

PCDDS PCDFS E DIOXIN LIKE-PCBS NEL LATTE OVINO IN SARDEGNA

PCDDs, PCDFs AND DIOXIN-LIKE PCBs IN SHEEP MILK IN SARDINIA

Scarano C.¹, Storelli M.M.², Viridis S.¹, Spanu C.¹, De Santis E.P.L.¹, Marcotrigiano G.O.²

¹Dipartimento di Biologia Animale - Sassari

²Dipartimento Farmaco-Biologico – Bari

SUMMARY

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) are widespread contaminants with important implications for the environment protection and for the human health. Milk and dairy products consumption has been classified as one of the primary pathways of human exposure to these toxic chemicals. In this study we evaluated the levels of 17 laterally substituted PCDD/Fs and 12 DL-PCBs in 45 sheep milk samples collected from small dairy sheep farms in Sardinia (Italy). Mean concentrations of PCDDs and PCDFs were 2.31 and 3.11 pg g⁻¹ fat basis, respectively. With regard to the DL-PCBs only PCB 118 was detected in 51.1% of samples (0.73 ng g⁻¹ fat basis), while the rest of the studied congeners was never detected. The contamination of milk by PCDD/Fs and DL-PCBs (0.92 pg WHO-TEQ/g fat) being within the permissible limit set by the European Commission (6 pg WHO-TEQ/g fat) gives no indication of particular health risk. However, continuous surveillance on PCDD/Fs and DL-PCBs levels in milk is needed in order to correctly evaluate either the environmental impact and human health risk.

KEYWORDS

PCDDs, PCDFs, DL-PCBs, sheep milk

INTRODUZIONE

Le diossine e i PCBs, sono composti organici eterociclici clorurati caratterizzati da notevole stabilità e tossicità per l'uomo e per gli animali (1). Le diossine comprendono 75 policlorodibenzodiossine (PCDDs) e 135 policlorodibenzofurani (PCDFs). Sono composti organici volatili rilasciati nell'ambiente in seguito alla combustione di materiale organico e dei rifiuti urbani, ad attività industriali ed incendi boschivi (2,3,4). I policlorobifenili (PCBs) sono suddivisi in due gruppi: i diossina-simili (DL-PCBs) e i non diossina-simili (NDL-PCBs).

I PCB sono derivati sintetici la cui produzione, lavorazione e distribuzione è stata proibita dalla fine degli anni '80. Venivano utilizzati per numerose applicazioni industriali, quali fluidi per circuiti termici e idraulici, come componenti di adesivi e vernici, come ritardanti di fiamma. Tra le diossine, la 2,3,7,8 tetracloro dibenzo-*p*-diossina (TCDD), è il composto maggiormente

tossico, classificato "agente cancerogeno per l'uomo" (gruppo 1) dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (5). I PCBs comprendono tre gruppi dei quali due, i non-*ortho* e mono-*ortho* sostituiti (DL-PCB), mostrano caratteristiche di tossicità simili alle diossine e sono classificati come "probabili cancerogeni per l'uomo" (gruppo 2A).

Le diossine e i DL-PCB hanno elevata persistenza nell'ambiente e sono presenti nelle acque, nei sedimenti, nell'aria e nel suolo. A causa delle loro caratteristiche lipofile e della loro scarsa biodegradabilità, i PCDD/Fs e i DL-PCBs tendono ad accumularsi negli alimenti, specialmente in quelli ad alto contenuto lipidico. In seguito all'ingestione di vegetali contaminati da parte degli animali, gli inquinanti vengono assorbiti dal tratto gastrointestinale, si accumulano nel fegato e nel grasso, mentre il latte rappresenta la principale via di escrezione (6,7). Nel latte la contaminazione media rilevata è compresa fra 0,6 e 1,0 pg TEQ/g di grasso per i

