IS), North Adriatic (NA), Central Adriatic (CA) and South Adriatic (SA) seas, as illustrated in **figure at right**.



Registered offshore aquaculture farms (bivalve mollusks, seabass and seabream) were located in the corresponding fishing areas. Sampling activity was framed within both

national monitoring plans for residue analysis and the AquaFish and FISR (26) nationally/regionally-funded projects. Seafood of the more prevalent commercial size in the catch was considered for the sampling of edible parts. Each sample of the farmed seabass and seabream species was represented by 20-30 different individuals of commercial size, 350-400 g ww. Fish TLs have been taken to the Mediterranean Sea (27) or from a specific database consulted (28).

2.2. Analysis. Total Mercury determination was performed using different analytical techniques, including Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) and Direct Automatic Analyzer based on Thermal Decomposition Amalgamation coupled with Atomic Absorption Spectrophotometry (TDA/AAS), according to the different equipment available in the official labs. In ICP-MS, Hg_{TOT} determination was performed by Agilent 7500CE ICP-MS. ²⁰⁹Bi was used as internal standard element to compensate matrix effect and signal drift. For each batch of samples processed, a method blank was carried throughout the entire sample preparation and analytical process. The calibration curve was verified at the end of each analytical batch using continuing calibration verification (CCV) at or near midrange. In AAS, the determination was performed by Perkin Elmer Flow Injection Mercury System FIMS 400. In TDA/AAS, a DMA-80 Direct Mercury Analyzer (Milestone Inc.) and an AMA254 Automatic Mercury Analyzer (FKV, Altec) were used. The quality control of the data produced was verified and controlled using Certified Reference Materials FAPAS T07139 - Canned fish (Certified Value: 0,539 mg/kg dw), BCR 278R - Mussel Tissue (Certified Value: 0,196 mg/kg dw), DORM-2 - Dogfish Muscle (Certified Value: 4,64 mg/kg dw), DORM-3 - Fish Protein (Certified Value: 0,382 mg/kg dw). All labs were intercalibrated through successful participation in internationally organised proficiency tests, with LOQs between 0,010 and 0,001 mg/kg ww, for Hg_{TOT}, according to the different analytical equipment. Within the FISR project activities (26), a panel of 36 fish market samples from 10 wild species caught from not impacted fishing areas (anchovies, N = 6; pilchards, N = 2; red mullets, N = 6; Atlantic mackerel, N = 2; bullet tuna, N = 3; European hake, N = 6; Atlantic horse mackerel, N = 3; Atlantic bonito, N = 4; bluefin tuna, N = 2; swordfish, N = 2) were also analyzed for

MeHg, using GC-MS (SIM) according to other authors (21), adding Ethyl-Mercury (EtHg) as Internal Standard. The accredited method with a LOQ of 0,010 mg/kg ww, was under quality control using BCR-463 - tuna fish (certified value 3,04 mg/kg dw).

3. Theory/calculation

3.1. Conversion of Hg_{TOT} into MeHg. The conversion of Hg_{TOT} into MeHg for wild fish was performed using the following correlation equation taken from the parallel analysis of these contaminants $[MeHg] = -0,166 (\pm 0,0827) + 1,14 (\pm 0,0515)\log[Hg_{TOT}]$ $r = 0,967$, $r^2 = 93,5$ as described above (26). For seafood species, this ratio was derived from the scientific literature and set at 60% for octopus and crustaceans of the same trophic level (29) and at 40% for Mediterranean mussels (10). The MeHg values were taken directly from the specific analysis of farmed seabass and seabream of market size (350 g ww).

3.2. Fish and seafood consumption. The median, mean and 95th percentile of seafood consumption expressed as mg/kg bw per day were taken from the National Comprehensive Food Consumption Database (30), referred to seafood consumers only. The details concerning the most frequently consumed marine fish species are available on the same database and from the market statistics of local fisheries (31) and are reported in Table 1 along with their total lipid and LC omega-3 PUFA contents expressed as percentages of 100 g of product ww.

Table 1: most Mediterranean seafood species on Italian local markets (31).

Scientific name	Common name	Amount %	Commercial value %	Lipid content %	Omega-3 content %	Ref.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mediterr. mussel	8.9	2.1	13 - 32	1.9 - 5.6	(32)
<i>Chamelea gallina</i>	Striped venus			0.73-1.5	0.25 - 0.63	(33)
<i>Sparus aurata</i>	Seabream farmed	8.9	8.1	8.4	1.9 - 2.3	(34)
<i>Engraulis encrasicolus</i>	European anchovy	6.8	6.0	2.6	0.79	(35)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Seabass farmed	6.5	6.5	2.5 - 3.8	0.46 - 1.0	(36)
<i>Octopus vulgaris</i>	Common octopus	4.3	4.6	16	0.40	(35)
<i>Merluccius merluccius</i>	European hake	3.9	4.5	0.30	0.11	(35)
<i>Loligo vulgaris</i>	European squid	3.6	3.9	1.7	0.40	(35)
<i>Nephrops norvegicus</i>	Norway lobster	3.5	3.8	0.65	0.24	(26)
<i>Xiphias gladius</i>	Swordfish	3.1	6.0	2.78	18.91	(26)
<i>Scomber scombrus</i>	Atlantic mackerel	2.2	1.5	11	2.8	(26)
<i>Sardina pilchardus</i>	European pilchard	1.9	1.4	15	4.3	(35)
<i>Mullus spp.</i>	Mulletts	1.7	2.0	3.2	0.77	(37)

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

The default body weights for children (3-9 y), male adults (18-64 y) and female adults (18-64 y) were derived from the INRAN (30) and harmonized with those reported in the EFSA guidance (38), in order to calculate the threshold level in consumed fish and seafood compatible with the MeHg TWI of 1,3 µg/kg bw, in the consumer groups considered. To formulate appropriate dietary indications, the threshold contamination levels for the different categories of consumers calculated according to the mean body weight and seafood consumption, were matched with the median MeHg contamination for each species considered and the associated Median Absolute Deviation (MAD). Mean seafood intakes result equivalent to four servings per week giving a total consumption over two months of 32 servings. This time-frame was selected to account for the assumed half-life of MeHg of 57 ± 18 days in blood (39), and for the more sensitive period of prenatal exposure, linked to the early stages of brain development in the foetus (40).

4. Results

4.1. Occurrence. The occurrence of Hg_{TOT} and MeHg and its main descriptors from the 69 seafood species analyzed are reported in **Tables 2** and **3**, together with their assigned trophic levels. In farmed European seabass samples, from five different farms, Hg_{TOT} results showed a mean and a standard deviation (sd) of $0,088 \pm 0,025$ mg/kg ww, and a median of 0,083 mg/kg ww; the direct MeHg values were $0,056 \pm 0,012$ as mean and sd, and 0,052 for the median. Similar results, in mg/kg ww, were found in samples of seabream taken from farms (N = 7): mean and sd = $0,059 \pm 0,018$, median = 0,058 for Hg_{TOT}, mean and sd = $0,035 \pm 0,020$, median = 0,038 for MeHg. MeHg accounted on average for 0,63% and 0,59% of the Hg_{TOT} found in seabass and seabream, respectively.

4.2. Seafood consumption and acceptable intakes. The threshold values (as the maximum acceptable MeHg contamination in seafood able to keep the intake below the corresponding TWI or other guidance values for food exposure), tailored to the mean seafood consumption and body weight for the different groups of consumers, were estimated to fall below 0,1 mg/kg ww and below 0,2 mg/kg ww, accounting for the the US NRC intake limit of 0,7 µg/kg bw and the EU TWI of 1,3 µg/ kg bw, respectively, as reported in **Table 4**. **Figure 2** shows a clustering of seafood species relevant for a reduction in MeHg intake, according to the above mentioned TWI.

Table 2: occurrence of Hg_{TOT} and MeHg in selected fish species from the Mediterranean Sea.

Fish species (scientific name) ^a	FAO English names ^a	ISSCAAP code ^a	Trophic level Range 2-5	MRU ^b ±s.e.	MeHg/Hg _{TOT} ratio (%) ^c	N	Hg _{TOT} (mg/kg ww)					MeHg (mg/kg ww)				
							Average	Median	MAD	Min	Max	Average	Median	MAD	Min	Max
<i>Axius rochei</i>	Bullet tuna	36	4.13	0.61	56	3	0.221	0.230	0.066	0.137	0.296	0.123	0.128	0.042	0.071	0.170
<i>Boops boops</i>	Bogue	33	2.97	0.12	50	8	0.145	0.125	0.025	0.096	0.249	0.064	0.064	0.016	0.047	0.140
<i>Centrocanthias cirrus</i>	Curled picarel	33	3.28	0.31	50	50	0.112	0.110	0.025	0.079	0.160	0.056	0.055	0.014	0.038	0.084
<i>Conger conger</i>	European conger	34	4.29	0.75	50	63	0.649	0.577	0.178	0.151	1.472	0.427	0.365	0.131	0.079	1.060
<i>Dentex dentex</i>	Common dentex	33	4.50	0.70	50	66	3.2019	0.832	0.450	0.775	4.450	1.602	0.553	0.043	0.510	3.742
<i>Dicentrarchus labrax</i>	European seabass	33	3.79	0.60	50	49	0.463	0.090	0.040	0.027	4.196	0.351	0.044	0.023	0.011	3.500
<i>Diplodus annularis</i>	Annular seabream	33	3.40	0.50	50	59	0.370	0.356	0.126	0.230	4.196	0.221	0.210	0.082	0.128	3.326
<i>Diplodus sargus</i>	White seabream	33	3.04	0.29	50	57	0.36	0.28	0.06	0.21	0.58	0.21	0.16	0.04	0.12	0.37
<i>Diplodus vulgaris</i>	Common two-banded seabream	33	3.24	0.37	50	62	0.604	0.505	0.215	0.179	1.592	0.395	0.313	0.147	0.096	1.159
<i>Engraulis encrasicolus</i>	European anchovy	35	3.11	0.45	50	48	0.110	0.080	0.030	0.050	0.291	0.057	0.038	0.016	0.022	0.167
<i>Lichia amia</i>	Leerfish	37	4.50	0.80	50	63	4.348	0.587	0.048	0.539	3.680	1.024	0.372	0.035	0.337	3.013
<i>Lithognathus mormyrus</i>	Sand steenbras	33	3.42	0.50	50	61	0.390	0.455	0.104	0.157	0.559	0.238	0.278	0.074	0.083	0.352
<i>Lophius piscatorius</i>	Angler (=Monk)	34	4.50	0.76	1.00	49	0.130	0.100	0.000	0.100	0.190	0.067	0.049	0.000	0.049	0.103
<i>Merlangius merlangus</i>	Whiting	32	4.37	0.77	50	53	0.176	0.160	0.040	0.120	0.240	0.095	0.084	0.023	0.061	0.134
<i>Merluccius merluccius</i>	European hake	32	4.42	0.78	50	52	0.159	0.132	0.057	0.048	0.490	0.087	0.068	0.034	0.021	0.303
<i>Mugil cephalus</i>	Flathead grey mullet	33	2.13	0.18	50	47	0.086	0.078	0.018	0.030	0.180	0.042	0.037	0.009	0.013	0.097
<i>Mullus barbatus</i>	Red mullet	33	3.15	0.35	1.00	56	0.233	0.235	0.055	0.148	0.353	0.131	0.131	0.034	0.077	0.208
<i>Mullus surmuletus</i>	Surmullet	33	3.42	0.51	1.00	51	0.258	0.129	0.079	0.050	0.784	0.154	0.066	0.044	0.022	0.517
<i>Muraena helena</i>	Mediterranean moray	33	4.18	0.61	50	64	0.748	0.642	0.303	0.267	1.880	0.503	0.412	0.216	0.151	1.401
<i>Mustelus mustelus</i>	Smooth-hound	38	3.83	0.50	1.00	59	2.406	0.360	0.113	0.210	14.650	2.267	0.213	0.074	0.115	14.556
<i>Pagellus bogaraveo</i>	Blackspot (=red) seabream	33	3.73	0.56	1.00	62	0.466	0.473	0.129	0.282	0.638	0.288	0.291	0.092	0.161	0.409
<i>Pegellus erythrinus</i>	Common pandora	33	3.40	0.47	1.00	68	0.91	0.99	0.47	0.19	2.91	0.64	0.67	0.34	0.10	2.31
<i>Raja clavata</i>	Thornback ray	38	3.76	0.59	1.00	55	0.384	0.213	0.131	0.071	1.170	0.243	0.117	0.078	0.033	0.816
<i>Sarda sarda</i>	Atlantic bonito	36	4.50	0.74	1.00	60	0.822	0.378	0.233	0.096	2.080	0.580	0.225	0.164	0.047	1.573
<i>Sardina pilchardus</i>	European pilchard (=Sardine)	35	3.05	0.19	50	48	0.092	0.090	0.028	0.010	0.160	0.046	0.044	0.016	0.004	0.084
<i>Sarpa salpa</i>	Salena	33	2.00	0.00	50	38	0.015	0.011	0.001	0.010	0.046	0.006	0.004	0.000	0.004	0.020
<i>Scomber japonicus</i>	Chub mackerel	37	3.09	0.43	50	52	0.22	0.14	0.01	0.13	0.39	0.13	0.07	0.01	0.07	0.24
<i>Scomber scombrus</i>	Atlantic mackerel	37	3.65	0.56	50	50	0.229	0.114	0.067	0.046	0.656	0.136	0.057	0.037	0.020	0.422
<i>Scorpaena porcus</i>	Black scorpionfish	34	3.93	0.65	50	63	0.610	0.560	0.145	0.170	1.574	0.394	0.352	0.103	0.091	1.144
<i>Scorpaena scrofa</i>	Red scorpionfish	34	4.27	0.73	50	60	0.428	0.422	0.094	0.134	0.639	0.262	0.255	0.064	0.069	0.410
<i>Scyllorhinus canicula</i>	Small-spotted catshark	38	3.69	0.55	1.00	69	1.174	1.092	0.524	0.170	2.320	0.839	0.754	0.410	0.091	1.781
<i>Seriola dumerilii</i>	Greater amberjack	37	4.50	0.80	50	59	0.310	0.359	0.001	0.210	0.360	0.180	0.212	0.001	0.115	0.213
<i>Serranus cabrilla</i>	Comber	33	3.35	0.47	50	57	0.322	0.296	0.076	0.165	0.610	0.190	0.170	0.051	0.087	0.388
<i>Serranus scriba</i>	Painted comber	33	3.82	0.62	50	56	0.249	0.252	0.078	0.165	0.330	0.141	0.142	0.051	0.087	0.193
<i>Solea solea</i>	Common sole	31	3.13	0.32	50	50	0.138	0.105	0.040	0.015	0.325	0.074	0.052	0.024	0.006	0.189
<i>Sparus aurata</i>	Gilthead seabream	33	3.26	0.48	50	50	0.145	0.109	0.050	0.033	0.350	0.078	0.055	0.028	0.014	0.206
<i>Sphyraena sphyraena</i>	European barracuda	37	4.04	0.51	50	69	2.097	1.110	0.524	0.534	5.139	1.664	0.770	0.399	0.334	4.410
<i>Spicara maena</i>	Blotched picarel	33	4.15	0.70	50	53	0.154	0.154	0.060	0.066	0.247	0.082	0.081	0.035	0.031	0.139
<i>Spondylisoma cantharus</i>	Black seabream	33	3.29	0.43	50	55	0.206	0.221	0.080	0.090	0.256	0.113	0.122	0.017	0.044	0.144
<i>Squalus acanthias</i>	Picked dogfish	38	4.30	0.67	1.00	64	0.951	0.670	0.510	0.117	2.950	0.698	0.432	0.348	0.059	2.342
<i>Thunnus thynnus</i>	Atlantic bluefin tuna	36	4.43	0.78	1.00	72	3.1288	1.540	0.464	0.320	2.004	0.936	1.116	0.391	0.186	1.507
<i>Trachurus araneus</i>	Spotted weever	33	4.00	0.66	50	65	0.83	0.67	0.31	0.23	1.93	0.57	0.44	0.23	0.13	1.44
<i>Trachurus draco</i>	Greater weever	33	4.18	0.71	50	65	0.582	0.741	0.019	0.246	0.760	0.374	0.485	0.014	0.138	0.499
<i>Trachurus trachurus</i>	Atlantic horse mackerel	37	3.64	0.58	50	61	0.496	0.437	0.196	0.066	1.120	0.317	0.265	0.131	0.031	0.776
<i>Trigla lyra</i>	Piper gurnard	34	3.46	0.45	50	55	0.360	0.215	0.120	0.010	1.000	0.231	0.119	0.068	0.004	0.682
<i>Uranoscopus scaber</i>	Stargazer	34	4.38	0.70	50	63	0.883	0.504	0.223	0.276	2.730	0.625	0.316	0.155	0.157	2.144
<i>Xiphias gladius</i>	Swordfish	36	4.50	0.57	1.00	73	1.947	1.610	0.770	0.053	6.240	1.512	1.174	0.615	0.024	5.502
<i>Zeus faber</i>	John dory	34	4.40	0.80	50	55	0.302	0.212	0.034	0.166	0.620	0.178	0.116	0.021	0.088	0.396

^a FAO/WHO (2011).
^b Groups FAO of species: 31 = flounders, halibuts, soles; 33 = miscellaneous coastal fishes; 34 = miscellaneous demersal fishes; 35 = herrings, sardines, anchovies; 36 = tunas, bonitos, billfishes; 37 = miscellaneous pelagic fishes; 38 = sharks, rays, chimaeras, <http://www.fao.org/fishery/collection/astis/en>. Consulted on 28 February, 2012.
^c According to European Commission (EC) Regulation No. 629/08 of 2 July 2008, Official Journal of the European Union L 173 of 3 July 2008, p6.
^d Plotted on median values.

Table 3: occurrence of Hg_{TOT} and MeHg in molluscs.

Fish species (scientific name) ^a	FAO English names ^a	FAO ASFIS code ^a	ISSCAAP code ^a	Trophic level		MRL ^b	MeHg/Hg _{TOT} ratio (%) ^c	N	Hg _{TOT} (mg/kg ww)				MeHg (mg/kg ww)					
				Range	±s.e.				Average	Median	MAD	Min	Max	Average	Median	MAD	Min	Max
<i>Acanthocardia tuberculata</i>	Tuberculate cockle	KTT	56	2.10	na	0.50	40	31	0.065	0.060	0.040	0.010	0.230	0.026	0.024	0.016	0.004	0.092
<i>Callista chione</i>	Smooth callista	KLK	56	2.10	na	0.50	40	53	0.029	0.030	0.010	0.010	0.060	0.012	0.012	0.004	0.004	0.024
<i>Chamelea gallina</i>	Striped venus	SVE	56	2.10	na	0.50	40	78	0.039	0.030	0.010	0.010	0.190	0.016	0.012	0.004	0.004	0.076
<i>Chlamys varia</i>	Variategated scallop	VSC	55	2.10	na	0.50	40	25	0.023	0.020	0.010	0.010	0.090	0.009	0.008	0.004	0.004	0.036
<i>Crassostrea gigas</i>	Cupped oyster	OYC	53	2.10	na	0.50	40	34	0.032	0.030	0.016	0.005	0.090	0.013	0.012	0.006	0.002	0.036
<i>Donax trunculus</i>	Truncate donax	DXL	56	2.10	na	0.50	40	4	0.023	0.015	0.005	0.010	0.050	0.009	0.006	0.002	0.004	0.020
<i>Ensis siliqua</i>	Sword razor shell	EQI	56	2.10	na	0.50	40	35	0.101	0.060	0.020	0.030	0.590	0.040	0.024	0.008	0.012	0.236
<i>Loligo vulgaris</i>	European squid	SQR	57	3.40	na	0.50	60	7	0.143	0.100	0.060	0.040	0.300	0.086	0.060	0.036	0.024	0.180
<i>Macra corallina</i>	Rayed trough shell	MOX	56	2.10	na	0.50	40	3	0.020	0.020	0.010	0.010	0.030	0.008	0.008	0.004	0.004	0.012
<i>Phyllonotus trunculus</i>	Banded murex	FNT	52	2.30	na	0.50	60	54	0.109	0.085	0.025	0.040	0.570	0.066	0.051	0.015	0.024	0.342
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mediterranean mussel	MSM	54	2.10	na	0.50	40	337	0.030	0.020	0.010	0.005	0.470	0.012	0.008	0.004	0.002	0.188
<i>Nassarius mutabilis</i>	Changeable nassa	NSQ	52	2.30	na	0.50	60	25	0.120	0.090	0.030	0.030	0.470	0.072	0.054	0.018	0.018	0.282
<i>Octopus vulgaris</i>	Common octopus	OCC	57	3.40	na	0.50	60	10	0.108	0.102	0.030	0.023	0.260	0.065	0.061	0.018	0.014	0.156
<i>Ostrea edulis</i>	European flat oyster	OYF	53	2.10	na	0.50	40	11	0.040	0.040	0.010	0.020	0.060	0.016	0.016	0.004	0.008	0.024
<i>Paracentrotus lividus</i>	Stony sea urchin	URM	76	2.20	na	0.50	60	22	0.045	0.040	0.010	0.020	0.130	0.027	0.024	0.006	0.012	0.078
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Deep-water rose shrimp	DPS	45	2.80	na	0.50	60	11	0.228	0.180	0.040	0.030	0.613	0.137	0.108	0.024	0.018	0.368
<i>Pecten jacobaeus</i>	Great mediterranean scallop	SJA	55	2.10	na	0.50	40	8	0.016	0.015	0.005	0.010	0.030	0.007	0.006	0.002	0.004	0.012
<i>Ruditapes decussatus</i>	Grooved carpet shell	CTG	56	2.10	na	0.50	40	115	0.064	0.060	0.020	0.010	0.190	0.026	0.024	0.008	0.004	0.076
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Japanese carpet shell	CLJ	56	2.10	na	0.50	40	502	0.041	0.040	0.020	0.010	0.190	0.016	0.016	0.008	0.004	0.076
<i>Sepia officinalis</i>	Common cuttlefish	CTC	57	3.40	na	0.50	60	25	0.291	0.192	0.068	0.049	0.955	0.175	0.115	0.041	0.029	0.573
<i>Venus verrucosa</i>	Warty venus	VEV	56	2.10	na	0.50	40	4	0.058	0.060	0.000	0.050	0.060	0.023	0.024	0.000	0.020	0.024

^c FAO/WHO (2011).

^a Groups FAO of species: 45 = shrimps, prawns; 52 = abalones, winkles, conchs; 53 = oysters; 54 = mussels; 55 = scallops, pectens; 56 = clams, cockles, arkshells; 57 = squids, cuttlefishes, octopuses; 76 = sea-urchins and other echinoderms. <http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en>. Consulted on 28 February, 2012.

^b According to European Commission (EC) Regulation No. 420/11 of 29 April 2011. Official Journal of the European Union L 111 of 30 April 2011, p. 3.

^c Plotted on median values.

Table 4: threshold levels for the maximum acceptable MeHg contamination in seafood, referred to fish Consumers only from South Italy and Isles, accounting for the mean body weight for the different categories, and the considered intake guidance values: 1.3 µg/kg bw (8) and 0.7 µg/kg bw (7) (between brackets, in italics).

Consumers	Age (year)	Mean body weight (kg)	Max MeHg intake (µg/week/person)	Seafood consumption (g/week/person)			Threshold levels (mg/kg ww)		
				Mean	Median	95P	Mean	Median	95P
Children	3-10	23.1	29.9 (16.1)	469	378	966	0.06 (0.03)	0.08 (0.04)	0.03 (0.02)
Women	18-64	67.2	65.0 (35.0)	602	513	1185	0.15 (0.08)	0.17 (0.09)	0.07 (0.04)
Men	18-64	82.0	81.9 (44.1)	626	545	1503	0.17 (0.09)	0.20 (0.11)	0.07 (0.04)

5. Discussion

5.1. Seafood in the Mediterranean context. The twenty-one countries bordering the Mediterranean Sea have a population of around 450 million people, of whom around 150 million live in the coastal zones, with food habits based on local seafood consumption. This geo-referenced situation is determined basically by cultural heritage (6), the perception that the quality of fish is strictly bound to its freshness and to its low/zero mileage transport (31), and socio-economic considerations: fisheries are one of the more important socioeconomic resources of the Mediterranean region, providing about 1'686'351 tons of catches in 2007 (41). Within this framework, it seemed interesting to gather data from national monitoring programmes and research activities able to improve our knowledge about the occurrence of Hg_{TOT} /MeHg in seafood from this area.

