



Rapporti ISTISAN

11/18



Interferenti endocrini nelle acque
da destinare al consumo umano in Italia:
strumenti metodologici per un'indagine
conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici



ISSN 1123-3117

A cura di
L. Achene, S. Bogialli, L. Lucentini,
P. Pettine e M. Ottaviani

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Interferenti endocrini
nelle acque da destinare al consumo umano in Italia:
strumenti metodologici per un'indagine conoscitiva
estesa a diversi sistemi idrici**

A cura di
Laura Achene, Sara Bogialli, Luca Lucentini,
Paola Pettine e Massimo Ottaviani
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
11/18

Istituto Superiore di Sanità

Interferenti endocrini nelle acque da destinare al consumo umano in Italia: strumenti metodologici per un'indagine conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici.

A cura di Laura Achene, Sara Bogialli, Luca Lucentini, Paola Pettine e Massimo Ottaviani

2011, iii, 84 p. Rapporti ISTISAN 11/18

Gli interferenti endocrini sono un gruppo di sostanze chimiche, sia naturali che sintetiche, presenti nell'ambiente e sospettate di alterare la funzione del sistema endocrino e conseguentemente di causare effetti avversi sugli organismi. L'evidenza di un'associazione fra esposizione a sostanze in grado di interagire con il sistema endocrino (interferenti endocrini) e patologie umane quali infertilità e poliabortività, disturbi neurocomportamentali o pubertà precoce ha indirizzato, negli anni recenti, molteplici attività di ricerca volte ad approfondire le conoscenze sulle potenziali vie e modalità di esposizione della popolazione a tali sostanze. In tale contesto risultava necessario e urgente approfondire lo stato delle conoscenze sul ruolo delle acque destinate al consumo umano quale possibile fonte di esposizione agli interferenti endocrini in Italia, esigenza cui lo studio, promosso da Fondazione AMGA, ha dato, in via preliminare, alcune importanti risposte.

Parole chiave: Interferenti endocrini; Acque destinate al consumo umano

Istituto Superiore di Sanità

Endocrine disruptors in Italian water for human consumption: methods adopted in a preliminary study of different water suppliers.

Edited by Laura Achene, Sara Bogialli, Luca Lucentini, Paola Pettine and Massimo Ottaviani

2011, iii, 84 p. Rapporti ISTISAN 11/18 (in Italian)

Endocrine disruptors are a group of environmental pollutants of both natural and synthetic origin, suspected to be able of interfering with the endocrine system and consequently causing adverse effects on living organisms. An association between exposition to endocrine disruptors and human diseases – such as infertility, polyabortivity, neuro-behavioural disorders, precocious puberty – has recently directed the research activity on pathways and modes of exposure to endocrine disruptors of the general population. It was then necessary and urgent to explore whether in Italy water for human consumption could be a possible exposure vehicle to endocrine disruptors. The present study, promoted by the AMGA Foundation, yielded some relevant preliminary answers.

Key words: Endocrine disruptors; Water for human consumption

Per informazioni su questo documento scrivere a: laura.achene@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Achene L, Bogialli S, Lucentini L, Pettine P, Ottaviani M (Ed.). *Interferenti endocrini nelle acque da destinare al consumo umano in Italia: strumenti metodologici per un'indagine conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/18).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2011



INDICE

Abbreviazioni e acronimi	iii
Introduzione	
<i>Laura Achene</i>	1
1. Generalità sugli interferenti endocrini	
<i>Franca Palumbo, Enrico Raffo, Francesco D'Agostini</i>	3
2. Presenza degli interferenti endocrini nelle acque destinate al consumo umano	
<i>Laura Achene, Paola Pettine</i>	15
3. Determinazione di interferenti endocrini in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano: una metodologia di analisi	
<i>Sara Bogialli, Federica Nigro Di Gregorio, Giorgia Di Pofi</i>	27
4. Valutazione dei livelli di interferenti endocrini in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano in diversi sistemi idrici italiani	
<i>Sara Bogialli, Federica Nigro Di Gregorio, Giorgia Di Pofi</i>	38
5. Applicazione di metodi biologici per la determinazione di interferenti endocrini in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano	
<i>Daniela Reali, Katy Sanfilippo, Laura Canesi, Rita Fabbri</i>	45
Conclusioni	
<i>Laura Achene, Sara Bogialli, Laura Canesi, Marina Di Carro, Giorgia Di Pofi, Rita Fabbri, Emanuele Magi, Federica Nigro Di Gregorio, Franca Palumbo, Paola Pettine, Enrico Raffo, Daniela Reali, Katy Sanfilippo, Giuliano Ziglio</i>	62
APPENDICE A	
Metodo analitico LC/MS/MS per la determinazione di interferenti endocrini in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano	65
APPENDICE B	
Specifiche tecniche per i laboratori delle aziende acquedottistiche coinvolte nell'indagine per la valutazione dei livelli di 17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo, nonilfenolo in acque grezze e trattate	75
APPENDICE C	
Impiego di campionatori passivi per la determinazione di interferenti endocrini in acque per il consumo umano	81
Bibliografia	84

ABBREVIAZIONI E ACRONIMI

APEO	<i>AlkylPhenol EthOxylates</i> (achilfenol etossilati)
CP	<i>Chlorinated paraffins</i> (paraffine cloridrate)
DDE	Dicloro Difenil dicloroEtilene
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DES	<i>Diethyl-stilboesterol</i>
DEVENERTOX	<i>Toxic threats to the developing nervous system</i>
DS	Deviazione Standard
EEQ	<i>Estradiol EQuivalent</i> (estradiolo equivalente)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (dosaggio immuno-assorbente legato ad un enzima)
GAC	<i>Granular Activated Carbon</i> (carbone granulare attivato)
HLB	<i>Hydrophilic – Lipophilic Balance</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia liquida ad alte prestazioni)
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
IE	Interferenti endocrini
IPA	Idrocarburi Policiclici Aromatici
IS	<i>Internal Standard</i> (standar interno)
LC/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> (cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa)
LOD	<i>Limit Of Detection</i> (limite di rivelazione)
LOR	<i>Limit Of Report</i>
LPVC	<i>Low Production Volume Chemicals</i>
MANOVA	<i>Multivariate ANalysis Of VAriance</i> (analisi multivariata della varianza)
NPEO	<i>NonylPhenol EthOxylate</i> (nonilfenoli etossilati)
OPEO	<i>OctylPhenol EthOxilate</i> (octilfenol etossilati)
PAH	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
PBB	<i>Poly-Brominated Biphenyl</i> (bifenil polibromurato)
PBBE	<i>PolyBrominated Biphenyl Ether</i>
PCB	PoliCloroBifenili
PCT	<i>PolyChlorinated Triphenyls</i> (terfenili policlorurati)
REACH	<i>Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (deviazione standard relativa)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (estrazione in fase solida)
UV	UltraVioletto

INTRODUZIONE

Laura Achene

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Gli Interferenti Endocrini (IE) sono inquinanti ambientali (ormoni naturali e sintetici, farmaci, composti di sintesi come ad esempio i pesticidi, sostanze chimiche industriali quali PCB e diossine, ecc.) che possono provocare effetti sfavorevoli sull'organismo umano interferendo con il sistema endocrino.

Studi effettuati negli ultimi decenni hanno evidenziato che molte di queste sostanze possono essere presenti anche nell'acqua destinata al consumo umano e di conseguenza è maturato da parte della Comunità scientifica l'interesse verso questa problematica.

Le indagini ad oggi eseguite, soprattutto a livello europeo, che mirano a valutare l'esposizione della popolazione agli IE hanno evidenziato concentrazioni assai modeste di queste sostanze nelle acque grezze superficiali, nelle acque profonde e nelle acque trattate. In particolare i dati a disposizione sulla presenza degli IE nelle acque destinate al consumo umano sono piuttosto scarsi e incompleti.

Sulla base di tali premesse il Reparto di Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità ha avviato un'indagine che riguarda lo studio degli "Interferenti endocrini e le acque destinate al consumo umano", promosso e coordinato dalla Fondazione AMGA Onlus e dal Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova, con la finalità è quella di approfondire lo stato delle conoscenze sul potenziale impatto degli IE sui sistemi idrici per la produzione e distribuzione di acque da destinare al consumo umano nel contesto nazionale.

Lo studio ha coinvolto alcuni acquedotti italiani, sia per il campionamento che per la fase estrattiva dei campioni e precisamente:

- Acquedotto Pugliese SpA Bari (responsabile Pier Paolo Abis);
- ACSM AGAM Reti Gas Acqua Como (responsabile Paola Roncoroni);
- Hera SpA BOLOGNA (responsabile Luciano Agostini);
- Mediterranea delle Acque SpA Genova (responsabile Francesco Perasso);
- Publiacqua SpA Firenze (responsabile Daniela Santianni);
- SMAT SpA Torino (responsabile Lorenza Meucci).

L'attività fino ad ora svolta ha creato una solida base per la rivelazione analitica delle sostanze, la valutazione sull'efficacia dei trattamenti e la potenziale esposizione per la salute umana; ha contribuito ad armonizzare criteri e metodi di intervento ed accrescere il livello di conoscenza sul tema in diversi gruppi di interesse. Inoltre ha dimostrato, sebbene i dati siano ancora preliminari, che tracce di IE possono riscontrarsi in acque da destinare e destinate a consumo umano e che le concentrazioni sostanze ricercate nelle acque esaminate indicano l'assenza di rischio per la salute.

Il coinvolgimento delle parti interessate alla sicurezza della risorsa idrica consentirà di organizzare una "task force" sul particolare problema degli IE.

Il presente documento comprende pertanto le informazioni generali sugli interferenti endocrini, sulla loro presenza nelle acque da destinare e destinate al consumo umano a livello europeo e sui metodi chimici e biologici più innovativi per la loro determinazione qualitativa e quantitativa nelle acque.

Inoltre nelle Appendici vengono riportati:

- Appendice A
Metodo analitico LC/MS/MS per la determinazione di interferenti endocrini in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano
che illustra il metodo analitico in dettaglio;
- Appendice B
Specifiche tecniche per i laboratori delle aziende acquedottistiche coinvolte nell'indagine per la valutazione dei livelli di 17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo, nonilfenolo in acque grezze e trattate
che riporta le istruzioni inviate ai gestori degli acquedotti coinvolti nell'indagine;
- Appendice C
Impiego di campionatori passivi per la determinazione di interferenti endocrini in acque per il consumo umano
che descrive un metodo di campionamento alternativo a quelli comunemente in uso.

1. GENERALITÀ SUGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

Franca Palumbo (a), Enrico Raffo (a), Francesco D'Agostini (b)

(a) *Fondazione AMGA, Genova*

(b) *Dipartimento Scienze della Salute, Università di Genova, Genova*

1.1. Definizione e classificazione dei composti con azione di interferente endocrino

Gli Interferenti Endocrini (IE) sono un gruppo di sostanze chimiche, sia naturali che sintetiche, presenti nell'ambiente e sospettate di alterare la funzione del sistema endocrino e conseguentemente di causare effetti avversi sugli organismi.

In occasione dello "European workshop in the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife", tenutosi a Weybridge in Inghilterra nel 1996 (1), è stata concordata dalla comunità scientifica internazionale, la seguente definizione: "Una sostanza che altera il sistema endocrino è una sostanza o una miscela esogena che agisce sulle funzioni del sistema endocrino, provocando di conseguenza effetti negativi per la salute di un organismo intatto, della sua progenie o delle (sotto)popolazioni".

La *Environmental Protection Agency* degli Stati Uniti (USEPA) ha adottato la seguente definizione: "Gli IE sono composti chimici che interferiscono con le funzioni del sistema endocrino".

Il *National Research Council* (2) ha proposto la definizione di "composti ormonalmente attivi" (*hormonally active agents*) definiti come agenti che dimostrano attività ormono-simile.

Le sostanze che possono o potrebbero alterare il sistema endocrino sono raggruppabili in sostanze di origine naturale, quali ormoni naturali comprendenti gli estrogeni, il progesterone e il testosterone naturalmente prodotti nell'organismo umano o animale e i fitoestrogeni, sostanze contenute in alcune piante, come i germogli alfalfa e i semi di soia, che, se ingerite, esercitano un'attività analoga a quella degli estrogeni. Inoltre possono comprendere sostanze sintetizzate dall'uomo, quali gli ormoni di sintesi, inclusi quelli identici agli ormoni naturali, quali i contraccettivi orali, le sostanze utilizzate nella terapia sostitutiva degli ormoni e alcuni additivi per mangimi, concepiti espressamente per interferire sul sistema endocrino, modulandone la funzionalità e composti concepiti per usi industriali (es. alcuni detergenti industriali), agricoli (es. alcuni antiparassitari) e per taluni beni di consumo (es. alcuni additivi per sostanze plastiche), nonché derivati dai processi industriali (es. diossine).

Lo studio effettuato da Wenzel nel 2003 (3), promosso dalla CE sulla presenza di IE in acque destinate al consumo umano, in base allo studio della letteratura scientifica disponibile associata a un'indagine su alcuni acquedotti europei ha classificato gli IE nelle seguenti classi: estrogeni naturali e sintetici, alchilfenoli e alchilfenoli etossilati, acidi alchilfenossiacetici, bisfenolo A, composti organo stannici e pesticidi.

Gli IE si potrebbero classificare anche in base agli ormoni con cui interferiscono, come riportato nella Tabella 1 (4). Ad esempio quelli che interagiscono con gli ormoni steroidei sono i composti alogenati persistenti (diossine; PoliCloroBifenili, PCB), diversi antiparassitari, pesticidi, fungicidi e biocidi, nonché sostanze di uso industriale tipo composti fenolici e ftalati.