PCDDs e PCDFs, e tra 0,6 a 1,3 pg TEQ/g di grasso per DL-PCBs (3). Lo scopo del lavoro era quello di contribuire allo studio del livello di contaminazione da PCDD/Fs e da DL-PCBs in campioni di latte ovino della Regione Sardegna e di valutare le possibili differenze tra allevamenti localizzati in aree ad elevato e a basso rischio di contaminazione.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata realizzata dal Dipartimento di Biologia Animale dell'Università di Sassari in collaborazione con il Dipartimento Farmaco-Biologico dell'Università di Bari, il Dipartimento di Prevenzione, il Servizio Veterinario e il Servizio Salute e Ambiente della AUSL di Cagliari. La determinazione di PCDDs, PCDFs e DL-PCBs (Tabella 01) è stata condotta su 45 campioni di latte prelevati in 15 allevamenti ovini a conduzione estensiva. In ciascun allevamento sono stati effettuati tre prelievi, nei mesi di marzo, aprile e maggio. Delle 15 aziende, 12 erano localizzate in un'area ad elevato rischio di contaminazione, in prossimità ad un rilevante insediamento industriale.

Rispetto al sito industriale, 6 aziende (gruppo A) erano situate ad una distanza <7 Km, mentre 6 (gruppo B) in un'area compresa fra i ≥ 7 e i 13 Km. Le 3 aziende utilizzate come "controllo" (gruppo C) erano situate a distanze >30 Km da possibili siti di contaminazione e >140 Km dal sito industriale di riferimento. Il profilo altimetrico delle aziende appartenenti ai gruppi A e B era compreso tra 10 e 49 m sul livello del mare (l.d.m.), mentre per quelle del gruppo C era

compreso tra 185 e 400 m sul l.d.m. L'estrazione dei lipidi per la determinazione dei DL-PCBs è stata effettuata secondo la metodica di Erney (8). Successivamente, dopo concentrazione in Kuderna-Danish, la fase eterea è stata quantitativamente trasferita e fatta adsorbire su microcolonna di Florisil (9).

La separazione e la determinazione quantitativa dei congeneri è stata effettuata per via gascromatografica. Per la determinazione dei PCDD/Fs è stata seguita la metodica USEPA 1613, mentre la determinazione qualitativa è stata effettuata in spettrometria di massa, utilizzando un gas cromatografo Thermo Trace Ultra (colonna RTX-5, Restek U.S.), connesso ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (Polaris Q). Le contaminazioni da PCDDs/Fs e DL-PCBs sono espresse come concentrazioni degli equivalenti tossici (TEQs), utilizzando i fattori di equivalenza tossica (TEFs) (10). Le differenze fra le concentrazioni medie di PCDD/Fs e DL-PCBs nei tre campionamenti sono state valutate mediante LSD test, per un livello di significatività $P < 0,05$.

L'effetto delle variabili sperimentali sulla concentrazione dei contaminanti è stata valutata utilizzando il seguente modello lineare generalizzato: $Y_{ijkm} = m + G_i + C_j + A_k + e_{ijkm}$ dove Y_{ijkm} è la variabile dipendente, rappresentata dalla concentrazione del contaminante, m la media, G_i l'effetto del gruppo di appartenenza, C_j l'effetto della data di campionamento, A_k l'altimetria e e_{ijkm} l'errore residuale. L'analisi statistica è stata condotta mediante software Statgraphics 5.1.

Tabella 1. PCDD/Fs e DL-PCBs ricercati in campioni di latte di pecora (45 campioni).

PCDDs	PCDFs	DL-PCBs non-ortho	DL-PCBs mono-ortho
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDF	PCB 77	PCB 105
1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-PeCDF	PCB 126	PCB 114
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2,3,4,7,8-PeCDF	PCB 169	PCB 118
1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-HxCDF		PCB 123
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,6,7,8-HxCDF		PCB 156
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,2,3,7,8,9-HxCDF		PCB 157
OCDD	2,3,4,6,7,8-HxCDF		PCB 167
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF		PCB 189
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF		
	OCDF		

RISULTATI

Nei campioni di latte di pecora analizzati, le concentrazioni (media \pm ds) dei PCDDs erano pari a 2,31 \pm 1,48 pg/g (0,11- 7,13 pg/g) e dei PCDFs 3,11 \pm 1,73 pg/g (0,20 - 7,47 pg/g). Tra i PCBs è stato rilevato unicamente il congenere mono-ortho PCB 118, presente nel 48,9% dei campioni, con concentrazioni pari a 0,73 \pm 0,97 ng/g

