

# Interferenti endocrini nelle acque destinate al consumo umano

Laura Achene - Silvia Moretti

Acque destinate al consumo umano: l'applicazione del  
Decreto Legislativo 31/2001

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Roma, 13-14 novembre 2008

# *Definizione*

*Una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure sulla sua progenie o di una (sotto)popolazione*

*(CE-COM(99)706)*

# Classificazione

- Ormoni naturali (compresi i fitoestrogeni)
- Farmaci o estrogeni sintetici (DES e farmaci per il trattamento di neoplasie)
- Composti di sintesi quali : pesticidi e plastificanti (in particolare, gli ftalati)  
Sostanze di origine industriale come:
  - ✓• alchilfenoli
  - ✓• policlorobifenili (PCB) e diossine
  - ✓• acido perfluorooctanoico e suoi sali
  - ✓• alcuni metalli pesanti (piombo, cadmio e mercurio)

INTERFERENTI ENDOCRINI  
RISCONTRATI  
NELLE ACQUE DELLA COMUNITA'  
EUROPEA

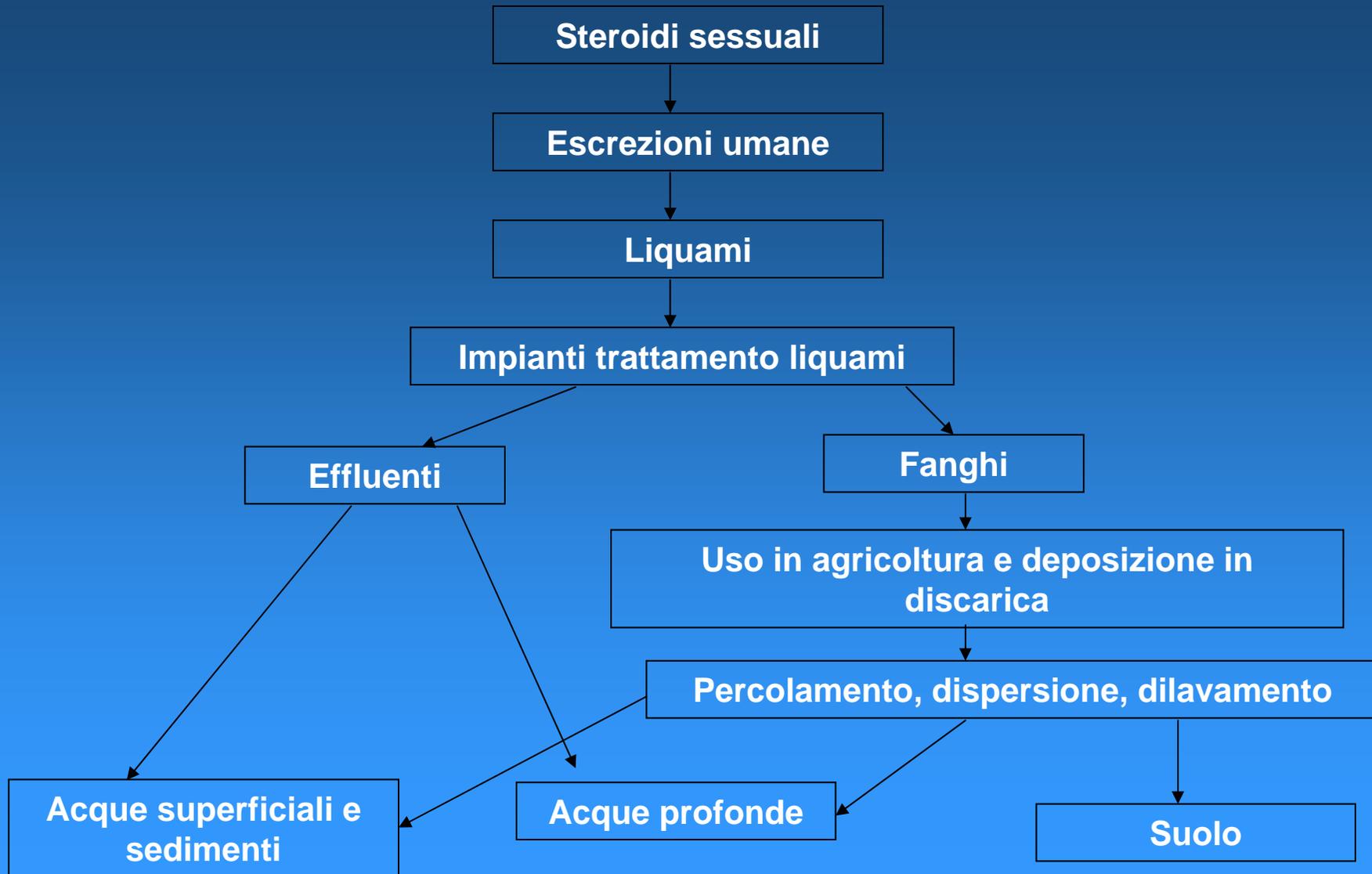
## Attività e normative nazionali ed internazionali

