



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
SCUOLA DI DOTTORATO IN TOSSICOLOGIA

INDIRIZZO: Tossicologia degli Alimenti e dell'Ambiente

XXIV CICLO – AREA SCIENTIFICA CHIM/10

Direttore Prof. Gaetano Di Chiara

**Studio della contaminazione da IPA del riccio di
mare *Paracentrotus Lividus* in Sardegna.**

Dottorando:

Dott. Luciano Porcu

Supervisore:

Dott. Alberto Angioni

Relazione scientifica finale Scuola di Dottorato in Tossicologia

Sommario

INTRODUZIONE GENERALE

1. Il riccio di mare *Paracentrotus lividus*

1. *Distribuzione e caratteristiche*
2. *Importanza ecologica*
3. *Il mercato*
4. *Valore alimentare*

2. L'area di gestione sperimentale del riccio di mare a Capo Pecora

La tutela del riccio di mare

3. Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

1. *Struttura e proprietà chimico fisiche degli IPA*
2. *Sorgenti e meccanismi di formazione*
3. *Comportamento e distribuzione ambientale*
 - *Ambiente atmosferico*
 - *Ambiente terrestre*
 - *Ambiente acquatico*
 - *Assorbimento e contaminazione dei vegetali*
4. *Legislazione*

4. Messa a punto e validazione del metodo

4.1. Materiali e Metodi

Reattivi

Metodo di estrazione

Analisi strumentale

Validazione del metodo

Analisi statistica

4.2. Risultati e Discussione

5. Monitoraggio della contaminazione da IPA

Aree di prelievo

Campionamento

Risultati e discussione

6. Bibliografia

Introduzione Generale

Negli ultimi anni è aumentata nettamente la consapevolezza e la percezione delle crescenti e numerose minacce ambientali legate alle attività umane. Tra queste, una riguarda i potenziali danni associati alla mancanza di una corretta gestione delle sostanze chimiche tossiche volontarie e involontarie. In particolare l'inquinamento involontario è causato da sostanze che vengono immesse nell'ambiente attraverso moltissime vie, fra cui il rilascio durante i processi di produzione, gli effluenti industriali, le applicazioni dirette, lo smaltimento, il trasporto e una moltitudine di impieghi diversi. Fra queste sostanze rappresentano una parte molto importante inquinanti organici persistenti (POPs, Persistent Organic Pollutants) la cui contaminazione si è diffusa in tutto il mondo, giungendo fino agli esseri umani, alla fauna e flora selvatiche.

Il comportamento ambientale dei POPs è molto complesso in quanto queste sostanze si ritrovano in tutti i compartimenti (aria, acqua, suolo, sedimenti, organismi viventi) e sono sottoposti a continui scambi tra questi. Sebbene i livelli ambientali più elevati di POPs siano generalmente riscontrati in prossimità dei punti di rilascio, queste sostanze sono ormai ubiquitarie (Figura 1).

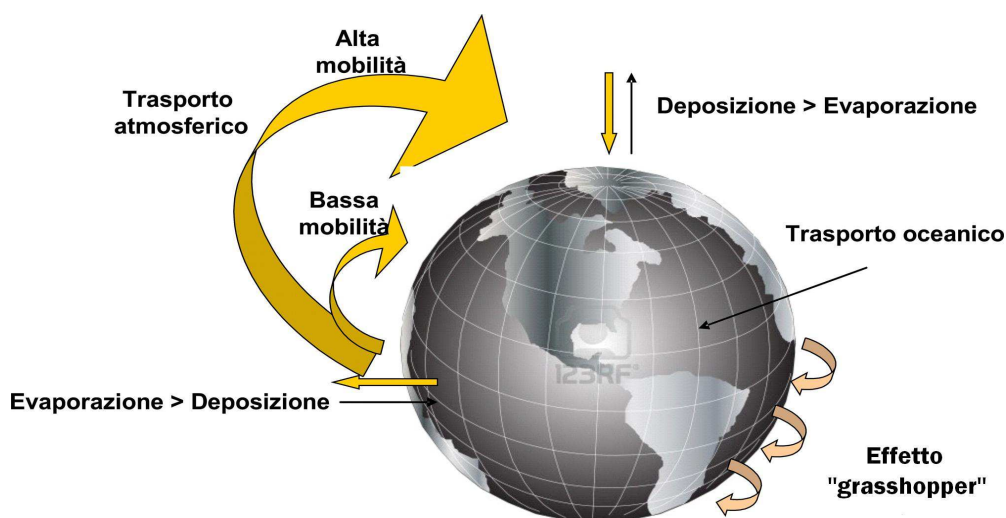


Figura 1. Scambi tra i compartimenti responsabili del trasporto transfrontaliero dei POPs.

I mari e gli oceani ricoprono il 70% della superficie del nostro pianeta e producono quasi tre quarti dell'ossigeno che respiriamo. Tuttavia, l'uomo può utilizzare direttamente soltanto l'1% dell'acqua e numerose attività umane esercitano una notevole pressione su questa risorsa. L'acqua inquinata, indipendentemente dalla fonte dell'inquinamento, ritorna in un modo o nell'altro nell'ambiente (in particolare nel mare e nelle falde freatiche) e può quindi arrecare danni alla salute umana e all'ambiente. Una delle normative più importanti in questo settore è la direttiva quadro in materia di acque. Il Mar Mediterraneo a causa del limitato ricambio idrico, risulta estremamente sensibile all'accumulo di sostanze inquinanti,¹ che possono portare ad una progressiva degradazione dell'ecosistema marino (Figura 2).



Figura 2. Mappa del bacino del Mar Mediterraneo in cui si può evidenziare la scarsa capacità di scambio idrico (A, B)

La regione del Mediterraneo consiste in un complesso scenario geografico, climatico, idrologico, ecologico, culturale e sociopolitico. Il Mar Mediterraneo è caratterizzato da un alto livello di biodiversità: è, infatti, uno dei mari più ricchi del mondo in quanto a flora e fauna, in particolare nelle zone costiere, con un alto tasso di specie endemiche.^{2,3} Da una stima approssimativa, più di 8.500 specie di grandi animali marini vivono nel Mediterraneo.⁴ Tale

ricchezza di biodiversità rappresenta dall'8 al 9% del numero totale di specie marine al mondo e ancora oggi se ne rilevano di nuove negli strati marini e nelle aree inesplorate,³ il che risulta particolarmente significativo se si pensa che l'area del Mediterraneo equivale allo 0,82% dell'area totale degli oceani e il suo volume allo 0,32% del volume totale degli oceani.

Inoltre, il Mar Mediterraneo ospita numerose specie marine a rischio: la foca monaca (*Monachus monachus*), della quale solo 350 - 400 individui sono attualmente presenti nel mondo, la tartaruga verde (*Chelonia mydas*) e la tartaruga comune (*Caretta caretta*) (Figura 3), la cui origine risale a 100 milioni di anni fa e che nidifica sulle spiagge del Mediterraneo, 18 specie di cetacei, delle quali sette osservabili in tutti i periodi dell'anno: il globicefalo (*Globicephala melas*), la balenottera comune (*Balaenoptera physalus*), il capodoglio (*Physeter macrocephalus*), il delfino comune (*Delphinus delphis*), la stenella striata (*Stenella coeruleoalba*), il tursiope (*Tursiops truncatus*) e il grampo (*Grampus griseus*) (Figura 4), e infine la posidonia (*Posidonia oceanica*) (Figura 5) pianta fanerogama marina endemica, il cui ruolo è cruciale nell'economia degli ecosistemi marini costieri, per motivi di carattere sia biologico sia fisico (riparo, produzione di ossigeno, fonte diretta e indiretta di nutrimento per pesci ed altri organismi, fissazione e stabilizzazione dei fondali e freno all'erosione costiera).⁵



Figura 3. *Caretta caretta* (1), *Chelonia mydas* (2), *Monachus monachus* (3).



Figura 4. *Stenella coeruleoalba* (a), *Delphinus delphis* (b), *Tursiops truncatus* (c), *Grampus griseus* (d), *Balaenoptera physalus* (e), *Globicephala melas* (f), *Physeter macrocephalus* (g).



Figura 5. Banchi di *Posidonia oceanica*.

Il Mar Mediterraneo costituisce anche un importante sito di pesca commerciale. Delle 900 specie di pesci presenti nel Mediterraneo, 100 sono sfruttate a scopi commerciali e molte possiedono un alto valore di mercato. Nel Mar Mediterraneo, il destino degli esseri umani e quello della natura sono strettamente collegati.

La contaminazione chimica rappresenta una seria minaccia a livello globale e il Mar Mediterraneo risulta particolarmente vulnerabile. Il Mediterraneo è il più grande mare semi-chiuso, circondato a nord da paesi con un forte tasso d'industrializzazione e, lungo tutto il suo bacino, da paesi ad elevato sviluppo agricolo. Molte di queste attività umane costituiscono una grave fonte di degradazione per il Mediterraneo, le cui peculiarità giocano un ruolo cruciale nell'accumulo, nella diffusione e nell'impatto delle sostanze inquinanti nell'intera regione. Le principali caratteristiche del Mediterraneo (tra cui l'alta temperatura, l'alta salinità, il regime microtidale) influenzano i cicli fisici, chimici e biologici che incidono su tutti i processi ecologici.³ Nel corso dell'ultima decade, i rifiuti industriali, agricoli e urbani si sono riversati nel Mar Mediterraneo attraverso gli scarichi costieri, i fiumi e l'atmosfera, aumentando considerevolmente il tasso d'inquinamento, con conseguente degradazione progressiva dell'ecosistema.^{1,6}

Nella catena alimentare marina, il bioaccumulo dei composti chimici è favorito dalle proprietà fisico-chimiche delle sostanze inquinanti e dalle caratteristiche oceanografiche del Mediterraneo stesso; molti inquinanti chimici sono persistenti, si degradano, cioè, molto lentamente nell'ambiente e, per la loro capacità di legarsi alla materia organica e in particolare ai tessuti grassi, possono accumularsi lungo le catene alimentari, soprattutto nelle specie all'apice della catena stessa,⁷⁻⁹ rappresentando un potenziale fattore di rischio anche per la salute umana. Il Mar Mediterraneo comunica con l'Atlantico tramite lo Stretto di Gibilterra: il flusso attraverso lo stretto ($5 \cdot 10^{13} \text{ m}^3$ all'anno in entrata, che in uscita si riduce del 4%,)¹⁰ non consente un ricambio d'acqua significativo, aumentando così il tempo di permanenza delle sostanze chimiche e favorendone il loro accumulo.

Nell'ambito del parere espresso in sede Comunitaria dal Comitato Scientifico sulla Sicurezza Alimentare¹¹ sono stati evidenziati alcuni punti di estremo interesse relativi alla distribuzione della contaminazione da composti ad azione diossina-equivalente nei prodotti ittici. Questa distribuzione, rispetto ad altri prodotti alimentari, copre un intervallo di concentrazioni di tre ordini di grandezza in prima approssimazione, e in aggiunta, nella classe di alimenti presa in considerazione compaiono organismi appartenenti ad ambienti d'acqua dolce e marina, a pesci, molluschi e crostacei. Viene evidenziata, tra l'altro, l'importanza della determinazione della provenienza del prodotto ittico includendo anche dati provenienti dal Mar Baltico che, essendo notoriamente un'area inquinata, determina un ampliamento dell'intervallo di concentrazioni considerate. Dall'area baltica provengono inoltre grandi quantità di farine di pesce largamente impiegate nella produzione di mangimi destinati all'acquacoltura.

Ne consegue che i termini presi in considerazione per la gestione del rischio dovuto al consumo di prodotto ittico risultano ampiamente incerti o, addirittura, inesatti per prodotti provenienti da aree a livelli di contaminazione ridotti quali presumibilmente quelli mediterranei.

Nella Commissione SCF (Scientific Committee on Food), in merito alla valutazione di rischio dovuta alla presenza di composti organostannici nel prodotto alimentare, attualmente in corso, è emerso un fattore di estremo interesse ai fini della pianificazione delle strategie di campionamento ambientale: questo tende a rilevare la presenza di aree ad alto rischio che, per loro natura (maggiore esposizione ai contaminanti chimici, posizione geografica) sono escluse dalla raccolta di organismi per il consumo umano.

Nazioni come la Francia e la Gran Bretagna, pur avendo una banca dati consistente sulla presenza di organostannici in organismi,¹² non sono state in grado di fornire contributi alla commissione che potessero essere utilizzati dall'SCF per una valutazione del rischio sanitario relativo. In questa tipologia di campionamenti è emerso con evidente preponderanza l'utilizzo nelle indagini di matrici come i mitili (*Mytilus sp* e *Modiolus sp*) e, in misura minore, di ostriche.

L'utilizzo di tali organismi perciò sembra assumere prevalentemente un significato ambientale ma, in un'ottica di valutazione del rischio sanitario da agenti chimici, il loro utilizzo appare meno rilevante. L'Italia, tra l'altro, ha prodotto dati in larga parte (~ 90%) provenienti dalla laguna veneta che si propone, nella maggior parte dei casi, come "worst case" per la presenza di questi contaminanti.

Da un recentissimo convegno UNEP¹³ sulla presenza di Persistent Toxic Substances nell'area mediterranea emerge altresì una mancanza di dati generalizzata sulla presenza di xenobiotici come policlorodibenzo-p-diossine, policlorodibenzofurani, policlorobifenili, policloronaftaleni ecc. in matrici alimentari, derivando quindi da questa situazione l'impossibilità di poter effettuare indagini sulla distribuzione geografica di tali contaminanti e sull'andamento temporale di tali livelli in risposta a provvedimenti restrittivi presi dai singoli stati sulle loro emissioni.

La definizione dei livelli di fondo locali di tali contaminanti appare, in aggiunta, uno strumento basilare nell'ambito della tracciabilità e della valorizzazione complessiva del prodotto ittico, necessità rappresentata anche nel regolamento comunitario che definisce i limiti di tolleranza sul pesce per la presenza di contaminanti ad azione diossina-simile.

Nonostante esistano numerosi trattati o convenzioni^{14,15} volti a proteggere il bacino del Mediterraneo, il mare continua a risentire degli effetti dovuti all'aumento dell'inquinamento. L'attuale legislazione in materia di sostanze chimiche risulta, infatti, inadeguata a garantire la protezione della fauna selvatica e della salute umana.

LA CONVENZIONE DI BARCELLONA¹⁴

La Convenzione di Barcellona per la Protezione del Mar Mediterraneo dall'Inquinamento, siglata il 16 febbraio 1976 ed entrata in vigore il 12 febbraio 1978, costituisce lo strumento legale del Mediterranean Action Plan (MAP),¹⁶ uno sforzo regionale cooperativo che coinvolge i 21 paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo e l'Unione europea, sotto gli auspici del Programma per l'Ambiente delle Nazioni Unite (UNEP).¹⁷ Tramite il piano d'azione del MAP, le parti contraenti la Convenzione di Barcellona ed i suoi protocolli sono intenzionate ad affrontare la sfida costituita dalla protezione dell'ambiente marino e costiero, implementando nel contempo piani regionali e nazionali finalizzati alla realizzazione di uno sviluppo sostenibile.

La Convenzione di Barcellona, modificata dalle parti contraenti nel 1995, ha cambiato titolo diventando "Convenzione per la protezione dell'ambiente marino e la regione costiera del Mediterraneo"¹⁸ e ha ampliato l'ambito della sua applicazione geografica, comprendendo le acque marine interne del Mediterraneo e le aree costiere. Tale modifica è stata finalizzata al conferimento di uno status legale agli impegni assunti dalle nazioni che hanno partecipato all'Earth Summit, tenutosi nel 1992 a Rio.¹⁹ Solo 8 paesi (Croazia, Egitto, Francia, Italia, Malta, Monaco, Spagna e Tunisia) oltre all'Unione Europea hanno ratificato gli emendamenti adottati nel 1995. È necessario che altri 7 paesi del Mediterraneo ratifichino tali emendamenti perché essi possano entrare in vigore.

Dal 1975, il cosiddetto sistema di Barcellona ha dato vita a sei Protocolli, strumenti legali vincolanti rivolti a specifici aspetti della protezione ambientale. Il Land-based Source of Pollution (LBS), relativo alla protezione del Mar Mediterraneo, è uno dei sei Protocolli non ancora ratificati. L'implementazione del Protocollo LBS, pronto dal 1996, dovrebbe prevenire e ridurre il rilascio di alti livelli di sostanze inquinanti. In una petizione comune, presentata nel novembre 2003 ai ministri e delegati dei 21 paesi mediterranei, il WWF ed altre 15 ONG ambientaliste hanno sottolineato che, malgrado gli sforzi da parte di molti paesi mediterranei per attuare il Protocollo LBS, Algeria, Bosnia-Erzegovina, Croazia, Egitto, Israele, Libano, Libia, Serbia Montenegro e Siria devono ancora ratificare il Protocollo.

Fra tutti questi paesi, sono necessarie solo tre ratifiche per consentire al Protocollo LBS di diventare legalmente vincolante per gli stati del Mediterraneo che hanno adottato la Convenzione di Barcellona. Il WWF e le altre ONG invitano questi paesi a ratificare tempestivamente il Protocollo LBS, rendendo così la Convenzione operativa.

LA CONVENZIONE POP

La Convenzione POP,¹⁵ elaborata nel quadro del Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente (UNEP), mira a proteggere la salute umana e l'ambiente dagli inquinanti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants, POP). Tra i 12 POP che attualmente rientrano nel campo d'applicazione della Convenzione vi sono 9 pesticidi (aldrin, lordano, DDT, dieldrin, endrin, eptaclorobenzene, esaclorobenzene, mirex e toxafene), sostanze chimiche industriali e 2 gruppi di prodotti e sottoprodotti della combustione emessi non intenzionalmente (PCB, diossine e furani). La Convenzione stabilisce i meccanismi di controllo che disciplinano la produzione, l'uso, l'importazione, l'esportazione, le emissioni e lo smaltimento di questi POP a livello mondiale. Queste sostanze chimiche costituiscono un grosso rischio per la salute umana e l'ambiente, poiché le loro caratteristiche le rendono particolarmente pericolose. Sono sostanze persistenti che resistono alla degradazione permanendo nell'ambiente per lunghi periodi di tempo e grazie al loro alto grado di liposolubilità si accumulano nel tessuto adiposo, risultando tossiche per l'uomo, la fauna e la flora selvatica. Sono presenti in alte concentrazioni nelle specie ai vertici delle catene alimentari. Queste sostanze sono in grado di attraversare la barriera costituita dalla placenta: passano dalla madre al feto e, attraverso il latte materno, al neonato. I POP possono causare danni al sistema nervoso, immunopatologie, disordini riproduttivi e dello sviluppo e non per ultimo il cancro. Inoltre, sono presenti nell'ambiente e negli organismi viventi non come singole entità, ma come miscele complesse. Gli effetti di un'esposizione multipla sono ancora poco conosciuti. Riguardo agli inquinanti organici persistenti (POP), nel 1992, nel corso dell'Earth Summit a Rio,¹⁹ con l'adozione dell'Agenda 21, è stato dato l'avvio a una serie di accordi intergovernativi, culminati poi nella Convenzione di Stoccolma (22 maggio 2001), volti a intraprendere tutte le misure necessarie ad eliminare o ridurre a livelli non pericolosi le emissioni dei composti chimici nell'atmosfera (UNEP, 2001). Firmata da più di 100 paesi, la Convenzione è entrata in vigore il 17 maggio 2004, dopo la ratifica, nel febbraio 2004, della Francia.

Regolamento (CEE) n. [315/93](#)²⁰ del Consiglio, dell'8 febbraio 1993, che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari [[Cfr atti modificativi](#)].