(0,47 e 4,42 ng/g). La concentrazione dei PCDDs e PCDFs (Tabella 2 e Grafici 1 e 2) è risultata inferiore nel primo campionamento rispetto ai due successivi ($P < 0,05$). La localizzazione degli allevamenti (gruppi A, B, C), la data di campionamento e l'altitudine sul livello del mare hanno influenzato significativamente le concentrazioni di PCDDs e PCDFs ($P < 0,05$), mentre tali effetti sono risultati non significativi per il congenere PCB 118. Tra i PCDDs le classi di iso-

meri rilevate con maggiore frequenza relativa, sono risultate: l'ottaclorodibenzo-*p*-diossina (29,3–43,1%), gli esaclorodibenzo-*p*-diossine (15,2–44,7%), tetra-(15,3–23,8%), epta-(5,8–25,7%) e penta-(0,9–1,0%). Tra i congeneri era prevalente il OCDD (29,3–43,1%), seguito da 2,3,7,8-TCDD (15,3–23,8%), 1,2,3,7,8,9-HxCDD (6,0–22,6%), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (5,8–25,7%), 1,2,3,6,7,8-HxCDD (2,8–12,2%) e 1,2,3,4,7,8-HxCDD (2,5–9,9%). Scarsamente rappresentato il 1,2,3,7,8-PeCDD (0,9–1,0%), risultato inferiore al limite di rilevabilità nel 91,1% dei campioni. Tra i PCDFs, sono risultati preponderanti i

penta-clorodibenzofurani (33,0–45,7%), seguiti dagli epta-(23,0–25,0%), octa-(15,7–27,0%), esa-(9,5–19,5%) e tetra-(0,4–1,9%). Per i PCDFs, il 1,2,3,7,8-PeCDF (20,8–28,3%) è risultato il congenero prevalente, seguito da OCDF (15,7–27,0%), 2,3,4,7,8-PeCDF (12,3–18,5%), 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF (11,4–16,4%), 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (6,6–13,2%) e 1,2,3,7,8,9-HxCDF (5,0–12,1%). Poco rappresentati il 1,2,3,4,7,8-HxCDF (1,0–3,3%) e il 1,2,3,6,7,8-HxCDF, sempre sotto i limiti di rilevabilità. I risultati espressi come TEQs, sono riportati in tabella 2 e nei grafici 3 e 4.

Tabella 1. Media delle sommatorie di PCDDs, PCDFs (pg/g base lipidica) e PCBs (ng/g base lipidica).

	I campionamento			II campionamento			III campionamento		
	min	max	media±ds	min	max	media±ds	min	max	media±ds
ΣPCDDs	0,12	2,39	1,53±0,75a	0,11	4,53	2,37±1,44b	0,59	7,13	3,01±1,75b
ΣPCDFs	0,38	3,58	1,06±1,24a	0,20	7,47	3,43±1,76b	0,57	6,69	3,84±1,86b
PCB 118	0,51	4,42	1,65±1,20	0,66	3,02	0,63±0,95	0,47	1,56	0,57±0,64

^{a,b}: lettere diverse nella medesima riga indicano una differenza significativa per $P < 0,05$.

Tabella 2. PCDDs, PCDFs, PCBs (pg WHO-TEQ/g base lipidica) nel latte di pecora.

gruppo allevamento		I campionamento*	II campionamento*	III campionamento*
A	media±ds	0,72±0,38	0,96±0,38	1,12±0,28
	min-max	0,15-1,18	0,28-1,33	0,72-1,48
B	media±ds	0,76±0,09	1,20±0,38	1,30±0,45
	min-max	0,62-0,86	0,79-1,74	0,56-1,69
C	media±ds	0,47±0,63	0,63±0,89	0,66±0,86
	min-max	0,07-1,19	0,09-1,65	0,14-1,66
totale	media±ds	0,07±0,39	0,09±0,62	0,14±0,64
	min-max	0,07-1,19	0,09-1,74	0,14-1,69

*valore espresso in pg WHO-TEQ/g base lipidica; distanza dal sito principale: A<7 Km, B>7 Km, C >140 Km.

