

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2

Settore Scientifico disciplinare: VET/04

**VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI
CONTAMINANTI PERFLUOROALCHILICI
IN ALIMENTI DESTINATI AL CONSUMO
UMANO**

Presentata da: Dott.ssa Chiara Devicienti

Coordinatore Dottorato
Prof. Carlo Tamanini

Relatore
Prof. Giampiero Pagliuca

Correlatore
Dr. Andrea Barbarossa

Esame finale anno 2014

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1. SOSTANZE PERFLUROALCHILICHE (PFAS)	3
1.1.1. . Struttura chimica	3
1.1.2. Produzione ed applicazioni industriali.....	7
1.2. PRESENZA DEI PFAS NELL' AMBIENTE.....	9
1.2.1. Aria	12
1.2.2. Acqua e suolo	13
1.2.3. Fauna	16
1.3. POSSIBILI FONTI DI ESPOSIZIONE UMANA	
1.3.1. Fonti di esposizione alimentare	18
1.3.2. Valutazione dell'esposizione umana	30
1.4. TOSSICITÀ	32
1.4.1. . Tossicocinetica	34
1.4.1.1. Tossicocinetica negli animali.....	34
1.4.1.2. Tossicocinetica nell'uomo	36
1.4.2. Meccanismo d'azione dei PFAS.....	36
1.4.3. Effetti tossici.....	37
1.4.3.1. Effetti tossici negli animali	37
1.4.3.2. Effetti tossici nell'uomo	39
1.5. METODI DI ANALISI dei PFAS	41
1.5.1. Preparazione del campione.....	41
1.5.2. . Analisi strumentale	42
1.6 LEGISLAZIONE.....	45
2 SCOPO DEL LAVORO.....	48
3. MATERIALI E METODI	50

3.1.CAMPIONI.....	50
3.1.1. Campioni di latte	50
3.1.2. Campioni di pesce	52
3.2.MATERIALI	55
3.3.STRUMENTAZIONE	59
3.3.1. UPLC/MS-MS	59
3.4.CONDIZIONI STRUMENTALI.....	61
3.4.1. CONDIZIONI LC.....	61
3.4.2. CONDIZIONI MS/MS	63
3.5.PROCEDURE DI ESTRAZIONE DEI CAMPIONI	66
3.5.1. Campioni di latte	66
3.5.2. Campioni di pesce	69
3.6.QUANTIFICAZIONE	71
3.6.1. Campioni di latte	71
3.6.2. Campioni di pesce	72
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	74
4.1.VERIFICA DELLE PRESTAZIONI DEL METODO.....	74
4.1.1. Campioni di latte	74
4.1.2. Campioni di pesce	76
4.2.ANALISI DEI CAMPIONI.....	81
4.2.1. Latte vaccino.....	81
4.2.2. Latte materno	83
4.2.3. Pesci.....	85
4.2.4. Branzino.....	88
5. CONCLUSIONI.....	93
BIBLIOGRAFIA.....	96

1. INTRODUZIONE

Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) è un nome collettivo che comprende un vasto e complesso gruppo di composti costituiti da una catena carboniosa idrofobica di lunghezza variabile da C4 a C16, e da un gruppo idrofilico terminale.

La porzione idrofobica può essere lineare, ramificata e parzialmente o totalmente fluorurata. Quando è completamente fluorurata, ovvero quando tutti gli atomi d'idrogeno sono sostituiti da atomi di fluoro, si parla di composti perfluorurati (PFC) (EFSA 2011).

In relazione al tipo di carica che assume il gruppo terminale idrofilico che può essere positiva, negativa o nulla, queste sostanze si presentano sotto forma di tensioattivi cationici, anionici o neutri.

Un'importante sottoinsieme dei PFAS è rappresentato dai tensioattivi organici (per)fluorurati con gruppo terminale anionico, di cui fanno parte il l'acido perfluoroottanosulfonato (PFOS) e l'acido perfluoroottanico (PFOA).

La loro particolare struttura chimica ed in particolar modo i numerosi legami covalenti carbonio-fluoro che hanno una forte energia di legame, conferiscono notevole stabilità ed inerzia termica, chimica e biologica a questi composti.

Altre interessanti proprietà chimico-fisiche di queste sostanze risultano essere i bassi punti di ebollizione e una debole tensione superficiale che rende i PFAS sostanze chimiche estremamente resistenti al calore e a valori di pH estremi, e difficilmente solubili sia in acqua che nei lipidi. Pertanto risultano molecole altamente resistenti ai processi di degradazione termica, biodegradazione, idrolisi, metabolizzazione e di conseguenza altamente persistenti nell'ambiente (EFSA, 2008).

Non si tratta di molecole naturalmente presenti in natura, anche se composti monofluorurati possono essere prodotti da alcune piante o funghi e certi composti perfluoroalchilati possono essere originati durante attività vulcaniche o altri processi geofisici, anche se in quantità trascurabili.

Esistono principalmente due metodi di produzione dei PFAS, ovvero la fluorurazione elettrochimica (EF) e la telomerizzazione (TM).

L'inizio della produzione dei PFAS risale alla fine degli anni '40 e da allora queste molecole sono state utilizzate per le loro potenzialità chimico-fisiche in una vasta gamma di

applicazioni industriali e commerciali. Esempi del loro utilizzo comprendono rivestimenti oleorepellenti per contenitori alimentari, schiume antincendio, insetticidi, rivestimenti anti-macchia per tessuti, detergenti e cere per pavimenti (EFSA, 2008; Buck et al., 2011).

Si tratta dunque di sostanze di origine antropica e la loro presenza nell'ambiente, inclusi animali e persone, è pertanto attribuibile alla loro vasta produzione e utilizzo da parte dell'uomo (Butt et al., 2010; Schiavone et al., 2009).

Nell'ultimo decennio, il crescente interesse della comunità scientifica verso questi contaminanti ha portato ad importanti scoperte sul loro potenziale effetto tossico.

La natura anfifilica di queste sostanze impedisce l'accumulo nel tessuto adiposo a differenza di quanto accade solitamente per gli altri composti alogenati, mentre viene mostrata elevata affinità per le proteine. Non è un caso dunque che i PFAS accumulandosi nella catena alimentare si possano poi ritrovare anche nel plasma umano.

Diversi studi hanno dimostrato che i PFAS una volta nell'organismo hanno un'emivita piuttosto lunga, andandosi ad accumulare preferibilmente nel sangue e nel fegato e che possono provocare epatotossicità, immunotossicità, neurotossicità, alterazioni ormonali nella riproduzione e nello sviluppo (EFSA, 2011).

La dieta è considerata la principale fonte di esposizione per l'uomo, ed in particolare i prodotti ittici risultano essere gli alimenti più contaminati, ma altrettanto importanti e possibili fonti di contaminazione non devono essere trascurate, prime tra tutte l'acqua potabile e l'aria.

Numerose Autorità in tutto il mondo, preoccupate dal potenziale impatto dei PFAS sia sull'ambiente che sull'uomo, hanno avviato programmi di ricerca per meglio comprendere quale fosse il destino di queste molecole a livello ambientale ed alimentare al fine di effettuare una stima il più possibile veritiera circa il grado di esposizione umana a queste sostanze. Anche l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) con il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare ha elaborato un parere scientifico sul PFOS, il PFOA e i loro sali, che è stato presentato il 21 febbraio 2008.

Nel 2009 il PFOS è stato inserito nell'allegato B della Convenzione di Stoccolma che elenca le sostanze soggette a limitazioni per la produzione e per l'uso ed è stato catalogato come POP (Persistent Organic Pollutants), data la sua diffusa presenza e la capacità di persistere nell'ambiente e negli organismi viventi e la sua tossicità (Wang et al., 2009; Raccomandazione UE 161/2010).

1.1 SOSTANZE PERFLUROALCHILICHE (PFAS)

1.1.1 Struttura chimica

Le sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) sono costituite da una catena carboniosa idrofobica di lunghezza variabile (da C4 a C16), che può essere lineare o ramificata e parzialmente o totalmente fluorurata e da un gruppo idrofilico terminale.

Il gruppo terminale idrofilo impartisce alla molecola una carica neutra, positiva o negativa per cui tali composti possono presentarsi sotto forma di tensioattivi cationici, anionici o neutri.

I gruppi terminali anionici più frequenti sono i carbossilati ($-\text{COO}^-$, come il PFOA), i sulfonati ($-\text{SO}_3^-$, a cui appartiene il PFOS) e i fosfati ($-\text{OPO}_3^-$).

Per semplificare la terminologia, quando si fa riferimento ai composti perfluoroalchilici si usano spesso abbreviazioni che derivano dalla loro struttura molecolare.

Quindi l'acido perfluoroottano sulfonato viene indicato con la sigla PFOS, dove "PF" sta per "perfluoro", "O" perché è costituito da otto atomi di carbonio e infine con "S" si intende il gruppo idrofilico terminale (che in questo caso è il sulfurico), mentre l'acido perfluorottanico viene denominato PFOA perché con "A" si indica convenzionalmente il gruppo acido carbossilico (Buck et al., 2011).

Come accennato in precedenza, i PFAS sono molecole altamente resistenti ai processi di degradazione termica, biodegradazione, idrolisi, fotolisi e non vengono quasi per nulla metabolizzati. Solo alcuni polimeri vengono degradati limitatamente dando luogo a polimeri di peso molecolare inferiore (EFSA, 2008).

Il PFOS e il PFOA sono considerati i contaminanti più rappresentativi tra i PFAS, anche perché sono i prodotti di degradazione finale della maggior parte dei composti fluorurati (Raccomandazione UE 161/2010).

PFOA

Il PFOA è un composto costituito da una catena alchilica (C8) completamente fluorurata e da un gruppo terminale carbossilico (-COO⁻).



Figura 1.1: *Struttura del PFOA*

In soluzione acquosa a pH4, le molecole si trovano quasi tutte in forma dissociata: la catena perfluoroalchilica resta sulla superficie a livello di interfaccia aria/acqua, mentre il gruppo carbossilico rimane nell'acqua (US EPA, 2005).

Questo acido, in forma dissociata, presenta una tensione di vapore trascurabile e moderato assorbimento nei solidi, per cui tende ad accumularsi a livello delle acque superficiali. Inoltre la sua presenza nell'ambiente deriva sia da un processo diretto, ossia produzione, utilizzo ed eliminazione, che da processi indiretti che includono la degradazione dei precursori attraverso processi di biodegradazioni e ozonolisi (EFSA , 2008).

PFOS

Il PFOS, come il PFOA, è un composto costituito da una catena alchilica (C8) completamente fluorurata e da un gruppo terminale solfato ($-\text{SO}_3^-$).



Figura 1.2: *Struttura del PFOS*

Si utilizza solitamente sotto forma di sale (sale di ammonio, sodio o potassio) oppure in forma polimerizzata; in acqua per valori di pH compresi tra 3 ed 8 si presenta in forma completamente dissociata (EFSA, 2008). L'origine e la produzione del PFOS è principalmente industriale, ma questo composto può derivare anche dalla degradazione dei suoi vari precursori, operata da microrganismi ambientali o da organismi superiori. Si tratta infatti di un composto altamente resistente alla fotolisi (emivita stimata: più di 3,7 anni) e alle reazioni di idrolisi (emivita stimata: più di 41 anni). Ad oggi l'incenerimento ad alte temperature è l'unico modo conosciuto per degradarlo (EFSA, 2008) ed è, tra i PFAS, il contaminante più diffuso nei prodotti alimentari e quello rilevato alle più alte concentrazioni.

Nel marzo del 2010, la Comunità Europea ha emanato una Raccomandazione (2010/161/EU) relativa al controllo della presenza di sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti ed ai loro precursori, come il perfluoroottanosulfonamide (PFOSA), l' N-etilperfluoroottanosulfonamidetano (N-EtFOSE) e l' 8:2 fluorotelomero degli alcool (FOET).

Il PFOS (Fig.3) e il PFOA(Fig. 4) sono considerati i contaminanti perfluoroalchilici più rappresentativi tra i PFAS, proprio perché sono anche i prodotti di degradazione finale della maggior parte dei composti fluorurati (Raccomandazione UE 161/2010).

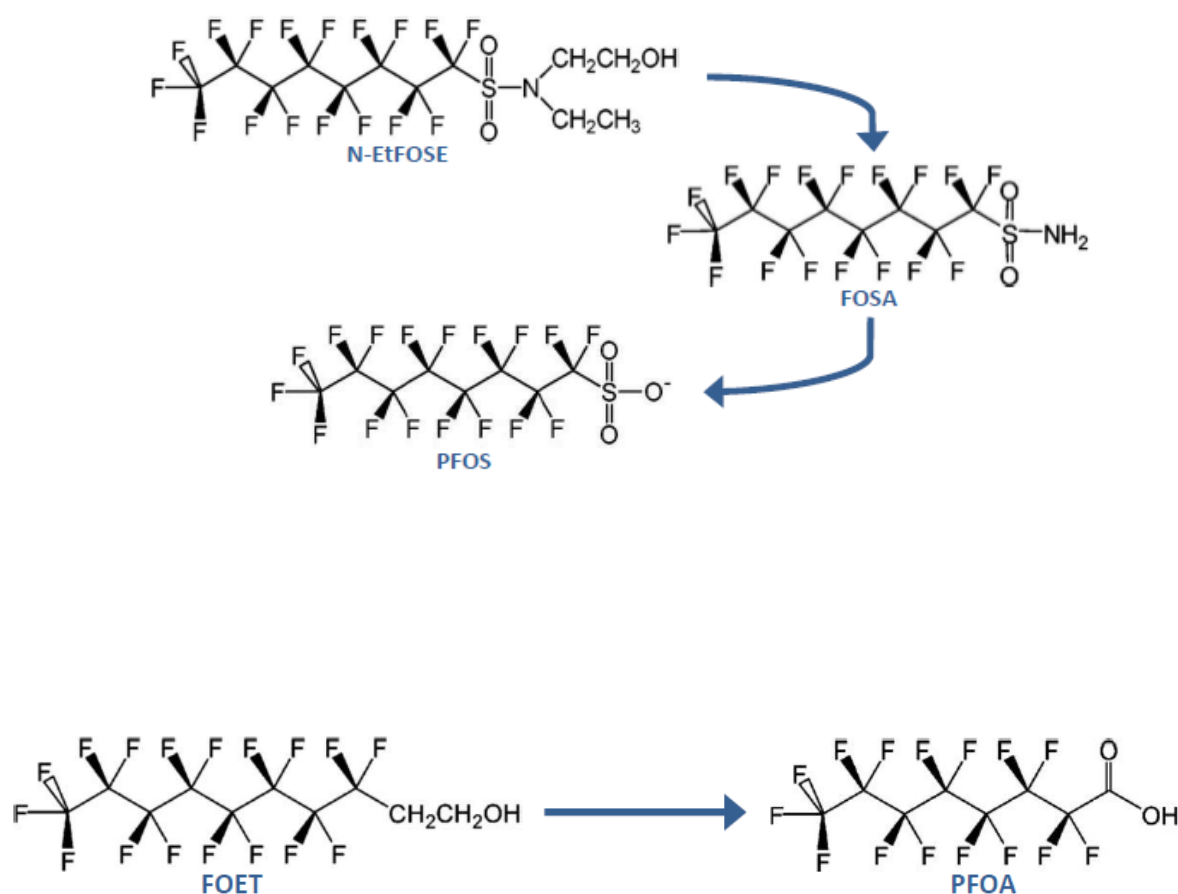


Figura 1.3 PFOS, PFOA e i loro precursori

1.1.2 Produzione ed applicazioni industriali

I principali metodi di produzione dei PFAS sono: la fluorurazione elettrochimica (EF) e la telomerizzazione (TM).

La fluorurazione elettrochimica, introdotta alla fine degli anni '40, è stata ampiamente ed a lungo utilizzata soprattutto per i bassi costi di produzione che implicava.

Questo processo consiste nell'elettrolisi di un composto organico in una soluzione liquida di acido fluoridrico (HF) che permette la sostituzione di tutti gli atomi di idrogeno delle molecole con atomi di fluoro e produce una miscela di composti formata da 4 a 9 atomi di carbonio, ottenendo sia isomeri lineari che ramificati (Brooke et al, 2004; Prevedouros et al., 2006).

Nel maggio 2000 la 3M, azienda statunitense, maggior produttrice mondiale di questi composti, annuncia l'abbandono di tale tecnica per la produzione di PFAS, sicuramente in seguito al riscontro della loro presenza sia nel personale esposto sul luogo di lavoro che nell'ambiente e alle relative restrizioni imposte dall'Unione Europea.

Fino ad allora infatti il PFOS era il composto perfluoroalchilico più utilizzato e la sua produzione e quella di altri PFAS, stimata nel mondo, ammontava a 4500 tonnellate/anno con concentrazioni maggiori in particolar modo in Europa, Giappone e Stati Uniti (Paul et al., 2009).

Dunque, la riduzione dell'utilizzo del PFOS ha consentito una diminuzione notevole delle emissioni di queste sostanze, che sono state gradualmente sostituite da altri prodotti, ottenuti mediante il processo di telomerizzazione (Brooke et al., 2004; Van Asselt et al., 2011).

Tale metodica in realtà può essere applicata solo per la produzione di PFOA e dei composti della stessa famiglia, ma risulta essere ad ogni modo un processo più efficiente e vantaggioso rispetto al precedente, in quanto, l'elevata purezza delle materie prime utilizzate fa sì che il prodotto sintetizzato risulti altrettanto puro (più del 99% di molecola lineare) (EFSA, 2008).

Questa tecnica consiste nel far reagire il tetrafluoroetilene con il pentafluoruro di iodio (IF₅) per la produzione di fluorotelomeri aventi una catena alchilica lineare ed un numero pari di atomi di carbonio.

I PFAS, così ottenuti, sono sostanze estremamente resistenti a qualsiasi processo di degradazione (termico, chimico e biologico), che godono di elevata stabilità chimica e di proprietà idro e oleofobiche allo stesso tempo.

Sono proprio le suddette caratteristiche chimico-fisiche ad averli resi quasi insostituibili, negli ultimi cinquant'anni, in molteplici applicazioni industriali e prodotti di consumo.

Per quanto riguarda le tipologie di applicazione del PFOS, sono state suddivise dall'OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) in tre grandi categorie.

La prima comprende i trattamenti di rivestimento della carta, per creare contenitori repellenti all'acqua, ai grassi e all'olio nei prodotti destinati al contatto con gli alimenti (come contenitori per alimenti o contenitori utilizzati nei fast food, contenitori per pizze).

La seconda riguarda i trattamenti superficiali, utilizzati soprattutto in ambito tessile per la realizzazione di tappeti e tappezzerie con rivestimento antimacchia e per produrre tessuti ad alta tecnologia. Sono inoltre presenti in prodotti commerciali come emulsionanti e surfattanti per la pulizia di pellame, tappeti e tappezzeria e in alcune formulazioni per shampoo ed insetticidi.

Infine la terza categoria comprende diversi sali del PFOS utilizzati per produrre schiume anti-incendio, imballaggi, mobili, impregnanti per il legno, cere, vernici e lucidanti.

Sono utilizzati anche nelle industrie dei semiconduttori, per la produzione di pellicole fotografiche e radiografiche e come tensioattivi per l'industria estrattiva mineraria del petrolio (OCSE, 2002; Raccomandazione UE 161/2010).

Il PFOA inoltre è stato anche ampiamente utilizzato per la produzione di fluropolimeri come il politetrafluoroetilene (meglio conosciuto come Teflon) e il polivinilidene fluoruro (PVDF). Questi polimeri, grazie alla loro attività surfattante di superficie, sono i componenti principali dei rivestimenti antiaderenti per le padelle (Lehmler, 2005).

Dall'annuncio della 3M, l'utilizzo dei PFAS in Europa è diminuito in maniera significativa ed in alcuni casi è perfino cessato grazie anche alla possibilità di impiegare sostanze alternative ma con le stesse funzioni (soprattutto nel campo dell'industria tessile, per la carta ed il packaging degli alimenti).

Anche se da un lato queste notizie sono confortanti, dall'altro rimane il fatto che i tessuti trattati e/o ancora in uso possono rappresentare comunque una fonte di PFAS, considerando anche la lunga emivita nell'ambiente di queste sostanze.

1.2 PRESENZA DEI PFAS NELL'AMBIENTE

I PFAS presenti a livello ambientale derivano per lo più da procedimenti di fabbricazione, da operazioni di smaltimento, o dal rilascio da parte degli innumerevoli prodotti che li contengono.

Secondo l'OCSE la produzione di PFOS (in Europa, Stati Uniti e Giappone) fino al 2000 era pari a circa 4500 tonnellate all'anno, per le quali le applicazioni riguardavano al 50% trattamenti superficiali e al 30% i trattamenti di rivestimento della carta.

Attualmente, gli unici dati che ci permettono di effettuare una stima riguardo all'ammontare dei rifiuti di produzione del PFOS sono quelli che ha fornito l'azienda statunitense 3M, maggiore produttrice di questa sostanza.

Ammonterebbero a 26.500 tonnellate i rifiuti derivati dalla produzione di PFOS, che sono stati prodotti tra il 1970 e il 2002 in tutto il mondo. Tenendo presente che circa il 90% di questi rifiuti è in forma solida e che i 2/3 di questi vengono smaltiti attraverso l'incenerimento, mentre la quota rimanente viene dispersa in discariche, è stato stimato che 24500 tonnellate si ritrovino nell'ambiente in forma solida, 435-575 tonnellate siano disperse nell'aria e le restanti 230-1450 nelle acque (Paul et al., 2009).

Per quanto riguarda il PFOA, la produzione globale stimata durante il periodo che va dal 1951 al 2004 era di circa 3600-5700 tonnellate. La maggior parte della produzione PFOA (80-90% nel 2000) derivava dal processo di fluorurazione elettronica, mentre il restante 10-20% è stato sintetizzato mediante telomerizzazione a partire dal 1975 ad oggi (Prevedouros et al., 2006).

L'avvento della telomerizzazione è stato fondamentale per far diminuire la produzione di PFOA e di conseguenza le emissioni globali di tali sostanze nell'ambiente. Bisogna, comunque considerare anche le fonti indirette di rilascio: la presenza a livello ambientale di acidi perfluoroalchilcarbossilici (PFCA), precursori di PFOA, non deriva solo da processi di produzione, utilizzo e smaltimento, ma anche dalla loro presenza sotto forma di residui in prodotti che contengono PFOA (ottenuti mediante fluorinazione elettrochimica), o in prodotti a base di fluorotelomeri come involontari intermedi di produzione. Tra l'altro ogni possibile processo di degradazione di queste molecole o delle rispettive materie prime può rappresentare un'ulteriore fonte di PFAS.

Le emissioni stimate a livello globale di PFCA nel 2000 ammontano a circa 237 tonnellate, delle quali 200 sono rappresentate da PFOA (Prevedouros et al., 2006).

L'utilizzo intensivo di queste sostanze, ha portato alla loro diffusione globale e recenti studi hanno dimostrato la generale presenza dei PFAS (con i loro sali e precursori) nell'ambiente, e nei mammiferi, negli uccelli, nei pesci e nei molluschi in diverse aree geografiche (UE 161/2010).

E' stato stimato che il PFOS, nell'ambiente, ha un'emivita di 41 anni, ed il PFOA di 8, per cui la loro presenza e conseguente contaminazione continueranno ad essere di grande interesse per la salute pubblica anche negli anni futuri (D'Hollander et al., 2010).

A dimostrazione del fatto che questi contaminanti hanno un grande potenziale di bioaccumulo, esistono dati preoccupanti circa le concentrazioni di PFOS riscontrate sia nei predatori all'apice della catena alimentare (orso polare, foca, visone, aquila), sia nei livelli trofici più bassi anche in zone molto distanti dalle fonti legate alle attività umane.

La presenza dei PFAS risulta più elevata nelle regioni con alta densità di industrializzazione ed in particolare vicino ai siti di produzione, e lo scarico di acque reflue industriali o le operazioni antincendio sembrano essere i maggiori responsabili dell'esposizione a questi contaminanti nelle aree urbane (Van Asselt et al., 2011).

Questo dati hanno ovviamente destato una notevole preoccupazione riguardo alla persistenza e alla capacità di bioaccumulo di tali composti soprattutto quando il PFOS è risultato essere presente oltre che nella fauna selvatica anche nell'uomo (Haug et al., 2011).

Tra i contaminanti perfluoroalchilici, il PFOS è il composto maggiormente riscontrato negli alimenti e in generale in concentrazioni più elevate rispetto agli altri PFAS (EFSA, 2008).

Per quanto riguarda l'uomo, l'esposizione ai PFAS non è ancora stata completamente chiarita ma tra tutte la principale fonte di esposizione sembra essere la dieta, seguita da altre potenziali vie come l'acqua, l'aria e la polvere (EFSA, 2008).

Le sostanze perfluoroalchiliche sono presenti sia in ambienti urbani con elevata densità di popolazione e industrializzati, sia al contempo in ambienti lontani da attività antropogeniche, come le acque e gli animali delle zone artiche.

I PFAS sono stati ritrovati in varie matrici ambientali ed a livello globale, ma tutt'oggi la loro diffusione ed il loro trasporto verso zone remote come l'Artico non sono ancora chiarite.

In uno studio di Kwok et al. (2013), sono state quantificate le concentrazioni di 17 tipi di PFAS in campioni di nuclei ghiacciati, neve superficiale, acqua di fiume e di mare, tutti

prelevati nella zona di Svalbard, in Norvegia. Il 60% di quest'isola è costituito da ghiacciai, lontani dalle principali fonti di inquinamento da PFAS (ad eccezione delle miniere locali di carbone). Precedenti studi avevano già dimostrato una contaminazione da parte delle aree industrializzate d'Europa attraverso il trasporto di correnti atmosferiche e/o oceaniche.

Concentrazioni relativamente basse di PFAS sono state rinvenute nei ghiacciai. I livelli più elevati di PFOS e PFOA si trovavano negli strati intermedi dei campioni di ghiaccio, rappresentativi del periodo 1999-2000 che coincide con quello di maggiore produzione di tali composti. Le concentrazioni di PFCA (perfluorocarbossilati C8-C12), rilevate sempre in campioni di ghiaccio, sono state minori di quelle rinvenute in studi precedenti in nuclei di ghiaccio dell'Artico canadese, suggerendo dunque una contaminazione minore dell'Artico Europeo.

Differenze significative nei livelli di PFAS sono state osservate analizzando i campioni raccolti in zone via via più lontane dal ghiacciaio, e le concentrazioni maggiori di PFAS (anche fino a tre volte maggiori) sono state registrate nelle zone costiere e nei campioni di neve superficiale ed in acqua di fiume.