Il regolamento (CEE) n. 315/93 vieta l'immissione sul mercato di prodotti alimentari contenenti quantitativi inaccettabili di sostanze residue. Tali sostanze, dette contaminanti, sono il risultato dei trattamenti subiti dagli alimenti successivamente alla produzione oppure della loro contaminazione dovuta all'ambiente. Potendo costituire un rischio per la salute pubblica, l'Unione europea ha fissato i tenori ammissibili di contaminanti, mantenendoli ai livelli più bassi possibile sul piano tossicologico.

Il regolamento non si applica ai contaminanti oggetto di regolamentazioni più specifiche né ai corpi estranei quali, ad esempio, frantumi di insetti, peli di animali e altri.

Gli Stati membri possono adottare misure più rigorose rispetto al presente regolamento se sospettano che la presenza di un contaminante possa costituire un pericolo per la salute umana. In tal caso informano immediatamente gli altri Stati membri e la Commissione, motivando la loro decisione. La Commissione esamina nel più breve tempo possibile i motivi forniti dallo Stato membro e adotta adeguate misure dopo aver consultato il comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali. Tale comitato assiste la Commissione su tutte le questioni connesse ai contaminanti, compresa la fissazione delle tolleranze massime autorizzate.

Gli Stati membri non possono vietare la commercializzazione di prodotti alimentari conformi al presente regolamento.

1. Il riccio di mare *Paracentrotus lividus*

1. *Distribuzione e caratteristiche*

Il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (classe: ECHINOIDEA; ordine: DIADEMATOIDA; famiglia: ECHINIDAE) costituisce in Sardegna una risorsa di particolare interesse alimentare, ecologico e di mercato,^{21,22} le gonadi di questo echinoide rappresentando un ricercato e caratteristico alimento locale. E' principalmente erbivoro e si ciba generalmente di micro- e macroalghe nelle zone litorali.²³

E' praticamente diffuso in tutte le zone costiere del Mediterraneo e dell'Atlantico orientale, dalla Scozia al Rio de Oro, fino alle Canarie, prediligendo i fondali rocciosi e le praterie di Posidonie e condividendo normalmente il territorio con l'altra specie di riccio di mare presente nel Mediterraneo *Arbacia Ligula*, ugualmente diffusa ed erroneamente definita "riccio maschio" in contrapposizione al "riccio femmina" come veniva definito il *Paracentrotus lividus* (Figura 6).

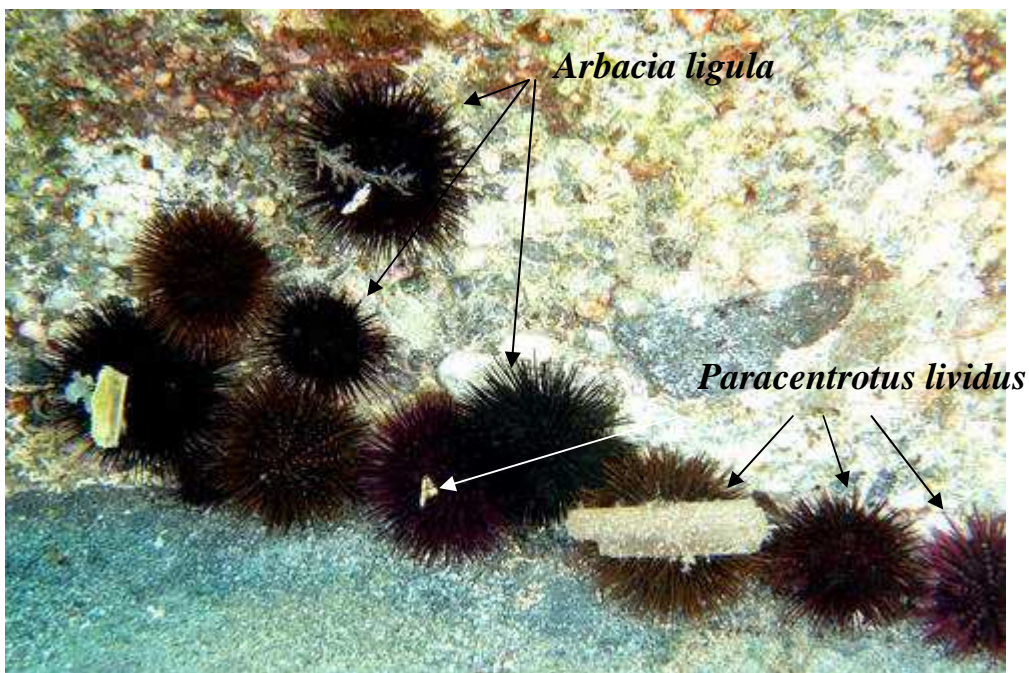


Figura 6. *Arbacia ligula* e *Paracentrotus Lividus* condividono lo stesso territorio.

I ricci di mare hanno un corpo sferico con l'emisfero orale posto ventralmente, al centro del quale si trova l'apparato buccale che si riconosce per la presenza dei 5 denti della lanterna di Aristotele che è la struttura preposta alla masticazione. Tutto intorno a questa vi è un'area membranosa chiamata membrana peristomale, mentre la regione anale (detta periprocto) è la parte rivolta verso l'alto ed è formata da un anello con 10 piastre nel quale è presente una struttura chiamata madreporite o piastra madreporica attraverso la quale il liquido del sistema acquifero è in collegamento con l'esterno (Figura 7). Tra gli aculei si trovano i pedicellaria che sono delle appendici molto mobili e con funzioni diverse e di diverso tipo: pedicellarie che terminano con una ventosa e sono preposte al movimento o a trattenere gli oggetti con i quali alcune specie di ricci di mare si coprono il corpo; pedicellarie a forma di pinza usate per afferrare; pedicellarie che terminano con una piccola spina cava che può iniettare del veleno nella carne di un aggressore (es *Asthenosoma varium*). La locomozione avviene attraverso il sistema acquifero che è formato da dei vasi molto simili a quelli sanguigni che circolano in tutto il corpo dell'animale al cui interno scorre acqua prelevata dall'ambiente esterno; l'acqua pompata in questo sistema determina una variazione del turgore dei pedicelli che così si possono muovere. L'apparato riproduttore è formato da cinque gonadi (che rappresentano la parte edule) unite tra loro da filamenti e quando sono mature appaiono voluminose e di colore dal giallo al rosso più o meno intenso estendendosi dalla parte aborale dove comunicano con l'esterno fin quasi alla lanterna di Aristotele.

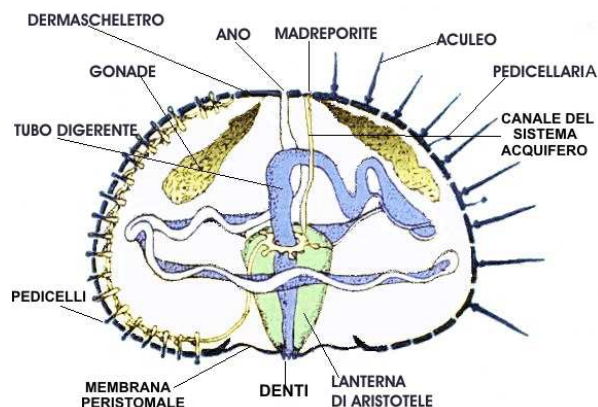


Figura 7. Sezione trasversale di *Paracentrotus Lividus* in cui si evidenzia l'apparato buccale (Lanterna di Aristotele).

Il corpo è leggermente schiacciato con aculei di diversa lunghezza e colorazione. Vi sono esemplari viola, verdi, marroni, neri e rossicci. Può raggiungere il diametro di 7 cm. Vive in fondali rocciosi, detritici e praterie di posidonia dalla superficie fino ad 80 metri di profondità.

E' una specie fotofobica che per ripararsi dalla luce utilizza tutto ciò che trova (alghe, conchiglie e piccoli pezzi di roccia). Non sopporta temperature nè troppo basse nè troppo alte con un valore ottimale intorno ai 18-20 °C, ed è poco tollerante nei confronti delle variazioni di salinità a causa della sua anatomia.

E' un animale brucatore ed è addirittura in grado di creare delle nicchie nella roccia in cui ripararsi durante le mareggiate. Infatti il *Paracentrotus lividus* è un grande scavatore delle rocce in grado di costruire delle nicchie nelle quali infossarsi, tanto che spesso vi rimane permanentemente in quanto capita che l'apertura fatta quando era in stadi più piccoli è diventata talmente stretta che non riesce più a venirne fuori. In tal caso per il nutrimento dipende esclusivamente dai materiali che vengono portati dalla corrente.

Il riccio di mare ha sessi separati, e non è possibile distinguere il maschio dalla femmina dall'esterno. L'unico modo per riconoscere il sesso è l'analisi istologica delle gonadi tramite microscopio. La riproduzione avviene durante quasi tutto l'anno ma con una maggior intensità in primavera-estate, compendosi senza accoppiamento in quanto le uova sono deposte e fecondate nell'acqua a causa della contemporanea emissione del seme maschile, poiché la gametogenesi è regolata dal fotoperiodo in modo che i maschi e le femmine producano le uova e gli spermatozoi contemporaneamente.

Dall'uovo fecondato si sviluppano le larve. La larva del *Paracentrotus lividus*, un echinopluteo (Figura 8), liberamente natante e planctontrofica, può vivere da 20 fino a 40 giorni prima di fissarsi al substrato. Presenta la particolarità di essere a simmetria bilaterale, e attraverso varie metamorfosi arriva alla forma adulta a simmetria pentaradiale, assumendo l'aspetto che tutti conoscono. Lo sviluppo sessuale sembra essere raggiunto intorno al terzo dei presunti nove anni di vita.²⁴



Figura 8. Fasi di crescita del *Paracentrotus lividus*.

Le **gonadi** (Figura 9) sono sospese nella cavità celomatica e comunicano con l'ambiente marino mediante un gonoporo posto sulla piastra genitale aborale. Le cinque gonadi, di colore variabile dal giallo arancio, marrone al rosso vivo, costituiscono la prelibata parte edibile dell'animale. Il periodo migliore per il consumo di queste specie va dal mese di settembre al mese di aprile, quando le gonadi sono maggiormente sviluppate.



Figura 9. Gonadi di *Paracentrotus lividus* di diversa colorazione.

L'alimentazione del *Paracentrotus lividus* è basata fondamentalmente sulla *posidonia oceanica*, pianta acquatica spermatofita monocotiledone della quale consuma praticamente tutte le parti: foglie verdi coperte con piante epifite e non, foglie morte ancora sulla pianta o giacenti sul fondale, tronco e radici.²⁵⁻²⁹

Ma oltre a nutrirsi di questa pianta e di altre macro-alghe il *Paracentotus lividus* mostra caratteristiche opportunistiche soprattutto in situazioni di scarsità di questo tipo di nutrimento e non è raro che nei suoi intestini vengano ritrovati resti di microalghe, spugne, idrozoi.³⁰⁻³⁷ In aggiunta sono stati ritrovati anche resti di altri ricci in popolazioni con grande densità di individui³⁸ e questo è da prendere in considerazione nell'organizzazione dell'allevamento dei ricci di mare.

“Quando circa l'80% della superficie delle vasche era coperta da grossi ricci di mare, il 20% di questi, in particolare i ricci di mare più giovani, ha iniziato a cibarsi di altri individui. I ricci di mare più piccoli tendono a cannibalizzare di più in condizioni di assenza di cibo, dato che stanno crescendo, hanno necessità di più nutrienti, e hanno mostrato di aver bisogno di elevati livelli di proteine e carboidrati nella loro dieta. A giudicare dai dati raccolti, questo indica che le persone interessate nel creare un protocollo di successo per la coltura intensiva di grandi popolazioni di ricci di mare dovranno gestire l'ostacolo del cannibalismo. Comprendere queste scoperte è un primo passo per identificare le condizioni di coltura dei ricci di mare per un uso commerciale” (Robert Fischer professore di biologia dell'Università dell'Alabama).

2. Importanza ecologica

In relazione alla posizione del riccio di mare nell'ecosistema marino bisogna considerare il fatto che essendo esso prevalentemente erbivoro, è il maggior consumatore di alghe e piante marine nelle acque poco profonde ed è quindi molto importante per la salvaguardia del bio-sistema

acquatico e per il mantenimento dell'equilibrio delle delicate reti alimentari marine dei primi metri di profondità, regolando la crescita delle alghe nei substrati rocciosi. Essendo inoltre un animale opportunistico preferisce nutrirsi di cibo meno appetibile ma più diffuso, dando così un importante contributo alla biodiversità delle comunità bentoniche.³⁸

Se le popolazioni di riccio di mare sono molto abbondanti possono portare alla completa estinzione delle alghe e allo svilupparsi dei cosiddetti deserti rocciosi. Questa evenienza si configura ogni volta che i ricci vengono lasciati crescere in assenza di predatori.^(39,40)

3. Il mercato

Il mercato delle gonadi di riccio può essere diviso in due tipologie ben definite. Il mercato mondiale e quello del bacino del mediterraneo. Nei paesi dove non è presente il *Paracentrotus lividus* vengono raccolti e consumati altri tipi di riccio, come per es. lo *Strongylocentrus droebachiensis* negli stati americani del nord-Atlantico, il *Cidaris tribuloides* nelle Indie occidentali, l'*Evechinus chloroticus* in Nuova Zelanda, lo *Strongylocentrotus franciscanus* e lo *Strongylocentrotus purpuratus* nelle coste del Pacifico degli Stati Uniti. Il mercato mondiale è fondamentalmente comandato dalla domanda crescente del mondo asiatico in particolare quello giapponese, per il quale le gonadi di riccio costituiscono un ingrediente del sushi.

Questo fatto ha causato e sta creando notevoli difficoltà alle popolazioni di ricci della costa della California, con possibilità di estinzione nel breve periodo. Di fatto i ricci di mare che venivano considerati come una peste in quanto eliminavano le foreste di alghe dei mari della California, costituiscono attualmente l'articolo di esportazione più importante dell'oceano, grazie alla costante domanda da parte dell'Asia. La creazione di stabilimenti dedicati alla raccolta e controllo delle popolazioni di ricci è cominciata negli Stati Uniti nel 1971 grazie a un programma federale, anche se il vero boom commerciale è molto più recente e spinto dal rapporto yen/dollaro.

La richiesta da parte asiatica è legata al sovrasfruttamento effettuato per decenni sulle coste giapponesi che ha portato all'estinzione quasi totale dei ricci asiatici, dove la raccolta di questi è

diminuita da 24,000 metric tons (MT) nel 1981 a circa 14,000 MT nel 1991, con una ulteriore diminuzione nei successivi dieci anni del 40%. Di contro le importazioni sono aumentate del 65%.

Ad oggi sono 23 i paesi esportatori di gonadi di riccio, in primo luogo gli Stati Uniti soprattutto verso il Giappone, seguiti da Russia, Canada, Corea del Nord, Cile, Messico, Australia e Cina.

Il mercato mediterraneo presenta delle connotazioni diverse sia per la specie di riccio presente che per le usanze. Il riccio consumato nel Mediterraneo è rappresentato esclusivamente dal *Paracentrotus lividus*, che è l'unico che incontra i gusti del consumatore europeo. Il suo consumo è limitato in maniera estensiva solo ad alcuni paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo, in particolare Italia del sud, alcune zone della Spagna, Grecia e le isole maggiori del Mediterraneo.

Il suo consumo inoltre è legato molto alla stagionalità e alla convivialità, raramente viene consumato dopo confezionamento, ma viene preferito il consumo immediato.

Nonostante la domanda non eccessiva rispetto a quella mondiale, la raccolta indiscriminata anche delle forme giovanili sta portando ad un progressivo spopolamento che ne potrebbe pregiudicare la raccolta in un prossimo futuro. Per questo motivo si stanno sperimentando sistemi di allevamento semiartificiale con lo scopo di ripopolare zone ormai completamente depredate. I sistemi di acquicoltura sperimentali stanno seguendo due linee ben precise: 1) allevamento con lo scopo di ripopolare zone di mare depredate (restocking), 2) allevamento delle forme giovanili in vasche usate per l'allevamento di alghe, con sistema di circolazione dell'acqua forzato e purificata con serie di filtri.

La shelf life delle uova è di sole tre ore e per questa ragione devono essere messe sottovuoto, o congelate nel più breve tempo possibile dopo essere state asportate dal guscio. Sulla piattaforma internet è possibile trovare gonadi di riccio provenienti dalla California e dal Maine con prezzi variabili fra 20 e 60 dollari, mentre il mercato del *P. lividus* è quasi praticamente solo locale con un costo per confezione di circa 70 g attorno ai 9 euro.

4. Valore alimentare

Nel 1948 il giornalista spagnolo Julio Camba nel suo libro “La Casa del Lùculo o el arte de comer” scriveva :

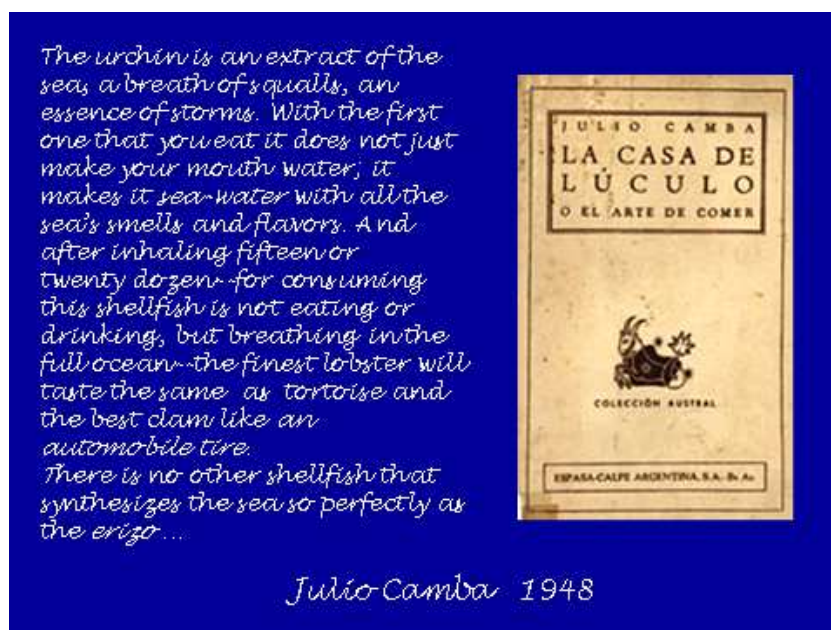


Figura 10. copertina e prefazione del libro La Casa del Luculo di Julio Camba.

Il riccio di mare, *Paracentrotus lividus*, è presente in tutto il Nord Est Atlantico, dall'Irlanda al Marocco incluse le Canarie e l'arcipelago di Madeira, è un riccio abbastanza grande, il cui diametro (calcolato sulle dimensioni orizzontali, spine escluse) può raggiungere i 7,5 cm.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Nonostante si tende comunemente ad indicarlo con il nome “riccio viola” il *Paracentrotus lividus* presenta una vasta gamma di variazioni che vengono per comodità raccolte in sette tonalità principali: black-purple, purple, red-brown, dark brown, yellow-brown, light brown e olive green.

La tonalità del colore non è legata alla profondità in cui vive o alle dimensioni ma sembra sia legata al tipo di alimentazione (prevalentemente di alghe, spugne e idrozoi). Il riccio di mare ha un grande valore commerciale in campo alimentare per via della prelibatezza delle gonadi e vengono commercializzati presso i principali mercati Ittici e pescherie della Sardegna.