Non esiste una normativa nazionale italiana in tema di acqua specifica per gli EDs

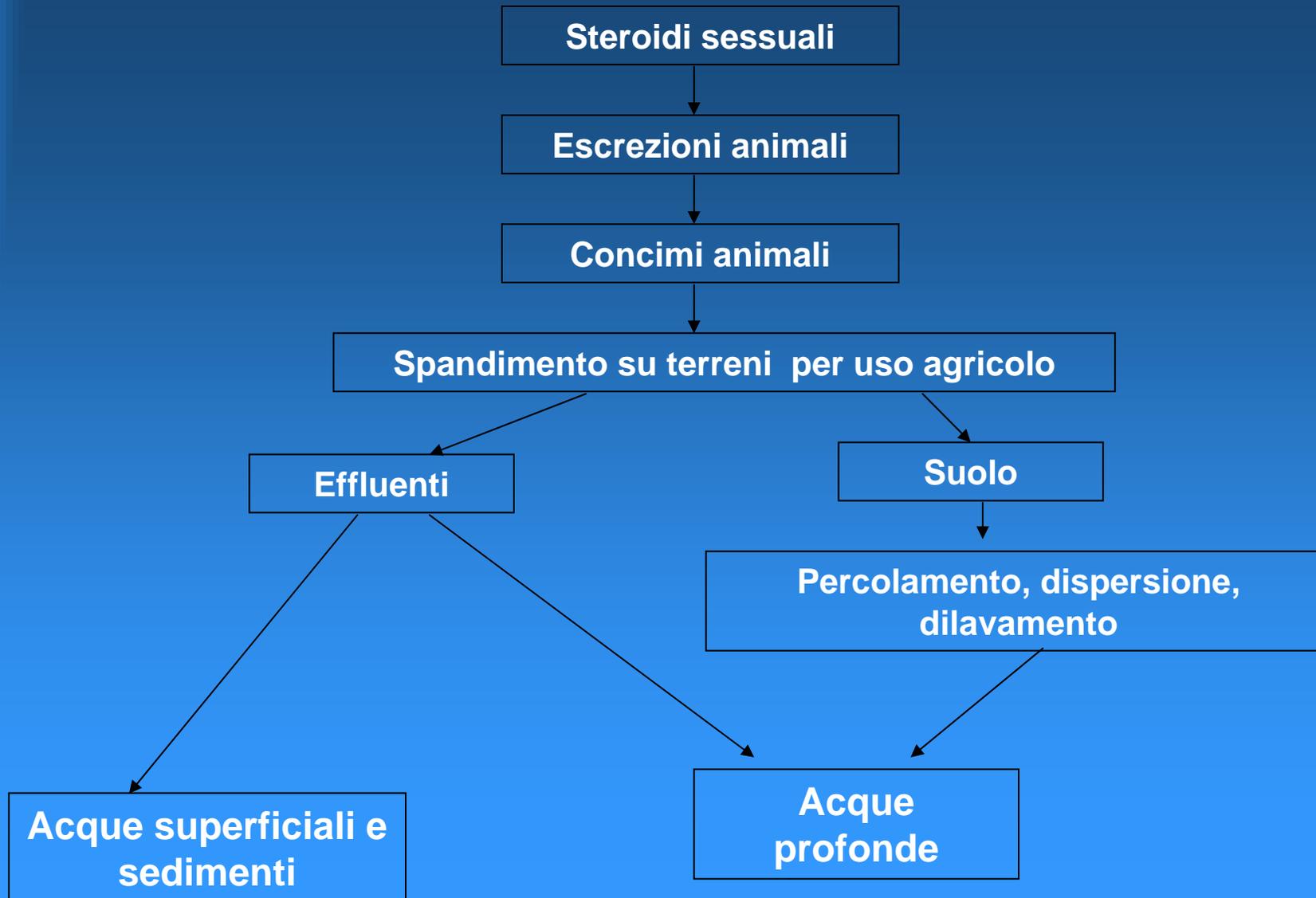
La Direttiva 98/83/CE cita nelle premesse gli EDs  
".....considerando che, pur non esistendo attualmente sufficienti certezze su cui basarsi per fissare valori parametrici a livello comunitario per i prodotti chimici nocivi per il sistema endocrino, è sempre più forte la preoccupazione per il potenziale impatto sugli esseri umani e sulla fauna e flora selvatiche"