L'interpretazione di questi dati ci indica come principale fonte di PFAS per i ghiacciai la degradazione dei precursori volatili (FTOH 08:02 e FTOH 10:02), arrivati probabilmente attraverso un trasporto atmosferico di lungo raggio. Per quanto riguarda invece la contaminazione più a valle dei vari campioni di neve e acque superficiali, la causa è sicuramente la risultante di vari fattori: l'insediamento di diverse attività umane (comprese quelle sciistiche), lo sviluppo industriale dei paesi vicini, così come le fonti locali, le condizioni meteorologiche e i meccanismi di fusione e ricongelamento delle acque.

Analisi future su nuclei di ghiaccio e acque derivanti dai ghiacciai e da nevi superficiali potrebbero essere effettuate per meglio comprendere i meccanismi di diffusione e trasporto globale di questi contaminati (Kwok et al., 2013).

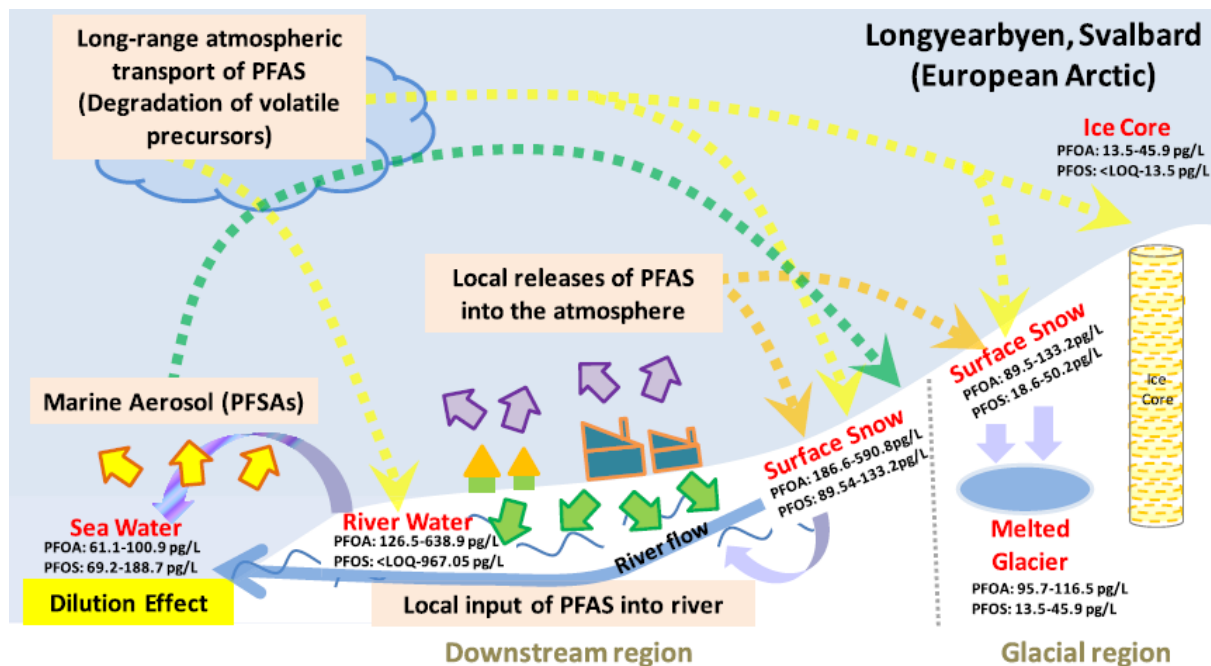


Figura 1.5

Schema delle possibili fonti e diffusione dei PFAS nell'Artico Europeo (Kwok et al., 2013)

1.2.1 Aria

Diversi PFAS sono stati rinvenuti diffusamente a livello ambientale, nell'aria, nel suolo, nei sedimenti, nelle acque superficiali e in quelle potabili.

Quando si valuta la presenza dei PFAS a livello atmosferico, solitamente si fa riferimento ai loro precursori volatili, come gli alcoli dei fluorotelomeri (FTOH) e i perfluoroottanosulfamide etanoli (FOSE). Si tratta infatti di molecole molto meno stabili dei composti perfluoroalchilici, a causa della presenza di un gruppo metilico nella catena, ma altrettanto nocive, se modificate, in seguito a processi di degradazione nell'atmosfera. L'estrema volatilità permette loro una diffusione globale che si aggiunge a quella che avviene anche attraverso le correnti oceaniche (Jahnke et al., 2009; Barber et al., 2007).

La presenza di FTOH e FOSE nell'aria è stata valutata in uno studio di Martin et al. del 2002 nel quale sono stati confrontati i dati ottenuti dal monitoraggio di due località a diverso grado

di urbanizzazione (Toronto e Long Point). I campioni prelevati dalla metropoli sono risultati essere quelli maggiormente contaminati (con concentrazioni da due a tre volte più alte).

In Giappone, invece, sulla base dei risultati di precedenti monitoraggi effettuati sul siero della popolazione locale, Kyoto è risultata essere la città più inquinata e Iwate la zona rurale con il più basso tasso di contaminazione. Uno studio successivo ha confermato questi dati valutando la presenza di alcuni PFAS proprio nell'aria esterna delle suddette cittadine. I valori ottenuti per PFOS e PFOA sono stati, rispettivamente, 262,8 e 5,2 pg/m³ per Kyoto e 0,2 e 0,7 pg/m³ per Iwate (Harada et al., 2005).

Successivamente si è continuato ad indagare sulla presenza dei PFAS in campioni di aria esterna, come in uno studio europeo che mette a confronto campioni di aria prelevati in diverse zone del Regno Unito, Irlanda e Norvegia (Barber et al., 2007). In questo caso il PFOA è risultato essere il composto perfluoroalchilico più abbondante nel particolato, e per quanto riguarda la fase gassosa sono stati rinvenuti principalmente i precursori volatili del PFOA, soprattutto FOET (8:2 fluorotelomero), FHET (6:2 fluorotelomero) e il FDET (10:2 fluorotelomero).

1.2.2 Acqua e suolo

Solitamente i PFAS possono entrare nell'ambiente acquatico a livello dei siti di produzione industriale o di altre fonti antropiche ma quando si parla di contaminazione dell'ambiente acquatico bisogna sempre tener presente che essa può coinvolgere anche le acque destinate al consumo umano.

L'acqua potabile proviene infatti per lo più dalle acque superficiali (laghi, fiumi e ruscelli) e dall'acqua di pozzo (Picò et al., 2011).

Anche se attualmente esistono delle tecniche che permettono di rimuovere tali contaminanti dall'acqua potabile (come l'utilizzo del carbone attivo), tuttavia non sono trattamenti comunemente utilizzati, per cui i monitoraggi delle acque superficiali risultano di fondamentale importanza per la valutazione di un possibile rischio di esposizione legato al consumo dell'acqua potabile (van Asselt et al., 2011).

E' stato condotto uno studio in Germania, dove, nelle acque dei fiumi Moehne, Ruhr e Rhine è stata rilevata la presenza di alcuni PFAS. In particolare il PFOA è risultato il contaminante più abbondante e presente alle più alte concentrazioni rispetto agli altri composti.

I livelli più alti di contaminazione sono stati rilevati nella parte più a monte del fiume Ruhr e nel suo affluente Moehne. Indagini sulle possibili cause dell'inquinamento hanno dimostrato che l'uso diffuso di fertilizzanti, unito ai rifiuti industriali, era stata la fonte della contaminazione delle acque. Successivamente questi dati sono stati supportati anche da ricerche che hanno rilevato elevate concentrazioni di PFAS anche nei campioni di plasma di bambini e adulti della stessa zona (Skutlarek et al., 2006).

In ogni caso la stessa fonte di inquinamento avrebbe potuto contaminare anche i terreni agricoli in diverse regioni della Germania. Per cui è stato effettuato un attento monitoraggio attraverso l'analisi di 916 campioni raccolti nella suddetta zona, che ha indicato livelli di PFAS tra 100 e 500 µg/kg in appena l' 8% dei campioni esaminati, tratte in due zone agricole per le quali i valori hanno superato 1500 µg/kg e che in seguito sono state sanificate. Di contro l'analisi di altrettanti campioni in una zona non contaminata della Germania (Baviera) ha mostrato concentrazioni di PFOS sempre al di sotto di 10 µg/kg.

Purtroppo ad oggi i dati relativi ai livelli di contaminazione del suolo sono piuttosto scarsi, ed è per questo che sarebbe auspicabile effettuare monitoraggi su acque e suolo nella stessa area per riuscire a comprendere meglio le modalità di contaminazione (van Asselt et al., 2011).

Recentemente è stato effettuato uno studio per valutare la persistenza ambientale a lungo termine di PFOS in seguito al rilascio accidentale di schiume antincendio avvenuta nel 2000 nelle vicinanze dell' aeroporto internazionale di Toronto. Sono stati eseguiti nel 2003, 2006 e 2009 diversi campionamenti di acqua, sedimento, pesce e fegato di pesce in varie località limitrofe (tra Etobicoke e Spring Creeks), valutando l'andamento delle concentrazioni di PFOS nel tempo. A distanza di dieci anni dalla contaminazione i livelli di PFOS nei sedimenti sono risultati molto alti, anche se l'impatto maggiore è rimasto localizzato solo ad un'area di Spring Creek, forse a causa dell'azione di diluizione del torrente Etobicoke e della gestione delle acque piovane.

Invece i livelli di PFOS nei campioni prelevati in località situate più a valle di Etobicoke Creek si sono ridotti notevolmente. Probabilmente la diminuzione riflette la riduzione delle fonti di PFOS, dovuta all'interruzione della sua produzione da parte della 3M e all'istituzione di normative sull'utilizzo di PFOS nelle schiume antincendio. Tuttavia nel 2009 i livelli di

PFOS registrati nell'acqua e nel pesce, a monte della stessa, sono risultati da 2 a 10 volte superiori e si pensa che l'impatto ambientale a lungo termine e il fenomeno dell'urbanizzazione siano le concause più probabili (Awad et al., 2011).

Un altro caso è quello del fiume Yodo (situato vicino dell'aeroporto di Osaka, in Giappone), dove nel 2004, le concentrazioni di PFOS hanno raggiunto $0,526 \mu\text{g/L}$, verosimilmente a causa dell'uso di schiume antincendio a base acquosa (AFFF) (van Asselt et al., 2011).

Alcuni studi sono stati condotti nella zona di Singapore per valutare i livelli di PFAS nelle acque (costiere, dei fiumi e vicine agli impianti di trattamento delle acque reflue). Nei campioni prelevati dalle acque di scarico sono state trovate concentrazioni elevate di contaminanti perfluoroalchilici ($0,532 \mu\text{g/L}$ per il PFOS e $1,060 \mu\text{g/L}$ per il PFOA), confermando quindi che le zone di rilascio degli impianti per il trattamento delle acque reflue possono rappresentare la fonte e di conseguenza il punto di accesso dei PFAS nell'oceano (Hu et al., 2011).

Sempre al fine di verificare l'impatto di impianti per la produzione di PFAS a livello ambientale, sono stati raccolti ed analizzati 40 campioni in un tratto del fiume Tennessee nelle vicinanze di un sito produttivo. Le concentrazioni medie trovate per il PFOS sono state significativamente più alte a valle dell'impianto, passando gradualmente da valori di circa $0,030 \mu\text{g/L}$ a $0,110 \mu\text{g/L}$ e confermando quindi che l'accumulo degli scarichi di produzione può essere la causa della contaminazione delle acque superficiali (Hansen e al., 2002).

Spesso le acque di scarico sono quelle utilizzate anche come fertilizzante, ma la loro depurazione non sempre ha dimostrato molta efficacia, per cui le acque reflue risultano essere il principale veicolo di contaminanti perfluoroalchilici nel ciclo dell'acqua, e pertanto responsabili dell'inquinamento dei terreni, delle acque e dell'acqua potabile (Picò et al., 2011).

Numerosi sono gli studi effettuati in Giappone ed altre zone asiatiche riguardo al grado di contaminazione da PFAS dell'acqua potabile. I dati raccolti hanno confermato che i campioni maggiormente contaminati sono quelli prelevati nei pressi di scarichi industriali e acque reflue, con un valore massimo per il PFOS di $0,157 \mu\text{g/L}$ (EFSA, 2008).

I dati raccolti nei Paesi Bassi, Germania, Svezia, Norvegia, Italia e altri Paesi europei hanno mostrato livelli di contaminazione nelle acque di superficie che vanno da $0,00002$ a $0,056 \mu\text{g/L}$ per il PFOS, a da $0,00065$ a $0,057 \mu\text{g/L}$ per il PFOA.

Le concentrazioni più elevate di PFOA sono state ritrovate in campioni prelevati in Germania e nei Paesi Bassi, mentre fiumi e acque di sorgenti alpine italiane sono risultati i meno contaminati.

Sempre in Italia, secondo lo studio di Loos et al. del 2007, le concentrazioni di PFOS a livello dei fiumi alpini erano da non rilevabili a valori di 0,0001 µg/L, mentre nelle acque superficiali del Lago Maggiore la presenza era in un intervallo che andava da 0,0072 a 0,0086 µg/L (EFSA, 2008).

Più in generale però le concentrazioni di PFOS nei campioni di acqua potabile europea sono comprese tra 0,0004 a 0,0097 µg/L e tra 0,001 a 0,004 µg/L per il PFOA (EFSA, 2008), per cui alla luce di quanto riportato finora potremmo dire che l'acqua potabile non rappresenta la fonte principale di esposizione per l'uomo, anche se le concentrazioni elevate riscontrate nelle aree vicine a fonti di contaminazione possono rappresentare un rischio per l'esposizione umana (van Asselt et al., 2011).

In alcuni Paesi sono state stabilite delle linee-guida provvisorie per le concentrazioni di PFOS e PFOA ammissibili nell'acqua potabile (Regno Unito, Baviera e Minnesota) (D'Hollander et al., 2010).

1.2.3 Fauna

I composti perfluoroalchilici sono stati ritrovati in un gran numero di specie animali, come aquila calva, albatros, foche, orso polare e varie specie di pesci. In tutti i campioni di plasma, provenienti da diverse aree geografiche, sia vicine a centri urbani, come la regione dei Grandi Laghi e altre zone costiere e fiumi del Nord America e dell'Europa, sia in aree meno antropizzate, come l'Oceano Pacifico del Nord e il Circolo Polare Artico, è stata rilevata la presenza di PFOS, mentre tutti gli altri composti sono stati osservati con meno frequenza e in concentrazioni minori. Ancora una volta inoltre i valori trovati sono risultati molto più alti nelle specie animali che popolano zone urbane ed industrializzate, piuttosto che zone lontane dall'attività umana. Infine da questo studio è emerso anche che il PFOS era presente a vari livelli di concentrazione nei pesci delle zone monitorate e nei volatili, ma le concentrazioni maggiori sono riferite a visoni, aquile calve, lontre di fiume e orsi polari, per cui tali dati

suggeriscono che questo contaminante tenderebbe ad accumularsi nei livelli di più alti della catena alimentare (Giesy e Kannan, 2001).

Questa tendenza è stata confermata anche da uno studio successivo condotto per valutare la presenza dei PFAS in animali appartenenti all'ecosistema dei Grandi Laghi. E' stato trovato un fattore di bioconcentrazione (BFC) relativo agli invertebrati bentonici circa uguale a 1000, che esprime come il livello di contaminazione di PFOS ritrovato negli animali supera di circa 1000 volte quello dell'acqua circostante. In questi invertebrati sono state rilevate concentrazioni 2-4 volte inferiori rispetto a quelle osservate nei pesci che li predano, che a loro volta sono 10-20 volte inferiori rispetto a quelli rilevati in alcune specie, come coregone e salmone reale, che si trovano nei più alti livelli della catena alimentare. Così come ad esempio nei visoni e nelle aquile i livelli di PFOS erano 5-10 volte più alti rispetto ai pesci di cui si nutrono, mentre per quanto riguarda il PFOA il potenziale di biomagnificazione risulta essere decisamente inferiore (Kannan et al, 2005).

1.3 POSSIBILI FONTI DI ESPOSIZIONE UMANA

I PFAS sono contaminanti ubiquitari data la loro diffusa presenza nell'ambiente, nella fauna selvatica e nell'uomo, ma tutt'ora le possibili fonti di esposizione umana non sono del tutto chiare (EFSA, 2008).

Per produrre stime accurate di una esposizione globale è importante valutare il contributo di ciascuna possibile fonte relativa sia all'ambiente che circonda l'uomo che alla sua vita quotidiana.

Le fonti di esposizione per l'uomo possono comprendere l'ingestione (tramite l'acqua, gli alimenti o il contatto con le labbra), l'inalazione (aria, pulviscolo) e il contatto dermico (maneggiamento di articoli contenenti PFAS), anche se la maggior parte degli studi hanno confermato che la dieta rappresenta la principale fonte d'esposizione.

Come già accennato in precedenza elencando numerosi esempi di studi effettuati su campioni di acqua potabile, si è potuto concludere che la sua contaminazione contribuisce con meno del 16% all'esposizione totale di PFOA ed in quantità ancora minore (circa lo 0,5%) a quella di PFOS (EFSA 2008).

L'ambiente domestico può invece rappresentare un'importante fonte di PFAS. In uno studio effettuato su 41 donne norvegesi sono state valutate diverse vie di esposizione. Oltre ad esaminare informazioni inerenti alla dieta di ciascuna di queste donne, è stata presa in considerazione l'assunzione individuale di PFAS da fonti multiple, valutando le concentrazioni di questi contaminanti nell'aria degli interni e nella polvere presente in casa.

E' stato così osservato che l'ambiente domestico rappresentava fino al 50% dell'apporto totale di PFAS in diverse donne con una correlazione significativa tra le concentrazioni di PFAS nella polvere domestica e i rispettivi livelli sierici (Haug et al. 2011). Alcuni studi dimostrano che i valori medi delle concentrazioni dei composti perfluoroalchilici nella polvere domestica possono variare tra i 39 e i 1200 µg/Kg per il PFOS e tra gli 11 e i 220 µg/Kg per il PFOA.

Il contatto con questi contaminanti inizierebbe quindi già durante le prime fasi di vita mediante l'allattamento e continuerebbe poi tramite l'ingestione di cibo, acqua, polvere. Anche l'ingestione della polvere per contatto con le mani può essere considerata una fonte importante di esposizione ai PFAS specialmente nei bambini, mentre negli adulti avviene molto più frequentemente mediante inalazione (D'Hollander et al., 2010 e Shoeib et al., 2011).

Il contributo totale delle fonti non alimentari per l'esposizione a PFOS è stato stimato inferiore al 2%, mentre per il PFOA potrebbe raggiungere il 50% (prevalentemente per esposizione in ambito domestico), ma per entrambi il contributo di queste vie di esposizione nell'uomo diminuisce nel passaggio dall'infanzia all'età adulta (EFSA 2008).

Nel 2009, uno studio piuttosto completo ha prodotto una serie di dati inerenti al contributo delle varie fonti di esposizione per l'uomo, e sono stati riportati i seguenti valori globali di assunzione media giornaliera: da 0,0016 a 0,0088 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo per il PFOS e da 0,0029 a 0,0126 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo per il PFOA, confermando la dieta come la principale fonte di esposizione e a seguire l'acqua potabile, l'aria degli interni e la polvere domestica. Sono stati stimati in questo caso anche gli apporti medi giornalieri da fonti di esposizione multipla per i precursori volatili che corrispondono a 0,00014 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ per il FTOH e 0,0016 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ per il FOSES (Fromme et al., 2009).

Sarebbe opportuno, dunque, per ottenere dati più rappresentativi di una contaminazione globale, estendere i monitoraggi non solo ad altri prodotti e matrici ma anche ad altri analiti ed ai loro precursori.

La dieta può rappresentare una fonte d'esposizione ai composti perfluoroalchilici anche in maniera indiretta.

Bisogna infatti considerare che anche altri fattori possono determinare il passaggio dei PFAS negli alimenti, come i processi di trasformazione, il contatto con il rivestimento degli imballaggi o quello delle pentole antiaderenti (EFSA, 2012).

Nel 2006 uno studio suggerisce che i PFAS potrebbero entrare nella catena alimentare attraverso la migrazione dal materiale in contatto con l'alimento, come nel caso di cottura in pentole con rivestimento antiaderente o per il confezionamento di alimenti in imballaggi trattati con PFAS (Tittlemier et al., 2006).

La stessa tesi è stata supportata dai dati ottenuti da un'altra ricerca effettuata sugli incarti utilizzati per il confezionamento di popcorn e cioccolato spalmabile, precedentemente trattati con fluorotelomeri, e sulla possibile trasmissione dei PFAS nel cibo. I risultati hanno dimostrato che i composti presenti nell'imballaggio possono emulsionarsi con l'olio presente negli alimenti (Begley et al., 2008).

Nel 2007 invece è stato approfondito da un altro Autore uno studio riguardante la presenza di residui di PFAS nelle pentole antiaderenti, dovuta al loro processo di rivestimento. E' stata

dimostrata non solo la presenza di PFAS, ma anche il loro rilascio in forma volatile durante la cottura e di conseguenza la contaminazione dell'alimento (Sinclair et al., 2007).

L'Agenzia per la sicurezza alimentare francese (AFSSA) ha studiato i potenziali rischi per la salute umana associati alla presenza residua di PFAS nei rivestimenti antiaderenti per il pentolame, concludendo che il rischio per i consumatori può essere considerato trascurabile (EFSA, 2011).

1.3.1 Fonti di esposizione alimentare

La dieta sembra essere la principale fonte di esposizione ai PFAS nella popolazione, ma anche l'impatto relativo delle varie tipologie di alimento non sono ancora state completamente chiarite (Haug et al., 2010).

Così negli ultimi anni una serie di prodotti alimentari sono stati oggetto di indagini in diversi Paesi al fine di stabilire l'eventuale presenza di composti perfluoroalchilici.

In uno studio complessivo sulla dieta effettuato nel Regno Unito sono stati ritrovati PFOS e PFOA solo in alcuni campioni e più nello specifico in alimenti contenenti patate, e la loro assunzione media giornaliera stimata è stata rispettivamente di 0,100 µg/Kg di peso corporeo per il primo e di 0,070 µg/Kg di peso corporeo per il secondo (UK Food Standard Agency, 2006).

In un successivo monitoraggio, condotto sempre nel Regno Unito, sono stati ricercati 11 diversi tipi di composti perfluoroalchilici in 252 campioni di alimenti vari. Il PFOS, il PFOA ed il FOSA sono risultati i composti riscontrati maggiormente (anche se solo in tracce nel 75% dei campioni) e gli alimenti più contaminanti pesci, granchi, fegato e reni, mentre nelle patate sono risultati assenti.

Per cui sulla base dei dati raccolti l'assunzione media giornaliera dei PFAS mediante la dieta, calcolata per gli adulti, corrisponde a 0,020 µg/Kg di peso corporeo (Mortimer et al., 2009).

In un altro studio complessivo sulla dieta canadese sono stati analizzati 54 campioni tra cui pesce, frutti di mare, carne e fast-food e ed è emersa la diffusa e rilevante presenza di PFOS e PFOA, ed è stata calcolata un'introduzione totale di PFAS mediante la dieta di 0,250 µg/giorno (Tittlemier et al., 2007).

In uno studio del 2010 condotto in Cina, sono state misurate le concentrazioni di diversi PFAS in carne, prodotti carnei e uova per stimare le dosi giornaliere assunte con questi alimenti. La carne di pollo è risultata quella con il più alto livello di contaminazione (12,7 µg/Kg), seguita dalla carne di maiale (6,38 µg/Kg), fegato di suino (47 µg/Kg) e carne di manzo (4,43 µg/Kg), mentre le concentrazioni più basse sono state quelle riscontrate nelle uova (0,38- 1,21 µg/Kg) (Zhang et al., 2010).

Sempre in Cina l'analisi di diversi campioni di prodotti ittici pescati e commercializzati ha permesso di individuare la presenza di diversi PFAS, tra i quali il PFOS è risultato essere il più rilevante in termini sia di frequenza (è stato riscontrato in tutti i campioni) che di concentrazione (con il più alto livello di 13,9 ng/g misurato in una partita di canocchie) (Gulkowska et al., 2006).

Altri studi simili sono stati condotti in Spagna (Ericson et al., 2008a), in Norvegia (Rylander et al., 2010; Haug et al., 2010 e 2011), in Germania (Fromme et al., 2007; Schuetze et al., 2010), nei Paesi Bassi (Noorlander et al.; 2011), e in Giappone (Kärman et al., 2009) e tutti gli autori concordano sul fatto che gli alimenti in cui è maggiore la presenza di PFAS e in particolar modo di PFOS, risultano essere i prodotti ittici, come pesce e crostacei.

Tra tutti i contaminanti perfluoroalchilici il PFOS è quello più comunemente ritrovato negli alimenti e alle più alte concentrazioni, ma rimane il fatto che risulta difficile riuscire a definire dei valori univoci e rappresentativi di esposizione globale ai PFAS mediante la dieta. Questo è legato all'estrema variabilità dei risultati presenti in letteratura, e dunque ai diversi siti di monitoraggio così come alle prestazioni dei metodi d'analisi utilizzati. Se a questo aggiungiamo che, la dieta è già di per se una variabile a seconda del Paese e della regione considerate, si deduce quanto sia complicato riuscire ad identificare il contributo dei vari alimenti all'assunzione dei vari contaminanti.

Nel 2008, in Danimarca hanno indicato durante una ricerca la possibile relazione tra le variabili alimentari ed i livelli plasmatici di PFOS di donne gravide, dimostrando l'esistenza di una correlazione positiva tra i livelli di PFOS e l'assunzione di carne rossa, patate, snack e grasso animale (Halldorsson et al., 2008).

Il latte ed i suoi derivati costituiscono parte dell'alimentazione umana e in uno studio condotto nel 2009 dalla U.S. Environmental Protection Agency (US-EPA) si sono riscontrati livelli misurabili di PFAS nei pascoli dell'Alabama, dove per circa un decennio erano stati sparsi liquami sui prati (Renner, 2009).

Sono stati rilevati PFAS anche nei pomodori e nella lattuga coltivata, con concentrazioni maggiori nelle radici rispetto a foglie e frutti (Felizeter et al., 2011). E' dunque molto importante indagare sulle concentrazioni dei contaminanti perfluoroalchilici non solo negli alimenti, ma anche sul loro trasferimento lungo la catena alimentare. Una volta rilasciati nell'ambiente, infatti, queste sostanze possono accumularsi nelle piante e negli animali, interessando anche l'acqua e i mangimi somministrati. Infatti, come già accennato in precedenza alcuni studi hanno dimostrato che i dati riguardanti la presenza dei PFAS nel suolo e nelle coltivazioni sono piuttosto carenti, e che sarebbe opportuno invece implementarli per aver un quadro più chiaro di questi contaminanti nell'ambito della sicurezza alimentare (van Asselt et al., 2011).