Nella maggior parte dei paesi in cui è possibile trovare il *Paracentrotus lividus*, sia in passato che nel presente, occasionalmente o abitualmente le sue gonadi hanno rappresentato un apprezzato frutto di mare e per questo motivo il riccio di mare è stato raccolto intensamente,

portando in alcuni casi ad un vero e proprio pericolo di estinzione. Nel mercato si possono trovare gonadi di riccio di specie diverse dal *Paracetrotus Lividus*, fresche o congelate, confezionate in recipienti di plastica o di legno, provenienti in gran parte dal Cile, dalle Filippine o da altri improbabili mercati. Attualmente il consumo di *P. lividus* è ristretto a Francia e Spagna, e in misura minore ad Italia e Grecia, mentre la raccolta viene effettuata anche su aree maggiori (e.g. Irlanda, Portogallo e Croazia) per esportazioni.⁽⁴⁴⁻⁵³⁾

Tuttavia gran parte del prodotto viene direttamente venduto dai pescatori nei tipici banchi di degustazione o “chioschetti” dei lungomare cittadini. In Italia i mercati più attivi sono quello siciliano, pugliese e sardo, in Sardegna il mercato di Cagliari è sicuramente quello più vivace, in relazione alla maggior tradizione nel consumo di ricci. Non sono le uova del riccio marino quelle che si mangiano, come tanti credono, bensì le **gonadi**, ovvero tutto l'apparato riproduttore che peraltro, essendo un organismo ermafrodita, produce sia spermatozoi sia uova. Le gonadi crude del riccio (o polpa), hanno un inconfondibile aroma che racchiude le percezioni olfattive sprigionate dalle alghe dei fondali marini, rappresentando una vera e propria prelibatezza gastronomica.

Si prestano al consumo fresco come antipasto estraendo l'interno con un cucchiaino, ma anche per la preparazione del condimento di svariati tipi di paste tipiche e risotti o ancora può guarnire i piatti più sofisticati per palati più raffinati, grazie anche alle sue vivaci colorazioni (rosso corallo, arancio e giallo ocra). Il riccio di mare è una vera prelibatezza e rappresenta una sorta di “sfizio gustoso” in grado di soddisfare la golosità dei palati più raffinati.

La legislazione alimentare del riccio di mare fa riferimento a quella dei prodotti di mare freschi o conservati.

- Reg. (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 852/2004 del 29/04/2004 - sull'igiene dei prodotti alimentari.

- Reg. (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 853 del 29/04/2004 - che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

- Reg. (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 854 del 29/04/2004 - che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale.

La composizione chimica delle gonadi del *Paracentrotus lividus* è rappresentata nella Figura 11.

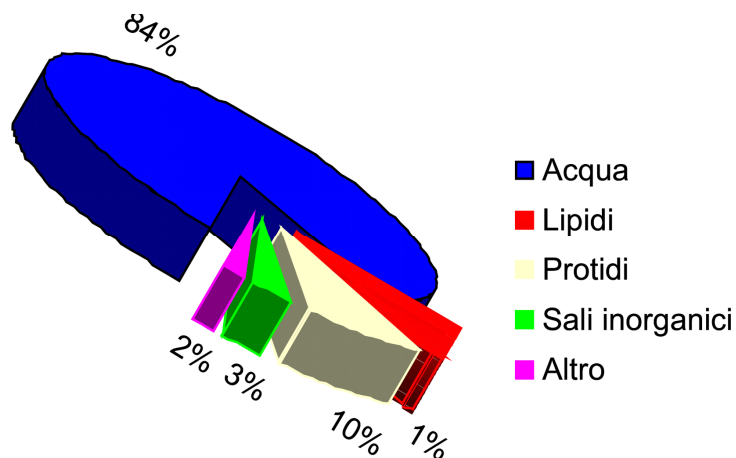


Figura 11. Composizione chimica percentuale delle gonadi di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Il contenuto totale in proteine e la tipologia è fortemente legato al periodo di maturità delle gonadi e segue per questo motivo un ciclo stagionale variando dal 36 al 60% (su secco). I livelli maggiori sono in concomitanza con i valori più alti di glicogeno che sembrerebbe costituire la fonte di energia utilizzata per la sintesi proteica durante la gametogenesi. Le caratteristiche organolettiche del riccio di mare vengono attribuite fondamentalmente a 5 aminoacidi, glicina, alanina, glutammato, valina e metionina. Quest'ultimo aminoacido possiede forti caratteristiche di amaro e costituisce l'ingrediente chiave delle caratteristiche gustative delle gonadi di riccio.

Eliminando la metionina il sapore del riccio di mare sarebbe molto simile a quello dei granchi o degli scampi.

La composizione della frazione lipidica è anch'essa fortemente condizionata dal ciclo stagionale e dal regime alimentare dei ricci. Studi effettuati su ricci selvatici e allevati hanno mostrato l'influenza della composizione della dieta sul livello dei lipidi totali e sulla composizione della frazione degli acidi grassi, dei quali quelli maggiormente presenti sono l'acido eicosapentaenoico (EPA), docosapentaenoico (DPA) e docosaheptaenoico (DHA). Inoltre sono presenti molti altri acidi grassi in concentrazioni minori (Tabella 1).

Per quanto riguarda la frazione vitaminica, questa è legata fortemente al tipo di alimentazione ed è rappresentata dalle vitamine liposolubili Vit. E (alfa-tocoferolo), dalla proVit. A (beta-carotene), e dalla Vit. K. Sono presenti in basse concentrazioni le vitamine idrosolubili del gruppo B, Ac. pantotenico (Vit. B5), ac. folico (Vit. B9), Vit. B1, B2, B3 e B6 e la vitamina C (Tabella 2).

Le sostanze inorganiche sono rappresentate fundamentalmente da sodio, potassio, magnesio, calcio e fosforo, inoltre sono presenti interessanti concentrazioni di zinco, manganese, selenio e ferro (Tabella 3).

Il colore è legato alla concentrazione dei coloranti ingeriti durante la dieta anche se la colorazione delle gonadi è stata messa in relazione con il sesso, i ricci maschi presentando gonadi colorate in giallo o marrone, mentre i ricci femmina rosso o arancio brillante. Comunque il numero di ricci analizzati per confermare questa correlazione non è ancora statisticamente accettabile, e il dato dovrà essere confermato in più siti con fonti alimentari diverse e su un numero maggiore di stagioni di raccolta. Le caratteristiche aromatiche rappresentano la maniera più semplice per valutare la piacevolezza organolettica del riccio e definirne il prezzo sui mercati internazionali. Analisi descrittive hanno evidenziato che le gonadi dei ricci maschi presentano un aroma dolciastro e di latticino, mentre le gonadi di riccio femmina presentano un sapore più amaro e acido,⁽⁵⁴⁾ con un flavour erbaceo e metallico. La caratterizzazione della composizione della frazione aromatica non è stata ad oggi ancora completamente delucidata ed è possibile individuare in letteratura solo delle informazioni parziali.

Fonti alimentari del riccio di mare

La composizione chimica delle gonadi del *P. lividus* è fortemente influenzata dalla sua alimentazione. Le sue preferenze alimentari sono state studiate in laboratorio fornendo ai ricci mantenuti in vasche alimenti diversi in quantità simili e abbondanti. Ulteriori informazioni sono state ottenute studiando la quantità di un determinato alimento all'interno del sistema digerente del riccio e la quantità di alimento presente nell'habitat di raccolta (indice di Ivlev).

Un alimento viene definito “preferito” o “evitato” quando la sua quantità percentuale nel sistema digerente del riccio è al di sopra o al di sotto di quella riscontrata nel suo ambiente. Quando i dati ottenuti in vitro vengono trasferiti in sistemi in mare aperto, è necessario tenere conto delle molteplici variabili (fra le quali l’abilità del riccio nel raggiungere il cibo preferito e nella manipolazione, differenze stagionali) presenti che potrebbero influenzare il dato finale di preferenza.

Il riccio animale come alimento per la fauna marina

I ricci sono fonte di nutrimento per molti predatori. Nel mare mediterraneo è facile trovare resti di riccio nell’apparato digerente di pesci della famiglia degli Sparidae quali in particolare il genere *Diplopus*, della famiglia Labridae genere *Labrus* e *Coris* e il crostaceo *Maja crespata*. La stella marina *Marthasterias glacialis* pur essendo in grado di attaccare tutte le classi dimensionali di *P. lividus* consumando in media un riccio ogni 4-5 giorni, non risulta essere uno dei predatori maggiori a causa della scarsità della popolazione.

Tabella 1. Concentrazione media (%) degli acidi grassi nelle gonadi di diverse specie di riccio.

Acidi grassi	<i>Spatangus Purpureus</i>	<i>Echinus Melo</i>	<i>Sphaerechinus Granularis</i>	<i>Paracentrotus Lividus</i>
C13:0	0,32 ± 0.03	0,20 ± 0.01	n.d	n.d
C14:0	7,13 ± 0.02	7,45 ± 0.02	7,49 ± 0.01	16,52 ± 0.48
C14:0 12-methyl (ante-iso C15)	0,31 ± 0.02	0,41 ± 0.01	0,36 ± 0.01	0,59 ± 0.01
C15:0	5,48 ± 0.03	5,62 ± 0.01	3,37 ± 0.01	2,51 ± 0.10
C15:0 13-methyl (ante-iso C16)	0,40 ± 0.01	0,43 ± 0.01	0,30 ± 0.01	0,41 ± 0.03
C16:0	22,85 ± 0.06	22,66 ± 0.01	30,31 ± 0.02	38,75 ± 0.11
C16:1 n7	3,15 ± 0.03	3,38 ± 0.03	3,33 ± 0.02	2,59 ± 0.15
C16:0 14-methyl (ante-iso C17)	0,45 ± 0.01	0,37 ± 0.01	0,37 ± 0.01	0,49 ± 0.01
C16:0 10-methyl	0,12 ± 0.03	0,12 ± 0.01	0,90 ± 0.01	0,21 ± 0.06
C16:1 n9 7-methyl	3,56 ± 0.01	3,67 ± 0.02	0,28 ± 0.01	0,38 ± 0.02
C17:0	4,34 ± 0.02	4,15 ± 0.02	1,34 ± 0.01	0,66 ± 0.03
C17:1 n7	0,19 ± 0.01	0,31 ± 0.01	0,38 ± 0.01	0,31 ± 0.01
C17:0 15methyl (ante-iso C18)	0,54 ± 0.01	0,53 ± 0.01	0,21 ± 0.01	0,03 ± 0.02
C18:0	9,92 ± 0.05	9,81 ± 0.01	5,38 ± 0.01	3,63 ± 0.07
C18:1t n9	0,97 ± 0.02	0,88 ± 0.01	0,44 ± 0.02	0,19 ± 0.01
C18:1 n9	1,15 ± 0.02	1,28 ± 0.02	1,87 ± 0.02	1,52 ± 0.04
C18:1c n7	0,71 ± 0.01	0,66 ± 0.02	2,52 ± 0.02	2,11 ± 0.04
C18:2 n6	0,16 ± 0.02	0,16 ± 0.01	1,86 ± 0.01	1,94 ± 0.26
C18:2 n4	0,16 ± 0.01	n.d	0,12 ± 0.01	0,06 ± 0.03
C18:0 16methyl (anteiso C19)	0,89 ± 0.02	0,90 ± 0.01	0,52 ± 0.01	0,28 ± 0.03
C18:3 n6 (gamma linolenic)	n.d.	n.d	0,51 ± 0.02	0,36 ± 0.01
2-hexyl-cycloprpaneoctanoic ac	1,19 ± 0.01	1,14 ± 0.01	0,55 ± 0.02	0,35 ± 0.02
C18:3 n3 alfa-linolenico	0,05 ± 0.01	0,07 ± 0.01	1,63 ± 0.02	1,90 ± 0.03
C18:4 n3	0,32 ± 0.01	0,32 ± 0.01	1,78 ± 0.01	1,55 ± 0.03
C20:0	1,18 ± 0.01	1,04 ± 0.01	0,80 ± 0.01	0,67 ± 0.06
C20:1 n9	3,64 ± 0.01	3,70 ± 0.01	3,30 ± 0.02	2,13 ± 0.04
C20:1 n7	2,75 ± 0.02	2,46 ± 0.01	0,94 ± 0.02	1,92 ± 0.15
C20:1n4	0,20 ± 0.01	0,21 ± 0.01	0,37 ± 0.02	0,49 ± 0.07
C20:2 n6	3,31 ± 0.01	3,06 ± 0.01	1,29 ± 0.01	2,05 ± 0.14
C20:2 n7	n.d	n.d	0,15 ± 0.01	0,27 ± 0.05
MonoMe (9,5)	0,07 ± 0.01	0,08 ± 0.01	0,05 ± 0.01	0,03 ± 0.01
C20:2 n3	1,13 ± 0.01	1,09 ± 0.01	1,89 ± 0.02	1,53 ± 0.03
C20:3 n6	0,20 ± 0.01	0,22 ± 0.01	0,22 ± 0.01	0,20 ± 0.02
C20:3 n9	n.d.	n.d	0,49 ± 0.02	0,33 ± 0.01
DiMe (9,5) FA	0,11 ± 0.01	0,15 ± 0.01	0,18 ± 0.01	0,01 ± 0.00
cycloprop 2oetyl (C22H42O2)	0,18 ± 0.01	0,13 ± 0.01	0,22 ± 0.01	0,25 ± 0.01
C20:4 n6	5,36 ± 0.02	5,61 ± 0.01	11,79 ± 0.02	3,25 ± 0.04
C20:3 n3	0,42 ± 0.01	0,38 ± 0.01	0,76 ± 0.01	1,30 ± 0.07
DiMe (11,3) FA	0,27 ± 0.01	0,10 ± 0.01	0,12 ± 0.01	0,28 ± 0.06
C20:4 n3	0,10 ± 0.01	0,05 ± 0.01	0,23 ± 0.01	0,34 ± 0.01
C20:5 n3	10,70 ± 0.01	10,97 ± 0.02	7,87 ± 0.02	4,76 ± 0.12
C20:3 n?	0,07 ± 0.01	0,12 ± 0.01	0,06 ± 0.01	n.d
C22:1 n9	1,92 ± 0.01	1,68 ± 0.01	0,93 ± 0.02	1,12 ± 0.01
C22:2 n6	0,13 ± 0.01	0,10 ± 0.01	n.d	0,08 ± 0.01
C22:2 n3	0,07 ± 0.01	0,08 ± 0.01	n.d	0,22 ± 0.01
MonoMe (11,5) FA	0,99 ± 0.02	0,96 ± 0.01	0,13 ± 0.01	0,14 ± 0.03
DiMe (11,5) FA	0,28 ± 0.01	0,38 ± 0.01	0,31 ± 0.01	0,28 ± 0.03
C22:4 n6	0,11 ± 0.01	0,12 ± 0.01	0,24 ± 0.01	0,13 ± 0.01
C22:5 n6	0,12 ± 0.01	0,13 ± 0.01	0,46 ± 0.01	0,17 ± 0.04
C24:0	0,42 ± 0.01	0,44 ± 0.01	0,17 ± 0.01	0,19 ± 0.03
C22:6 n3	1,76 ± 0.03	2,04 ± 0.03	0,70 ± 0.01	0,21 ± 0.02

Tabella 2. Valori minimo e massimo delle vitamine presenti nelle gonadi di riccio di mare.

Vitamina A Retinolo Equivalenti	5.8µg	221µgRE
Vitamina E Alpha Tocopherol	0.36mg	2.2mg
Vitamina K	2.7µg	17µg
Vitamina B1	0.01mg	0.32mg
Vitamina B2	0.04mg	0.36mg
Niacina	0.11mg	3.48mgNE
Vitamina B6	0.02mg	0.35mg
Vitamina B12	0.13µg	0.8µg
Folate	36µg	80µg
Acido Pantotenico	0.07mg	1.5mg
Vitamina C	0.3mg	33mg

Tabella 3. Valori minimo e massimo delle sostanze inorganiche presenti nelle gonadi di riccio di mare.

Sodium	22mg	~ 1000mg
Potassium	34mg	833mg
Calcium	1.2mg	221mg
Magnesium	2.7mg	91.8mg
Phosphorus	39mg	381mg
Iron	0.09mg	3.49mg
Zinc	0.2mg	3mg
Copper	0.01mg	0.24mg
Manganese	0.01mg	1.17mg

Post raccolta del riccio di mare: tecnologie di conservazione

A livello mondiale sono numerose le aziende che, sfruttando le comuni tecnologie di conservazione, hanno proposto al mercato prodotti con denominazioni commerciali diverse, concorrendo in tal modo allo sviluppo di consumi non più legati alla stagionalità e alla freschezza.

In Italia queste conserve alimentari, generalmente identificate con la denominazione di "polpa di riccio", vengono confezionate in barattoli di latta o vetro (il vetro è preferito dal consumatore, perché all'atto d'acquisto si può osservare il contenuto per verificare l'assenza di difetti o colorazioni anomale); il liquido di governo è costituito, generalmente, da acqua e sale marino (ciò si indica in etichetta con la dicitura "al naturale") e il prodotto risulta, infine, addizionato con additivi (es. aromi naturali, correttori di acidità, ecc).

Nel mercato estero è più facile trovare prodotti essiccati e in atmosfera controllata, conservati in alcool previa o meno sterilizzazione o in soluzione acquosa al 3% di NaCl, sterilizzati e surgelati o solo surgelati.

Il trattamento di sterilizzazione allunga notevolmente la *shelf-life*, ma incide pesantemente sulle caratteristiche fisiche e sensoriali del prodotto, che perde completamente l'originale freschezza. Per ottenere alimenti stabili ma con elevate caratteristiche nutrizionali e sensoriali, ormai, nell'industria alimentare si ricorre sempre più spesso a tecnologie definite *mild*.

Il segreto della conservazione della polpa di riccio risiede nella presenza in essa dell'acido citrico (E330), che abbassa il pH a valori inferiori a 7, optimum per la proliferazione microbica.

Il trattamento con alte pressioni idrostatiche (350 Mpa e 450 Mpa) e basse temperature (35 °C e 50 °C) presenta rispetto ai trattamenti di stabilizzazione termica convenzionali una maggiore conservazione delle proprietà sensoriali (colore, consistenza, aroma, gusto) del prodotto fresco.

Questa tipologia di trattamento permette di mantenere costante la popolazione microbica anche dopo 60 giorni di conservazione a 4 °C.

La surgelazione per periodi sino a sei mesi viene ottenuta mediante immersione delle gonadi in una soluzione satura di cloruro di sodio, con successivo trattamento in una soluzione contenente

cloruro di sodio, fosfato di sodio e un'agente antiossidante, quindi operando una surgelazione rapida.

2. L'area di gestione sperimentale del riccio di mare a Capo Pecora

1. La tutela del riccio di mare

La crescente domanda alimentare delle gonadi di riccio di mare, come precedentemente detto, ha causato una eccessiva asportazione e di conseguenza una rimarchevole diminuzione delle popolazioni selvatiche in molti siti, dove il riccio di mare è diventata una specie rara.^(49,23,55,56)

Le strategie per la promozione di uno sviluppo socio-economico rispettoso del bene ambiente non possono prescindere da forme di programmazione che vedano interventi coerenti con le politiche comunitarie, nazionali e attraverso un'impostazione basata su interessi settoriali e/o locali, senza preoccuparsi delle ricadute sugli ambienti marino e terrestre limitrofi.

Al contrario, una visione unitaria ed integrata nell'approccio alle problematiche della costa deve prevedere una forte correlazione operativa, non più procrastinabile, tra la Gestione Integrata delle Zone Costiere e il Piano Nazionale della Biodiversità.

Un contributo a tale proposito può derivare dalla forte sinergia da stabilire tra il Sistema della Ricerca, quello delle Aree protette e il Sistema delle Agenzie per la Protezione dell'Ambiente, volta ad affermare e a rafforzare lo sviluppo di nuove metodologie analitiche, all'acquisizione delle informazioni e alla gestione di territori estremamente vulnerabili, quali quelli appartenenti all'ecosistema costiero.