**Pertanto nella Direttiva non sono stati indicati valori limite per i composti ED**

# Potenziati vie di esposizione ad ormoni naturali sessuali di origine umana (Lintelman et al., 2003 IUPAC Technical Report)



# Potenziati vie di esposizione ad ormoni naturali sessuali di origine animale (Lintelman et al., 2003)



## Altre vie di esposizione

- ✓ Durante la loro produzione, il loro utilizzo o per cessione da materiali che li contengono
- ✓ Impiego intenzionale (pesticidi, steroidi anabolizzanti)
- ✓ Immissione non intenzionale (PCB e diossine) in quanto sottoprodotti di molti processi di combustione ed industriali

# Bisfenolo A

- ✓ Usato nella produzione di policarbonati (materiali a contatto con gli alimenti) e resine epossidiche (rivestimenti protettivi per lattine e contenitori per alimenti e bevande)
  - ✓ Acque superficiali  $\leq 4 \mu\text{g/L}^*$
  - ✓ Acque profonde livelli inferiori a  $0,007 \mu\text{g/L}^*$
  - ✓ Acque grezze da potabilizzare:  $2,5-9 \text{ ng/L}^*$
  - ✓ Valore tollerabile per l'uomo nell'acqua:  $30 \mu\text{g/L}$
- \*Dati studio Wenzel et.al (2003)

# Alchilfenoli

- ✓ Nonil ed octilfenolo prodotti di degradazione dei rispettivi polietossilati usati come tensioattivi nei detergenti domestici ed industriali, emulsionanti e stabilizzanti per il propilene ed il PVC
- ✓ Acque superficiali nonilfenolo livelli fino a 4,1  $\mu\text{g/L}$ , octilfenolo livelli  $< 0,30\mu\text{g/L}^*$
- ✓ Acque profonde nonilfenolo fino a 4,2  $\mu\text{g/L}$ , octilfenolo tracce\*
- ✓ Acque grezze nonilfenolo fino a livelli di 0,29  $\mu\text{g/L}$ , octilfenolo livelli pari a 0,005  $\mu\text{g/L}^*$
- ✓ Valore tollerabile per l'uomo nell'acqua: 45  $\mu\text{g/L}$  (CE) e 15  $\mu\text{g/L}$  (studio danese EU RAR 2002)

\*Dati studio Wenzel et.al (2003)

# Estrogeni sintetici e naturali

- ✓  $17\alpha$ -etinilestradiolo, composto più attivo, frequentemente usato nei contraccettivi; potenza estrogenica molto elevata pari a quella dell'ormone naturale
- ✓ Acque superficiali fino a 4 ng/L
- ✓ Acque profonde assente o presente al massimo 0,6 ng/L
- ✓ Nel fiume Tevere riscontrati livelli pari a 0,04 ng/L
- ✓  $17\beta$ -estradiolo ed estrone
- ✓ Acque superficiali livelli fino a 0,11 ng/L per il  $17\beta$ -estradiolo e fino a 22 ng/L per l'estrone
- ✓ Acque profonde presente solo estrone fino a 15 ng/L

# PESTICIDI

Matrice	PESTICIDI	Livelli riscontrati ( $\mu\text{g/L}$ )
Acque Profonde	Atrazina	$\leq 1,52$
	Diuron	$\leq 0,1$
	Lindano	$\leq 0,1$
	Simazina	$\leq 0,1$
Acque Superficiali	Simazina	$\leq 28,7$
	Atrazina	$\leq 14,9$
	Diuron	$\leq 23,1$
	Lindano	$\leq 6,25$
Acque Potabili (grezze)	Diuron	$\leq 0,5$
	Atrazina	$> 0,1$ (UK)
Acque Potabili (trattate)	Simazina	$\leq 0,043$