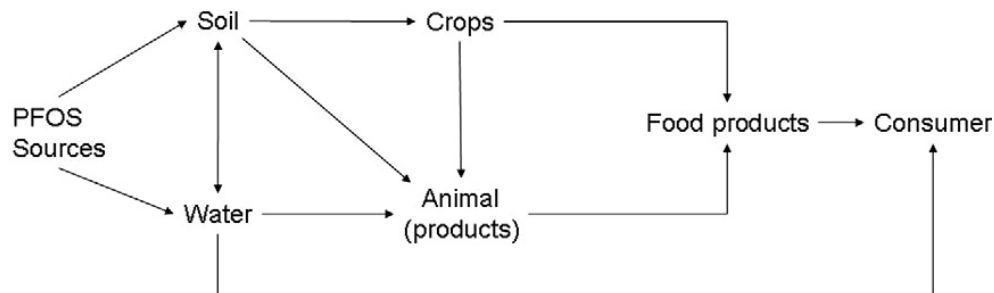


Figura 1.6 *Passaggio del PFOS lungo la catena produttiva alimentare (van Asselt et al., 2011)*

Anche l'EFSA ha confermato che nell'ambito Europeo il PFOS è il composto più frequentemente ritrovato tra i PFAS ricercati negli alimenti e che le tipologie alimentari maggiormente contaminate sono il pesce e i prodotti ittici, seguiti da frutta, e prodotti carnei (EFSA 2012).

Nello studio di Xu et al.(2014), è stato studiato il potenziale bioaccumulo dei PFAS nella catena alimentare del lago Taihu in Cina. Indagando su diversi organismi (passando dal fitoplancton e zooplacton, ai pesci, ai gamberi e alle garzette), i risultati mostrano che tra i 12 PFAS analizzati sia i PFCA (C8 e C12) che il PFOS sono stati rilevati in tutti i campioni biologici, ma con alcune differenze.

In acqua sono stati misurati regolarmente sia PFCA a catena corta (C6-C9) che PFOS, mentre nei sedimenti il PFOS era il composto dominante insieme ai PFCA solo a catena lunga (C11-C12).

E' stato calcolato per i PFCA da 9 a 12 atomi di carbonio un fattore di biomagnificazione (TMF) che va da 2,1 a 3,7 mentre al PFOS è stato assegnato un potenziale di biomagnificazione leggermente inferiore di 2,9 nella stessa catena alimentare.

Più in generale è stato concluso che i valori di contaminazione ritrovati per PFOS e PFOA (inferiori all'unità) non rischiano di provocare un danno immediato per la popolazione locale attraverso il consumo di pesce e gamberi, ma tuttavia anche questi bassi livelli non dovrebbero considerarsi tollerabili tenendo conto del potenziale effetto cancerogeno di alcuni PFAS (Xu et al., 2014).

Qui di seguito tratteremo il latte e il pesce come sotto-sezioni specifiche, essendo le matrici indagate nel presente lavoro e rappresentando alcuni degli alimenti più studiati, destinati al consumo umano, per la valutazione dell'esposizione attraverso la dieta.

Pesce

Pesce e frutti di mare sembrano essere gli alimenti che maggiormente contribuiscono all'assunzione di PFAS, tra i quali il PFOS, oltre ad essere generalmente presente in concentrazione maggiore rispetto al PFOA, ha anche dimostrato la tendenza ad accumularsi con un fattore di bioconcentrazione elevato, soprattutto nel fegato (EFSA, 2008).

Nel 2008 è stato calcolato, dal Panel CONTAM dell'EFSA, che sulla base di tutti i dati disponibili sui prodotti ittici, l'esposizione alimentare giornaliera di PFOS sarebbe di circa 0,060 µg/kg di peso corporeo per la popolazione media, aumentando fino a 0,200 µg/kg di peso corporeo per i grandi consumatori.

Sulla base di questi dati il gruppo di esperti ha suggerito un'esposizione individuale giornaliera al di sotto del TDI (ovvero 0,150 µg/kg di peso corporeo), anche se in soggetti particolarmente esposti si potrebbe eguagliare o addirittura superare questo valore. Per il PFOA invece i valori consigliati sono stati decisamente inferiori, andando da 0,002 a 0,006

µg/kg di peso corporeo come assunzione media giornaliera, e non correlata esclusivamente al consumo di pesce (EFSA, 2008).

In uno studio condotto in Norvegia nel 2010 è stata dimostrata la presenza di PFAS in diversi campioni di cibo e bevande locali, ma i valori maggiori sono stati ritrovati nel merluzzo, nel fegato di merluzzo, nel salmone, nello sgombro in scatola e nella carne.

Questi risultati sono in accordo con i dati raccolti da tutte le ricerche effettuate a livello mondiale, secondo cui è il pesce l'alimento maggiormente contaminato da PFAS.

In Norvegia, in particolar modo, il pesce rappresenta una fonte di esposizione cronica per la popolazione locale, dato il consistente ed abituale consumo di questo alimento (Haug et al., 2010b).

Così lo stesso Autore ha anche cercato di comprendere se esiste o meno una relazione tra il consumo di determinati alimenti (in particolar modo di pesce) e le corrispondenti concentrazioni sieriche di PFAS nell'uomo, monitorando per un periodo di dodici mesi 175 soggetti, attraverso l'uso di una dieta controllata. I dati di questo studio hanno confermato che pesci e crostacei sono gli alimenti maggiormente responsabili delle concentrazioni sieriche di PFAS, contribuendo all'assunzione giornaliera di PFOS e PFOA rispettivamente per il 93% e il 38%.

Questi dati confermano quelli già ottenuti precedentemente da altri Autori, Bakke et al. (2008) e Fjeld et al. (2005), per i quali fegato di pesce e gamberetti sono gli alimenti con i livelli più alti di PFAS (Haug et al., 2010).

Le concentrazioni sieriche di PFAS sembrano essere influenzate anche da altri fattori come l'età del soggetto e la zona di residenza: i dati dimostrano infatti che i valori sono maggiori all'aumentare dell'età del soggetto e negli abitanti delle zone costiere, probabilmente per il consumo di pesce pescato in acque contaminate (Haug et al., 2010).

Alcuni studi precedenti avevano già provato a suggerire la dieta come principale via di esposizione, senza riuscire a dimostrare però la presenza di una correlazione tra l'assunzione di PFAS attraverso la dieta e le concentrazioni sieriche, sicuramente per il limitato periodo di osservazione (Fromme et al., 2007; Kärman et al., 2009).

Più in generale nel recente passato un vasto numero di studi sono stati effettuati per valutare la contaminazione di PFAS nei prodotti ittici.

Nel 2011 è stato eseguito un monitoraggio su pesce e frutti di mare nella regione della Catalogna, dimostrando la presenza di PFOS (come composto predominante, circa il 73% del

totale) e PFOA in questi alimenti. Sulla base dei risultati ottenuti è stato poi stimato un apporto medio dietetico di PFAS, per gli adulti che vivono in quella zona, di circa 0,097 µg/giorno, in gran parte dovuti al consumo di sardine e triglie (Domingo et al., 2011).

Nel recentissimo lavoro di Hloušková et al. (2013) sono stati analizzati 48 campioni di pesce collezionati in località vicine ai più importanti fiumi e affluenti della Repubblica Ceca, e lungo alcuni dei quali sorgono importanti zone industriali. Sono stati raccolti nell'autunno del 2010 per indagare la presenza e le concentrazioni di vari gruppi di composti alogenati (compresi i PFAS), anche in zone altamente industrializzate.

Dei 25 PFAS analizzati, tra gli analiti più frequentemente riscontrati sono presenti le forme sia lineare che ramificata di PFOS (ritrovato in tutti i campioni, 100%), seguite da PFDA (99%) e PFDoA(83%), mentre il PFOA è risultato presente in pochissimi campioni. Il PFOS non solo è risultato il composto più abbondante e presente nel tessuto muscolare dei pesci analizzati, ma è stato trovato anche alle più alte concentrazioni, comprese tra 0,1 e 842 µg/Kg (mediana 5,59 µg/Kg) nei pressi di una zona altamente industrializzata.

Nelle altre località monitorate sono state ritrovate concentrazioni più basse di PFAS (0,15-40,9 µg/Kg. Più in generale dai profili di PFAS nelle varie specie ittiche (anche se il numero di campione per specie era limitato) è stato osservato che la contaminazione nelle specie carnivore supera quella delle specie onnivore (Hloušková et al., 2013).

Anche in un monitoraggio multi-sito di varie specie ittiche allevate in Europa, Sud-Est Asiatico e Sud America le concentrazioni misurate di PFAS, sono risultate sensibilmente superiori nei pesci rispetto ai gamberetti, e nelle specie carnivore (trota e salmone) piuttosto che in quelle onnivore. Si è visto anche che i salmoni e le trote d'allevamento presentavano livelli di contaminazione maggiore rispetto ai pesci marini selvatici, mentre per quanto riguarda gamberetti, tilapie e pangasi d'allevamento le concentrazioni erano inferiori. Secondo gli Autori il salmone è risultato responsabile per il 97% dell'esposizione umana a tali contaminanti (van Leeuwen et al., 2009).

Nel 2009 in Italia è stato effettuato un monitoraggio per valutare la presenza di PFOS e PFOA in alcuni prodotti ittici del Mar Mediterraneo. In generale i valori riscontrati relativi alla presenza di PFOS e PFOA sono stati piuttosto bassi, tranne che per alcuni campioni di pesce che hanno raggiunto livelli di contaminazione più alti (431 µg/Kg).

Dalle analisi di tessuto muscolare ed epatico è emerso che i livelli di contaminazione erano molto più elevati nel fegato (fino a 10 volte maggiori), con valori che non superavano i 6 µg/Kg per entrambi i contaminanti (Nania et al., 2009).

Secondo L'EFSA le quantità maggiori di contaminanti si trovano nei visceri del pesce, ma elevate concentrazioni possono essere rilevate, a livelli inferiori, anche nel muscolo. Allo stesso modo il discorso è applicabile a crostacei e molluschi, anche se i dati a riguardo sono decisamente inferiori (EFSA, 2011).

Latte

Latte e latticini sono componenti importanti della dieta sia per gli adulti che per i bambini, mentre il latte materno costituisce l'unica fonte di nutrimento per i neonati.

In vari studi è stata evidenziata la presenza di PFAS in latte e derivati (Wang et al., 2010; Ericson et al., 2008; Tittlemier et al., 2006), e del PFOS come il contaminante con la più alta affinità per albumina e β-lattoglobulina.

In un monitoraggio effettuato dall'EFSA nel 2008 e 2009 sono stati analizzati 121 campioni di latte, 87 di latte fermentato e 43 di formaggio ed è stata osservata una contaminazione da PFOS solo in 2 campioni, su 18, di latte di pecora, con concentrazioni di 0,140 e 0,260 µg/L (LOQ 0,020 µg/L). E' stato però specificato che si trattava di campioni di latte provenienti da animali che pascolavano nei pressi di uno stabilimento industriale (EFSA, 2011).

Nel sondaggio condotto da Ericson et al., sono stati monitorati anche latte e prodotti lattiero-caseari (latte intero, latte parzialmente scremato, formaggi, yogurt, crema e crema al caramello). Il PFOS è stato ritrovato nella maggior parte dei prodotti lattiero-caseari con una concentrazione di 0,121 µg/L mentre il PFOA è stato rilevato in 2 campioni di latte intero a livelli medi (0,056 µg/L) e a livelli inferiori negli altri campioni. Sulla base dei dati raccolti è stata stimata un'assunzione media giornaliera di PFOS per la popolazione locale che va da 0,0013 a 0,0037 µg/giorno per il latte e da 0,0084 a 0,0165 µg/giorno per i latticini, tenendo sempre in considerazione l'età e il sesso dei soggetti (Ericson et al., 2008).

Nel monitoraggio già precedentemente citato, condotto in Norvegia, Haug et al. (2010) hanno anche analizzato alcuni campioni di latte e derivati. Le concentrazioni ritrovate di PFOS e PFOA sono state rispettivamente di 0,007 µg/Kg e 0,005 pg/g nel latte, e di 0,013 µg/Kg e

0,000012 µg/Kg nel formaggio. E' stato stimato un apporto totale di PFAS attraverso latte e latticini, pari a 0,0047 µg/giorno per il PFOS e a 0,0044 µg/giorno per il PFOA (Haug et al., 2010).

Anche se i dati disponibili sul latte scarseggiano, sembrerebbe comunque che questo alimento possa essere una possibile fonte di esposizione per l'uomo, e considerando che il suo consumo, in particolare durante l'infanzia, risulta importante la valutazione del rischio di esposizione nei neonati allattati al seno, per i quali il latte materno può rappresentare la maggiore fonte di PFAS (Haug et al., 2011).

Nello studio di Antignac et al.(2013), è stata valutata la presenza di 14 sostanze perfluoroalchiliche in 48 campioni di latte materno raccolto da donne francesi nello studio pilota ELFE.

PFOS, PFOA e PFHxS sono stati rilevati e quantificati in quasi tutti i campioni analizzati e sono quindi risultati i composti più importanti per l'esposizione totale ai PFAS (contribuiscono all'esposizione rispettivamente con il 38%, 37%, e 25%).

I livelli di concentrazione misurati variano da < 0,05 a 0,33 µg/L per il PFOS (mediana = 0,079), da < 0,05 a 0,22 µg/L per il PFOA (mediana = 0,075) e da 0,04 a 0,07 µg/L per il PFHxS (mediana = 0,050).

Nonostante il numero esiguo di campioni di latte materno analizzati, i profili di contaminazione osservati sono in accordo con i risultati di studi simili condotti a livello europeo ed internazionale (Antignac et al., 2013).

Reference	Population (Country)	Number of samples	PFOS ($\mu\text{g/L}$)	PFOA ($\mu\text{g/L}$)	PFHxS ($\mu\text{g/L}$)
Fujii et al. (2012)	Japan	28	n.d.	0.089 (<0.040–0.194)	n.d.
	Korea	24	n.d.	0.062 (<0.040–0.173)	n.d.
	China	19	n.d.	0.051 (<0.040–0.122)	n.d.
Haug et al. (2011)	Norway	19	0.087 (0.040–0.250)	0.025 (<0.018–0.830)	n.d.
Kadar et al. (2011)	France	30	0.074 (0.024–0.171)	0.057 (0.018–0.102)	n.d.
Kim et al. (2011)a,b	Korea	35	0.06 (n.a.)	0.05 (n.a.)	n.d.
Karman et al. (2010)	Spain	10	0.11 (0.070–0.220)	n.d. (0.070–0.220)	n.d.
Liu et al. (2010a)	China	24 (pools)	0.049 (0.006–0.137)	0.034 (<LOD–0.814)	n.d.
Llorca et al. (2010)	Spain	20	0.084 (0.028–0.865)	n.d.	n.d.
Roosens et al. (2010)	Belgium	22 (pools)	2.9 (<0.400–28.2)	0.3 (<0.300–3.50)	n.d.
Bernsmann and Fürst (2008)	Germany	203	0.082 (0.050–0.284)	0.09 (0.025–0.610)	n.d.
Tao et al. (2008)	USA	45	0.106 (<0.032–0.617)	0.036 (<0.030–0.161)	0.012 (<0.012–0.064)
	Cambodgia	24	0.04 (0.017–0.327)	n.d.	n.d.
	Vietnam	40	0.058 (0.017–0.393)	n.d.	0.004 (<0.002–0.027)
	Indonesia	20	0.067 (0.025–0.256)	n.d.	0.013 (<0.002–0.059)
	Philippines	24	0.104 (0.027–0.208)	n.d.	0.007 (<0.002–0.013)
	Malaysia	13	0.111 (0.049–0.350)	n.d.	n.d.
	India	39	0.039 (<0.011–0.120)	n.d.	n.d.
	Japan	24	0.196 (0.140–0.523)	0.078 (<0.042–0.170)	0.0006 (<0.002–0.018)
	Völkel et al. (2008)	Germany (Munich)	19	0.113 (0.028–0.239)	n.d.
Germany (Leipzig)		38	0.123 (0.033–0.309)	n.d.	n.d.
Hungary		13	0.33 (0.096–0.639)	n.d.	n.d.
Karman et al. (2007)	Sweden	12	0.166 (0.060–0.470)	n.a. (<0.209–0.492)	0.07 (0.031–0.172)
Nakata et al. (2007)	Japan	51	n.d. (0.008–0.401)	n.d. (<LOD–0.339)	n.d. (<LOD–0.025)
So et al. (2006)	China	19	0.100 (0.045–0.360)	0.11 (0.047–0.210)	0.011 (0.004–0.100)

Figura 1.7 Panoramica dei livelli di concentrazione di PFOS, PFOA e PFHxS (valori mediani e range in $\mu\text{g/L}$) determinati nel latte materno e riportati in letteratura (Antignac et al., 2013).

Un discorso a parte merita dunque il consumo di latte nei bambini e soprattutto nei neonati allattati al seno, la cui fonte di nutrimento principale è il latte materno. Inoltre i neonati saranno sicuramente più esposti anche a livelli più elevati di contaminazione rispetto agli adulti in rapporto al peso corporeo. Diversi lavori hanno dimostrato la presenza di vari PFAS anche nel siero e nel latte materno, riportando però livelli di PFOS nel latte anche di 100 volte inferiori rispetto al sangue (Kärman et al., 2007).

Anche se il meccanismo attraverso il quale i composti perfluoroalchilici si trasferiscono dal sangue al latte materno non sono ancora ben noti, è verosimile pensare di ritrovare concentrazioni inferiori di PFAS nel latte rispetto al sangue. Il latte materno contiene infatti 9-11 g di proteine/L (maggiormente lattealbumina e caseina), mentre il plasma ne contiene 35-50 g/L (albumine) (Völkel et al., 2008; Fromme et al., 2009).

I PFAS potrebbero ad ogni modo essere trasmessi alla prole sia per via transplacentare che attraverso l'allattamento, sollevando di conseguenza non poche preoccupazioni sulla salute del feto o del neonato.

Kärman et al. (2007) ha analizzato i livelli di PFAS nel latte e nel siero materno raccolti da 12 primipare svedesi. Il PFOS è risultato presente in tutti i campioni di latte con concentrazioni

comprese tra i 0,060 e i 0,470 µg/L, mostrando una correlazione positiva con i rispettivi valori misurati nel siero (mediana 0,166 µg/L), mentre il PFOA è stato rilevato solo in pochi campioni. La stima calcolata dell'assunzione totale di PFAS attraverso l'allattamento è stata di circa 200 ng/giorno (Kärman et al., 2007).

Nello studio effettuato da Fromme et al. (2010), sono stati raccolti ed analizzati circa 200 campioni di latte materno di donne tedesche, durante i primi 5 mesi di vita dei neonati. L'indagine sulla presenza dei PFAS ha evidenziato che il PFOS è il composto rilevato con la frequenza più alta (72%) e a concentrazioni comprese tra i 0,030 e i 0,110 µg/L, mentre il PFOA è stato ritrovato con una frequenza solo del 2%, con concentrazioni massime di 0,025 µg/L (Fromme et al., 2010).

Tao et al. (2008), misurando le concentrazioni di alcuni PFAS in 45 campioni di latte materno provenienti dal Massachusetts, ha riscontrato livelli medi di PFOS e PFOA rispettivamente di 0,131 e 0,438 µg/L. Inoltre dal confronto tra il rapporto PFOS/PFOA (ricavato dall'analisi dei suddetti campioni) e quello riportato per il siero umano della popolazione femminile statunitense, gli Autori suggeriscono che il PFOA abbia un trasferimento preferenziale nel latte rispetto al PFOS, e che le concentrazioni maggiori di PFOA provengano da campioni di latte appartenenti a donne primipare (Tao et al., 2008).

Alcuni Autori hanno anche studiato l'andamento delle concentrazioni di PFAS nel latte durante l'allattamento. È stato osservato che le concentrazioni di PFOS e PFOA nel latte sono diminuite notevolmente durante i 12 mesi di allattamento al seno (Thomsen et al., 2010) e che anche i livelli di PFAS nel siero si sono ridotti dopo un periodo di allattamento al seno superiore ai 4 mesi (Haug et al., 2010b).

Si deduce che l'esposizione post-natale a questi inquinanti potrebbe avere un impatto sulla salute e sarebbe dunque auspicabile avere il maggior numero di informazioni a riguardo per valutare i rischi derivanti da allattamento per i neonati.

1.3.2 Valutazione dell'esposizione umana

Anche se la dieta rappresenta la fonte di esposizione principale ai contaminanti perfluoroalchilici, per avere una stima esatta del grado di esposizione umana, bisognerebbe poter monitorare l'alimento indagato lungo tutta la catena alimentare, e considerare poi come e in che misura le altre fonti di esposizione possono contribuire alla contaminazione totale del soggetto.

Dato il crescente interesse della comunità scientifica verso la diffusione globale dei composti perfluoroalchilici e dei relativi rischi per la salute, sono stati condotti diversi studi per valutare l'esposizione umana ai composti perfluoroalchilici, misurando il grado di contaminazione presente a livello di sangue, plasma o siero.

Molti Autori hanno dimostrato correlazioni tra i valori di assunzione di PFAS tramite la dieta, calcolate attraverso modelli tossicocinetici, ed i rispettivi livelli ematici, ed alcuni hanno anche cercato di stabilire differenze legate al sesso o all'età dei soggetti. In diversi lavori è emerso che le concentrazioni maggiori di PFAS sono state rinvenute negli uomini piuttosto che nelle donne, ma tuttora non esistono dati sufficienti a riguardo che possano confermarlo (Midash et al., 2006; Fromme et al., 2007b; Kärman et al., 2004 ed Ericson et al., 2007), mentre non sono state trovate significative tendenze legate all'età dei soggetti.

In uno studio effettuato di recente da Christa Schröter-Kermani et al., è stata valutata la presenza di sostanze perfluoroalchiliche in campioni di plasma (n=258, età 20-29) del periodo di osservazione 1982-2010, archiviati presso la "Environmental Specimen Bank" tedesca, per valutare l'andamento dell'esposizione umana ai PFAS dopo le restrizioni attuate nei confronti di questi contaminanti.

I composti rilevati con maggiore frequenza sono stati PFOS, PFOA e PFHxS.

Concentrazioni di PFOS, PFOA sono state riscontrate in tutti i campioni indagati nei rispettivi range di 1,9-102,9 µg/L e di 0,8-15,4 µg/L, mentre il PFHxS è stato ritrovato in 254 campioni su 258.

Per quanto riguarda l'andamento espositivo nel tempo, sono state calcolate concentrazioni medie e mediane ed è emerso che sia per il PFOS che per il PFOA questi valori sono fortemente aumentati nel periodo che andava dal 1982 al 1986. Poi per il PFOS sono iniziati a diminuire nel corso degli anni fino ad avere un netto calo tra il 2001 ed il 2010, mentre per il

PFOA dopo l'86 si sono registrate concentrazioni medie che oscillavano tra i 4,8 e i 6,3 µg/L, poi una diminuzione nel 2008 per ottenere i valori più bassi nel 2010.

Per quanto riguarda le concentrazioni di PHFxS i dati suggeriscono un aumento costante tra il 1982 e il 2001, quando i valori hanno cominciato a diminuire, per arrivare al 2010 a livelli di circa il 20% inferiori rispetto agli anni '80.

Sono state osservate correlazioni positive tra i livelli di PFAS e il sesso dei soggetti analizzati. Le concentrazioni più elevate di PFOS, PFOA e PFHxS sono state rilevate nel plasma maschile.

I risultati di questo studio, relativi al periodo 2007-2009, sono paragonabili a recenti studi internazionali simili (Italia, Grecia, Canada, Stati Uniti ed Australia), effettuati con metodiche analitiche ottimizzate, secondo i quali, i range delle concentrazioni medie per PFOS e PFOA nel suddetto biennio, sono stati rispettivamente di 5-15 µg/L e 2-5 µg/L (Schröter-Kermani et al., 2013).

Alcuni lavori suggeriscono anche possibili correlazioni tra i livelli sierici di PFOA e PFOS ed il luogo d'origine del donatore, ma anche queste differenze sono difficili da stabilire, perché potrebbero essere dovute a differenze etniche o ad una combinazione di fattori, tra cui lo stile di vita e la dieta (Fromme et al., 2009; EFSA, 2008).

La maggior parte degli Autori, sulla base dei risultati ottenuti dai vari monitoraggi effettuati per valutare la presenza di composti perfluoroalchilici nel sangue, siero o plasma, concordano invece sul fatto che, il PFOS risulta essere il composto predominante e rinvenuto alle più alte concentrazioni rispetto agli altri PFAS, seguito dal PFOA nella maggior parte dei casi (Kannan et al., 2004; Falandysz et al., 2006; Haug et al., 2010b).

Nel 2012 Cornelis et al. hanno valutato il livello di esposizione della popolazione ai PFAS tramite la dieta, concludendo che i valori trovati negli adulti (0,0242 µg/kg al giorno per il PFOS e 0,0061 µg/kg al giorno per il PFOA) risultavano triplicati nei bambini (Cornelis et al., 2012).

Anche secondo l'EFSA la classe di età più esposta a contaminazione da PFAS, tramite la dieta, sono i bambini, ed il contributo maggiore è dato da latte, prodotti caseari e acqua di bevanda.

Sempre secondo l'EFSA le stime di esposizione alimentare relative al consumo di prodotti ittici sarebbero inferiori, in alcuni casi anche di circa trenta volte, rispetto a quelle calcolate nel 2008. Questo sembrerebbe dipendere, oltre che da un numero limitato di nuovi risultati

inerenti a questo alimento, anche dalle metodiche analitiche più o meno sensibili utilizzate durante le varie ricerche. Ciò porterebbe di conseguenza a notevoli differenze nei valori delle concentrazioni medie di PFOS e PFOA utilizzate per il calcolo dell'esposizione giornaliera (EFSA, 2012).

1.4 TOSSICITÀ

Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi per approfondire la conoscenza sui possibili effetti tossici causati dai composti perfluoroalchilici. Quasi tutte le informazioni disponibili riguardo al PFOS e al PFOA confermano la loro capacità di bioaccumulo principalmente a livello epatico e nel sangue e la loro lunga emivita nell'organismo.

Vengono segnalati come composti dagli effetti immunotossici ed epatotossici e dai possibili effetti negativi sul sistema respiratorio, nervoso e riproduttivo e con potenziale genotossico e cancerogeno (OCSE, 2002; EFSA, 2011). E' stata sottolineata anche la loro capacità di causare alterazioni ormonali e nello sviluppo (van Asselt et al., 2011).

Numerosi studi sui loro effetti avversi sono stati condotti principalmente sui ratti e in minor misura anche su conigli e primati non umani. Ma l'esposizione a questi ed altri inquinanti ambientali sembra aver raggiunto anche alcuni animali del Circolo Polare Artico, come orsi polari, cani da slitta e volpi artiche, dimostrando anche l'ubiquitarietà dei PFAS a livello ambientale (Sonne, 2010).