5.2. Uncertainties. The principal uncertainties in our dataset arise from a lack of information about the size of fish when sampled during food safety residue-monitoring programmes: however, it is possible to assume that they are of commercial size and that they represent the species most sold and consumed. The limited representativeness ($N = <30$) of the samples of some species hampered the definition of a sound statistical analysis of the occurrence of Hg_{TOT} /MeHg (42). However, the calculated mean, median and median absolute deviation (MAD), together with the report of minimum and maximum values, provide an initial overview of the range of contamination, thus also giving an early indication about the presumed skewness of the distribution. The standard deviation can more consistently be plotted on farmed fish data, as exposure to MeHg is determined mainly by the quality of the feeding stuffs administered (43). Left-censored data were recorded in bivalve molluscs only and account for 30% of the samples analyzed and managed with the upper bound approach. Considering that molluscs intake is reported by only 20% of fish consumers (30), this uncertainty should have a negligible effect on the exposure scenarios. The use of an experimentally derived equation for the conversion of Hg_{TOT} into MeHg data allows the uncertainties related to possible overestimation of the MeHg content in Mediterranean seafood to be refined under the conservative assumption that the Hg_{TOT} content basically accounts for the

presence of its organic form(s) in fish, irrespective of their trophic level and size: this conservative approach matches the conversion ratio according to the 95% upper confidence limit of the equation (see [Supplementary material](#)). In substantial agreement with the experimental data on which the proposed correlation relies, other authors (44) recently reported an average MeHg/ Hg_{TOT} ratio in marine fish ranging from 53% in anchovies and sardines, to 76% in tuna, in a study focused on seafood available on the German market. However, such equation cannot be applied to fish and seafood caught from highly contaminated environments, due to nonlinearities between total Hg input, MeHg formation, and MeHg bioaccumulation (45). In agreement with the Mediterranean georeferenced approach, the threshold limit for a maximum allowable contamination in seafood, based on intakes, accounts for the health-based guidance value for MeHg, the EFSA TWI of 1,3 µg/kg bw; this TWI is based on several assumptions, each associated with some degree of uncertainty, in order to protect the developing foetus from neurotoxic effects. It has been adopted for all classes of consumers even though adults may be less sensitive to the adverse effects of methyl mercury. Because the possible need of additional precaution for women in childbearing age, the more conservative guidance value for MeHg of 0,7 µg/kg bw proposed by the National Research Council of the United States of America (7) has been also considered. To endorse the possible translation of our investigation into risk management options within the European Union, [Tables 2](#) and [3](#) report the corresponding Maximum Residue Limit for Hg_{TOT}, under the above EU Regulation No 1881/2006 (46).

5.3. Dataset. We followed the approach described in a recent French study for the estimation of MeHg intake from seafood consumption in pregnant woman (47), based on an experimentally derived Hg_{TOT}/MeHg correlation coefficient in fish. On the median values, results gave correlations ranging from 30% in vegetarian low-contaminated species (*Salpa salpa*, TL = 2,00) to 72% in top piscivorous predators (*Xiphias gladius*, TL = 4,50) ([Table 2](#)). When plotting the observed contaminations with the assigned trophic level, it seems evident that major variations in median MeHg contents were found in top predatory fish ([Figure 2](#)). This is a consequence both of the rather large sd in the assigned trophic levels (27) and of their pelagic behavior, with a migratory

tendency to catch prey from mercury hot spots in the Mediterranean (a comparison of the results reported in this work with the published inventoried data on georeferenced basis is reported as a Table in the supplementary data). It is worth noting that in some species, such as the European hake, the recorded occurrence of Hg_{TOT} and MeHg is not in line with the assigned trophic level; this result, in good agreement with previous reports (18), can be attributed to the preferred prey of this species, represented mainly by small crustaceans, at least for fish of commercial size. It would therefore seem preferable to follow a species-specific approach when investigating contaminants in fish, regardless of the assigned trophic level. In this regard the large analytical dispersion observed in the dataset of *Parapenaeus longirostris* (Deep-water rose shrimp) (Table 2) is in line with that already described by other authors (48), as being related to the different commercial size: in fish measuring less than 10 cm the Hg_{TOT} reported ranged from 0,10 to 0,70 mg/kg ww; over 16 cm of length, the minimum/maximum range described was 0,80-1,8 mg/kg ww. Of some interest are the levels of Hg_{TOT} and MeHg found in farmed gilthead seabream and seabass: the origin and amount of the fish meal in the feed formula, can be assumed as the main factors determining both the MeHg accumulation and the MeHg/Hg_{TOT} ratio (37). Consequently, this ratio in farmed fish was higher than that recorded in the corresponding wild species (on average 0,60 vs 0,50) (Table 2). The choice of the smaller commercial size of farmed fish (i.e. 350 g vs 900 g) may be recommended to minimize risk for more sensitive groups. Recent studies in such euryhaline farmed species indicate also lower levels of polychlorodibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorodibenzofurans (PCDFs), dioxin-like poly-chlorobiphenyls (DL-PCBs), non-dioxin-like polychlorobiphenyls (NDL-PCBs), and polybromodiphenyl ethers (PBDEs) than those from caught species (49). This indicates the overall higher food safety of the Mediterranean aquaculture vs wild seafood.

5.4. Advisories. The threshold guidance levels for the maximum allowed MeHg contamination in seafood reported in Table 4, clearly indicate that children may be more exposed on account of their lower food intake vs bw ratio than adults. Within a conservative approach, the lowest threshold value estimated for children should be

considered for women in childbearing age, as far as Hg levels in foetal blood may be about 1.7 times higher than those recorded in maternal blood (50). In coastal populations, the amount of seafood eaten and its lipid composition are themselves sufficient to comply with the Recommended Daily Allowance (RDA) of LC-omega3-PUFA (0,2% of the energy intake or 0,5 g/day) (6) (Table 1). On the basis of 3-5 seafood servings per week on average, any effective risk-mitigation efforts should be based on targeted dietary advice to endorse a responsible choice of geo-referenced fish. It is clear from Figure 2 that a balanced choice based on Mediterranean and related bivalve mollusks (MSM), European anchovy (ANE), gilthead seabream (SBG), common octopus (OCC) European pilchard (PIL), Atlantic mackerel (MAC) European hake (HKK), among wild species, and farmed seabass and seabream, will not contribute to dietary exposures in excess of the MeHg TWI for children. This indication is matched by the fact these species are the most consumed/caught at local level (Table 3), suggesting an acceptable intake scenario.

The consumption of top predatory fish should be discouraged in the most susceptible persons (children and women of childbearing age) and this advice should be extended to apply not only to bluefin tuna and swordfish (already covered by advisories at national level), but also to pandoras, weevers, Atlantic bonito, leerfish, dentex and European barracuda, in consideration of their higher levels of contamination and of the associated variability. For the other consumer groups, top predator species could possibly be included in a well balanced diet (no more than one/two serving per month) in combination with the less contaminated species listed above. The grey area is represented by species such as mullet and cephalopods, whose median MeHg levels are close to the corresponding threshold level and whose MADs range is beyond (Figure 2). A pragmatic approach would be to choose fish of commercial size rather than larger specimens and to balance the top predator species in the diet with the consumption of less contaminated seafood in a ratio of 1:5, equivalent to no more than one serving per week. The indications suggested above should be adequately adapted to the general Italian population, the majority of whom live in a continental/urban context, characterized by reduced seafood consumption: the median intake for the Italian

population overall is about 56% of that reported for fish consumers only ⁽³⁰⁾ (Table 4). Moreover, fish consumption consists mainly of freshwater species farmed inshore and in 75% of cases the wild marine species originating from FAO zones other than the Mediterranean and Black Sea area - FAO 37.

6. Conclusions

The improvements in knowledge concerning the occurrence of Hg_{TOT}/MeHg in different seafood species from georeferenced Mediterranean area should permit the formulation of advice regarding food habits that could maximize the benefits, by reducing the risks of MeHg intake in sensitive groups without compromising seafood consumption, and should allow a better understanding of the food risk associated to mercury high polluted sites. As risk management option, a wild fish label on georeferenced basis in a more detailed way than the in force prescription using FAO codes could support such efforts. Further work is in progress, to implement the Hg_{TOT}/MeHg database in Mediterranean seafood and to assess MeHg intakes also through Total Diet and Duplicate Diets Studies, on strict geo-referenced basis in the different Italian coastal communities.

References

- (1) Martinez-Frias J, Navarro A, Lunar R, Garcia-Guinea J, 1998. Mercury pollution in a large marine basin: A natural venting system in the south-west Mediterranean margin. *Nat Resour* 34: 9-10
- (2) Grassi S, Netti R, 2000. Sea water intrusion and mercury pollution of some coastal aquifers in the province of Grosseto (Tuscany, Italy). *J Hydrol* 237: 198-211
- (3) Moldenhauer KM, Zielhofer C, Dominik F, 2008. Heavy metals as indicators for Holocene sediment provenance in a semi-arid Mediterranean catchment in northern Tunisia. *Quat Int* 189: 129-134
- (4) Covelli S, Langone L, Acquavita A, Piani R, Emili A, 2012. Historical flux of mercury associated with mining and industrial sources in the Marano and Grado Lagoon (northern Adriatic Sea). *Estuar Coast Shelf Sci* 1: 1-13
- (5) UNEP (United Nations Environment Programme) Chemicals, 2002. Global Mercury Assessment [270 pp.] (<http://www.chem.unep.ch/mercury/Report/Final%20report/final-assessment-report-25nov02.pdf>)

- (6) FAO/WHO, 2010. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. [63 pp.] (<http://www.fao.org/docrep/014/ba0136e/ba0136e00.pdf>)
- (7) NRC (National Research Council), 2000. Toxicological Effects of Methylmercury. *National Academy Press*, Washington, DC. [333 pp.]
- (8) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2012. Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food (EFSA-Q-2011-00923). *EFSA Journal* 10, 2985 [241 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/2985.pdf>)
- (9) Mahaffey KR, Sunderland EM, Chan HM, Choi AL, Grandjean P, Marien K, Oken E, Sakamoto M, Schoeny R, Weihe P, Yan CH, Yasutake A, 2011. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev* 69: 493-508
- (10) Di Leo A, Cardellicchio N, Giandomenico S, Spada L, 2010. Mercury and methylmercury contamination in *Mytilus galloprovincialis* from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy): risk evaluation for consumers. *Food Chem Toxicol* 48: 3131-3136
- (11) Spada L, Annicchiarico C, Cardellicchio N, Giandomenico S, Di Leo A, 2012. Mercury and methylmercury concentrations in Mediterranean seafood and surface sediments, intake evaluation and risk for consumers. *Int J Hyg Environ Health* 215: 418-426
- (12) Gabellini M, Barra M, Tranchida G, Bellanca A, Neri R, Budillon F, Saggiomo R, Mazzola S, Saggiomo V, 2011. The key role played by the Augusta basin (southern Italy) in the mercury contamination of the Mediterranean Sea. *J Environ Monit* 13: 1753-1760
- (13) Elhamri H, Idrissi L, Coquery M, Azemard S, El Abidi A, Benlemlih M, Saghi M, Cubadda F, 2007. Hair mercury levels in relation to fish consumption in a community of the Moroccan Mediterranean coast. *Food Addit Contam* 11: 1236-1246
- (14) Diez S, Montuori P, Pagano A, Sarnacchiaro P, Bayona JM, Triassi M, 2008. Hair mercury levels in an urban population from southern Italy: fish consumption as

- a determinant of exposure. *Environ Int* 34: 162-167
- (15) Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa MJ, Diez S, Vioque J, Ballester F, Fernandez MF, 2010. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res* 110: 96-104
 - (16) Storelli MM, Giacominielli-Stuffler R, Marcotrigiano GO, 2002. Total and methyl-mercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 44: 1354-1358
 - (17) Storelli MM, Giacominielli-Stuffler R, Storelli A, Marcotrigiano GO, 2003. Total Mercury and methylmercury content in edible fish from the Mediterranean Sea. *J Food Prot* 66: 300-303
 - (18) Storelli MM, Storelli A, Giacominielli-Stuffler R, Marcotrigiano GO, 2005. Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. *Food Chem* 89: 295-300
 - (19) Perugini M, Visciano P, Manera M, Zaccaroni A, Olivieri V, Amorena M, 2009. Levels of Total Mercury in Marine Organisms from Adriatic Sea, Italy. *Bull Environ Contam Toxicol* 83: 244-248
 - (20) Copat C, Bella F, Castaing M, Fallico R, Sciacca S, Ferrante M, 2012. Heavy metals concentrations in fish from Sicily (Mediterranean Sea) and evaluation of possible health risks to consumers. *Bull Environ Contam Toxicol* 88: 78-83
 - (21) Ipolyi I, Massanisso P, Sposato S, Fodor P, Morabito R, 2004. Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island. *Anal Chim Acta* 505: 145-151
 - (22) Storelli MM, Giacominielli-Stuffler R, Storelli A, Marcotrigiano GO, 2005. Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: a comparative study. *Mar Pollut Bull* 50: 993-1018
 - (23) Corsi I, Mariottini M, Menchi V, Sensini C, Balocchi C, Focardi S, 2002. Monitoring a marine coastal area: use of *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* as bioindicators. *PSZNI Mar Ecol* 23: 138-153
 - (24) Groth E, 2010. Ranking the contributions of commercial fish and shellfish varieties

- to mercury exposure in the United States: implications for risk communications. *Environ Res* 110: 226-236
- (25) Lambert KF, Evers DC, Warner KA, King SL, Selin NE, 2012. Integrating mercury science and policy in the marine context: Challenges and opportunities. *Environ Res* 119: 132-142
- (26) FISR (Special Integrative Fund for Research) project, 2011. Added value of the Italian seafood: geo-referenced contamination of micropollutants, acids composition of fish meat, and welfare status of farmed species. Final Report of the National Research Council Project [92 pp.] (http://www.iss.it/binary/fisr/cont/Text_Report_3_FISR_121010_rev_2bis.pdf)
- (27) Stergiou KI, Karpouzi VS, 2002. Feeding habits and trophic levels of Mediterranean fish. *Rev Fish Biol Fish* 11: 217-254
- (28) FishBase (A Global Information System on Fishes), for the specific function of tools such as trophic pyramids available at: http://www.fishbase.org/trophiceco/trophicanalysis.php?ve_code=13&tag=1&ht=&ft=
- (29) Raimundo J, Vale C, Canario J, Branco V, Moura I, 2010. Relations between mercury, methyl-mercury and selenium in tissues of *Octopus vulgaris* from the Portuguese Coast. *Environ Pollut* 158: 2094-2100
- (30) INRAN (National Institute of Food Research and Nutrition), 2012. National Food Consumption Database. Available at: http://www.inran.it/710/I_consumi_alimentari_INRAN-SCAI_2005-06.html
- (31) ISMEA (Agricultural Market Food Services Institute), 2011. Seafood on the table: perceptions and consumers attitudes of Italian people [25 pp.] (<http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/6191>)
- (32) Orban E, Di Lena G, Nevigato T, Casini I, Marzetti A, Caproni R, 2002. Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chem* 77: 57-65
- (33) Orban E, Di Lena G, Nevigato T, Casini I, Caproni R, Santaroni G, Giulini G, 2006. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea*

- gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chem* 101: 1063-1070;
- (34) De Francesco M, Parisi G, Perez-Sanchez J, Gomez-Requeni P, Medale F, Kaushik SJ, Mecatti M, Poli BM, 2007. Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. *Aquacult Nutr* 13: 361-372
 - (35) INRAN (National Institute of Food Research and Nutrition), 2012. Tables of food composition. Available at: http://www.inran.it/646/tabelle_di_composizione_degli_alimenti.html
 - (36) Roncarati A, Sirri F, di Domenico A, Brambilla G, Iamiceli AL, Melotti P, Meluzzi A, 2010. Survey of qualitative traits of European seabass cultivated in different rearing systems. *Eur J Lipid Sci Technol* 112: 770-779
 - (37) Roncarati A, Brambilla G, Meluzzi A, Iamiceli AL, Fanelli R, Moret I, Ubaldi A, Miniero R, Sirri F, Melotti P, Di Domenico A, 2012. Fatty acid profile and proximate composition of fillets from *Engraulis encrasicolus*, *Mullus barbatus*, *Merluccius merluccius* and *Sarda sarda* caught in Tyrrhenian, Adriatic and Ionian seas. *J Appl Ichthyol* 28: 545-552
 - (38) EFSA Scientific opinion, 2012. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 10(3): 2579 [32 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/2579.pdf>)
 - (39) Yaginuma-Sakurai K, Murata K, Iwai-Shimada M, Nakai K, Kurokawa N, Tatsuta N, Satoh H, 2012. Hair-to-blood ratio and biological half-life of mercury: experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. *J Toxicol Sci* 37: 123-130
 - (40) Grandjean P, Landrigan PJ, 2006. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368: 2167-2178
 - (41) European Commission, Fisheries Directorate, 2010. Facts and Figures on the Common Fisheries Policy. Basic statistical data [52 pp.] (http://ec.europa.eu/fisheries/documentation/publications/pcp2010_en.pdf)
 - (42) Kroes R, Muller D, Lambe J, Lowik MRH, Van Klaveren J, Kleiner J, Massey R,

- Mayer S, Urieta I, Verger P, Visconti A, 2002. Assessment of intake from the diet. *Food Chem Toxicol* 40: 327-385
- (43) Roncarati A, Brambilla G, Miniero R, Brizzi G, Cascone V, Mangiacotti M, Marchesani G, Miedico O, Chiaravalle E, 2009. Methyl-mercury in feeds and in sea bream fillet under routine farming conditions, In: Proceedings European Aquaculture Association: 529-530. Available at: <http://www.easonline.org/>
- (44) Kuballa T, Moellers M, Schoeberl K, Lachenmeier DW, 2011. Survey of methylmercury in fish and seafood from the southwestern German market. *Eur Food Res Technol* 232: 737-742
- (45) Carrasco L, Barata C, Berthou EG, Tobias A, Bayona JM, Diez S, 2011. Patterns of mercury and methylmercury bioaccumulation in fish species downstream of a long-term mercury-contaminated site in the lower Ebro River (NE Spain). *Chemosphere* 84: 1642-1649
- (46) Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. OJEU 20/12/2006, L 364: 5-24
- (47) Pouzaud F, Ibbou A, Blanchemanche S, Grandjean P, Krempf M, Philippe HJ, Verger P, 2010. Use of advanced cluster analysis to characterize fish consumption patterns and methylmercury dietary exposures from fish and other sea foods among pregnant women. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 20: 54-68
- (48) Capelli R, Drava G, Siccardi C, De Pellegrini R, Minganti V, 2004. Study of the distribution of trace elements in six species of marine organisms of the Ligurian Sea (north-western Mediterranean) - comparison with previous findings. *Ann Chim* 94: 533-546
- (49) Miniero R, Brambilla G, Chiaravalle E, Mangiacotti M, Brizzi G, Ingelido AM, Abate V, Cascone V, Ferri F, Iacovella N, Di Domenico A, 2011. Chemometric data analysis application to *Sparus aurata* samples from two offshore farming plants along the Apulian (Italy) coastline. *Chemosphere* 85: 465-472
- (50) Stern AH, Smith AE, 2003. An assessment of the cord blood: maternal blood methylmercury ratio: implications for risk assessment. *Environ Health Perspect* 111: 1465-1470.

2.7 Variabilità dell'accumulo del cadmio in cefalopodi (*Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* e *Todarodes sagittatus*) campionati in Sardegna nel periodo 2008-2012

Applied study, 2013. *Ital J Food Safety* 2(2): 81-85 [DOI: 10.4081/ijfs.2013.e24] (<http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/download/ijfs.2013.e24/pdf>)

“Variability of the cadmium accumulation in cephalopods (*Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* and *Todarodes sagittatus*) collected in Sardinia during the 2008-2012 period”

Piras Pierluigi, Chessa Giannina*, Cossu Maurizio*, Rubattu Federica*, Fiori Gianuario*

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Abstract

Cephalopods are known to accumulate cadmium and play an important role in its biomagnification. They are an essential link in marine trophic chain and represent an important case in studies on cadmium transfer to man through the food chain. Since cadmium concentration widely varies in different tissues of the cephalopods - mainly accumulating in the hepatopancreas - evisceration represents a recommended preliminary step to reduce cadmium intake in view of cephalopods consumption; yet, the residual concentration in the edible part may still be a risk for public health. This study is intended to assess cadmium levels variability in the muscles of Cephalopoda, considering the different feeding habitats and marine trophic webs. In compliance with EU regulation, a survey on cadmium and other heavy metal levels in various sea food, including cephalopods, was conducted by the Istituto Zooprofilattico of Sardinia in cooperation with local health authorities. During a five-year survey (2008-2012), 90 samples were collected from the following species: commons octopus (*Octopus vulgaris*), cuttlefish (*Sepia officinalis*), European squid (*Loligo vulgaris*), and flying squid (*Todarodes sagittatus*), located in different coastal areas and representatives of either benthic or nektonic habitats. Determination of cadmium levels was carried out according to Regulations (EC) No. 882/2004, No. 1881/2006 and No. 333/2007. Analysis of the edible portion (muscle) of fresh homogenised samples was carried out

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The results showed a highly skewed distribution of data. No statistically significant differences were observed among four distributions of the natural logs of cadmium levels in the species considered.

Keywords

Cadmium, Cephalopods, Bioaccumulation, Food safety

Introduzione

Il cadmio (Cd) è un metallo presente a basse concentrazioni nella crosta terrestre, associato con i minerali di zinco, piombo e rame. Come ha recentemente rimarcato anche la *World Health Organization* (1), la sua concentrazione può aumentare attraverso attività antropiche, in particolare tramite le attività estrattive, sia funzionanti che dismesse, essendo il Cd tipicamente reperito come sottoprodotto minerario e/o legato allo smaltimento di code minerarie, oltre che proveniente dall'industria dei combustibili fossili o dai rifiuti industriali. Una volta nei suoli, il Cd può diventare mobile ed essere assorbito dalla vegetazione e/o venire disperso negli ambienti acquatici. Si tratta, come è noto, di un elemento chimico non essenziale, potenzialmente tossico per gli organismi animali. I cefalopodi, tuttavia, come altri molluschi acquatici, dispongono di meccanismi di difesa verso tale elemento e verso altri metalli pesanti. Nella fattispecie, i cefalopodi ricorrono al sequestro dei metalli pesanti: l'isolamento nella ghiandola digestiva o epatopancreas di alcuni metalli pesanti bio-tossicologicamente importanti come il Cd rappresenta infatti una tendenza generale di tale gruppo zoologico (2, 3, 4, 5). Quando il Cd raggiunge tale organo, si lega a molecole del citosol, in particolare quelle aventi gruppi sulfidrilici, denominate genericamente metallotioneine (6, 7), diventando metabolicamente indisponibile. Per la detossificazione a lungo termine, il Cd può inoltre essere depositato nei lisosomi, come precipitato in granuli insolubili di minerali di solfuro o fosfato, ed essere quindi definitivamente rimosso dal *pool* come ione biologicamente attivo (8, 9). I cefalopodi rappresentano a loro volta una fonte importante di Cd per i relativi predatori, agendo come importanti vettori nel processo di biomagnificazione (10, 11, 12). Proprio il ruolo che essi possono svolgere nella distribuzione del Cd ai livelli trofici superiori ha motivato gli studi sull'accumulo di Cd

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metallioidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

nei cefalopodi in condizioni di esposizione controllata a breve termine e/o a mimare l'esposizione cronica (13). Le concentrazioni di Cd possono infatti variare tra i diversi tessuti e i diversi stadi di vita (14). Tuttavia il Cd, come si è detto, è accumulato nei visceri e soprattutto nell'epatopancreas (15, 16, 17, 18, 19, 20) e, pertanto, l'eviscerazione rappresenta un'operazione preliminare raccomandata ai fini della significativa riduzione dell'assunzione di Cd conseguente al loro consumo. I consumatori sono infatti esposti a varie dosi di Cd a seconda della via di esposizione; per la popolazione generale (esclusi in particolare i fumatori) il percorso dominante è però la via alimentare (21, 22). L'esposizione alimentare umana è stata affrontata anche recentemente, sia in riferimento alla popolazione italiana (23) che a quella dell'Unione Europea (24). L'esposizione al Cd attraverso prodotti alimentari è infatti di costante preoccupazione per la salute pubblica (1, 25), poiché quella a lungo termine dà luogo ad accumulo nell'organismo e può provocare effetti negativi di varia natura, anche gravi. Il Cd ha infatti una lunga emivita biologica (stimata in circa 15-30 anni), cui consegue la grande capacità di accumularsi nell'organismo. Organi bersaglio critici dell'esposizione a basse concentrazioni di Cd sono soprattutto fegato e reni, nei quali si deposita il 30-60% dell'elemento. Dal punto di vista delle proprietà cancerogene, inoltre, l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha classificato il Cd e i suoi composti come cancerogeni umani di classe 1. Sulla base dell'analisi del rischio, il *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) di esperti del *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* FAO/WHO aveva quindi stabilito un *Tolerable Weekly Intake* (TWI) provvisorio di 7 µg/kg di peso corporeo, a seguito del quale molte agenzie di regolamentazione in tutto il mondo fornirono però evidenze per un suo riesame, considerate le preoccupazioni per i margini di sicurezza dello standard proposto. Così ha fatto il *Panel* europeo di esperti per la sicurezza alimentare sui contaminanti nella catena alimentare, che ha raccomandato (25) e ribadito (26) l'orientamento per un ridotto TWI, pari a 2,5 µg/kg di peso corporeo. Col presente contributo si è voluto valutare la variabilità dell'accumulo di Cd nelle parti edibili (muscolo) in quattro specie di cefalopodi, comunemente presenti sui nostri mercati, oltre che provenienti da diverse zone della costa e rappresentanti diversi ambienti, sia

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

nectonici che bentonici. Tale classe dei molluschi sta peraltro attirando una sempre maggior attenzione da parte delle discipline biologiche applicate al mare, assumendo una crescente importanza per la pesca europea (27). In particolare, il polpo *Octopus vulgaris* (famiglia Octopodidae) è una specie tipicamente bentonica e costiera (neritica), di acque basse o poco profonde (quasi mai sotto i 100 m), che vive una vita solitaria negli anfratti rocciosi del fondo e tra le praterie di fanerogame marine; la seppia *Sepia officinalis* (famiglia Sepiidae) è invece una specie necto-bentonica (demersale) della zona litorale e relativa scarpata continentale, che frequenta habitat diversi, come roccia, sabbia, fango, coralli e alghe, in prossimità della costa e fino a 150 m di profondità, dove si trova con più abbondanza; il calamaro *Loligo vulgaris* (famiglia Loliginidae) è anch'essa una specie costiera, semi-pelagica, con una distribuzione più o meno estesa, comunque generalmente mai al di sotto della piattaforma continentale, e compie migrazioni stagionali tra basse batimetrie e 250 m di profondità; il totano *Todarodes sagittatus* (famiglia Ommastrephidae) è, infine, una specie pelagica e semi-demersale, che vive tra la superficie e 800 m di profondità e compie significative migrazioni sia stagionali che diurne verticali, stando vicino al fondo durante il giorno. Tutte e quattro le specie sono carnivore e si nutrono principalmente di crostacei, piccoli pesci e molluschi, compresi i conspecifici. Il processo di bioaccumulo di metalli pesanti è stato infatti descritto come passibile di variazione a seconda delle specificità degli organismi, come l'età/dimensione, sesso ed ecologia, oltre che secondo la biodisponibilità relativa del metallo nella dieta e nell'acqua di mare (18, 28, 29).