Tabella 1. Principali gruppi di interferenti endocrini

Composti IE	Utilizzo	Potenza estrogenica (riferita a estradiolo)	Concentrazioni osservate	
			in animali da laboratorio con effetti biologici significativi	in ambiente acquatico
Pesticidi organoclorurati (DDT, DDE, metossicloro, lindano, clordecone)	Insetticida	Estrogenico (100-100000 x < potente)	> 32 (µg/L)	0-2,8 (µg/L)
Difenili policlorurati	Applicazioni relative a trasferimento di elettricità e calore, impianti idraulici, materiali plastici, pigmenti	Estrogenico (50-500 x < potente)	nd	nd
Diossine	Combustione composti organici	Estrogenico	0,1-1 (µg/L)	0-40 (µg/L)
Alchilfenoli	Detergenti industriali, emulsionanti, plastificanti, antiparassitari	Estrogenico (2000-100000 x < potente)	0,32-10 (µg/L)	nd
Composti derivati dai Policarbonati e Resine epossidiche	Rivestimento per contenitori e tubazioni	Estrogenico (2000 x < potente)	> 10 (µg/L)	0-1 (µg/L)
Ftalati	Manifattura di plastiche, repellenti, cosmetici, oli, inchiostri	Estrogenico	> 320 (µg/L)	0-30 (µg/L)
Vinclozolin	Farmaco fungicida	Androgenico	nd	nd
Composti organostannici	Antivegetativo carene barche	Androgenico	1-5 ng/L	0-30 ng/L
Estrogeni sintetici	Controllo delle nascite	Estrogenico (0,7 x < potente)	1-10 ng/L	0-7 ng/L
Estrogeni naturali		Estrogenico	0,002-0,003 pg/L (sangue)	1-80 ng/L

nd: non disponibile

Per quanto riguarda le acque in generale e quelle utilizzate a scopo idropotabile, l'elenco preparato dalla CE riportato nella Tabella 2 (5), può costituire un utile punto di partenza per affrontare il problema del rilevamento di composti con tali caratteristiche, in quanto elenca per ciascun gruppo di sostanze il relativo numero di composti da prendere in considerazione.

Da quanto esposto, emerge come non sia facile elencare e ancor più classificare in maniera semplice e univoca, le sostanze con effetti di IE.

Nel 1999, l'USEPA ha promosso uno studio per la messa a punto di test capaci di rivelare gli effetti ormonali di 87.000 sostanze. Questo numero così elevato di sostanze da valutare, derivava dalla carenza di informazioni su moltissimi dei composti che possono essere ritrovati quali inquinanti nelle diverse matrici ambientali. Nel 2000 la CE ha affidato alla società BKH Consulting Engineers (5), l'incarico di predisporre un elenco completo delle sostanze con caratteristiche di IE: inizialmente sono state identificate 553 sostanze candidate, fra le quali è stata confermata l'azione o la potenziale azione IE, in 118.

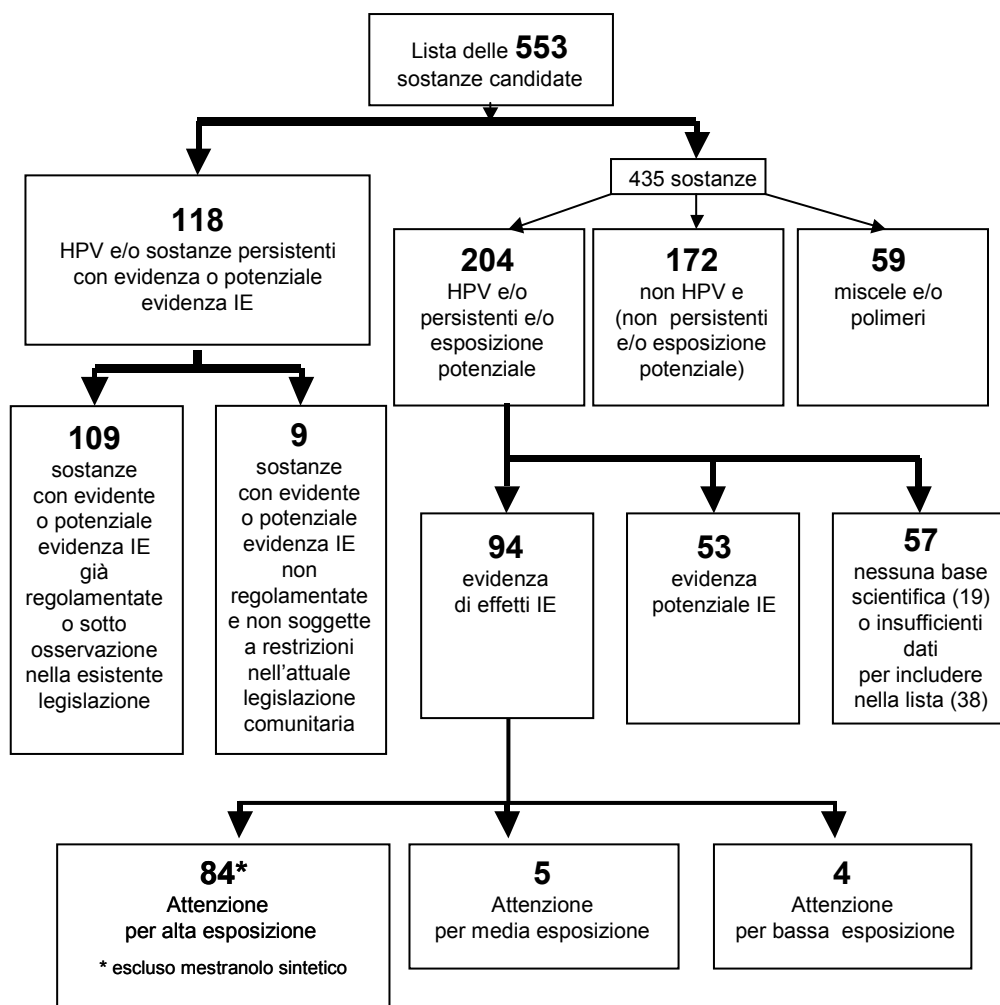
Tabella 2. Gruppi di sostanze e numero di composti

Gruppi sostanze	Numero di composti per gruppo
Pesticidi	
1-idrossibenzonitrile	2
Benzimidazolo	2
Carbammati	6
Ciclodieni clorurati e camfeni	17
Composti clorofenolici	5
DDT derivati e metaboliti	28
Dicarbossimide	5
Dinitroanilide	3
Ditiocarbammati	9
Esaclorocicloesano e isomeri	4
Linurone, diurone e metaboliti derivati	6
Metossicloro e derivati	9
Pestici organofosforici	28
Piretrine	1
Piretroidi	12
Pirimidine e piridine	3
Triazine e triazoli	21
Altri pesticidi	27
Composti chimici industriali	
Alchilbenzeni e stireni	5
Alchilfenoli e derivati	71
Bisfenoli	46
Clorofenoli e benzeni	7
Derivati del difenil propano	5
Derivati del trifenil metano	1
Difenili	5
Difenili bromurati, polibromurati e difenileteri	5
Difenili policlorurati	63
Diossine	16
Fenil idrossi fenil metano	2
Fenil silossani	10
Ftalati	19
Furani	22
Idrocarburi policiclici aromatici	16
Metalli	29
Naftaleni e derivati	8
Parraffine clorate	3
Terfenili policlorinati	2
Altre sostanze	32

Sono stati avviati successivamente altri studi, che prevedevano una valutazione approfondita di 9 sostanze candidate e cioè il 2,2-bis(4-(2,3-epossipropossi)fenil)propano (BADGE), disolfuro di carbonio, 4-cloro-3-metilfenolo, 2,4-diclorofenolo, 4-nitrotoluene, o-fenilfenolo, resorcinolo, 4-tert octilfenolo, il 2,2',4,4-tetrabromodifeniletere (tetra-BDE) e inoltre di 3 ormoni naturali/sintetici (estrone, 17 α -estradiolo 17 α -etinilestradiolo), in quanto sostanze non sottoposte ad alcune restrizione o valutazione nella normativa comunitaria esistente. Lo studio ha portato alla conclusione che l'estrone naturale 17 β -estradiolo e il 17 α -etinilestradiolo provocano effetti sulla riproduzione e sullo sviluppo dei pesci, probabilmente mediati dal sistema endocrino. La seconda ricerca riguardava le rimanenti 435 sostanze per le quali nel rapporto del 2000 (6), i cui relativi dati erano insufficienti per definire come sostanze con effetti IE o di potenziale IE:

pertanto la ricerca aveva lo scopo di radunare dati/informazioni sulla persistenza, volumi di produzione, posizione legale di esse, suddivise in tre gruppi omogenei in base alla disponibilità di dati sulla esposizione, persistenza e tossicologia. Questa analisi ha portato ad una lista di 94 sostanze candidate per cui erano disponibili dati relativi ad effetti endocrini, 53 con dati relativi a potenziali effetti e 57 senza dati scientificamente accertati. In una ulteriore fase si sono evidenziate 84 sostanze per cui esisteva elevata preoccupazione per la esposizione, 5 sostanze con media preoccupazione e 4 con modesta preoccupazione. Quelle che destavano elevata preoccupazione appartenevano a 34 differenti gruppi includenti paraffine clorate, ftalati, bisfenoli, IPA, PCB, diossine/furani, triazine, fungicidi pirimidinici e piretroidi.

Delle 147 sostanze con evidenza di effetti IE o potenziali effetti IE, 129 sono risultate già sottoposte a restrizioni o regolamentazioni sebbene per motivi non necessariamente attinenti all'attività come IE, mentre 18 sostanze non risultavano sottoposte ad alcuna regolamentazione della CE (Figura 1) (7).



Nota: HPV: *High Production Volume* (sostanze con elevato volume di produzione annua)
IE: Interferenti Endocrini

Figura 1. Lista prioritaria di sostanze per ulteriori valutazioni degli IE

La CE ha promosso successive iniziative finalizzate (8, 9) alla rivisitazione e adattamento della legislazione vigente relativa all'identificazione degli IE, valutazione e modalità di impiego dei prodotti chimici prendendo in considerazione anche le sostanze chimiche prodotte in quantitativi limitati (*Low Production Volume Chemicals*, LPVC).

Di importanza particolare è il Regolamento della Commissione (EC) n. 1907/2006 (10) riguardo al registro, alla valutazione, all'autorizzazione e alla limitazione dei prodotti chimici (REACH) entrato in vigore il 1° giugno 2007, che richiama i prodotti chimici industriali con potenziale IE.

1.2. Possibili azioni degli IE sul sistema endocrino umano

Nel corpo umano esistono due sistemi principali di controllo e coordinamento dei processi biologici interconnessi, che agiscono in accordo fra di loro: il sistema nervoso e il sistema endocrino. Mentre il primo agisce mediante segnali elettrici convogliati lungo il percorso dei nervi fino agli organi o tessuti, il secondo si basa su messaggeri chimici, gli ormoni, che vengono secreti dalle ghiandole nel sangue o in altri liquidi extracellulari e raggiungono tutto l'organismo.

Il sistema endocrino è costituito da un sistema di ghiandole, ormoni e recettori. Le ghiandole endocrine secernono gli ormoni. Gli ormoni circolano per via ematica e modulano le funzioni cellulari e degli organi combinandosi con i recettori cellulari; alcuni di essi, detti trofomoni o ormoni trofici, agiscono sulle altre ghiandole endocrine. I recettori cellulari, attivati a seguito della combinazione con gli ormoni, regolano funzioni e processi metabolici dei tessuti interagendo con il DNA cellulare o con altri complessi processi intracellulari (11). Il sistema endocrino costituisce la connessione fondamentale per la comunicazione e il controllo tra sistema nervoso e funzioni somatiche quali la riproduzione, l'attività immunitaria, il metabolismo e il comportamento.

Le ghiandole endocrine e i principali ormoni presenti nell'organismo umano sono indicati in Tabella 3.

Tabella 3. Ghiandole endocrine e principali ormoni dell'organismo umano

Ghiandola	Ormone	Funzioni
Ipotalamo	Fattori (RF) e ormoni (RH) che regolano il rilascio di vari ormoni ipofisari	Stimolazione o inibizione dell'attività ipofisaria
Adenoipofisi	Ormone somatotropo (GH), prolattina (PRL), ormone tireotropo (TSH), ormone adrenocorticotropo (ACTH), ormone follicolo-stimolante (FSH), ormone luteinizzante (LH)	Stimolazione dell'attività di altre ghiandole (tiroide, surreni, gonadi e pancreas)
Neuroipofisi	Ormone antidiuretico (ADH); ossitocina	Regolazione del ricambio idrico ed elettrolitico; stimolazione della contrazione uterina
Tiroide	Tetraiodotironina (T4), triiodotironina (T3)	Regolazione di metabolismo, crescita e sviluppo, comportamento e pubertà
Surreni	Ormoni mineralcorticoidi (aldosterone), glucocorticoidi (cortisolo), catecolammine (adrenalina, noradrenalina)	Regolazione di metabolismo e comportamento
Pancreas	Insulina e glucagone	Regolazione della glicemia
Gonadi	Ormoni steroidei sessuali (estrogeni, androgeni)	Regolazione di sviluppo e crescita, riproduzione, immunità, pubertà e comportamento

L'attività secretoria delle ghiandole endocrine e quindi i livelli ormonali e la loro disponibilità periferica, sono regolati grazie ad una serie di meccanismi di controregolazione ("feed-back negativo"). I meccanismi di controregolazione mantengono in equilibrio i vari organi e sistemi corporei secondo un processo denominato "omeostasi".

Come già detto il sistema endocrino è assai importante per la vita in quanto controlla la crescita e lo sviluppo durante l'infanzia, regola le funzioni corporee nell'adulto e i processi riproduttivi. Molti degli ormoni agiscono su vari tessuti e organi. Le cellule effettrici sono dotate di strutture specializzate dette "recettori" con i quali soltanto un ormone può combinarsi. La risposta cellulare dipende dal tipo di recettore e di cellula e dalla esposizione anche ad altri ormoni. Lo stesso ormone può avere effetti diversi in tipi diversi di cellule (12).

1.2.1. Modalità di azione degli IE

Gli IE possono agire influenzando sui meccanismi di omeostasi o dando luogo a processi non previsti (in un dato momento) nel ciclo vitale.

Le sostanze che alterano il sistema endocrino sembrano interferire sul funzionamento di questo complesso meccanismo agendo almeno a tre livelli:

1. simulando l'azione di un ormone naturale e inducendo così reazioni chimiche analoghe a quelle normalmente prodotte ma al tempo sbagliato o in grado eccessivo (effetto agonistico);
2. bloccando i recettori delle cellule che riconoscono e si legano agli ormoni (recettori ormonali), impedendo così la normale azione solitamente esercitata dagli ormoni naturali (effetto antagonistico);
3. interferendo sulla sintesi, sul trasporto, sul metabolismo e sull'escrezione degli ormoni naturali.