Gestione integrata delle coste e Biodiversità

In questo contesto l'Agenzia regionale Conservatoria delle Coste, con il supporto scientifico del Centro di Competenza sulla Biodiversità Marina (Com. Bio. Ma.) e in collaborazione con il

Servizio Pesca dell'Assessorato Regionale dell'Agricoltura e Riforma Agro Pastorale e la collaborazione esterna della Sezione di Chimica degli Alimenti dell'Università degli Studi di Cagliari, ha elaborato un progetto orientato all'utilizzo razionale delle risorse marine, utile per individuare strategie di sviluppo sostenibile in piccole località costiere della Sardegna.

Il progetto denominato GIRA "Gestione integrata delle risorse alieutiche" è stato sviluppato all'interno del bando Camp-Italia (Coastal Area Management Programme) e prevede un'azione pilota sul ripopolamento dell'astice (*Homarus gammarus*), del polpo comune (*Octopus vulgaris*) e del riccio di mare (*Paracentrotus lividus*).

Il progetto è articolato in tre azioni che verranno sviluppate nell'arco di tre anni: il ripopolamento sperimentale dell'astice, *Homarus gammarus*, nell'area di Castelsardo; la gestione sperimentale del polpo comune, *Octopus vulgaris*, nell'area di Su Pallosu; ed infine la gestione sperimentale del riccio di mare, *Paracentrotus lividus*, presso Capo Pecora (Comune di Arbus). Il progetto sul riccio di mare ha lo scopo di sviluppare un modello di gestione basato sulla valutazione della biomassa pescabile e il calcolo delle quote individuali di pesca. La gestione di tutte le operazioni finalizzate al conseguimento degli obiettivi delle azioni del progetto Gira quali pesca, prelievo e re-immissione di esemplari delle specie oggetto di studio, sono effettuate sotto il coordinamento e la responsabilità scientifica del Com.Bio.Ma. (Centro di competenza biodiversità marina). Le attività sono realizzate con la collaborazione attiva dei Comuni di Buggerru ed Arbus.

Gli obiettivi del progetto sul riccio di mare sono:

- Creare un'Area DI GESTIONE SPERIMENTALE dove svolgere gli studi sul riccio di mare (Decreto Ass. Agricoltura n. 669/Dec.A/18)
- Sperimentare un modello per quantificare i ricci nell'area sperimentale (STOCK ASSESSMENT)
- Computare le QUOTE di pesca per gli operatori locali autorizzati alla pesca del riccio
- Sperimentare, localmente, una FILIERA CORTA del riccio di mare
- Rendere riconoscibile il prodotto locale con un marchio fiduciario di SOSTENIBILITA'

- Coinvolgere le comunità locali con iniziative mirate alla SALVAGUARDIA e valorizzazione della specie.

A queste azioni grazie all'attivazione del presente dottorato è stata aggiunta l'attività di controllo dei contaminanti nelle gonadi, per valutare la qualità anche dalla prospettiva della sicurezza alimentare.



Figura 12. Zona di ripopolamento del riccio di mare a Capo Pecora.

2. Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono inquinanti lipofili largamente presenti nell'ambiente che si formano durante la combustione incompleta o la pirolisi di materiale organico, come carbone, legno, prodotti petroliferi e rifiuti. Di conseguenza, la loro formazione è per lo più associata alle seguenti sorgenti (IPCS, 1998):

- processi industriali vari (in particolare: produzione di alluminio, produzione di ferro e acciaio, fonderie);
- lavorazioni del carbone e del petrolio;
- impianti di generazione di energia elettrica;
- inceneritori;
- riscaldamento domestico, specialmente a legna e carbone;
- emissioni da veicoli a motore;
- incendi di foreste;
- combustioni in agricoltura;
- cottura di alimenti su fiamma;
- fumo di tabacco.

I vulcani possono inoltre rappresentare una sorgente naturale di IPA con un impatto locale rilevante. A causa di queste fonti numerose e diffuse, gli IPA sono ubiquitari e si ritrovano in tutti i comparti ambientali, nei quali essi entrano soprattutto attraverso l'atmosfera.

Durante ogni processo di formazione, e conseguentemente nelle matrici alle quali è comunemente esposta la popolazione (aria, acqua, suolo e alimenti), gli IPA sono sempre presenti come classe, mai come singoli composti, in miscele complesse contenenti anche altre sostanze e classi chimiche. Negli alimenti non sottoposti a cottura con generatori di IPA, la loro presenza è essenzialmente dovuta a contaminazione ambientale: deposizione di materiale particolato atmosferico (es. su grano, frutta e verdure), assorbimento da suolo contaminato (es. per le patate), assorbimento da acque di fiume e di mare contaminate (es. per mitili, pesci e crostacei).

Sorgenti comuni negli alimenti trasformati o lavorati sono i trattamenti termici (in particolare: la cottura alla griglia, arrosto e al forno, e la frittura) e i processi di lavorazione. Questi ultimi riguardano specialmente processi di essiccazione attraverso i fumi di combustione, nei processi di affumicatura con i metodi tradizionali.⁽⁵⁷⁾

L'eventuale presenza di IPA nell'acqua potabile è generalmente dovuta alla cessione dai rivestimenti, in catrame o bitume, delle condutture di distribuzione dell'acqua stessa (WHO, 1998).

1. Struttura e proprietà chimico fisiche degli IPA

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono una vasta classe di composti organici contenenti due o più anelli aromatici condensati (Figura 13).

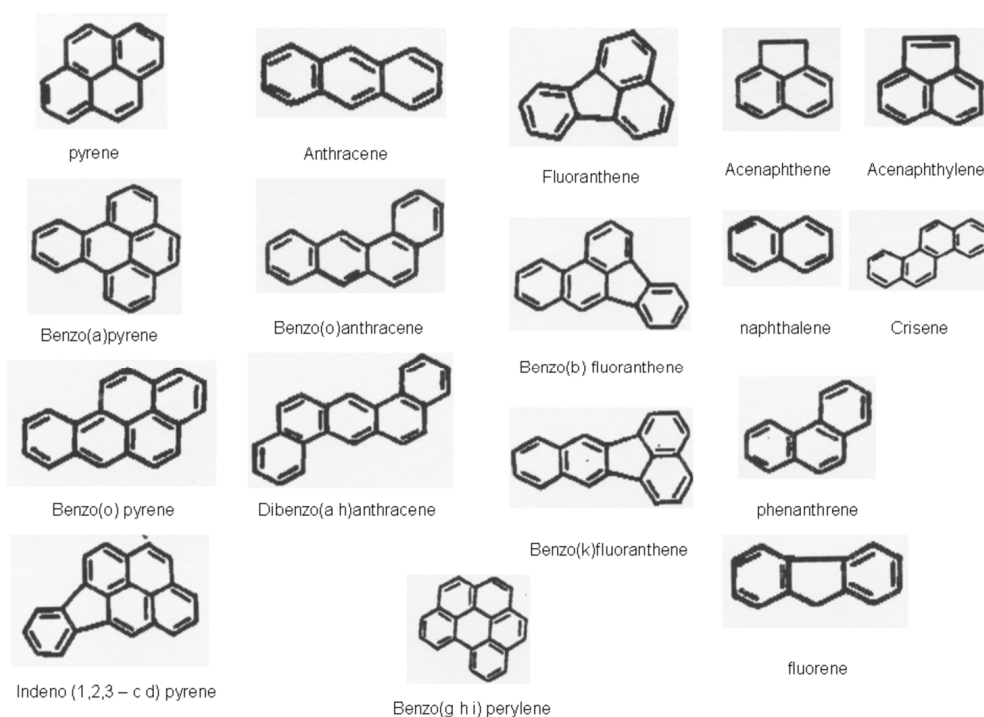


Figura 13. struttura chimica degli IPA più frequentemente riscontrati negli alimenti e nell'ambiente.

In particolare, il nome IPA si riferisce ai composti contenenti solo atomi di carbonio e idrogeno (cioè, gli IPA non sostituiti e i loro derivati alchilsostituiti), mentre il nome più generale “composti policiclici aromatici” include anche i derivati funzionali (es. i nitro-IPA) e gli analoghi eterociclici (es. gli aza-areni). Il termine “polinucleari” è spesso usato al posto di “policiclici”. La nomenclatura codificata dalla *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1979) è usata anche dal *Chemical Abstracts Service* (CAS, 1988, 1990). Alcuni composti, tuttavia, vengono comunemente riportati in letteratura con nomi non sistematici. Gli IPA possono formarsi in numero

di alcune centinaia. Più di un centinaio sono stati identificati nel materiale particolato atmosferico⁽⁵⁸⁾ e circa duecento nel fumo di tabacco.⁽⁵⁹⁾ Hanno solubilità molto scarsa in acqua, sono solubili in molti solventi organici⁽⁶⁰⁾ e sono fortemente lipofili.⁽⁶¹⁾

Il benzo[a]pirene (BaP) è il composto più ampiamente studiato dal punto di vista tossicologico e più frequentemente determinato nelle varie matrici, sia ambientali che alimentari. Il BaP viene frequentemente usato come indicatore della classe degli IPA, per quanto riguarda sia i livelli di contaminazione che il rischio cancerogeno (il rischio sanitario di gran lunga più importante associato a questa classe di sostanze). Tale scelta si basa su alcune osservazioni: la sostanziale somiglianza, almeno in termini di ordini di grandezza, tra i “profili” degli IPA rispetto al BaP (cioè i rapporti tra le concentrazioni degli IPA, in particolare quelli cancerogeni, e la concentrazione del BaP), osservata in campioni anche di diversa origine; la potenza cancerogena del BaP relativamente elevata rispetto agli altri IPA; i livelli di concentrazione del BaP simili o superiori a quelli degli altri IPA cancerogeni.⁽⁶²⁾

L'utilizzo degli IPA è limitato sostanzialmente a scopi di ricerca. Le eccezioni sono rappresentate dal naftalene, usato come antitarmico per i tessuti, e da un uso occasionale di alcuni IPA (naftalene, acenaftene, fluorene, antracene, fenantrene, fluorantene e pirene) come intermedi nella produzione di plastificanti, pigmenti, coloranti e pesticidi.⁽⁶²⁾

Il Naftalene è il rappresentante più semplice della classe degli IPA è costituito da due anelli benzenici condensati e può essere preso ad esempio per comprendere il comportamento chimico degli IPA. Tutti gli altri si possono considerare formalmente derivati da questo per lo più per aggiunta di anelli benzenici condensati.

La struttura molecolare del naftalene è planare, ciclica, formata da una sequenza di atomi di C ibridati sp^2 , ciascuno con un orbitale pz semioccupato. Il naftalene possiede un totale di 10 elettroni p, rispettando la regola di Hückel che definisce i composti aromatici in base al numero di elettroni del sistema coniugato. Le caratteristiche chimico-fisiche del naftalene sono quelle tipiche dei composti aromatici. Nonostante l'elevato grado di insaturazione, il sistema dà reazioni di

sostituzione elettrofila aromatica e molto difficilmente reazioni di addizione. Il sistema presenta una elevata stabilità termodinamica (61 Kcal/mole), dovuta appunto alle sue caratteristiche di aromaticità.

Fra gli idrocarburi policiclici con tre anelli aromatici l'antracene ha energia di risonanza 84 Kcal/mol e il fenantrene ha energia di risonanza 92 Kcal/mol. All'aumentare del numero di anelli benzenici impiegati aumenta il numero dei possibili composti (Tabella 4).

Tabella 4. relazione fra il numero di anelli e il numero di idrocarburi possibili.

n.ro anelli benzenici	n.ro di idrocarburi possibili
5	22
6	88
7	333
8	1448

L'EPA (Environmental Protection Agency degli Stati Uniti) ha inserito nella lista dei "priority pollutants" 16 idrocarburi policiclici aromatici, più il Benzo[e]pirene, alcuni dei quali appartengono alla classe di cancerogenicità 2A (probabile cancerogeno per l'uomo) e 2B (possibile cancerogeno per l'uomo) come definiti dalla IARC (International Agency for Research on Cancer).

Tossicità

Gli IPA hanno una tossicità multiorgano grazie all'elevata solubilità, possono attraversare le membrane molto facilmente, senza bisogno di trasporto attivo. Una volta ingeriti (o inalati), gli IPA sono rapidamente assorbiti attraverso il tratto gastro-intestinale o l'epitelio polmonare, e distribuiti e metabolizzati in vari tessuti e organi (soprattutto quelli più ricchi di grasso, polmone, pelle, esofago, colon, fegato, placenta, ecc). la tossicità primaria è molto bassa ma in seguito a reazioni di biotrasformazione (in particolare il diolo-eossido) aumenta notevolmente. Gli IPA sono risultati particolarmente implicati nei tumori del polmone, della vescica e della cute, ma anche di rene,

laringe, mammella, ed esistono sospetti su una varietà di altri tumori, sia per quanto riguarda alti livelli occupazionali di IPA sia per quanto riguarda le basse esposizioni ambientali (anche se in modo molto meno spiccato). Il primo step del metabolismo degli IPA è finalizzato ad aumentarne la idrofilicità e facilitarne l'escrezione, è una ossidazione. Il pathway metabolico del BaP è quello studiato con maggiore dettaglio, e può essere preso come esempio (Figura 14).

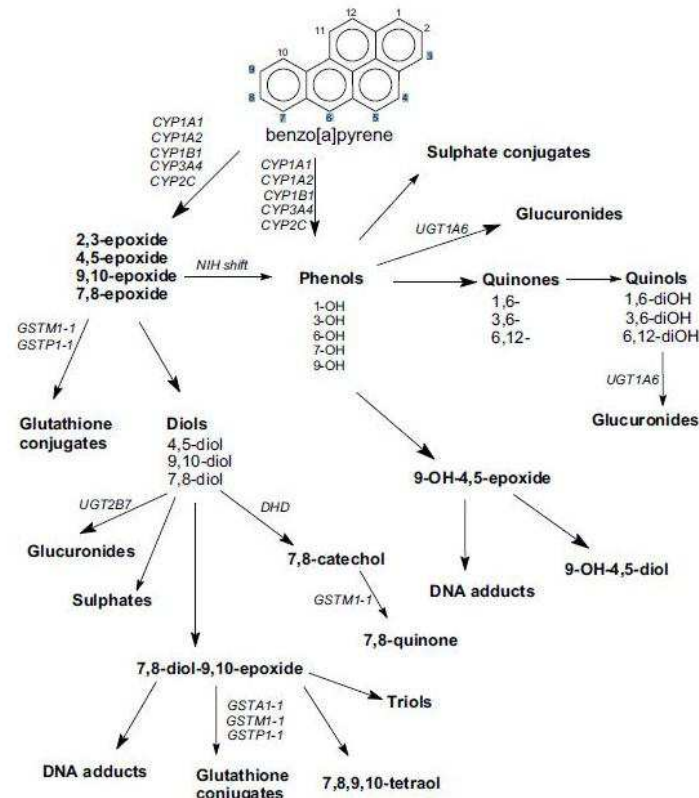


Figura 14. Pathway metabolico del BaP nell'uomo.

Il composto originale viene sottoposto ad ossidazione da parte degli enzimi della famiglia del citocromo P450, con formazione di epossidi e specie idrossilate in varie posizioni, che subiscono a loro volta ulteriori trasformazioni metaboliche. Mentre gli IPA in sé sono chimicamente inerti, nel corso di queste reazioni metaboliche possono formarsi degli intermedi elettrofili capaci di interagire con varie macromolecole biologiche, compreso il DNA.⁽⁶²⁾

Gli effetti tossici degli IPA sono ascrivibili sia alla generazione di intermedi metabolici reattivi, che alla attivazione da parte della molecola parentale del recettore AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*). Il recettore AhR è un regolatore trascrizionale localizzato nel citoplasma che, attivato dal

suo ligando, entra nel nucleo ove si lega a sequenze specifiche del promotore e dell'*enhancer* (AHRE, *AhR Response Elements*) attivando la trascrizione di varie famiglie di geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici, nella trasduzione del segnale e nel controllo della proliferazione cellulare.⁽⁶³⁾ Tra gli effetti tossici degli IPA, l'immunosoppressione,⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ gli effetti teratogeni e sulla riproduzione,⁽⁶⁶⁾ e l'effetto promovente nella cancerogenesi⁽⁶⁷⁻⁶⁸⁾ sono mediati dalla attivazione del recettore AhR.

In genere gli IPA mostrano bassa tossicità acuta, con NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) per somministrazione orale superiori ai 100 mg/kg p.c. Anche altri effetti tossici diversi da quelli cancerogeni (immunotossicità, effetti sulla riproduzione) sono stati osservati solo in seguito ad esposizione ad alte dosi. La caratteristica tossicologica di maggiore rilievo in relazione ai possibili rischi posti dalla presenza di IPA negli alimenti è quindi senz'altro l'attività genotossica e cancerogena, per le quali si ritiene che non esista dose soglia.⁽⁵⁷⁾

In particolare otto di questi sono classificati attualmente probabili umano-carcinogenici in "Annex VI of Regulation (EC) 1272/2008 (CLP Regulation): benz[a]antracene (BaA), benzo[a]pirene (BaP), benzo[e]pirene (BeP), benzo[b]fluorantene (BbF), benzo[k]fluorantene (BkF), benzo[j]fluorantene (BjF), crisene (CHR), e dibenzo[a,h]antracene (DBahA).

2. *Comportamento e distribuzione ambientale*

Come detto gli IPA sono ubiquitari e si ritrovano in tutti i comparti ambientali, nei quali essi entrano soprattutto attraverso l'atmosfera.

- ***Ambiente atmosferico***

Gli IPA sono comuni inquinanti dell'atmosfera. La concentrazione degli IPA nell'aria esterna urbana ammonta ad alcuni nanogrammi per metro cubo. Tale concentrazione può raggiungere livelli dieci volte superiori negli ambienti molto inquinati. La concentrazione di IPA negli ambienti chiusi è dovuta al fumo del tabacco ed alla combustione del legno e del carbone.

Gli IPA contenenti quattro anelli, o un numero inferiore, in genere rimangono in forma gassosa quando vengono immessi nell'atmosfera. Dopo aver stazionato meno di 24 ore nell'aria esterna, di solito vengono degradati attraverso una sequenza di reazioni radicaliche che hanno inizio con la addizione di un radicale OH.

Al contrario dei loro analoghi inferiori, gli IPA con più di 4 anelli non permangono a lungo nell'atmosfera, ma tendono a venire adsorbiti su particelle di fuliggine o di cenere. Poiché molte particelle di fuliggine hanno dimensioni tali da essere respirate, gli IPA possono penetrare nei polmoni mediante la respirazione.

I gas ed il particolato emessi dagli scarichi degli autoveicoli a motore diesel, che recentemente sono stati indicati come "probabili cancerogeni per l'uomo" contengono non solo IPA, ma anche alcuni composti derivati che presentano il nitro-gruppo, NO₂, come sostituente.

Questi composti, che si formano nei motori, per reazione dell'IPA corrispondente con i radicali NO₂ ed N₂O₄, sono ancora più cancerogeni degli IPA corrispondenti. Gli IPA si possono combinare con l'acido nitrico dello smog fotochimico.

Il particolato atmosferico è costituito da centinaia di diverse specie chimiche, inorganiche ed organiche. Per quanto riguarda la frazione organica la classe degli idrocarburi policiclici aromatici costituisce una frazione inconsistente della massa totale del particolato atmosferico (< 0,1%) ma ha un importante interesse tossicologico, in relazione all'attività mutagena e cancerogena di alcuni IPA.