Oggetto dell'indagine è l'analisi comparativa delle concentrazioni di Cd tra le quattro specie di cefalopodi. L'appartenenza a nicchie ecologiche diverse ha rappresentato il presupposto per la valutazione dell'eventuale influenza della specie e, indirettamente, dell'ambiente sulla capacità di tali organismi di bioaccumulare Cd nella parte edibile. In altri termini, tenuto conto che la normativa comunitaria esclude i visceri relativamente alla determinazione del Cd, lo scopo del presente studio è stato quello di indagare la variabilità intra- ed inter-specifica della sua distribuzione nella sola parte edibile e, quindi, valutare in che misura tale variabilità potesse rappresentare un fattore di rischio per i consumatori.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Case report

Nel quinquennio 2008-2012 sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca del Cd da parte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) della Sardegna 90 campioni di cefalopodi prelevati dai Servizi Veterinari delle ASL della Regione Sardegna, appartenenti alle specie polpo (*Octopus vulgaris*), seppia (*Sepia officinalis*), calamaro (*Loligo vulgaris*) e totano (*Todarodes sagittatus*). Il campionamento e la determinazione dei livelli di Cd nei cefalopodi sono stati svolti in conformità ai Regolamenti (CE) n. 882/2004 (30) e n. 333/2007 (31).

Il Cd è stato determinato sull'omogenato della parte muscolare, escludendo l'epatopancreas, così come previsto dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 (32) al relativo allegato (punto 3.2.11 del testo consolidato) che, per i cefalopodi, stabilisce tenori massimi da determinarsi nei prodotti *senza visceri*. Le concentrazioni di Cd sono state determinate in applicazione al metodo EPA 6020A (33) per l'analisi strumentale in associazione al metodo EPA 3052 (34) per gli aspetti che riguardano il trattamento del campione. Una porzione (1 gr) del campione omogenato è stata sottoposta a degradazione ossidativa mediante mineralizzazione acida, a temperatura e pressione controllata, in forno a microonde. La soluzione risultante, opportunamente diluita, è stata analizzata tramite tecnica *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS), strumentazione Agilent 7500CE (Agilent Technologies, Cernusco Sul Naviglio, Italia). Le concentrazioni sono state determinate per interpolazione del segnale di lettura con curve di taratura utilizzando il ^{111}Cd , quale isotopo di quantificazione, e il ^{115}In , quale standard interno. Le sequenze analitiche hanno previsto, oltre all'analisi dei campioni in esame, la lettura di soluzioni di controllo relative a bianco-reattivi e matrici certificate CRM 278 e CRM DOLT-2. La procedura analitica utilizzata è stata validata in conformità con la norma UNI EN ISO 17025/2005 e presenta un *limit of quantification* (LoQ) pari a 0,010 mg/kg.

Nell'analisi dei dati, non disponendo di una numerosità campionaria sufficiente ad indagare per variabili intraspecifiche (come la gamma di dimensioni e taglia in relazione all'età, e/o per provenienza geografica), ci si è concentrati a comparare solo la variabilità delle concentrazioni del metallo tra le quattro specie. Relativamente ai test

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

statistici, l'analisi della varianza [tramite *ANalysis Of VAriance* (ANOVA)] delle concentrazioni di Cd è stata svolta su log-trasformate naturali, dopo aver comunque saggiato l'ipotesi della distribuzione normale, ricorrendo al test di Shapiro-Wilk e, per l'ipotesi dell'uguaglianza della varianza (o della omoschedasticità), ricorrendo al test di Bartlett.

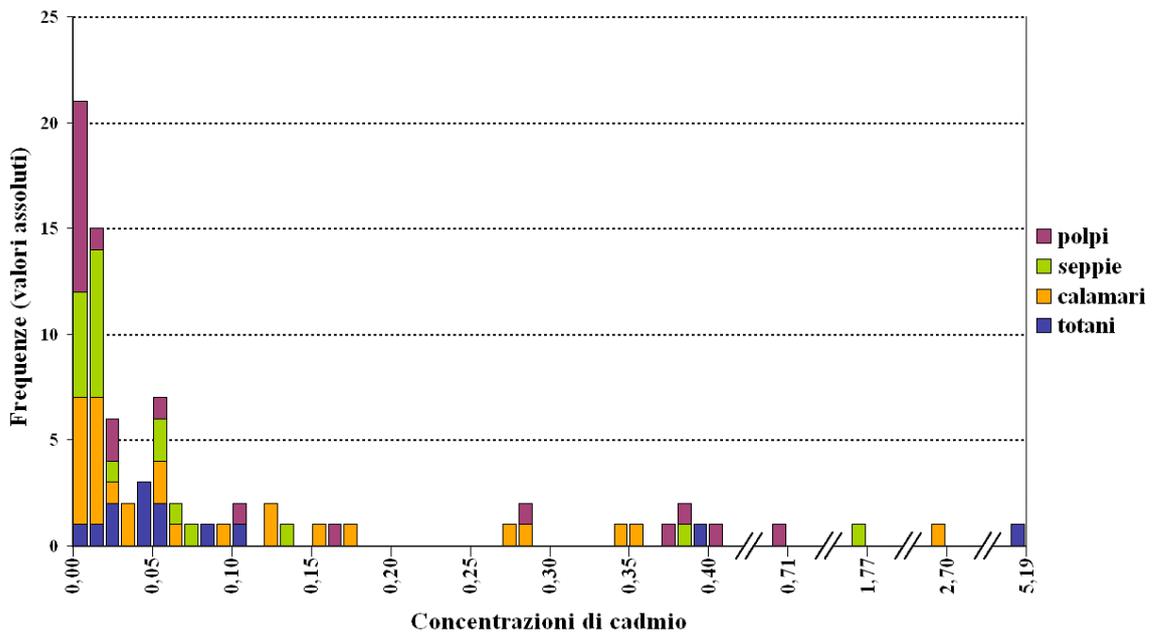
L'indagine, svolta con lo scopo di verificare se e in quale misura l'accumulo di Cd nei muscoli potesse significativamente differire tra le quattro specie di cefalopodi più rappresentative del pescato mediterraneo, ha consentito una prima analisi delle distribuzioni, con i risultati riportati nella **Tabella 1**.

Tabella 1: range, media (\pm Deviazione Standard) e mediana delle concentrazioni di cadmio (mg/kg di peso fresco) su cefalopodi “senza visceri”.

Specie	N	Range	Media \pm DS	Mediana
<i>Octopus vulgaris</i>	21	0,001 - 0,715	0,148 \pm 0,211	0,031
<i>Sepia officinalis</i>	23	0,001 - 1,775	0,257 \pm 0,493	0,017
<i>Loligo vulgaris</i>	31	0,002 - 2,700	0,249 \pm 0,552	0,054
<i>Todarodes sagittatus</i>	15	0,007 - 5,189	0,675 \pm 1,476	0,052

Nel complesso, il limite di tolleranza stabilito dalla normativa comunitaria, pari a 1,0 mg/kg di peso fresco nel prodotto *senza visceri*, è stato superato in 7 campioni su 90 (7,8%). Per confrontare i livelli medi di Cd nelle diverse specie si è ipotizzato di ricorrere, in prima battuta, ad un test parametrico, ovviamente dopo verifica delle precondizioni della statistica parametrica (ovvero sulla normalità delle distribuzioni e sulla loro omoschedasticità), e solo in caso contrario si è considerata l'alternativa di ricorrere residualmente ad un test non parametrico. La variabile del livello di Cd riscontrato nelle diverse specie di cefalopodi presentava da subito una distribuzione fortemente asimmetrica a destra (**Figura 1**). Inoltre, anche nell'eventualità di calcolare il test della normalità di Shapiro-Wilk, questo risultava essere senza dubbio significativo ($P < 0,0001$), avendo conferma che la variabile Cd nel muscolo dei cefalopodi non risultava normalmente distribuita.

Figura 1: distribuzione delle concentrazioni di cadmio (mg/kg di peso fresco su cefalopodi “senza visceri”) espresse come valori assoluti in istogramma a barre sovrapposte. L’asse delle concentrazioni si è dovuto ripetutamente spezzare a destra a causa della lunga coda delle distribuzioni, volendo comunque evidenziare i valori estremi di range per le quattro specie.



Con tali premesse, si è dovuto perciò cautelativamente fare ricorso a un test non parametrico (nel caso specifico, quello di Kruskal-Wallis, noto anche come *equality of populations rank test*) che ha restituito un chi-quadro di 3,7810 con 3 gradi di libertà, quindi non significativo ($P=0,2863$). Ciò ha portato ad una prima constatazione che la differenza tra i livelli medi di Cd nelle quattro specie di cefalopodi non risultasse statisticamente significativa ricorrendo ad un test non parametrico. Volendo però utilizzare anche un test parametrico (che, sotto il profilo statistico sarebbe risultato ovviamente più robusto), si è voluto fare un tentativo di *normalizzazione* delle distribuzioni attraverso la trasformazione logaritmica. In questo caso, la distribuzione era diventata piuttosto simmetrica (**Figura 2**) e il test della normalità di Shapiro-Wilk era risultato non significativo anche in questo caso ($P=0,2242$), dando così evidenza del fatto che la trasformazione logaritmica dei livelli di Cd avesse veramente *normalizzato* la relativa distribuzione. Non è restato perciò che verificare l’altra precondizione della statistica parametrica, ovvero la omoschedasticità delle quattro distribuzioni log-naturali, attraverso l’utilizzo del test di Bartlett. Quest’ultimo è risultato non significativo ($P=0,739$), tanto che le varianze sono da ritenersi significativamente

omogenee e la condizione di omoschedasticità quindi verificata. Per confrontare le medie log-naturali dei quattro gruppi di cefalopodi si è quindi passati all'utilizzo del test ANOVA, con i valori riferiti ai quattro gruppi riepilogati nella **Tabella 2** e con risultato non significativo ($P=0,2205$). Anche il test parametrico ha confermato che la differenza tra i livelli medi di Cd nelle quattro specie di cefalopodi non era statisticamente significativa.

Figura 2: Distribuzione delle concentrazioni di cadmio (mg/kg di peso fresco su cefalopodi senza visceri) espresse come valori log-naturali in istogramma a barre sovrapposte.

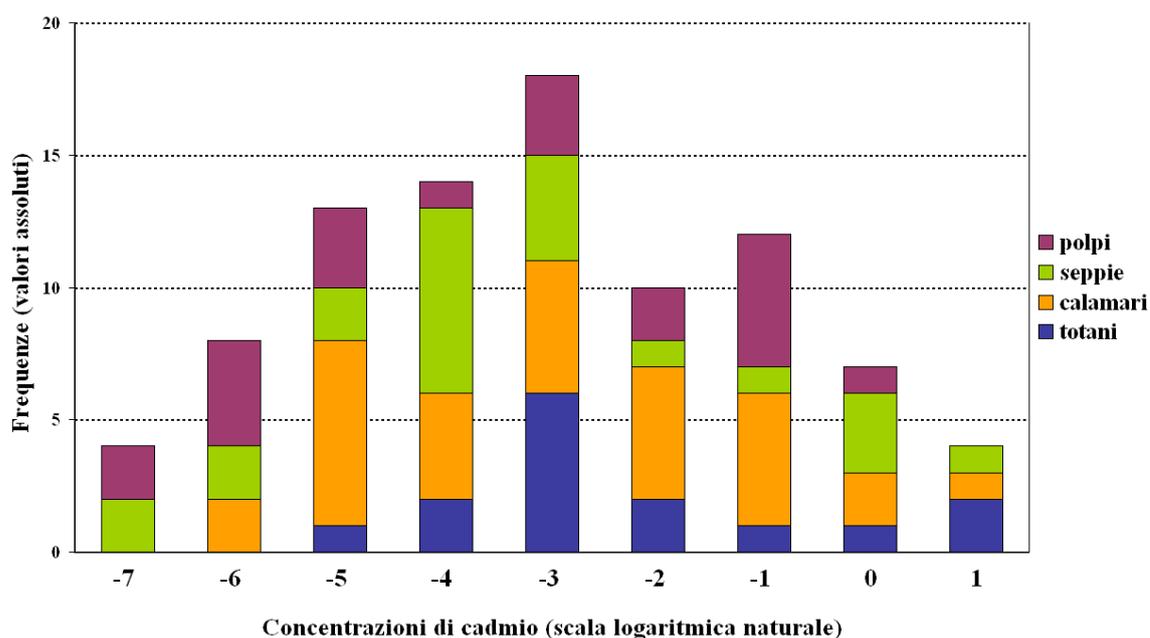


Tabella 2: media (\pm Errore Standard) e mediana delle distribuzioni log-naturali delle concentrazioni di cadmio (mg/kg di peso fresco) su cefalopodi “senza visceri.

Specie	N	Media in log-nat	\pm ES	Mediana in log-nat
<i>Octopus vulgaris</i>	21	3,611745	\pm 0,491848	3,473768
<i>Sepia officinalis</i>	23	3,368072	\pm 0,458345	4,074542
<i>Loligo vulgaris</i>	31	2,980759	\pm 0,337674	2,918771
<i>Todarodes sagittatus</i>	15	2,229905	\pm 0,479660	2,956512
totale	90	3,101827	\pm 0,218156	3,026670

Discussione

I cefalopodi sono in grado di accumulare Cd in diversi tessuti, con livelli notoriamente alti nell'epatopancreas e relativamente molto più bassi nel muscolo. Per quanto riguarda la variabilità dell'accumulo in tale tessuto, dalla presente indagine si possono trarre le seguenti conclusioni: i) la distribuzione delle frequenze di concentrazione del Cd nel muscolo delle specie di cefalopodi esaminati risulta nel complesso essere di tipo log-normale, come lo sono le specifiche distribuzioni nei quattro gruppi; ii) assumendo quindi l'ipotesi di base dell'analisi della varianza testata nello studio, ovvero la possibile scomposizione della varianza nelle sue due componenti, quella *interna ai gruppi* (o *within*) e quella *tra i gruppi* (o *between*), si è potuto evidenziare come la prima componente risultasse relativamente elevata rispetto alla seconda, in misura tale che, con alta significatività statistica, la differenza tra i quattro gruppi fosse praticamente attribuibile solo alla variabilità interna. In altre parole: nel confronto in esame, la varianza *between* non contribuirebbe significativamente alla varianza totale ed il fenomeno quindi non sarebbe legato a caratteristiche proprie di ciascuna delle quattro specie di cefalopodi.

Conclusioni

Dal momento che con la presente indagine non è stata evidenziata una variabilità significativamente diversa nei livelli di Cd nel muscolo tra i quattro gruppi, lo scenario più probabile che differenzerebbe ontologicamente le quattro specie sarebbe soprattutto legato alle condizioni di partizionamento del Cd nell'epatopancreas. I risultati del presente studio osservazionale sulla variabilità della distribuzione del Cd nel muscolo dei cefalopodi, è pertanto solo apparentemente contrastante con i risultati di altri studi svolti in condizioni sperimentali, dove sono state rilevate differenze nei meccanismi di accumulo del Cd, in particolare nell'epatopancreas, tra le diverse specie di cefalopodi. Come riferito da diversi autori (2, 4, 6, 7, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 22), i modelli differenti di partizionamento del Cd all'interno dei tessuti, in particolare dell'epatopancreas, benché sottintendano alcune significative differenze tra le specie, non determinerebbero infatti carichi di Cd molto dissimili a livello muscolare (5, 12, 17). Pertanto, ciò non deve essere preso in alcun modo come prova del fatto che il partizionamento ed il metabolismo del Cd siano identici in tutte le specie. Le ragioni delle differenze interspecifiche di

bioaccumulazione nei visceri, epatopancreas in particolare, riferite in bibliografia (e, per la specificità d'organo, biologicamente spiegate), si ritiene possano quindi plausibilmente essere compatibili con la significativa assenza di differenze osservata invece nei muscoli, data la fisiologia muscolare presumibilmente simile nelle specie considerate. A tale proposito, si ritengono però necessari ulteriori studi ed un prosieguo dell'indagine per confermare il fenomeno su scala più ampia. Al momento, il presente studio costituisce un contributo pratico per coloro che valutano *sul campo* il rischio Cd nei cefalopodi destinati al consumo umano - da consumarsi comunque *senza visceri*. Nella fattispecie, lo studio qui descritto considera tale classe di molluschi tendenzialmente omogenea relativamente al rischio Cd ad essa associato, come d'altronde dispone la stessa normativa comunitaria che stabilisce a tutt'oggi un tenore massimo unico per la categoria generica dei *cefalopodi*.

Bibliografia

- (1) WHO, 2010. Preventing disease through health environments. Exposure to cadmium: a major public health concern. *WHO ed., Ginevra, Svizzera*. [4 pp.] (<http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>)
- (2) Nessim R, Riad R, 2003. Bioaccumulation of heavy metals in *Octopus vulgaris* from coastal waters of Alexandria (Eastern Mediterranean). *Chem Ecol* 19: 275-81
- (3) Bernardi C, Trezzi I, Renon P, Cattaneo P, Malandra R, 2004. Determinazione di piombo e cadmio in molluschi cefalopodi del Mediterraneo. *Ind Aliment-Italy* 43: 1006-1008
- (4) Raimundo J, Caetano M, Vale C, 2004. Geographical variation and partition of metals in tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *Sci Total Environ* 325: 71-81
- (5) Raimundo J, Pereira P, Vale C, Caetano M, 2005. Fe, Zn, Cu and Cd concentration in the digestive gland and muscle tissues of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from two coastal areas in Portugal. *Cienc Mar* 31: 243-251
- (6) Bustamante P, Cosson RP, Gallien I, Caurant F, Miramand P, 2002. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar Environ Res* 53: 227-241

- (7) Raimundo J, Costa PM, Vale C, Costa MH, Moura I, 2010. Metallothioneins and trace elements in digestive gland, gills, kidney and gonads of *Octopus vulgaris*. *Comp Biochem Phys C* 152: 139-146
- (8) Bustamante P, Bertrand M, Boucaud-Camou E, Miramand P, 2006. Subcellular distribution of Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn in the digestive gland of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *J Shellfish Res* 25: 987-993
- (9) Raimundo J, Vale C, Duarte R, Moura I, 2010. Association of Zn, Cu, Cd and Pb with protein fractions and sub-cellular partitioning in the digestive gland of *Octopus vulgaris* living in habitats with different metal levels. *Chemosphere* 81: 1314-1319
- (10) Bustamante P, Caurant F, Fowler SW, Miramand P, 1998. Cephalopods as a key of the transfer of cadmium to top marine predators. *Sci Total Environ* 220: 71-80
- (11) Raimundo J, Vale C, 2008. Partitioning of the Fe, Cu, Zn, Cd and Pb concentrations among eleven tissue of *Octopus vulgaris* from the portuguese coast. *Cienc Mar* 34: 297-305
- (12) Chouvelon T, Spitz J, Cherel Y, Caurant F, Sirmel R, Mèndez-Fernandez P, Bustamante P, 2011. Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods. *Mar Ecol-Prog Ser* 433: 107-120
- (13) Bustamante P, Teyssié JL, Fowler SW, Cotret O, Danis B, Miramand P, Warnau M, 2002. Biokinetics of cadmium and zinc accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mar Ecol-Prog Ser* 231: 167-177
- (14) Storelli MM, Marcotrigiano GO, 1999. Cadmium and total mercury in some cephalopods from the South Adriatic Sea (Italy). *Food Addit Contam* 16: 261-265
- (15) Storelli MM, Barone G, Marcotrigiano GO, 2005. Cadmium in cephalopod molluscs: implications for public health. *J Food Protect* 68: 577-580
- (16) Miramand P, Bustamante P, Bentley D, Kouéta N, 2006. Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Sci Total Environ* 361: 132-143

- (17) Manso M, Carvalho ML, Nunes ML, 2007. Characterization of essential and toxic elements in cephalopod tissues by EDXRF and AAS. *X-Ray Spectrom* 36: 413-418
- (18) Raimundo J, Vale C, Duarte R, Moura I, 2008. Sub-cellular partitioning of Zn, Cu, Cd and Pb in the digestive gland of native *Octopus vulgaris* exposed to different metal concentrations (Portugal). *Sci Total Environ* 390: 410-416
- (19) Bonerba E, de Candia G, Ceci E, 2009. Presenza di cadmio in *Octopus vulgaris*: valutazione del rischio per la salute pubblica. *Rivista dell'AIVI* 6: 73-76
- (20) Pereira P, Raimundo J, Vale C, Kadar E, 2009. Metal concentrations in digestive gland and mantle of *Sepia officinalis* from two coastal lagoons of Portugal. *Sci Total Environ* 407: 1080-1088
- (21) Storelli MM, Giacomini-Stuffler R, Storelli A, Marcotrigiano GO, 2006. Cadmium and mercury in cephalopod molluscs: estimated weekly intake. *Food Addit Contam* 23: 25-30
- (22) Storelli MM, Garofalo R, Giungato D, Giacomini-Stuffler R, 2010. Intake of essential and non-essential elements from consumption of octopus, cuttlefish and squid. *Food Addit Contam B* 3: 14-18
- (23) Pastorelli AA, Morelli S, Baldini M, Stacchini P, Sagratella E, Zaza S, 2011. Valutazione dei livelli di presenza di cadmio in matrici alimentari: studio pilota a livello nazionale. *J Food Sci Nutr* 40: 33-38
- (24) EFSA Scientific Report, 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 10(1): 2551 [37 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/2551.pdf>)
- (25) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2009. Scientific Opinion of the Cadmium in food (EFSA-Q-2007-138). *EFSA Journal* 980: 1-139 (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/980.pdf>)
- (26) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain [CONTAM], 2011. Statement on tolerable weekly intake for cadmium (EFSA-Q-2010-01008). *EFSA Journal* 9(2): 1975 [19 pp.] (<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/doc/1975.pdf>)
- (27) Pierce GJ, Allcock L, Bruno I, Bustamante P, González A, Guerra A, Jereb P, Lefkaditou E, Malham S, Moreno A, Pereira J, Piatkowski U, Rasero M, Sánchez

- P, Santos B, Santurtún M, Seixas S, Villanueva R, eds. 2010. Cephalopod biology and fisheries in Europe. ICES-Cooperative Research Report No. 303. *International Council for the Exploration of the Sea ed., Copenhagen, Danimarca* [181 pp.] (<http://oceanrep.geomar.de/10074/1/CRR-303%2520final.pdf>)
- (28) Seixas S, Bustamante P, Pierce GJ, 2005. Interannual patterns of variation in concentrations of trace elements in arms of *Octopus vulgaris*. *Chemosphere* 59: 1113-1124
- (29) Pierce GJ, Stowasser G, Hastie LC, Bustamante P, 2008. Geographic, seasonal and ontogenetic variation in cadmium and mercury concentrations in squid (Cephalopoda: Teuthoidea) from UK waters. *Ecotox Environ Safe* 70: 422-432
- (30) Regolamento (CE) n. 882/2004 [del Parlamento e del Consiglio] del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GUCE 30/04/2004, L 165: 1-77) - testo consolidato (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0882:20120101:IT:PDF>)
- (31) Regolamento (CE) n. 333/2007 [della Commissione] del 28 marzo 2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari (GUCE 29/03/2007, L 88: 29-38) - testo consolidato (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2007R0333:20120901:IT:PDF>)
- (32) Regolamento (CE) n. 1881/2006 [della Commissione] del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - (GUCE 20/12/2006, L 364: 5-24) modificato dal Regolamento (CE) n. 629/2008 (GUCE 03/07/2008, L 137: 6-9) - testo consolidato (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701:IT:PDF>)
- (33) EPA, 2007. Method 6020A. Inductively coupled plasma-mass spectrometry [30 pp.] (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/6020a.pdf>)
- (34) EPA, 1996. Method 3052. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices [20 pp.] (<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf>)

2.8 L'accumulo di piombo ed altri metalli pesanti (cadmio e mercurio) in molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes* spp. e *Crassostrea gigas*) campionati in Sardegna nel quinquennio 2008-2012.

Original article, 2013. *Ital J Food Safety*, in press (paper # 1627 - email of acceptance: 29/08/2013)

“Lead and other heavy metals (cadmium and mercury) accumulation in bivalve mollusks (*Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes* spp. and *Crassostrea gigas*) sampled in Sardinia in the 2008-2012 period”

Piras Pierluigi, Chessa Giannina*, Cossu Maurizio*, Fiori Gianuario*, Piras Patrizia*,
Ledda Giuseppe*.