Fino ad oggi, in base alle osservazioni raccolte sull'uomo e negli animali, l'attenzione è stata rivolta soprattutto allo studio di quelle sostanze che possono avere effetti sugli ormoni che regolano lo sviluppo e la riproduzione, vale a dire gli ormoni steroidei (estrogeni e androgeni) prodotti nelle gonadi. Gli ormoni steroidei agiscono, insieme ad altri ormoni, sulla riproduzione, sul comportamento sessuale, sulla differenziazione, sullo sviluppo e sulla maturazione fetale. Recentemente si è osservato che gli IE possono agire anche sulla funzionalità tiroidea, soprattutto per quanto riguarda il suo ruolo nei processi dello sviluppo.

Altri effetti sul sistema immunitario e sul sistema nervoso trovano qualche riscontro ma non è ancora chiaro il meccanismo da cui derivano questi effetti. Punto di partenza sono state le osservazioni in animali selvatici di disfunzioni della tiroide (uccelli e pesci), diminuzione della fertilità (uccelli, pesci, molluschi e mammiferi), fenomeni teratogenetici (uccelli, pesci e tartarughe), anomalie metaboliche (uccelli, pesci e mammiferi), alterazioni comportamentali (uccelli), demascolinizzazione e femminilizzazione (pesci e uccelli) e infine compromissione del sistema immunitario (uccelli e mammiferi) (13, 14).

Mentre sono numerose le osservazioni sugli effetti degli IE negli animali, limitati sono i dati relativi ad effetti avversi sull'uomo, con interessamento del sistema endocrino in occasione di esposizioni intenzionali o accidentali con elevate dosi di alcune sostanze chimiche. L'esempio più noto è quello relativo al dietilstilbestrolo (DES), un estrogeno sintetico somministrato negli anni '50-'60 del XX secolo a milioni di gravide per prevenire l'aborto spontaneo. In alcuni dei nati esposti all'ormone sintetico durante la gravidanza, si sono constatate anomalie di sviluppo e in alcune bambine una forma anomala di cancro alla vagina all'epoca della pubertà. Tale sostanza fu pertanto bandita negli anni '70.

Altre osservazioni sono state raccolte a Seveso, nella popolazione esposta alla diossina immessa nell'ambiente a seguito di un incidente.

Sono state avanzate ipotesi circa la possibilità che gli IE possano essere responsabili di alcuni cambiamenti che sembrano verificarsi nella popolazione negli ultimi decenni. In particolare, i principali fenomeni ai quali gli IE potrebbero aver contribuito sarebbero:

- diminuzione del numero degli spermatozoi nel liquido seminale rilevato negli ultimi 50 anni in alcune zone;
- comparsa di malformazioni congenite;
- aumento di casi di ipospadia e criptorchidismo;
- aumento di tumori associabili ad ormoni (cancro del testicolo, della prostata, della mammella, dell'ovaio);
- ritardato sviluppo sessuale;
- ritardato sviluppo neurocomportamentale.

Esistono tuttavia molte incertezze sulla consistenza di queste ipotesi e pertanto la comunità internazionale scientifica sta cercando di coordinare le ricerche in questo campo onde chiarire i molti punti oscuri e i dubbi sui reali effetti degli IE sulla popolazione.

1.2.2. Modalità di esposizione agli IE

Gli IE hanno in comune alcune caratteristiche come la persistenza nell'ambiente e la possibilità di accumulo nel tessuto adiposo come metaboliti lipofili.

Alcuni di essi vengono immessi nell'ambiente intenzionalmente (pesticidi in agricoltura), per altri la contaminazione ambientale è involontaria, in seguito alla produzione, l'uso o lo smaltimento di rifiuti (percolato delle discariche, fanghi dei liquami). Altri composti (es. diossine) sono presenti come sottoprodotti in diversi processi di combustione e industriali.

La più importante via di esposizione è la via alimentare, soprattutto per i fitoestrogeni, presenti nei legumi, quali la soia e in molti altri vegetali, micoestrogeni e per molti prodotti sintetici lipofili che si accumulano nella catena alimentare. Altre vie di esposizione in generale sono l'acqua, l'aria e il contatto cutaneo.

Le stime compiute, soprattutto sull'esposizione ad IE con effetto estrogenoestrogenico, hanno messo in risalto che il contributo da inquinamento ambientale ipotizzabile, corrisponde a frazioni minime delle dosi a cui vengono somministrati gli anticoncezionali, antiabortivi e chemioterapici. Inoltre, salvo il caso di una somministrazione terapeutica di ormoni, il maggior apporto di IE con effetto estrogenico proviene da estrogeni naturalmente presenti negli alimenti.

La dose assume notevole importanza: livelli elevati di un ormone possono esercitare un'azione inibitrice mentre livelli molto bassi possono essere stimolanti (es. il bisfenolo-A e il DES).

Anche la finestra di esposizione può assumere una grande importanza, in periodi critici come quello precedente e corrispondente alla nascita, l'inizio della pubertà, ecc. con conseguenti effetti reversibili (sulla maturazione) o irreversibili (sulla differenziazione). Ad esempio un periodo critico per lo sviluppo delle gonadi umane maschili sarebbe quello fra la 8^a e la 10^a settimana di gestazione (15).

La dose non è l'unico fattore da prendere in considerazione. Occorre non trascurare molti altri aspetti come l'assorbimento, il metabolismo, l'escrezione, il bioaccumulo, e possibili effetti sinergici dovuti a interazioni di miscele di IE simultaneamente assunti. Così ad esempio i fitoestrogeni, la cui elevata attività nei test *in vitro* è ben nota, hanno un'emivita assai breve.

1.3. Impatto degli IE sull'ambiente

L'esposizione dell'uomo agli IE avviene attraverso diverse vie, la cui principale è rappresentata dagli alimenti. Solo in piccola parte contribuirebbero il consumo di acqua potabile, la respirazione e il contatto. Per approfondire la conoscenza sulla presenza di IE nelle acque destinate al consumo umano, la Commissione europea ha affidato uno studio a due Istituti di ricerca della Germania, il *Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie Angewandte Oekologie* (IME) e l'*Institute for Water Research and Water Technology* (ESWE). L'indagine ha preso in considerazione i seguenti IE: estrogeni sintetici e naturali, alchilfenoli, alchilfenoli etossilati, acido alchilfenossiacetici, bisfenolo A e composti organostannici. Questi composti sono stati ricercati nelle acque grezze e trattate di alcuni acquedotti europei (3).

I risultati della ricerca possono essere così sintetizzati:

- presenza di pesticidi con possibile attività di IE in acque profonde e superficiali usate per il consumo umano anche a concentrazioni superiori a 0,1 µg/L. I pesticidi più frequentemente riscontrati nelle acque naturali e in quelle destinate al consumo umano sono risultati atrazina, simazina, diuron, isoproturon e lindano;
- presenza di tributilstagno (composto organostannico) nelle acque superficiali;
- presenza di bisfenolo A e alchilfenoli nelle acque superficiali e in acque distribuite da acquedotti a livelli di alcuni ng/L, mentre gli alchilfenoli (octil- e nonil- fenoli) risultano presenti solo nelle acque superficiali;
- presenza di estrogeni naturali e sintetici in tracce nelle acque superficiali.

In conclusione lo studio prova che la contaminazione delle acque grezze è possibile ad opera di IE, soprattutto utilizzando acque superficiali. Questi composti possono persistere anche dopo i trattamenti ma i dati a disposizione devono essere approfonditi e confermati vista la problematica, di unificare e standardizzare i metodi di analisi per la loro determinazione.

I trattamenti utilizzati nel settore acquedottistico (quali ozono, carboni attivi, microfiltrazione) risultano efficaci per la rimozione di alcuni IE.

Per quanto riguarda la presenza di Interferenti Endocrini in acque superficiali e acque di depurazione alcuni studiosi hanno ricercato IE come il bisfenolo A e composti alchilici nelle acque del bacino dell'Elba, riscontrandone la presenza anche fino a 100 ng/L. Altri hanno indagato in alcuni bacini tedeschi e negli impianti di depurazione dei liquami domestici con risultati in accordo con quelli prima descritti, che non desterebbero preoccupazioni per l'uomo. Studi analoghi sono stati condotti nelle acque degli impianti di trattamento dei liquami in Giappone e negli USA, dalla *National Ground Water Association* (NGWA) (16). In quest'ultima nazione si sta diffondendo la pratica del riciclo di acque reflue in periodi di particolare siccità impiegando diverse metodologie, quali la filtrazione attraverso terreni porosi, iniezione diretta in acquiferi profondi, con una conseguente contaminazione globale ad opera di composti organici persistenti aventi caratteristiche di IE.

Negli USA il problema degli IE è seguito con attenzione dal 1996 quando una legge (*Food Quality Protection Act*) richiedeva alla USEPA di sviluppare un programma di screening con sistemi di analisi validati per determinare sostanze con effetti IE. La USEPA sta sviluppando un programma in due fasi: la prima per identificare i composti IE e la seconda per stabilire gli effetti di specifici IE e la dose a cui si verificano tali effetti (17).

Va ricordato inoltre che si è acuito l'interesse per la presenza nelle stesse acque di farmaci, sia come principio attivo che come metaboliti o prodotti di trasformazione degli stessi.

Nel 2004 in seguito a mandato del Congresso degli USA la *Food and Drug Administration* (FDA) (4) ha richiesto all'industria farmaceutica di dimostrare che i nuovi prodotti si trovino nell'ambiente a concentrazioni inferiori a 1 µg/L o di venire sottoposti a prove di tossicità e rischio più restrittive.

Altri studi in Germania dimostrerebbero che anche le acque profonde possono contenere farmaci e IE a seguito della pratica di riciclare le acque di rifiuto trattate (contenenti ad esempio acido cloridrico a 11 µg/L) oppure per vicinanza di corsi d'acqua superficiali o di discariche (ad opera del percolato).

Anche in Italia alcuni studiosi hanno indagato su questo aspetto, riscontrando presenza in acque superficiali di concentrazioni minime di alcuni farmaci (Lombardia) (18).

Va sottolineato come anche i farmaci stiano assumendo un'importanza globale per la loro presenza nelle acque e nell'ambiente in generale; anche in questo settore sono necessarie ulteriori ricerche al fine di comprendere meglio l'impatto ecologico di queste sostanze per una migliore selezione delle strategie di abbattimento e di mitigazione delle conseguenze ambientali.

1.4. Attività e normative nazionali e internazionali relative agli IE

La Commissione Europea ha finanziato numerosi progetti a partire dal Quarto Programma Quadro di Ricerca e sviluppo tecnologico (1995-1998) per proseguire nel Quinto (1998-2002) diversificando i temi di ricerca (organi e tessuti diversi dal sistema riproduttivo, sviluppo di sensori per il rilevamento degli IE e nuovi metodi di analisi *in vivo* (animali transgenici) e *in vitro*, sugli effetti protettivi dei fitoestrogeni per il cancro e l'osteoporosi, con particolare attenzione per l'esposizione a basse dosi per lunghi periodi e per esposizioni multiple (15, 19).

Esiste un sito web (http://ec.europa.eu/research/endocrine/index_en.html) dedicato alle ricerche sugli IE ove sono indicati tutti i collegamenti a siti dedicati a questo tema. La Direzione Generale Ricerca della Commissione ha pubblicato un catalogo di tutti i progetti finanziati sul tema degli IE nell'ambito del quarto e quinto programma quadro.

Il Programma per l'energia, ambiente e sviluppo sostenibile ha finanziato sette progetti compresi due appartenenti al CREDO (*Cluster of Research into Endocrine Disruptors in Europe*) (12) con un budget di 16 milioni di euro, e le attività relative agli IE sono incluse (supportate dalle azioni di base "Management sostenibile e qualità dell'acqua", e "Ecosistemi marini sostenibili").

Nel 2001 sono state gettate le basi per un progetto comune, il CREDO che ha iniziato la sua attività nel 2003. Il CREDO interessa 63 laboratori in Europa finanziati con 20 milioni di euro, ed è coordinato dal progetto EDEN, uno dei quattro progetti di ricerca fondamentali del CREDO (gli altri sono COMPRENDO, EURISKED, FIRE). Altri sette progetti (iniziati nel 2002-2003) sono associati al CREDO (Ace, Bonetox, Easyring, Edera, Endomet, Gendisrupt, Mednos, Senspesti).

I quattro progetti di base coprono, sinteticamente, i seguenti temi:

- EDEN (ricerca di nuovi parametri, esposizione, effetti di basse dosi e di miscele nell'uomo, nella fauna acquatica e animali da laboratorio);
- EURISKED (valutazione del rischio complessivo di alcuni IE);
- COMPRENDO (ricerca comparativa sugli IE, approccio filogenetico e principi comuni di composti con effetti Androgeni/Antiandrogeni);
- FIRE (valutazione del rischio da ritardanti della fiamma bromurati, sospettati di essere IE per l'uomo e animali selvatici).

Nel VI programma quadro di ricerca e sviluppo tecnologico (2002-2006) il tema degli IE è specificatamente incluso nella Priorità 5 (Qualità e sicurezza degli alimenti) e nella Priorità 6 (Sviluppo sostenibile, Cambiamenti globali ed ecosistemi).

Nel febbraio 2004 in questo contesto è stata lanciata una vasta Rete di Eccellenza (CASCADE) (20) per ricerca, valutazione del rischio, educazione e informazione riguardante i composti IE nella catena alimentare. I suoi obiettivi sono non soltanto quello di riempire vuoti di conoscenze scientifiche ma anche di aumentare la consapevolezza della popolazione e di promuovere scelte equilibrate fra i consumatori in campo alimentare. La durata del progetto è di cinque anni, comprende 197 membri in 8 Paesi europei e 18 Istituti. Nel 2004 l'attività di valutazione del rischio ha preso in considerazione quattro sostanze modello (vinclozolin, pesticida agente mediante recettore β -estrogenico), bisfenolo A (usato nei plastificanti e agente mediante recettore androgenico), 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (inquinante ambientale attivo mediante il recettore idrocarburi arilici) e genisteina (componente naturale di alimenti agenti tramite il recettore α -estrogenico)

Nel 2003 è stato avviato un piccolo progetto di ricerca focalizzato sugli effetti di miscele di composti neurotossici (PCB, metilmercurio) negli alimenti (DEVNERTO) (21); nella Priorità 6, area della Ricerca Complementare 2003 sono stati avviati programmi di ricerca inerenti metodologie di valutazione del rischio derivante da esposizioni combinate a numerosi agenti dannosi comprese le miscele di prodotti chimici e prodotti farmaceutici inquinanti l'ambiente.