In ambiente urbano le elevate concentrazioni di IPA in atmosfera sono principalmente legate al traffico autoveicolare (in ambiente urbano ~ 80%). A temperatura ambiente, la distribuzione dei diversi IPA tra fase gassosa e particolata dell'atmosfera dipende principalmente dalla loro tensione di vapore, che varia da 10¹ a 10⁻¹⁰ Pa (a 25°C). Gli IPA con più di 5 anelli aromatici, fra i quali si trovano i composti a maggior interesse tossicologico (es. Benzo[a]pirene) sono presenti quasi esclusivamente nella fase particolata (>90%), adsorbiti alle particelle fini.

Alcuni studi hanno dimostrato come la mutagenicità diretta del particolato atmosferico sia principalmente attribuibile proprio alla classe degli idrocarburi policiclici aromatici (e derivati): tra questi attualmente la normativa italiana prevede un limite di legge solo per il benzo[a]pirene, stabilendo che la sua concentrazione nel PM10 deve rispettare l'obiettivo di qualità di 1 ng/m³ come media mobile giornaliera dei valori registrati in 1 anno.

Ambiente terrestre

Dal comparto atmosferico gli IPA possono spostarsi nell'ambiente terrestre attraverso fenomeni di deposizione secca o umida. Particolarmente efficiente nella traslocazione dall'atmosfera risultano essere le precipitazioni nevose che hanno la capacità di rimuovere grosse frazioni del particolato per la loro elevata porosità e area superficiale specifica. Una volta depositatisi sul suolo gli IPA sono soggetti a vari processi: ripartizione, degradazione, trasporto.

Gli elevati rapporti di K_{oc} suggeriscono che questi siano fortemente adsorbiti dalla frazione organica. Mentre molto basse risultano le traslocazioni per solubilizzazione nella fase acquosa.

- ***Ambiente acquatico***

L'inquinamento delle acque marine può derivare dalla immissione in esse di acque di superficie inquinate o direttamente dall'atmosfera, inoltre possono contribuire a questo anche le attività antropiche, in particolare l'utilizzo di natanti dotati di motori "Diesel".

Essendo lipofili e praticamente non solubilizzandosi nelle acque marine gli IPA si depositano nei sedimenti dai quali possono venire rimossi.⁽⁶⁹⁾ Il fenomeno del bioaccumulo degli IPA negli organismi bentonici marini è stato ampiamente dimostrato da analisi e monitoraggio delle acque e dei sedimenti e dall'utilizzo di organismi bio-indicatori di inquinamento come il *Mytilus Galloprovincialis*.⁽⁷⁰⁻⁷⁸⁾

- *Assorbimento e contaminazione dei vegetali*

Nei vegetali l'assorbimento dei soluti è controllato da proteine carrier e da canali proteici e proteine catalitiche (pompe ioniche). Tale processo è specifico e selettivo (solo un determinato ione può passare), ma nonostante questa selettività, i meccanismi possono a volte essere ingannati, e questo vale anche per i composti organici. La velocità di assorbimento dei soluti varia con la loro concentrazione. Le membrane contengono diverse proteine che conoscono specificatamente determinati soluti, si combinano con essi e rendono più veloce il loro trasporto all'interno. L'assorbimento degli IPA a livello radicale avviene mediante trasporto xilematico. Essendo lo xilema, detto anche legno, un insieme di tessuti vegetali presente nelle piante vascolari e adibito alla conduzione dell'acqua e dei soluti in essa disciolti di carattere ionico, si desume che gli IPA presenti nel suolo aventi alta lipofilità e scarsa idrofilità difficilmente vengono assorbiti attraverso questa via. Gli IPA, infatti, presentano un coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua solitamente superiore a 10^4 , il che si traduce in una bassa tendenza al trasferimento di tali sostanze nello xilema.

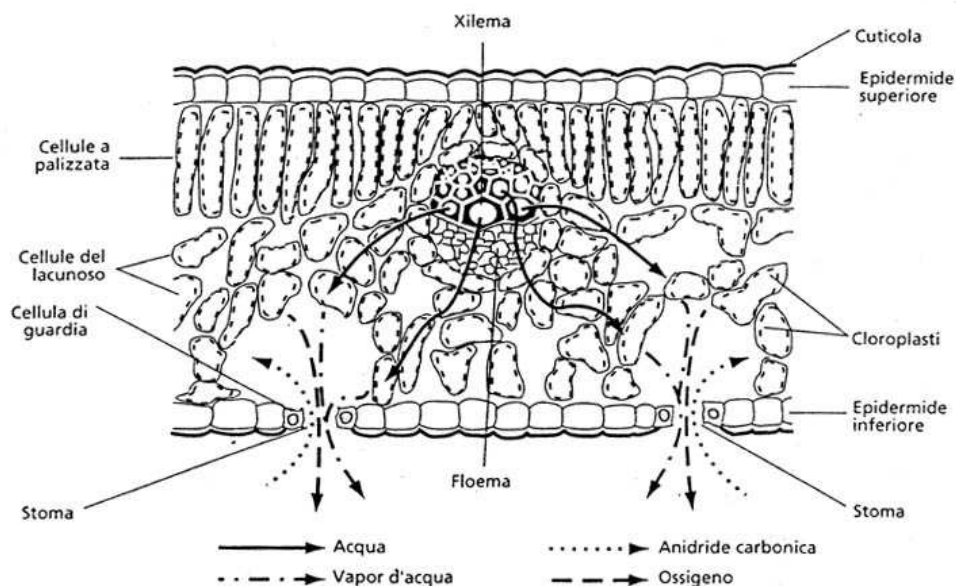


Figura 15. Struttura di una cellula vegetale.

E' importante capire che l'assorbimento nella pianta non avviene esclusivamente dalle radici ma soprattutto dalle foglie che costituiscono la sede delle principali reazioni biochimiche dell'organismo. Come si può osservare dalla figura 15, gli scambi con l'ambiente esterno avvengono a livello degli stomi.

1. Legislazione

Il Decreto Ministeriale del 25/11/1994 fissa come obiettivo di qualità per gli IPA il valore giornaliero medio annuale di 1 ng/mc in riferimento al benzo(a)pirene.

Il DM n.163 del 21/04/1999 individua i criteri ambientali e sanitari in base ai quali i Sindaci possono limitare la circolazione degli autoveicoli per migliorare la qualità dell'aria nelle aree urbane; sono presi in considerazione anche gli IPA.

Il Decreto Legislativo n.351 del 04/08/1999 recepisce la Direttiva Europea 96/62/CE e prevede nell'elenco degli inquinanti atmosferici da considerare nel quadro della valutazione e della gestione della qualità dell'aria ambiente anche gli Idrocarburi Policiclici Aromatici.

La Direttiva Europea 2004/107/CE concernente l'arsenico, il cadmio, il mercurio, il nichel e gli idrocarburi policiclici aromatici nell'aria ambiente è stata recepita dal Decreto Legislativo 152/2007.

L'Occupational Safety and Health Administration (OSHA) ha stabilito un limite di 0,2 mg di IPA per metro cubo di aria.

Il National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) raccomanda che i livelli nell'aria dei prodotti volatili del catrame sia inferiore a 0,1 mg/mc per un giorno lavorativo di 10 ore nell'ambito di 40 ore settimanali di lavoro.

La normativa europea comprende :

Regolamento 1881/06/CE sui livelli massimi di alcuni contaminanti negli alimenti

Regolamento 333/07/CE sul campionamento e analisi

Tali regolamenti sono emendati e saranno sostituiti da nuovi a partire dalla fine del 2012 inizio 2013.

I limiti massimi del BaP sono stati mantenuti, ma in alcuni casi adattati sulla base dei nuovi dati disponibili. I limiti massimi per la Σ 4 IPA sono stati fissati sulla base del “lower bound limit”. I limiti massimi presenti per il pesce fresco sono stati depennati in quanto gli IPA subiscono una rapida metabolizzazione nel muscolo e non si accumulano.

Tabella 5.

Matrice	Limite attuale BaP (µg/Kg)	Limite proposto BaP (µg/Kg)	Limite proposto Σ 4 IPA (µg/Kg)
Muscolo di pesce e prodotti a base di pesce affumicato	5,0	5,0 dopo 2 anni 2,0	30,0 dopo 2 anni 12,0
Molluschi bivalvi	10,0	5,0	30,0
Molluschi bivalvi affumicati	--	6,0	35,0
Spratti affumicati e spratti affumicati in scatola	--	5,0	30,0
Alimenti per l'infanzia, e alimenti dietetici a fini medici speciali	1,0	1,0	1,0

4. Messa a punto e validazione del metodo

Materiali e Metodi

Prodotti chimici

L'acetonitrile era un solvente ultra residuo di grado analitico, acquistato dalla Merck (Darmstadt, Germania). Gli standard analitici di idrocarburi policiclici aromatici QTM PAH a 2,000 mg/L in CH_2Cl_2 e 1-metilnaftalene e 2-metilnaftalene (purezza $\geq 95\%$) erano Fluka e Sigma-Aldrich (Chemie, Germany). Le soluzioni madre standard sono state preparate in acetonitrile ad una concentrazione di 10 mg/L.

Una soluzione standard mista intermedia è stata preparata combinando aliquote definite di ciascuna soluzione madre, successivamente, sono state preparate soluzioni standard di lavoro a diverse diluizioni, per potere verificare la linearità della risposta del detector e valutare i limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) dello strumento (Vryzas and Papadopoulou-Mourkidou 2002), calcolati come 3 volte e 10 volte, rispettivamente, il rapporto segnale/rumore.

Soluzioni standard degli analiti considerati sono state preparate in matrice alle stesse concentrazioni delle soluzioni di lavoro, aggiungendo apposite quantità di soluzione madre a estratti di uova di riccio non contaminati da IPA (controllo).

Analisi gascromatografica GC-ITMS

Le analisi sono state eseguite utilizzando un gas-cromatografo modello Varian 3800 munito di un autocampionatore Varian 7800 ed un iniettore split/splitless Varian 1079, ed utilizzando un rilevatore di massa a trappola ionica (ITMS) 2000. La colonna analitica era una Varian VF5ms (spessore della pellicola 30 m×0.25 mm i.d.×0.25 µm) (Varian, Milano, Italia).

Il gas di trasporto utilizzato a 1 mL/min è stato l'elio. Il campione di 1 µL è stato iniettato in modalità splitless con la valvola di spurgo programmata chiusa per 1 minuto. La temperatura dell'iniettore era di 280 °C. Lo spettrometro di massa è stato calibrato settimanalmente utilizzando il test di auto-tune del software (Saturn GC/MS Workstation 5.41). Il rilevatore di massa è stato utilizzato in modalità di EI positiva.

Le temperature di trappola, manifold e interfaccia erano rispettivamente di 170°, 100° e 200 °C. Il forno è stato programmato come riportato di seguito: 60 °C (1 min), portato a 250 °C (10 °C/min) e successivamente mantenuto a temperatura costante per 15 minuti, in seguito portato a 325 °C (15 °C/min) e mantenuto a temperatura costante per 5 minuti. La determinazione quantitativa è stata fatta in modalità MS/MS utilizzando lo ione precursore (**Tabella 6**), integrando l'area del picco dei cromatogrammi GC-ITMS in funzione della concentrazione.

L'identificazione dei picchi è stata effettuata mettendo a confronto gli spettri di massa e i tempi di ritenzione (r.t.) dei picchi cromatografici ottenuti dai campioni di riccio con quelli ottenuti dagli standard analitici utilizzati nella retta di calibrazione e con i dati della NIST MS Spectra Library (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST\EPA\NIH Mass Spectral Library version 2.0, build 12/2000).

Preparazione ed estrazione dei campioni

Per il processo di estrazione è stato utilizzato il metodo QuEChERS modificato (Anastassiades et al. 2003). Dopo la raccolta, una volta estratte le gonadi dei ricci di mare dai loro gusci, un'aliquota (1 g) di campione omogeneizzato è stata pesata all'interno di un tubo con tappo a vite insieme a 600 µg di MgSO₄, 150 µg di CH₃COONa e 1 mL di acetonitrile. Il tubo è stato poi agitato in vortex per 4 minuti e poi centrifugato per altri 4 minuti a 3.500 rpm.

Il solvente è stato trasferito in un altro tubo con tappo a vite con 90 mg di MgSO₄, 30 mg di ammine primarie e secondarie (PSA) e 15 mg di fase C18. Il tubo è stato agitato in un vortex per 4 minuti e centrifugato per altri 4 minuti a 3.500 rpm.

Lo strato superiore è stato poi filtrato utilizzando un filtro 0.45 µm PTFE (Econofilters-Agilent Technologies, Milano, Italia) ed iniettato nel GC-ITMS/MS per l'analisi.



Figura 16: Provetta "Falcon" con matrice.

Validazione del metodo

Il metodo è stato validato determinando la percentuale di deviazione standard relativa (RSD%) della ripetibilità (*r*) e della precisione intermedia (IP), del recupero e della linearità.

La ripetibilità è stata valutata analizzando sei campioni di standard fortificati ogni giorno, mentre la precisione intermedia è stata calcolata analizzando sei campioni al giorno in sei giorni diversi. La precisione del metodo è rappresentata dalla percentuale di deviazione standard relativa. L'accuratezza del metodo è stata determinata considerando la media delle percentuali di recuperi delle concentrazioni di analita inizialmente presenti nelle gonadi intere di riccio fortificate aggiungendo un volume appropriato di soluzione madre intermedia standard.

Gli esperimenti di recupero sono stati effettuati a due livelli di fortificazione 700 e 10 µg/Kg di IPA, e i campioni sono stati processati utilizzando il metodo QuEChERS descritto in precedenza. Il LOQ ed il LOD sono stati calcolati con cinque replicazioni ad ogni livello di concentrazione.

L'effetto matrice è definito come l'influenza che tutti i componenti della matrice hanno sulla risposta del rilevatore rispetto agli analiti presi in esame (facendo una stima dell'aumento o della riduzione del segnale) rispetto agli stessi standard analitici diluiti con acetonitrile puro. Le curve di calibrazione sono state costruite utilizzando soluzioni di calibrazione standard in matrice di uova di riccio.

La linearità è stata valutata con sei livelli di concentrazione per i 17 IPA presi in esame.

Analisi Statistica

Questo metodo è stato validato in accordo alle direttive presenti nella EURACHEM Guide (1998) e nella EURACHEM/CITAC Guide (2002).

L'analisi delle varianze è stata effettuata tramite il software STATISTICA, utilizzando il post-hoc test di Tukey per $p > 0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metodo gascromatografico utilizzato ha permesso di ottenere una buona separazione degli IPA presenti nelle gonadi del riccio di mare (**Figura 13**). Non sono stati rilevati picchi interferenti nel range di corsa cromatografica interessata dagli analiti presi in considerazione e non è stata necessaria nessuna pulizia aggiuntiva della miscela estratta. Gli IPA sono stati confermati abbinando tempo di ritenzione del picco (t_R) e frammentazione del MS agli standard analitici analizzati alle stesse condizioni sperimentali.

I LOQ e LOD della metodica strumentale, calcolati come dieci e tre volte il rapporto segnale/rumore, sono risultati idonei a garantire una corretta determinazione ed identificazione dei pesticidi, conformemente a quanto stabilito dal Regolamento (EC) no. 333/2007 riguardo agli IPA benzo[*a*]pirene negli alimenti (**Tabella 6**). Per gli IPA esaminati sono state preparate delle curve di calibrazione standard da 6 punti.

Il coefficiente di correlazione (R^2) ottenuto oscillava fra 0,9972 (CHR e pirene) ed 1,0000 (naftalene), mostrando una buona linearità, Il $RSD_{\max}\%$ (15) è stato rilevato per l'acenaftene. I dati sull'accuratezza sono stati ottenuti da esperimenti di recupero (5 repliche per ogni test) degli analiti precedentemente aggiunti nelle uova di riccio di mare a due livelli di fortificazione.

Sono stati raggiunti dei buoni livelli di recupero per tutti i composti esaminati in conformità ai valori riportati nella EC SANCO/10684/2009 (Commissione Europea 2009). I recuperi degli IPA variavano dal 72% al 119% ed il coefficiente di variabilità dal 3% al 17% nel più sfavorevole dei casi (**Tabella 7**).

I valori ottenuti hanno confermato che il metodo di estrazione proposto è idoneo per la determinazione dei composti IPA nelle gonadi del riccio di mare. La ripetibilità è stata stimata a $n=6$ e la precisione intermedia (IP) a $n=36$. I risultati ottenuti sono stati buoni in tutti gli esperimenti ($RSD \leq 20$) in accordo con quanto riportato nella EC SANCO/10684/2009 (**Tabella 8**).

L'RSD_{max}% è stato del 14,9% in ripetibilità per il fenantrene e del 19,9% in precisione intermedia per il BaP.

L'effetto matrice, valutato a due diversi livelli di concentrazione, ha mostrato che i composti estratti dalla matrice non hanno influenzato i risultati del rivelatore relativi agli IPA esaminati e grazie al metodo QuEChERS di estrazione e di purificazione, sia l'iniettore sia la trappola ionica non hanno necessitato di precauzioni e pulizie ulteriori a quelle previste dalla normale manutenzione (**Tabella 9**). I dati della matrice fortificata a 700 e 10 µg/kg variavano rispettivamente dall' 86% al 108% e dal 71% al 105%, con un RSD_{max} di 13 nel più sfavorevole dei casi.

Questo lavoro di tesi ha permesso di sviluppare e validare un metodo semplice e rapido per la determinazione dei residui IPA nel riccio di mare. Il metodo ha mostrato dei buoni parametri di validazione e dei buoni valori di recupero. I valori di LOQ sono risultati inferiori o in alcuni casi uguali a quelli riportati da altri metodi per le analisi sull'inquinamento dell'acqua marina, dei sedimenti e dei mitili.^(74,79)

Le piccole quantità di campioni presenti in ciascun riccio di mare sono risultate compatibili con l'analisi mediante il metodo QuEChERS utilizzato il quale ha dimostrato una buona funzionalità nell'estrazione degli IPA; gli altri metodi di estrazione degli IPA riportati in letteratura prevedono una fase di estrazione utilizzando per le analisi ambientali di IPA la gel permeation o il soxhlet oppure microestrazione in fase solida e solventi organici, e la determinazione veniva conseguita tramite cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore/rivelatore a fluorescenza, oppure tramite rivelatore gascromatografico a ionizzazione di fiamma.^(74,79,80)

Queste metodiche necessitano di maggiori quantità di campioni che nel caso dei ricci di mare non sono disponibili. Grazie al metodo di estrazione QuEChERS e alla alta capacità di selezione del metodo analitico GC-ITMS/MS, non c'è stato bisogno di ulteriori fasi di purificazione dell'estratto e lo strumento analitico è stato sottoposto soltanto alla normale manutenzione.

La mancanza di metodi impiegati per la determinazione degli IPA nelle uova del riccio di mare della specie *P.Lividus* non permette di fare alcuni raffronti in merito alla sensibilità o selettività del metodo proposto per questa matrice. Per queste ragioni, questo esperimento rappresenta un passo fondamentale nelle analisi sugli IPA nelle uova di riccio di mare, permettendo l'utilizzo di questi echinoidi come indicatori biologici dell'inquinamento dell'ambiente marino.