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Abstract

The sardinian shellfish farming, as the national, is mainly focused on mussels and carpet-shell clams, still less on cupped oyster farming. After Olbia's Gulf, various lagoon areas along the coastal perimeter have been interested to shellfish farming. They are transitional waters, whose state of pollution must be evaluated both as ecosystem's "health" and as directly/indirectly human risk. This also applies to heavy metals such as lead, cadmium and mercury, arising both from anthropogenic that geological-natural activity. This study's aim is to investigate the variability of the concentrations of these metals in the different mollusks to make a comparative assessment, detect trends (over the five-years or cyclic-recurring) and identify hot spots. In the 2008-2012, by ICP-MS technique validated according to UNI/EN/ISO 17025/2005, were analyzed 984 samples, of which 599 in pre-marketing (for classification of production areas or their monitoring) and the remaining during marketing. The difference between the average levels of the three metals in the different mollusks species was statistically significant, with $Pb > Cd > Hg$, and there was evidence of a gradual downward trend, albeit moderate, in the contamination levels, with a significant seasonality in concentrations levels, of lead in particular. Also comparisons between the bio-monitored coastal areas were

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

statistically different. Since the samples were representative of the entire production of bivalve mollusks in Sardinia and the contamination allowable limits have never been exceeded in the products marketed, it can be concluded that these products are safe, pointing out that maintenance of monitoring/surveillance plans provides useful information species-dependent, site-specific and temporal trends.

Keywords

Lead, Heavy metal, Bioaccumulation, Shellfish, Food safety.

Introduzione

La produzione mondiale di molluschi bivalvi si è attestata su 13 milioni di tonnellate annue, circa un quinto del complessivo dell'acquacoltura, e l'impatto economico della sola molluschicoltura è rilevante anche all'interno dell'UE, dove la Spagna è il maggior produttore con 270 mila tonnellate/anno, cui segue la Francia con 200 mila tonnellate, e l'Italia con circa 130 mila tonnellate di produzione media annua (1). I $\frac{3}{4}$ della produzione nazionale sono riferiti ai mitili, il restante $\frac{1}{4}$ alle vongole veraci, mentre sono marginali i quantitativi di ostriche. La molluschicoltura nazionale è quindi fondamentalmente legata a due specie: la cozza o mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) e la vongola verace alloctona (*Ruditapes philippinarum*); il resto è rappresentato da pochi tentativi di gestire in semiestensivo la vongola verace autoctona (*Ruditapes decussatus*) e di sviluppare l'ostricoltura allevando l'ostrica concava (*Crassostrea gigas*). Per quanto riguarda la mitilicoltura, la Sardegna vanta una lunga tradizione, soprattutto quella storicamente polarizzata nel Golfo di Olbia, cui si sono aggiunte altre zone lagunari lungo il perimetro costiero, dalla costa occidentale ad alcuni distretti centromeridionali della costa orientale, mentre per quanto riguarda la venericoltura, la Sardegna contribuisce in modo limitato alla produzione di vongole veraci e relativamente all'ostricoltura è presente una realtà produttiva specializzata sempre nella costa nord-orientale della Sardegna. La molluschicoltura, essendo esercitata soprattutto nelle acque di transizione, come gli ambienti lagunari e/o nella fascia strettamente costiera, è per sua stessa natura un settore produttivo molto fragile, strettamente legato alle modifiche di tali ambienti ed ai fenomeni, sia naturali (come gli eventi meteo-marini) che indotti (come gli inquinamenti di tipo microbiologico e

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

chimico) più o meno prevedibili e/o ricorrenti. Tali ambienti rappresentano il modello più diffuso di sistemi di transizione nel Mediterraneo, il cui possibile stato d'inquinamento deve essere valutato sia in termini di stato di "salute" dell'ecosistema e sia di rischio diretto o indiretto per la salute umana. Ciò vale anche in relazione ad alcuni specifici contaminanti, come il piombo (Pb) ed altri metalli pesanti, cadmio (Cd) e mercurio (Hg), derivanti sia da inquinamento per attività antropiche che di origine naturale. I molluschi bivalvi, filtrando rilevanti quantità di acqua per estrarre il loro cibo, mostrano grandi capacità di bioaccumulo (2) anche specifico, come per esempio il Pb nei mitili (3). La contaminazione può essere diretta, dall'acqua di colonna o interstiziale del sedimento, o tramite ingestione di cibo, ovvero da particolato (4), sia inerte che vivente. I metalli pesanti accumulati nella polpa dei molluschi bivalvi, mostrano concentrazioni maggiori in determinati organi, in particolare nella ghiandola digestiva o epatopancreas, che svolge un ruolo attivo nella loro assimilazione, disintossicazione e/o eliminazione. La cinetica di contaminazione/decontaminazione non dipende infatti solo dal differenziale iniziale di concentrazione, ma anche da numerosi altri fattori (5, 6, 7, 8, 9) come quelli chimico-specifici (legati all'elemento in traccia, al livello di contaminazione ed alle vie di contaminazione), quelli fisiologici del mollusco (legati a fattori specie-dipendenti, al tasso di crescita ed alle variazioni di massa nel tempo, soprattutto se legate allo stato di maturità sessuale ed alla fase riproduttiva) e, infine, quelli ambientali (come la temperatura e la quantità/qualità del particolato alimentare disponibile). I molluschi esposti a metalli pesanti rispondono con due tipi di meccanismi di detossificazione (10): o rendono il metallo non più biodisponibile attraverso la formazione di sali insolubili (come ad esempio i solfuri), oppure inducono la formazione di molecole a struttura organo-metallica, le metallotioneine, in grado di bloccare l'attività tossica del metallo (11). Il riscontro dell'avvenuta contaminazione può basarsi quindi, oltre che sulle determinazioni dirette (12, 13), anche su analisi indirette, più sensibili ma meno specifiche, per la ricerca di metallotioneine o per la valutazione del grado di alterazioni strutturali e funzionali indotte da avvenuta esposizione (10, 11, 14, 15). L'approccio basato sulla quantificazione dei metalli pesanti direttamente sull'acqua è stato infatti abbandonato già diverse decine

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

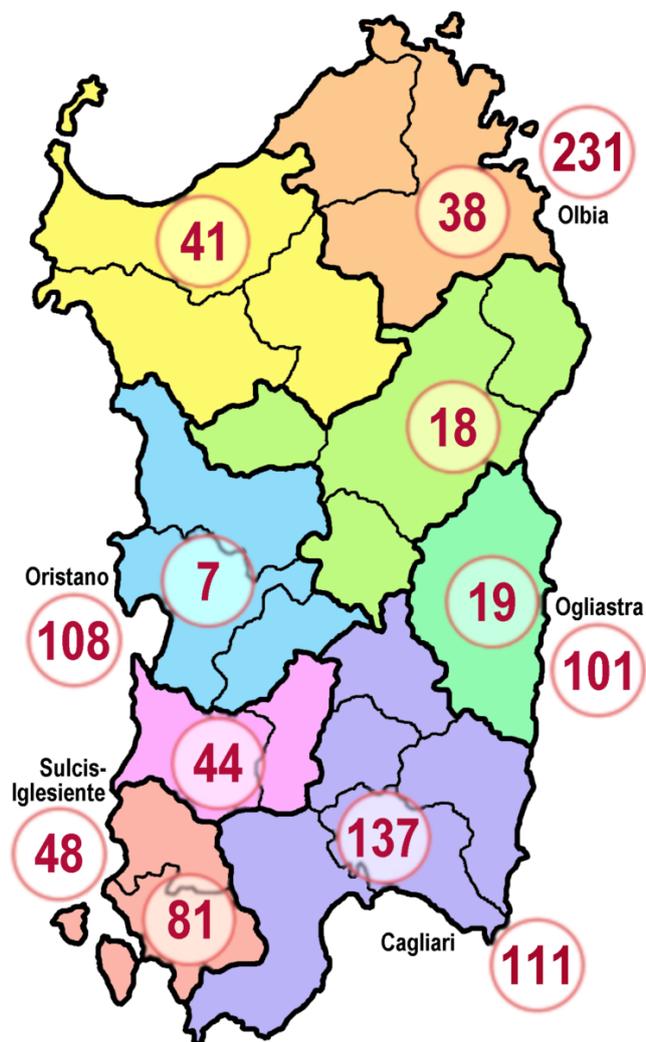
di anni fa, a favore di tecniche più appropriate di monitoraggio con specie-sentinella, come l'approccio *Mussel Watch*, oramai ampiamente utilizzati per indagare la qualità dei sistemi acquatici (16). Numerosi studi svolti anche nel Mediterraneo centro-occidentale attestano l'impiego dei mitili quale organismo maggiormente indicato per studi di valutazione dello stato di contaminazione delle acque (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) ed è comunque documentato l'utilizzo anche di altri bivalvi, vongole veraci comprese (25). I mitili fornirebbero però un'informazione più completa, considerando pure il loro consumo relativo, per la valutazione dell'esposizione umana a metalli pesanti (26), Pb in particolare (3, 27, 28). Le norme comunitarie riguardanti la sicurezza alimentare dedicano ampio spazio al controllo dei molluschi bivalvi vivi e delle zone di produzione e stabulazione e, sotto il profilo applicativo, le autorità competenti regionali hanno emanato indirizzi specifici e regolamentato il sistema di sorveglianza sanitaria sulla filiera dei molluschi bivalvi, dalla produzione primaria fino alla commercializzazione al minuto, oltre che aver predisposto specifici piani di monitoraggio delle zone costiere classificate per la produzione e/o la stabulazione degli stessi (29). La possibilità di coltivazione e raccolta dei molluschi bivalvi vivi a scopo commerciale è infatti soggetta ad una preventiva valutazione delle possibili fonti di inquinamento. Benché il criterio di classificazione, com'è noto, sia in definitiva di tipo microbiologico, è comunque indispensabile caratterizzare l'area anche sotto il profilo del rischio chimico. Nel Regolamento (CE) n. 854/2004 (30) viene infatti stabilito che: "Le zone di stabulazione e produzione classificate devono essere monitorate periodicamente al fine di verificare ... la presenza di contaminanti chimici nei molluschi bivalvi vivi". Quindi, anche se il "pacchetto igiene" non esplicita alcun obbligo di testare preventivamente per i contaminanti chimici ai fini della classificazione delle zone di produzione, tuttavia vi è un chiaro obbligo di monitorare chimicamente queste aree attraverso analisi svolte non direttamente sulle matrici abiotiche (come acque e sedimenti), ma sui molluschi che svolgono in tal senso un implicito ruolo di "sentinella". Ai fini della sicurezza alimentare, i molluschi bivalvi vivi immessi in commercio devono inoltre essere oggetto di sorveglianza sanitaria e rientrare nei tenori massimi di contaminanti definiti nel Regolamento (CE) n. 1881/2006 (31).

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Scopo di questo articolo è indagare la variabilità delle concentrazioni di Pb e di altri metalli pesanti (Cd e Hg) nella parte edibile dei molluschi bivalvi e valutarla relativamente agli attuali *standard* normativi, considerando ciò una premessa necessaria per la stima dell'esposizione umana, ma anche rilevare eventuali *hot spot* e *trend* temporali (nell'arco del quinquennio, o anche andamenti stagionali ricorrenti).

Materiali e metodi

Nel quinquennio 2008-2012 sono state determinate dall'IZS della Sardegna le concentrazioni di Pb, Cd e Hg in complessivi n. 984 campioni di molluschi bivalvi, prelevati dai Servizi Veterinari delle ASL della Sardegna, di cui n. 599 in fase di pre-commercializzazione (per finalità di classificazione delle zone di produzione e/o monitoraggio delle stesse) ed i restanti n. 385 in fase di commercializzazione, appartenenti alle specie di cozza o mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) e di ostrica concava (*Crassostrea gigas*) ed ai congeneri di vongola verace (*Ruditapes* spp.), con una ripartizione territoriale in proporzione sia alle produzioni primarie locali (cioè agli impianti di molluschicoltura), sia ai consumi (relativamente cioè alla popolazione stabile residente ed a quella turistica), quindi con relativa maggiore numerosità nei poli di Olbia e Cagliari (figura a lato). I livelli di Pb, Cd e Hg sono stati determinati in applicazione al metodo EPA 6020A per l'analisi strumentale, in associazione al metodo EPA 3052 per gli aspetti che riguardano il trattamento del campione.



Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

In conformità ai Regolamenti (CE) nn. 1881/2006 e 333/2007 (31, 32) è stata selezionata solo la parte edibile dei molluschi. Una porzione (1gr) del campione omogenato è stata sottoposta a degradazione ossidativa mediante mineralizzazione acida in forno a microonde, a temperatura e pressione controllata. Le soluzioni risultanti, opportunamente diluite, sono state analizzate mediante tecnica ICP-MS, con strumentazione Agilent 7500CE, e le concentrazioni determinate per interpolazione del segnale di lettura con curve di taratura utilizzando il ^{208}Pb , il ^{111}Cd ed il ^{202}Hg , quali isotopi di quantificazione dei tre elementi, e il ^{209}Bi e ^{115}In come standard interni. Le sequenze analitiche hanno previsto, oltre all'analisi dei campioni in esame, la lettura di soluzioni di controllo relative ai bianco-reattivi ed alle matrici certificate CRM 278 e CRM DOLT-2. La procedura analitica utilizzata è stata infine validata in conformità con la norma UNI/EN/ISO 17025/2005.

Poiché l'obiettivo dello studio era quello di confrontare i livelli medi di Pb, Cd e Hg delle diverse specie di molluschi bivalvi, nel tempo (come andamento di medio periodo osservato nel quinquennio, o quello ciclico/stagionale) e nelle diverse aree costiere, la prima fase dell'analisi dei dati ha riguardato la valutazione della variabilità delle distribuzioni dei tre metalli pesanti, con un'attenzione particolare al *pattern* del Pb. È stata perciò preventivamente verificata la normalità delle distribuzioni dei tre metalli, sia sui valori di concentrazione espressi tal quali (mg/kg di peso fresco) sia sulle log-trasformate naturali, ricorrendo in entrambi i casi al *normality test* di Shapiro-Wilk. Nel caso in cui le ipotesi della distribuzioni normale o log-normale non fosse rispettata si è preventivato l'utilizzo alternativo di test non parametrici, in particolare il test di Kruskal-Wallis (o "*One-Way ANOVA by Ranks*") o il test di Mann-Witney (o "*Wilcoxon Rank-Sum test*"). Per valutare infine la covarianza del Pb in coppia (*pairwise*) col Cd o col Hg, si è proceduto al calcolo dei coefficienti di correlazione (Bravais-Pearson *correlation analysis*).

Risultati

In **Tabella 1** sono riassunti i livelli di contaminazione media (\pm ES), mediana e *range* interquartile (iqr) di Pb, Cd e Hg, riscontrati nei campioni analizzati e suddivisi per specie di mollusco bivalve.

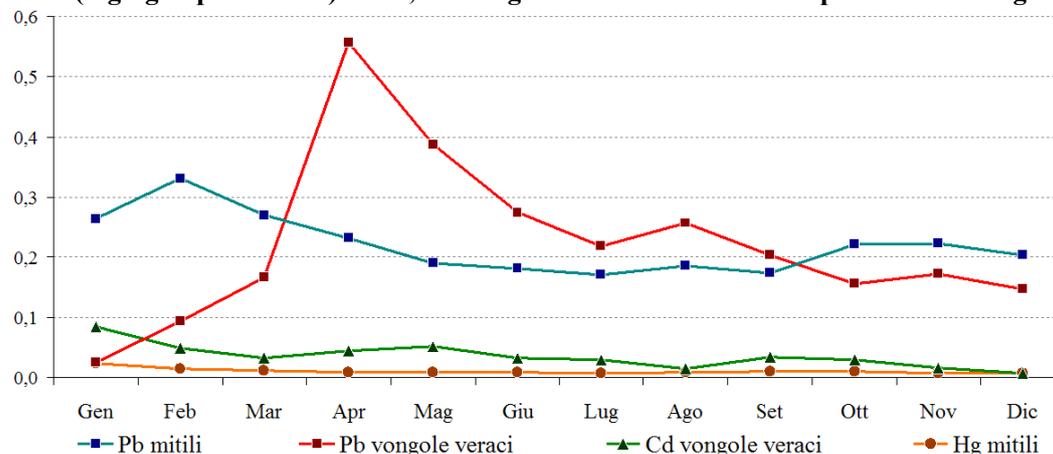
Tabella 1: concentrazioni di piombo, cadmio e mercurio (mg/kg di peso fresco) in molluschi bivalvi campionati in Sardegna, periodo 2008-2012. Confronto tra specie.

Specie	N	metallo	media \pm ES	mediana	iqr
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	864	Pb	0,206 \pm 0,005	0,165	0,133
		Cd	0,099 \pm 0,003	0,083	0,055
		Hg	0,009 \pm 0,001	0,008	0,009
<i>Ruditapes</i> spp.	91	Pb	0,274 \pm 0,024	0,188	0,260
		Cd	0,034 \pm 0,002	0,028	0,033
		Hg	0,006 \pm 0,000	0,005	0,007
<i>Crassostrea gigas</i>	29	Pb	0,108 \pm 0,006	0,103	0,029
		Cd	0,148 \pm 0,014	0,120	0,089
		Hg	0,017 \pm 0,005	0,011	0,012
Totale	984	Pb	0,209 \pm 0,005	0,163	0,139
		Cd	0,095 \pm 0,002	0,081	0,058
		Hg	0,009 \pm 0,000	0,008	0,010

Nel complesso, i tenori massimi stabiliti dalla normativa comunitaria, pari a 1,5 mg/kg di peso fresco per il Pb e, rispettivamente, a 1,0 e 0,50 nel caso del Cd e del Hg, sono stati superati in un solo campione, relativamente ai limiti stabiliti per il Pb, con altri tre campioni che mostravano concentrazioni superiori ai $\frac{2}{3}$ del limite, tutti prelevati in fase di classificazione delle zone costiere. Relativamente al Cd, tutti i campioni erano compresi in un intervallo di distribuzione tra il limite di rivelabilità e $\frac{1}{4}$ del livello massimo ammissibile, mentre, relativamente al Hg, i valori estremi erano abbondantemente sotto il 5% del tenore massimo stabilito in norma. Le concentrazioni dei tre elementi nelle diverse specie di molluschi bivalvi presentano una distribuzione fortemente asimmetrica a destra. Il test di normalità di Shapiro-Wilk è risultato essere significativo, a conferma che tali variabili nella parte edibile dei molluschi bivalvi non sono normalmente distribuite ($p < 0,0001$). Anche a seguito del tentativo di “normalizzare” tali distribuzioni attraverso la trasformazione logaritmica, pur osservando una buona simmetria nelle distribuzioni, il test di Shapiro-Wilk sulle log-trasformate naturali è risultato essere ancora significativo ($p < 0,0001$), concludendo che l’ipotesi alla base dei test parametrici non sono rispettate. Si è passati quindi all’utilizzo del test non parametrico di Kruskal-Wallis, che è risultato significativo ($p = 0,0001$) sia per il Pb, che per il Cd ed il Hg, potendo concludere che la differenza tra i livelli medi di ciascuno dei tre metalli pesanti nelle diverse specie di molluschi campionati è statisticamente

significativa, con $Pb > Cd > Hg$, in accordo con quanto la recente bibliografia riferisce per altri contesti comparabili del Mediterraneo centro-occidentale (23, 24). Relativamente ai coefficienti di correlazione tra coppie di metalli pesanti, si osservano moderati o deboli livelli di correlazione statisticamente significativi ($p < 0,0001$), con $Pb/Cd = 0,305$ e $Pb/Hg = 0,207$. Anche per confrontare i livelli medi di metalli pesanti tra i cinque anni è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis, che è risultato significativo ($p = 0,0001$), concludendo che anche le differenze tra i livelli medi di ciascuno dei metalli pesanti nei cinque anni è statisticamente significativa. Ciò è spiegabile in ragione delle ampie oscillazioni, sia annuali (con valori significativamente più alti nel 2009) che ciclico-stagionali, benché si osservi un trend generale di moderata diminuzione nel quinquennio, con una linea di tendenza (data dalla retta di regressione, posto $y = \text{mg/kg}$ e $x = \text{tempo/mesi}$), di $y = -0,0006x + 0,2407$ per il Pb, di $y = -0,0005x + 0,1182$ per il Cd e di $y = -0,0002x + 0,0152$ per il Hg. Le concentrazioni di contaminanti chimici nei molluschi bivalvi mostrano soprattutto oscillazioni a seconda del periodo dell'anno e tale fenomeno è noto da tempo (2). Il *pattern* per i composti inorganici, come i metalli pesanti, è fondamentalmente riferibile a quello del “*biological dilution*”, quando cioè le quantità unitarie (per singolo mollusco) di contaminanti rimangono le stesse ma, in particolare nel periodo nel quale ciascuna specie raggiunge la maturità sessuale, la polpa del bivalve aumenta la massa dell'organismo, determinando una relativa “caduta” delle concentrazioni di metalli pesanti. Le concentrazioni più elevate si registrano quindi in inverno/primavera e le più basse in estate/autunno.

Grafico 1: dinamica temporale, per mese e cumulativa del quinquennio 2008-2012, dei valori medi (mg/kg di peso fresco) di Pb, Cd e Hg in molluschi bivalvi campionati in Sardegna.



Per verificare la significatività delle differenze stagionali sono stati messi a confronto i livelli medi rilevati nei due semestri degli anni in osservazione, adoperando il test non parametrico di Mann-Whitney. Relativamente al Pb, il test risulta statisticamente significativo per i campioni di mitili ($p < 0,0001$) e per quelli delle vongole veraci ($p = 0,0049$). Per il Cd, il test risulta statisticamente significativo solo per i campioni di vongole veraci ($p = 0,0055$), mentre per il Hg, il test risulta statisticamente significativo solo per i campioni di mitili ($p < 0,0001$). Per le ostriche, probabilmente anche in relazione alla bassa numerosità campionaria, il test risulta non significativo per tutti e tre i metalli pesanti. Nella **Tabella 2** sono infine riportati i confronti tra le cinque aree costiere della Sardegna biomonitorate, utilizzando quindi i soli campionamenti georeferenziati ($N = 599$). Il test di Kruskal-Wallis risulta significativo per tutti e tre i metalli pesanti, con maggior evidenza ($p < 0,0001$) per il Pb ed il Cd e relativamente minore ma sempre robusta ($p = 0,0036$) per il Hg, a dimostrazione che i livelli medi di Pb, Cd e Hg nelle aree sono statisticamente differenti.

Tabella 2: concentrazioni di piombo, cadmio e mercurio (mg/kg di peso fresco) in molluschi bivalvi campionati in Sardegna, periodo 2008-2012. Confronto tra zone di produzione.

Zone di produzione	N	metallo	media \pm ES	mediana	iqr
Olbia	231	Pb	0,179 \pm 0,008	0,148	0,095
		Cd	0,089 \pm 0,003	0,076	0,055
		Hg	0,011 \pm 0,001	0,009	0,010
Ogliastra	101	Pb	0,131 \pm 0,008	0,106	0,092
		Cd	0,102 \pm 0,005	0,093	0,048
		Hg	0,008 \pm 0,001	0,008	0,009
Cagliari	111	Pb	0,233 \pm 0,011	0,215	0,179
		Cd	0,091 \pm 0,006	0,067	0,091
		Hg	0,012 \pm 0,001	0,010	0,009
Sulcis-Iglesiente	48	Pb	0,477 \pm 0,048	0,394	0,422
		Cd	0,169 \pm 0,028	0,085	0,187
		Hg	0,017 \pm 0,008	0,007	0,009
Oristano	108	Pb	0,247 \pm 0,016	0,206	0,139
		Cd	0,070 \pm 0,005	0,064	0,074
		Hg	0,008 \pm 0,001	0,006	0,008
Totale	599	Pb	0,217 \pm 0,007	0,166	0,149
		Cd	0,095 \pm 0,003	0,076	0,068
		Hg	0,011 \pm 0,001	0,009	0,009

Discussione e conclusioni

Anche dai dati raccolti in questo studio si può rilevare come vi siano forti evidenze per raccomandare di non ridurre i programmi di monitoraggio chimico e/o controllo ufficiale esistenti per i molluschi bivalvi commestibili.

La ragione principale per il proseguimento di tali attività è che esiste una grande variabilità nell'ordine di grandezza alla quale i diversi metalli pesanti bioaccumulano nei molluschi: generalmente più alta nel caso del Pb, intermedia per il Cd e relativamente più bassa nel caso del Hg. Inoltre, sia i parametri ambientali che le specie di bivalvi influenzano il grado di bioconcentrazione di tali contaminanti, cui si aggiunge il fatto che i carichi di contaminanti siano influenzati anche dalla stagione nella quale i molluschi sono raccolti.

Quindi, benché sia basilare riaffermare, in accordo con il diritto alimentare comunitario, che per garantire i consumatori di molluschi bivalvi dal rischio, anche chimico derivante da metalli pesanti, la loro produzione e commercializzazione debba essere innanzitutto gestita dagli operatori del settore alimentare secondo le procedure di sicurezza ricadenti nei Regolamenti del “pacchetto igiene”, tuttavia, sulla qualità e sicurezza del prodotto, è del tutto evidente come debba mantenere un ruolo fondamentale sia il monitoraggio della produzione primaria che il controllo della filiera commerciale da parte dell'autorità pubblica.