Le azioni a lungo termine comprendono una rivisitazione e un adattamento della legislazione esistente relativa ai test per l'identificazione degli IE e la valutazione e le modalità di impiego dei prodotti chimici della CE.

In particolare, nell'ottobre 2003 la Commissione ha adottato una proposta concernente la registrazione valutazione autorizzazione e restrizione dei prodotti chimici (REACH) creando una Agenzia Europea dei prodotti Chimici e modificando la Direttiva 1999/45/EC (22) e il regolamento sugli inquinanti organici persistenti. Fra le sostanze che richiedono elevata attenzione (PBT: persistenti, bioaccumulanti e tossiche) sono comprese quelle aventi caratteristiche di IE. La Direttiva 2000/60/EC (23), direttiva quadro relativa alla politica comunitaria sulle acque nell'allegato VIII, gruppo 4, comprende "sostanze e miscele o prodotti di degradazione che hanno dimostrato di possedere proprietà cancerogene o mutagene che potrebbero influenzare funzioni endocrine steroidee, tiroidee, della riproduzione o altre, nel o attraverso l'ambiente acquatico". Gli Stati membri dovranno prevenire la esposizione dell'uomo ad IE attraverso l'ambiente idrico allestendo un programma per bacini idrici nel 2009 da rendere operativo nel 2012. Nel frattempo si sta aggiornando la Direttiva 76/464/EEC (24) in funzione della 2000/60.

A livello comunitario la lista di 33 sostanze prioritarie preparata nel 2001 (in base alla Direttiva 2000/60) per le quali si stanno preparando proposte di standard di qualità e controllo delle emissioni, contiene 21 sostanze candidate dell'elenco degli IE.

Come già detto in precedenza la Direttiva 98/83/EC (25) per le acque destinate al consumo umano non prevede valori limite per singoli IE, per insufficienza di dati disponibili. Si sta lavorando sul problema del rilascio di IE da materiali a contatto con l'acqua (contenitori, tubazioni, ecc.) (26).

Altre Direttive interessate al riesame sono la Direttiva 92/59/EC (26) sulla sicurezza generale dei prodotti (modificata con la 2001/95/EC) (25, 27), la Direttiva 91/414/EEC (28) che riguarda la immissione sul mercato di Prodotti per la protezione delle piante, la Direttiva 98/8/EC relativa alla immissione in commercio di prodotti biocidi, la Direttiva 96/22 (27) relativa alla proibizione dell'uso in agricoltura di sostanze con azione ormonale o tireostatica e beta-agonisti.

A tutt'oggi non esiste una normativa nazionale italiana, in tema di acque, specifica per gli IE in quanto tali; alcuni composti o gruppi di composti aventi attività di IE sono regolamentati in base a direttive della CE, come ad esempio gli antiparassitari.

A tale proposito si ricorda che la Direttiva 98/83/CE, recepita in Italia dal DL.vo 31/2001 (29), cita nelle premesse gli IE, "[...] 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”.

Nel 2007 sono stati avviati i lavori di revisione della Direttiva 98/83/CE: dai lavori della Commissione emergerebbe che gli IE saranno controllati mediante l’approccio dei *Water Safety Plans*, aventi come scopo la tutela della salute, basata sul monitoraggio di tali sostanze e sulla valutazione del rischio.

Bibliografia

1. European Commission. *European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of proceedings from a workshop held in Weybridge, UK, 2–4 December 1996*. Brussels: European Commission, DGXII; 1996. (Report reference, EUR 17549)
2. Committee on Hormonally Active Agents in the Environment, National Research Council. *Hormonally active agents in the environment*. Washington, DC: National Academy Press, 1999
3. Wenzel A, Müller J, Ternes T. *Study on endocrine disrupters in drinking water. Final report*. Francoforte: Fraunhofer IME, ESWE; 2003. (ENV. D. 1/ETU/2000/0083).
4. US FDA (2004). *Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations – electronic orange book*. Consultabile sul sito www.fda.gov/cder/ob/default.htm; ultima consultazione 30/09/11.
5. European Commission DG ENV. *Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. Preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. Final report (incorporating corrigenda to final report dated 21 June 2000)*. Delft (The Netherlands): BKH Consulting Engineers; 2000. (M0355008/1786Q/10/11/00)
6. European Commission DG ENV. *Final report: endocrine disrupters: study on gathering information on 435 substances with insufficient data*. Delft (The Netherlands): BKH Consulting Engineers; 2002. (B4-3040/2001/3258.50/MAR/C2).
7. European Commission. *Communication from the Commission to the Council and the European Parliament: community strategy for endocrine disrupter, a range of substances suspected of interfering with hormone systems of humans and wildlife*. Brussels: EC; 1999 (COM(1999) 706 final).
8. European Commission. *Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on the implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupter-a range of substances suspected of interfering with hormone systems of humans and wildlife (COM(1999) 706)*. Brussels: EC; 2001. (COM(2001) 262 final).
9. Commissione europea. Regolamento del parlamento europeo e del consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l’autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un’agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE. *G.U.U.E.* 30 dicembre 2006, n. L 396.
10. European Commission. *Commission staff working document on the implementation of the “Community Strategy for Endocrine Disrupters” - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372)*. Brussels: EC; 2007. (SEC(2007) 1635).
11. Faglia G. *Malattie del sistema endocrino e del metabolismo*. Milano: McGrawHill Libri Italia; 1997.
12. European Commission. *CREDO cluster*. Disponibile al sito: http://ec.europa.eu/research/endocrine/projects_clusters_en.html; ultima consultazione 27/9/2011.

13. Gies A. Workshop 6.3: Government view of endocrine disruption in wildlife. *Pure Appl Chem* 2003;75:2563-74.
14. Hallers-Tjabbes TCC, Kemp JF, Boon JP. Imposed in whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea: relation to shipping traffic intensities. *Mar Pollut Bull* 1994;28:311-3.
15. Commissione europea- SCALE Technical Working Group on Integrated Monitoring „Subgroup Integrated Monitoring of Endocrine Disruptors. Actions and Recommendations for “Integrated monitoring of endocrine disruptors” in the framework of the European Environment and Health Strategy (COM(2003)338 final).
16. United Nations Environment Programme International Labour Organization World Health Organization. Report of the joint IPCS-Japan Workshop. Endocrine disruptors: research needs and future directions. Ginevra: WHO. WHO/IPCS/EDC/01/04.
17. EPA. *Safe Drinking Water Act (SDWA)*. Disponibile all’indirizzo: <http://www.epa.gov/safewater/sdwa/sdwa.html>; ultima consultazione 27/9/2011.
18. Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet* 2000;335:1789-90.
19. European Commission. *Enhanced international collaboration in the field of endocrine disruptors: How to do it in practice?* 26 January 2005, Brussels. Disponibile all’indirizzo: http://ec.europa.eu/research/endocrine/workshop_jan2005_en.html; ultima consultazione 27/9/2011.
20. CASCADE. *Chemicals as contaminant in the food chain. Targeting health risks in food*. Disponibile all’indirizzo: <http://www.cascadenet.org/>; ultima consultazione 27/9/2011.
21. Karolinska Institutet. *Institutet för miljömedicin (IMM)*. Disponibile all’indirizzo: <http://ki.se/IMM>; ultima consultazione 27/9/2011.
22. Commissione Europea. Direttiva del 31 maggio 1999, n. 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all’imballaggio e all’etichettatura dei preparati pericolosi. *G.U.C.E.* 30 luglio 1999, n. L 200.
23. Commissione Europea. Direttiva del 23 ottobre 2000, n. 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio che istituisce un quadro per l’azione comunitaria in materia di acque. *G.U.C.E.* 22 dicembre 2000, n. L 327.
24. Commissione Europea. Direttiva del 4 maggio 1976, n. 76/464/CEE del Consiglio concernente l’inquinamento provocato da certe sostanze pericolose scaricate nell’ambiente idrico della Comunità. *G.U.C.E.* 18 maggio 1976, n. L 129.
25. Commissione Europea. Direttiva del 3 novembre 1998, n. 98/83/CE del Consiglio concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *G.U.C.E.* 5 dicembre 1998, n. L 330.
26. Commissione Europea. Direttiva del 29 giugno 1992, n. 92/59/CEE del Consiglio relativa alla sicurezza generale dei prodotti. *G.U.C.E.* 11 settembre 1992, n. L 228.
27. Commissione Europea. Direttiva del 29 aprile 1996, n. 96/22/CE del Consiglio concernente il divieto d’utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β -agoniste nelle produzioni animali e che abroga le direttive 81/602/CEE, 88/146/CEE e 88/299/CEE. *G.U.C.E.* 23 maggio 1996, n. L 125.
28. Commissione Europea. Direttiva del 15 luglio 1991, n. 91/414/CEE del Consiglio relativa all’immissione in commercio dei prodotti fitosanitari. *G.U.C.E.* 19 agosto 1991, n. L 230.
29. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 52, 3 marzo 2001.

2. PRESENZA DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI NELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

Laura Achene, Paola Pettine

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

2.1. Introduzione

Nel corso dell'ultima decade considerevoli quantità di risorse scientifiche ed economiche sono state impiegate per chiarire i potenziali rischi per la salute umana derivanti dagli Interferenti Endocrini (IE) presenti negli alimenti e nell'acqua destinata al consumo umano. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la Commissione Europea (CE) e la *Environmental Protection Agency* degli Stati Uniti (USEPA) hanno proposto importanti iniziative e vasti programmi di ricerca in questo settore. Negli USA il problema degli IE è stato affrontato fin dal 1996, quando nella legge *Safe Drinking Water Act* (SDWA) erano previste azioni per accertare gli effetti sul sistema endocrino delle sostanze chimiche e degli antiparassitari. All'USEPA era affidato anche il compito di mettere a punto un programma volto ad accertare se gli effetti sull'uomo degli IE fossero paragonabili a quelli degli ormoni naturali (USEPA 2005). Dal canto suo, la Commissione Europea, nell'anno 2000, ha commissionato uno studio a due enti di ricerca tedeschi, il *Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie Angewandte Oekologie* (IME) e l'*Institute for Water Research and Water Technology* (ESWE), allo scopo di fare il punto sulle conoscenze e sulla presenza degli IE nelle acque e sulle possibili conseguenze della esposizione della popolazione europea a tali sostanze. Tale studio si è concluso nel 2003 con la stesura di un rapporto finale comprendente numerosi dati bibliografici, dati forniti dalle Autorità dei Paesi Membri e dai relativi acquedotti raccolti mediante un apposito questionario e i risultati di un monitoraggio in quattro acquedotti campione (1). In tale rapporto gli IE sono stati raggruppati in: estrogeni naturali e sintetici, alchilfenoli e alchilfenoli etossilati, bisfenolo A, composti organo tannici e pesticidi.

Per quanto riguarda l'Italia, anche nel nostro paese vi è un grande interesse per i problemi relativi agli IE. Attualmente l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) con il Reparto di Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria è impegnato in un progetto di ricerca riguardante lo studio degli "Interferenti endocrini nelle acque destinate al consumo umano", promosso e coordinato dalla Fondazione AMGA e dal Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova, con l'obiettivo di approfondire lo stato delle conoscenze sul potenziale impatto degli IE sui sistemi idrici, con particolare riguardo alle acque da destinare e destinate al consumo umano. Sulla base delle informazioni scientifiche emerse dal rapporto europeo del 2003, l'attenzione iniziale è stata focalizzata su alcune classi di composti con attività di IE, quali ormoni naturali e sintetici (17 β -estradiolo, estrone, 17 α -etinilestradiolo), gli alchilfenoli (4-n-nonilfenolo, 4-tert-octilfenolo) e il bisfenolo A. Per il monitoraggio di queste sostanze, sono stati valutati alcuni casi-studio rappresentativi di diverse realtà acquedottistiche italiane, privilegiando le acque di captazione di tipo superficiale, considerate le più vulnerabili alle contaminazioni. Le indagini fino ad ora eseguite indicano che i livelli di IE riscontrati nell'acqua destinata al consumo umano non sono singolarmente significativi per quanto riguarda l'impatto sulla salute umana tuttavia, non deve essere sottovalutato il potenziale rischio per effetti additivi, antagonisti, sinergici conseguenti all'esposizione a miscele di IE.

2.2. Ormoni: estrogeni naturali e sintetici

Le principali fonti degli estrogeni sono gli esseri umani e gli animali. Gli estrogeni sono naturalmente secreti nelle donne come componenti integranti del ciclo mestruale ed escreti principalmente nelle urine (95%) come composti solfato o glucuronide-coniugati (2, 3). Dal menarca alla menopausa l'estrogeno maggiormente prodotto è il 17 β -estradiolo; livelli di 17 β -estradiolo compresi tra 2,5 e 3,5 μ g/die sono escreti da donne in età fertile e in menopausa, mentre donne in gravidanza ne possono secernere oltre 259 μ g al giorno. Dopo la menopausa l'ormone maggiormente prodotto è l'estrone, che possiede un'attività estrogenica inferiore a quella dell'estradiolo (4, 5). A scopo terapeutico vengono somministrati estrogeni sintetici, in particolare il 17 α -etinilestradiolo è il più attivo e frequentemente utilizzato (6). Gli uomini invece rilasciano nelle urine 1,6 μ g al giorno di 17 β -estradiolo.

Le forme coniugate ritornano allo stato libero ad opera di enzimi batterici presenti nell'ambiente; in tal modo i coniugati, aventi debole potere estrogenico, riacquistano la potenza ormonale primitiva (7, 8). Anche negli animali i livelli di ormoni escreti sono più alti nella fase riproduttiva. Basandosi sui dati esistenti e considerando la quantità di escreti prodotti per animale, Lange *et al.* (9) hanno calcolato nell'anno 2000 negli USA e nell'Unione europea, una produzione di estrogeni, di 49 e 33 tonnellate rispettivamente.