# INQUINANTI AMBIENTALI

Matrice	INQUINANTI AMBIENTALI	Livelli riscontrati ( $\mu\text{g/L}$ )
Acque Profonde	bisfenolo A nonilfenolo octilfenolo	$\leq 0,007$ $\leq 4,2$ tracce
Acque Superficiali	benzo- $\alpha$ -pirene bisfenolo A nonilfenolo octilfenolo	$\leq 0,2$ $\leq 4$ $\leq 4,1$ $\leq 0,27$
Acque Potabili (grezze)	nonilfenolo octilfenolo	$\leq 0,29$ $\leq 0,005$
Acque Potabili (trattate)	benzo- $\alpha$ -pirene bisfenolo A nonilfenolo stirene ftalati	$\leq 0,0007$ $\leq 0,12$ $\leq 2,1$ $\leq 0,193$ $\leq 1,2$

# ORMONI E FITOESTROGENI

Matrice	ORMONI E FITOESTROGENI	Livelli riscontrati (ng/L)
Acque Profonde	17 $\alpha$ -etinilestradiolo estrone	$\leq 0,6$ $\leq 15$
Acque Superficiali	17 $\alpha$ -etinilestradiolo estriolo estradiolo estrone	$\leq 4$ $\leq 0,33$ $\leq 0,11$ $\leq 21,7$
Acque Potabili (grezze)	17 $\alpha$ -etinilestradiolo: 17 $\beta$ -estradiolo estrone	$\leq 1,4$ 0,2 - 2,1 $\leq 3$
Acque Potabili (trattate)	$\beta$ -sitosterolo stigmasterolo	$\leq 66$ $\leq 66$

# Il progetto: Interferenti endocrini nelle acque per consumo umano

- ✓ Promosso e coordinato dalla Fondazione AMGA Onlus e dal Dipartimento di Scienze della Salute dell' Università di Genova
- ✓ Finalizzato ad approfondire lo stato delle conoscenze sul potenziale impatto degli interferenti endocrini sui sistemi idrici per la produzione e distribuzione di acque da destinare al consumo umano nel contesto nazionale

# Il gruppo di ricerca

- Acquedotto Pugliese S.p.A.
- ACSM S.p.A (Como).
- Federutility
- Fondazione AMGA
- Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME) = Germany
- HERA S.p.A. (Bologna)
- Iride Acqua Gas S.p.A (Genova).
- Istituto Mario Negri
- Istituto Superiore Sanità - Dip. Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria
- Istituto Superiore Sanità -Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
- Mediterranea delle Acque S.p.A (Genova).
- Publiacqua S.p.A (Firenze).
- SMAT S.p.A (Torino).
- Università Cà Foscari Venezia = Dip. Scienze Ambientali
- Università di Genova = Dipartimento di Biologia
- Università di Genova = Dipartimento di Chimica
- Università di Genova = Dipartimento di Scienze della Salute
- Università di Pisa = Dip. Patologia Sperim. Biotecnologie Mediche, Infettivologia, Epidemiologia
- Università di Trento = Dipartimento Ingegneria Civile Ambientale
- Utilitatis pro acqua energia ambiente

# Obiettivi specifici

- ✓ Creazione di sinergie tra i gestori
- ✓ Attivazione di sinergie tra gli acquedotti ed Enti ed Istituti di ricerca
- ✓ Sviluppo e validazione di metodi analitici chimici per la determinazione degli EDs nelle acque destinate al consumo umano da utilizzare come metodi analitici di riferimento ai sensi del D.Lgs. 31/2001;
- ✓ Valutazione dell'impiego di test biologici per la presenza degli ED nelle acque destinate al consumo umano;
- ✓ Esame di casi-studio rappresentativi di diverse realtà, con particolare attenzione alle acque di captazione di tipo superficiale, più vulnerabili;
- ✓ Verifica dell'efficacia dei sistemi di potabilizzazione attualmente in uso sulla mitigazione del rischio;
- ✓ Identificazione di elementi di valutazione e gestione del rischio e proposte di modelli operativi anche nell'ambito di *"Water Safety Plans"*

# Le attività

- ✓ avviate nel 2007
- ✓ attualmente completata da parte dell'ISS-DAMPP la fase di sviluppo e validazione dei metodi analitici utilizzabili per la determinazione delle sostanze individuate come prioritarie nel progetto (17 $\alpha$ -etinilestradiolo, estrone, 17 $\beta$ -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo, nonilfenolo) e di altre sostanze ad azione endocrina come i tensioattivi perfluorurati
- ✓ sviluppati dall'Università di Pisa e di Genova test biologici (su linee cellulari, test biochimici, test di biologia molecolare) per la determinazione degli EDs nelle acque destinate al consumo umano;
- ✓ armonizzate e validate le procedure estrattive e di preconcentrazione degli EDs da parte di 6 laboratori nazionali partecipanti;
- ✓ in fase di attuazione la determinazione di EDs su campioni reali (acque da destinare al consumo umano e acque trattate) da diverse realtà acquedottistiche italiane.