Anche se i risultati dello studio mostrano alcune aree monitorate con contaminazioni a livelli di attenzione, in particolare per il Pb, tuttavia, poiché i campionamenti svolti sono rappresentativi di tutta la produzione di molluschi bivalvi in Sardegna ed i limiti ammissibili di contaminazione non vengono, praticamente, mai superati, si può concludere che, nella generalità, tali prodotti vanno considerati sicuri.

Vanno comunque sottolineate alcune cautele. Una marcata stagionalità è stata osservata anche in questo studio, nella concentrazione del Pb in particolare, dovuta all'influenza dello sviluppo gonadico sul peso relativo della ghiandola digestiva (14); di conseguenza, questo fatto può generare una stima imprevedibile della effettiva biodisponibilità del metallo (5). Considerare l'importanza dei processi fisiologici, come quello riproduttivo, quali determinanti stagionali delle concentrazioni di metalli nei molluschi bivalvi (22)

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

possono infatti essere utili anche per affinare gli strumenti di monitoraggio per la valutazione del rischio e, più in generale, per le strategie di gestione ambientale (8), in particolare in aree *hot spots* che presentano naturalmente più alti livelli di metalli pesanti, come quelle che hanno sul territorio importanti attività minerarie piombo-zincifere dismesse (33) di cui ne è un esempio in Sardegna il SIN del Sulcis-Iglesiente-Guspinese.

Si può in sintesi concludere che l'interpretazione dei risultati analitici richiede sempre la considerazione delle differenze tra le varie specie a bioaccumulo e che dai piani di monitoraggio delle zone classificate per la molluschicoltura e da quelli del controllo ufficiale per la sicurezza alimentare si possono trarre utili informazioni di *trend* temporali e sito-specifici.

Bibliografia

- (1) ISMEA, 2007. Il settore ittico in Italia e nel mondo: le tendenze recenti. *Ismea*, Roma: 123-163 (<http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/9%252Fd%252Ff%252FD.7ea151ee461300d27dfe/P/BLOB%3AID%3D2756>)
- (2) Claisse D, 1992. Accumulation des métaux lourds et polluants organiques par les coquillages. In Lesne J, eds. Coquillages et santé publique. Du risque à la prévention. *ENSP*: 99-111 (<http://archimer.ifremer.fr/doc/00017/12785/9726.pdf>)
- (3) Boisson F, Cotret O, Fowler SW, 1998. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater. *Sci Total Environ* 222: 55-61
- (4) Griscom SB, Fisher NS, 2004. Bioavailability of sediment-bound metals to marine bivalve molluscs: An overview. *Estuaries* 27: 826-838
- (5) Soto M, Kortabitarte M, Marigomez I, 1995. Bioavailable heavy metals in estuarine waters as assessed by metal shell-weight indices in sentinel mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol-Prog Ser* 125: 127-136
- (6) Boening DW, 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environ Monit Assess* 55: 459-470
- (7) Casas S., Bacher C. 2006. Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental

- monitoring. *J Sea Res* 56(2): 168-181
- (8) Casas S, González JL, Andral B, Cossa D, 2008. Relation between metal concentration in water and metal content of marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*): impact of physiology. *Environ Toxicol Chem* 27: 1543-1552
 - (9) Conti ME, Iacobucci M, Cecchetti G, Alimonti A, 2008. Influence of weight on the content of trace metals in tissues of *Mytilus galloprovincialis*: a forecast model. *Environ Monit Assess* 141: 27-34
 - (10) Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS, 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76: 160-202
 - (11) Ramšak A, Ščančar J, Horvat M, 2012. Evaluation of metallothioneins in blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the slovenian waters (Gulf of Trieste): a long-term field study. *Acta Adriat* 53: 71-86
 - (12) Giusti L, Zhang H, 2002. Heavy metals and arsenic in sediments, mussels and marine water from Murano (Venice, Italy). *Environ Geochem Health* 24: 47-65
 - (13) Conti ME, Cecchetti GF, 2003. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environ Res* 93: 99-112
 - (14) Regoli F, Enzo O, 1993. *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses. *Sci Total Environ* 134: 1283-1292
 - (15) Nasci C, Da Ros L, Campesan G, Fossato VU, 1998. Assessment of the impact of chemical pollutants on mussel, *Mytilus galloprovincialis*, from the Venice Lagoon, Italy. *Mar Environ Res* 46: 279-282
 - (16) Gupta SK, Singh J, 2011. Evaluation of molusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. *J Int Omics Appl Biotechnol* 2: 49-57 (<http://www.iioab.org/SPI-1%28EBT%29/Gupta%20et%20al-IIOABJ2%20%281%29-%28SP1%29-49-57p.pdf>)
 - (17) Amiard-Triquet C, Burgeot T, Claisse D, 1999. La surveillance de la qualité du milieu marin: l'expérience du Réseau National d'Observation et le développement

- de biomarqueurs. *Océanis* 25: 651-684 (<http://archimer.ifremer.fr/doc/00017/12848/9793.pdf>)
- (18) Benedicto J, Rodríguez C, Martínez-Gómez C, Guerrero J, Jornet A, 2003. Distribución espacial y tendencias temporales de los niveles de metales traza en el litoral de Andalucía utilizando mejillón *Mytilus galloprovincialis* como organismo indicador: 1991-2003. *Bol Inst Esp Oceanogr* 19: 31-39 (http://www.revistas.ieo.es/index.php/boletin_ieo/article/viewFile/117/110)
- (19) Jureša D, Blanuša M, 2003. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* 20: 241-246
- (20) Andral B, Stanisiere JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F, Boissery P, 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar Pollut Bull* 49: 704-712
- (21) Kljaković-Gašpić Z, Ujević I, Zvonarić T, Barić A, 2007. Biomonitoring of trace metals (Cu, Cd, Cr, Hg, Pb, Zn) in Mali Ston Bay (eastern Adriatic) using the Mediterranean blue mussel (1998-2005). *Acta Adriat* 48: 73-88
- (22) Cardellicchio N, Buccolieri A, Di Leo A, Giandomenico S, Spada L, 2008. Levels of metals in reared mussels from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy). *Food Chem* 107: 890-896
- (23) Stanković S, Jović M, 2012. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ Chem Lett* 10: 119-130
- (24) Spada L, Annicchiarico C, Cardellicchio N, Giandomenico S, Di Leo A, 2013. Heavy metals monitoring in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Apulian coast (Southern Italy). *Medit Mar Sci* 14: 99-108
- (25) Storelli MM, Marcotrigiano GO, 2001. Consumption of bivalve molluscs in Italy: estimated intake of cadmium and lead. *Food Addit Contam* 18: 303-307
- (26) Jović M, Onjia A, Stanković S, 2011. Toxic metal health risk by mussel consumption. *Environ Chem Lett* 10: 69-77
- (27) Regoli F, Enzo O, 1994. Bioavailability of biologically detoxified lead: risks arising from consumption of polluted mussels. *Environ Health Perspect* 102: 335-833

- (28) Cirillo T, Fasano E, Viscardi V, Arnese A, Amodio-Cocchieri R, 2010. Survey of lead, cadmium, mercury and arsenic in seafood purchased in Campania, Italy. *Food Addit Contam B* 3: 30-38
- (29) Determina RAS (Regione Autonoma della Sardegna) Direzione generale dell'ambiente - Servizio pesca, acquacoltura e stagni (Settore Tecnico Biologico in materia di Pesca e Acquacoltura) - n. 1093, 2007. Allegato: zone di produzione e di stabulazione di molluschi bivalvi vivi ubicate in acque di mare e di transizione della Sardegna. *BURAS* n. 28/2007: 56-93 (http://www.regione.sardegna.it/documenti/1_5_20070824125444.pdf)
- (30) Regolamento (CE) n. 854/2004 [del Parlamento e del Consiglio] del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano - (GUCE 30/04/2004, L 139: 206-320) modificato dal Regolamento (CE) n. 2074/2005 (GUCE 22/12/2005, L 338: 27-59) e dal Regolamento (CE) n. 1021/2008 (GUCE 18/10/2008, L 277: 15-17) testo consolidato - (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0854:20110729:IT:PDF>)
- (31) Regolamento (CE) n. 1881/2006 [della Commissione] del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari - (GUCE 20/12/2006, L 364: 5-24) modificato dal Regolamento (CE) n. 629/2008 (GUCE 03/07/2008, L 137: 6-9) - testo consolidato - (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20121203:IT:PDF>)
- (32) Regolamento (CE) n. 333/2007 [della Commissione] del 28 marzo 2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio (...) nei prodotti alimentari - (GUCE 29/03/2007, L 88: 29-38) modificato dal Regolamento (CE) n. 836/2011 (GUCE 20/08/2011, L 215: 9-16) - testo consolidato - (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2007R0333:20120901:IT:PDF>)
- (33) Benedicto J, Martínez-Gómez C, Guerrero J, Jornet A, Rodríguez C, 2008. Contaminación por metales en la bahía de Portmán (Murcia, SE España) 15 años después del cese de las actividades mineras. *Cienc Mar* 34: 389-398

2.9 Supply chains globalization and reliability of food testing: the Italian experience of the public veterinary laboratories accreditation system.

Short communication / poster, 2013. World Veterinary Congress. *Poster session abstracts*: 18 (Topic: Food Higiene, ID: 211): <http://www.wvc2013.com/cms/soubory/wvc-2013-list-of-posters.pdf>

Grasselli Aldo*, Ferri Maurizio*, Piras Pierluigi

* Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva

Supply chains globalization and reliability of food testing: the Italian experience of the public veterinary laboratories accreditation system

Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva
Aldo Grasselli¹ - Maurizio Ferri^{2*} - Pierluigi Piras³

¹ President of the IIRVMP Italian Society for Preventive Veterinary Medicine; ² member of the IIRVMP Board & Italian representative to the WVO section of the WVA; ³ representative of the IIRVMP PVB center in Italian Origin Food Safety; University of Sassari (Italy); * Correspondence email: ferri@uniss.it

Background and aims
During the last decade the EU food safety legislative framework has experienced radical changes. One example is the new General Food Law, starting from Regulation 178/2002¹, where the concept of liability goes together with responsibility and, within this, put in place a control system (including laboratory testing), designed to take into account the "farm to fork" approach. The change of food safety policy anticipated a similar integrated control system to verify conformity of other goods², according to a strategy agreed at European level³. Standard control rules, initially set up on a voluntary basis by International standardization bodies, with Regulation 882/2004⁴ became legal rules. At international level, the key standard document for laboratory sector is the ISO 17025, which establishes the accreditation process and defines standards for laboratory analytical methods, especially for the determination of residues and contaminants in food. The liability and comparability of results stemming from the application of standardized procedures and analytical methods represent an essential requirement for making relevant decisions on veterinary public health, particularly in relation to international disputes where industrial, legal and trade interests are at stake. The objective of this study is to describe recent developments of European Accreditation of the Italian system for food safety official Veterinary Laboratories (see table), represented by the branches of the Zooprofilattici Sperimentali Istituti (ZS) and the Istituto Superiore di Sanità (ISS).

References
1. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 20 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority, and amending Directive 85/394/EEC and Council Directive 2001/18/EC of 14 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/269/EEC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/REGULATIONS/?uri=CELEX:32002R0178>
2. Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls relating to food, feed, food safety and food hygiene and repealing Council Directive 853/2004/EC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/REGULATIONS/?uri=CELEX:32004R0882>
3. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/REGULATIONS/?uri=CELEX:32003R1831>
4. Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls relating to food, feed, food safety and food hygiene and repealing Council Directive 853/2004/EC. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/REGULATIONS/?uri=CELEX:32004R0882>

Conclusions
The globalization, based on the requirement of free trade of commodities, due to high level of complexity and size of operations, might result in emerging food safety risks. In order to address this challenging scenario, the EU food safety policy has been designed to take into account the interlinks of the whole food chain. Moreover a reliable and effective analytical strategy, starting from the quality of scientific information necessary for risk assessment through the effectiveness of official controls activities, has been recognized as the condition *qua non* for the success of the new food safety policy. In the current global market, "controls, certification and responsibility" are elements duly shared between public and private subjects, each one bearing specific expertise, either on global or local level. In this context as emphasized by the EU legislation, Veterinary Public Health and the network of official laboratories play a strategic role.

Role of European system for laboratory accreditation
The UE certification system (with related technical requirement) is a fundamental tool to harmonize and ensure a smooth functioning of internal and global market. This condition is related to the following important elements introduced at EU level: A) definition of food safety specific requirements set by the "food hygiene" package regulations and B) public functions assigned to organisms tasked with conformity assessment. For the latter, the EU, with Regulation 765/2008⁵ and related Decision 768/2008/EC⁶, has ensured and attested that conformity assessment bodies (e.g. laboratories, inspection or certification bodies) must have the technical capacity to perform their duties adequately through the European system of accreditation organisms, represented by national bodies belonging to an institution known as the European co-operation for Accreditation (EA), of which national accreditation organisms are members and which cooperates with the European Commission. Global trade and marketing of food commodities have important food safety and public health implications. With this scenario, the harmonization of analytical methods and most importantly their conformity and validation assessment are fundamental. In Italy since 2011 analytical tests of official samples need to be accredited by a unique National accreditation organism⁷ represented by Accredia⁸. Considering the public health, the environmental implications and the global market, the key points are the quality/comparability of data obtained from different laboratories, and the assessment of uncertainty level associated to data.

Role of public vet. laboratories for animal origin foods testing in Italy
Quality accreditation of testing laboratories requires a high level of commitment/management and a clear description of processes and objectives. The objectives are mainly related to the liability of test results. A proper and responsible adoption of a quality system by food laboratories testing for environment contaminants (e.g. toxic heavy metals and metalloids) is the main requirement for reliability of analytical data. With the new Italian food safety legislative framework⁹, the network (see above map) of ZS and the ISS represents the public laboratory system tasked for official testing of animal origin foods. This network provides assistance to Public Health and Food safety veterinary organizational units, that were recently assigned new technical competences and responsibilities¹⁰.

Code	Official Analytical Laboratories of Animal Origin Food and their Accreditation
0100	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0101	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0102	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0103	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0104	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0105	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0106	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0107	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0108	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0109	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0110	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0111	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0112	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0113	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0114	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0115	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0116	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0117	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0118	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0119	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0120	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0121	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0122	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0123	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0124	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0125	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0126	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0127	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0128	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0129	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0130	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0131	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0132	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0133	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0134	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0135	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0136	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0137	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0138	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0139	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0140	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0141	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0142	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0143	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0144	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0145	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0146	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0147	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0148	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0149	ISS - Istituto Superiore di Sanità
0150	ISS - Istituto Superiore di Sanità

Background and aims. During the last decade the EU food safety legislative framework has experienced radical changes. One example is the new General Food Law, starting from EC Regulation 178/2002, where the concept of liability goes together with responsibility and, within this, put in place a control system (including laboratory testing), designed to take into account the "farm to fork" approach. The change of food safety policy anticipated a similar integrated control system

to verify conformity of other goods (1), according to a strategy agreed at European level. Standard control rules, initially set up on a voluntary basis by International standardization bodies, with Regulation 882/2004 became legal rules. At international level, the key standard document for laboratory sector is the ISO 17025, which establishes the accreditation process and defines standards for laboratory analytical

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

methods, especially for the determination of residues and contaminants in food. The liability and comparability of results stemming from the application of standardized procedures and analytical methods represent an essential requirement for making relevant decisions on veterinary public health, particularly in relation to international disputes where industrial, legal and trade interests are at stake. The objective of this study is to describe recent developments of European accreditation of the Italian system for food safety official veterinary laboratories, represented by the Istituti Zooprofilattici Sperimentali and the Istituto Superiore di Sanità.

Role of European system for laboratory accreditation. The UE certification system (with related technical requirement) is a fundamental tool to harmonize and ensure a smooth functioning of internal and global market. This condition is related to the following important elements introduced at EU level: a) definition of food safety specific requirements set by the “food hygiene” package regulations and b) public functions assigned to organisms tasked with conformity assessment. For the latter, the EU, with Regulation 765/2008 (2) and related Decision 768/2008/EC (3), has ensured and attested that conformity assessment bodies (e.g. laboratories, inspection or certification bodies) must have the technical capacity to perform their duties adequately through the European system of accreditation organisms, represented by national bodies belonging to an institution known as the European cooperation for Accreditation (EA), of which national accreditation organisms are members and which cooperates with the European Commission. Global trade and marketing of food commodities have important food safety and public health implications. With this scenario, the harmonization of analytical methods and most importantly their conformity and validation assessment are fundamental. In Italy since 2011 analytical tests of official samples need to be accredited by a unique National accreditation organism (4) represented by Accredia (5). Considering the public health, the environmental implications and the global market, the key points are the quality/comparability of data obtained from different laboratories, and the assessment of uncertainty level associated to data.

Role of public veterinary laboratories for the analysis of animal origin foods in Italy. Quality accreditation of testing laboratories requires a high level of

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

commitment/management and a clear description of processes and objectives. The objectives are mainly related to the liability of test results. A proper and responsible adoption of a quality system by food laboratories testing for environment contaminants (e.g. toxic heavy metals and metalloids) is the main requirement for reliability of analytical data. With the new Italian food safety legislative framework (6), the network of IZS and the ISS represents the public laboratory system tasked for official testing of animal origin foods. This network provides assistance to Public Health and Food safety veterinary organizational units, that were recently assigned new technical competences and responsibilities (7). Their strategic role is aimed to the high standards required by the current legislation for official testing laboratories.

Conclusions. The globalization, based on the requirement of free trade of commodities, due to high level of complexity and size of operations, might result in emerging food safety risks. In order to address this challenging scenario, the EU food safety policy has been designed to take into account the interlinks of the whole food chain. Moreover a reliable and effective analytical strategy, starting from the quality of scientific information necessary for risk assessment through the effectiveness of official controls activities, has been recognized as the *conditio sine qua non* for the success of the new food safety policy. In the current global market, “controls, certification and responsibility” are elements duly shared between public and private subjects, each one bearing specific expertise, either on global or local level. In this context as emphasized by the EU legislation, Veterinary P.H. and the official laboratories network play a strategic role.

References

(1) Communication from the EC Commission 7.5.2003 - COM (May 2003) 240 final: 1-34; (2) Regulation (EC) No 765/2008 of Parliament and Council of 9.7.2008 - OJEU (Aug. 2008) L/218: 30-47; (3) Decision No 768/2008/EC of Parliament and Council of 9.7.2008 - OJEU (Aug. 2008) L/218: 82-128; (4) Communication from the Commission 21.5.2009 - OJEU (May 2009) C/116/04: 6-11; (5) Italian Inter-ministerial Decree 22.12.2009 - GURI (Jan. 2010) n. 20: 17-19; (6) Italian Legislative Decree 28.06.2012, n. 106 - GURI (Jul. 2012) n. 170: 1-19; (7) Italian Law 8.11.2012, n. 189 - GURI (Nov. 2012) n. 263: 1-12.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

3. L'ultimo *step* della ricerca: la speciazione dell'arsenico nei prodotti della pesca come pre-condizione per il *Risk Assessment*

L'arsenico è il ventesimo (inteso come abbondanza) elemento presente nella crosta terrestre, è chimicamente un "metalloide" e si trova associato sia a rocce ignee che sedimentarie, specialmente con i minerali contenenti solfuro (insieme con "metalli" p.d., come ferro, piombo, rame, nichel, cobalto e altri). È componente di oltre 245 minerali (1), ma quello più diffuso contenente arsenico è l'arsenopirite (FeAsS). L'arsenico e suoi composti sono molto mobili nell'ambiente: l'erosione delle rocce converte infatti i solfuri di arsenico in ossido arsenioso, che entra nel ciclo ambientale dell'arsenico come polvere aerodispersa o - per dissoluzione - in pioggia contaminando quindi i corpi idrici, superficiali e non. Ed è proprio la contaminazione da arsenico delle acque sotterranee una delle più gravi minacce per l'umanità in molte parti del mondo (1). Può entrare nella catena alimentare, distribuendosi diffusamente in tutto il regno vegetale e animale. Si tratta quindi di un elemento ubiquitario, già "naturalmente" presente nei suoli, nelle acque, nei sedimenti e negli organismi.

Dall'avvento della metallurgia, ai "livelli di fondo" dell'arsenico ambientale si sono aggiunti quelli antropogenici in quanto esso rappresenta anche un sottoprodotto nell'estrazione dei metalli, sia nobili (quali oro e rame) che non (come il piombo), mentre il contributo antropogenico recente alle concentrazioni di arsenico ambientale deriva anche dall'uso di pesticidi utilizzati dal secondo dopoguerra, quali il noto arsenito di rame (detto anche "verde Parigi", l'arsenato di piombo e l'arsenato di sodio, nonché dal suo utilizzo come conservante del legno.

Per cause naturali, o antropogeniche, è quindi necessario sottolineare che la concentrazione di arsenico presente nella crosta terrestre, pur essendo mediamente intorno ai 3 p.p.m., presenta notevoli variazioni geografiche, anche dipendenti dal tipo di rocce presenti, mostrando valori oscillanti anche di 3-4 ordini di grandezza, da 0,1 p.p.m. a diverse centinaia di p.p.m. (2), rendendo alcuni distretti ad alto rischio. Diverse popolazioni, come si è detto, sono pertanto esposte alla possibilità di ingerire quantità non indifferenti di arsenico nella dieta e sono note aree endemiche (3), sia in Asia (Bangladesh, Cina, Taiwan) che nelle Americhe (Messico, Cile), dove si verificano

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

diffusi casi d'avvelenamento da arsenico a causa del consumo di acque di pozzo contaminate (4). La distribuzione ambientale dell'arsenico ed i suoi effetti tossicologici sono diventati infatti un problema serio, con milioni di persone in tutto il mondo ad esserne colpite. Nell'ambito dell'8° *International Conference on Biogeochemistry of Trace Elements* (ICOBTE), svoltosi in Australia nel 2005, è stato convocato un simposio speciale (SYP-4) su "Arsenico nell'ambiente: Biologia e Chimica" (2), che ha attirato una vasta gamma di contributi pluridisciplinari da un notevole numero di ricercatori, coprendo tutti i grandi temi legati all'arsenico, come ad esempio: le fonti e la caratterizzazione del rischio legato all'arsenico, in particolare quello emergente delle falde sotterranee; i processi che controllano la mobilità e la speciazione dell'arsenico nei suoli, nelle acque e nel biota; le tecniche di analisi e gli studi di speciazione analitica.

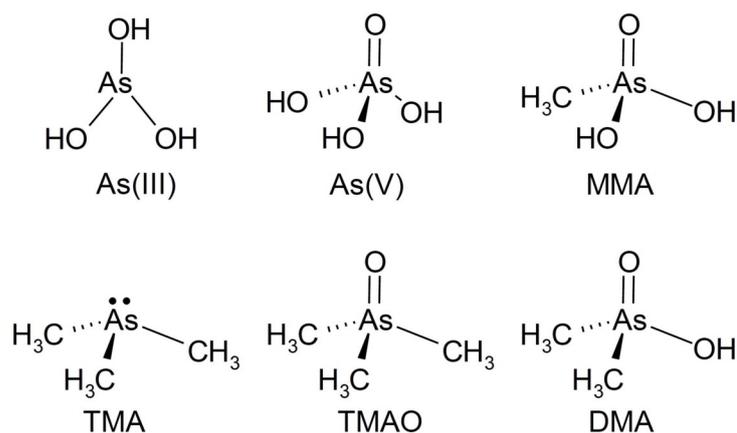
Relativamente a quest'ultimo aspetto, è infatti noto da tempo come, sotto il profilo biochimico-tossicologico per i diversi organismi viventi, la forma o "specie chimica" di un determinato elemento, come è descritto per diversi "elementi in traccia", sia importante quanto la sua "quantità" ed è perciò necessario poterla riconoscere per avere informazioni sull'impatto di tale specifico elemento chimico in un determinato ambiente (5). E ciò vale in particolar modo per l'arsenico, che può presentarsi con diversi stati di ossidazione e, già con tale prima caratterizzazione, mostrare molta della sua rilevanza dal punto di vista sanitario, in quanto la pericolosità per l'uomo delle sue varie forme varia in modo davvero considerevole (6).

La valenza sanitaria del problema si fa ancora più evidente dal quadro che ci viene fornito dalla dinamica delle diverse forme chimiche dell'arsenico in ambiente acquatico marino (7, 8). In tale contesto, l'arsenico si presenta infatti in forme diverse a seconda del comparto ambientale considerato (9): i sedimenti marini incontaminati contengono da 5 a circa 40 mg/g di peso secco di arsenico totale (10), prevalentemente rappresentato dalle forme inorganiche, sia As(III) che As(V), mentre l'arsenico disciolto in acqua di mare si trova prevalentemente in forma di arsenato (As(V)), con una concentrazione media generalmente di circa 1-2 µg/litro (11), senza sostanziali variazioni lungo la colonna d'acqua (in particolare quando ci si trovi in contesti ambientali costieri, quindi con basse batimetrie, o anche in mare aperto entro profondità di zona fotica e ossigenata).

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

L'arsenito (As(III)), potenzialmente più tossico e cancerogeno, rappresenta raramente più del 20% dell'arsenico totale in acqua di mare (10). Oltre alle forme inorganiche, l'arsenico in ambiente marino è presente in varie forme organiche, a partire da quelle mono-, di- e tri-metilate (Figura 1).