Grafico 1. Concentrazione (pg/g base lipidica) degli isomeri PCDDs.

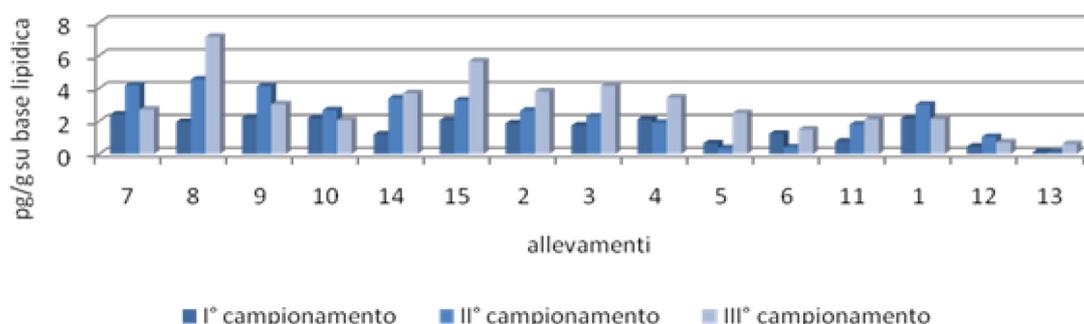


Grafico 2. Concentrazione (pg/g base lipidica) degli isomeri PCDFs.

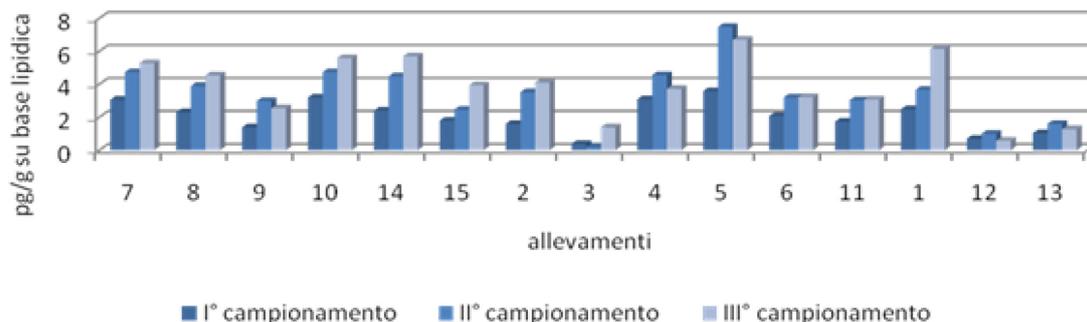


Grafico 3. TEQs di PCDDs + PCDFs in relazione ai TEFs WHO (12).

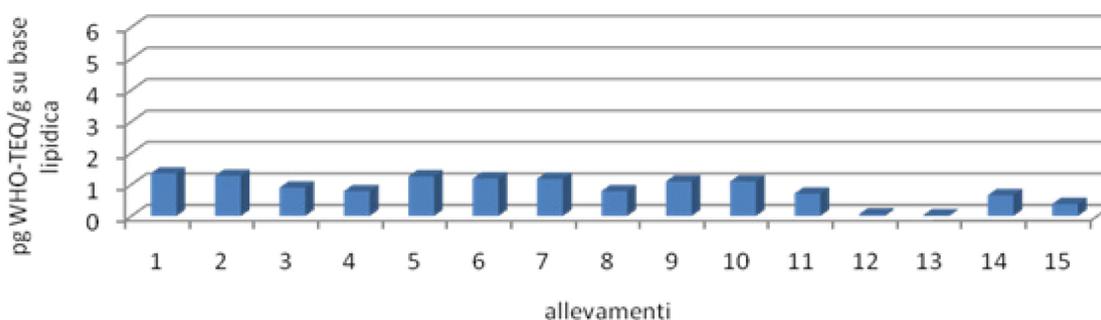
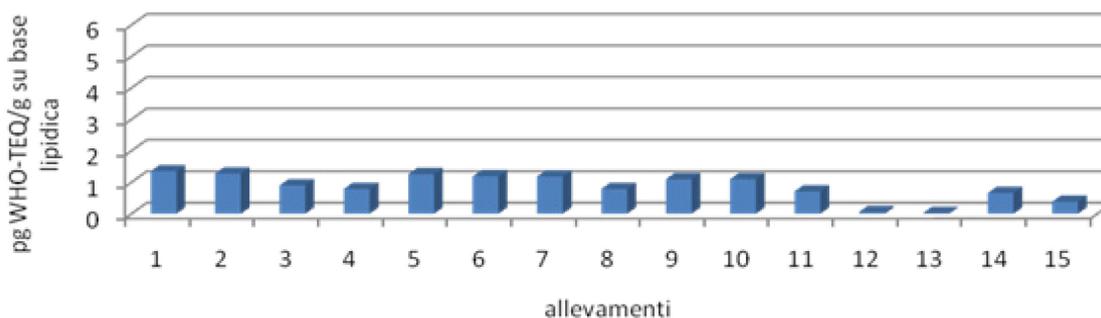