## Attività del Reparto Igiene delle acque interne

Sviluppo e validazione di un metodo analitico basato sulla separazione in HPLC accoppiata al sistema di rivelazione MS/MS per l'identificazione e quantificazione di alcuni EDs nelle acque destinate al consumo umano quali:

17 $\alpha$ -Etinilestradiolo, Estrone, 17 $\beta$ -Estradiolo, Bisfenolo A, 4-Octilfenolo, Nonilfenolo

# Metodo SPE-HPLC-MS/MS

1 L di campione

Estrazione in fase solida: OASIS  
HLB (Waters; 200 mg, 6 mL)

Eluizione: 2 x 3 mL miscela  
metanolo:acetone:acetato di etile  
40:40:20

Evaporazione dell'eluato sotto  
flusso di azoto o argon e ripresa  
del residuo con 0.5 mL di miscela  
acqua:metanolo 50:50

Analisi LC-MS/MS

# Metodo SPE-HPLC-MS/MS

## Condizioni HPLC:

Condizioni MS/MS: 18 15 cm x 2.1 mm, ID 5 µm;

## Condizioni SPE:

- APL 3000 (Atmospheric Pressure Ionization)

- Attivazione cartuccia (OASIS HLB, 1g) con 25 mL di metanolo e sorgente TIS (Turbo Ion Spray) a 250 °C

- Fase mobile: A) 25% in H<sub>2</sub>O; B) MeOH;

- 25 mL di acqua ultrapura, quadrupolo

- Flusso 0.2 mL/min; - Passaggio del campione (10 L) ad un flusso ≤ 8 mL/min;

- Lavaggio con etilene glicole

- Eluizione con etilene glicole

2:2:1; (negative ionization mode)

- Concentrazione di etilene glicole

(N<sub>2</sub>, A) 271 > 145 Temperature: 450 ° C

misce di

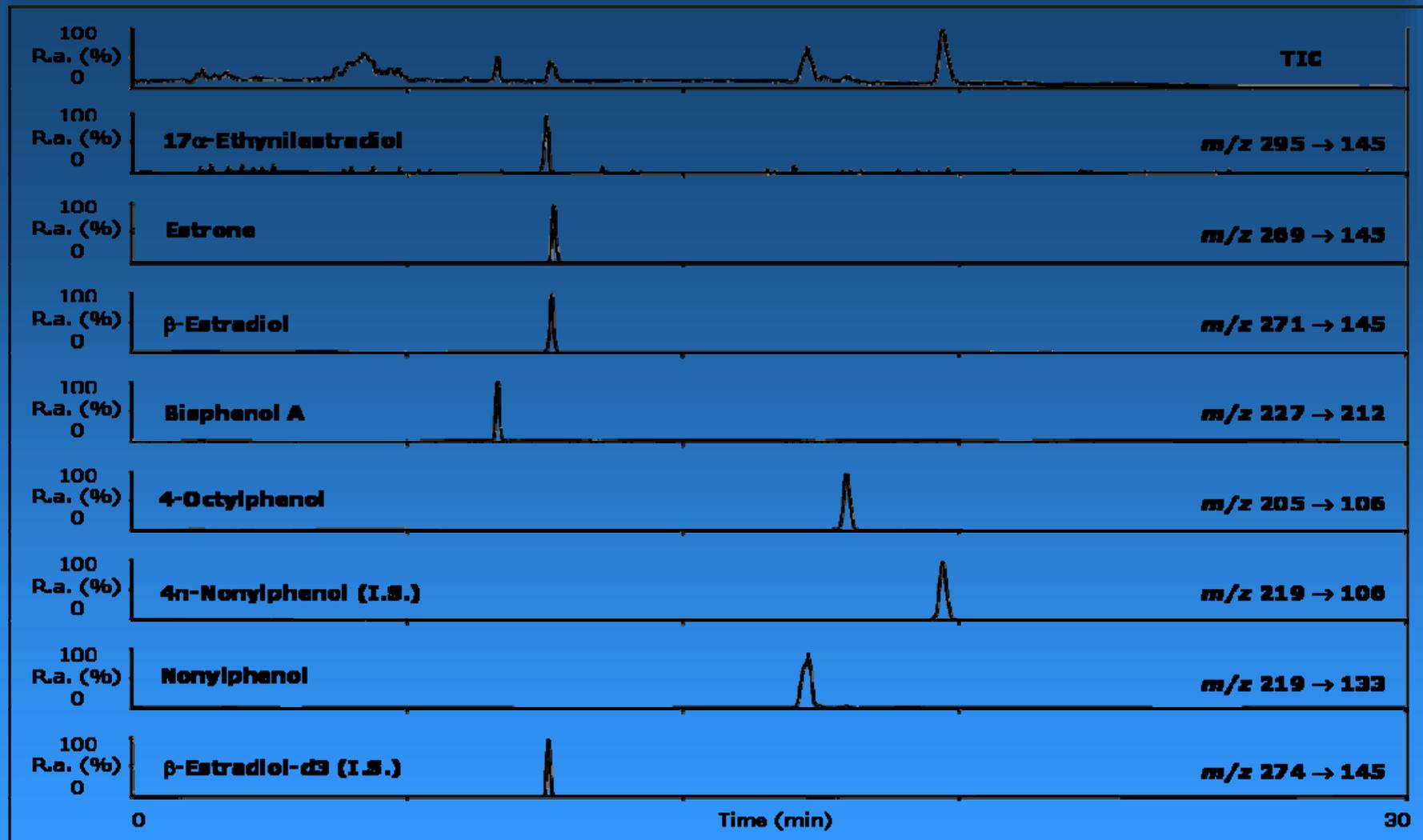
4-Octilfenolo 205 > 106 Curtain gas flow: 10 u.a.