Tabella 6. Limite di quantificazione (LOQ) e limite di determinazione (LOD) strumentale degli IPA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) analizzati nelle gonadi di riccio di mare. Rapporto di massa su carica (m/z) utilizzato per la quantificazione. Coefficiente di correlazione (R^2) e RSD%.

composti	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intervallo di linearità ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$R^2 \pm \text{RSD}\%$	slope	MS/MS m/z
Naphtalene	0.7	1.5	1.5 – 500	1.0000 ± 5	1,88E+02	127
1-methylnaftalene	1.5	5.0	5.0 – 500	0.9995 ± 3	1,68E+02	141
2-methylnaphthalene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9997 ± 8	1,54E+02	141
Acenaftilene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9998 ± 7	2,52E+02	151
Acenaftene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9999 ± 15	2,92E+02	151
Fluorene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9999 ± 10	2,39E+02	164
Fenantrene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9994 ± 8	1,65E+02	177
Anthracene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9999 ± 6	1,34E+02	177
Fluoranthene	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9999 ± 9	1,93E+02	201
Pirene	1.5	5.0	5.0 -500	0.9972 ± 4	2,04E+02	201
BaA	0.7	1.5	1.5 – 500	0.9999 ± 11	1,44E+02	227
CHR	1.5	5.0	5.0 -500	0.9972 ± 7	1,40E+02	227
BbFA	1.5	5.0	5.0 -500	0.9980 ± 3	1,76E+02	251
BaP	1.5	5.0	5.0 -500	0.9980 ± 5	1,40E+02	251
IcP	1.5	5.0	5.0 -500	0.9991 ± 11	9,85E+01	275
DiB(a,h)A	1.5	5.0	5.0 -500	0.9997 ± 8	7,31E+01	275
BghiPER	1.5	5.0	5.0 -500	0.9979 ± 6	1,97E+02	275

Tabella 7. Recuperi (%) \pm RSD degli IPA selezionati in gonadi di riccio di mare a due livelli di fortificazione.

composti	recuperi % (n=5) \pm RSD	
	700 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	10 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Naphtalene	95 \pm 12	97 \pm 9
1-methylnaftalene	91 \pm 9	97 \pm 5
2-methylnaphthalene	89 \pm 5	93 \pm 7
Acenaftilene	85 \pm 12	123 \pm 9
Acenaftene	98 \pm 15	112 \pm 3
Fluorene	89 \pm 14	113 \pm 4
Fenantrene	69 \pm 16	113 \pm 15
Anthracene	68 \pm 14	144 \pm 7
Fluoranthene	88 \pm 17	102 \pm 7
Pirene	105 \pm 16	114 \pm 8
BaA	111 \pm 16	112 \pm 14
CHR	108 \pm 17	107 \pm 7
BbFA	91 \pm 17	119 \pm 5
BaP	78 \pm 12	111 \pm 6
IcP	73 \pm 11	80 \pm 6
DiB(a,h)A	73 \pm 9	80 \pm 8
BghiPER	72 \pm 16	104 \pm 3

Tabella 8. Parametri di validazione per gli IPA selezionati su riccio di mare (RSD%).

composti	ripetibilità (n=6)	Precisione intermedia (n=36)
Naphtalene	8.1	9.7
1-methylnaftalene	7.8	8.6
2-methylnaphthalene	5.6	6.3
Acenaftilene	13.7	8.6
Acenaftene	3.2	11.4
Fluorene	8.4	8.6
Fenantrene	14.9	9.5
Anthracene	6.1	8.2
Fluoranthene	8.8	12.3
Pirene	10.7	12.3
BaA	13.9	11.7
CHR	12.1	15.1
BbFA	6.5	14.8
BaP	9.1	19.9
IcP	8.5	16.5
DiB(a,h)A	7.9	12.8
BghiPER	5.5	9.6

Tabella 9. Effetto matrice (% \pm RSD) degli analiti analizzati a due differenti concentrazioni di fortificazione.

	700 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	10 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Naphtalene	96 \pm 5	99 \pm 3
1-methylnaftalene	98 \pm 8	96 \pm 5
2-methylnaphthalene	97 \pm 6	94 \pm 4
Acenaftilene	94 \pm 13	93 \pm 11
Acenaftene	93 \pm 11	95 \pm 3
Fluorene	91 \pm 5	105 \pm 13
Fenantrene	89 \pm 1	77 \pm 11
Anthracene	93 \pm 6	74 \pm 5
Fluoranthene	86 \pm 9	76 \pm 10
Pirene	107 \pm 1	84 \pm 13
BaA	92 \pm 6	73 \pm 9
CHR	108 \pm 2	87 \pm 12
BbFA	94 \pm 6	80 \pm 8
BaP	94 \pm 6	73 \pm 12
IcP	87 \pm 5	75 \pm 8
DiB(a,h)A	86 \pm 12	77 \pm 9
BghiPER	96 \pm 8	71 \pm 8

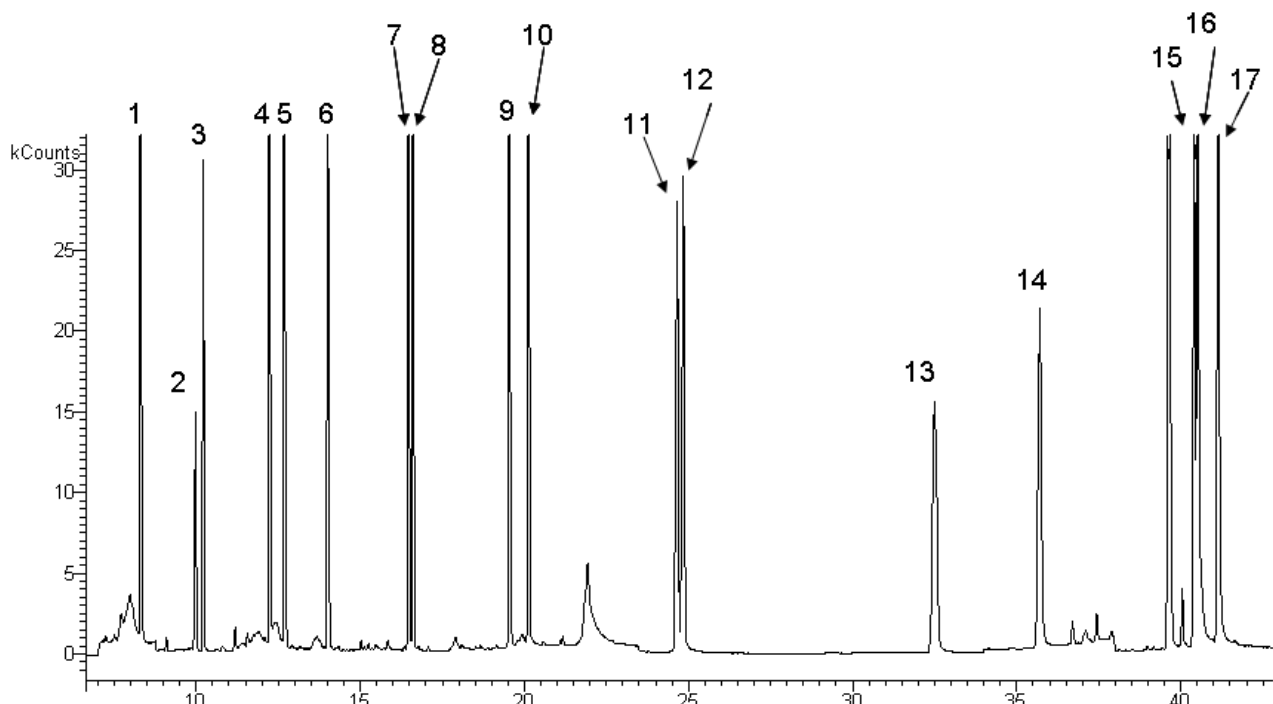


Figura 17. Cromatogramma GC-ITMS/MS a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di IPA in estratto di matrice di riccio. Naphtalene (1), 1-methylnaftalene (2), 2-methylnaphthalene (3), Acenaftilene (4), Acenaftene (5), Fluorene (6), Fenantrene (7), Anthracene (8), Fluoranthene (9), Pirene (10), BaA (11), CHR (12), BbFA (13), BaP (14), IcP (15), DiB(a,h)A (16), BghiPER (17).

5. Monitoraggio della contaminazione degli IPA

Aree di prelievo.

I campioni di riccio sono stati prelevati dall'area di gestione sperimentale di Capo Pecora precedentemente descritta e a Capitana in provincia di Cagliari (39°12'36.9"N 9°18'17"E) (Figura 18).



Figura 18. Aree di prelievo del riccio di mare durante la sperimentazione

Il prelievo dei campioni è stato effettuato per due annualità di raccolta successive, prelevando da ogni sito ricci cresciuti su roccia e ricci cresciuti su posidonia con una profondità compresa tra i 5 e i 10 metri.

Raccolta, preparazione ed analisi dei ricci

Trenta esemplari di riccio *Paracentrotus lividus* sono stati raccolti in maniera randomizzata dalle zone prescelte per lo studio e trasportati in laboratorio all'interno di un contenitore di plastica

refrigerato (5 °C). I ricci di mare sono stati aperti, le gonadi di ogni riccio sono state contate, misurate, prelevate, omogeneizzate per singolo riccio e sottoposte ad estrazione ed analisi in GCITMS. Per l'estrazione e l'analisi sono state utilizzate le condizioni messe a punto durante la validazione del metodo. Per ogni riccio sono state effettuati tre replicati indipendenti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il campionamento è stato effettuato per due anni consecutivi in due siti posizionati in zone ben distinte della Sardegna, i ricci sono stati raccolti su fondo roccioso e su fondo di posidonia. Il primo sito si trova nella provincia di Carbonia-Iglesias (Figura 18), in una zona poco antropizzata della Sardegna in cui il vento principale è il maestrale (NE). Il secondo sito (Figura 18), che si trova all'interno del Golfo di Cagliari ed è caratterizzato da un forte presenza dell'uomo, con lottizzazioni che arrivano sino a pochi metri dalla costa, presenta inoltre anche un porticciolo turistico nelle vicinanze e uno scivolo a mare per piccole imbarcazioni. I venti principali sono levante e scirocco (E, SE).

Entrambi i siti sono caratterizzati da un fondale abbastanza basso per i primi 200 metri lineari dalla riva, con una profondità massima intorno ai 10 metri. Il fondale è simile, in cui zone rocciose si alternano a banchi di posidonia e da una popolazione ittica rappresentata dalle specie tipiche delle coste sarde (saraghi, orate, stelle marine, polpi, etc.), delle quali molte sono predatori del riccio di mare.

I campionamenti sono stati fatti durante il periodo autorizzato per la raccolta e fuori da questo periodo e compatibilmente con le condizioni climatiche sono state effettuate raccolte mensili o bimestrali. I ricci raccolti presentavano misure in linea con le normative vigenti variando da min

4,24 a max 5,73 cm di diametro esterno, preso a livello dell'attaccatura delle spine (Tabella 10 e 11). La colorazione dello scheletro calcareo esterno era rappresentata dai colori verde, viola e marrone. Le gonadi presentavano colorazioni variabili e non correlabili con il colore dello scheletro calcareo. I colori principali erano rappresentati dall'arancione, dal giallo e dal rosso. In alcuni casi si avevano delle colorazioni aranciato molto chiare e delle colorazioni arancio più scure. La colorazione delle gonadi era direttamente correlabile nei campioni analizzati con il sesso del riccio: i ricci con colorazione arancio scuro e rosso erano femmine, mentre i ricci arancio, arancio chiaro e giallo erano maschi (Tabella 10 e 11). Le dimensioni delle gonadi presentavano una ampia variabilità durante il periodo di raccolta, strettamente legata al periodo riproduttivo. I ricci prelevati a Capo Pecora a parità di dimensioni esterne e periodo riproduttivo presentavano delle gonadi significativamente più grandi.

Tabella 10. Caratteristiche dei ricci di mare prelevati su fondo di *Posidonia oceanica* nei due siti di raccolta utilizzati durante la sperimentazione nei due anni.

Campione	dimensioni	Colore esterno	Colore gonadi (Sesso)	Dimensione gonadi [¥]
Capitana				
Feb.2011	D 4.63±0.55 H 2.73±0.43	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), rosso (♀),	0.71-0.63-2.00
Apr. 2011	D 4.29±0.58 H 2.59±0.43	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), bruno (♀), giallo (♂), rosso (♀),	0.32-0.31-1.48
Lug. 2011	D 4.24±0.45 H 2.39±0.25	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂)	0.34-0.44-1.73
Nov. 2011	D 4.50±0.39 H 2.51±0.24	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂)	0.36-0.46-1.85
Feb. 2012	D 4.39±0.47 H 2.53±0.35	Viola, verde, marrone,	arancio (♂)	0.44-0.37-1.73
Apr. 2012	D 4.30±0.17 H 2.55±0.24	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.45-0.43-1.77
Lug. 2012	D 4.30±0.17 H 2.55±0.24	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.45-0.43-1.77
Capo Pecora				
Gen. 2011	D 5.73±0.34 H 3.11±0.38	Viola, verde, marrone,	arancio chiaro(♂), giallo (♂), arancio scuro (♀), rosso (♀)	1.08-0.71-2.71
Apr. 2011	D 4.85±0.69 H 2.67±0.48	Viola, verde, marrone,	arancio chiaro(♂), giallo (♂), rosso (♀)	1.02-0.69-2.09
Lug. 2011	D 5.03±0.32 H 2.90±0.19	Viola, verde, marrone,	arancio (♂)	0.51-0.51-2.18
Nov. 2011	D 5.02±0.12 H 2.83±0.14	Viola, verde, marrone,	arancio (♂)	0.52-0.47-2.13
Gen. 2011	D 5.03±0.32 H 2.90±0.19	Viola, verde, marrone,	arancio (♂)	0.51-0.51-2.18
Apr. 2012	D 5.13±0.68 H 3.43±0.51	Viola, verde, marrone,	arancio chiaro(♂), marrone (♀), rosso (♀)	0.60-0.46-2.12
Mag. 2012	D 5.52±0.50 H 3.38±0.42	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), marrone (♀), rosso (♀)	0.54-0.53-2.41
Lug. 2012	D 5.66±0.55 H 3.42±0.39	Viola, verde, marrone,	marrone (♀)	0.50-0.26-2.16

[¥]BM-Bm-L – Base Maggiore - Base minore - Lunghezza.

Tabella 11. Caratteristiche dei ricci di mare prelevati su fondo di roccia nei due siti di raccolta utilizzati durante la sperimentazione nei due anni.

campione	dimensioni	Colore esterno	Colore gonadi (Sesso)	Dimensione gonadi [‡]
Capitana				
Feb.2011	D 4.97±0.35 H 2.81±0.28	Viola, verde, marrone,	arancio chiaro(♂), arancio scuro (♀), giallo (♂), rosso (♀),	0.82-0.76-2.49
Apr. 2011	D 4.36±0.37 H 2.51±0.24	Viola, verde, marrone,	arancio chiaro(♂), arancio scuro (♀), giallo (♂), rosso (♀),	0.41-0.36-1.34
Lug. 2011	D 4.65±0.39 H 2.61±0.28	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂)	0.44-0.35-1.81
Nov. 2011	D 4.53±0.29 H 2.51±0.21	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂)	0.41-0.30-1.64
Feb. 2012	D 5.03±0.36 H 2.89±0.28	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.81-0.74-2.51
Apr. 2012	D 4.44±0.49 H 2.65±0.37	Viola, verde, marrone,	arancio(♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.45-0.41-1.57
Lug. 2012	D 4.44±0.49 H 2.65±0.37	Viola, verde, marrone,	arancio(♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.45-0.41-1.57
Capo Pecora				
Gen. 2011	D 5.31±0.47 H 3.12±0.33	Viola, verde, marrone,	arancio chiaro(♂), arancio scuro (♀), giallo (♂), rosso (♀)	0.86-0.69-2.47
Apr. 2011	D 4.82±0.72 H 2.64±0.49	Viola, verde, marrone,	rosso (♀), giallo (♂)	0.72-0.53-2.12
Lug. 2011	D 4.91±0.27 H 2.69±0.20	Viola, verde, marrone,	arancio (♂)	0.48-0.47-2.11
Nov. 2011	D 4.99±0.28 H 2.74±0.20	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂)	0.48-0.34-2.06
Gen. 2011	D 4.81±0.27 H 2.78±0.31	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), bruno (♀)	0.38-0.33-1.86
Apr. 2012	D 4.64±0.53 H 2.87±0.24	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.79-0.74-1.66
Mag. 2012	D 5.38±0.37 H 3.15±0.18	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), giallo (♂), rosso (♀)	0.58-0.53-2.26
Lug. 2012	D 5.24±0.50 H 2.59±0.25	Viola, verde, marrone,	arancio (♂), bruno (♀)	0.40-0.26-1.76

[‡]BM-Bm-L – Base Maggiore - Base minore - Lunghezza.

Contaminazione da IPA

L'analisi delle gonadi dei ricci prelevati nei due siti ha messo in evidenza la presenza di 11 e 12 IPA nei campioni di Capo Pecora e Capitana, rispettivamente. Questi si sono presentati in maniera abbastanza disomogenea, pur manifestando delle caratteristiche comuni. Il Naftalene e i suoi due prodotti di degradazione l'1-Metil-naftalene e il 2- Metil-naftalene e il Fluorene, erano presenti anche se in concentrazioni diverse in tutte le gonadi analizzate (Tabelle 12-15). Acenaftilene, acenaftene e fenantrene erano presenti in tutti i campioni di Capo Pecora roccia (Tabella 12), il fenantrene era presente in tutti i campioni di Capo Pecora posidonia (Tabella 13). Gli altri IPA erano presenti nei diversi campioni in maniera casuale (Tabelle 12-15). Il Pirene è stato riscontrato solo nei campioni di Capitana. Non era possibile evidenziare nessuna relazione fra il sesso dei ricci e la presenza di IPA.

Gli RSD% riscontrati erano in alcuni casi abbastanza elevati mostrando notevole variabilità nelle concentrazioni degli IPA determinati anche fra ricci presenti nello stesso sito e con la stessa dieta. La variazione del residuo di IPA nei campioni prelevati da fondali rocciosi durante l'anno 2011 ha mostrato un andamento nella maggior parte dei casi crescente da gennaio a luglio per diminuire nuovamente verso la fine dell'anno (Tabelle 12-15). Questo andamento seppure quantitativamente differente presentava lo stesso trend anche nell'anno successivo. I campioni prelevati da campioni di posidonia presentavano invece un trend meno variabile durante tutto l'anno in entrambi le annate di prelievo. Questo fatto trova sicuramente una spiegazione nella diversa dieta delle due popolazioni. I ricci presenti nel fondo roccioso infatti sono costretti a causa della ridotta presenza di alghe a muoversi e nutrirsi in maniera varia sfruttando gli alimenti presenti sul territorio in quel periodo. Inoltre la tipologia di alghe presenti risulta essere notevolmente diversa rispetto ai fondali di posidonia. I ricci che vivono in fondali di posidonia hanno una grande quantità di cibo a disposizione e in quanto organismi tendenzialmente opportunisti preferiscono nutrirsi del cibo più facilmente raggiungibile piuttosto che variare la dieta cercando altri alimenti. Le variabilità nei residui di IPA riscontrate fra i ricci cresciuti su fondo roccioso sia in termini quantitativi che qualitativi sono, quindi, probabilmente legate alla diversa alimentazione disponibile, mentre le differenze fra i residui nei campionamenti su fondo di posidonia sono probabilmente dovute ad un consumo di posidonia a diverso stadio vegetativo, che influenza il bioaccumulo di sostanze inquinanti.

La contaminazione totale dei ricci da residui di IPA mostra valori statisticamente sovrapponibili fra campioni prelevati da fondali di posidonia e roccia nei singoli siti (Figura x e y). Il confronto dei dati totali fra i residui di contaminanti IPA presenti nella roccia e nella posidonia mostra in entrambi i casi valori maggiori nelle gonadi di riccio prelevate nel sito di Capitana rispetto a quelle prelevate nel sito di Capo Pecora.