L'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) ha pubblicato, nel 2002, una valutazione del rischio sul PFOS ed i suoi sali, classificandolo come inquinante persistente ed in grado di bioaccumularsi, e con un potenziale tossico verso i mammiferi. E' stato quindi fissato anche un valore di NOAEL (Dose osservabile senza effetto avverso) di 100µg/Kg/giorno stabilito sulla base dei risultati di uno studio di due generazioni di ratti (OCSE, 2002).

Nel 2003 l'Agenzia per la Protezione Ambientale Statunitense (U.S. EPA) si è invece espressa sui possibili effetti tossici connessi all'esposizione del PFOA e dei suoi sali, stabilendo una NOAEL di 3000 e 10000 µg/Kg/giorno rispettivamente per maschi e femmine (U.S. EPA, 2003).

Sulla base di ulteriori studi e dati disponibili, nel 2008, l'EFSA ha proposto nuovi valori di NOAEL, più bassi, sia per il PFOS che per il PFOA (rispettivamente di 30 e 60 µg/Kg di peso corporeo/giorno), ritenendo improbabile la comparsa di effetti nocivi nella popolazione in seguito all'esposizione ai PFAS. Ha stabilito inoltre una TDI (Tolerable Daily Intake), di 0,15 µg/Kg di peso corporeo per il PFOS e di 1,5 µg/Kg di peso corporeo per il PFOA, affermando che l'esposizione della popolazione per via alimentare ai PFAS risulta inferiore alle TDI (EFSA, 2008).

Secondo Haug et al. (2010b) l'esposizione alimentare al PFOS e al PFOA risulterebbe essere addirittura rispettivamente 100 e 2500 volte inferiore rispetto alle suddette TDI. Occorre comunque tener presente che i livelli di esposizione possono aumentare nei soggetti che consumano elevate quantità di prodotti ittici e che occorre valutare anche il contributo delle fonti non alimentari (Haug et al., 2010b). L'EFSA definisce infatti le sue valutazioni sui contaminanti perfluoroalchilici solo parziali, raccomandando la raccolta di ulteriori dati relativi alla presenza dei PFAS negli alimenti e nell'uomo, per poterne monitorare meglio le tendenze espositive (EFSA, 2008).

L'Istituto federale tedesco per la valutazione dei rischi (BfR) ha definito molto bassa la possibilità di esposizione dell'uomo ai PFAS tramite la dieta e ha proposto una TDI provvisoria di 0,100 µg/Kg di peso corporeo per entrambi i composti (BfR, 2010).

Il Comitato britannico sulla tossicità delle sostanze chimiche negli alimenti, nei prodotti di consumo e nell'ambiente, sulla base degli effetti tossici rinvenuti a livello di fegato, sangue, rene e sistema immunitario ha consigliato una TDI di 3 µg/kg di peso corporeo per il PFOA e di 0,3 µg/kg di peso corporeo per il PFOS (Committee on Toxicity, 2009 e 2010).

Nello studio di Fromme et al. (2007a) è stata valutata l'assunzione giornaliera totale di PFOS e PFOA, considerando anche tutte le possibili vie d'esposizione. I valori trovati erano inferiori alle TDI consigliate, almeno per quanto riguarda gli adulti, mentre il profilo dei bambini non è ancora ben definito.

Anche secondo l'EFSA sarebbero i bambini i soggetti maggiormente esposti alla possibile contaminazione da PFAS tramite la dieta (principalmente attraverso il latte, l'acqua e i prodotti lattiero-caseari) (EFSA, 2012).

1.4.1 Tossicocinetica

1.4.1.1 Tossicocinetica negli animali

Sono stati condotti diversi studi per valutare la cinetica di questi composti nei ratti, alcuni dei quali hanno previsto la somministrazione orale di molecole radioattive marcate di PFOS e PFOA.

PFOS

Per quanto riguarda il PFOS, i risultati hanno dimostrato che, dopo 48ore, circa il 5% della radioattività è stata trovata nelle feci e nell'intestino, supponendo che il restante 95% sia stato assorbito. Dopo 89 giorni sono state misurate le concentrazioni di PFOS, e livelli significativi di accumulo sono stati ritrovati nel fegato e nel plasma, mentre quantitativi nettamente inferiori sono state rilevate nei polmoni, nei reni o altri tessuti.

Il PFOS viene eliminato soprattutto per via renale e parzialmente attraverso le feci e la l'emivita stimata è di circa 90 giorni nei ratti (in ratti maschi, dopo una singola dose orale) e di circa 200 giorni nelle scimmie (dopo una somministrazione di alimento contaminato di 183 giorni) (OCSE, 2002, EFSA, 2008).

In un altro studio è stato osservato che il PFOS, dopo somministrazione orale, viene assorbito rapidamente e ha la tendenza ad accumularsi, se somministrato ripetutamente. Non viene metabolizzato, e i valori sierici sono risultati maggiori nei ratti femmina rispetto ai maschi, mentre le concentrazioni epatiche non differivano in base al sesso (Seacat et al., 2003).

Il PFOS non viene metabolizzato e dopo l'assorbimento si lega alle proteine sieriche (soprattutto albumina) e si distribuisce nel siero e nel fegato, a differenza dei suoi precursori N-MeFOSE e N-EtFOSE che sembrerebbero essere metabolizzati a PFOS (3M, 1999).

Altri studi nei roditori, hanno dimostrato che il PFOS può attraversare la placenta e raggiungere il feto, e anche qui localizzarsi a livello epatico, arrivando anche a concentrazioni pari al 50 % di quelle ritrovate nel fegato materno (EFSA 2008).

PFOA

Anche per quanto riguarda il PFOA è stato dimostrato nei ratti, un assorbimento quasi totale (93%), dopo 24 ore dalla somministrazione di una singola dose orale di molecola radioattiva marcata. Analogamente al PFOS si distribuisce principalmente nel siero, per la sua alta capacità di legare l'albumina, e nel fegato, vista la sua affinità per le proteine leganti acidi grassi.

Il PFOA non viene metabolizzato e ha la tendenza all'accumulo (EFSA, 2008).

Anche il PFOA può attraversare barriera placentare e raggiungere il feto, dove si localizza a livello epatico, ed è stato dimostrato anche un trasferimento al bambino attraverso l'allattamento, con livelli di PFOA nel latte corrispondenti a circa il 10% delle concentrazioni plasmatiche (Hinderliter et al., 2005).

L'eliminazione nei ratti avviene principalmente per via renale, e solo in minor misura attraverso le feci; inoltre l'escrezione urinaria sembra essere la più importante via di eliminazione solo nei ratti femmina (EFSA, 2008).

L'emivita stimata nei ratti femmina risulta inferiore alle 24 ore, mentre nei ratti maschi è di circa 15 giorni e questa differenza si basa probabilmente su meccanismi di secrezione ormono-dipendenti.

In uno studio effettuato sulle scimmie, alimentate per 26 settimane con una dieta arricchita di PFOA, l'emivita stimata è stata di circa 30 giorni per le scimmie femmina e di 21 per le scimmie maschio (EFSA, 2008).

1.4.1.2 Tossicocinetica nell'uomo

Le informazioni inerenti alla tossicocinetica dei PFAS nell'uomo, non sono tante, ma suggeriscono che questi vengono assorbiti bene dopo esposizione orale e si ritrovano principalmente nel fegato, nel sangue e nei reni. Non vengono metabolizzati, e sono stati rilevati nel sangue umano, legati a proteine plasmatiche, quali albumine, e in minor misura anche a beta-lipoproteine e globuline (OCSE, 2002; EFSA, 2011).

Anche nell'uomo è stato segnalato un passaggio di PFOS e PFOA attraverso la placenta ed il bio-accumulo fetale (EFSA, 2008).

L'eliminazione renale di entrambi i composti può considerarsi trascurabile negli esseri umani, mentre i risultati degli studi relativi all'emivita nell'organismo sono stati molto variabili.

Secondo l'EFSA la stima più attendibile, come tempo di emivita di questi composti nell'organismo umano, è per il PFOS, quella proposta da Olsen et al., che suggerisce un valore di 5,44 anni (Olsen et al., 2007b), e per il PFOA di 4,37 anni (EFSA, 2008).

1.4.2 Meccanismo d'azione dei PFAS

Nonostante i meccanismi attraverso i quali i PFAS generano effetti tossici non siano ancora ben noti, i principali effetti avversi riscontrati riguardano la proliferazione dei perossisomi e la variazione dell'attività enzimatica.

Sembra che i PFAS possano interferire con il metabolismo lipidico a livello dei perossisomi, facendo aumentare la β -ossidazione, probabilmente a causa della loro struttura chimica che risulta essere molto simile a quella degli acidi grassi endogeni.

È stato anche dimostrato che possono alterare l'attività di alcuni enzimi a livello epatico, come l'acetil-CoA ossidasi e deidrogenasi, con conseguente diminuzione della quantità di trigliceridi e colesterolo nel circolo sanguigno, formazione di perossido d'idrogeno e danno ossidativo al DNA (Hu et al., 2005; EFSA, 2008).

L'esposizione al PFOS può determinare danni fisici alle membrane cellulari sia in vivo che in vitro (Hu et al., 2002) e insieme al PFOA sembra possano agire sul sistema endocrino, andando a modulare i livelli ormonali, con aumento dei livelli di estradiolo e diminuzione di

quelli di testosterone. In alcuni studi su colture cellulari i PFAS hanno mostrato anche effetti estrogenici (Jensen e Leffers, 2008).

Non è stata riportata alcuna genotossicità né in vivo né in vitro, per cui il loro potenziale cancerogeno potrebbe essere legato ad un meccanismo indiretto (EFSA, 2008).

Un altro meccanismo d'azione dei PFAS riguarda l'attivazione dei recettori PPAR-alfa (peroxisome proliferator-activated receptors alpha), ovvero fattori di trascrizione ligando-dipendenti che regolano l'espressione genica e di conseguenza il metabolismo dei lipidi, l'omeostasi del glucosio e anche, proliferazione e differenziamento cellulare. In alcuni studi l'esposizione degli animali a questi contaminanti ha portato anche alla produzione di citochine, sintesi di anticorpi e risposta infiammatoria alterata. Tuttavia alcuni di questi effetti avversi sembrano essere indipendenti dall'attivazione dei PPAR-alfa (Shipley et al., 2004; De Witt et al., 2009).

1.4.3 EFFETTI TOSSICI

1.4.3.1 Effetti tossici negli animali

Le sperimentazioni effettuate su animali, soprattutto roditori, hanno dimostrato il potenziale tossico di queste sostanze.

Sia il PFOS che il PFOA hanno evidenziato moderata tossicità acuta dopo somministrazione per via orale o inalatoria. Il valore di dose letale (DL50, ovvero la dose in grado di provocare la morte nella metà dei soggetti trattati), calcolato dopo la somministrazione di una singola dose di PFOS mediante sonda gastrica, è stato di 251 e 271 mg/Kg di peso corporeo, rispettivamente per femmine e maschi di ratto. Mentre per il PFOA è stata calcolata una DL50 orale, compreso nel range di 250 -500 mg/Kg di peso corporeo per i ratti femmina e superiore a 500 mg/Kg di peso corporeo per i ratti maschi (OCSE, 2002; EFSA, 2008).

L'esposizione per via inalatoria al PFOS somministrata nei ratti mediante polvere, con un meccanismo ad aria secca, ha evidenziato una concentrazione letale (CL 50) di 5,2 mg/L, generando altri segni di tossicità quali: dimagrimento, deficit respiratori, secrezioni nasali.

Il PFOA è stato invece somministrato via aerosol e dopo 4 ore di inalazione, in ratti maschi, la CL 50 era pari a 980 ng/m³ d'aria (EFSA, 2008).

In questo caso si è notato un aumento di dimensione del fegato ed opacità delle cornee. Inoltre se ripetuto nel tempo (circa 10 giorni) ha portato anche ad un aumento del peso del fegato.

Da alcuni studi effettuati su ratti e macachi è emerso che, in generale, l'esposizione prolungata (molte settimane) ai PFAS, può provocare effetti tossici cronici soprattutto a livello epatico e determinare alterazioni biochimiche associate al metabolismo lipidico. Nei ratti è stato osservato un aumento del peso nel fegato e una riduzione del peso corporeo e dei valori sierici di colesterolo e trigliceridi, mentre dal punto di vista microscopico gli epatociti appaiono caratterizzati da evidente ipertrofia centrolobulare, con vacuolizzazione diffusa e necrosi (Seacat et al., 2003; Perkins et al., 2004; EFSA, 2008).

Anche negli studi di Butenhoff et al. (2002) e Goldenthal (1978) si sono osservate nei macachi alterazioni simili a quelle riferite per i ratti dopo somministrazione orale di PFAS (pochi mg/Kg al giorno per alcuni mesi). E' stato descritto un aumento dose-dipendente del peso del fegato e alterazioni ormonali (a livello della tiroide), ma nessuna alterazione istopatologica, tuttavia alcuni macachi sono morti prima che lo studio fosse concluso (EFSA, 2008).

I ratti sono quindi risultati meno sensibili rispetto ai macachi e i ratti femmina meno sensibili rispetto a quelli maschi.

Per quanto riguarda gli effetti neoplastici nei ratti, indipendentemente dal sesso, si è notato un aumento di adenomi epato-cellulari e a livello delle cellule follicolari della tiroide, mentre solo nei ratti maschi, dopo esposizione a PFOA è stata evidenziata una proliferazione delle cellule acinose del pancreas (EFSA, 2008).

Le prove condotte sia in vitro che in vivo, per valutare la genotossicità di PFOS e PFOA, hanno portato invece ad esiti negativi, per cui si è concluso che questi PFAS sembrano essere privi di attività genotossica (EFSA, 2008).

E' stata poi valutata anche l'esposizione al PFOS durante la vita fetale, nei ratti, dopo somministrazione attraverso un tubo alimentare di dosaggi crescenti (da 1 a 10 mg/Kg di peso corporeo) dal secondo al ventunesimo giorno di gravidanza. E' stato dimostrato che gli effetti patologici sono dose-dipendenti, ma in generale si è osservato che l'esposizione può compromettere la sopravvivenza post-natale, e causare ritardi nella crescita e nello sviluppo e alterazioni ormonali nei sopravvissuti.

Al dosaggio massimo è stato evidenziato: riduzione del peso, palatoschisi ed anasarca (Lau et al., 2003).

Nel 2006, sono state riportate le prove dei deficit dose-dipendenti, nella crescita dei topi neonati, in seguito a somministrazione orale di PFOA alle madri gravide.

E' stata dunque valutata un'esposizione a dosaggi crescenti (da 1 a 40 mg/Kg di peso corporeo al giorno). In tutti i gruppi trattati (tranne in quello trattato con la dose più bassa), è stato osservato un ritardo dell'apertura degli occhi e ritardi nella crescita. Alle dosi intermedie si è visto una diminuzione della sopravvivenza post-natale e nel gruppo trattato alla dose massima un riassorbimento embrionale.

Anche in questo caso il PFOA ha portato ad un incremento del peso del fegato in tutte le madri (Lau et al., 2006).

Un altro studio eseguito nel 2007 da White et al. su topi in gravidanza ha cercato di stabilire, se e in che misura, gli effetti avversi dell'esposizione al PFOA sui neonati, fossero collegati al periodo di gestazione piuttosto che all'allattamento. I risultati hanno evidenziato che oltre all'esposizione intrauterina anche il passaggio di PFOA attraverso il latte, nei neonati, può influire sui ritardi nella crescita della prole (EFSA, 2008).

Non sono stati segnalati chiari segni clinici di neurotossicità nei confronti di PFOS e PFOA, ma alcuni Autori hanno segnalato alterazioni comportamentali (in particolar modo iperattività), probabilmente legati ad un danneggiamento a livello del sistema colinergico (Johansson et al., 2008).

1.4.3.2 Effetti tossici nell'uomo

Diversi studi sono stati eseguiti per investigare sugli effetti che PFOS e PFOA possono provocare sulla popolazione. Molti di questi studi sono stati condotti sui lavoratori della 3M Company, professionalmente esposti ai PFAS. L'obiettivo era quello di cercare di spiegare le potenziali correlazioni dei contaminanti con le varie sintomatologie riferite, ma nella maggioranza dei casi sono stati ottenuti risultati contrastanti e senza molta rilevanza statistica. Uno dei monitoraggi, è stato effettuato nel 2000, per valutare gli effetti dell'esposizione ai PFAS sulla salute del personale dell'azienda 3M, nella sede in Alabama, dove PFOS e PFOA

venivano prodotti dal 1991 il primo e dal 1998 il secondo. Nei 263 lavoratori osservati i livelli sierici riportati per il PFOS sono stati di 1,32 mg/Kg (range: 0,06-10,6 mg/Kg) e per il PFOA di 1,78 mg/Kg (range: 0,04-12,7 mg/Kg). I soggetti sono stati sottoposti ad una serie di analisi che hanno evidenziato una correlazione positiva tra l'esposizione a queste sostanze e l'aumento di T3 (triiodotironina) e dei trigliceridi nel siero.

Altri studi, effettuati sempre sui lavoratori della 3M Company, avevano suggerito che i soggetti altamente esposti ai PFAS potessero avere il più alto rischio di morte da cancro alla vescica, ma poi ulteriori studi di follow-up hanno evidenziato l'esistenza di un numero esiguo di casi e di nessuna correlazione significativa a riguardo (EFSA, 2008).

In un recente lavoro sono stati analizzati un centinaio di campioni di sangue materno e del cordone ombelicale di donne norvegesi, per valutare la presenza di vari PFAS. Le concentrazioni di PFAS nel sangue del cordone ombelicale corrispondevano tra il 30% ed il 79% a quelle riscontrate nel sangue materno, dimostrando un passaggio placentare di questi composti.

Il PFOA ha mostrato un trasferimento più efficiente rispetto agli altri PFAS e questo è sinonimo di un'esposizione fetale più rilevante a questo composto (Gützkow et al., 2011).

Recentemente sono state valutate le conseguenze dell'esposizione del feto ai PFAS sui livelli di immunoglobuline E (IgE) e sull'insorgenza di dermatiti atopiche (DA). Dopo circa 2 anni sono state raccolte informazioni inerenti all'eventuale sviluppo di DA nei bambini e sulla concentrazione sierica totale di IgE; questi dati sono stati confrontati con quelli conservati e relativi alle concentrazioni sieriche delle IgE e dei PFAS nel sangue del cordone ombelicale degli stessi bambini, che erano stati precedentemente misurati e raccolti insieme anche ad altri importanti parametri (peso alla nascita, tipo di parto, durata della gestazione etc.).

Dal confronto si è concluso che esiste una correlazione positiva tra l'esposizione prenatale ai PFAS e i livelli ematici di IgE nel cordone ombelicale, mentre nessuna associazione significativa è stata osservata per la DA (Wang et al., 2011).

Ad ogni modo secondo l'EFSA sono necessarie ulteriori indagini per confermare gli effetti tossici che questi composti possono provocare nell'uomo, tenendo presente che anche altri fattori potrebbero contribuire alla loro manifestazione (EFSA, 2008).

1.5 METODI DI ANALISI dei PFAS

1.5.1 Preparazione del campione

Le sostanze perfluoroalchiliche è un nome collettivo che comprende un gruppo di composti formati da una catena carboniosa fluorurata e da un gruppo idrofilico terminale. I vari composti possono essere molto differenti tra di loro per le proprie caratteristiche chimico-fisiche (il tipo catena, il grado di fluorurazione o la carica del gruppo idrofilico) e di conseguenza altrettanto differenti dovranno essere i metodi analitici utilizzati per la loro determinazione.

Quando si effettua un'analisi dei PFAS bisogna adottare poche ma giuste misure di precauzione per ridurre il rischio di contaminazione o di perdita dell'analita e per garantire l'affidabilità dei risultati.

Innanzitutto secondo Hansen et al. (2001) sarebbe opportuno evitare l'utilizzo di attrezzature di vetro (che possono assorbire i PFAS), o di Teflon (possibile fonte di PFAS), ma è preferibile utilizzare un materiale inerte come il polipropilene. Per evitare una possibile contaminazione durante l'analisi strumentale, è consigliabile sostituire le tubature in politetrafluoroetilene (PTFE) del sistema LC con quelle in polietere etere chetone (PEEK) o con quelle in acciaio inossidabile. Alcuni Autori per limitare al minimo possibili fonti di contaminazione hanno deciso anche di applicare una colonna di protezione, prima del sistema di iniezione del cromatografo per rimuovere anche i PFAS eventualmente presenti o che potrebbero essere rilasciati dallo strumento stesso, durante l'iniezione del campione (Tittlemier e Braekevelt, 2011).

Per ridurre l'effetto matrice (questi contaminanti si legano principalmente alle proteine), alcuni campioni vengono pretrattati, e la precipitazione delle proteine può essere ottenuta mediante l'aggiunta di acetonitrile, acido formico o acido trifluoroacetico, seguita poi da centrifugazione.

I campioni vengono conservati solitamente in frigorifero, anche se nel caso di composti volatili sarebbe meglio riempire completamente i contenitori e congelarli, per evitarne l'evaporazione.

Di solito i campioni analizzati sono freschi o scongelati, ma ci sono stati casi anche di studi che hanno utilizzato campioni di cibo liofilizzati, senza causare perdita di analiti durante la fase di estrazione.

I metodi utilizzati per analizzare i PFAS negli alimenti risultano essere solitamente degli adattamenti di quelli già in uso per il monitoraggio degli stessi composti in campioni biologici (Tittlemier e Braekevelt, 2011).

L'estrazione dei campioni può essere effettuata in svariati modi, quali: estrazione in fase solida (SPE), estrazione liquido-liquido (LLE), estrazione con liquido pressurizzato (PLE), estrazione basata sull'accoppiamento ionico (IPE) e la microestrazione in fase solida (SPME utilizzabile solo in gascromatografia). La fase di estrazione dalla matrice può essere seguita da un'ulteriore fase di purificazione sempre mediante cartucce SPE o SPE in fase solida dispersiva, per eliminare gli interferenti.

L'estrazione a coppia ionica è stato sicuramente il metodo più usato, introdotto nel 1985 da Ylinen e modificato nel 2001 da Hansen et al., poiché garantisce una buona flessibilità (in quanto può essere usato in varie matrici: fegato, uova, muscoli etc.), e permette buoni recuperi. Tuttavia è risultato comunque un metodo laborioso e molto lungo (EFSA, 2008).

Nel 2005 Powley et al. hanno sviluppato una metodica rapida e libera dall'effetto matrice per gli acidi carbossilici perfluorurati, che prevede l'omogenizzazione del campione con solvente organico e l'estrazione in fase solida dispersiva, costituita di carbone grafitato.

Recentemente è stata utilizzata la tecnica di estrazione con liquido pressurizzato (PLE), come metodica di pretrattamento, è risultata semplice e rapida, sembra migliorare il LOQ e che permetta di preparare velocemente un gran numero di campioni (Llorca et al., 2009).

Anche la microestrazione in fase solida (SPME) utilizzata di recente nelle analisi di GC sembra consentire una facile estrazione dei PFAS e una riduzione del consumo dei solventi (Luque et al., 2010).

1.5.2 Analisi strumentale

Le prime metodiche analitiche usate per la determinazione del fluoro organico si sono basate sulla sua conversione a ione fluoruro solubile (EFSA, 2008). Una delle prime tecniche si basava sulla vaporizzazione del campione in camera di combustione per decomporlo in anidride carbonica e acido fluoridrico, ma questa metodica permetteva solo di individuare la totalità dei composti fluorurati, senza però riuscire a separare quelli organici dagli altri.

Anche altre tecniche analitiche utilizzate per quantificare il contenuto di fluoro nelle molecole organiche, come l'attivazione neutronica e la fluorescenza a raggi X (XFR), sono risultate aspecifiche.

Negli anni '60 fu introdotta la risonanza magnetica nucleare (NMR) e fu usata anche per l'identificazione dei PFAS in matrici liquide, come siero umano ed acqua, ma anche questa tecnica è stata abbandonata per la sua scarsa affidabilità per quanto riguarda la quantificazione (sembrerebbe infatti che la presenza di altri surfattanti nei campioni, che producono spettri simili a quelli di altri composti per fluorurati, possano causare delle sovrastime). Un'altra tecnica utilizzata, è stata la spettroscopia ad infrarossi con trasformata di Fourier (FT-IR), per monitorare la presenza atmosferica di alcoli contenenti fluorotelomeri (de Voogt e Sàez, 2006; EFSA, 2008).

Più recentemente invece per la determinazione delle sostanze perfluoroalchiliche volatili, che hanno un'elevata pressione di vapore, viene utilizzata la gascromatografia (GLC), con l'uso di colonne di media o alta polarità.

I PFAS anionici invece devono essere derivatizzati prima dell'analisi mediante GLC. Questa tecnica non è adatta a determinare composti polari e idrofili per cui la tecnica più efficiente per lo studio di queste sostanze è la cromatografia liquida (LC) (EFSA, 2008).

La separazione mediante LC avviene mediante colonne C8 o C18 a fase inversa, utilizzando, come fase mobile, una miscela di solventi organici (generalmente a base di metanolo o acetonitrile) e una soluzione acquosa (solitamente acetato di ammonio con concentrazioni che vanno da 1 a 20 mM). La fase stazionaria invece può essere a scambio ionico o a fase perfluorinata, in grado in quest'ultimo caso, di separare anche gli isomeri ramificati del PFOS (de Voogt e Sàez, 2006; Tittlemier e Braekevelt, 2011).

I rilevatori che solitamente si associano alla GLC sono quelli a ionizzazione a fiamma o a cattura elettronica, mentre per la LC ricordiamo quello a fluorescenza, a trappola ionica (adatta soprattutto per l'identificazione degli isomeri ramificati), il Q-TOF (rilevatore quadrupolo-tempo di volo, molto adatto alla determinazione dei PFAS nell'ambiente) e il conduttometrico.

Il rilevatore che ha permesso un miglioramento sostanziale per l'analisi delle sostanze perfluoroalchiliche è lo spettrometro di massa triplo quadrupolo (MS/MS) che è considerato il rivelatore più adatto a questo scopo.

Se si utilizza la spettrometria di massa associata alla GC, a seconda del tipo di molecola che si dovrà analizzare si potranno utilizzare, come interfaccia ionizzante, sia la sorgente a ionizzazione chimica (CI) che quella ad impatto elettronico (EI), in modalità positiva o negativa e con metano o ammoniaca come gas reagenti. La ionizzazione chimica negativa è la configurazione più diffusa e utilizzata per la sua sensibilità.

Se invece si utilizza la cromatografia liquida associata allo spettrometro di massa (LC-MS, l'interfaccia più utilizzata è la ionizzazione elettrospray (ESI) e nel caso specifico dei PFAS, si preferisce operare in modalità ESI negativa per generare ioni pseudomolecolari $[M-H]^-$.