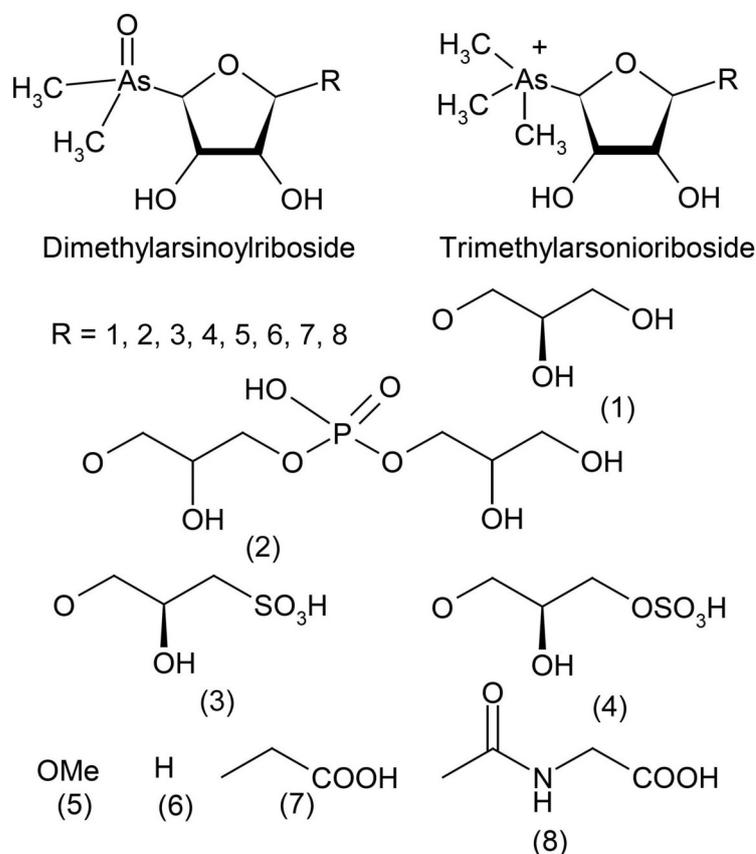
Figura 1: rappresentazione strutturale dell'acido arsenioso (As(III)), dell'acido arsenico (As(V)), dell'acido monometilarsonico (MMA), dell'acido dimetilarsinico (DMA), della trimetilarsina (TMA) e del suo ossido (TMAO).



Le alghe marine assorbono facilmente l'arsenato dall'acqua ed in esse si riscontra la presenza di diversi composti organici arseno-ribosidici (Figura 2). Tali composti, spesso indicati col termine generico di "arsenozuccheri", rappresentano un anello importante nel ciclo biochimico dell'arsenico in ambiente marino (12). Costituiscono infatti la forma prevalente di arsenico nelle alghe (circa $\frac{3}{4}$ della frazione di arsenico), ma sono presenti in quantità significative anche nei molluschi marini, in particolare nei gasteropodi erbivori (circa $\frac{1}{4}$ della frazione di arsenico totale), mentre viceversa sono presenti in bassissime concentrazioni nei pesci. Gli studi sulla tossicità degli arsenozuccheri risultano quindi numerosi e di grande interesse anche in ambito europeo, per il crescente uso alimentare delle alghe, consolidato invece per tradizione nei paesi asiatici. Tuttavia, nonostante la notevole mole di dati bibliografici, non ci sono ancora informazioni definitive sulla eventuale tossicità di questi composti, ovvero, come si sostiene secondo una formulazione prudenziale (13): «i dati limitati sulla tossicità degli arsenozuccheri ad oggi indicano una bassa tossicità»

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Figura 2: rappresentazione della struttura fondamentale degli arsenoribosidi metilati e delle loro R varianti

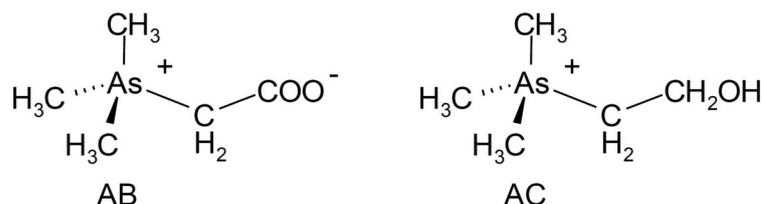


Gli animali acquatici marini (pesci, crostacei e molluschi acquatici) hanno invece una capacità limitata di bioconcentrare arsenico inorganico dall'acqua marina, mentre possono bioaccumulare e biotrasformare i composti organici dell'arsenico attraverso la catena alimentare (14). Tutti i tessuti, sia degli invertebrati che dei pesci marini, contengono infatti concentrazioni molto elevate di arsenico (10), generalmente in una gamma tra 1 e 100 mg/Kg di peso fresco ma, va da subito precisato, questi si trovano per lo più nelle forme di composti organici dell'arsenico. Gli organismi marini sembra infatti che abbiano affrontato evolutivamente il problema, verosimilmente sotto la pressione selettiva data dalla presenza naturale del metalloide negli ambienti marini, sfruttando la ricca chimica organica dell'arsenico, per trasformare le forme inorganiche in una gamma di composti organici dell'arsenico, fundamentalmente atossici (11). Il composto più abbondante è l'arsenobetaina, con quantità residuali di arsenocolina (Figura 3) e delle riferite specie chimiche metilate (15). In tutta la copiosa bibliografia

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

scientificamente prodotta negli ultimi 50 anni (13), l'arsenobetaina e l'arsenocolina sono considerate non tossiche, sebbene la prima sia stata molto più studiata e ne sia stata verificata l'inerzia metabolica, mentre sull'arsenocolina (che, comunque costituisce generalmente meno dell'1% dell'arsenico totale presente in organismi marini) esistono ancora lacune conoscitive.

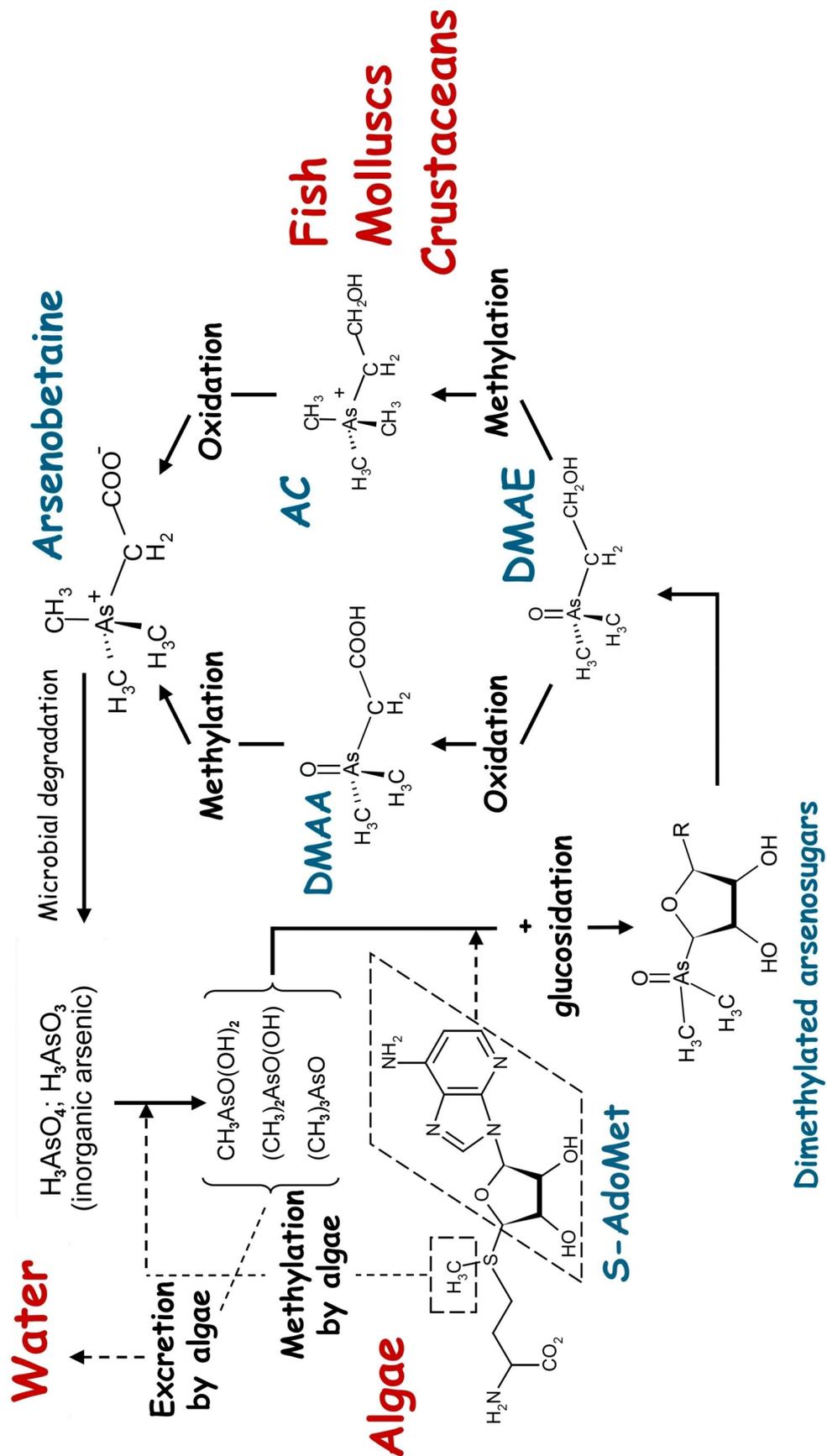
Figura 3: rappresentazione strutturale dell'arsenobetaina (AB) e dell'arsenocolina (AC)



Appare chiaro perciò come le determinazioni delle sole concentrazioni totali dell'arsenico nelle diverse matrici ambientali (sedimento, acqua e soprattutto biota) non possano, da un lato, costituire un elemento sufficiente per poter valutare il possibile effetto sugli organismi e la dinamica di tale metalloide nell'ambiente marino-costiero considerato (16, 17, 18, 19) e, dall'altro, non essere sufficienti per lo svolgimento di una corretta valutazione del rischio umano per esposizione alimentare a prodotti della pesca "contaminati" da tale metalloide (20, 21). Benché le forme inorganiche dell'arsenico siano più tossiche di quelle organiche, la quasi totalità dei dati sulla presenza di arsenico negli alimenti, raccolti nel quadro dei controlli ufficiali in ambito europeo, riportano però solo l'arsenico totale, senza fare distinzioni tra le sue varie forme. Poiché nei prodotti della pesca l'arsenico è prevalentemente presente in forme organiche, è quindi necessario disporre di dati di speciazione, come ha raccomandato anche l'EFSA con la *Scientific Opinion on Arsenic in Food* (22), aggiornata nel 2010, sottolineando il fatto che un *Risk Assessment* che non tenga conto di ciò, condurrebbe a sovrastimare notevolmente il rischio sanitario derivante, in particolare, dal consumo di prodotti della pesca. Gli organismi marini presentano infatti concentrazioni notoriamente molto alte di arsenico totale, ma con una prevalenza di composti innocui (come l'arsenobetaina in pesci, crostacei e molluschi), o ritenuti tali (quali gli arsenozuccheri in molluschi ed alghe), bioaccumulati secondo un complesso ciclo bio-geochimico (Figura 4).

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Figura 4: ciclo dell'arsenico in ambiente marino (23).



Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

I composti dell'arsenico presenti negli ambienti acquatici marini sono, come si è visto, diverse decine ed è nota la variabilità della capacità dei diversi organismi vegetali e animali, anche in relazione al livello trofico da questi occupato (24), di bioaccumulare alcuni di questi composti in luogo di altri (25). In particolare quindi, è l'analisi selettiva delle forme inorganiche da quelle organiche dell'arsenico a rivestire un'importanza cruciale nella valutazione del rischio legato all'esposizione a tale elemento attraverso la dieta, in quanto le diverse forme chimiche presentano differente tossicità (1, 8, 10, 13). I composti inorganici dell'arsenico sono infatti potenti cancerogeni per l'uomo e, inoltre, è ampiamente dimostrato che l'esposizione cronica ad essi determina un aumento nel rischio d'insorgenza di numerose altre patologie non tumorali, come ipercheratosi, ipertensione, diabete, nonché disturbi respiratori, neurologici e cardiovascolari (1, 3, 26). Si è visto che la caratteristica più importante che determina la tossicità dell'arsenico inorganico è il suo stato di ossidazione. Dati di letteratura indicano infatti che l'arsenico sotto forma di arsenito (As(III)) è da 10 a 60 volte più tossico della forma di arsenato (As(V)) e da 70 a 100 volte più tossico delle specie organiche metilate (27, 28). Per quanto concerne le caratteristiche di tossicità dei composti metilati dell'arsenico, questi sono quindi generalmente meno tossici rispetto ad altri composti organo-metallici (al contrario quindi di quanto avviene, ad esempio, tipicamente nel caso del mercurio).

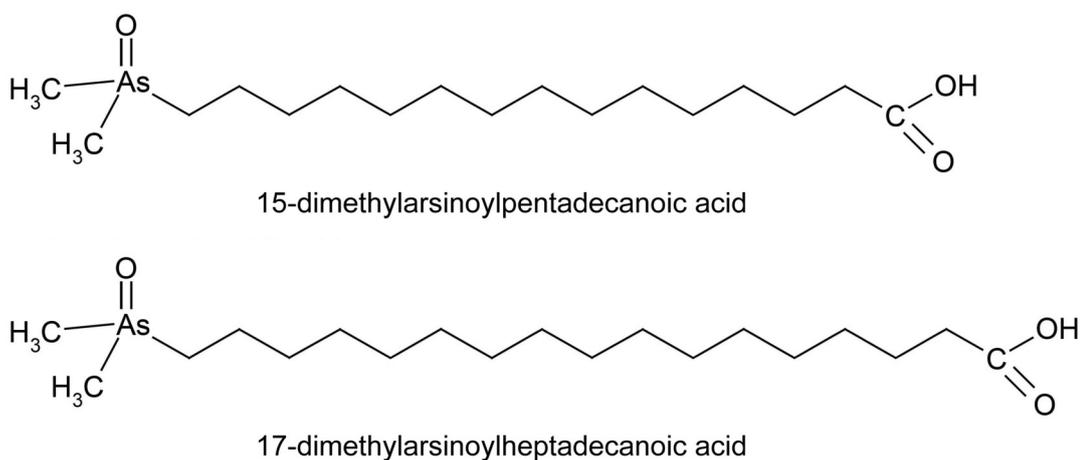
Quali forme chimiche siano implicate, se organiche o inorganiche (e, aggiuntivamente, lo stato di ossidazione per queste ultime), rappresenta quindi il fattore determinante per quanto riguarda la valutazione della tossicità, oltre che la biodisponibilità (29) dell'arsenico e, per alcuni dei più diffusi composti di tale elemento, è generalmente accettata la seguente scala di tossicità: $As(III) > As(V) > MMA > DMA$ (8, 30, 31), mentre arsenobetaina, arsenocolina ed arsenozuccheri sono specie chimiche dell'arsenico considerate generalmente come non tossiche.

Ad oggi sarebbero però più di 50 le forme addizionali di arsenico organico identificate in organismi marini (13), nei tessuti dei quali, oltre a tutta la gamma fin'ora descritta di composti contenenti arsenico, si aggiungono pure i composti lipidici (32). Negli oli di pesce è stata infatti da tempo rilevata una serie di acidi grassi saturi con la porzione terminale dimetil-arsinoil- e, nella stragrande maggioranza, si tratta di composti con

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

numero dispari di atomi di carbonio (**Figura 5**), con il gruppo dimetil-arsinoil- che sostituisce il gruppo metilico terminale di acidi grassi convenzionali con numero pari di atomi di carbonio.

Figura 5: esempi di arsenolipidi (C-15 e C-17)



Allo stato attuale delle conoscenze, sembrerebbe che tutti gli oli di pesce, con proporzioni variabili tra le diverse specie, presentino tale serie di acidi grassi (e relativi idrocarburi) contenenti arsenico. La presenza di arsenolipidi in oli di pesce non sembra tuttavia sollevare problemi di tossicità nell'uomo: benchè essi vengano assorbiti dal tratto gastrointestinale, l'arsenico è infatti rapidamente escreto sotto forma di metaboliti organici idrosolubili (prevalentemente composti dimetilati ed arsenobetaina).

In sintesi, per quanto riguarda le forme organiche dell'arsenico, è sufficientemente associato come l'arsenobetaina, che è la forma predominante nei pesci e nella maggior parte dei c.d. "frutti di mare", non desti alcuna preoccupazione dal punto di vista tossicologico e che, relativamente agli arsenozuccheri e agli arsenolipidi (poiché vengono nell'uomo generalmente metabolizzati in dimetilarsinato), non siano attualmente disponibili sufficienti informazioni sull'eventualità e grado di una qualche loro tossicità residuale.

Poiché l'EFSA, attraverso il richiamato parere scientifico (22) ha sostenuto in modo deciso l'adozione di misure comunitarie utili per ridurre l'esposizione alimentare all'arsenico inorganico, essendo fondamentalmente questa la forma tossica dell'elemento, ha però nel contempo raccomandato, proprio per affinare la valutazione

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

del rischio derivante dall'arsenico inorganico, la necessità di produrre dati di speciazione per i differenti prodotti alimentari, a sostegno di una corretta valutazione dell'esposizione alimentare.

Nello stesso parere EFSA, è riferito come i Paesi Membri abbiano fornito i risultati di più di 100'000 determinazioni della concentrazione di arsenico in svariati prodotti alimentari, ma che la quasi totalità (98% circa) dei risultati riportava l'arsenico totale e solo poche analisi distinguevano tra le varie specie di arsenico.

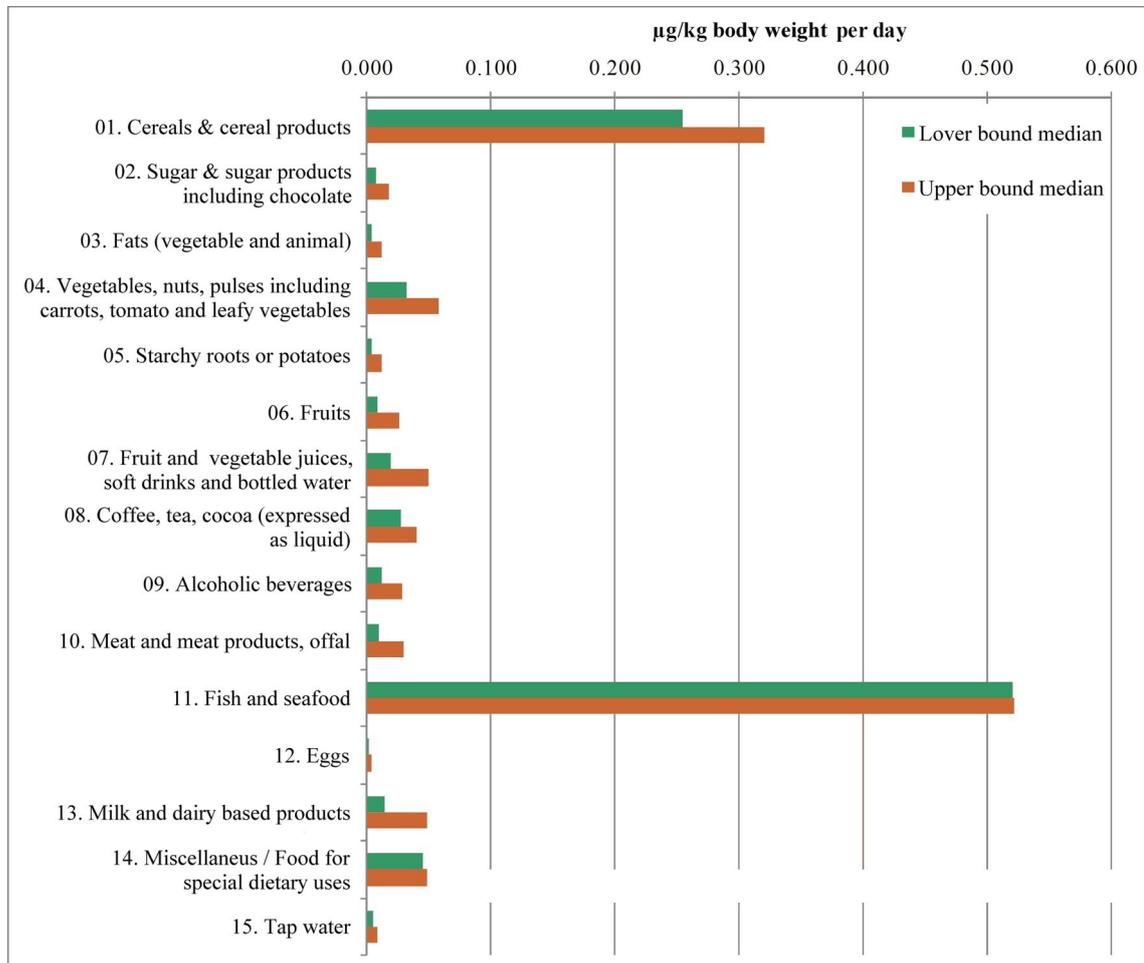
I livelli più alti di arsenico totale sono stati riscontrati nei pesci e “frutti di mare” e, a seguire, nei prodotti o integratori alimentari a base di alghe, specialmente il *hijiki* (o 鹿尾菜, nome giapponese del *Sargassum fusiforme*, un'alga bruna ad altissimo tenore di minerali ed oligoelementi).

Per formulare comunque un proprio parere sui rischi per la salute correlati alla presenza di arsenico negli alimenti, il *Panel on Contaminants in the Food Chain* (CONTAM) dell'EFSA ha potuto valutare il contributo dei singoli gruppi di alimenti all'assunzione dell'arsenico, considerato però solo come arsenico totale (quindi “non speciato”), e sintetizzando tali stime in un grafico del parere scientifico (**Figura 6**).

A causa della carenza di dati di speciazione rappresentativi, il CONTAM non è stato inoltre in grado di individuare una proporzione tipica dell'arsenico organico od inorganico nei vari gruppi di prodotti alimentari. Ha dovuto conseguentemente formulare solo una serie di ipotesi per giungere ad una stima dell'apporto dell'arsenico inorganico ricavabile dai dati dell'arsenico totale, attraverso una valutazione dell'esposizione basata fondamentalmente sulle informazioni reperibili nella letteratura scientifica. Si è quindi ipotizzato che la proporzione di arsenico inorganico sull'arsenico totale stimato per prodotti alimentari diversi dalla categoria “pesce e frutti di mare” fosse mediamente del 70%. Nel pesce e nei frutti di mare la proporzione relativa di arsenico inorganico è notoriamente molto ridotta e varia a seconda della specie o del gruppo zoologico considerato. Sulla base dei dati disponibili nella bibliografia scientifica, per calcolare l'esposizione alimentare dell'uomo sono stati considerati quindi verosimili valori “fissi” e molto bassi di arsenico inorganico equivalenti a 0,03 mg/kg di peso fresco nel pesce ed a 0,1 mg/kg nei frutti di mare.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Figura 6: Stima dell'esposizione all'arsenico dei consumatori europei (22). Valori mediiani dell'arsenico totale per diversi gruppi di alimenti (con i limiti fiduciali inferiore e superiore, calcolati tenendo conto dei valori medi di presenza dell'arsenico nei diversi gruppi di alimenti e dei consumi individuali medi dei medesimi gruppi di alimenti).



Non considerando i prodotti ittici, le concentrazioni di arsenico totale negli alimenti risultano generalmente basse, ma va considerato il fatto che aumenta considerevolmente la frazione delle forme più tossiche e, infatti, la matrice che attualmente desta maggiore preoccupazione è il riso, trattandosi di un alimento di base per estese popolazioni. Dal diagramma emerge però anche il considerevole contributo all'*intake* di arsenico totale da parte della categoria “pesce e i frutti di mare” che, però, considerata la relativamente piccola frazione stimata della forma inorganica, assume pari rilevanza della “acqua di rubinetto” che, pur non contribuendo in modo rilevante alla assunzione totale di arsenico, contiene tale elemento principalmente nella forma inorganica tossica. È quindi del tutto evidente l'importanza che riveste la speciazione dell'arsenico nei vari gruppi di alimenti quando si effettuino stime di valutazione dell'esposizione.