Numerosi studi hanno messo in evidenza la possibilità che estrogeni naturali e sintetici, contenuti nelle fognature urbane vadano ad inquinare le acque superficiali attraverso gli effluenti grezzi o trattati (10-12). Le acque superficiali possono essere contaminate non solo dalle acque reflue, ma anche dai percolati delle discariche dei rifiuti solidi e dalle acque di scorrimento di aree agricole o dove sono presenti allevamenti di bestiame. La concentrazione di questi steroidi negli effluenti dipende dall'efficienza di rimozione dei vari processi di trattamento delle acque reflue. Generalmente i livelli di abbattimento sono alti; i carboni attivi possono eliminare fino 77% della concentrazione di estrogeni presenti (13); dopo ossidazione con ozono l'attività estrogenica è ridotta del 99% in campioni di letame preventivamente sottoposti a processi di degradazione anaerobica e aerobica (14).

Dai dati di letteratura (5, 15-18) e dal rapporto europeo del 2003 (1) risulta che nelle acque superficiali l'estrone è il composto più frequentemente rilevato e a concentrazioni maggiori. La concentrazione di estrogeni rivelata nelle acque superficiali destinate al consumo umano in Belgio, Olanda, Germania e Regno Unito era generalmente al di sotto di 5 ng/L (5, 11, 19, 20). L'estrone era rivelato occasionalmente a livelli di 20 ng/L. In un'indagine condotta in Pensilvania (USA) su acque superficiali presenti in aree suburbane, agricole e a tipologia mista, l'estrone era rilevato nel 90% dei casi con concentrazioni che variavano tra 0,8 a 19 ng/L (21). Nel fiume Tevere in Italia sono stati riscontrati livelli di estriolo pari a 0,33 ng/L, a 0,11 ng/L di estradiolo, a 1,5 ng/L di estrone e a 0,04 ng/L di etinilestradiolo ad 1 km dalla foce, a valle di piccoli agglomerati urbani (5). Tabata *et al.* (22) hanno condotto un'indagine estesa sulla presenza di ormoni steroidei in 109 fiumi del Giappone, rilevando la presenza di 17 β -estradiolo in 222 dei 256 campioni esaminati in estate ad una concentrazione media di 2,1 ng/L e in 189 dei 261 campioni prelevati in autunno con una concentrazione media di 1,8 ng/L. Nelle acque del Tamigi l'estrone è stato rilevato a livelli compresi tra 0,2 e 17 ng/L (18) e in 15 corsi d'acqua in Germania (12) le concentrazioni di estrone variavano tra 0,7 e 1,6 ng/L. La ricerca di vari estrogeni nelle acque del fiume Llbregat in Spagna (23) ha evidenziato la presenza di estrone e del suo composto coniugato estrone-3-solfato a livelli massimi di 21,7 ng/L per il primo e di 6 ng/L per il secondo. Uno studio pubblicato nel 2008 sulla qualità delle acque del medesimo fiume indica concentrazioni di estrone-3-solfato, estrone ed estriolo a livelli di pochi ng/L per tutti gli analiti (24).

Per quanto riguarda le acque profonde, gli estrogeni sintetici e naturali vengono adsorbiti su particelle del suolo e biodegradati (25), ciò spiegherebbe la loro assenza in questa tipologia di acque. Infatti, anche dopo lunghi periodi di spargimento di liquami su terreni, le acque profonde della stessa area sono risultate prive di tali sostanze; in caso di rilevamento positivo le concentrazioni sono state sempre inferiori ad 1 ng/L. Shore *et al.* (26) ritenevano che una costante presenza di 17 α -estradiolo a concentrazioni di circa 5 ng/L in acque di sorgente era causata dall'infiltrazione di acque di scarico contaminate nel terreno fino al raggiungimento delle acque profonde. Peterson *et al.* (27) rilevavano livelli di 17 α -estradiolo fino 66 ng/L in falde acquifere ricoperte di rocce carsiche nel nord-est dell'Arkansas. La contaminazione era associata allo spandimento di liquami provenienti da allevamenti sull'area interessata.

Per quanto riguarda l'acqua destinata al consumo umano le informazioni sono piuttosto frammentarie. Uno studio estensivo condotto negli Stati Uniti (28) su acque grezze destinate al consumo umano, acque trattate e acque distribuite al rubinetto ha evidenziato la presenza di 17 β -estradiolo, estrone e 17 α -etinilestradiolo nelle acque in entrata agli impianti di potabilizzazione in concentrazioni medie rispettivamente pari a 17 ng/L, 0,30 ng/L e 1,4 ng/L, e la totale assenza di tali sostanze all'uscita degli impianti dopo il trattamento con ozono e nei campioni prelevati al rubinetto. Dai risultati dello studio europeo (1), in uno solo dei 51 acquedotti intervistati mediante questionario, l'estrone è risultato presente a concentrazione di 1 ng/L nelle acque trattate. Per quanto riguarda i quattro acquedotti scelti come casi studio, estrogeni naturali sono stati trovati solo nelle acque grezze di un acquedotto (concentrazione media 0,38 ng/L per il 17 β -estradiolo e 3,0 ng/L per l'estrone), probabilmente derivanti dal dilavamento di aree adibite a pascolo di bestiame. Tali composti risultavano assenti dopo trattamento di flocculazione, permanenza in un lago per 3 mesi e filtrazione rapida su sabbia.

Kuster *et al.* (24) hanno esaminato campioni di acqua destinata al consumo umano provenienti dal fiume Llobregat in Spagna, sottoposti a diversi sistemi di potabilizzazione. Tutti i campioni sono risultati negativi per la presenza di estrogeni, tranne uno, in cui è stato quantificato estradiolo a concentrazioni di 11,6 ng/L.

Diversi autori hanno pubblicato di recente studi sull'effetto della clorazione su alcuni estrogeni che possono essere presenti in acque da potabilizzare ed hanno valutato la potenziale attività estrogenica dei sottoprodotti clorurati confrontandola con quella dei prodotti di origine. Nakamura *et al.* (29) hanno dimostrato che l'ipoclorito di sodio reagisce facilmente con l'estrone per formare derivati clorurati, la cui attività estrogenica può essere in alcuni casi maggiore di quella del composto precursore; anche l'attività estrogenica dei derivati clorurati del 17 β -estradiolo, dell'estriolo e del 17 β -etinilestradiolo mostra una tendenza simile a quella dell'estrone. Il 17 β -estradiolo reagisce rapidamente con l'acido ipocloroso, formando prodotti clorurati dopo solo dieci minuti di contatto. Test *in vitro* hanno dimostrato che l'attività estrogenica esplicita dalla soluzione clorurata dopo tempi di contatto pari a 10, 30 e 60 minuti è simile o di poco inferiore a quella della soluzione prima della clorazione. Una riduzione del 40% dell'attività estrogenica viene osservata solo dopo 120 e 180 minuti di contatto (30).

Sulla base dei dati disponibili può essere rappresentato uno scenario della possibile assunzione di ormoni steroidei attraverso l'acqua destinata al consumo umano, confrontandola con la produzione endogena umana. Assumendo che il consumo di acqua da parte di un uomo adulto sia di 2 litri al giorno, l'acqua destinata al consumo umano non trattata può fornire fino ad un massimo di 40 ng di estradiolo (o estrogeni equivalenti) al giorno, gli effluenti trattati ne possono fornire una quantità pari alla metà o meno, le acque dei fiumi contribuiscono per 10 ng di estrogeni e l'acqua destinata al consumo umano per 4 ng al giorno o meno. Questi valori confrontati con la secrezione endogena giornaliera di estrogeni (0,05-0,60 $\times 10^3$ μ g/die di estrogeni) appaiono sicuramente trascurabili (31). Ulteriori dati per una conoscenza più approfondita sono tuttavia necessari.

2.3. Bisfenolo A e alchilfenoli

Il bisfenolo A è usato principalmente per la produzione di plastiche e suoi derivati, presenti in commercio da più di 50 anni. È utilizzato nella sintesi del poliestere, dei polisulfonati, dei chetoni polieterei, come antiossidante in alcuni plastificanti e come inibitore della polimerizzazione del PVC. È un monomero chiave nella produzione delle resine epossidiche e nelle più comuni forme di policarbonato. Il policarbonato, materiale pressoché infrangibile, è usato per un gran numero di prodotti per l'infanzia (biberon), bottiglie, attrezzature sportive, dispositivi medici e odontoiatrici, lenti per gli occhiali, supporti ottici, elettrodomestici, caschi di protezione, otturazioni dentarie e ovunque siano necessarie caratteristiche di durezza e resistenza. Le resine epossidiche che contengono bisfenolo A sono, invece, utilizzate come rivestimento interno nella maggior parte delle lattine per alimenti e bevande. Il bisfenolo A è anche un precursore per ritardanti di fiamma, il tetrabromobisfenolo A, ed era anche usato come fungicida (32). Piccole quantità di bisfenolo A entrano nell'ambiente attraverso gli impianti di trattamento delle acque reflue e il compartimento acquatico è stato identificato come quello maggiormente interessato dalla presenza di bisfenolo A (33).

Circa tre milioni di tonnellate di bisfenolo A sono prodotte ogni anno nel mondo. Studi condotti dai CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) hanno rivelato la presenza di bisfenolo A nelle urine del 95% degli adulti sottoposti a campionamento nel periodo 1988-1994 e nel 93% dei bambini e degli adulti analizzati nel periodo 2003-2004 (34). La presenza del bisfenolo A è stata accertata in alcuni fiumi di Austria, Belgio, Svizzera, Germania e Olanda con concentrazioni fino a 776 ng/L (35-37). In Spagna è stato rilevato, in un range di concentrazioni di 65-295 ng/L (23) nelle acque del fiume Llobregat, le quali dopo i trattamenti di potabilizzazione contribuiscono per un terzo all'approvvigionamento idrico della città di Barcellona. È stato rilevato in acque superficiali del Portogallo fino a concentrazioni di 4.000 ng/L (38) e ancora in Spagna nelle acque del fiume Ter e di suoi due affluenti (39), nelle acque fluviali del sud della Germania tra 0,5 e 16 ng/L (11), nelle acque del fiume Detroit in Canada, del lago Pontchartrain e del fiume Mississippi negli USA (40, 41) e nel fiume Tama in Giappone (42).

Per quanto riguarda le acque profonde questo composto può essere ritrovato come risultato del percolamento o di un diffuso inquinamento e trasporto attraverso i sistemi acquiferi superficiali. Concentrazioni inferiori a 7 ng/L sono state rilevate nelle acque profonde del bacino del fiume Llobregat in Spagna (23). Nell'acqua destinata al consumo umano proveniente dai fiumi Reno e Mosa, dopo i trattamenti il bisfenolo A risultava a livelli dell'ordine di pochi ng/L (8-11 ng/L) (17, 43) analoga situazione era riscontrata in Olanda (44). Dallo studio europeo del 2003 (1) risultava che il bisfenolo A fosse presente in due dei 4 acquedotti scelti come casi studio a concentrazioni di 6 ng/L. Sono stati descritti anche casi di presenza nell'acqua potabile a livelli di pochi nanogrammi, probabilmente dovuta a rilascio da tubazioni in materiale plastico (45).

Gli alchilfenoli sono sostanze chimiche non alogenate usate quasi esclusivamente per produrre gli alchilfenoli etossilati (APEO), un gruppo di tensioattivi non ionici. Gli APEO più comunemente impiegati sono i nonilfenoli etossilati (NPEO) e, in misura minore, gli octilfenoli etossilati (OPEO). Una volta rilasciati nell'ambiente, gli alchilfenoli etossilati possono essere nuovamente degradati in alchilfenoli, che sono persistenti, bioaccumulabili e tossici per gli organismi acquatici.

Gli NPEO sono stati utilizzati come agenti tensioattivi non ionici largamente utilizzati nei detersivi delle industrie tessili e conciarie, in attività domestiche, nelle vernici.

Uno studio condotto nello stato di Hesse in Germania, mostrava concentrazioni medie di 4-tert-octilfenolo di 38 ng/L come disperdenti nella formulazione di pesticidi ad uso agricolo e

domestico e come emulsionanti in diversi prodotti per l'igiene e l'uso personale (46, 47). Si riscontra inoltre l'uso dei derivati dei nonilfenoli come antiossidanti in alcuni tipi di plastica (48).

Per quanto riguarda gli OPEO, nonostante siano disponibili un minor numero di dati affidabili, sembra che siano utilizzati in una gamma di applicazioni simile a quella dei nonilfenoli (49).

Sia gli APEO che gli alchilfenoli (in particolare il nonilfenolo e i suoi derivati) sono distribuiti su larga scala nelle acque dolci e marine ed, in particolare nei sedimenti, dove questi composti persistenti tendono ad accumularsi. A causa del loro rilascio in acqua, gli alchilfenoli e gli alchilfenoli etossilati si riscontrano comunemente nei liquami, inclusi quelli usati per concimare i terreni. I rischi ambientali ampiamente riconosciuti degli alchilfenoli/APEO hanno condotto ad alcune limitazioni del loro uso. Va menzionata, in particolare, nel contesto europeo, la Raccomandazione approvata dalla Commissione di Parigi (oggi facente parte della Commissione OSPAR) nel 1992, in cui si richiedeva l'eliminazione graduale di queste sostanze dai detergenti ad uso domestico entro il 1995 e dai detergenti industriali entro l'anno 2000 (50).

Non sempre gli impianti di trattamento sono in grado di abbattere efficacemente alcuni di questi composti chimici, che si ritrovano quindi potenzialmente attivi nei corpi idrici recettori. I trattamenti convenzionali, quali la coagulazione, sedimentazione e filtrazione presentano un'efficienza di rimozione inferiore al 25%, mentre le tecnologie avanzate come l'ozonizzazione, l'assorbimento su carbone attivato granulare (*Granular Activated Carbon*, GAC) e l'irraggiamento UV sono maggiormente efficaci nella rimozione di contaminanti organici in tracce (51).