Quindi ad oggi la LC-MS/MS in modalità MRM (multiple reaction monitoring) ed ESI negativa risulta essere la tecnica migliore per la determinazione di PFAS anionici in matrici organiche (EFSA, 2008; Tittlemier et al., 2007).

Un inconveniente che è stato segnalato nel corso di alcune analisi mediante LC-MS/MS è l'effetto matrice, che abbiamo già accennato a livello della preparazione dei campioni, ma in questo caso è dovuto alla sovrapposizione delle masse degli analiti con alcune sostanze interferenti ancora presenti nel campione, e responsabile della diminuzione delle prestazioni analitiche in termini di sensibilità, e quantificazione dei risultati.

Nelle matrici di origine animale, per esempio, l'interferenza può essere generata da composti endogeni, che possono avere in comune con l'analita d'interesse sia il tempo di ritenzione che una delle transizioni monitorate, per cui la separazione dei due, a livello cromatografico, deve essere modulata in modo tale da eliminare l'interferente. Per ovviare all'inconveniente si possono innanzitutto cambiare le condizioni cromatografiche (gradiente di eluizione e/o fase stazionaria), si può tentare di cambiare transizione e ovviamente procedere nel modo più efficace possibile durante la preparazione del campione per evitare l'accumulo di sostanze interferenti.

Potrebbe anche verificarsi il così detto effetto di soppressione ionica, causato anch'esso da sostanze interferenti che ostacolano la fase di ionizzazione dell'analita, riducendo così la risposta strumentale.

Tuttavia l'utilizzo di isotopi stabili come standard interni e l'utilizzo di tecniche innovative per la pulizia durante la preparazione dei campioni è il connubio migliore per evitare l'effetto matrice. Si tratta di isotopi stabili dei composti perfluoroalchilici che permettono di monitorare i risultati durante la quantificazione, e di conseguenza un miglioramento in termini di precisione dell'analisi e della quantificazione stessa (Tittlemier e Braekevelt, 2011).

Risulta essenziale dunque un miglioramento costante delle metodiche analitiche e della comparabilità di quelle già in uso per la determinazione delle sostanze perfluoroalchiliche, in modo tale da favorire l'aumento dei dati disponibili, l'affidabilità dei risultati e di conseguenza la stima esatta dell'esposizione umana a tali contaminanti (EFSA, 2008; EFSA, 2012).

1.6 LEGISLAZIONE

Le prime restrizioni previste a livello europeo per l'utilizzo e il commercio di PFOS sono state emanate il 12 dicembre 2006, con la Direttiva 2006/122/CE.

Questo documento, che va a modificare la precedente Direttiva 79/769/CEE del Consiglio, illustra quali sono le restrizioni inerenti all'immissione in commercio e all'utilizzo di varie sostanze e preparati considerati pericolosi. Tali restrizioni riguardano tutti quei prodotti non alimentari ai quali il PFOS è stato aggiunto intenzionalmente, e si riferiscono solo ai nuovi prodotti. Viene poi specificato che l'impiego di PFOS dovrebbe essere ridotto al minimo nei processi di placcatura dei metalli, mentre per le schiume antincendio non è più permesso l'uso delle scorte immesse nel mercato prima del dicembre 2006 e sarebbe quindi opportuno valutare l'utilizzo di prodotti sostitutivi.

Alcuni usi marginali del PFOS, invece, non sono soggetti a limitazioni sia perché sembrano non costituire un rischio per la salute umana e per l'ambiente, sia perché non esistono sostanze alternative. Rientrano in questa categoria alcune applicazioni industriali dei settori fotografico, dei semiconduttori e dell'aviazione.

La Direttiva prevede la necessità di monitorare anche il PFOA ed i suoi sali che sembra possano avere un potenziale di rischio analogo al PFOS.

L'applicazione di tutte le misure citate sono diventate obbligatorie a partire dal 27 giugno 2008 (Direttiva 2006/122/CE).

Ad oggi non esiste ancora una regolamentazione precisa che imponga restrizioni sulla presenza di PFAS negli alimenti, anche se già nel 2000 la Commissione europea si era espressa sull'importanza di garantire i più alti standard di sicurezza possibili e dei vari approcci per l'ottenimento, pubblicando il libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare (Picò et al., 2011).

Nel 2002 l'OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) dopo aver effettuato, sulla base delle informazioni disponibili al momento, una valutazione dei rischi legata al PFOS e in accordo con lo SCHER (Comitato scientifico dei rischi sanitari e ambientali), ha concluso che il PFOS è un contaminante persistente e con potenziali effetti tossici e che bisognava ridurre i pericoli per la salute umana e per l'ambiente.

Nel 2003 il PFOS è stato aggiunto alla lista OSPAR (Oslo and Paris Convention), che contiene un elenco delle sostanze chimiche da monitorare per la salvaguardia dell'ambiente. Si tratta di una cooperazione internazionale che lavora per la protezione dell'ambiente marino dell'Atlantico nord-orientale (van Asselt et al., 2011).

Nel 2008 l'EFSA ha incaricato un gruppo di esperti (Panel CONTAM) per valutare e esporre un parere scientifico su PFOS, PFOA ed i loro sali.

Il documento che ne deriva è una fonte aggiornata di informazioni sui PFAS, sulle fonti di esposizione e sul ruolo dell'alimentazione. Secondo il parere scientifico è alquanto improbabile che questi contaminanti abbiano effetti nocivi per la popolazione, ma sui loro possibili effetti nei confronti dello sviluppo degli organismi viventi rimangono delle incertezze. Per tale motivo l'EFSA ha ritenuto necessaria la produzione di ulteriori dati per la valutazione dei livelli dei PFAS negli alimenti e nell'uomo e per monitorarne le tendenze espositive.

Nel 2009 il PFOS ed i suoi sali sono stati inseriti nell'allegato B della Convenzione di Stoccolma come inquinanti organici persistenti (POP) e sottoposti dunque a limitazioni nella produzione e nell'uso.

Il 17 marzo 2010 è stata emanata la Raccomandazione della Commissione europea relativa al controllo della presenza di PFAS negli alimenti da parte degli Stati membri per il biennio 2010-2011 (UE 161/2010).

Il controllo doveva comprendere un'ampia varietà di prodotti alimentari sia di origine animale (pesci, uova, carne, latte e derivati) che vegetale, tenendo conto anche delle abitudini di consumo per poter consentire una stima affidabile dell'esposizione umana.

La Raccomandazione comprende dunque PFOS, PFOA ed ove possibile i loro precursori (FOSA, N-EtFOSE e fluorotelomeri degli alcoli) e composti omologhi con catena di diversa lunghezza. Le analisi dovevano essere eseguite in conformità all'allegato III del Regolamento (CE) n. 882/2004 procedendo con metodi d'analisi che abbiano dimostrato di produrre risultati affidabili. Infine sono stati esortati gli Stati membri alla trasmissione regolare di tutti i dati, relativi anche ai monitoraggi degli anni precedenti, in modo tale che l'EFSA potesse creare una banca dati europea per valutare la tendenza all'esposizione (UE 161/2010).

Nel 2011 l'EFSA ha pubblicato un resoconto intermedio sui monitoraggi effettuati e analizzando i dati raccolti ha emesso delle raccomandazioni per regolare i lavori in corso (EFSA, 2011).

Nel 2012 anche l'EFSA ha esortato nuovamente gli Stati membri, sostenendo che per i futuri monitoraggi sarebbe stato opportuno definire una lista dei PFAS più pericolosi e procedere all'analisi di questi contaminanti mediante le più sensibili tecniche analitiche per ottenere il maggior numero di dati disponibili e per poter quindi stabilire in maniera più precisa l'andamento dell'esposizione e di conseguenza gli eventuali rischi per la salute dell'uomo (EFSA, 2012).

2. SCOPO DEL LAVORO

Le sostanze perfluoroalchiliche sono un vasto e complesso gruppo di composti fluorurati, che comprendono tensioattivi cationici, anionici o neutri con elevata inerzia termica, chimica e biologica.

Un'importante sottoinsieme dei PFAS è rappresentato dai tensioattivi organici (per)fluorurati con gruppo terminale anionico, di cui fanno parte l'acido perfluoroottanosulfonato (PFOS) e l'acido perfluoroottanico (PFOA).

I PFAS sono stati impiegati dall'uomo fin dagli anni '50 in maniera intensiva, in diverse applicazioni industriali e domestiche, permettendo quindi a questi composti di diffondersi e accumularsi nell'ambiente, vista la loro estrema resistenza alla degradazione non valutando preventivamente i loro potenziali effetti tossici sia sull'ambiente che sull'uomo.

Diversi studi hanno dimostrato che i PFAS una volta nell'organismo hanno un'emivita piuttosto lunga, e possono provocare epatotossicità, immunotossicità, neurotossicità, alterazioni ormonali nella riproduzione e nello sviluppo.

L'esposizione umana a questi contaminanti avviene principalmente attraverso la dieta e l'Unione Europea ha emanato la Raccomandazione 161/2010, nella quale richiede agli Stati membri un monitoraggio nel biennio 2010-2011, relativo alla presenza dei PFAS negli alimenti, al fine di produrre stime accurate di esposizione.

Considerando che in Italia i dati relativi alla presenza di PFAS negli alimenti sono ancora piuttosto scarsi, scopo di questo lavoro è stato quello di indagare sulla presenza di PFOS e PFOA in matrici potenzialmente contaminate.

Inizialmente è stato effettuato un monitoraggio preliminare sulla presenza di PFOS e PFOA in latte italiano vaccino ed umano.

Sono stati analizzati 67 campioni di latte bovino di differente tipologia raccolti tra il 2011 e il 2012 nel Nord Italia, e 37 campioni di latte materno umano, raccolti nel 2010 presso l'ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna.

Successivamente si è rivolta l'attenzione sui prodotti ittici ed in particolare sul pesce che, ad oggi, in accordo con il parere espresso dall'EFSA, risulta essere la tipologia di alimento più contaminata.

Un primo monitoraggio è stato eseguito per valutare la presenza di PFAS in varie specie di pesce fresco proveniente dalla grande distribuzione dell'area di Bologna. Sono stati analizzati 31 campioni di 7 specie diverse acquistati in differenti punti vendita, nella zona di Bologna, nel giugno del 2012.

L'indagine è proseguita effettuando poi un secondo monitoraggio monospecie su 140 campioni di branzini provenienti da diverse aree (in particolare dal Mar Mediterraneo), sia pescati che allevati e prelevati in due differenti momenti dell'anno: primavera/estate ed autunno/inverno.

L'obiettivo, in questo caso, è stato anche quello di cercare di stabilire se il tipo di alimentazione (naturale o artificiale) o la campionatura stagionale potessero influenzare i livelli dei PFAS nei pesci.

Le analisi sono state svolte mediante LC-MS/MS (cromatografia liquida associata allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo), che attualmente risulta la tecnica analitica migliore per la determinazione dei PFAS in matrici alimentari.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI

Inizialmente è stato effettuato un monitoraggio preliminare sulla presenza di PFOS e PFOA in latte italiano vaccino ed umano.

Successivamente si è rivolta l'attenzione sui prodotti ittici ed in particolare sul pesce che, ad oggi, in accordo con il parere espresso dall' EFSA, risulta essere la tipologia di alimento più contaminata.

3.1.1 Campioni di latte

Il monitoraggio preliminare prevedeva 2 tipologie di latte:

Latte vaccino

Sono stati analizzati 67 campioni di latte bovino di differente tipologia (intero, parzialmente scremato, biologico, alta digeribilità, crudo ed alta qualità), raccolti tra il 2011 e il 2012 nel Nord Italia. In particolare 22 campioni sono stati acquistati da vari negozi della zona di Bologna, confezionati in bottiglie di plastica o tetra-pack, mentre gli altri 45 campioni (8 di latte biologico e 37 di latte prodotto in aziende con elevati standard igienici e nutrizionali) raccolti nelle regioni Lombardia ed Emilia Romagna.

I campioni raccolti sono stati trasferiti in provette di polipropilene e conservati al buio a – 20 °C.

Campioni	Tipo di latte	N° Campioni
A	Intero	6
B	Scremato	6
C	Alta Qualità	37
D	Biologico	12
E	Crudo	6

Tabella 3.1 *Campioni di latte vaccino e loro caratteristiche.*

Latte materno umano

Sono stati raccolti 37 campioni di latte materno umano nel 2010, presso l'ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna, di cui 21 provenivano da primipare, mentre gli altri 16 da multipare. Il prelievo dei campioni è stato autorizzato dal Comitato Etico Indipendente dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico Sant'Orsola Malpighi (sperimentazione clinica num. 49/2011/U/Tess).

I campioni raccolti sono stati trasferiti in provette di polipropilene e conservati al buio a – 20 °C.

	Primipare	Multipare	Totale
N° campioni latte materno	21	16	37

Tabella 3.2 *Campioni di latte materno e indicazione sulla provenienza dei campioni di latte (primipara/multipara).*

3.1.2 Campioni di pesce

Un primo monitoraggio è stato effettuato per valutare la presenza di PFAS in varie specie di pesce fresco proveniente dalla grande distribuzione dell'area di Bologna.

L'indagine è proseguita effettuando un secondo monitoraggio monospecie su 140 campioni di branzini provenienti da diverse zone del Mar Mediterraneo, sia pescati che allevati in gabbie galleggianti e prelevati in due differenti momenti dell'anno: primavera/estate ed autunno/inverno.

Specie varie di pesce

Sono stati analizzati 31 campioni di 7 specie diverse (platessa, merluzzo, sgombro, occhiata, cefalo, branzino e orata) acquistati in differenti punti vendita, nella zona di Bologna, nel giugno del 2012.

I pesci sono stati sfilettati, omogeneizzati e trasferiti in provette di polipropilene il medesimo giorno dell'acquisto e conservati a -18°C, fino al giorno dell'analisi.

Specie	Provenienza	N° Campioni
Platessa	Atlantico	5
Merluzzo	Atlantico	5
Sgombro	Atlantico	5
Occhiata	Atlantico	5
Cefalo	Mediterraneo	5
Branzino	Mediterraneo	5
Orata	Mediterraneo	1

Tabella 3.3 *Campioni di pesce e indicazioni sulla specie e sulla provenienza.*

Branzino

I campioni di muscolo di branzino sono stati forniti dall'Unità Organizzativa di Sede di Cesenatico del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

Dopo omogeneizzazione, i campioni sono stati congelati e conservati in aliquote di 20 g ciascuno. Sono stati conservati in congelatore a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ fino al giorno dell'analisi.

I campioni sono stati prelevati nel biennio 2009-2010 in diverse località italiane del Mar Mediterraneo, in due diversi periodi dell'anno: primavera-estate ed autunno-inverno. I branzini campionati erano sia allevati che pescati. I soggetti allevati erano provenienti da allevamenti intensivi in gabbie galleggianti, estensivi e semi-intensivi.

Gruppo	Luogo di origine	Tipo	Numero esemplari	
			Aut./Inv.	Prim./Est.
1	Monfalcone (ITA)	Allevati	5	5
2	Pachino - Capo Passero (ITA)	Allevati	5	5
3	Golfo Aranci - Isola Figarolo (ITA)	Allevati	5	5
4	Adriaticonord- occidentale (ITA)	Pescati	5	5
5	Tirreno (ITA)	Pescati	5	5
6	Lavagna (ITA)	Allevati	5	5
7	Porto Tolle (ITA)	Allevati	5	5
8	Follonica (ITA)	Allevati	5	5
9	Porto Tolle (ITA)	Allevati	5	5
10	Pakostane (HR)	Allevati	5	5
11	Bodruh (TR)	Allevati	5	5
12	Koropiu (GR)	Allevati	5	5
13	Atlantico NE (FR)	Pescati	5	5
14	Golgo del Leone (FR)	Pescati	5	5

Tabella 3.4 Campioni di branzino e indicazioni sulla provenienza, sulla campionatura (allevamento/pescato) e sul periodo di raccolta.

3.2 MATERIALI

Per verificare le prestazioni del metodo e la quantificazione dei campioni sono stati utilizzati standard di PFOS e PFOA, ed anche M-PFOS e M-PFOA (PFOS e PFOA marcati) come standard interni.

Tutte le soluzioni standard, elencate di seguito, sono state acquistate da “ Wellington Laboratories” (Guelph, Canada) con un grado di purezza > 98% in metanolo:

- **PFOS** Sodium perfluoro-1-octanesulfonate: 1,2 mL (50 µg/mL in metanolo)
- **PFOA** Perfluoro-n-octanoic acid: 1,2 mL (50 µg/mL in metanolo)
- **M-PFOS** Sodiumperfluoro -1- [1,2,3,4-¹³C4] octanesulfonate: 1,2 mL (50 µg/mL in metanolo)
- **M-PFOA** Perfluoro-n- [1,2,3,4-¹³C4] octanoic acid: 1,2mL (50 µg/mL in metanolo)

Partendo da questi prodotti sono state poi preparate le seguenti soluzioni standard riportate qui di seguito e suddivise in base al tipo di matrice da analizzare.

Soluzioni standard per i campioni di latte:

- *Soluzione madre:* per ogni composto è stata preparata una soluzione a 5 µg/mL, diluendo 1:10 in metanolo il relativo standard di 50 µg/mL;
- *Soluzione madre PFAS (0,5 µg/mL):* 20 µL di PFOS (50 µg/mL) e 20 µL di PFOA (50 µg/mL) sono stati diluiti in 2 mL di metanolo (con diluizione 1:100);
- *Soluzione madre M-PFAS (5 µg/mL):* 1mL di M-PFOS (50 µg/mL) e 1mL di M-PFOA (50 µg/mL) sono stati diluiti in 10mL di metanolo (con diluizione 1:10).

Soluzioni standard per i campioni di pesce:

- *Soluzione madre:* per ogni composto è stata preparata una soluzione a 5 µg/mL, diluendo 1:10 in metanolo il relativo standard di 50 µg/mL;
- *Soluzione madre PFAS (0,5 µg/mL):* 20 µL di PFOS (50 µg/mL) e 20 µL di PFOA (50µg/mL) sono stati diluiti in 2 mL di metanolo (con diluizione 1:100);
- *Soluzione madre M-PFAS (0,5 µg/mL):* 20 µL di M-PFOS (50 µg/mL) e 20 µL di M-PFOA (50 µg/mL) sono stati diluiti in 2 mL di metanolo (con diluizione 1:100).

Successivamente, diluendo ulteriormente in metanolo le soluzioni madri, sono state ottenute le seguenti “*working solutions*” riportate qui di seguito e suddivise in base al tipo di matrice da analizzare.

Working solutions per i campioni di latte:

- “*working solution*” PFAS a 50 µg/L per diluizione della *soluzione madre PFAS* 1:10 in metanolo;
- “*working solution*” PFAS a 5 µg/L per diluizione della soluzione precedente 1:100 in metanolo;
- “*working solution*” M-PFAS a 50 µg/L per diluizione della *soluzione madre M-PFAS* 1:100 in metanolo.

Working solutions per i campioni di pesce:

- “working solution” PFAS a 100 µg/L per diluizione della *soluzione madre PFAS* 1:2,5 in metanolo;
- “working solution” PFAS a 25 µg/L per diluizione della soluzione precedente 1:4 in metanolo;
- “working solution” PFAS a 5 µg/L per diluizione della soluzione precedente 1:5 in metanolo;
- “working solution” M-PFAS a 25 µg/L per diluizione della *soluzione madre M-PFAS* 1:10 in metanolo.

Sono stati utilizzati anche standard di isomeri dell'acido taurodesossicolico, noto come potenziale interferente del PFOS, durante la sua determinazione:

- Sodium taurodeoxycholate hydrate (Sigma-Aldrich)
- Sodium taurochenodeoxycholate (Sigma-Aldrich)

Tutte le soluzioni sono state conservate in frigorifero a 4°C e al riparo dalla luce.

Solventi e reagenti

I solventi utilizzati per le analisi in spettrometria di massa erano di grado LC-MS:

- Acqua ultrapura
- Ammonio acetato (Fluka)
- Metanolo (Sigma Aldrich)

I solventi utilizzati per la fasi di estrazione erano di grado analitico:

- Acido formico (Sigma Aldrich)
- Acetonitrile (Fluka)

- Metanolo (Sigma Aldrich)
- Ammoniaca al 33% (Sigma Aldrich)
- Acido acetico glaciale (Sigma Aldrich)
- Acetone (VWR)
- Acqua pura

Per l'estrazione degli analiti del latte sono state utilizzate 2 diverse cartucce SPE (estrazione in fase solida):

- Cartucce SPE Oasis™ HLB 500 mg 6 mL (Waters Corporation, Milford, USA)
- Cartucce SPE ENVI-Carb™ 500 mg 6 mL (Supelco- Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Per l'estrazione degli analiti del pesce sono stati impiegati alcuni reagenti:

- Cloruro di sodio (NaCl) (Sigma Aldrich)
- Solfato di magnesio (MgSO₄) (Sigma Aldrich)
- Fase solida Bondesil C18 (40 µm) (Agilent)
- Fase solida Supelclean ENVI-Carb (120-400 mash) (Sigma Aldrich)

3.3 STRUMENTAZIONE

3.3.1 UPLC/MS-MS

Il sistema utilizzato per l'analisi dei PFAS era costituito da una pompa Waters Acquity UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), munita di auto campionatore, degasatore, termostato per colonna e per campioni.

A questo strumento era collegato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Waters Quattro Premier XE con interfaccia ESCi™ Multi-Mode (Waters Corporation, Milford, USA).

Per la separazione cromatografica nei campioni di latte, è stata impiegata una colonna Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm e 2,1 x 50 mm), abbinata ad una precolonna VanGuard™ con le stesse caratteristiche (Waters Corporation, Milford, USA).

La separazione cromatografica nei campioni di pesce, è stata ottenuta invece con una colonna Waters Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm e 2,1 x 50 mm), abbinata ad una precolonna VanGuard™ con le stesse caratteristiche di fase stazionaria (Waters Corporation, Milford, USA).

I dati sono stati poi acquisiti e processati con il software Waters MassLynx™ 4.1 (Waters Corporation, Milford, USA).

L'azoto utilizzato in laboratorio, per il funzionamento dello spettrometro di massa era prodotto dal generatore DBS N2-Mistral-4 (DBS Strumenti Scientifici, Padova, Italia).

Altre apparecchiature utilizzate

Durante la preparazione dei campioni di latte e di pesce sono state utilizzate le apparecchiature qui di seguito elencate:

- Congelatore a temperatura $< 18\text{ }^{\circ}\text{C}$, con termometro analogico
- Frigorifero a temperatura $4\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, con termometro analogico
- Sistema di purificazione dell'acqua (New Human Power I, Human Corporation)
- Bagnomaria
- Pipette Gilson Automatiche (Gilson, Middleton , USA)
- Vortex (VelpScientific, Italia)
- Centrifuga refrigerata (Hettich, Kirchlengern, Germania)
- Concentratore di campioni a flusso di azoto
- Estrattore multiplo per cartucce SPE (Waters Corporation, Milford, USA)
- Sonicatore (Brawson)
- Filtri per siringa Puradish™ in PVDF $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Whatman, Kent, Regno Unito)

3.4 CONDIZIONI STRUMENTALI

3.4.1 CONDIZIONI LC

Le analisi sono state tutte eseguite in condizioni programmate, con un flusso di 0,5 mL/minuto. Il volume di iniezione era di 10 μ L in modalità “full loop” e la colonna era mantenuta ad una temperatura di 45 °C.

La *fase mobile*, per l'analisi dei **campioni di latte**, era così costituita:

- Fase A: ammonio acetato 20 mM
- Fase B: metanolo

I gradienti iniziali erano 70% di A e 30% di B, mantenuti per i primi 30 secondi. Dopo, in un minuto, le concentrazioni venivano portate a 0% di A e 100% di B e lasciate così per un minuto e mezzo. Infine, negli ultimi 30 secondi si riportava la fase mobile alle condizioni iniziali (70% di A e 30% di B) e si mantenevano tali per circa un minuto e mezzo, per far riequilibrare la colonna prima della successiva iniezione (vedi **Tabella 3.5**). I campioni erano mantenuti a temperatura ambiente durante la giornata di analisi.

Tempo (min)	Soluzione A%	Soluzione B%
0	70	30
0,5	70	30
1,5	0	100
3	0	100
3,5	70	30
5	70	30

Tabella 3.5 Programma del gradiente di fase mobile.

La fase mobile per l'analisi dei **campioni di pesce**, era costituita da:

- Fase A: ammonio acetato 5 mM in acqua
- Fase B: metanolo

In questo caso le condizioni iniziali erano mantenute per il primo minuto e corrispondevano a: 100% di A e 0% di B. Poi si passava in un minuto e mezzo a 40% di A e 60 % di B e poi in un altro minuto e mezzo si arrivava a 5% di A e 95% di B, per ritornare infine alle condizioni iniziali (100% di A e 0% di B).

Si lasciava riequilibrare la colonna per circa 3 minuti, prima di procedere ad una nuova iniezione (vedi **Tabella 3.6**). I campioni erano mantenuti nell'autocampionatore a 6 °C durante la giornata di analisi.

Tempo (min)	Soluzione A%	Soluzione B%
0	100	0
1	100	0
2,5	40	60
4	5	95
5	100	0
8	100	0

Tabella 3.6 Programma del gradiente di fase mobile.

3.4.2 CONDIZIONI MS/MS

Lo strumento ha operato in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), osservando due transizioni sia per PFOS e PFOA che per i relativi standard interni.

La modalità di ionizzazione era l'elettrospray negativo (ESI $\bar{\text{}}$) e l'argon era utilizzato come gas di collisione.

Le tabelle seguenti, una per le analisi dei *campioni di latte* (**Tabella 3.7**), e una per le analisi dei *campioni di pesce* (**Tabella 3.8**), illustrano le transizioni scelte per ogni precursore e i corrispondenti valori di voltaggio del cono ed energia di collisione.