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

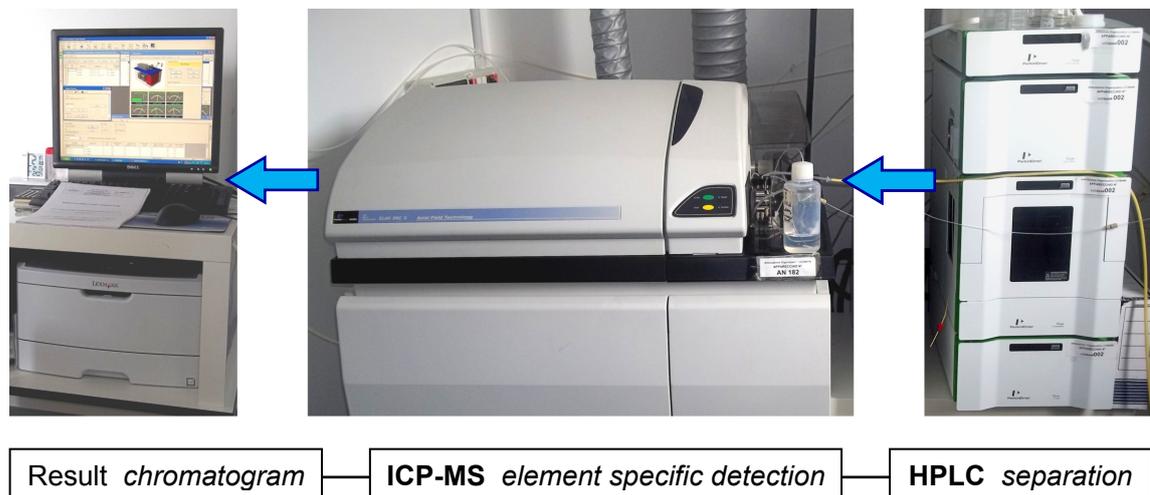
3.1 *Background e obiettivi*

In un precedente studio sul contenuto di metalli pesanti e metalloidi in molluschi bivalvi, crostacei e pesci lagunari campionati nell'area d'indagine, la laguna di Boi Cerbus, che si trova nella parte sud-occidentale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente), erano stati rilevati elevati livelli di arsenico ed erano state avanzate stime per la valutazione del rischio da esposizione alimentare (33). Seguendo l'approccio metodologico armonizzato europeo, che utilizza il parametro tossicologico del *Provisional Tollerable Weekly Intake* (PTWI) come "quantità massima di contaminante tollerabile settimanalmente" in funzione del peso corporeo dell'individuo, le concentrazioni di arsenico totale riscontrate avrebbero contribuito per l'86% del PTWI negli adulti e per i giovani ed i bambini (che rappresentano gruppi vulnerabili) rispettivamente il 126% ed il 215% della dose accettabile. Si è trattato ovviamente di stime molto prudenziali, nell'ipotesi estrema che tutto l'arsenico riscontrato avesse gli effetti tossici dell'arsenico inorganico. Tale studio preliminare ha quindi spinto la ricerca ad effettuare un'analisi più approfondita ed accurata del rischio potenziale. Infatti, per quanto concerne la valutazione del rischio per esposizione alimentare, è apparso da subito di fondamentale importanza poter stimare la frazione di arsenico inorganico, che è quella che presenta rilevanza sanitaria. Nello scenario di ricerca che si è aperto, è apparso da subito necessario poter quindi disporre di tecniche analitiche capaci di discriminare, in una vasta gamma di prodotti della pesca, l'arsenico inorganico dal complesso di composti riferibili alle forme organiche dell'arsenico. La tecnica che permette di caratterizzare e determinare un elemento nelle sue diverse forme chimiche è chiamata "analisi di speciazione" e per "speciazione" si intende la distribuzione di un elemento nelle sue diverse specie chimiche. La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) a questo proposito fornisce le seguenti definizioni (34): «Speciazione di un elemento» è la "distribuzione di un elemento nelle specie chimiche definite in un sistema" (*Speciation of an element; speciation. Distribution of an element amongst defined chemical species in a system*), mentre per «Specie chimica (Elemento chimico)» deve intendersi una "specifica forma di un elemento definita come la sua composizione isotopica, stato di ossidazione o elettronico, e/o struttura molecolare o del complesso"

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalloidi (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

(*Chemical species. Chemical elements: specific form of an element defined as to isotopic composition, electronic or oxidation state, and/or complex or molecular structure*) e, infine, per «Analisi di speciazione» è definita quella “tecnica analitica di identificazione e/o misura della quantità di una o più singole specie chimiche in un campione” (*Speciation analysis. Analytical chemistry: analytical activities of identifying and/or measuring the quantities of one or more individual chemical species in a sample*). I metodi usati per la speciazione si basano fondamentalmente sulla combinazione di tecniche di separazione e tecniche di rivelazione. In relazione al tipo di separazione che si vuole attuare, sono possibili differenti approcci operativi che coinvolgono strumentazioni diverse. Nel caso delle analisi di speciazione dell'arsenico (16, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39) le tecniche di separazione attualmente più usate sono senza dubbio quelle cromatografiche, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) in combinazione (o “*hyphenated applications*”) con rivelatori di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente, ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Tale accoppiamento (Figura 7) è possibile anche perché l'usuale flusso di lavoro dell'HPLC ($\sim 1 \text{ ml/min}^{-1}$) è compatibile con il flusso di aspirazione del sistema ICP.

Figura 7: sequenza strumentale per la tecnica HPLC/ICP-MS di speciazione dell'arsenico.



In genere, l'analisi di speciazione dell'arsenico in campioni marini viene eseguita non routinariamente ma per ricerche *ad hoc* e finalità scientifiche (comunque non nel contesto di piani di sorveglianza), ponendosi come obiettivo soprattutto la

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

differenziazione multipla delle specie organiche dell'elemento (29, 40). Con procedura che meglio si presterebbe agli obiettivi di sorveglianza in sanità pubblica, è stato invece sperimentato un particolare sistema di preparazione del campione che permette, sempre attraverso tecnica HPLC/ICP-MS, un'analisi di speciazione "semplificata", ovvero finalizzata alla sola determinazione dell'arsenico inorganico. Originariamente sperimentata in campioni di pesci marini (41), dopo un'ulteriore semplificazione e perfezionamento della procedura, è stata inoltre applicata, oltre che sui pesci marini, anche sui molluschi bivalvi e crostacei (42). L'IZS dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Ancona, ha di recente adottato e messo a punto tale procedura analitica, fondamentalmente orientata, come è già stato sottolineato, all'analisi di speciazione "semplificata" dell'arsenico, indirizzata cioè alla determinazione della frazione inorganica. La stessa metodica è stata utilizzata anche nel presente studio.

Pertanto, nell'ambito delle attività di biomonitoraggio ambientale effettuate nella laguna di Boi Cerbus, con quest'ultimo *step* si è voluta sviluppare la ricerca, con l'obiettivo di rilevare le frazioni tossiche dell'arsenico (come $AS_{INORG}/AS_{TOT} \times 100$) su organismi marini "sentinella" dell'area costiera indagata.

Ci si è sono posti come obiettivi correlati anche quelli di:

- determinare le concentrazioni di arsenico totale e quelle di arsenico inorganico in una vasta gamma di specie marino-lagunari di prodotti della pesca, ponendo particolare attenzione a evidenziare eventuali differenze tra specie o *taxa* di livello superiore, oltre che tra organismi bentonici (o a contatto col sedimento) vs quelli nectonici;
- utilizzare i risultati ottenuti come elementi utili per completare una campagna di controllo quanto più completa per approfondire le conoscenze sul comportamento dell'arsenico in organismi marino costieri con habitat prossimo ad aree minerarie, come quelle del Sulcis-Iglesiente, e valutarne l'impatto sulla sicurezza alimentare;
- perfezionare e validare una procedura per la separazione, l'identificazione e la quantificazione dell'arsenico inorganico vs quello organico nelle matrici biologiche ittiche, sempre mediante l'utilizzo di un sistema accoppiato HPLC/ICP-MS, ma con una procedura semplificata, tale da potersi estendere operativamente (valutandone i costi/benefici) anche all'attività pianificata del controllo ufficiale sugli alimenti.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

3.2 Materiali e metodi

Tramite una procedura di speciazione basata su una tecnica accoppiata HPLC/ICP-MS (42), si è studiata la distribuzione della forma inorganica dell'arsenico (e sua quantificazione proporzionale sull'arsenico totale) in n° 80 campioni, riferibili a n° 14 specie acquatiche marine eduli, campionate nel 2013 nella laguna di Boi Cerbus nel corso di tre calate di pesca svolte nelle date del: 21 febbraio, 29 aprile e 6 luglio. In particolare, per quanto riguarda gli organismi bentonici, sono stati campionati: i Molluschi bivalvi, con la specie *Cerastoderma glaucum* (denominato “cuore”) e quelli gasteropodi, con la specie *Phyllonotus trunculus* (denominato “murice”), i Crostacei brachiuri, con le specie *Carcinus aestuarii* ed *Eriphia verrucosa* (denominati rispettivamente “granchio da moleca” e “favollo”) e, tra i pesci, i Gobidi, con le specie *Gobius niger jozo* e *Zosterisessor ophiocephalus* (denominati rispettivamente “ghiozzo nero” e “ghiozzo gò”), i Blennidi, con la specie *Salaria basiliscus* (comunemente chiamata “bavosa”) e la sogliola *Solea vulgaris*. Relativamente ai pesci nectonici, sono stati campionati: gli Atherinidi, con la specie *Atherina (Hepsetia) boyeri* (denominato “latterino”), gli Sparidi con la salpa *Sarpa salpa* e l'orata *Sparus auratus*, i Mugilidi, con le specie *Mugil Cephalus* e *Liza aurata* (denominati rispettivamente “cefalo o volpina” e “cefalo dorato o lotregano”), la spigola *Dicentrarchus labrax* e l'anguilla *Anguilla anguilla*. Ciascun campione per l'analisi è stato ottenuto da un pool (ovvero da un “campione globale” ottenuto da un numero statisticamente rappresentativo di “campioni elementari”) costituito da non meno di tre porzioni muscolari di altrettanti esemplari di pesci di grossa taglia, o da qualche decina di esemplari (anche interi) nel caso di pesci di piccola taglia e crostacei, e fino ad oltre un centinaio di esemplari nel caso di un campione per l'analisi dei piccoli molluschi bivalvi sgusciati. Gli organismi acquatici sono stati infatti campionati nella sola parte edibile, quindi immediatamente refrigerati a +4°C per massimo 3 giorni e infine trasportati in continuità termica al laboratorio “Controllo Chimico e Biomonitoraggio” della Sezione di Ancona dell'IZS dell'Umbria e delle Marche, dove sono stati prontamente congelati a -18°C e in breve tempo liofilizzati. La stabilità delle specie chimiche durante la movimentazione e lo stoccaggio del campione prima delle analisi è infatti un prerequisito fondamentale per ottenere

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

risultati affidabili, in particolare per le analisi di speciazione, dovendosi evitare, anche in questa fase, che intervengano modifiche nella ripartizione delle varie specie. Il congelamento in laboratorio dei campioni e la loro liofilizzazione in attesa dell'analisi di speciazione è una procedura compatibile con l'esigenza di tale tipo di stabilità chimica, come mostrano i risultati di studi *ad hoc* (43).

Lo schema di speciazione utilizzato, elaborato sulla base della letteratura esistente (42) e della strumentazione specificamente disponibile presso la Sezione IZS-UM di Ancona, prevede due procedure autonome: quella per la determinazione della concentrazione totale di arsenico (con tecnica ICP-MS) e, in parallelo, quella per la speciazione dell'arsenico (con tecnica combinata HPLC/ICP-MS). Tutti i campioni sono stati accuratamente omogeneizzati prima delle suddette procedure. Tali omogeneizzati sono stati quindi liofilizzati (con apparecchio Heto Lyolab 3000) e, sia prima che dopo liofilizzazione, su ognuno di essi è stata determinata la percentuale di umidità, per riportare su peso fresco i risultati ottenuti sul liofilizzato. Dai liofilizzati sono stati prelevati dei sub-campioni (di circa 0,5 g) per l'analisi in doppio in ciascuna delle due procedure. Si è quindi proceduto alle analisi con una dotazione strumentale specifica costituita da: una pre-colonna ed una colonna HPLC (ICSep ION-120 Ø 4,6 mm), uno strumento per HPLC (Perkin Elmer Flexar Liquid Chromatography) ed uno strumento per ICP-MS (Perkin Elmer Elan DRC II). La speciazione dell'arsenico è stata resa possibile grazie all'accoppiamento online dell'HPLC con l'ICP-MS, effettuato con la connessione del capillare in uscita dalla colonna cromatografica con la camera di nebulizzazione dell'ICP-MS, gestito tramite specifico PC dotato di software (Chrimera Speciation) che, tra l'altro, permette anche l'appropriata lettura dei cromatogrammi.

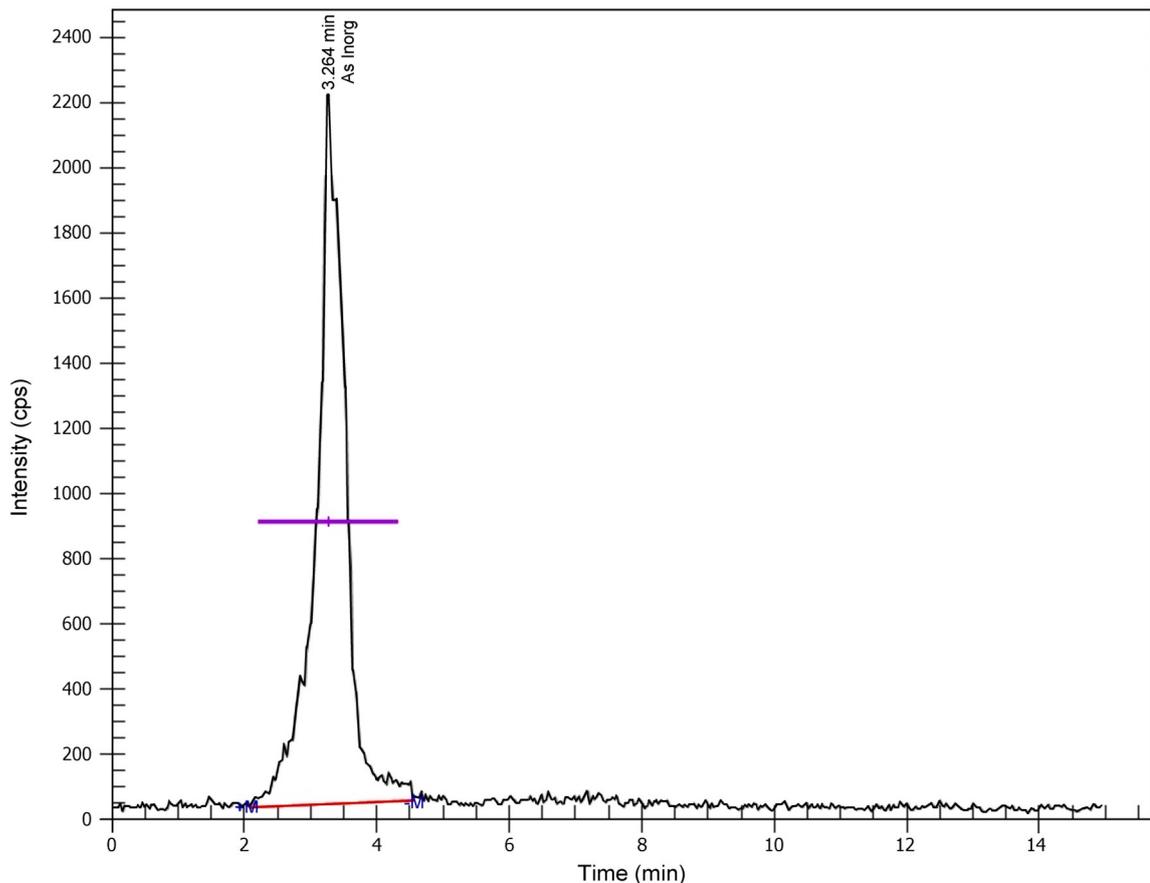
Per l'analisi del contenuto totale di arsenico (AS_{TOT}), i sub-campioni sono stati sottoposti a digestione in microonde (tramite mineralizzatore Milestone Ethos 1, a vasi di teflon) con 6 ml di HNO_3 concentrato e 2 ml di H_2O_2 al 30%, entrambi per analisi di metalli in traccia. Le soluzioni risultanti, opportunamente diluite, sono state analizzate mediante tecnica ICP-MS, con un LOQ di 0,010 mg/kg.

Per l'estrazione e l'analisi dell'arsenico inorganico (AS_{INORG}), i sub-campioni sono stati miscelati con una soluzione 9/1 di HCl 0,07 M e H_2O_2 al 3% e riscaldati in microonde.

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

Prima della separazione cromatografia gli estratti sono stati centrifugati (circa 4'000 rpm per 10 min) e filtrati (\varnothing 0,45 μ m). Il confronto con i tempi di ritenzione del “materiale di riferimento” (*standard*), con un picco a 3,2 minuti (\pm 2,5%) ed a concentrazione nota, ha permesso di identificare e quantificare la concentrazione dell'arsenico inorganico nei campioni (**Figura 8**), con un LOQ di 0,001 mg/kg.

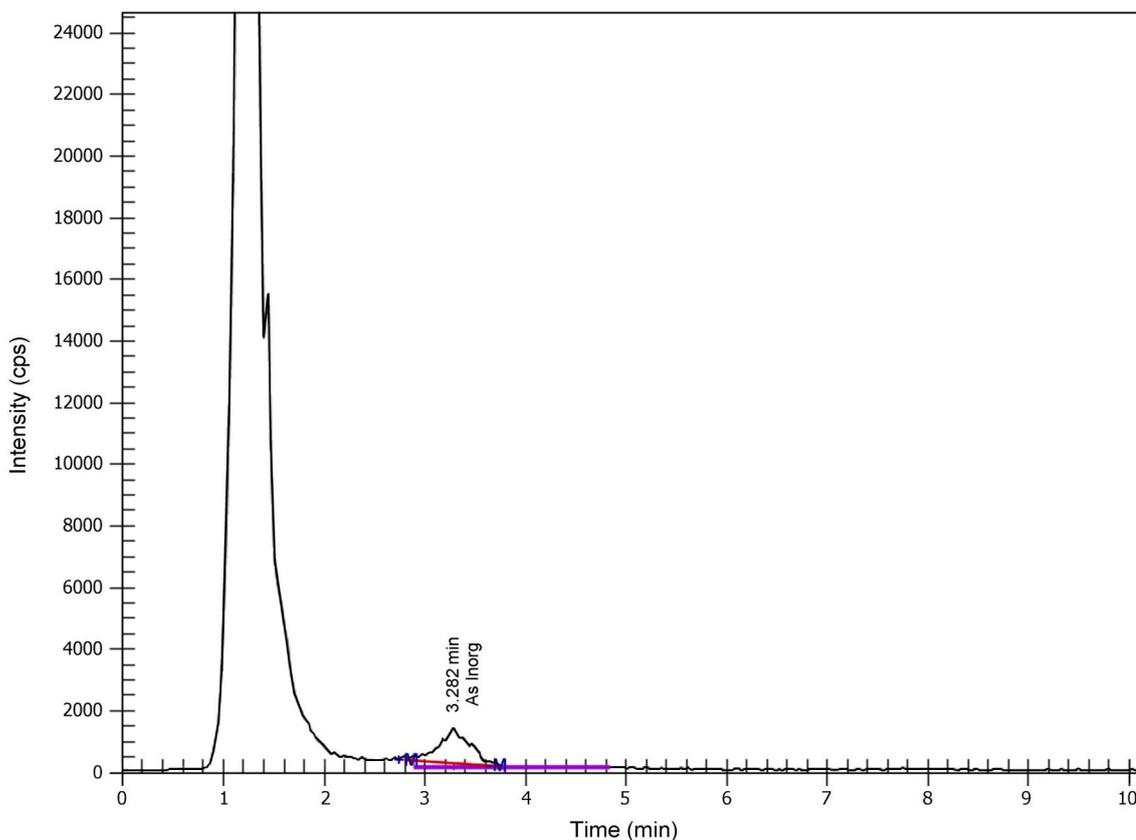
Figura 8: cromatogramma relativo al “materiale di riferimento” (*standard*) di arsenico inorganico (As(V)) alla concentrazione certificata di 20 p.p.b.



Per la quantificazione dell'arsenico inorganico si è ricorsi ad una retta di taratura esterna, costruita con soluzioni di “materiale di riferimento” (*standard*) preparate nella miscela estraente, utilizzando 5 punti compresi tra 1 e 40 μ g/litro. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio (il valore comunicato è quindi quello medio) e per ogni *batch* analitico e per ogni matrice è stata fatta un'aggiunta in linea per la verifica dei recuperi. Per esempio, nel cromatogramma che segue (**Figura 9**), relativo ad un campione (del bivalve *Cerastoderma glaucum*) “spiked” con 1,545 μ g/g di arsenico inorganico (As(V)), la concentrazione misurata è risultata in buon accordo con quella additivata,

mostrando una buona efficienza di recupero (con un valore medio del 92%).

Figura 9: cromatogramma relativo ad un campione “spiked” con 1,545 µg/g di arsenico inorganico (As(V)).



Per l'analisi di speciazione è opportuno sottolineare come la fase di estrazione rivesta un'importanza decisiva, considerata la necessità di ottenere un'alta percentuale di recupero e mantenere la distribuzione originale delle specie chimiche presenti nel campione. Ogni conversione delle specie organiche dell'arsenico, nettamente predominanti nei prodotti della pesca, in specie inorganiche durante la procedura di pretrattamento del campione comprometterebbe infatti la precisione riferita alla proporzione dell'arsenico inorganico sul totale. Tuttavia, relativamente alla procedura di speciazione utilizzata, è ammissibile la conversione di composti organici dell'arsenico in altri composti organici del medesimo elemento, in quanto ciò non influirebbe sulla predetta proporzione percentuale ($AS_{INORG}/AS_{TOT} \times 100$). La procedura di analisi di speciazione adottata (42) rassicura infatti sul fatto che, dai dati sperimentali disponibili, non sia stata osservata alcuna conversione delle specie madri di arsenico organico in inorganico. Sono state invece rilevate possibili inter-conversioni tra alcuni dei composti

Pierluigi Piras - "Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali" - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

organici dell'arsenico, ma questa eventualità non influenza, come si è detto, il contenuto originario di arsenico inorganico (42).

Con il termine di “arsenico inorganico” si intende inoltre la somma di As(III) e As(V) poiché, durante il trattamento a microonde, avviene la conversione quantitativa della prima forma nella seconda e la frazione nella forma As(III) dell'acido arsenioso (H_3AsO_3) viene tutta ossidata in As(V) dell'acido arsenico (H_3AsO_4). Si consideri a tal proposito che la separazione delle specie inorganiche bersaglio (somma di As(III) + As(V)) da quelle organiche rappresenta proprio l'obiettivo dell'analisi di speciazione che ci si è posti, utile come informazione fondamentale per le finalità del *Risk Assessment* e per l'eventuale ampliamento dell'uso della metodica ai fini della sorveglianza sanitaria pianificata.

A tale proposito, considerando quindi la possibilità che il metodo di analisi adottato possa essere in prospettiva esteso operativamente anche all'attività di controllo ufficiale (oltreché all'ambito della ricerca applicata) e che, quindi, possa essere ipotizzata la futura standardizzazione internazionale del metodo, i vantaggi e gli svantaggi riportati dagli autori che hanno messo a punto la procedura (42) possono essere così riassunti:

- vantaggi: (i) una preparazione rapida e semplice del campione, con una conseguente dissoluzione quasi totale del medesimo; (ii) una procedura cromatografica breve che facilita un alto numero di campioni per ogni *batch*, e (iii) bassi limiti di rivelabilità (LOD), in accordo con i livelli biologicamente tossici dell'arsenico inorganico.
- svantaggi: (i) l'apparecchiatura HPLC/ICP-MS rappresenta un investimento costoso (anche se nel tempo si colgono i benefici dalla sua flessibilità) e (ii) la necessità di una frequente pulizia della strumentazione analitica per mantenere prestazioni accettabili.

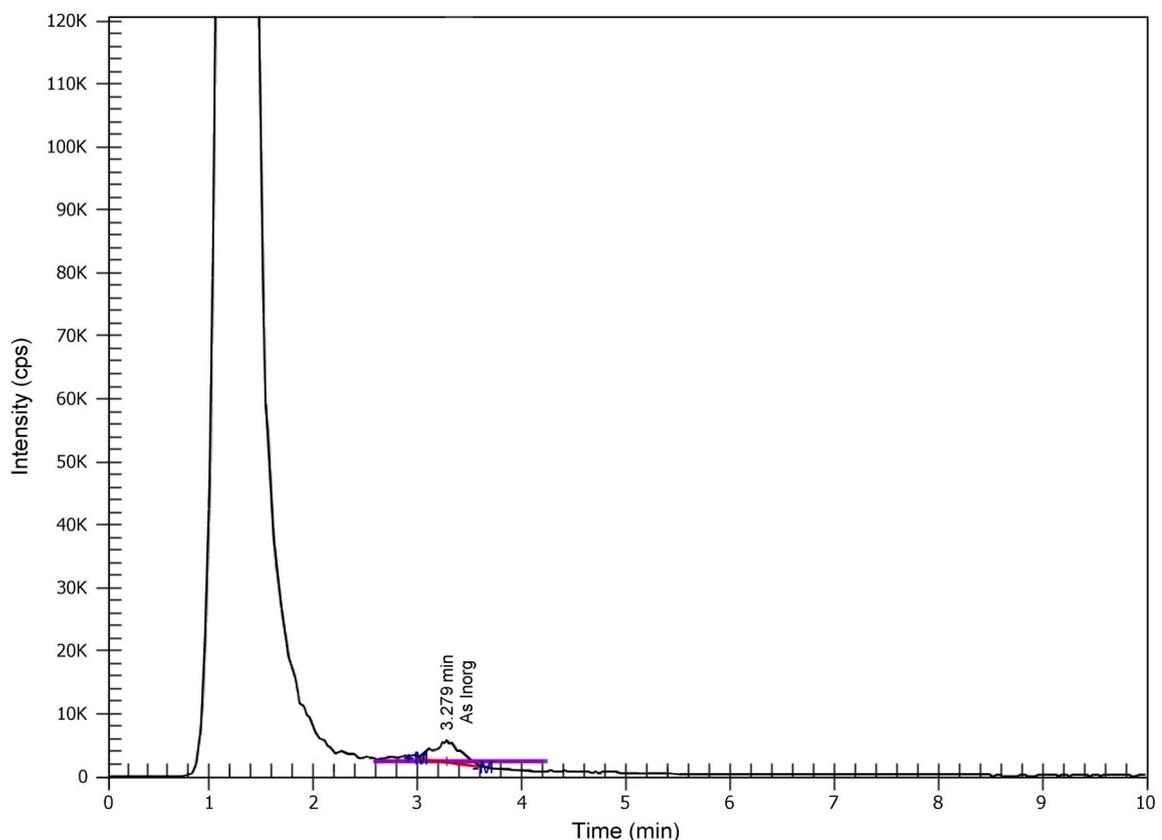
Relativamente all'analisi statistica dei dati, per i confronti temporali (ovvero sulla entità e significatività statistica delle differenze tra i valori di concentrazione nelle tre calate di pesca/raccolta) è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis (noto come “*One-Way ANOVA by Ranks*” o anche “*Equality-of-populations Rank test*”) e per i confronti tra gruppi di organismi marini (per habitat, per *taxon* e per specie) il test, sempre non parametrico, di Mann-Witney (o “*Wilcoxon Rank-Sum test*”).