Il nonilfenolo e i nonilfenolo etossilati sono stati riscontrati in acque superficiali, sotterranee, nei sedimenti, e in acque degli affluenti e degli effluenti degli scarichi fognari. Per le acque superficiali i dati disponibili riguardano principalmente il nonilfenolo e mostrano concentrazioni molto variabili. L'octilfenolo è presente generalmente in concentrazioni inferiori rispetto al nonilfenolo. Uno studio condotto sulla presenza di nonilfenolo e nonilfenolo-etossilati sulle acque di 30 fiumi negli USA ha rilevato concentrazioni inferiori a 0,1 µg/L nel 75% dei campioni esaminati. I livelli più alti riscontrati erano di 1 ppb per il nonilfenolo e di 15 µg/L per il nonilfenolo-etossilato (52). Ahel *et al.* hanno misurato il nonilfenolo nelle acque dei fiumi in Svizzera in concentrazioni tra 1 e 3 µg/L (53). In uno studio sulla presenza di alcuni alchilfenoli nelle acque del fiume Po negli anni 1994-1996, sono state rilevate concentrazioni di nonilfenolo (come somma dei suoi isomeri) comprese tra <0,1 e 158 µg/L. Dopo accordi con le industrie sulla riduzione della produzione, i livelli osservati mostravano un andamento decrescente negli anni con un livello massimo di 8,8 µg/L nel 1996. Questo andamento non era osservato per gli altri alchilfenoli. Erano inoltre riportati livelli di 4-tert-octilfenolo compresi tra <0,1 e 28 µg/L (54). Dalla bibliografia più recente risulta che le concentrazioni di nonilfenolo riscontrate nelle acque dei fiumi in Germania variavano da 0,028-1,22 µg/L (55) e da 8,3 a 22 µg/L (come somma di nonilfenolo, nonilfenolo mono e dietossilati e carbossilasi) nelle acque del fiume Llobregat in Spagna (56) e presentavano delle variazioni stagionali con le più alte concentrazioni riscontrate in estate dovute ad un aumento dell'attività microbica alle alte temperature, che probabilmente portano ad un aumento della degradazione dei nonilfenolo etossilati (53, 57). In un lavoro pubblicato nel 2010 sempre sulle acque del fiume Llobregat le concentrazioni di composti alchilfenolici risultano considerevolmente più basse di quelle pubblicate in precedenza probabilmente, come specificato in precedenza, grazie alla riduzione degli alchilfenoli nei detergenti domestici, in primo momento su base volontaria e ora stabilita per legge (58). Le concentrazioni di nonilfenolo in Ungheria nelle acque del Danubio variavano da 0,008 a 0,428 µg/L e quelle del 4-tert-octilfenolo da <0,0016 a 0,0907 µg/L (59). Bolz *et al.* (60) hanno rilevato concentrazioni di 4-tert-octilfenolo fino a 163 ng/L, con valori medi di 31,4

ng/L nel Korsh, un piccolo torrente nel sud della Germania e nel fiume Elba e nel Reno, rispettivamente concentrazioni rispettivamente fino a 3,3 ng/L e 130 ng/L (61, 62). Nei fiumi austriaci le concentrazioni di 4-tert-octilfenolo variavano da <5 a 88 ng/L (63). Gli effluenti provenienti dagli impianti di trattamento dei reflui sono considerati la fonte principale della presenza di 4-tert-octilfenolo nei fiumi e una recente indagine sugli effluenti degli impianti di trattamento riporta concentrazioni fino ad un massimo di 392 ng/L, valori perfettamente confrontabili con quelli riscontrati nelle acque dei fiumi (64).

Pochi sono i dati relativi alle acque profonde. La presenza di nonilfenolo nelle falde acquifere è strettamente correlata alle attività antropiche, come lo sversamento degli effluenti dagli impianti di trattamento degli scarichi con concentrazioni medie di 790 ng/L (65); in prossimità di fiumi contaminati 0,1-0,8 mg/L (66,67), fosse settiche 1,2 g/L (68), ma può essere anche dovuta ad attività agricole 0,16-0,38 µg/L (69), liquidi di drenaggio dei terreni e scarichi industriali <280 ng/L (70). La rimozione dei contaminanti nelle acque profonde è generalmente molto lenta dal momento che le caratteristiche chimiche e biologiche di tali acque non sono favorevoli ad una efficace degradazione (71). La biodegradazione è uno stadio critico per regolare il passaggio del nonilfenolo nelle acque profonde, in quanto la presenza di nutrienti e microorganismi costituiscono una efficace barriera all'entrata dei contaminanti nelle falde acquifere (66, 70). Uno studio condotto su due falde acquifere che ricevevano acque da fiumi contaminati rilevava che la presenza di nonilfenolo era inversamente proporzionale alla temperatura (66), con le più alte concentrazioni registrate durante l'inverno. La presenza di ossigeno era considerata un fattore critico per la permeazione del nonilfenolo nelle falde acquifere (72). In condizioni di anossia il nonilfenolo non veniva degradato mentre i composti etossilati e carbossilati davano origine ad ulteriore nonilfenolo.

Per quanto riguarda l'acqua destinata al consumo umano, i dati ottenuti dallo studio Europeo del 2003 (1) riportano la presenza di nonilfenolo nel range da 20 a 60 ng/L e octilfenolo da 1,2 a 4 ng/L nelle acque grezze di 3 dei quattro acquedotti scelti come casi studio; nelle acque trattate, invece, non sono mai stati rilevati. Le concentrazioni di nonilfenolo nelle acque trattate destinate al consumo umano variavano dagli 85 ng/L in Spagna (56) ai 15 ng/L in Germania (11). Queste concentrazioni evidenziano il fatto che l'acqua destinata al consumo umano non rappresenta una fonte significativa di nonilfenolo per l'uomo se confrontate con altre vie di esposizione come i materiali per il confezionamento degli alimenti (48), i detergenti per uso domestico e vari prodotti per l'igiene personale, nei quali le concentrazioni di nonilfenolo sono di gran lunga superiori a quelle rilevate nell'acqua destinata al consumo umano (73).

Anche nel caso del bisfenolo A e degli alchilfenoli la clorazione produce dei sottoprodotti con attività estrogenica da valutare. Yamamoto e Yasuhara (74) hanno dimostrato che i derivati clorurati del bisfenolo A sono ancora presenti dopo 60 minuti quando il bisfenolo A reagisce con alte concentrazioni di cloro. Questi derivati sono più difficilmente biodegradati rispetto al bisfenolo A e sono ritrovati all'uscita degli impianti di depurazione (75). Aizawa *et al.* (76) e Kuruto-Niwa *et al.* (77), riportano che i sottoprodotti della clorazione del bisfenolo A possedevano un'attività estrogenica maggiore del composto di origine a concentrazioni più basse, mentre Takemura *et al.* (78) riscontravano che l'attività estrogenica del bisfenolo A e di alcuni suoi sottoprodotti clorurati fosse sovrapponibile; nel caso del 4-nonilfenolo Ying Hu *et al.* hanno evidenziato la formazione di numerosi sottoprodotti clorurati con attività antiestrogenica (79).

2.4. Considerazioni conclusive

La qualità dell'acqua è uno dei fattori determinanti per la salute pubblica ed è complementare ai progressi economici e allo sviluppo sostenibile di un Paese.

Il problema degli IE coinvolge i paesi di tutto il mondo e interessa in primo luogo le acque superficiali e poi le acque potabili. Le acque superficiali sono facilmente contaminate dalle acque reflue, dai percolati delle discariche dei rifiuti solidi e dalle acque di scorrimento di aree agricole o adibite ad allevamenti di bestiame che possono contenere diversi inquinanti tra cui appunto gli IE. Dal momento che dalle acque superficiali vengono attinte le acque destinate al consumo umano, è necessaria una loro rimozione durante il processo di potabilizzazione. È fondamentale quindi, conoscere lo stato della presenza degli IE nelle acque grezze (all'ingresso dell'impianto di potabilizzazione) e successivamente in quelle trattate (dopo potabilizzazione) e distribuite in rete, valutando in tal modo l'efficacia degli impianti di potabilizzazione utilizzati dai gestori per una eventuale rimozione degli IE. Questi composti possono persistere anche dopo i trattamenti ma i dati a disposizione devono essere approfonditi e confermati, vista anche la problematica di unificare e standardizzare i metodi di analisi per la loro determinazione. Generalmente l'efficienza di rimozione è alta, superiore al 75%, tuttavia anche a basse concentrazioni di questi composti possono essere molto potenti; basti pensare che una concentrazione inferiore ad 1 ng/L di 17 α -etinilestradiolo può indurre la produzione di vitellogenina (proteina generalmente presente nel tuorlo dell'uovo delle femmine adulte) in pesci di sesso maschile di specie differenti (79, 80- 82).

I trattamenti utilizzati nel settore acquedottistico (quali ozono, carboni attivi, microfiltrazione) risultano generalmente efficaci per la rimozione di alcuni IE.

L'ozonizzazione, la filtrazione su carbone attivo granulare e l'osmosi inversa sono sistemi estremamente efficaci, la coagulazione, la filtrazione e la clorazione lo sono in misura minore. Inoltre va considerato che sostanze con caratteristiche di IE possono venir cedute per contatto all'acqua dai materiali stessi dell'impianto. bisfenolo A, alchilfenoli, ftalati e IPA possono essere rilasciati nell'acqua potabile quando vengono usati tubi di plastica per le condutture.

I dati, in certa misura frammentari, attualmente presenti in letteratura, anche raccolti nel documento redatto da Fondazione AMGA di Genova e il Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova (83), indicano livelli trascurabili di IE nell'acqua destinata al consumo umano. Per quanto riguarda il rischio per la salute umana, le conoscenze disponibili non sono sufficienti per una correlazione con i livelli presenti nell'acqua destinata al consumo umano.

Ulteriori dati tossicologici e dati di monitoraggio più approfonditi sono indispensabili per valutare l'importanza degli IE nell'acqua potabile. In ogni caso il contributo dell'acqua al rischio per l'uomo sembra trascurabile.

Bibliografia

1. Wenzel A, Müller J, Ternes T. *Study on endocrine disrupters in drinking water. Final report*. Francoforte: Fraunhofer IME, ESWE; 2003. (ENV. D. 1/ETU/2000/0083).
2. Fotsis TJ. Steroid. *Biochem* 1987;28: 215-26.
3. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock MJ. Identification of estrogenic chemicals in stw effluents. *Environ Sci Technol* 1998;32:1549-58.
4. Johnson AC Belfroid A, Di Corcia A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Tot Environ* 2000;256:163-73.
5. Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ Sci Technol* 2000;34,24:5060-66.

6. Arcand-Hoy LD, Nimrod AC, Benson WH. Endocrine modulating substances in the environment: Estrogenic effects of pharmaceutical products. *Int J Toxicol* 1998; 17:139-58.
7. D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ* 2003;302:199-209.
8. Muller M, Rabenoelina F, Balaguer P, Patureau D, Lemenach K, Budzinski H, Barcelo D, De Alda ML, Kuster M, Delgenes JP, Hernandez-Raquet G. Chemical and biological analysis of endocrinedisrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environ Toxicol Chem* 2008;27:1649-58.
9. Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D, Meyer HHD. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal Chim Acta* 2002;473:27-37.
10. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ Sci Technol* 1998;32:1549-58.
11. Kuch HM, Ballschmitter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* 2001;35:3201-6.
12. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 1999;225:81-90.
13. Suzuki Y, Kubota A, Furukawa T, Sugamoto K, Asano Y, Takahashi H, Sekito T, Dote Y, Sugimoto Y. Residual of 17 β -estradiol in digestion liquid generated from a biogas plant using livestock waste. *J Hazard Mat* 2009; 165:677–82
14. Ermawati R, Morimura S, Tang YQ, Liu K, Kida K. Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation. *J Biosc Bioeng* 2007;103:27-31.
15. Pryor JL, Hughes C, Foster W, Hales BF, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):491-503.
16. Oikawa S, Matsumoto M. Workshop 6.7. Relevant activities for risk management of endocrine disruptors in Japanese government agencies. *Pure Appl Chem* 2003;75:2609-11.
17. Heemken OP, Reincke H, Stachel B, Theobald N. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 2001;45(3):245-59.
18. Xiao XY, McCalley DV, McEvoy J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *J. Chrom. A*. 2001;923:195-204.
19. Adler P, Steger-Hartmann Th, Kalbfuß W. Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogener Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 2001;29:227-41.
20. Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schafer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ* 1999;225:101-8.
21. Velicu M, Suri R. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environ Moni Assess* 2009;154:349-59

22. Tabata A, Kashiwada, S Ohnishi, Ishikawa H, Miyamoto N, Itoh M, Magara Y. Estrogenic influences of estradiol-17 β , p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci Technol* 2001;43:109-16.
23. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barcelò D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1045:85-92.
24. Kuster M, Lopez de Alda MJ, Hernando MD, Petrovic M, Martin-Alonso J, Barcelò D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J Hydrol* 2008;358:112-23.
25. Colucci, MS, Bork H, Topp E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β -estradiol and estrone. *J Environ Qual* 2001;30:2070-6.
26. Shore LS, Correll DL, Chakraborty PK. Relationship of fertilization with chicken manure and concentrations of estrogens in small streams. In: Steele KF (Ed.) *Animal waste and the land-water interface*. Boca Raton, FL: Lewis Publ.; 1995. p. 155-62.
27. Peterson EW, Davis RK, Orndorff HA. 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. *J Environ Qual* 2000;29:826-34.
28. Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol* 2009;43:597-603.
29. Nakamura H, Shiozawa T, Terao Y, Shiraishi, F, Fukazawa, H. By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *J Health Sci* 2006;52:124-31.
30. Hu JY, Cheng SJ, Aizawa T, Terao Y, Kunikane S. Products of aqueous chlorination of 17 beta-estradiol and their estrogenic activities. *Environ Sci Technol* 2003;37:5665-70.
31. Kuster M, Lopez de Alda MJ, Rodriguez-Mozaz S, Barcelò D. Analysis of steroid estrogens in the environment. In: Petrovic M, Barceló D (Ed.). *Comprehensive analytical chemistry. analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*. Berlin: Elsevier; 2007. p. 219-64.
32. Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364(1526):2097-113.
33. Cousins IT, Staples CA, Klecka GM, Mackay D. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human Ecol Risk Assess* 2002;8 (5):1107-35.
34. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008;116(1):39-44.
35. Heemken OP, Reincke H, Stachel B, Theobald N. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 2001;45(3):245-59.
36. Hohenblum P, Gans O, Moche W, Scharf S, Lorbeer G. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Sci Total Environ* 2004;333:185-93.
37. Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Poll* 2009;157:561-8.
38. Azevedo DA, Lacorte S, Viana P, Barcelò D. Analysis of priority pesticides and phenols in Portuguese river water by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2001;53:113-8.
39. Cespedes R, Lacorte S, Raldua D, Ginebreda A, Barcelò D. Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Anal Bioanal Chem* 2006;385:992-1000.