Analita	Transizione 1 (<i>m/z</i>)	Voltaggio del cono (V)	Energia di collisione (eV)	Transizione 2 (<i>m/z</i>)	Voltaggio del cono (V)	Energia di collisione (eV)
PFOS	498,6 > 99,0	52	10	498,6 > 80,0	52	43
PFOA	412,8 > 369,0	12	10	412,8 > 169,0	12	17
M-PFOS	502,9 > 99,0	50	11	-	-	-
M-PFOA	416,9 > 372,0	11	10	-	-	-

Tabella 3.7 *Transizioni monitorate e relativi parametri specifici in campioni di latte.*

I parametri dello spettrometro di massa erano:

- Voltaggio del Capillare: 2,00 kV
- Voltaggio dell'estrattore: 3V
- Temperatura della sorgente: 150 °C
- Temperatura di desolvatazione: 220 °C
- Flusso del gas del cono: 50 L/h
- Flusso del gas di desolvatazione: 700 L/h

Analita	Transizione 1 (<i>m/z</i>)	Vtaggio del cono (V)	Energia di collisione (eV)	Transizione 2 (<i>m/z</i>)	Vtaggio del cono (V)	Energia di collisione (eV)
PFOS	498,6 > 99,0	62	44	498,6 > 80,0	62	38
PFOA	412,8 > 369,0	14	10	412,8 > 169,0	14	18
M-PFOS	502,9 > 99,0	55	41	502,9 > 80,0	55	38
M-PFOA	416,9 > 372,0	11	10	416,9 > 169,0	15	18
TDCA	498,2 > 124,0	95	52	-	-	-

Tabella 3.8 *Transizioni monitorate e relativi parametri specifici in campioni di pesce.*

I parametri dello spettrometro di massa erano:

- Vtaggio del Capillare: 4,00 kV
- Vtaggio dell'estrattore: 3V
- Temperatura della sorgente: 150 °C
- Temperatura di desolvatazione: 220 °C
- Flusso del gas del cono: 100 L/h
- Flusso del gas di desolvatazione: 800 L/h

3.5 PROCEDURE DI ESTRAZIONE DEI CAMPIONI

3.5.1 Campioni di latte

I campioni sono stati estratti seguendo la procedura di estrazione descritta da Kadar et al. (2011).

Dopo il trasferimento dei 2 standard interni e di 3 mL di latte in provette di polipropilene, l'aggiunta di acetone (9 mL) permette la precipitazione delle proteine.

I campioni, dopo essere stati agitati per 30 secondi, sono stati posti nel bagno ad ultrasuoni per circa 10 minuti per facilitare il processo di estrazione e poi sono stati centrifugati a 2000 x g per altri 10 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente il surnatante è stato trasferito in nuove provette di polipropilene e fatto evaporare con flusso di azoto, a bagnomaria, fino ad ottenere un volume di 2-3 mL, al quale è stato aggiunto acido formico 0,1 M (8 mL), per regolare il pH del campione in vista della prima fase di purificazione con cartucce SPE Oasis HLB.

Prima di caricare i campioni sulle cartucce, queste sono state condizionate con metanolo (10 mL) e acido formico 0,1 M (10 mL), evitando sempre di far andare a secco la fase solida.

Una volta che il campione ha attraversato tutta la colonna, sono stati fatti 2 lavaggi, uno con acido formico 0,1 M (5 mL), e l'altro con una soluzione costituita al 50% da metanolo e al 50% da acido formico 0,1 M (5 mL).

Prima di procedere con l'eluizione dei campioni, è stato applicato il vuoto per 5 minuti per essere sicuri di aver eliminato completamente le soluzioni di lavaggio.

Gli analiti sono stati eluiti con 6 mL di una soluzione costituita al 99% da metanolo e all'1% da ammoniacca, e il campione raccolto è stato concentrato a bagnomaria, sotto flusso di azoto, fino ad ottenere un volume di circa 2 mL.

Si è proceduto quindi alla seconda fase di purificazione, mediante cartucce Supelclean™ ENVI-Carb™, precedentemente attivate con metanolo (10 mL).

Dopo aver caricato i campioni sulle cartucce, questi sono stati eluiti con una soluzione di 6 mL, costituita da metanolo ed acido acetico glaciale in proporzione 80:1 e per assicurarsi di

aver ottenuto una eluizione completa, anche in questo caso, si è applicato il vuoto per qualche secondo.

L'eluato è stato quindi desolvato mediante flusso di azoto, ed in seguito ricostituito con 200 mL di una soluzione costituita al 50% da metanolo e al 50% da acqua.

A questo punto il contenuto della provetta è stato trasferito in una microprovetta e centrifugato a 12.000 rpm per 45 minuti.

Infine sono stati prelevati 150 μ L di surnatante e trasferiti in vials di polipropilene, alle quali sono stati aggiunti 50 μ L di acqua, prima dell'analisi in UPLC-MS/MS.

Il procedimento appena descritto è schematizzato nella figura **3.1**.

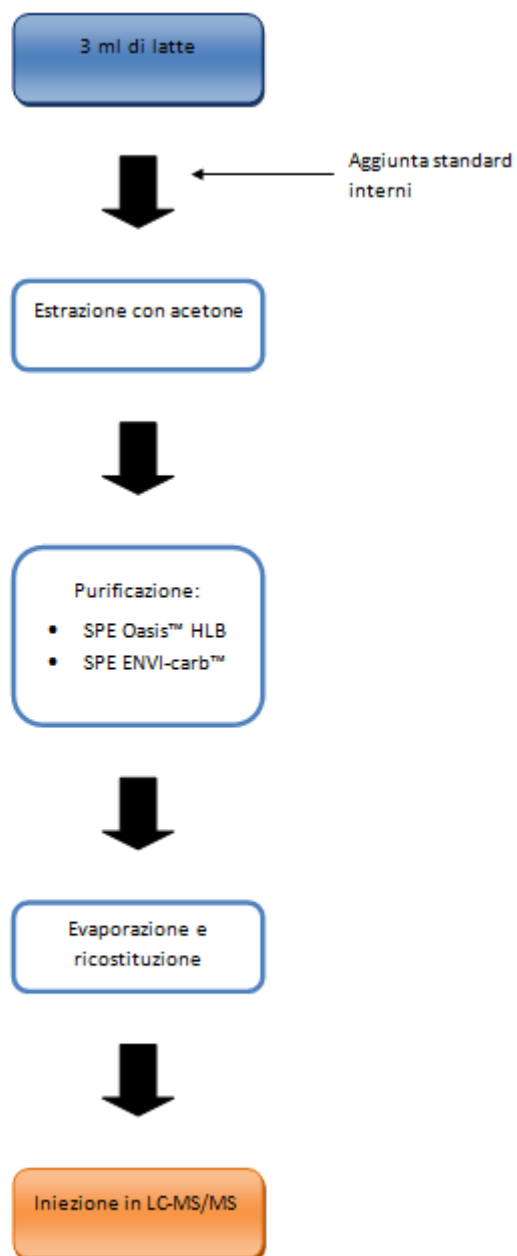


Fig.3.1 *Procedimento di estrazione dei campioni di latte schematizzato*

3.5.2 Campioni di pesce

Il metodo utilizzato per l'estrazione dei campioni di pesce è stato descritto da Lacina et al., (2011).

Una volta trasferiti 7,5 g di muscolo di branzino omogeneizzato in provette di polipropilene, sono stati aggiunti gli standard interni (45 μ L di *working solution* M-PFAS da 25 μ g/mL) e l'acqua ultrapura (10 g) ed è stato agitato il tutto per un minuto.

Le proteine presenti nei campioni sono state fatte precipitare con l'acido formico (0,2 mL) e l'acetonitrile (15 mL) e successiva agitazione mediante vortex.

La prima fase di purificazione del campione è stata ottenuta aggiungendo alle stesse provette $MgSO_4$ e NaCl (rispettivamente 6 e 1,5 g), e dopo agitazione vigorosa sono state centrifugate (9000 rpm per 15 minuti).

Nel frattempo, per poter effettuare la seconda fase di purificazione, sono state allestite altrettante provette in polipropilene, contenenti $MgSO_4$ (1,8 g), fase solida di C18 (0,18 g) e fase solida ENVI-Carb (0,09 g), ed in queste provette così preparate sono stati trasferiti in ognuna 12 mL di surnatante. Dopo circa un minuto di agitazione, i campioni sono stati nuovamente centrifugati (9000 rpm per 15 minuti).

Il nuovo surnatante (8 mL) è stato desolvato con flusso di azoto, prima di essere ricostituito con metanolo (0,5 mL).

L'estratto è stato infine filtrato con filtro PVDF da 0,2 μ m e iniettato nel sistema LC.

Il procedimento appena descritto è schematizzato nella figura **3.2**.

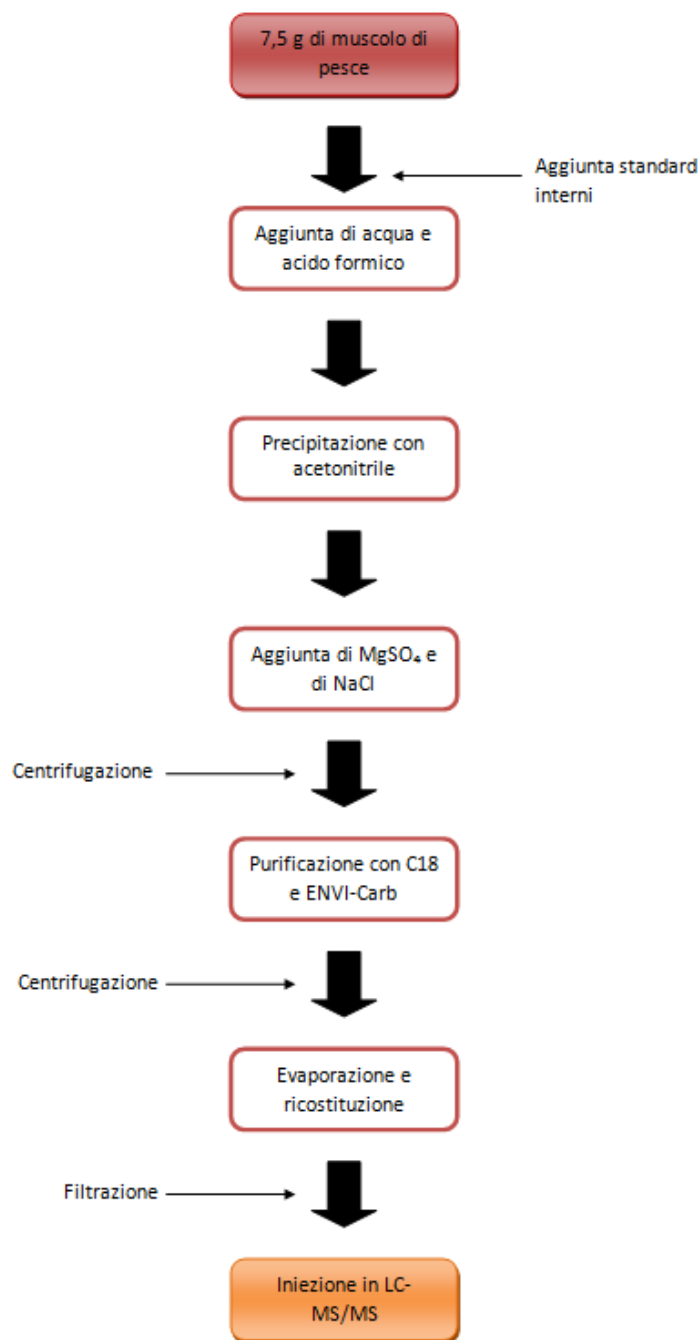


Fig.3.2 *Procedimento di estrazione dei campioni di pesce schematizzato*

3.6 QUANTIFICAZIONE

3.6.1 Campioni di latte

Per quantificare i campioni di latte sono state preparate rette di taratura in acqua, per ogni giorno d'analisi.

A 3mL di acqua sono stati addizionati 30 μL della *working solution* M-PFAS, aggiunti come standard interni, seguiti dall'aggiunta di quantità crescenti delle altre *working solution* di PFAS (a 5 $\mu\text{g/L}$ e a 50 $\mu\text{g/L}$), così come viene illustrato nella **Tabella 3.9**.

Nome	Concentrazione ($\mu\text{g/L} = \text{ppb}$)	μL M-PFAS (50 $\mu\text{g/L}$)	μL PFAS (5 $\mu\text{g/L}$)	μL PFAS (50 $\mu\text{g/L}$)
C0	0	30	-	-
C 0.025	0.025	30	15	-
C 0.05	0.05	30	30	-
C 0.1	0.1	30	60	-
C 0.2	0.2	30	120	-
C 0.5	0.5	30	-	30
C 1	1	30	-	60
C 2	2	30	-	120

Tabella 3.9 Preparazione della retta di taratura per campioni di latte.

Le 8 soluzioni ottenute, con concentrazioni da 0 a 2 $\mu\text{g/L}$, sono state processate con la stessa procedura di estrazione utilizzata per i campioni e poi iniettate nel sistema UPLC-MS/MS (vedi paragrafo 3.5, **Campioni di latte**).

3.6.2 Campioni di pesce

Per quantificare i campioni di pesce, valutare le prestazioni del metodo (in termini di specificità, linearità, accuratezza e precisione), e per ottenere le rette di taratura, sono stati utilizzati dei campioni di orata, nei quali era stata precedentemente confermata l'assenza di contaminanti.

La retta di taratura è stata preparata aggiungendo a 7,5 g di orata 45µL della *working solution* M-PFAS, come standard interni, e successivamente quantità crescenti delle altre *working solution* di PFAS (a 5 µg/L, 25 µg/L e 250 µg/L), così come viene illustrato nella **Tabella 3.10**.

Nome	Concentrazione (µg/Kg = ppb)	µL M-PFAS (25 µg/L)	µL PFAS (5 µg/L)	µL PFAS (25 µg/L)	µL PFAS (250 µg/L)
C0	0	45	-	-	-
C50	0,05	45	75	-	-
C100	0,1	45	100	-	-
C250	0,25	45	-	75	-
C500	0,5	45	-	150	-
C1000	1	45	-	300	-
C2000	2	45	-	-	60
C5000	5	45	-	-	150
C10000	10	45	-	-	300

Tabella 3.10 Preparazione della retta di taratura per campioni di pesce

Le 7 soluzioni ottenute con concentrazioni da 0 a 10 µg/Kg, sono state processate con la stessa procedura di estrazione utilizzata per i campioni e poi iniettate nel sistema UPLC-MS/MS (vedi paragrafo 3.5, **Campioni di pesce**).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 VERIFICA DELLE PRESTAZIONI DEL METODO

4.1.1 Campioni di latte

I campioni sono stati estratti secondo il protocollo descritto da Kadar et al. (2011), completamente convalidati in conformità con le linee guida CE (Decisione 2002/657/CE).

Durante la preparazione dei campioni sono stati messi in atto diversi accorgimenti per cercare di limitare al massimo le possibili interferenze. A tale scopo ad esempio sono state utilizzate provette e vials in polipropilene, anziché in vetro.

Per valutare le prestazioni del metodo sono stati utilizzati campioni di latte vaccino selezionati, in cui era stata già valutata l'assenza di contaminanti, poiché non era disponibile latte materno privo di questi contaminanti.

La specificità è stata valutata dunque attraverso l'analisi di questi campioni di latte non contaminati, escludendo la presenza di possibili composti interferenti e dunque con tempi di ritenzione simili (visibili nei cromatogrammi) a quelli di PFOS e PFOA.

L'attendibilità della quantificazione è da attribuire anche all'utilizzo di standard interni PFOS e PFOA marcati (M-PFOS e M-PFOA) in quanto, avendo strutture chimiche uguali a quelle delle molecole target, garantiscono un comportamento analogo in tutte le fasi di preparazione e di analisi del campione.

I parametri riportati nelle tabelle sono riferiti al latte vaccino ma, assumendo che la composizione del latte materno sia simile, si considerano applicabili anche ad esso.

La linearità del metodo è stata dimostrata iniettando una curva di calibrazione in matrice ad 8 punti (range 0-2 µg/L) durante ogni giornata di lavoro: il coefficiente di correlazione R^2 è risultato essere sempre maggiore di 0,99 per entrambi gli analiti, come mostrato in figura **4.1** e **4.2**.

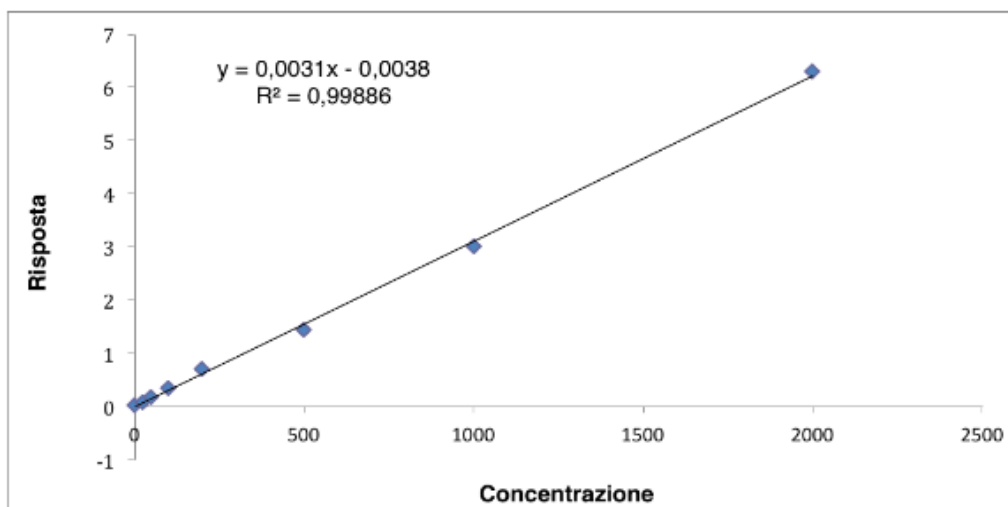


Fig. 4.1 Retta di taratura per il PFOS

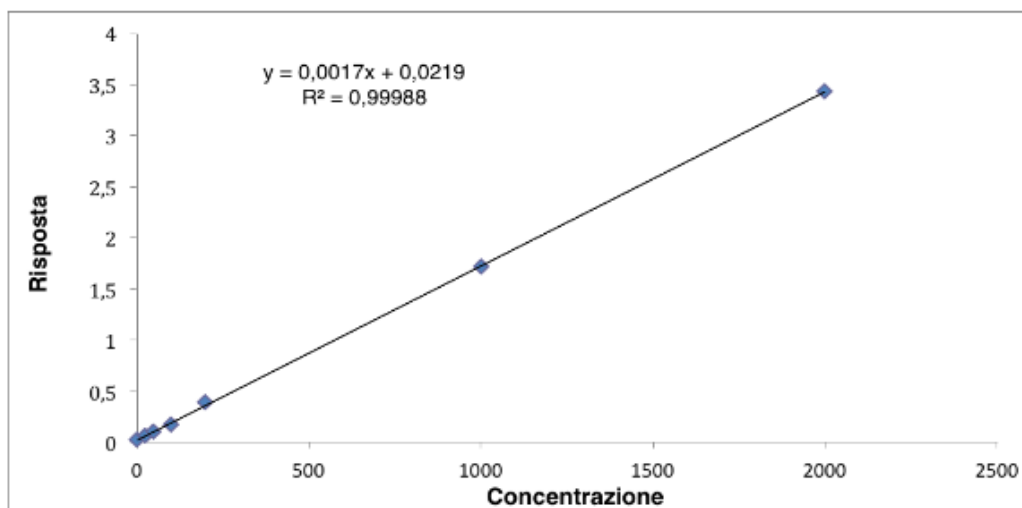


Fig. 4.2 Retta di taratura per il PFOA

La precisione del metodo è stata valutata tramite l'iniezione di latte bianco fortificato a quattro differenti concentrazioni (50, 200, 400 e 800 ng/L) e ripetuto in quadruplicato (**Tabella 4.1**)

I risultati relativi alla precisione sono stati soddisfacenti, con valori massimi di deviazione standard rispetto alla media (CV%) dell' 8%, così come quelli relativi all'esattezza, espressi come differenza relativa tra il valore medio misurato e la concentrazione fortificata, che sono risultati sempre sotto il 10%.

La retta di taratura è stata utilizzata anche per la determinazione del limite di rilevazione (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) del metodo, che corrispondono alle concentrazioni degli analiti che presentano un rapporto segnale/rumore maggiore o uguale rispettivamente a 3 e 10 (**Tabella 4.2**).

	PFOS	PFOA
LOD (ng/L)	5	8
LOQ (ng/L)	15	24

Concentrazione ng/L	ESATTEZZA (%)	PRECISIONE (%)
50	6,4	5,1
200	5,5	5,6
400	9,8	8,0
800	7,2	6,9

Tabella 4.1: *Prestazioni del metodo d'analisi in campioni di latte*

L'utilizzo di un UPLC ha permesso inoltre di ottenere tempi di analisi molto veloci, rispetto a quelli ottenibili con HPLC impiegata nella maggior parte dei lavori presenti in letteratura.

4.1.2 Campioni di pesce

Il metodo utilizzato per l'estrazione dei campioni di pesce è stato quello descritto da Lacina et al. (2011).

Anche in questo caso, durante la preparazione dei campioni sono state utilizzate provette e vials in polipropilene, anziché in vetro così come per la preparazione dei campioni di latte, per cercare di limitare al massimo le possibili interferenze.

Per quanto riguarda la separazione cromatografica è stata utilizzata, inizialmente, una colonna Waters Acquity UPLC BEH C18, così come riportato in letteratura da diversi Autori che hanno determinato i PFAS negli alimenti (Domingo et al., 2011; Haug et al., 2010).

Kadar et al. (2011) hanno messo in evidenza la presenza di alcune molecole naturalmente presenti nel pesce: gli isomeri dell'acido taurodesossisolico (TDCA). Queste molecole possono interferire, durante la determinazione del PFOS con lo spettrometro di massa, in quanto presentano una transizione in comune con questa sostanza ($498,6 > 80$), lo stesso peso molecolare e anche stessi tempi di ritenzione, causando di conseguenza possibili sovrastime del PFOS.

Si è deciso dunque di intervenire agendo sulla separazione cromatografica. I tentativi di modificare la fase mobile non hanno dato risultati soddisfacenti, per cui si è pensato di agire sulla fase fissa. La colonna BEH C18 è stata sostituita da una Waters Acquity UPLC HSS T3, compatibile al 100% con la fase mobile acquosa. Questo ha permesso di ottenere tempi di ritenzione diversi per le due molecole (PFOS e TDCA) e quindi ha consentito la quantificazione accurata dell'analita. La transizione $498,6 > 80$ che, utilizzando la colonna HSS T3, è risultata più intensa, è stata impiegata per la quantificazione dell'analita, mentre l'altra transizione $498,6 > 99,0$ (specifica solo del PFOS), è servita per confermarne l'identità. In Figura 4.3 sono riportati i cromatogrammi ottenuti con le due colonne impiegate.

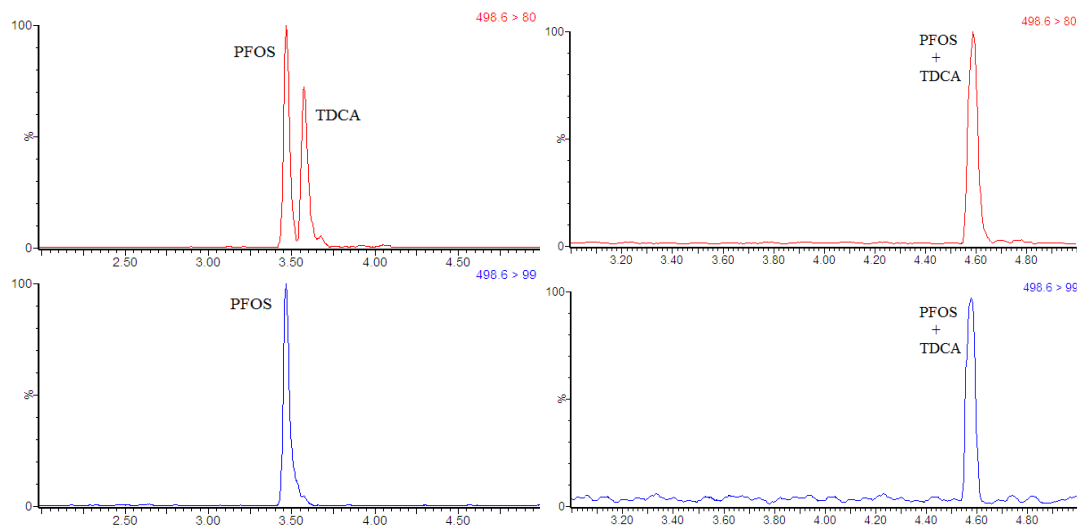


Fig. 4.3 *Confronto tra la separazione del PFOS e del TDCA, ottenuta con 2 diverse colonne: BEH C18 a sinistra, e HSS T3 a destra.*

La linearità del metodo è stata dimostrata iniettando una curva di calibrazione durante ogni giornata di lavoro: il coefficiente di correlazione R^2 è risultato essere sempre maggiore di 0,99, come si può osservare nella Fig.4.4.

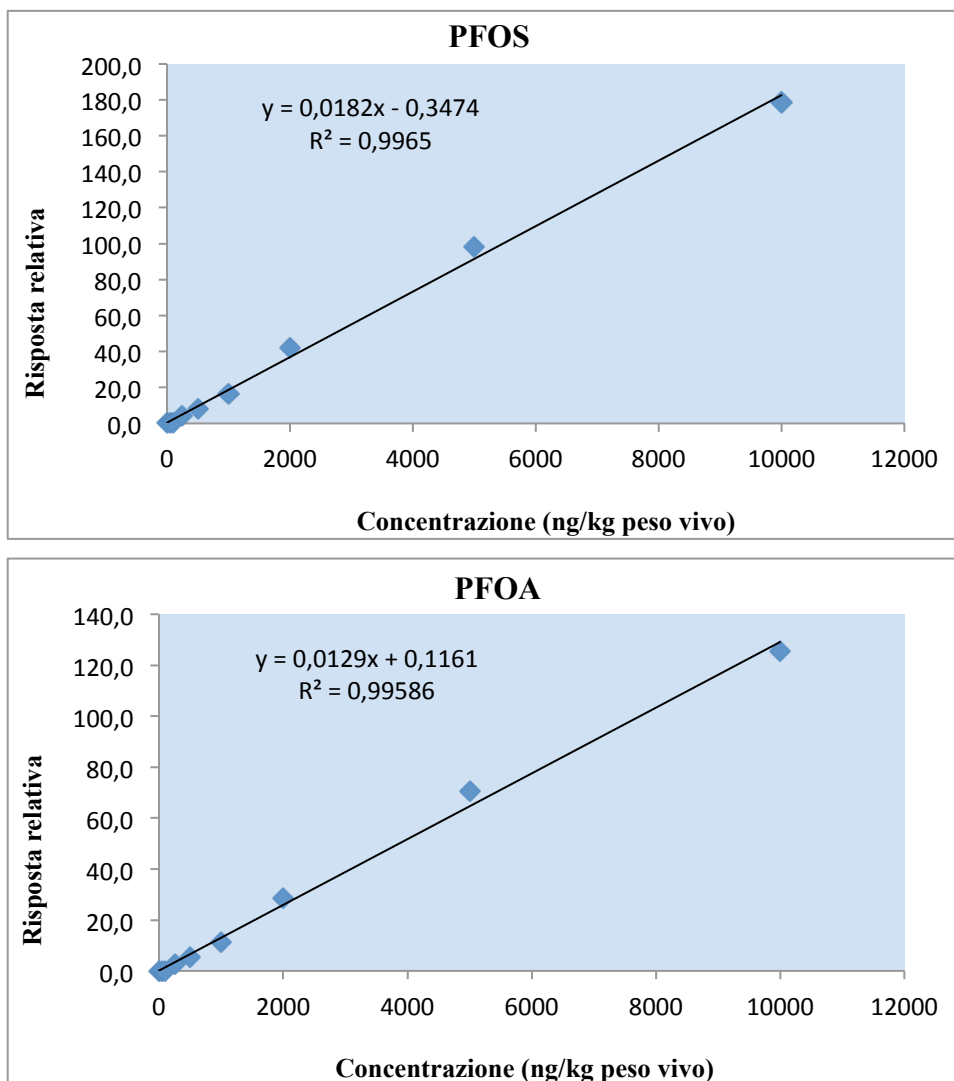


Fig. 4.4 Rappresentazione grafica delle rette di taratura per PFOS e PFOA in campioni di pesce

La retta di taratura è stata utilizzata anche per la determinazione del limite di rilevazione (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) del metodo, che corrispondono alle concentrazioni degli analiti che presentano un rapporto segnale/rumore maggiore o uguale rispettivamente a 3 e 10.