Grafico 4. TEQs di PCDDs + PCDFs + PCBs in relazione ai TEFs WHO (12).



CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nei campioni di latte prelevati nelle aziende situate in prossimità dell’insediamento industriale oggetto della ricerca (A e B) si evidenzia una contaminazione diffusa da PCDDs e PCDFs (Grafici 1 e 2). Quest’area non risulta attualmente inserita tra i Siti di Interesse Nazionale (SIN) nei quali è previsto il monitoraggio dei contaminanti ambientali per gli alimenti di origine animale. Le contaminazioni rilevate nei campioni dei due gruppi (A, B) non erano influenzate dalla distanza dall’insediamento in-

dustriale. Le concentrazioni mostravano invece un incremento progressivo durante la lattazione. Questo dato, conferma che le variazioni stagionali influenzano in misura non trascurabile i meccanismi di “deposizione secca e umida” dei contaminanti su suolo e vegetali (11). Le concentrazioni medie di PCDDs e PCDFs nei campioni dei gruppi A e B sono sensibilmente più elevate rispetto a quelle riscontrate in due delle tre aziende controllo (n.12 e n.13). Mentre, in una di queste (n.01), le concentrazioni osservate presentavano valori simili ai campioni delle aziende dei gruppi A e B. Questa differenza potrebbe essere posta in relazione alla differente

collocazione delle tre aziende controllo. Infatti l'azienda n.01 era localizzata su un versante esposto ai venti prevalenti, provenienti da una direzione che comportava il passaggio attraverso aree industriali "a rischio", seppure collocata, come le altre, ad distanza >30 Km da questi e ad una >140 Km dal sito principale. L'area di localizzazione di questa azienda, nell'anno precedente il campionamento, era stata interessata da un incendio. Gli incendi boschivi sono infatti considerati una delle maggiori fonti di inquinamento da PCDDs e da PCDFs, tale da consentire la rilevazione dei contaminanti a concentrazioni comprese tra 0,4 e 308 g ITEQ/y (12). Gli altri allevamenti controllo (n.12 e n.13) erano situati invece su un versante collinare il cui orientamento non comportava una diretta esposizione ad analoghe contaminazioni. I risultati ottenuti mostrano concentrazioni dei TEQs inferiori ai limiti massimi stabiliti dalla normativa comunitaria, pari a 3 pg WHO-TEQ/g su base lipidica per la sommatoria dei PCDDs e PCDFs e a 6 pg WHO-TEQ/g su base lipidica se nella sommatoria si includono anche i DL-PCBs (13). Precedenti ricerche hanno mostrato concentrazioni di PCDDs, PCDFs e DL-PCBs nel latte vaccino prodotto in alcune regioni della Francia, comprese tra 0,16 e 0,76 pg TEQ/g su base lipidica, con una media nazionale di 0,33 pg TEQ/g su base lipidica (14). In Campania, nel latte di due allevamenti ovis sottoposti a sequestro cautelativo, sono stati riscontrati valori di 5,27 WHO TEQ/g su base lipidica (15). Nella stessa Regione la TCDD, era rilevata nel 90% dei campioni in concentrazione ad una concentrazione pari a 1,44 pg/g, valore superiore alla media nazionale (0,1 pg/g) e al valore medio (1,0 pg/g) regionale (16). La Raccomandazione 2006/88/CE, stabilisce livelli di azione per il latte, pari a 2 pg TEQ/g su base lipidica. In conclusione, il livello di contaminazione da PCDDs, PCDFs e DL-PCBs nel latte ovino proveniente da allevamenti situati in prossimità del sito industriale di riferimento (zona a rischio potenziale), non supera in nessun caso i limiti normativi fissati. La presenza di una contaminazione diffusa, se pur ridotta, in prossimità del sito oggetto della ricerca e in una delle aziende controllo, evidenzia la necessità di prendere in considerazione l'estensione del monitoraggio e una rivalutazione dei SIN per i contaminanti ambientali in alimenti di origine animale.