Nebulizer gas flow: 12 u.a.

β-Estradiolo d<sub>3</sub> 274 > 145

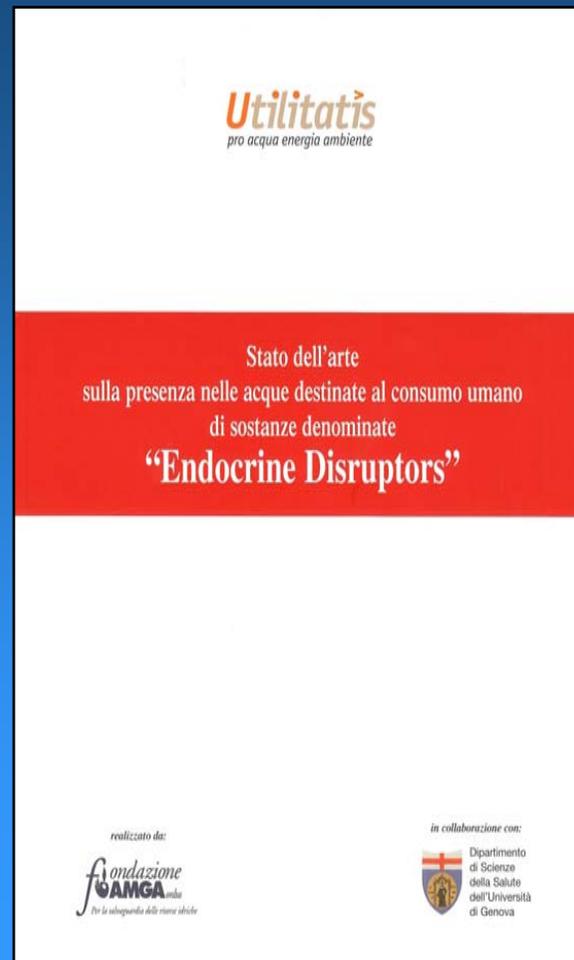
Turbo gas flow: 7 u.a.

# Metodo SPE-HPLC-MS/MS



Cromatogramma di un campione di acqua del rubinetto fortificato con 10 ng/L (LOQs) di ciascun EDs e 25 ng/L di 17 $\beta$ -estradiolo-d<sub>3</sub> and 4-n-nonilfenolo (S.I.)

Fondazione AMGA, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova e la partecipazione del DAMPP - Reparto Igiene delle acque interne, ha condotto nel 2006 un primo studio "Stato dell'arte sulla presenza nelle acque destinate al consumo umano di sostanze denominate "Endocrine Disruptors"



[www.edinwater.com](http://www.edinwater.com)