Per il calcolo dell'esattezza e della precisione del metodo sono state analizzate le aliquote di campioni di orata, fortificate a 100, 500 e 5000 ng/L e preparate in triplicato (**Tabella 4.2**).

	PFOS	PFOA
LOD (ng/Kg)	2	3
LOQ (ng/Kg)	6	9

Concentrazione ng/L	ESATTEZZA (%)		PRECISIONE (%)	
	PFOS	PFOA	PFOS	PFOA
100	13,4	12,4	10,4	11,1
500	9,2	9,4	6,6	7,5
5000	6,8	5,3	4,7	7,1

Tabella 4.2 Prestazioni del metodo d'analisi nel pesce

Le prestazioni del metodo sono state molto soddisfacenti, soprattutto in termini di bassi limiti di quantificazione ottenuti. I valori infatti sono stati più bassi rispetto a quelli riportati in altri lavori effettuati sempre sui pesci (Haug et al., 2010b; Berger et al., 2009; Nakata et al., 2006; Hloušková et al., 2013), e paragonabili come sensibilità a quelli di Lacina et al. (2011), anche se in questo caso gli Autori avevano utilizzato una trappola ionica come detector.

Anche in questo caso l'utilizzo di un UPLC ha permesso di ottenere tempi di analisi molto veloci (circa 8 minuti), rispetto ai tempi ottenuti in HPLC impiegata nella maggior parte dei lavori presenti in letteratura.

Una corsa cromatografica così breve, permette di analizzare un numero maggiore di campioni e in minor tempo, garantendo comunque l'accuratezza della misurazione e risultando quindi molto vantaggiosa nei monitoraggi su larga scala per la determinazione dei PFAS negli alimenti.

4.2 ANALISI DEI CAMPIONI

4.2.1 Latte vaccino

I dati delle concentrazioni di PFOS e PFOA rilevate nel latte vaccino sono riassunti nella tabella seguente.

Tipo di latte	N° campioni	PFOA			PFOS		
		Campioni <LOD	Campioni <LOQ	Range (ng/L)	Campioni <LOD	Campioni <LOQ	Range (ng/L)
Intero	6	2	1	0-27	0	1	0-31
Scremato	6	2	4	n.d.	0	2	0-26
Alta Qualità	37	30	7	n.d.	32	3	0-97
Biologico	12	5	5	0-32	6	3	0-32
Crudo	6	1	5	n.d.	0	2	0-67

Tabella 4.4: Risultati del monitoraggio sulla presenza di PFOS e PFOA nel latte vaccino (ng/L).

Questo lavoro è stato il primo monitoraggio su larga scala condotto in Italia, per valutare la presenza di sostanze perfluoroalchiliche in latte vaccino. I campioni collezionati, e provenienti da diverse zone, possono essere considerati rappresentativi della situazione del latte vaccino prodotto e disponibile in commercio nel Nord Italia.

Le molecole target sono state rilevate in maniera diffusa, e in particolare il PFOS è risultato presente in 29 campioni su 67, con concentrazioni massime misurate di 97 ng/L, mentre il PFOA è stato rilevato solo in 27 campioni, con concentrazioni massime di 32 ng/L.

Come è possibile osservare nella **tabella 4.4**, non esiste alcuna correlazione apparente tra il tipo di latte analizzato e i livelli di contaminazione riscontrati, né tra le concentrazioni di PFOS e PFOA misurate in ciascun campione.

La concentrazione massima di PFOS è stata rilevata in un campione di latte di “Alta qualità”, ma questo risultato non è stato confermato nei campioni dello stesso tipo.

Lo stesso discorso vale per il PFOA, che è stato riscontrato solo in pochi campioni di latte intero e biologico.

I dati ottenuti sono in linea con quelli riportati in altri recenti studi effettuati sul latte vaccino in vari paesi (Ericson et al., 2008; Mortimer et al., 2009; Haug et al., 2010; Lacina et al., 2011; Cornelis et al., 2012; Hlouskova et al., 2013), anche se in un paio di studi le concentrazioni misurate sono state più elevate, superando anche i 500 ng/L (Wang et al., 2010; Guerranti et al., 2013).

I risultati di questo studio indicano che non sembra sussistere un particolare rischio di esposizione ai PFAS legato al consumo di latte vaccino nel Nord Italia.

Più in generale, questi dati confermano che il latte, pur essendo un alimento importante per la dieta dell'uomo, non rappresenta una rilevante fonte di esposizione per i consumatori, e le concentrazioni misurate rientrano abbondantemente nei valori di TDI suggeriti dall'EFSA (EFSA, 2008).

Tuttavia, tenendo presente che il latte è una componente importante nella dieta di adulti e bambini, e considerando la variabilità che ci può essere tra i dati osservati, sarebbe utile raccogliere altri dati in merito e magari includere, in futuri monitoraggi, anche i prodotti derivati del latte, che potrebbero essere potenzialmente contaminati, anche in relazione a fattori di concentrazione dipendenti dalle fasi di lavorazione del prodotto.

4.2.2 Latte materno

I dati delle concentrazioni di PFOS e PFOA rilevate nel latte materno sono riportati nella tabella seguente.

		<i>N° campioni</i>	Campioni<LOQ	Conc. Minima (ng/L)	Conc. Massima (ng/L)	Media ± ES ^a (ng/L)
PFOS	Primipare	21	2	15	288	57±13
	Multipare	16	6	15	116	36±7
PFOA	Primipare	21	4	24	241	76±14
	Multipare	16	5	24	100	43±6

Tabella 4.5: Risultati del monitoraggio sulla presenza di PFOS e PFOA nel latte materno (ng/L) (Barbarossa et al., 2013).

Questo studio è stato il primo studio condotto in Italia sulla presenza di sostanze perfluoroalchiliche nel latte materno, in grado di individuare anche le concentrazioni delle ultra-tracce.

PFOS e PFOA erano presenti in tracce ($LOD < x < LOQ$) rispettivamente nel 22% e nel 24% dei campioni, ma in generale tutti i campioni di latte sono risultati contaminati.

In base alla tipologia di donatori, è stato anche osservato nel presente studio, che le concentrazioni medie e le frequenze sia del PFOS che del PFOA, erano più elevate nel latte proveniente da donne che allattano per la prima volta.

Il PFOS è stato quantificato nel 90% dei campioni ricevuti da madri primipare, e nel 62% di quelli ricevuti da madri multipare.

Si può osservare che, le concentrazioni di PFOS oscillavano nel range 15-288 ng/L, con valori medi di 57 ng/L nel caso delle donne che allattavano al seno per la prima volta, mentre nel caso di donne multipare il range era 15-116 ng/L (media 36 ng/L).

Anche il PFOA è stato quantificato maggiormente nei campioni ricevuti da madri primipare (81%), piuttosto che in quelli ricevuti da madri multipare (46%) e con concentrazioni rispettivamente del 24-241 ng/L (media 76 ng/L) e 24-100 ng/L (media 43 ng/L) come si può osservare in tabella 4.5.

Entrambi i valori più alti, sia per il PFOS (288 ng/L) che per il PFOA (241 ng/L), sono stati osservati in campioni ricevuti da donne primipare.

I dati ottenuti sono in linea con quelli riportati in studi simili, effettuati in altri paesi (Kadar et al., 2011; Fromme et al., 2010; Völkel et al., 2008; Kärman et al., 2007; Liu et al., 2010), e tutti questi lavori concordano sul fatto che, tra tutti i PFAS, il PFOS risulta essere il contaminante più abbondantemente ritrovato nei campioni analizzati.

Il PFOA, rilevato a livelli generalmente inferiori rispetto al PFOS, mostra invece una variabilità rilevante in termini di frequenza tra i vari studi, probabilmente dovuta all'alta variabilità dei limiti di quantificazione. Nel presente lavoro, per esempio, grazie alla buona sensibilità delle attrezzature utilizzate, è stato possibile determinare il PFOA in tutti i campioni analizzati, anche alle sue concentrazioni più basse.

Inoltre, anche se molti lavori hanno dimostrato che i livelli di PFAS nel sangue sono significativamente più alti di quelli riscontrati nel latte materno, è stato confermato il loro trasferimento dal primo verso il secondo durante l'allattamento, così come l'esistenza di una correlazione tra i valori misurati nel sangue e nel latte materno (Fromme et al., 2010).

Pertanto, nonostante l'esiguo numero di campioni analizzati in questo lavoro, si può notare una tendenza, per entrambi i composti a diminuire nel latte materno dopo la prima lattazione, come era già stato suggerito in uno studio precedente dagli autori Tao et al. (2008a).

Tale tendenza, se da un lato conferma il ruolo dell'allattamento come possibile e graduale via di eliminazione delle sostanze perfluoroalchiliche, dall'altro suggerisce anche il potenziale rischio di una maggiore esposizione nei bambini primogeniti.

Tuttavia, attraverso un recente studio, è stato notato che i livelli di PFAS presenti nelle donne pluripare, potrebbero essere influenzati dalla lunghezza dell'intervallo di tempo esistente tra una gravidanza e la successiva, ovvero che in caso di tempo prolungato tra le due gravidanze, i livelli di contaminazione del latte materno potrebbero avvicinarsi a quelli relativi al primo periodo di lattazione (Whitworth et al., 2012).

Ad ogni modo, se si considera il fatto che durante i primi mesi di vita il latte materno rappresenta l'unica fonte di nutrimento per i bambini, ed il loro ridotto peso corporeo, sarebbe

auspicabile eseguire ulteriori indagini relative alla contaminazione del latte materno da PFAS, per meglio delineare il rischio di esposizione infantile a questi contaminanti e i potenziali fattori che lo possono influenzare.

4.2.3 Pesci

I dati delle concentrazioni di PFOS e PFOA rilevate nelle varie specie di pesci analizzati, sono riportati nella tabella seguente.

Specie	PFOS		PFOA	
	Range ng/Kg	Media \pm DS (ng/Kg)	Range ng/Kg	Media \pm DS (ng/Kg)
Branzino	703 – 1243	1026 \pm 225,72	93 – 487	231 \pm 154,77
Cefalo	487 – 1896	926 \pm 564,86	12 - 113	47 \pm 39,01
Merluzzo	91 – 1292	716 \pm 529,84	tracce - 127	63 \pm 57,96
Occhiata	9 – 15	12 \pm 3	tracce	Tracce
Platessa	240 – 510	378 \pm 109,62	10 – 36	23 \pm 9,66
Sgombro	54 – 120	87 \pm 26,97	tracce - 22	9 \pm 8,82

Tabella 4.6: Risultati del monitoraggio sulla presenza di PFOS e PFOA nei pesci pescati (ng/Kg); (M = Mar mediterraneo; A = Atlantico).

Come si può notare, anche in tabella, la presenza sia di PFOS che di PFOA è stata osservata in tutti i campioni, con livelli di concentrazione maggiori del PFOS rispetto al PFOA e con valori rispettivamente inclusi nei seguenti range: 9-1896 ng/Kg (valore medio 524 ng/Kg), e 3-487 ng/Kg (valore medio 63 ng/Kg).

La più elevata concentrazione di PFOS è stata misurata in un campione di cefalo (1896 ng/Kg), ma anche in campioni di merluzzo e branzino sono state ritrovate concentrazioni piuttosto alte (con valori compresi tra 1200 e 1300 ng/Kg).

Per quanto riguarda il PFOA, la concentrazione maggiore è stata ritrovata nel branzino (487 ng/Kg), seguita da campioni di cefalo e merluzzo (rispettivamente pari a 113 ng/Kg e 127 ng/Kg).

Nonostante l'esiguo numero di campioni a nostra disposizione, i dati di questo studio ci hanno permesso di osservare delle differenze esistenti tra le varie specie, dovute ad una serie di fattori che possono influenzare i livelli di contaminazione dei pesci. Uno dei fattori più importanti è l'ambiente, e bisognerebbe infatti avere il maggior numero di informazioni disponibili inerenti al sito di prelievo, per poter meglio definire il contributo dei possibili fattori antropici, anche in base alla distanza dalla costa e all'esistenza di zone limitrofe più o meno industrializzate.

Da questo monitoraggio è emerso che cefalo e branzino (entrambi viventi nelle acque costiere) sono due delle specie maggiormente contaminate.

In uno studio condotto in Svezia, per valutare le differenze tra i livelli di concentrazione dei PFAS, misurati in diverse tipologie di pesce, sia nel mare aperto (Mar Baltico) che in un bacino chiuso (come il Lago Vättern) era stata evidenziata una concentrazione maggiore di contaminanti nel bacino chiuso (Berger et al., 2009), per cui è presumibile pensare anche nel nostro caso, che allo stesso modo, il Mar Mediterraneo sia un mare semichiuso che riceve acque da svariati fiumi, con conseguente concentrazione dei contaminanti.

Un altro fattore da non sottovalutare è quello legato alle abitudini alimentari, per esempio nel nostro studio è emerso che tra i pesci più contaminati ci sono dei predatori carnivori (merluzzo e branzino), confermando dunque la capacità di bioaccumulo di questi contaminanti. A tal proposito anche l'età dei pesci potrebbe giocare un ruolo determinante, suggerendo un maggiore accumulo dei contaminanti negli esemplari più vecchi.

Un'altra differenza osservata in questo lavoro, è stata quella relativa alle specie analizzate, che erano tutte pescate e risultate contaminate, al contrario del campione di orata (utilizzato poi per la costruzione della retta di taratura), che è risultato privo di contaminanti e che proveniva da allevamento, a conferma dell'influenza delle abitudini alimentari sulla possibile contaminazione.

Infine è emerso che, le specie magre analizzate (merluzzo, cefalo e branzino), sono risultate maggiormente contaminate rispetto a quelle grasse.

Risultati simili erano già stati ottenuti in crostacei e pesci magri nello studio condotto da Noorlander et al. (2011), e questi risultati potrebbero dipendere dal fatto che le sostanze perfluoroalchiliche possiedono un'elevata affinità per le proteine, a differenza di altri inquinanti alogenati che tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo.

Ad ogni modo, nonostante la variabilità dei dati e il ridotto numero di campioni, i risultati ottenuti in questo studio confermano la presenza rilevante dei PFAS nel pesce e di conseguenza il suo ruolo di fonte d'esposizione umana.

4.2.4 Branzino

I dati delle concentrazioni di PFOS e PFOA rilevate nei vati campioni di branzino analizzati, sono riportati nella tabella seguente.

	Tipo	Peso medio (g)	PFOS		PFOA	
			Range ng/Kg	Media \pm DS (ng/Kg)	Range ng/Kg	Media \pm DS (ng/Kg)
1	A. intensivo	486,9	24,5 - 104,5	53,8 \pm 26,0	<9 - 51,4	21,2 \pm 16,7
2	A. intensivo	366,1	11,1 - 41,7	23,8 \pm 10,0	<9 - 15,0	10,1 \pm 2,4
3	A. intensivo	375,8	14,4 - 39,8	22,6 \pm 8,3	<9 - 10,2	9,3 \pm 0,6
4	Pescati	1288,9	112,4 - 1242,9	607,6 \pm 468,3	<9 - 487,0	120,2 \pm 155,9
5	Pescati	701,0	1448,0 - 2326,0	1859,9 \pm 230,9	9,1 - 68,5	25,0 \pm 19,3
6	A. intensivo	421,9	26,1 - 42,0	33,9 \pm 6,1	<9 - 23,5	21,0 \pm 4,3
7	A. semi-intensivo	530,6	58,6 - 334,8	154,9 \pm 100,5	26,1 - 66,5	36,6 \pm 14,0
8	A. semi-intensivo	670,7	24,8 - 41,2	35,2 \pm 3,9	<9 - 24,8	18,1 \pm 9,6
9	A. estensivo	658,9	461,2 - 839,6	659,5 \pm 131,4	28,5 - 34,5	30,4 \pm 2,7
10	A. intensivo	335,2	24,9 - 50,1	35,7 \pm 7,7	<9 - 29,6	24,3 \pm 8,6
11	A. intensivo	412,0	26,3 - 60,8	33,9 \pm 10,5	20,7 - 23,7	21,9 \pm 1,0
12	A. intensivo	364,3	29,1 - 52,3	38,3 \pm 9,0	19,8 - 24,3	21,6 \pm 1,4
13	Pescati	713,4	397,9 - 2578,9	1397,1 \pm 727,8	27,0 - 30,8	28,3 \pm 1,4
14	Pescati	655,9	783,0 - >10000	4021,3 \pm 3617,8	27,1 - 101,9	42,5 \pm 25,6

Tabella 4.7 Risultati del monitoraggio sulla presenza di PFOS e PFOA nei branzini (ng/Kg). Nel calcolo dei valori è stato utilizzato un approccio “upper bound” portando i valori in tracce al livello del LOQ.

Tipologia di allevamento e sito di provenienza dei vari gruppi:

1- Allevamento intensivo in gabbie galleggianti, Monfalcone -GO(ITA);2- Allevamento intensivo in gabbie galleggianti, Pachino – Capo Passero - SR (ITA); 3- Allevamento intensivo in gabbie galleggianti, Golfo Aranci – Isola Figarolo – OT (ITA); 4- Branzini pescati provenienti dall’Adriatico Nord Occidentale(ITA); 5- Branzini pescati provenienti dal Tirreno(ITA); 6- Allevamento intensivo in gabbie sommerse, Lavagna (ITA); 7- Allevamento semi- intensivo in vasche a terra,Porto Tolle (ITA); 8- Allevamento semi- intensivo in vasche a terra, Follonica (ITA); 9- allevamento estensivo,Porto Tolle (ITA); 10- Allevamento intensivo in gabbie galleggianti, Pakostane (HR); 11- Allevamento intensivo in gabbie galleggianti, Podruh (TR); 12- Allevamento intensivo in gabbie galleggianti, Koropiu (GR); 13-Branzini pescati nell’Atlantico nord-orientale (FR); 14- Branzini pescati nel Golfo del Leone (FR).

Il PFOS è stato rilevato in tutti i campioni analizzati, in concentrazioni che oscillano da 11,1 a oltre 10.000 ng/Kg.

I valori più alti di PFOS sono stati riscontrati nei branzini pescati nel Golfo del Leone, in Francia (gruppo 14) e relativi al periodo primavera/estate, e che presentando livelli di concentrazione superiori al punto più alto della retta di calibrazione, sono stati riportati in tabella come > 10.000, in quanto non è stato possibile quantificarli con precisione.

Nella figura 4.4 è possibile osservare il confronto tra i cromatogrammi relativi alle transizioni del PFOS in un campione di orata (bianco) utilizzato per costruire la retta di taratura, e in uno dei campioni di branzino.

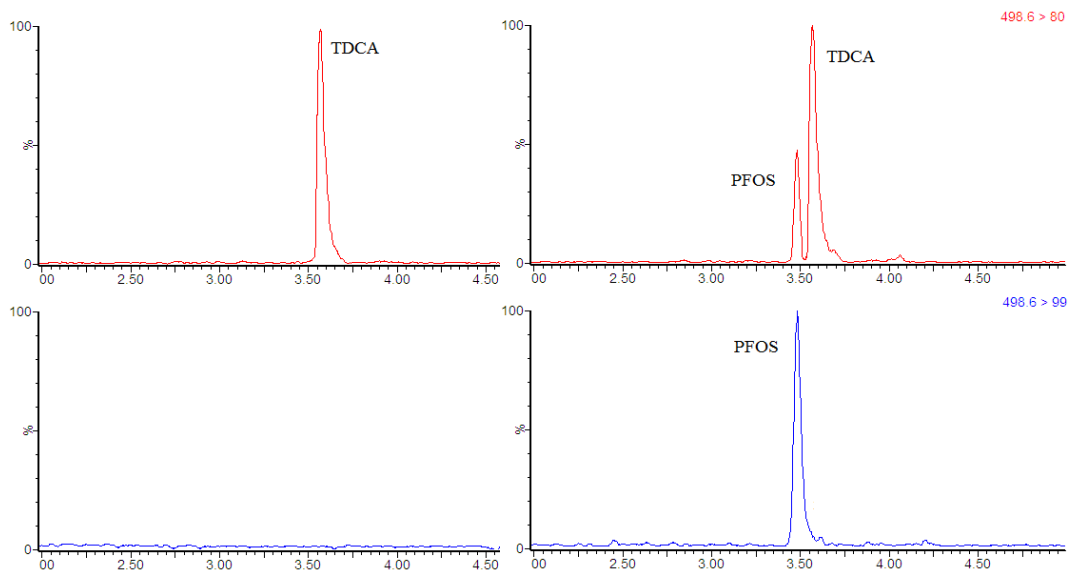


Fig.4.5 Cromatogrammi relativi alle transizioni del PFOS in un campione bianco (a sinistra) e in un campione di branzino (a destra).

Per quanto riguarda il PFOA invece, i valori più alti sono stati rilevati nei campioni provenienti da branzini pescati in acque italiane, nell'Adriatico Nord Occidentale (gruppo 4), nel periodo autunno/inverno, con valori che oscillano tra i 92,8 e i 487 ng/Kg.

Alti valori di PFOA si sono registrati anche nei campioni di branzini pescati nel periodo primavera/estate nel Golfo del Leone, in Francia (gruppo 14), già precedentemente citato come il gruppo con il più alto contenuto di PFOS.

La media dei livelli di PFOS nei pesci allevati è risultata pari a 109,1 ng/Kg, mentre quella dei pesci pescati è stata di 1971,5 ng/Kg.

La media dei livelli di PFOA invece, è risultata essere di 21,4 ng/Kg nei pesci allevati, e di 54,0 ng/Kg nei pesci pescati.

In generale, osservando i risultati ottenuti in questo lavoro, possiamo desumere che esiste una notevole differenza, in termini di livelli di concentrazione di PFAS, tra i branzini pescati e quelli allevati.

Questa osservazione è evidente nel caso del PFOS, che ha dimostrato raggiungere livelli di contaminazione molto maggiore (circa 40 volte) nei pesci pescati rispetto a quelli allevati, mentre nel caso del PFOA questa differenza esiste ma in misura minore, probabilmente dovuta alla maggiore variabilità dei dati.

I dati relativi ai livelli di concentrazione di PFOS e PFOA sono stati confrontati anche con il peso medio dei branzini esaminati (i branzini pescati presentano un peso medio superiore rispetto a quelli allevati) (vedi Tabella 4.7).

Se si considera il fatto che solitamente gli allevamenti impongono un ciclo di vita inferiore ai pesci, i branzini allevati avranno sicuramente minore possibilità di accumulare PFAS nel tempo, e quindi questo potrebbe in parte spiegare la loro minore contaminazione.

Tuttavia, confrontando i livelli di concentrazione del PFOS tra i gruppi di branzini pescati, manca una correlazione tra il peso e la contaminazione da PFAS, ed è dunque presumibile che altre cause siano in grado di influenzare i livelli di PFAS nei branzini (alimentazione, sito di prelievo etc.).

Dall'analisi di questi risultati possiamo affermare che il PFOS è il composto perfluoroalchilico predominante nei branzini pescati. Anche il PFOA è stato rilevato in

diversi campioni, ma a livelli nettamente inferiori, confermando comunque la maggiore contaminazione dei pesci pescati.

Si è potuto osservare con questo monitoraggio che le concentrazioni più elevate, di entrambi PFOS e PFOA, sono state ritrovate nei branzini provenienti da allevamento estensivo, mentre quelli provenienti da allevamento intensivo sono risultati i meno contaminati.

Nessuna correlazione è invece stata osservata tra le concentrazioni di PFAS e il periodo di campionamento (primavera/estate e autunno/inverno).

In accordo con i dati presenti in letteratura, relativi agli studi condotti per valutare la presenza di PFAS nel pesce, il PFOS è la sostanza perfluoroalchilica più diffusa sia in termini di quantità che di frequenza.

I dati ottenuti indicano livelli di contaminazione di gran lunga inferiori rispetto a quelli riportati in altri lavori (Gulkowaska et al., 2006; Berger et al., 2009; Schuetze et al., 2010; Domingo et al., 2012; Guo et al., 2012; Hloušková et al., 2013), così come si può osservare nella **tabella 4.8**.

Luogo di campionamento	PFOS (ng/Kg)	PFOA (ng/Kg)	Autore
Italia	12625	5000	<i>Nania et al., 2009</i>
Italia	11,1 - > 2000	< 9 - 487,0	<i>Farabegoli et al., 2013</i>
Svezia	1000 - 12000	100 - 250	<i>Berger et al., 2009</i>
Germania	35200	<300	<i>Schuetze et al., 2010</i>
Repubblica Ceca	<1400	<900	<i>Hradkova et al., 2010</i>
Repubblica Ceca	< 842000	-	<i>Hloušková et al., 2013</i>
Spagna	2700	74	<i>Domingo et al., 2012</i>
USA	16600	39,8	<i>Guo et al., 2012</i>
Cina	1800	500	<i>Gulkowaska et al., 2006</i>

Tabella 4.8: Confronto tra le medie dei livelli di PFOS e PFOA, presenti in letteratura

In particolare il monitoraggio effettuato nel 2009 da Nania et al., relativo alle acque del Mar Mediterraneo riporta valori nettamente superiori (circa 20 volte) a quelli ottenuti in questo lavoro, soprattutto in relazione ai livelli di PFOA.

Anche in questo caso la variabilità dei dati è stata elevata ed è stata attribuita ad altre possibili cause di contaminazione.

Più in generale per interpretare la variabilità dei dati presenti in letteratura bisognerebbe considerare anche la possibile sovrastima dei valori di PFOS, sia per la presenza di acidi biliari interferenti (TDCA), sia per il tipo di campionamento effettuato, in base alla vicinanza degli scarichi industriali ai siti di prelievo dei campioni, come evidenziato nello studio di Hloušková et al., nel quale, le concentrazioni di PFOS, ritrovate in pesci raccolti intenzionalmente vicino a zone altamente industrializzate, hanno dimostrato raggiungere livelli elevatissimi (PFOS < 842000 ng/Kg), (Hloušková et al., 2013).