40. Boyd GR, Palmieri JM, Zhang S, Mitra S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Science Total Environ* 2003;311:135-49.
41. Barnes KK, Kolpin DW, Meyer MT, Thurman EM, Furlong ET, Zaugg SD, Barber LB. *Water-quality data for pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000*. Iowa City: U.S. Geological Survey; 2002. (IA. Report 02-94). Disponibile all'indirizzo: <http://toxics.usgs.gov/pubs/OFR-02-94/>; ultima consultazione 30/9/11.
42. Takahashi A, Higashitani T, Yakou Y, Saitou M, Tamamoto H, Tanaka H. Evaluating bioaccumulation of suspected endocrine disruptors into periphytons and benthos in the Tama River. *Water Sci Technol* 2003;47(9):71-6.
43. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Muller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 2002;36(6):1429-38.
44. Belfroid A, van Velzen M, van der Horst B, Vethaak D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* 2002;49:97-103.
45. Casajuana N, Lacorte S. Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia* 2003;9/10:50-7.
46. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Brine DR, Fail PA, Seely JC, Van Miller JP. Two-generation reproduction study with para-tertoctylphenol in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;30(2 Pt 1):81-95.
47. Naylor CG. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Tex Chem Color* 1995;27:29-33.
48. Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol* 2002;36(8):1676-80.
49. OSPAR Commission. *Nonylphenol/nonylphenolethoxylates*. London: OSPAR Commission; 2001.
50. OSPAR Commission. *Overview assessment: Implementation of PARCOM Recommendation 92/8 on Nonylphenol/Nonylphenol-Ethoxylates (NP/NPE)*. London: OSPAR Commission, 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ospar.org/documents/dbase/decrecs/implementation/pr92-8.doc>; ultima consultazione 4/10/11.
51. Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int* 2008;34(7):1033-49.
52. Naylor CG, Mieure JP, Adams WJ, Weeks JA, Castaldi FJ, Ogle LD, Romano RR. Alkylphenol ethoxylates in the environment. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1992;69(7):605-703.
53. Ahel M, Giger W, Schaffner C. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res* 1994;28:1143-52.
54. Davi ML, Gnudi F. Phenolic compounds in surfacewater. *Water Res* 1999;33:3213-9.
55. Fries E, Puttmann W. Occurrence and behaviour of 4-nonylphenol in river water of Germany. *J Environ Monit* 2003;5:598-603.
56. Petrovic M, Diaz A, Ventura F, Barceló D. Occurrence and removal of estrogenic short-chain ethoxy nonylphenolic compounds and their halogenated derivatives during drinking water production. *Environ Sci Technol* 2003;37(19):4442-8.
57. Li D, Kim M, Shim WJ, Yim UH, Oh J-R, Kwon Y-J. Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. *Chemosphere* 2004;56:1-6.
58. Brix R, Postigo C, González S, Villagrasa M., Navarro A., Kuster M., Lopez de Alda M. J, Barceló D. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:1301-9.

59. Nagy P, Fekete J, and Sharma VK. Octylphenol and Nonylphenol in Surface Water of Ráckevei-Soroksári Danube Branch, Hungary. *J Environ Sci Health* 2005;40:1679-88.
60. Bolz U, Hagenmaier H, Körner W. Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, southwest Germany. *Environmental Pollution* 2001;115:291-302.
61. Stachel B, Ehrhorn U, Heemken OP, Lepom P, Reincke H, Sawal G, Theobald N. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* 2003;124:497-508.
62. Quednow K, Püttmann W. Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environmental Pollution* 2008;152:476-83.
63. Scheffknecht C. *Fließgewässer in Vorarlberg. Hormonell wirksame Stoffe*. Bregenz: Umweltinstitut des Landes Vorarlberg, 2005. (UI-08/2005).
64. Hohne C, Puttmann W. Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens Bisphenol A, 4-tert-octylphenol and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants, *Environ Sci Pollut Res* 2008;15:405-16.
65. Barber LB, Thurman EM, Schroeder MP, Leblanc DR. Long-term fate of organic micropollutants in sewage-contaminated groundwater. *Environ Sci Technol* 1988;22:205-11.
66. Ahel M, Schaffner C, Giger W. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 3. Occurrence and elimination of their persistent metabolites during infiltration of river water to groundwater. *Water Res* 1996; 30:37-46.
67. Zoller U, Ashash E, Ayali G, Shafir S, Azmon B. Nonionic detergents as tracers of ground-water pollution caused by municipal sewage. *Environ Int* 1990; 16:301-6.
68. Rudel RA, Melly SJ, Geno PW, Sun G, Brody JG. Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ Sci Technol* 1998; 32:861-9.
69. Latorre A, Lacorte S, Barceló D. Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol a in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas. *Chromatographia* 2003; 57:111-6.
70. Ahel M. Infiltration of organic pollutants into groundwater: field studies in the alluvial aquifer of the Sava River. *Bull Environ Contam Toxicol* 1991;47:586-93.
71. Langwaldt JH, Puhakka JA. On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environ Pollut* 2000; 107:187-97.
72. Montgomery-Brown J, Drewes JE, Fox P, Reinhard M. Behavior of alkylphenol polyethoxylate metabolites during soil aquifer treatment. *Water Res* 2003; 37:3672-81.
73. CEPA (Canadian Environmental Protection Act). *Nonylphenol and its ethoxylates*. Quebec: CEPA; 2000.
74. Yamamoto T, Yasuhara A. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 2002;46:1215-23.
75. Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y. Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 2001;7:973-79.
76. Hu JY, Aizawa T, Ookubo S. Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 2002;36:1980-7.
77. Kuruto-Niwa R, Terao Y, Nozawa R. Identification of estrogenic activity of chlorinated bisphenol A using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol* 2002;12:27-35.
78. Takemura H, Mab J, Sayama K, Terao Y, Ting Zhu B, Shimo K. *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology* 2005;207:215-21

79. Hu JY, Xie GH, Aizawa T. Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. *Environ Toxicol Chem* 2002; 21(10):2034-9.
80. Schultz IR, Orner G, Merdink JL, Skillman A. Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17alpha-ethynylestradiol. *Aquat Toxicol* 2001;51(3):305-18.
81. Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Tox Chem* 2001;20(6):1216-27.
82. Andersen L, Holbech H, Gessbo A, Norrgren L, Petersen GI. Effects of exposure to 17alpha-ethynylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; 134(3):365-74
83. Fondazione AMGA, Dipartimento di Scienze della Salute Università di Genova. *Stato dell'arte sulla presenza nelle acque destinate al consumo umano di sostanze denominate "Endocrine Disruptors"*. Genova: Utilitatis; 2006.

3. DETERMINAZIONE DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ACQUE GREZZE E TRATTATE DA DESTINARE A CONSUMO UMANO: UNA METODOLOGIA DI ANALISI

Sara Bogialli (a), Federica Nigro Di Gregorio (b, c), Valentina Fuscoletti (c), Giorgia Di Pofi (d)

(a) *Dipartimento di Scienze chimiche, Università di Padova, Padova*

(b) *Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università "Sapienza" di Roma, Roma*

(c) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) *Dipartimento di Chimica, Università di Tor Vergata, Roma*

3.1. Scopo

Il metodo proposto è stato sviluppato presso il Reparto di Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria (DAMPP) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), incaricato della messa a punto di una metodica analitica avanzata per la ricerca e la quantificazione di bisfenolo A, octilfenolo, nonilfenolo, 17 α -etinilestradiolo, 17 β -estradiolo ed estrone nell'ambito di un progetto di ricerca riguardante lo studio degli "Interferenti endocrini e le acque destinate al consumo umano", promosso e coordinato dalla Fondazione AMGA di Genova e dal Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova.

Lo studio ha l'obiettivo di approfondire lo stato delle conoscenze sul potenziale impatto degli Interferenti Endocrini (IE) sui sistemi idrici con particolare riguardo alle acque da destinare al consumo umano, con il coinvolgimento di alcuni istituti di ricerca (ISS, Fondazione Mario Negri, *Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie Angewandte Oekologie*) e acquedotti italiani selezionati (Acquedotto Pugliese SpA di Bari, Publiacqua SpA di Firenze, Mediterranea delle Acque SpA di Genova, ACSM AGAM Reti Gas Acqua srl Como, SMAT SpA di Torino e HERA SpA di Bologna).

Gli obiettivi specifici dello studio sono i seguenti:

- a) verificare la specificità del metodo e la presenza di eventuali contaminazioni su campioni di differente origine;
- b) verificare l'applicabilità della procedura anche ai livelli di minima sensibilità del metodo;
- c) valutare l'affidabilità del metodo analitico sviluppato tramite validazione inter-laboratorio delle prestazioni della procedura di preparazione del campione;
- d) verificare la possibilità di applicare, da parte dei laboratori di acquedotti, il protocollo analitico sviluppato alla valutazione dei contenuti di IE in acque grezze e sottoposte a trattamenti di potabilizzazione.

Le prove, per il raggiungimento di tali obiettivi, hanno previsto l'esecuzione di una procedura estrattiva standardizzata (*vedi* Appendice A) da parte dei laboratori degli acquedotti coinvolti nello studio, la determinazione strumentale degli analiti negli estratti mediante un metodo validato basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC/MS/MS) e la valutazione dei dati da parte dell'ISS.

3.2. Campo di applicazione

Il metodo si applica alle acque da destinare e destinate al consumo umano secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti.

Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,24-5,0 ng/L.

La procedura è applicabile all'analisi di composti appartenenti alla classe degli estrogeni (17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo) alchilfenoli (4-octilfenolo, nonilfenolo) e bisfenolo A.

Gli analiti di interesse sono stati determinati mediante cromatografia liquida a fase inversa accoppiata alla spettrometria di massa tandem.

3.3. Principio del metodo

Con il metodo descritto il campione di prova, del volume di 1 L, è sottoposto ad estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE), utilizzando come materiale adsorbente un copolimero divinilbenzene/N-vinilpirrolidone per la preconcentrazione degli analiti (rapporto di concentrazione 2000:1).

Gli analiti estratti sono successivamente separati, rivelati e quantificati mediante LC/MS tandem impiegando come sistema di rivelazione uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, equipaggiato con una interfaccia elettrospray a pressione atmosferica. La misura si basa sull'intensità dei segnali ionici relativi a due transizioni ione pseudo-molecolare > ione frammento degli analiti.

Come standard di processo viene utilizzato il β -estradiolo d₃ (β -estradiolo trideuterato), monitorando in questo caso una transizione ione pseudo-molecolare > ione frammento.

3.4. Interferenze e cause di errore

In letteratura è ormai noto come il materiale utilizzato, come la vetreria e i solventi, può essere fonte di contaminazione non sistematica nell'analisi di composti ubiquitari, soprattutto per bisfenolo A e alchilfenoli (1). Questi analiti possono essere rilasciati dai materiali plastici utilizzati per le cartucce SPE, dalla vetreria e dai solventi, dall'acqua deionizzata (2) e possono essere presenti nello stesso ambiente di laboratorio.

La contaminazione della vetreria riguarda soprattutto il nonilfenolo ed è ascrivibile in gran parte all'uso di detergenti che contengono alchilfenoli come impurezze/prodotto di degradazione.

Da quanto riportato, emerge che materiali in plastica non dovrebbero essere utilizzati durante l'estrazione e la preparazione del campione. Allo stesso modo, particolare attenzione richiede la vetreria da utilizzare che va trattata con misto cromatico evitando l'uso di detergenti, in particolare quelli contenenti alchilfenolo etossilato.

3.5. Laboratori partecipanti

Alcuni laboratori di aziende acquedottistiche sono stati coinvolti in un piano di monitoraggio con l'obiettivo di valutare l'effettiva presenza degli IE nelle acque da destinare al consumo.

umano e l'efficacia dei processi di rimozione attuati nei potabilizzatori. I singoli laboratori inoltre, hanno partecipato ad un *collaborative trial* volto ad accertare le prestazioni del metodo estrattivo sia in fase di ottimizzazione che di validazione finale del metodo.

I laboratori coinvolti nel *collaborative trial* sono:

- ISS-DAMPP, Reparto Igiene delle Acque Interne, Roma
- Acquedotto Pugliese SpA, Bari
- HERA SpA, Bologna
- ACSM AGAM Reti Gas Acqua srl, Como
- Publiacqua SpA, Firenze
- Laboratori IREN ACQUA GAS SpA, Genova
- SMAT SpA, Torino

Per motivi di riservatezza, nel corso del *collaborative trial* ad ogni acquedotto è stata assegnata una sigla dall'Ente coordinatore (Fondazione AMGA), che è stata poi mantenuta nella fase di monitoraggio.

3.6. Campionamento

I campioni sono stati prelevati mediante campionamento istantaneo, cioè un campione singolo prelevato in un'unica soluzione in un punto determinato e in un tempo molto breve. Tale campionamento tradizionale, basato sul prelievo puntuale del campione (spot sampling), indica la situazione istantanea del livello di contaminanti presenti nel momento specifico del campionamento. Per avere una visione più generale, un'alternativa è rappresentata dall'impiego di campionatori passivi POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Samplers*); il campionamento passivo è una tecnica molto nota nel monitoraggio atmosferico, che lentamente sta diffondendosi anche per lo studio di matrici acquose. Si basa sul flusso spontaneo di un analita dal mezzo campionato alla fase ricevente del campionatore; tale flusso è generato dalla differenza del potenziale chimico dell'analita nei due mezzi. L'impiego di tale tecnica è riportata in Appendice C.