Questi dati avvalorano la tesi della presenza endemica di residui di IPA nell'ambiente e quindi la contaminazione generale di tutti gli organismi che ne entrano in contatto, ma sottolinea come siti fortemente antropizzati presentino valori totali di contaminazione maggiori rispetto a siti meno esposti alla contaminazione da parte delle attività umane. Il confronto dei dati dei residui totali di IPA ottenuti mediante analisi del contenuto di residui nelle gonadi di riccio, rispetto al metodo classico che utilizza i mitili, mostra come questo tipo di monitoraggio presenti valori nettamente più omogenei senza la presenza di picchi di concentrazione influenzati da correnti marine particolari.

Conclusione

Il monitoraggio effettuato permette di valutare i livelli di contaminazione del riccio di mare da parte di residui di IPA, inoltre permette di valutare la sua attitudine a indicare il livello di contaminazione ambientale di siti ben definiti. Maggiori studi sono necessari per correlare la presenza di residui di IPA in relazione all'alimentazione e quindi alla dieta del riccio e alla sua localizzazione sul fondale. Ulteriori studi dovranno anche chiarire quale influenza presenta lo sviluppo delle gonadi con l'alimentazione e con la contaminazione dell'ambiente.

I dati ottenuti sufficientemente omogenei nei due anni permettono di essere fiduciosi nel possibile utilizzo di questo echinoide come strumento per la valutazione della contaminazione ambientale non solo degli IPA ma anche di altri prodotti tossici presenti nell'ambiente come metalli pesanti e PCB e fitofarmaci. Per avvalorare questi dati saranno necessari nel prossimo futuro ulteriori campionamenti negli stessi siti ma ancora di più in siti con caratteristiche morfologiche e antropiche differenti, quali siti fortemente industrializzati o in prossimità di effluenti in grado di portare nell'ambiente marino residui industriali e di insediamenti agricoli tradizionali e casalinghi.

Tabella 12. Valori dei residui di IPA nelle gonadi di riccio di mare prelevati a Capo Pecora su fondali rocciosi.

Capo pecora	$\mu\text{g}/\text{Kg} \pm \text{RSD}\%$							
roccia	Campionamenti 2011				Campionamenti 2012			
IPA	Gennaio	Aprile	Luglio	Novembre	Gennaio	Aprile	Maggio	Luglio
Naftalene	315,9 \pm 16	646,7 \pm 15	981,5 \pm 16	267,6 \pm 20	387,5 \pm 2	447,8 \pm 5	576,2 \pm 15	428,1 \pm 16
1-MetNaft	329,8 \pm 7	218,3 \pm 17	362,5 \pm 7	100,3 \pm 10	238,3 \pm 6	192,9 \pm 7	300,7 \pm 9	248,2 \pm 15
2-MetNaft	86,2 \pm 9	102,7 \pm 2	130,8 \pm 25	54,2 \pm 14	92,9 \pm 4	49,8 \pm 6	106,0 \pm 8	85,5 \pm 15
Acenaftilene	18,3 \pm 3	17,3 \pm 4	21,4 \pm 4	23,8 \pm 5	27,8 \pm 10	21,9 \pm 6	17,6 \pm 8	25,2 \pm 12
Acenaftene	72,4 \pm 3	64,7 \pm 1	55,3 \pm 5	38,5 \pm 14	61,0 \pm 11	55,0 \pm	57,1 \pm 12	63,2 \pm 17
Fluorene	66,8 \pm 12	55,1 \pm 4	41,4 \pm 17	66,7 \pm 2	69,9 \pm 1	53,3 \pm 2	37,8 \pm 17	27,6 \pm 4
Fenantrene	164,0 \pm 15	50,1 \pm 2	143,1 \pm 18	76,4 \pm 9	55,4 \pm 2	40,6 \pm 3	78,2 \pm 10	110,1 \pm 15
Antracene	159,6 \pm 14		142,8 \pm 13		137,2 \pm 19	148,9 \pm 11	153,2 \pm 15	154,9 \pm 12
Pirene			2,3 \pm 3	2,5 \pm 4				2,7 \pm 7
B(a)antr			2,0 \pm 8					3,0 \pm 15
Crisene	53,4 \pm 13		51,4 \pm 25	45,8 \pm 15	41,2 \pm 3	50,7 \pm 15	55,9 \pm 4	53,1 \pm 12

Tabella 13. Valori dei residui di IPA nelle gonadi di riccio di mare prelevati a Capo Pecora su fondale di posidonia.

Capo pecora	$\mu\text{g}/\text{Kg} \pm \text{RSD}\%$							
posidonia	Campionamenti 2011				Campionamenti 2012			
IPA	Gennaio	Aprile	Luglio	Novembre	Gennaio	Aprile	Maggio	Luglio
Naftalene	821,9 ± 5	759,6 ± 5	981,5 ± 16	580,4 ± 9	519,8 ± 22	447,9 ± 10	576,2 ± 15	695,5 ± 11
1-MetNaft	281,8 ± 8	327,6 ± 3	362,5 ± 7	257,5 ± 8	214,6 ± 2	161,7 ± 15	300,7 ± 9	322,2 ± 12
2-MetNaft	114,6 ± 11	155,4 ± 11	13,8 ± 25	86,2 ± 9	50,7 ± 2	38,6 ± 15	106,0 ± 8	1,5 ± 23
Acetilnaftalene	23,4 ± 8	20,7 ± 12		22,5 ± 11	24,7 ± 5	26,8 ± 12		
Acenaftene	77,7 ± 15	52,33 ± 9		58,9 ± 9	64,3 ± 12	67,1 ± 11		69,2 ± 12
Fluorene	11,9 ± 1	17,40 ± 7	41,4 ± 17	9,7 ± 12	10,7 ± 13	2,1 ± 8	37,8 ± 17	17,1 ± 7
Fenantrene	75,3 ± 10	90,2 ± 13	32,1 ± 18	28,4 ± 21	21,5 ± 18	37,8 ± 14	78,2 ± 10	37,8 ± 20
Antracene	108,4 ± 9				99,7 ± 11			106,1 ± 11
Fluorantene	40,6 ± 14					25,9 ± 4	3,0 ± 9	28,8 ± 16
Pyrene	52,8 ± 11					45,8 ± 13	27,8 ± 9	34,6 ± 9
B(a)antr			2,0 ± 8				31,1 ± 18	32,4 ± 13
Crisene			51,4 ± 25	48,7 ± 13		51,8 ± 12	55,9 ± 4	45,6 ± 8

Tabella 14. Valori dei residui di IPA nelle gonadi di riccio di mare prelevati a Capitana su fondali rocciosi.

Capitana	$\mu\text{g}/\text{Kg} \pm \text{RSD}\%$							
roccia	Campionamenti 2011				Campionamenti 2012			
IPA	Febbraio	Aprile	Luglio	Novembre	Febbraio	Aprile	Luglio	
Naftalene	370,1 ± 15	946,9 ± 2	595,4 ± 22	427,0 ± 12	333,9 ± 10	543,7 ± 16	657,2 ± 12	
1-MetNaft	150,0 ± 21	440,8 ± 1	289,4 ± 13	128,0 ± 14	157,9 ± 7	345,1 ± 18	456,3 ± 7	
2-MetNaft	137,0 ± 29	186,4 ± 21	95,2 ± 8	83,4 ± 18	74,8 ± 7	87,5 ± 19	132,6 ± 12	
Acetilnaftalene	10,1 ± 12	13,7 ± 9	46,7 ± 16	48,7 ± 12	11,5 ± 12	82,5 ± 14	55,6 ± 12	
Acenaftene	83,0 ± 13	107,9 ± 11	29,7 ± 9	59,0 ± 11	75,4 ± 11	88,4 ± 15	67,8 ± 16	
Fluorene	233,7 ± 8	13,7 ± 13	36,5 ± 26	24,2 ± 16	380,4 ± 9	381,4 ± 9	67,1 ± 3	
Fenantrene	349,5 ± 16	156,7 ± 3	43,8 ± 19	125,3 ± 12	286,6 ± 13	192,7 ± 9	123,3 ± 10	
Antracene	322,1 ± 8	152,4 ± 2	316,9 ± 12	56,6 ± 21		36,3 ± 14	22,1 ± 12	
Fluorantene							78,7 ± 14	
Pirene							65,4 ± 17	
B(a)antr			70,3 ± 43	34,4 ± 17		23,2 ± 17	27,6 ± 19	
Crisene			43,9 ± 13	12,6 ± 14	56,1 ± 8	12,1 ± 14	19,4 ± 10	

Tabella 15. Valori dei residui di IPA nelle gonadi di riccio di mare prelevati a Capitana su fondali di posidonia.

Capitana	$\mu\text{g}/\text{Kg} \pm \text{RSD}\%$							
posidonia	Campionamenti 2011				Campionamenti 2012			
IPA	Febbraio	Aprile	Luglio	Novembre	Febbraio	Aprile	Luglio	
Naftalene	431,8 ± 15	946,9 ± 2	904,3 ± 22	828,0 ± 8	327,7 ± 20	807,7 ± 12	757,7 ± 15	
1-MetNaft	163,3 ± 4	440,8 ± 1	401,7 ± 13	357,2 ± 6	158,8 ± 8	416,5 ± 8	400,5 ± 18	
2-MetNaft	159,2 ± 12	252,0 ± 21	130,4 ± 8	180,1 ± 11	80,4 ± 8	174,2 ± 9	270,2 ± 19	
Acetilnaftalene		98,5 ± 11		68,4 ± 13	61,6 ± 11	65,8 ± 15	102,3 ± 12	
Acenaftene		100,3 ± 14	97,5 ± 12	91,3 ± 16	67,2 ± 12	89,1 ± 17	110,0 ± 7	
Fluorene	466,4 ± 12	13,7 ± 13	37,9 ± 26	25,1 ± 4	371,6 ± 20	20,8 ± 9	107,1 ± 9	
Fenantrene		156,7 ± 16	115,3 ± 19	65,3 ± 16	286,6 ± 18	103,6 ± 11	189,6 ± 14	
Antracene		21,5 ± 20				23,4 ± 13	42,4 ± 10	
Fluorantene							45,4 ± 15	
Pirene							62,3 ± 11	
B(a)antr		1,1 ± 14					3,1 ± 17	
Crisene		2,1 ± 7			5,4 ± 11	6,5 ± 10	3,2 ± 9	

Figura 19. Grafico dei residui di IPA totali determinati su gonadi di riccio di mare prelevati a Capo Pecora e Capitana su fondali rocciosi.

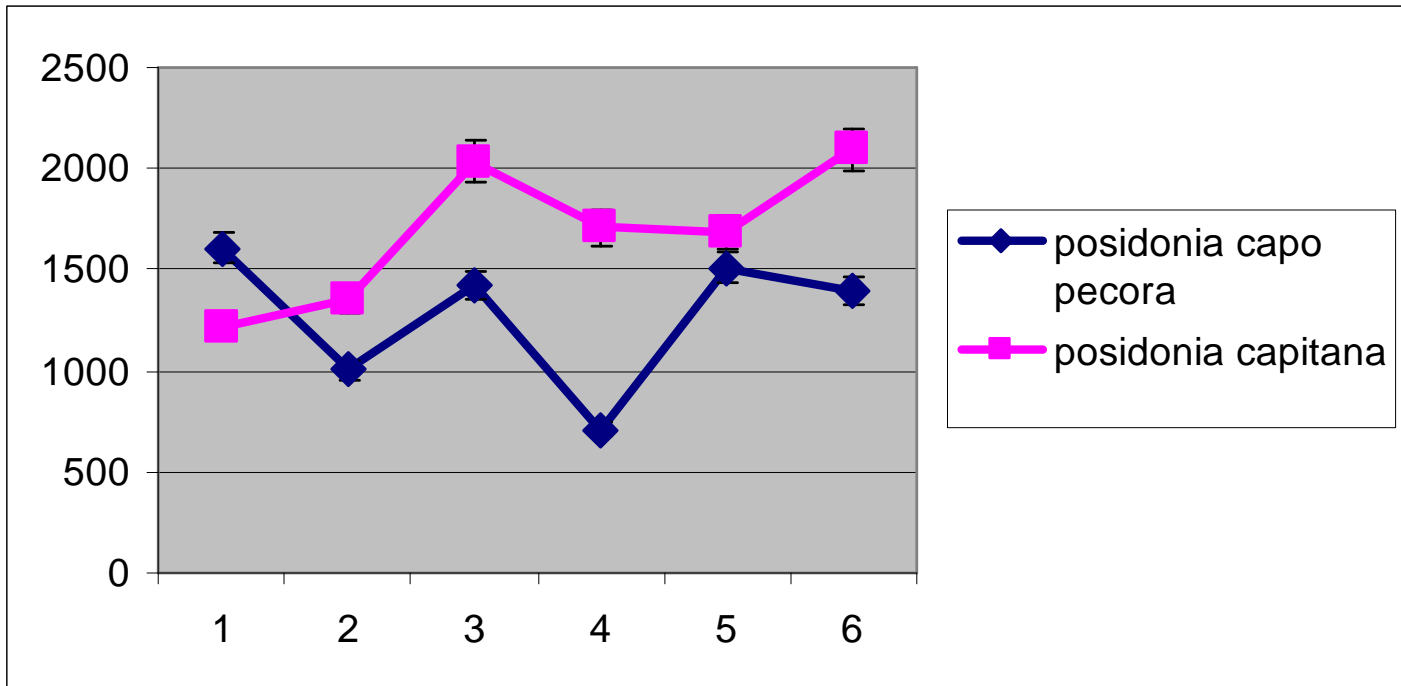


Figura 20. Istogramma dei residui di IPA totali determinati su gonadi di riccio di mare prelevati a Capo Pecora e Capitana su fondali di posidonia.

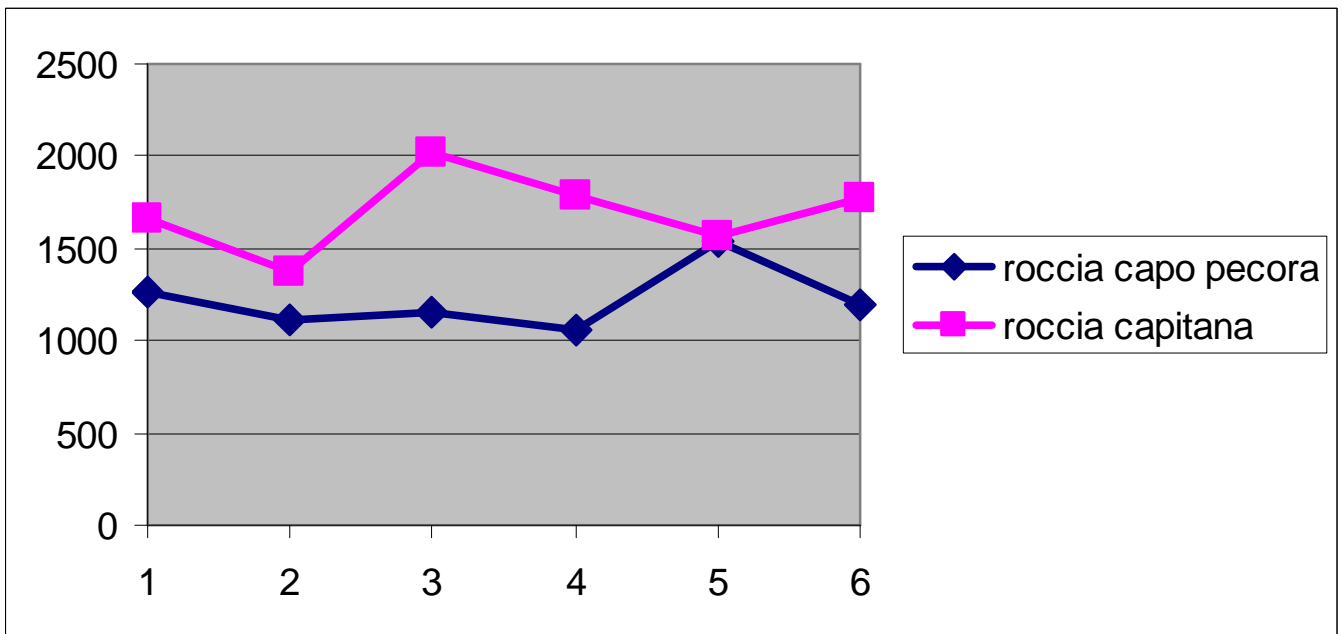


Figura 21. Grafico dei residui di IPA totali determinati su gonadi di riccio di mare prelevati a Capitanà su fondali rocciosi e di posidonia.

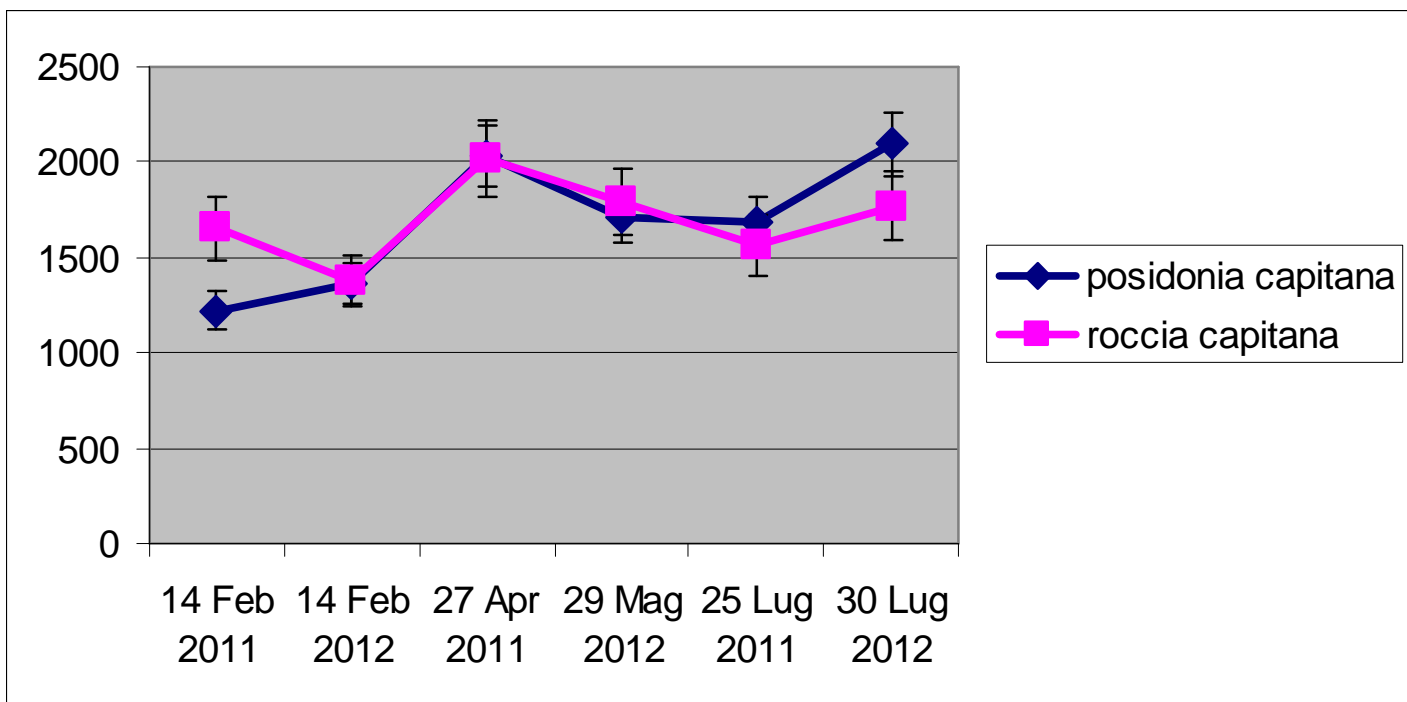
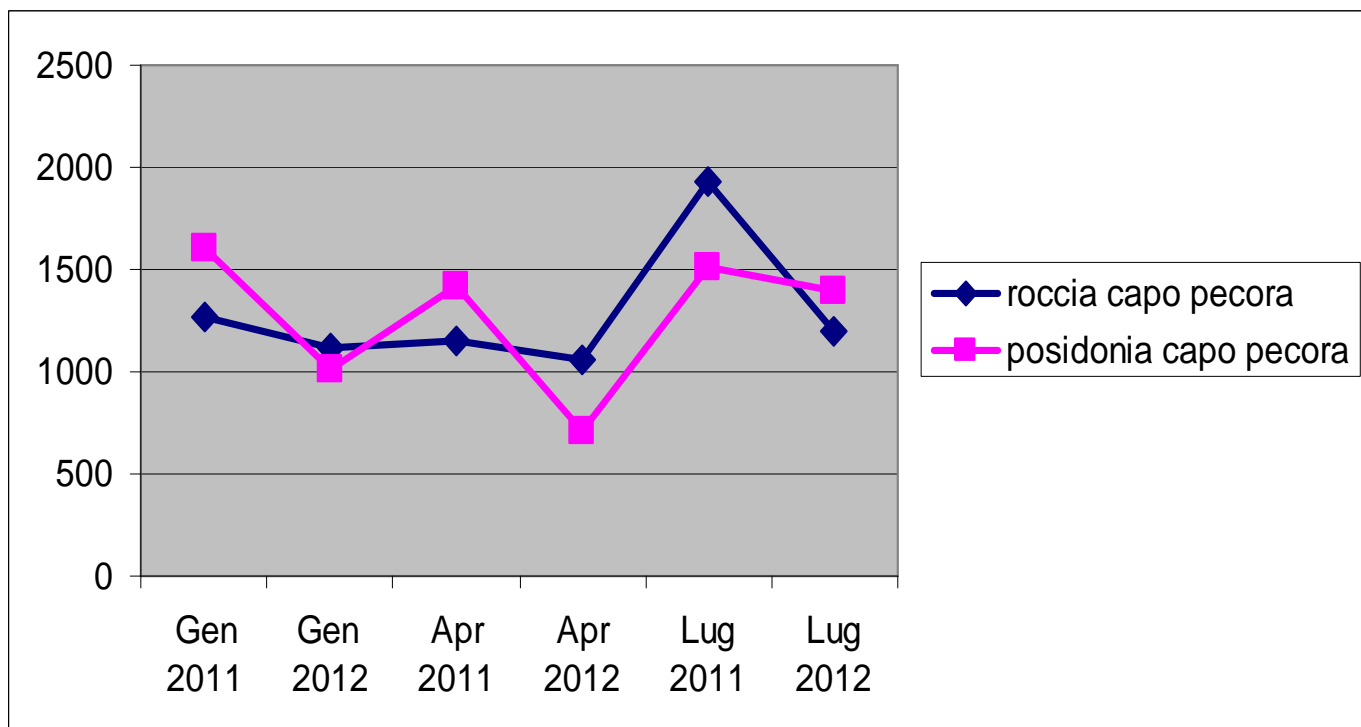