CONCLUSIONI

La ricerca riportata nella presente tesi è stata svolta presso il Laboratorio di Chimica Analitica Bio-Agroalimentare (CABA-Lab) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

I risultati ottenuti hanno consentito di acquisire nuovi dati relativi alla presenza dei PFAS negli alimenti che contribuiscono alla produzione di stime più accurate sull'esposizione a questi contaminati, in accordo con la Raccomandazione 161/2010.

Considerando che in Italia i dati relativi alla presenza di PFAS negli alimenti sono ancora piuttosto scarsi, è stato inizialmente effettuato un monitoraggio preliminare sulla presenza di PFOS e PFOA in latte italiano vaccino ed umano.

I dati ottenuti indicano che i livelli di PFAS del latte vaccino, prodotto e commercializzato nel Nord Italia, non risultano particolarmente elevati e che non è stata osservata nessuna correlazione apparente tra il tipo di latte e le concentrazioni riscontrate. Ciò, in accordo con i dati riportati in indagini similari svolte in altri Paesi, conferma che il latte vaccino non sembra una fonte importante di esposizione per i consumatori. Considerando comunque l'esistenza di una certa variabilità tra i risultati, sarebbe comunque importante proseguire la raccolta di dati su questa matrice, componente importante nella dieta di adulti e bambini, includendo anche i prodotti derivati.

In ogni caso, le concentrazioni dei PFAS misurate nel latte vaccino sono nettamente inferiori a quelle riscontrate nel latte materno umano che, nella fase successiva del progetto, ha fornito un primo quadro sul livello di contaminazione del latte materno italiano.

E' stato confermato il ruolo dell'allattamento come principale fonte di PFOS e PFOA per i neonati, ed in particolar modo è stato evidenziato un rischio di esposizione più alto per i primogeniti, dovuto all'accumulo di queste sostanze nel corpo materno, durante tutta la vita, fino alla prima gravidanza.

Anche se il numero di campioni analizzati è piuttosto basso per trarre conclusioni statisticamente significative, è stata osservata una tendenza per entrambi i composti a

diminuire nel latte dopo la prima lattazione, suggerendo il ruolo dell'allattamento al seno come via importante di eliminazione dei composti perfluoroalchilici.

I risultati di questo studio preliminare, in accordo con i dati provenienti da altri recenti ricerche, indicano, comunque, un rischio tossicologico moderato legato all'assunzione di questi contaminanti attraverso l'allattamento al seno.

La seconda parte del lavoro è stata rivolta all'analisi di PFAS in campioni di pesce che, ad oggi, in accordo con il parere espresso dall' EFSA, risulta essere la tipologia di alimento più contaminata.

E' stato condotto un primo monitoraggio su pesce fresco proveniente dalla grande distribuzione dell'area di Bologna che comprende 6 specie diverse: platessa, merluzzo, sgombro, occhiata, cefalo e branzino. I risultati di queste analisi hanno confermato la contaminazione dell'alimento a livelli rilevanti, ma anche la notevole variabilità delle concentrazioni misurate.

I fattori che possono influenzare il livello di contaminazione da PFAS sono legati a molte variabili quali ad esempio la specie, la posizione nella catena alimentare, l'ambiente, l'età.

L'indagine è quindi proseguita effettuando un monitoraggio su ampia scala su esemplari di branzino, proponendo per la prima volta un'elevata quantità di dati monospecie. Sono stati analizzati 140 campioni di branzini provenienti da diverse aree (in particolare Mar Mediterraneo), sia pescati che allevati e prelevati in due differenti momenti dell'anno: primavera/estate ed autunno/inverno.

La scelta del branzino è stata dettata dal fatto che questa specie è stata considerata ideale per la valutazione dei PFAS nei prodotti ittici, in quanto predatore e dunque un buon accumulatore di sostanze perfluoroalchiliche e per il fatto che è largamente diffusa nelle acque dei mari europei e, di conseguenza nel mercato italiano.

Dai risultati di questo lavoro è emersa una notevole differenza in termini di contenuto di PFAS tra i pesci pescati e quelli provenienti da allevamenti, in particolare per quanto riguarda il PFOS.

Le analisi condotte sul PFOA hanno invece fornito dati più variabili per cui non risulta così netta questa differenza tra soggetti pescati e allevati.

Non è stata notata alcuna differenza rilevante tra i livelli di PFAS registrati nel semestre primavera/estate e quelli relativi alle stagioni autunno/inverno.

I risultati ottenuti, in accordo con i lavori presenti in letteratura riguardanti la presenza di PFAS nel pesce, portano alla conclusione che il PFOS è il composto perfluorurato predominante, sia in termini di frequenza che di quantità.

Infine un altro fattore estremamente importante emerso dai dati ottenuti e dal confronto con quelli presenti in letteratura è che le restrizioni in atto da qualche anno nella produzione di PFAS stanno portando ad un calo globale dei livelli di contaminazione, con un conseguente calo del rischio per la salute umana ed ambientale.

BIBLIOGRAFIA

3M

“The science of organic fluorochemistry”

(1999)

Antignac J-P , Veyrand B, Kadar H, Marchand P, Oleko A, Le Bizec B Vandentorren, S

“Occurrence of perfluorinated alkylated substances in breast milk of French women and relation with socio-demographical and clinical parameters: Results of the ELFE pilot study”

Chemosphere 91 (2013) 802–808

Awad E, Zhang X, Bhavsar SP, Petro S, Crozier PW, Reiner EJ, Fletcher R, Tittlemier SA, Braekevelt E

“Long-term environmental fate of perfluorinated compounds after accidental release at Toronto airport”

Environmental Science & Technology (2011), 45 (19), 8081-8089

Bakke T, Boitsov S, Brevik EM, Gabrielsen GW, Green N, Helgason LB, Klungsøyr J, Leknes H, Miljeteig C, Måge A, Rolfsnes BE, Savinova T, Schlabach M, Skaare BB, Valdersnes S

“Mapping of selected organic contaminants in the Barents Sea 2007.”

Report 1021 (2008)

<http://www.klif.no/publikasjoner/2400/ta2400.pdf> (last accessed: 23 January 2012)

Barbarossa A, Masetti R, Gazzotti T, Zama D, Astolfi A, Veyrand B, Pession A, Pagliuca G

“Perfluoroalkyl substances in human milk: A first survey in Italy”

Environment International 51 (2013) 27–30

Barber JL, Berger U, Chaemfa C, Huber S, Jahnke A, Temme C, Jones KC

“Analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in air samples from Northwest Europe”

Journal of Environmental Monitoring (2007), 9 (6), 530-541

Begley TH, Hsu W, Noonan G, Diachenko G.

“Migration of fluorochemical paper additives from food-contact paper into foods and food simulants”

Food Additives and Contaminants. 2008;25(3):384-390.

Berger U, Glynn A, Holmström KE, Berglund M, Ankarberg EH, Törnkvist A.

“Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Sweden—Analysis of edible fish from Lake Vättern and the Baltic Sea.”

Chemosphere. 2009;76(6):799-804.

BfR (Bundensinstitut für Risikobewertung)

“Expert panel confirms: PFC exposure of consumers through foodstuffs is very low”

BfR Information Nr. 015 (2010)

http://www.bfr.bund.de/cm/349/expert_panel_confirms_pfc_exposure_of_consumers_through_foodstuffs_is_very_low.pdf (last accessed: 23 January 2012)

Brooke D, Footitt A, Nwagou TA

“Environmental risk evaluation report: perfluorooctanesulphonate (PFOS)”

(2004)

http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/submissions/Comments_2006/sia/pfos.uk.risk.eval.report.2004.pdf (last accessed: 23 January 2012)

Buck RC, Franklin J, Berger U, Conder JM, Cousins IT, de Voogt P, Jensen AA, Kannan K, Mabury SA, van Leeuwen SPJ

“Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification and origins”

Integrated Environmental Assessment and Management (2011), 7 (4), 513-541

Butt CM, Berger U, Bossi R, Tomy GT

“Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment”

Science of The Total Environment (2010), 408 (15), 2936-2965

Comitato Economico e Sociale Europeo (2006)

“Parere 2006/C195/03 del 17 maggio 2006 in merito alla Proposta di direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso dei perfluorottano solfonati “

(modifica della direttiva 76/769/CEE del Consiglio). Gazzetta Ufficiale dell’Unione europea del 18/8/2006, pag. C195/10-C195/13.

Committee on Toxicity

“COT statement on the tolerable daily intake for perfluorooctane sulfonate”

(2009)

<http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotstatementpfos200609.pdf> (last accessed: 23 January 2012)

Committee on Toxicity

“COT statement on the tolerable daily intake for perfluorooctanoic acid”

(2010)

<http://cot.food.gov.uk/pdfs/cotstatementpfoa200610.pdf> (last accessed: 23 January 2012)

Cornelis C, D’Hollander W, Roosens L, Covaci A, Smolders R, Van Den Heuvel R, *et al.*

“First assessment of population exposure to perfluorinated compounds in Flanders, Belgium.”

Chemosphere. 2012;86(3):308-314.

D’Hollander W, de Voogt P, De Cohen W, Bervoets L

“Perfluorinated substances in human food and other sources of human exposure”

Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (2010), 208, 179-215

De Witt JC, Shnyra A, Badr MZ, Loveless SE, Hoban D, Frame SR, Cunard R, Anderson SE, Meade BJ, Peden-Adams MM, Luebke RW, Luster MI

“Immunotoxicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate and the role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha”

Critical Reviews in Toxicology (2009), 39 (1), 76-94

Domingo JL, Ericson-Jogsten I, Nadal M, Perelló G, Bigas E, Llebaria X, van Bavel B

“Exposure to perfluorinated compounds through drinking water, and fish and seafood by the population of Catalonia (Spain)”

Organohalogen Compounds (2011), 73, 969-972

Domingo JL, Ericson-Jogsten I, Perelló G, Nadal M, Van Bavel B, Kærstner A.

“Human exposure to perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: contribution of drinking water and fish and shellfish.”

Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(17):4408-4415.

EFSA (European Food Safety Authority)

“Perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts – Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain”

The EFSA Journal (2008), 653, 1-131

EFSA (European Food Safety Authority)

“Results of the monitoring of perfluoroalkylated substances in food in the period 2000-2009”

The EFSA Journal (2011), 9(2):2016, 1-34

EFSA (European Food Safety Authority)

“Perfluoroalkylated substances in food: occurrence and dietary exposure”

The EFSA Journal.2012;10(6),2743:1-55

Ericson I, Gómez M, Nadal M, van Bavel B, Lindström G, Domingo JL

“Perfluorinated chemicals in blood of residents in Catalonia (Spain) in relation to age and gender: a pilot study”

Environmental International (2007), 33 (5), 616-623

Ericson I, Martí-Cid R, Nadal M, van Bavel B, Lindström G, Domingo JL

“Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) market”

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2008), 56 (5), 1787-1794

Ericson I, Nadal M, van Bavel B, Lindström G, Domingo JL

“Levels of perfluorochemicals in water samples from Catalonia, Spain: is drinking water a significant contribution to human exposure?”

Environmental Science and Pollution Research (2008b), 15 (7), 614-619

Falandysz J, Taniyasu S, Gulkowska A, Yamashita N, Schulte-Oehlmann U

“Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic Coast?”

Environmental Science & Technology (2006), 40 (3), 748-751

Farabegoli F, Barbarossa A, Devicienti C, Scardilli M, Zironi E, Pirini M, Badiani A, Pagliuca G, Gazzotti T

“Preliminary investigation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of perfluorinated compounds presence in bass reared and fished in Italy”

Journal of Food Safety 2013; volume 2:e48

Felizeter S, McLachlan M, De Voogt P

“Uptake of perfluorinated alkyl substances by hydroponically grown lettuce (Lactuca sativa) and tomato (Solanum lycopersicum)”

Organohalogen Compounds (2011), 73, 947-948

Fromme H, Schlummer M, Möller A, Gruber L, Wolz G, Ungewiss J, Böhmer S, Dekant W, Mayer R, Liebl B, Twardella D

“Exposure of an adult population to perfluorinated substances using duplicate diet portions and biomonitoring data”

Environmental Science & Technology (2007a), 41 (22), 7928-7933

Fromme H, Midasch O, Twardella D, Angerer J, Boehmer S, Liebl B

“Occurrence of perfluorinated substances in an adult German population in southern Bavaria”

International Archives of Occupational and Environmental Health (2007b), 80 (4), 313-319

Fromme H, Tittlemier SA, Völkel W, Wilhelm M, Twardella D

“Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries”

International Journal of Hygiene and Environmental Health (2009), 212 (3), 239-270

Fromme H, Mosch C, Morovitz M, Alba-Alejandre I, Boehmer S, Kiranoglu M, Faber F, Hannibal I, Genzel-Boroviczeny O, Koletzko B, Völkel W

“Pre- and postnatal exposure to perfluorinated compounds (PFCs)”

Environmental Science & Technology (2010), 44 (18), 7123-7129

Giesy JP and Kannan K

“Global distribution of perfluorooctanesulfonate in wildlife”

Environmental Science & Technology (2001), 35 (7), 1339-1342

Guerranti C, Perra G, Corsolini S, Focardi SE.

“Pilot study on levels of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in selected foodstuffs and human milk from Italy.”

Food Chem. 2013 Sep 1;140(1-2):197-203.

Gulkowska A, Jiang Q, So MK, Taniyasu S, Lam PKS, Nobuyoshi Y

“Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China”

Environmental Science & Technology (2006), 40 (12), 3736-3741

Guo R, Reiner EJ, Bhavsar SP, Helm PA, Mabury SA, Braekevelt E, et al.

“Determination of polyfluoroalkyl phosphoric acid diesters, perfluoroalkyl phosphonic acids, perfluoroalkyl phosphinic acids, perfluoroalkyl carboxylic acids, and perfluoroalkane sulfonic acids in lake trout from the Great Lakes region.”

Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012;404(9):2699-2709.

Halldorsson TI, Fei C, Olsen J, Lipworth L, McLaughlin JK, Olsen SF.

“Dietary predictors of perfluorinated chemicals: a study from the Danish National Birth Cohort”.

Environmental Science & Technology. 2008;42(23):8971-8977.

Hansen KJ, Johnson HO, Elridge JS, Buthenhoff JL, Dick LA

“Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee river”

Environmental Science & Technology (2002), 36 (8), 1681-1685

Harada K, Nakanishi S, Saito N, Tsutsui T, Koizumi A.

“Airborne perfluorooctanoate may be a substantial source contamination in Kyoto area, Japan”

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2005;74(1):64-9

Haug Ericson I, Martí-Cid R, Nadal M, van Bavel B, Lindström G, Domingo JL

“Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) market”

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2008a), 56 (5), 1787-1794

Haug LS, Salihovic S, Jogsten IE, Thomsen C, van Bavel B, Lindström G, Becher G

“Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway”

Chemosphere (2010a), 80 (10), 1137-1143

Haug L.S., Thomsen C., Brantsæter, A.L., Kvalem H.E., Haugen M., Becher G., Alexander J., Meltzer H.M., Knutsen H.K

“Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans.”

Environment International (2010b), 36 (7), 772-778

Haug LS, Huber S, Becher G, Thomsen C

“Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds - Comparing exposure estimates with biomarkers of exposure”

Environment International (2011a), 37 (4), 687-693

Haug LS, Huber S, Schlabach M, Becher G, Thomsen C

“Investigation on per- and polyfluorinated compounds in paired samples of house dust and indoor air from Norwegian homes”

Environmental Science & Technology (2011b), 45 (19), 7991-7998

Hinderliter PM, Mylchreest E, Gannon SA, Butenhoff JL, Kennedy GL Jr

“Perfluorooctanoate: placental and lactational transport pharmacokinetics in rats”

Toxicology (2005), 211 (1-2), 139-148

Hloušková V, Lanková D, Kalachová K, Hrádková P, Poustka J, Hajšlová J, Pulkrabová J

“Occurrence of brominated flame retardants and perfluoroalkyl substances in fish from the Czech aquatic ecosystem”

Science of the Total Environment 461–462 (2013) 88–98

Hrádková P, Poustka J, Hloušková V, Pulkrabová J, Tomaniová M, Hajšlová J.

“Perfluorinated compounds: occurrence of emerging food contaminants in canned fish and seafood products.”

Czech Journal Food Science. 2010;28(4):333-342.

Hu W, Jones PD, Upham BL, Trosko JE, Lau C, Giesy JP

“Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated compounds in rat liver and dolphin kidney epithelial cell lines in vitro and Sprague-Dawley rats in vivo”

Toxicological Sciences (2002), 68 (2), 429-436

Hu W, Jones PD, Celius T, Giesy JP

“Identification of genes responsive to PFOS using gene expression profiling”

Environmental Toxicology and Pharmacology (2005), 19 (1), 57-70

Hu J, Yu J, Tanaka S, Fujii S

“PerfluorooctaneSulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic acid (PFOA) in water environment of Singapore”

Water, Air and Soil Pollution (2011), 216 (1-4), 179-191

Jahnke A, Barber JL, Jones KC, Temme C

“Quantitative trace analysis of polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in ambient air samples from Mace Head (Ireland): A method intercomparison”

Atmospheric Environment (2009), 43 (4), 844-850

Jensen AA and Leffers H

“Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances”

International Journal of Andrology (2008), 31 (2), 161-169

Kadar H, Veyrand B, Barbarossa A, Pagliuca G, Legrand A, Boshier C, Boquien CY, Durand S, Monteau F, Antignac JP, Le Bizec B

“Development of an analytical strategy based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for measuring perfluorinated compounds in human breast milk: application to the generation of preliminary data regarding perinatal exposure in France”

Chemosphere (2011), 85 (3), 473-480

Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, Fillmann G, Kumar KS, Loganathan BG, Mohd MA, Olivero J, Van Wouwe N, Yang JH, Aldoust KM

“Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries”

Environmental Science & Technology (2004), 38 (17), 4489-4495

Kannan K, Tao L, Sinclair E, Pastva SD, Jude DJ, Giesy JP

“Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain”

Archives of Environmental Contamination and Toxicology (2005), 48 (4), 559-566

Kärman A, Ericson I, van Bavel B, Darnerud PO, Aune M, Glynn A, Lignell S, Lindström G

“Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a Temporal Trend, 1996–2004, in Sweden”

Environmental Health Perspectives (2007), 115 (2), 226-230

Kärroman A, Harada KH, Inoue K, Takasuga T, Ohi E, Koizumi A

“Relationship between dietary exposure and serum perfluorochemical (PFC) levels – A case study”

Environment International (2009), 35 (4), 712-717

Kwok KY, Yamazaki E, Yamashita N, Taniyasu S, Murphy MB, Horii Y, Petrick G, Kallerborn R, Kannan K, Murano K, Lam PK.

“Transport of perfluoroalkyl substances (PFAS) from an arctic glacier to downstream locations: implications for sources.”

Sci Total Environ. 2013 Mar 1;447:46-55. doi: 10.1016

Lacina O, Hradkova P, Pulkrabova J, Hajslova J

“Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish”

Journal of Chromatography A (2011), 1218 (28), 4312-4321

Lehmler HJ

“Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants – A review”

Chemosphere (2005), 58 (11), 1471-1496

Liu J, Li J, Zhao Y, Wang Y, Zhang L, Wu Y

“The occurrence of perfluorinated alkyl compounds in human milk from different regions of China”

Environment International (2010), 36 (5), 433-438

Loos R, Wollgast J, Huber T, Hanke G.

“Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy.”

Anal Bioanal Chem.2007 Feb;387(4):1469-78.

Midasch O, Schettegen T, Angerer J

“Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population”

International Journal of Hygiene and Environmental Health (2006), 209 (6), 489-496

Mortimer DN, Gem M, Clarke DB, Lloyd AS, Hird S

“PFOS, PFOA and other fluorinated organic chemicals in food”

Organohalogen Compounds (2009), 71, 1343-1348

Nakata H, Kannan K, Nasu T, Cho HS, Sinclair E, Takemura A

“Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: Environmental fate of perfluorooctanesulfonate in aquatic ecosystems”

Environmental Science & Technology (2006), 40 (16), 4916-4921

Nania V, Pellegrini GE, Fabrizi L, Sesta G, Sanctis PD, Lucchetti D, *et al.*

“Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea.

” Food Chemistry. 2009;115(3):951-957.

Noorlander CW, van Leeuwen SP, TeBiesebeek JD, Mengelers MJ, Zeilmaker MJ.

“Levels of perfluorinated compounds in food and dietary intake of PFOS and PFOA in the Netherlands.”

J Agric Food Chem. 2011 Jul 13;59(13):7496-505.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development)

“Hazard assessment of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and its salts”

ENV/JM/RD(2002)17/FINAL (2002) www.oecd.org/dataoecd/23/18/2382880.pdf (last accessed: 23 January 2012)

Olsen GW, Burriss JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR
“Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers”

Environmental Health Perspectives (2007b), 115 (9), 1298-1305

Oono S, Harada KH, Mahmoud MA, Inoue K, Koizumi A
“Current levels of airborne polyfluorinated telomers in Japan”

Chemosphere (2008), 73 (6), 932-937

Paul AG, Jones KC, Sweetman AJ

“A first global production, emission and environmental inventory for perfluorooctanesulfonate”

Environmental Science & Technology (2009), 43 (2), 386-392

Picò Y, Farre M, Llorca M, Barcelo D.

“Perfluorinated compounds in food: a global perspective.”

Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011;51(7):605-625.

Prevedouros K, Cousins IT, Buck RC, Korzeniowski SH

“Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates”

Environmental Science & Technology (2006), 40 (1), 32-44

Recommendation 2010/161/EU, of 17 March 2010 on the monitoring of perfluoroalkylated substances in food

Official Journal of the European Union (18.3.2010), L68, 22-23

Renner R.

“EPA finds record PFOS, PFOA levels in Alabama grazing fields”.

Environ Sci Technol. 2009 Mar 1;43(5):1245-6.

Rylander C, Brustad M, Falk H, Sandanger TM.

“Dietary predictors and plasma concentrations of perfluorinated compounds in a coastal population from northern Norway”.

J Environ Public Health. 2009;2009:268219.

Schiavone A, Corsolini S, Kannan K, Tao L, Trivelpiece W, Torres D Jr., Focardi S

“Perfluorinated contaminants in fur seal pups and penguin eggs from South Shetland, Antarctica”

Science of the Total Environment (2009), 407 (12), 3899-3904

Schröter-Kermani C, Müller J, Jürling H, Conrad A, Schulte C.

“Retrospective monitoring of perfluorocarboxylates and perfluorosulfonates in human plasma archived by the German Environmental Specimen Bank.”

International Journal Hygiene and Environmental Health. 216 (2013) 633-640

Schuetze A, Heberer T, Effkemann S, Juergensen S.

“Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany”.

Chemosphere. 2010;78(6):647-52.

Seacat AM, Thomford PJ, Hansen KJ, Clemen LA, Eldridge SR, Elcombe CR, Butenhoff JL

“Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats”

Toxicology (2003), 183 (1-3), 117-131

ShIPLEY JM, Hurst CH, Tanaka SS, DeRoos FL, Butenhoff JL, Seacat AM,

“trans-Activation of PPAR α and induction of PPAR α target genes by perfluorooctane-based chemicals”

Toxicological Sciences (2004), 80 (1), 151-160

Shoeib M, Harner T, Webster GM, Lee SC

“Indoor sources of poly- and perfluorinated compounds (PFCs) in Vancouver, Canada: implications for human exposure”

Environmental Science & Technology (2011), 45 (19), 7999-800

Sinclair E, Kim SK, Akinleye HB, Kannan K

“Quantitation of gas-phase perfluoroalkyl surfactants and fluorotelomer alcohols released from nonstick cookware and microwave popcorn bags”

Environmental Science & Technology (2007), 41 (4), 1180-1185

Skutlarek D, Exner M, Färber H

“Perfluorinated surfactants in surface and drinking water” Environmental Science and Pollution Research (2006), 13 (5), 299-307

Sonne C

“Health effects from long-range transported contaminants in Arctic top predators: An integrated review based on studies of polar bears and relevant model species”

Environment International (2010), 36 (5), 461-491

Tao L., Kannan K., Wong C.M., Arcaro K.F., Butenhoff J.L. (2008)

Perfluorinated Compounds in Human Milk from Massachusetts,

U.S.A. Environmental Science and Technology 42, pag. 3096-3101.

Thomsen C, Haug LS, Stigum H, Frøshaug M, Broadwell SL, Becher G

“Changes in concentrations of perfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast-milk during twelve months of lactation”

Environmental Science & Technology (2010), 44 (24), 9550-9556

Tittlemier SA, Pepper K, Edwards L

“Concentrations of perfluorooctanesulfonamides in Canadian total diet study composite food samples collected between 1992 and 2004”

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2006), 54 (21), 8385-8389

UK Food Standard Agency

“Fluorinated chemicals: UK dietary intakes”

Food Survey Information Sheet 11/06 (2006), 1-15

<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis1106.pdf> (last accessed: 23 January 2012)

US EPA

“Revised draft hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts”

(2002), 1-107 167

US EPA

“Preliminary risk assessment of the developmental toxicity associated with exposure to perfluorooctanoic acid and its salts”

(2003), 1-61

US EPA

“Draft risk assessment of the potential human health effects associated with exposure to perfluorooctanoic acid and Its salts (PFOA)”

(2005), 1-117

van Asselt ED, Rietra RPJJ, Römkens PFAM, van der Fels-Klerx HJ

“Perfluorooctanesulphonate (PFOS) throughout the food production chain”

Food Chemistry (2011), 128 (1), 1-6

van Leeuwen SPJ, van Velzen MJM, Swart CP, van der Veen I, Traag WA, de Boer J

“Halogenated contaminants in farmed salmon, trout, tilapia, pangasius, and shrimp”

Environmental Science & Technology (2009), 43 (11), 4009-4015

Völkel W, Genzel-Boroviczény O, Demmelmair H, Gebauer C, Koletzko B, Twardella D, Raab U, Fromme H

“Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study”

International Journal of Hygiene and Environmental Health (2008), 211 (3-4), 440-446

Wang JM, Shi YL, Pan YY, Cai YQ

“Perfluorinated compounds in milk, milk powder and yoghurt purchased from markets in China”

Chinese Science Bulletin (2010), 55 (11), 1020-1025

Whitworth KW, Haug LS, Baird DD, Becher G, Hoppin JA, Skjaerven R, et al
“*Perfluorinated compounds and subfecundity in pregnant women.* “
Epidemiology 2012;23:257–63.

Zhang T, Sun HW, Wu Q, Zhang XZ Yun SH, Kannan K
“*Perfluorochemicals in meat, eggs and indoor dust in China: assessment of sources and pathways of human exposure to perfluorochemicals*”
Environmental Science & Technology (2010), 44 (9), 3572-3579