Pierluigi Piras - “Sicurezza alimentare dei prodotti della pesca in relazione alla presenza di metalli pesanti (Pb, Cd e Hg) e metalli (As) come contaminanti ambientali” - Tesi di Dottorato in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale - Università degli Studi di SASSARI

3.3 Risultati e conclusioni

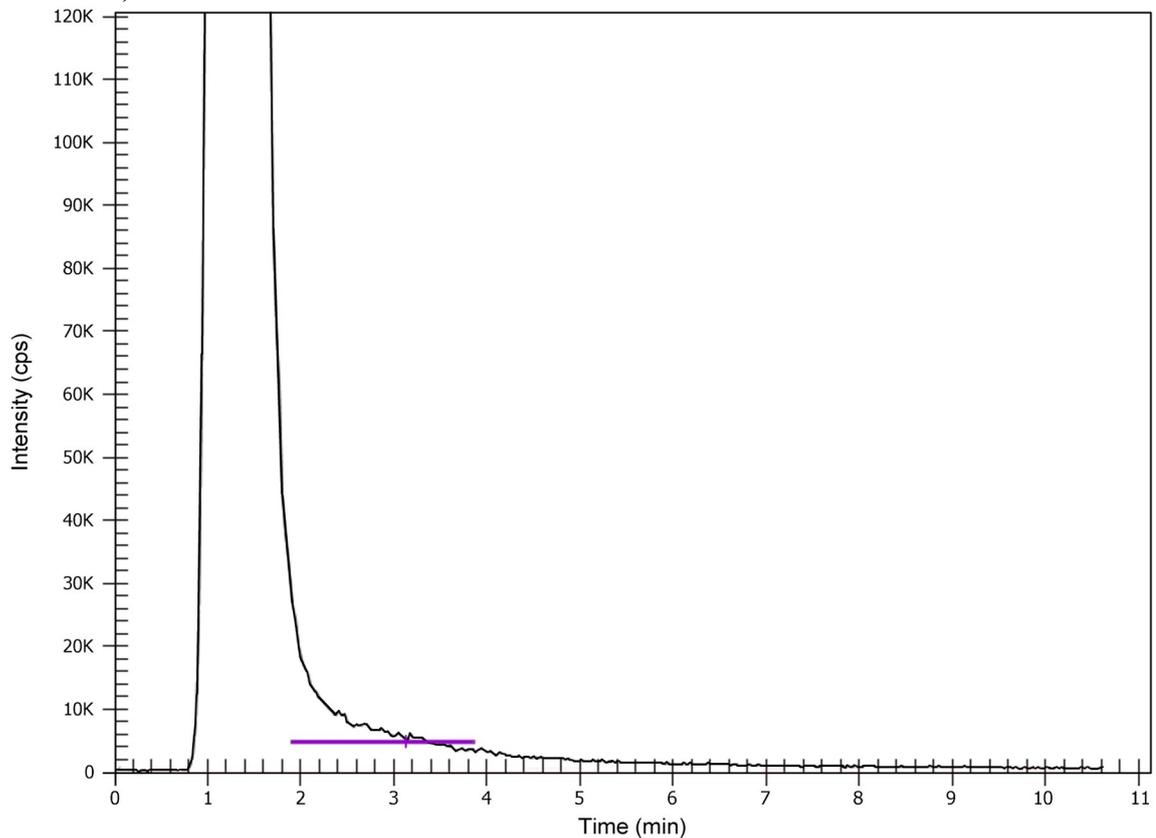
L'accoppiamento HPLC/ICP-MS secondo la procedura utilizzata (42) è una tecnica che è risultata essere rispondente sotto più profili, sia di efficacia (qualità del dato analitico) che di efficienza (relativa semplicità della metodica e tempi di analisi ridotti), agli obiettivi di analisi di speciazione dell'arsenico prefissati (come inorganico su totale) in organismi marini eduli. L'applicazione di tale metodologia anche ad organismi della laguna di Boi Cerbus ha confermato che le forme chimiche presenti in concentrazione di gran lunga superiore sono composti organici dell'arsenico. Le concentrazioni delle forme inorganiche sono così basse da non essere rilevabili o, se lo sono, rappresentano frazioni percentuali sull'arsenico totale che arrivano al massimo all'1%, com'è il caso dei molluschi bivalvi. La coppia di cromatogrammi che segue è stata selezionata in quanto esemplificativa dei risultati analitici ottenuti su campioni che hanno mostrato valori prossimi a quelli estremi del range di distribuzione. I cromatogrammi positivi mostrano infatti un picco di interesse al tempo di ritenzione intorno a 3,2 min (Figura 10).

Figura 10: cromatogramma di un campione di parte edibile di bivalve (*Cerastoderma glaucum*)



Solo i cromatogrammi positivi e con concentrazioni rivelabili mostrano un picco di interesse al tempo di ritenzione intorno a 3,2 minuti, mentre sono da interpretarsi come negativi quelli con concentrazioni < LOD (**Figura 11**).

Figura 11: cromatogramma di un campione di parte edibile di gasteropode (*Phyllonotus trunculus*)



La speciazione chimica dell'arsenico (intesa come analisi dirimente le forme inorganiche vs quelle organiche), studiata in organismi rappresentativi di quattro *taxa*: i molluschi bivalvi, quelli gasteropodi, i crostacei ed i pesci, ha confermato la predominanza di forme organiche e la tendenza generale degli organismi marini a bioaccumulare composti non tossici dell'arsenico, probabilmente derivante da una strategia adattativa di detossificazione. I risultati hanno infatti rivelato una elevata variabilità delle distribuzioni, con concentrazioni relative all'arsenico inorganico che vanno dallo zero analitico a valori medi per *taxon* prossimi a 0,15 mg/Kg.

Come si può rilevare anche dalla **Tabella 1**, le concentrazioni relativamente maggiori per l'arsenico inorganico si hanno nei molluschi bivalvi, cui seguono i crostacei, mentre tutte le altre specie presentano concentrazioni inferiori e tra loro confrontabili.

Tabella 1: concentrazioni medie (\pm D.S.) dell'arsenico totale ed inorganico (mg/Kg p.f.), con la frazione percentuale (\pm D.S.) di quest'ultimo, in (a) bivalvi, (b) gasteropodi, (c) crostacei e (d) pesci

Nome scientifico	Denom. Ital.	Nomenclatura FAO	N	AS _{TOT}	AS _{INORG}	AS _{INORG} /AS _{TOT} %
<i>Cerastoderma glaucum</i>	Cuore	Olive green cockle	11	15,47 \pm 2,56	0,111 \pm 0,025	0,74 \pm 0,22%
<i>Phyllonotus trunculus</i>	Murice	Banded murex	10	105,87 \pm 24,01	0,011 \pm 0,012	0,01 \pm 0,01%
<i>Carcinus aestuarii</i>	Granchio	Mediterr. shore crab	10	40,04 \pm 12,56	0,054 \pm 0,054	0,14 \pm 0,14%
<i>Gobius niger jozo</i>	Ghiozzo nero	Black goby	8	16,58 \pm 4,92	0,001 \pm 0,001	0,00 %
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	Ghiozzo go	Grass goby	3	34,34 \pm 5,71	0,004 \pm 0,003	0,01 \pm 0,01%
<i>Solea vulgaris</i>	Sogliola	Common sole	6	15,40 \pm 5,72	0,001	0,00 %
<i>Sparus aurat</i>	Orata	Gilthead seabream	3	15,20 \pm 1,87	0,001	0,00 %
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguilla	European eel	3	6,65 \pm 5,71	0,001	0,01 \pm 0,01%
<i>Mugil cephalus</i>	Cefalo	Flathead grey mullet	6	5,21 \pm 1,16	0,002 \pm 0,002	0,05 \pm 0,04%
<i>Liza aurata</i>	Lotregano	Golden grey mullet	6	3,68 \pm 1,13	0,001 \pm 0,001	0,02 \pm 0,02%
<i>Atherina (Hepsetia) boyeri</i>	Latterino	Big-scale sand smelt	4	2,99 \pm 0,66	0,001	0,04 \pm 0,04%
<i>Salaria basiliscus</i>	Bavosa	Combtooth blenny	3	2,56 \pm 1,73	0,007 \pm 0,002	0,33 \pm 0,15%
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Spigola	European seabass	5	2,00 \pm 1,01	0,000	0,01 \pm 0,01%
<i>Sarpa salpa</i>	Salpa	Salema	2	0,49 \pm 0,07	0,000	0,00 %

(a)

(b)

(c)

(d)

Questi risultati sono in accordo con altri studi e review della letteratura (10, 16, 20, 21, 41, 42) che, come si è più volte rimarcato, riportano in genere livelli molto bassi di concentrazioni di arsenico inorganico nei prodotti della pesca.

Relativamente all'analisi statistica dei dati, l'utilizzo di test indicati allo scopo, come quello non parametrico di Kruskal-Wallis al quale si è ricorsi per la valutazione di eventuali trends stagionali, non ha evidenziato differenze statisticamente significative, né sulle concentrazioni di arsenico totale ($p=0,2549$), né sulle percentuali medie di arsenico inorganico sul totale ($p=0,0817$), fra le tre calate di pesca/raccolta.

Al fine di valutare l'eventuale influenza degli habitats, le specie sono state raggruppate in due *cluster*: gli organismi bentonici (cuori, murici, granchi, ghiozzi, bavose e sogliole) versus quelli nectonici (latterini, salpe, cefali, lotregani, orate e spigole). Attraverso l'utilizzo del test non parametrico di Mann-Whitney, la differenza dei livelli medi di arsenico totale (in mg/Kg di peso fresco) tra gli organismi bentonici ($38,53 \pm$ E.S. di 5,21) e quelli nectonici ($4,89 \pm$ E.S. di 0,80) è risultata statisticamente significativa ($p<0,0001$). Le stesse specie sono state raggruppate in base al *taxon* in due nuovi *cluster*: gli invertebrati (cuori, murici e granchi) versus i vertebrati (le restanti specie, rappresentate da pesci Teleostei). Sempre ricorrendo al test non parametrico di Mann-Whitney, anche la differenza dei livelli medi di arsenico totale tra gli invertebrati ($52,56 \pm$ E.S. di 7,46) ed i vertebrati ($9,75 \pm$ E.S. di 1,33) è risultata statisticamente significativa ($p<0,0001$). Con i dati al momento disponibili, è difficile scomporre il "peso" attribuibile alla differenza di habitat piuttosto che a quella di *taxon* ma, verosimilmente, entrambi i fattori rappresentano un determinante causale importante.

Per le differenze tra singole specie, sono state selezionate soltanto quelle per le quali si disponeva di una numerosità pari o superiore a 8 pool campionari, quindi: cuori (*Cerastoderma glaucum*), murici (*Phyllonotus trunculus*), granchi (*Carcinus aestuarii*) e ghiozzi neri (*Gobius niger jozo*). Le differenze tra i livelli medi di arsenico totale tra le specie sono state valutate "per coppie" di specie (*pairwise*), sempre attraverso l'utilizzo del test non parametrico di Mann-Whitney, e risultano statisticamente significative ($p<0,0001$) le differenze in tutti i confronti fuorché quello "cuori vs ghiozzi neri" ($p=0,6797$), dove non sono state rilevate differenze.

Relativamente ai livelli medi percentuali di arsenico inorganico sul totale tra gli organismi bentonici ($0,21\% \pm \text{E.S. di } 0,04\%$) e quelli nectonici ($0,02\% \pm \text{E.S. di } 0,01\%$), sempre ricorrendo al test non parametrico di Mann-Whitney, la differenza non risulta statisticamente significativa ($p=0,1038$). Invece, la differenza dei livelli medi percentuali di arsenico inorganico sul totale tra gli invertebrati ($0,31\% \pm \text{E.S. di } 0,06\%$) ed i vertebrati ($0,03\% \pm \text{E.S. di } 0,01\%$) risulta statisticamente significativa ($p=0,0002$).

Relativamente alle differenze tra le specie, considerando ancora solamente quelle a numerosità campionaria ≥ 8 e valutate per confronto a coppie di specie (*pairwise*), risultano statisticamente significative ($p=0,0002$) le differenze in tutti i confronti tra i cuori (*C. glaucum*) e le altre specie, mentre non sono emerse differenze in “granchi vs ghiozzi neri” ($p=0,0097$), in “murici vs granchi” ($p=0,0348$) ed in “ghiozzi neri vs murici” ($p=0,0999$). Nel calcolo della significatività statistica è stata applicata anche la “correzione del Bonferroni” (un test per i confronti multipli simultanei, per esempio quelli tra medie di gruppi, com’è il caso in studio), considerato che, effettuare gli N test (*pairwise*) di Mann-Whitney non “raffinati” anche col test di Bonferroni, avrebbe significato non considerare pertinente il problema della, quantomeno opportuna, correzione per l’inflazione dell’errore complessivo (*experimentwise*) riferito a tutti i test accoppiati. Ciò si ottiene, semplicemente, dividendo il limite fiduciale prefissato (per esempio $p=0,05$) per il numero di confronti (cioè $(N \times (N-1))/2$ che, nel caso specifico del confronto “a coppie” di complessive 4 medie, è pari a 6), ottenendo quindi una considerevole riduzione del limite fiduciale complessivo dei test (nel caso specifico a $1/6$, equivalente al limite di significatività statistica minima prefissata di $p=0,0083$).

In sintesi, si può concludere confermando come l’arsenico sia un elemento ampiamente diffuso, anche nell’ambiente marino-lagunare indagato, sotto diverse forme chimiche: quelle inorganiche, che mediano gli effetti più tossici dell’elemento, predominanti nei sedimenti ed acqua marina, mentre gli organismi acquatici accumulano in prevalenza forme organiche dell’arsenico, non tossiche, ed a varie concentrazioni che riflettono, probabilmente, caratteristiche specie-specifiche nel metabolismo dell’elemento. Questo studio rappresenta pertanto un ulteriore contributo alla conoscenza sui livelli naturali e sulla speciazione chimica dell’arsenico negli organismi marini eduli di aree minerarie.

3.4 Bibliografia relativa all'ultimo step della ricerca

- (87) Mandal BK, Suzuki KT. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58: 201-235
- (88) Bhattacharya P, Welch AH, Stollenwerk KG, McLaughlin MJ, Bundschuh J, Panaullah G. 2007. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Sci Total Environ* 379: 109-120
- (89) Singh N, Kumar D, Sahu AP. 2007. Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention (Review). *J Environ Biol* 28(2): 359-365
- (90) Nordstrom DK. 2002. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296(5576): 2143-2145
- (91) Florence TM, Morrison GM, Stauber JL. 1992. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Sci Total Environ* 125: 1-13
- (92) Sharma VK, Sohn M. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation (Review). *Environ Int* 35: 743-759
- (93) Francesconi KA, Edmonds JS. 1993. Arsenic in the sea. Pages 110-151. In "Oceanography and Marine Biology – An Annual Review", Volume 31. A.D. Ansell, R.N. Gibson & M. Barnes, Ed UCL Press [pagg. 632]
- (94) Neff JM. 2002. Arsenic in the oceans. Chapter 3: 57-78. In "Bioaccumulation in Marine Organisms". Elsevier Ltd [pagg. 468]
- (95) Maher W, Butler E. 1988. Arsenic in the marine environment (Review). *Appl Organometal Chem* 2: 191-2014
- (96) Neff JM. 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment (Review). *Environ Toxicol Chem* 16(5): 917-927
- (97) Francesconi KA, Edmonds JS. 1998. Arsenic Species in Marine Samples. 1998. *Croat Chem Acta* 71(2): 343-359
- (98) Kirby J, Maher W, Spooner D. 2005. Arsenic occurrence and species in near-shore macroalgae-feeding marine animals. *Environ Sci Technol* 39: 5999-6005
- (99) Francesconi KA. 2010. Arsenic species in seafood: origin and human health implications. *Pure Appl Chem* 82(2): 373-381

- (100) Ventura-Lima J, Fattorini D, Notti A, Monserrat JM, Francesco Regoli F. 2009. Bioaccumulation patterns and biological effects of arsenic in aquatic organisms. Chapter 6: 89-106. In “Environmental Health Risks”. J.D. Gosselin Ed. - Nova Science Publishers, Inc. [pagg. 202] http://www.researchgate.net/publication/232814639_BIOACCUMULATION_PATTERNS_AND_BIOLOGICAL_EFFECTS_OF_ARSENIC_IN_AQUATIC_ORGANISMS/file/d912f5098daa3a267f.pdf?ev=pub_ext_doc_dl&origin=publication_detail&inViewer=true
- (101) Edmonds JS, Francesconi KA. 1998. Arsenic metabolism in aquatic ecosystems. Chapter 6: 159-184. In “Metal Metabolism in Aquatic Environments”. Ecotoxicology Series 7 - Chapman & Hall [pagg. 438]
- (102) Sörös C, Tünde Bodó E, Fodor P, Morabito R. 2003. The potential of arsenic speciation in molluscs for environmental monitoring. *Anal Bioanal Chem* 377: 25-31
- (103) Fattorini D, Alonso-Hernandez CM, Diaz-Asencio M, Munoz-Caravaca A, Pannacciulli FG, Tangherlini M, Regoli F. 2004. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: importance in monitoring studies. *Mar Environ Res* 58: 845-850
- (104) Foster S, Maher W, Taylor A, Krikowa F, Telford K. 2005. Distribution and speciation of arsenic in temperate marine saltmarsh ecosystems. *Environ Chem* 2: 177-189
- (105) Fattorini D, Notti A, Regoli F. 2006. Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. *Chem Ecol* 22(5): 405-414
- (106) De Gieter M, Leermakers M, Ryssen R, Noyen J, Goeyens L, Baeyens W. 2002. Total and toxic arsenic levels in North Sea fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 43: 406-417
- (107) Greene R, Crecelius E. 2006. Total and inorganic arsenic in mid-Atlantic marine fish and shellfish and implications for fish advisories. *Integr Environ Assess Manag* 2(4): 344-354
- (108) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion

- on arsenic in food. *EFSA Journal* 2009; 7(10): 1351 (published on 1 February 2010, replaces the earlier version published on 22 October 2009) [pagg. 199]
- (109) Edmonds JS, Francesconi KA. 1987. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia* 43: 553-556
- (110) Kirby J, Maher W. 2002. Tissue accumulation and distribution of arsenic compounds in three marine fish species: relationship to trophic position. *Appl Organometal Chem* 16: 108-115
- (111) Rahman MA, Hasegawa H, Lim RP. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain (Review). *Environ Res* 116: 118-135
- (112) Saha JC, Dikshit AK, Bandyopadhyaya M, Saha KC. 1999. A Review of arsenic poisoning and its effects on human health. *Crit Rev Env Sci Tec* 29(3): 281-313
- (113) Campanini G., Delbono G., Ghidini S. 1998. L'arsenico negli alimenti. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma*, Vol. XVIII: 185-204
- (114) Borak J, Hosgood HD. 2007. Seafood arsenic: implications for human risk assessment. *Regul Toxicol Pharm* 47: 204-212
- (115) Moreda-Piñeiro J, Alonso-Rodríguez E, Romarís-Hortas V, Moreda-Piñeiro A, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D, Bermejo-Barrera P. 2012. Assessment of the bioavailability of toxic and non-toxic arsenic species in seafood samples. *Food Chem* 130: 552-560
- (116) Jain CK, Ali I. 2000. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Res* 34: 4304-4312
- (117) Akter KF, Owens G, Davey DE, Naidu R. 2005. Arsenic Speciation and Toxicity in Biological Systems. *Rev Environ Contam Toxicol* 184: 97-149
- (118) Sele V, Sloth JJ, Lundebye AC, Larsen EH, Berntssen MHG, Amlund H. 2012. Arsenolipids in marine oils and fats: a review of occurrence, chemistry and future research needs (Review). *Food Chem* 133: 618-630
- (119) Piras PL, Mulas GF. 2011. Valutazione dell'esposizione alimentare a contaminanti presenti su bioti eduli (pesci, molluschi bivalvi e crostacei) in un

ambiente costiero antistante un'area mineraria ed industriale della Sardegna (Sulcis-Iglesiente). *Ital J Food Safety* 1: 31-36

- (120) Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson L-G, Muntau H, Van Leeuwen HP, Łobinski R. 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl Chem* 72(8): 1453-1470
- (121) Gong Z, Lu X, Ma M, Watt C, Le XC. 2002. Arsenic speciation analysis. *Talanta* 58: 77-96
- (122) Francesconi KA, Kuehnelt D. 2004. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* 129: 373-395
- (123) Leermakers M, Baeyens W, De Gieter M, Smedts B, Meert C, De Bisschop HC, Morabito R, Quevauviller Ph. 2006. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *Trends Anal Chem* 25(1): 1-10
- (124) Le XC, Cullen WR, Reimer KJ. 1994. Speciation of arsenic compounds in some marine organisms. *Environ Sci Technol* 28: 1598-1604
- (125) Goessler W, Maher W, Irgolic KJ, Kuehnelt D, Schlagenhafen C, Kaise T. 1997. Arsenic compounds in a marine food chain. *Fresenius J Anal Chem* 359: 434-437
- (126) Hirata S, Toshimitsu H, Aihara M. 2006. Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Anal Sci* 22(1): 39-43
- (127) Larsen EH, Sloth JJ, Hansen M, Jorhem L, Engman J. 2005. Determination of inorganic arsenic in white fish using microwave-assisted alkaline alcoholic sample dissolution and HPLC-ICPMS. *Anal Bioanal Chem* 381: 339-346
- (128) Sloth JJ, Larsen EH, Julshamn K. 2005. Survey of inorganic arsenic in marine animals and marine certified reference materials by anion exchange High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 53: 6011-6018
- (129) Dahl L, Molin M, Amlund H, Meltzer HM, Julshamn K, Alexander J, Sloth JJ. 2010. Stability of arsenic compounds in seafood samples during processing and storage by freezing. *Food Chem* 123: 720-727

Ringraziamenti

Se ho potuto raggiungere l'obiettivo del Dottorato di ricerca, lo devo a tantissime persone. Ad Ariella innanzitutto; compagna di vita, salda nei valori che ci hanno fatto incontrare e ci sostengono, generosissima, bella, talvolta suscettibile (quanto basta) nel reclamare i propri spazi, ma anche capace di una smisurata comprensione e, ahimè, incidentalmente, anche compagna di lavoro e Collega nella professione di Medico Veterinario, orgogliosa come me di esserlo; che anche per questo mi ha sostenuto e mi sostiene nei miei percorsi di formazione, anche significativi (e dispendiosi) come questo che mi appresto a concludere. Devo poi ringraziare la mia "famiglia adottiva" (si fa per dire!), Mariella Era e Dino Gagliardi (per altro con prole "naturale" già all'Università), che mi hanno accolto in tutti questi anni a Sassari come uno di casa (e a gratis). Voglio ringraziare anche i miei Prof. dell'Università di Sassari, a partire dal nucleo afferente all'Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale che, coinvolgendomi a più riprese negli anni post-laurea e, ora, con Enrico De Santis nell'insolito ruolo di mio Docente Guida, hanno consentito di mantenermi assiduo frequentatore di un'importante agorà della Veterinaria. Devo sinceramente ringraziare Giannina Chessa e Roberta Orletti, due dirigenti Chimiche di livello nei rispettivi IZS, che hanno messo a disposizione le loro competenze e, operativamente presso i laboratori che dirigono, anche attività analitica e/o fruizione di banche-dati, con le quali ho potuto costruire i "pezzi" più importanti della ricerca finalizzata al mio percorso di Dottorato (e, infatti, sono a mio esclusivo beneficio, "correlatrici" di questa tesi). Devo inoltre ringraziare moltissime persone dell'ISS, sia del Dipartimento "Ambiente e connessa Prevenzione Primaria" che di quello sulla "Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare", in particolare i ricercatori del gruppo con Alberto Mantovani, coi quali ho stretto anche legami di amicizia, in un *filrouge* di formazione altamente qualificante. Sempre dell'ISS, ma impegnati nel CNESPS, ringrazio, in particolare per le opportunità di formazione a supporto del Dottorato, gli amici Alberto Perra e Paola Scardetta, oltre che il "mostro" della statistica applicata Antonino Bella, a cui devo tutto sotto il profilo dell'analisi dei dati. Ultimi (ma non ultimi) voglio ringraziare gli amici e Colleghi della SIMeVeP, in particolare Aldo Grasselli e Vito Perrone, che mi hanno consentito di presentarmi e presentare i risultati della ricerca che andavo sviluppando, passo passo, in numerosi contesti pubblici. Ringrazio anche tutte le altre persone che mi hanno aiutato e/o sostenuto in questo triennio ma che, per mancanza di spazio ... non riesco a palesare.