BIBLIOGRAFIA

- Code of Practice for the Prevention and Reduction of Dioxin and DL-PCB Contamination in Foods and Feeds. *CAC/RCP 62*, (2006);
- U.S. Environmental Protection Agency, (1997). Locating and estimating air emissions from sources of dioxins and furans, *EPA-454/R-97-003*;
- European Commission (EU) Reports on tasks for scientific cooperation, (2000). Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU Member States. Report of experts participating in Task 3.2;
- Wei-Yu, K., Hwong-wen, M., Lin-Chi, W., Guo-Ping, C.C., (2007). Site-specific health risk assessment of dioxins and furans in an industrial region with numerous emission sources. *Journal of Hazardous Materials*, 145, 471-481;
- The IARC Monographs, (1997). An overview and update on occupational carcinogens, Group-1 agents with less than sufficient evidence in humans, Vol 69;
- Fürst, P., Fürsta, C., Wilmersa, K., (1992). PCDDs and PCDFs in human milk-statistical evaluation of a 6-years survey. *Chemosphere*, 25, 7-10, 1029-1038;
- Schuler, F., Schmid, P., Schlatter, C., (1997). The transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from soil into eggs of foraging chicken. *Chemosphere*, 34, 4, 711-718;
- Erney, D.R., (1983). Rapid screening procedure for pesticides and polychlorinated biphenyls in fish: collaborative study. *Journal Association Official Analytical Chemists*, 66, 969-973;
- Murphy, P.G., (1972). Sulfuric acid for the cleanup of animal tissues for analysis of acid-stable chlorinated hydrocarbon residues. *Journal Association Official Analytical Chemists*, 55, 1360-1362;
- Van Den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., et al., (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106, 775-792;
- Turci, R., Minoia, C., Leoni, E., et al., (2009). Interferenti endocrini: PCDD: poliorodibenzo-p-diossine. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, 31,4, 325-370;
- Martínez, M., Díaz-Ferrero, J., Martí, R., et al., (2000). Analysis of dioxin-like compounds in vegetation and soil samples burned in Catalan forest fires. Comparison with the corresponding unburned material. *Chemosphere*, 41, 12, 1927-1935;
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, (2006). Regolamento (CE) N. 1881che definisce i tenori massimi di alcuni contami-

- nanti nei prodotti alimentari. L 364/5 del 20 dicembre 2006, 5–24;
14. Durand B., Dufour B., Fraisse, D., Defour, S., Duhem, K., Le-Barillec K., (2006). Levels of PCDDs, PCDFs and DL-PCBs in raw cow's milk collected in France. *Chemosphere* 70, 4, 689-693;
 15. Iannuzzi, L., Perucatti, A., Di Meo, G.P., et al., (2004). Chromosome fragility in two sheep flocks exposed to dioxins during pasturage. *Mutagenesis* 19, 5, 355-359;
 16. Perucatti, A., Di Meo, G.P., Albarella, S., et al., (2006). Increased frequencies of both chromosome abnormalities and SCEs in two sheep flocks exposed to high dioxin levels during pasturage. *Mutagenesis* 21, 67-75.

Ricerca eseguita con finanziamento RAS Programma di Ricerca Sanitaria Finalizzata – anno 2007