Figura 22. Grafico dei residui di IPA totali determinati su gonadi di riccio di mare prelevati a Capo Pecora su fondali di posidonia e rocciosi.



BIBLIOGRAFIA

1. *Protocol for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution from Land-Based Sources and Activities. Adoption: 7 March 1996 Syracuse, Italy)*
2. *UNEP/MAP/WHO. (1999). Identification of Priority Hot Spots and Sensitive Areas in the Mediterranean. Map Technical Reports Series n° 124, UNEP/MAP, Athens, 90 pp.*
3. *Priority issues in the Mediterranean environment (EEA report n° 4/2006), Copenhagen, 2006)*
4. Bianchi e Morri, 2000 – *Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. Marine Pollution Bulletin, 40(5): 367-376).*
5. Holmer, M., C. M. Duarte and N. Marba. 2003. *Sulfur cycling and seagrass (Posidonia oceanica) status in carbonate sediments. Biogeochemistry 66: 223-239.*
6. UNEP (2002): *Water Supply and Sanitation Coverage in UNEP Regional Seas, Need for Regional Wastewater Emission Targets? Section I: Regional presentation of data. UNEP/GPA, The Hague, The Netherlands.*
7. Aguilar A., Borrell A. (1994a). *Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (Stenella coeruleoalba). affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. Sci. Tot. Environ. 154: 237-247.*
8. Aguilar A., Borrell A. (1994b). *Reproductive transfer and variation of body load of organochlorine pollutants with age in fin whales (Balaenoptera physalus). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27: 546-54.*
9. Borrell A., Aguilar A. and Pastor T. (1996). *Reproductive transfer and variation of body load of organochlorine pollutants with age in fin whales (Balaenoptera physalus). Organochlorine compound levels in striped dolphins from the western Mediterranean during the period 1987-1993. In: Evans, P.G.H. (Ed.), European Research on Cetaceans 10, Kiel, Germany. pp. 281-285.*
10. Ferrara R., B. Maserti, 1986 – *Mercury in the Mediterranean basin. Mar. Poll. Bull., 17 (12): 533-534.*
11. *Opinion on the scientific committee on food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food update based on new scientific information available since the adoption of the SCF opinion of 22nd November 2000 – adopted on 30 may 2001. Rue de la Loi 200b, B-1049 Bruxelles, Belgium.*
12. *Scientific Co-operation on Questions Relating to Food: assessment of the dietary exposure to organotins compound of the population of the eu member states, Scoop Task 3.2.13, 2003, in progress.*
13. *UNEP – Mediterranean Regional Report. Regionally Based Report of Persistent Toxic Substances. – December 2002.*

14. *Convention for the Protection of the Mediterranean Sea Against Pollution - Conference of Plenipotentiaries of the Coastal States of the Mediterranean Region for the Protection of the Mediterranean Sea*; Barcelona. -16 February 1976.
15. *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants; Conference of Plenipotentiaries on 22 May 2001 in Stockholm, Sweden.*
16. *Integrated Planning of the Development and Management of the Resources of the Mediterranean Basin* – 1975, Barcelona; Spain.
17. *International Environmental Workshop in Belgrade, Yugoslavia - The Belgrade Charter: A Global Framework for Environmental Education.* 1975; Belgrade, Yugoslavia.
18. *Convention for the Protection of the Marine Environment and the Coastal Region of the Mediterranean - Revised text*; June 1995.
19. *Agenda 21, The Rio Declaration on Environment and Development, the Statement of Forest Principles, the United Nations Framework Convention on Climate Change and the United Nations Convention on Biological Diversity.* Rio de Janeiro, 3-14 June 1992.
20. *Regolamento (CEE) N. 315/93 del Consiglio dell'8 febbraio 1993 che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari* (GU L 37 del 13.2.1993, pag. 1) - Modificato da: Gazzetta ufficiale M1 n.284 pag.1 data 31-10-2003 Regolamento (CE) n. 1882/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 settembre M2, Regolamento (CE) n. 596/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 giugno 2009. N. L188 pag.14 - 18.7.2009.
21. Addis P, Secci M, Manunza A, Corrias S, Niffoi A, Cau A (2009). *A geostatistical approach for the stock assessment of the edible sea urchin, Paracentrotus lividus, in four coastal zones of Southern and West Sardinia (SW Italy, Mediterranean Sea).* Fisheries Research 100:215-221.
22. Cau A, Addis P, Conias S et al (2007) *Final report for Autonomous Region of Sardinia, Department of Defense of the Environment, Fishing Ponds and Aquaculture Service*
23. Galasko G, Hom J, Toubé TP et al (1969) *J Chem Soc C* 9:1264-1265
24. Crapp, G.B. & Willis, M. E. (1975). *Age determination in Sea Urchin Paracentrotus Lividus (Lamarck), with notes on the reproductive cycle.* Journal of Experimental Marine Biology and ecology. 20, 157-78.
25. Traer, K., 1980. *The consumption of Posidonia oceanica Delile by echinoids at the Isle of Ischia.* p. 241-244. In: *Echinoderms: Present and Past.* M. Jangoux (Ed) Rotterdam, Balkema.
26. Traer, K (1984). *Ernährung und energetische regulärer Seeigel in Beständen des mediterranen Seegrases Posidonia Oceanica.* PhD Thesis. University of Vienna, 207 pp.

27. Verlaque, M. & Nédelec, H., 1983. *Biologie de Paracentrotus lividus (Lamarck) sur substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France): Alimentation des adultes. Vie et Milieu*, 33: 191-201. Verlaque et Nédelec 1989
28. Zupi V, Fresi E (1984) *A study of the food web of the Posidonia oceanica ecosystem: analysis of the gut contents of echinoderms*. In: Boudouresque CF, Jeudy de Grissac A, Olivier J (eds) *I. International workshop on Posidonia oceanica beds*. GIS Posidonie, Marseille, p 373-379
29. Shepherd A., (1987) *Grazing by the sea-urchin Paracentrotus lividus in Posidonia oceanica beds at Banyuls. France*. In: Boudouresque CF (ed) *Colloque international sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles*. GIS Posidonie. Marseille, p 83-96
30. Mortensen, T., 1943. *A Monograph of the Echinoidea. Volume III (3)*. Copenhagen, C.A. Reitzel, 446 pp.
31. Tortonese, E., 1965. *Echinodermata*. Fauna d'Italia. Ed. Calderini, Bologna
32. Pastor R., 1971. *Distribución del erizo de mar Paracentrotus Lividus (Lmk), en la Ria de Vigo*. Publ. Tecn. Dir. Gen. Pesca Marit. Spain 9: 255-270
33. Niell et Pastor 1973 Niell, F.X. & Pastor, R., 1973. *Relaciones tróficas de Paracentrotus lividus (Lmk) en la zona litoral*. *Investigación Pesquera*, 37: 1-7.
34. Régis, M.B., 1978a. *Croissance de deux échinoïdes du Golfe de Marseille (Paracentrotus lividus (Lmk) et Arbacia lixula (L)). Aspects écologiques de la microstructure du squelette et de l'évolution des indices physiologiques*. PhD Thesis. Université d'Aix-Marseille, 221 pp.
35. Délmas et Régis 1986 Delmas, P. & Régis, M.B., 1986. *Données préliminaires sur le contenu digestif de l'oursin comestible Paracentrotus lividus (Lamarck) soumis à l'influence d'effluents domestiques*. *Marine Environmental Research*, 20 (3): 197-220.
36. Fernandez, C. & A. Caltagirone, 1990. *Données préliminaires sur la population de Paracentrotus Lividus de l'étang d'Urbino (Corse)*. *Rapport de la Commission Internationale pour l'Exploration de la Mer Méditerranée* 32(1): 37.
37. Mazzella, L., M.C. Buia, M.C. Gambi, M. Lorenti, G.F. Russo, M.B. Scipione and V. Zupo. 1992. *Plant-animal trophic relationship in the Posidonia Oceanica eco system of the Mediterranean Sea: a review*. In: D.M. John, S.J. Hawkins and J.H. Price (eds.), *Plant-animal interactions in the marine benthos*. Pp 165-187. Systematics Association special volume, 46, Clarendon Press, Oxford.
38. Lawrence JM (ed) *Edible sea urchins: biology and ecology*, vol 32. Elsevier, Amsterdam, PP 177-216
39. Lawrence JM (1975) *On the relationship between marine plants and sea urchins*. *Oceanograf Mar Biol Annu. Rev* 13: 213-286.
40. Lawrence JM, Sammarco PW (1982). *Effects of feeding on the environment: Echinoidea*. In: Jangoux M. and Lawrence JM (eds) *Echinoderm nutrition*. AA Balkema, Rotterdam, pp. 449-519.

41. Bonnet A., - *Documents pour servir à l'étude de la variation chez les échinides.* – Bull. Inst. Océanogra., 462, p. 1-28.
42. Boudouresque, C. F., Nedelec, H. Shepherd, A.S. 1980. *The decline of a population of the sea-urchin Paracentrotus lividus in the bay of Port-Cros (Var, France).* Trav. sci. Parc nation. Port-Cros 6: 243-251
43. Lozano J, Galera J, López S, Turon X, Palacín C, Morera G, (1995). *Biological cycles and recruitment of Paracentrotus Lividus (Echinoderma: Echinoidea) in two contrasting habitats.* Mar Ecol Progr Ser 122: 179-191.
44. Régis M.B., Pérès, J.M., Gras, G., 1986. *Données préliminaires sur l'exploitation de la ressource Paracentrotus lividus dans le quartier maritime de Marseille.* Vie Marine 7:41-60.
45. Ballesteros, E. y García-Rubies, A. (1987). *La peche aux oursins en Espagne et plus particulièrement en Catalogne.* In : Boudouresque, GIS Posidonie, IFREMER (eds.). *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles.* Marseille: 325-328.
46. Le Direach L, Boudouresque CF, Antolic B, Kocatas A, Panayotidis P, Pancicci A, Semroud R, Span A, Zaquali J, Zavodnik D (1987). *Rapport sur l'exploitation des oursins en Méditerranée.* In : Boudouresque, GIS Posidonie, IFREMER (eds.). *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles.* Marseille: 199-222.
47. Le Gall (1987). *La peche des oursins en Bretagne.* In : Boudouresque, GIS Posidonie IFREMER (eds.). *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les oursins comestibles.* Marseille: 311-324.
48. Zavodnik D (1987). *Synopsis on the sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) in the Adriatic sea.* *Colloque International sur Paracentrotus Lividus et les Oursins Comestibles:* 221-240.
49. Byrne M (1990). *Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin Paracentrotus lividus from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland.* Marine Biology 104(2): 275-289.
50. Catoira Gòmez, J.L., 1992. *La peche des oursins en Galice, Espagne, pendant la campagne 1990–1991.* In: Scalera-Liaci, L., Canicattì, C. (Eds.), *Echinoderm Research.* Balkema Publ., Rotterdam, pp. 199–200
51. Martínez, I., F. J. García, A. I. Sánchez, J. L. Daza & F. Del Castillo, 2003. *Biometric parameters and reproductive cycle of Paracentrotus lividus (Lamarck) in three habitats of Southern Spain.* In Féral & David (eds), *Echinoderm Research 2001.* Swets & Zeitlinger, Lisse: 281–287
52. Guidetti P 2004. *Consumers of sea urchins, Paracentrotus lividus and Arbacia lixula, in shallow Mediterranean rocky reefs.* Helgoland Mar Res 58: 110-116.
53. Sanchez-España A.I., Martinez-Pita I., Garcia F.J., 2004. *Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin Paracentrotus Lividus (Lamarck, 1816) (Echinodermata : Echinoidea) from southern Spain.* Hydrobiologia 519: 61-72.

54. Phillips, K., Bremer P., Silcock P., Hamid N., Delahunty C., Barker M., & Kissick J., (2009). *Effect of gender, diet and storage time on the physical properties and the sensory quality of sea urchin (Evechinus chloroticus) gonads*. Aquaculture, Vol. 288, No. 3-4, (March 2009), pp. 208-215, ISSN 0044-8486.
55. Kawakami et al., 1998 T. Kawakami, M. Tsushima, Y. Katabami, M. Mine, A. Ishida, T. Matsuno. *Effect of β -carotene, β -echinenone, astaxanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin Pseudocentrotus depressus* J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 226 (1998), pp. 165–174.
56. Boudouresque C.F., Verlaque M., 2001. *Ecology of Paracentrotus lividus*. Pp. 177-216, in: *Edible sea-urchins: biology and ecology*, Lawrence J. (ed.), Elsevier publ., Amsterdam.
57. *Rapporti ISTISAN: 03/22 - Presenza degli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti*. Beatrice Bocca, Riccardo Crebelli, Edoardo Manichini 2003, 45 p.
58. Lee, M.L., Novotny, M. and Bartle, K.D., 1976. *Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulate*. Anal. Chem., 48, 1566-1572.
59. Lee ML, Novotny M, Bartle KD. 1981. *Analytical chemistry of polycyclic aromatic hydrocarbons*. New York, NJ: Academic Press.
60. Lide DR. *CRC Handbook of chemistry and physics*, 83rd edition, 2002-2003. Boca Raton (FL): CRC Press
61. Menichini, E., Tancredi F., *Osservazioni sul dosaggio di alcuni composti policiclici aromatici nelle applicazioni delle linee guida per le emissioni industriali*”(D.M. 12 luglio 1990), inquinamento, 1994, 6: 44-48
62. IPCS (1998) *Environmental Health Criteria: 202 Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons*, WHO, Geneva
63. Lai Z-W, Pineau T, Esser C. *Identification of dioxin responsive elements (DREs) in the 5 regions of putative dioxin-inducible genes*. Chem Biol Interact 1996;100:97-112.
64. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee, SST, Kimura S, Nebert D, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah-receptor*. Science 1995;268:722-6.
65. Near R, Matulka RA, Mann KK, Schneider AM, Golgate SU, Trombino AF, Sherr DH. *Regulation of pre-B cell apoptosis by AhR/transcription factor expressing stromal/adherent cells*. Proc Soc Exp Biol Med 1999;221:242-52.
66. Mattison DR, Nightingale MS. *The biochemical and genetic characteristics of murine ovarian aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity and its relationship to primordial oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons*. Toxicol Appl Pharmacol 1980;56:399-408.

67. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T. *Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci 2000;97:779-82.
68. Dertinger SD, Nazarenko DA, Silverstone AE, Gasiewicz TA. *Aryl hydrocarbon receptor signalling plays a significant role in mediating benzo[a]pyrene- and cigarette smoke condensate-induced cytogenic damage in vivo*. Carcinogenesis 2001;22:171-7.
69. Law RJ, Dawes VJ, Woodhead RJ, Matthiessen P (1997) *Mar Pollut Bull* 34:306-322
70. Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne J F, Burgeot T, Michel X, Bellocq J (1999) *Mar Environ Res* 47:415-439
71. Gavin AD, Moffat CF, Packer G, Webster L, *Environ J* (2004) *Monitor* 6:209-218
72. Isobe T, Takada H, Kanai M, Tsutstnni S, Isobe KO, Boonyatumanond R, Zakaria MCP (2007) *Environ Monit Assess* 135:423-440
73. Boehm PD, Page DS, Brown JS, Neff JM, Burns IA (2004) *Environ Toxicol Chem* 23:2916-2929
74. Galgani F, Martinez-Gomez C, Giovanardi F, Romanelli G, Caixach J, Canto A, Scarpato A, Benfirahiin S, Messaoudi S, Deudero S, Boulahelid M, Benedicto J, Andral B (2011 b) *Environ Monit Assess* 172:301-317
75. Masoero M, Colombi A, Gasrlanda. T (1985) *Report on the evaluation of the impact of anthracene, naphthalene and biphenyl on the aquatic environment. Prepared for the Commission of the European Communities, Contract U/84/123*
76. MPMMG (Marine Pollution Monitoring Management Group) (1998) *National Monitoring Programme Survey of the quality of UK coastal waters*. Marine Pollution Monitoring Management Group, Aberdeen, ISBN 0 9532838 36
77. Readman JW, Mantotua RFC, Rhead MM, Brown L (1982) *Estuar Coast Shelf Sci* 14:369-389 4 A
78. US EPA (1980) *Ambient water quality criteria for naphthalene*. Report no. 440/5- 80-059, United States Environmental Protection Agency. October 1980.
79. Bellas J, Nieto O, Beiras R (2011) *Cont Shelf Res* 31:448-456
80. Ruczynska WM, Szlinder-Richert J, Malesa-Ciecwieza M, Warzocha J (2011) *J Environ Monit* 13:2535-2542