3.6.1. Bianco campione

Come bianco campione si intende un campione di natura identica a quella del campione correntemente oggetto di analisi – nella fattispecie acqua destinata a consumo umano – ma virtualmente privo degli analiti. Vista la problematica relativa alla diffusione ubiquitaria e persistente degli analiti oggetto di analisi, la scelta di un adeguato bianco campione risulta critica ai fini della selettività, dell'accuratezza dell'analisi e della capacità di rivelazione.

Studi preliminari condotti presso l'ISS-DAMPP, hanno evidenziato che campioni di acqua oligominerale mostrano un livello di contaminazione naturale relativamente basso, ad eccezione di presenza sporadica e non sistematica di nonilfenolo e bisfenoloA.

I campioni di acqua oligominerale possono essere utilizzati come bianco campione e non richiedono pretrattamenti.

I bianchi campione possono essere utilizzati per:

- verifica della specificità del metodo;
- controlli di qualità;
- preparazione di campioni contaminati artificialmente
- costruzione della retta di calibrazione.

3.6.2. Raccolta dei campioni di prova

Seguire quanto indicato in ISS.PGA.901.rev00.

Il prelievo per l'analisi degli IE deve essere eseguito utilizzando contenitori in vetro (altamente raccomandato), in polietilene (PE) o FEP (*Fluorinated Ethylene Propylene*) -Teflon, prelevando come quantità minima 1L di acqua, preferibilmente 2L. Il campione di acqua viene suddiviso in due aliquote da 1 L ciascuna, utilizzando recipienti idonei all'estrazione SPE in vetro, in PE o in Teflon per alimenti. In alternativa al prelievo dei 2 L e successiva ripartizione in 2 aliquote da 1 L, possono essere effettuati i prelievi di 2 campioni da 1 L in rapida successione.

3.6.3. Conservazione dei campioni

Seguire quanto indicato in ISS.PGA.901.rev00.

I campioni devono essere conservati ad una temperatura di 1-10°C e risultano stabili per almeno 15 giorni.

3.7. Materiali di prova: natura dei materiali, distribuzione, omogeneità, stabilità

3.7.1. Reagenti

Utilizzare reagenti di grado HPLC o superiore. L'elenco dettagliato dei reagenti è riportato in Appendice A.

3.7.2. Materiali di riferimento

Gli standard degli analiti (17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo e nonilfenolo) e lo standard di processo (β -estradiolo d₃) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

3.7.3. Soluzioni primarie

Le soluzioni standard primarie individuali (standard stock solution) di tutti gli analiti sono state preparate trasferendo quantitativamente 50 mg di materiale standard in un matraccio tarato da 50 mL, portando a volume con metanolo, ottenendo una soluzione alla concentrazione di 1 g/L.

Le soluzioni sono conservate a 5 $\pm$ 3°C per minimizzare la degradazione degli analiti. Conservate in questo modo esse risultano stabili per almeno 3 mesi. Da queste, per successive diluizioni con metanolo, sono preparate soluzioni di lavoro a concentrazioni opportune (*working standard solution* o soluzione secondarie), così come riportato in Appendice A.

3.7.4. Vetreria, materiali e attrezzatura di base

Molti degli analiti, oggetto di determinazione, presentano diffusione ubiquitaria. Principali sorgenti di contaminazione e interferenze sono costituite da solventi, reagenti, materiali plastici utilizzati direttamente o indirettamente a contatto con il campione. È stata in particolare

evidenziata contaminazione da alchilfenoli, principalmente nonilfenolo, ascrivibile ai materiali utilizzati per le fasi di preparazione dei campioni (es. flaconi, contenitori, provette, cartucce, tubazioni e altro).

Allo scopo di eliminare o ridurre l'entità di possibili contaminazioni dovute all'uso di materiali plastici, si raccomanda pertanto di utilizzare preferibilmente materiali inerti, sostituendo i materiali plastici con materiali in polietilene (PE), Teflon o, eventualmente, con vetro trattato preventivamente con misto cromatico.

In particolare, si raccomanda l'uso di cartucce per estrazione in vetro e di microsiringhe in vetro in luogo di quelle in materiale plastico.

Tutti i materiali, prima del loro uso, devono essere accuratamente lavati e risciacquati in successione con acqua di rubinetto, acetone e metanolo.

La descrizione dettagliata è riportata in Appendice A.

3.7.5. Distribuzione dei materiali

Ad ogni laboratorio di prova partecipante al *collaborative trial* è stato inviato tutto il materiale occorrente e i *vial* contenenti le miscele di standard di processo e/o di analiti da trasferire quantitativamente nei campioni di acqua unitamente ad un allegato tecnico (vedi Appendice B) contenente le istruzioni operative dettagliate per eseguire il campionamento e l'estrazione dei campioni. Una volta eseguita la procedura estrattiva, gli estratti sono stati inviati all'ISS dove sono stati determinati.

3.8. Stabilizzazione dei campioni di acque destinate al consumo umano sottoposte a trattamenti di potabilizzazione

Nelle acque destinate al consumo umano e sottoposte a trattamenti di potabilizzazione possono essere presenti ossidanti residui come cloro, cloroammine e ozono in grado di reagire con gli analiti e lo standard di processo durante la conservazione dei campioni.

Ai fini analitici, l'accuratezza dei dati relativi allo standard di processo è un processo critico per la qualità del dato. È risultato fondamentale, quindi, ottimizzare la fase di pretrattamento dei campioni di acqua sottoposti a trattamento di potabilizzazione cercando un agente stabilizzante in grado di proteggere dall'ossidazione lo standard di processo.

In seguito a prove sperimentali condotte presso l'ISS, l'aggiunta di tiosolfato come antiossidante in concentrazione pari a 18 mg/L sui campioni acidificati a pH 3 (vedi Appendice A) è risultata essere efficace nella protezione dello standard di processo.

Nel corso dei successivi monitoraggi, le condizioni sperimentali individuate per garantire l'estrazione dello standard di processo in campioni di acqua sottoposta a trattamento di potabilizzazione, si sono dimostrate efficaci. I valori riscontrati di standard interno β -estradiolo d_3 , riportati in Tabella 1, sono infatti risultati aderenti a quelli attesi con una buona riproducibilità.

Una minore accuratezza è stata riscontrata per le estrazioni dei campioni reali di acque grezze destinate al consumo umano, dovuta presumibilmente ad "effetti matrice" di entità variabile.

Tabella 1. Accuratezza relativa allo standard interno β -estradiolo d_3 nei campioni, fortificati e reali estratti dai laboratori di prova, identificati con una sigla da un ente coordinatore (i dati sono riportati come percentuale rispetto al valore atteso e deviazione standard relativa dei campioni estratti in duplicata; livello di contaminazione, 50 ng/L)

Laboratorio di prova	$\bar{x}$ (%) $\pm$ RSD		
	H ^a	U ^b	E ^c
Z	100 $\pm$ 9	183 $\pm$ 1	54 $\pm$ 23
K	59 $\pm$ 31	73 $\pm$ 9	37 $\pm$ 19
X	102 $\pm$ 7	92 $\pm$ 8	54 $\pm$ 16
W	85 $\pm$ 6	82 $\pm$ 8	66 $\pm$ 6
Y	92 $\pm$ 19	88 $\pm$ 13	84 $\pm$ 11
Q	92 $\pm$ 10	80 $\pm$ 1	38 ^d
Overall	88 $\pm$ 18	100 $\pm$ 41	56 $\pm$ 32

^a H= risultati relativi a campioni di acqua oligominerale fortificata artificialmente; ^b U= campioni reali di acque destinate al consumo umano sottoposte a trattamenti di potabilizzazione; ^c E= campioni reali di acque grezze destinate al consumo umano; ^d Q (E2) senza standard interni, sono riportati i soli dati relativi al campione E1

3.9. Procedura estrattiva

3.9.1. Campioni di acqua superficiale (acqua grezza)

Tutti i campioni di prova, del volume di 1 L, sono stati contaminati artificialmente con 50 ng dello standard di processo (β -estradiolo d_3 , β -estradiolo trideuterato).

Se necessario, laddove si valuti che la torbidità/presenza di particolato potrebbe occludere le colonnine per SPE durante l'estrazione, i campioni di acqua sono filtrati su membrana in fibra di vetro da 0,45 μ m. Il filtrato viene raccolto in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE e il particolato trattenuto dal filtro è lavato con 10 mL di metanolo al fine di rimuovere eventuali analiti trattenuti in esso. La miscela è trasferita nel campione.

Il campione di prova, del volume di 1 L, è sottoposto ad estrazione e preconcentrazione degli analiti mediante procedura SPE, utilizzando come materiale adsorbente un copolimero divinilbenzene/N-vinilpirrolidone (tipo HLB) in colonnine di vetro. Gli analiti sono estratti con 6 mL di miscela metanolo:acetone:acetato di etile ed evaporati a temperatura $\leq 50^\circ\text{C}$ sotto moderato flusso di gas inerte, azoto o argon, rimuovendo la fase liquida fino ad un volume pari a circa 100 μ L. Il residuo è ricostituito con 0,4 mL di miscela acqua:metanolo 50:50.

La procedura estrattiva è riportata in Appendice A.

3.9.2. Campioni di acqua trattata (in uscita dal potabilizzatore)

I campionamenti di acqua trattata (in uscita dagli impianti di potabilizzazione) vanno effettuati in modo analogo alle acque superficiali (*vedi* Appendice A). Ad essi vanno aggiunti 18 mg/L di tiosolfato di sodio, dopo aver precedentemente acidificato il campione a pH 3 con acido cloridrico. Generalmente i campioni in uscita non richiedono filtrazione. La procedura estrattiva può essere effettuata dopo un'ora.

3.9.3. Costruzione della curva di taratura

Per la costruzione della curva di taratura, si utilizzano bianchi campione (*vedi* 3.6.1) opportunamente contaminati artificialmente con soluzioni degli analiti a concentrazione nota nel range compreso tra 5 e 1000 ng/L. la contaminazione è eseguita contestualmente all'aggiunta dello standard di processo. In Appendice A sono riportati i dettagli relativi alla costruzione della curva di taratura.

3.9.4. Controllo del bianco

Secondo quanto predisposto nell'ambito delle procedure di controllo qualità (ISS.PGA.903.revXX) controllare una aliquota di bianco campione (*vedi* 3.6.1) sottoponendola alla stessa procedura analitica prevista per il campione, allo scopo di individuare gli eventuali interferenti presenti nel tracciato cromatografico nell'intorno del tempo di ritenzione degli analiti da ricercare. In considerazione della diffusione ubiquitaria di alcuni analiti, l'analisi è considerata accettabile se i livelli di concentrazione delle sostanze ricercate sono inferiori ai *Limit of Report* (LOR), secondo quanto riportato in sezione 3.10.4.

3.10. Analisi LC/MS tandem: strumentazione analitica e accessori

Per la determinazione degli analiti, è stato utilizzato un sistema di rivelazione basato sulla cromatografia liquida accoppiata a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (LC/MS tandem). Qui di seguito, viene descritta in dettaglio la strumentazione analitica necessaria alla determinazione finale di IE ai livelli di interesse:

- a) pompa HPLC adatta a gestire microflussi ed eluizione in gradiente binaria equipaggiata di sistema di iniezione a valvola, utilizzando microsiringhe con loop interno da 20 µL;
- b) compartimento di termostatazione per la colonna
- c) colonna a fase inversa C-18 (150 x 2,1 mm I.D. 5 µm);
- d) analizzatore di massa a triplo quadrupolo equipaggiato con sorgente a pressione atmosferica del tipo TIS (*Turbo Ion Spray*); l'utilizzo di sorgenti di differenti tipologie può comportare la necessità di un processo di ottimizzazione dei parametri fisici e strumentali;
- e) sistema di acquisizione ed elaborazioni dati.

3.10.1. Fase mobile

La fase mobile è costituita da acqua ultra pura e metanolo, entrambi addizionati di ammoniaca 0,045 mM. Le condizioni sperimentali sono riportate in dettaglio in Appendice A.

3.10.2. Determinazione LC/MS tandem su campioni di prova

Per l'analisi di IE in campioni di acque da destinare e destinate al consumo umano, una aliquota del campione di prova, trattato come previsto nella sezione 3.9, deve essere iniettata all'apparato LC/MS tandem, sotto le stesse condizioni strumentali previste per le soluzioni

standard, i bianchi campioni e la curva di taratura. I composti di interesse devono essere identificati e quantificati seguendo le procedure sotto riportate:

– *Operazione preliminari*

Attivare l'apparecchiatura e predisporla al funzionamento secondo le procedure operative specifiche o le indicazioni fornite dai manuali d'uso. In particolare:

- ottimizzare i parametri funzionali dello spettrometro di massa e assicurare la corretta taratura delle masse;
- assicurarsi che lo strumento raggiunga l'equilibrio e scegliere un fondo scala compatibile con la concentrazione degli ioni da determinare.

– *Condizioni operative strumentali*

Per le determinazioni in LC/MS tandem predisporre la valvola di iniezione, o in alternativa, un autocampionatore, in modo da iniettare nel sistema un volume fisso pari a 20 µL dell'estratto concentrato e impostare le condizioni strumentali idonee allo scopo riportate in Appendice.

3.10.2.1. Identificazione dell'analita

L'identificazione degli analiti deve basarsi sul tempo di ritenzione e sui segnali ionici relativi alle transizioni ione precursore > ione frammento. I dati sull'identificazione degli analiti devono essere ottenuti per confronto – in identiche condizioni sperimentali – tra il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite al campione in esame e il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite alla soluzione di riferimento/(curva di taratura.)

In particolare, l'identificazione dell'analita sarà assicurata dalla presenza di entrambe le transizioni diagnostiche con un rapporto segnale/rumore (S/N) ≥ 3 , calcolato utilizzando algoritmi disponibili su software o un metodo grafico.

Per acquisizioni in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), dovranno essere anche osservati i rapporti tra le transizioni diagnostiche. Le condizioni operative sono riportate in Appendice A

In Appendice A è riportato un cromatogramma rappresentativo ottenuto dall'analisi LC/MS tandem di un campione addizionato degli analiti e lo standard di processo al livello di 50 ng/L.

3.10.2.2. Analisi quantitativa in LC/MS

- 3.10.2.2.1. Analizzare ciascuna aliquota di estratto oggetto di indagine.
- 3.10.2.2.2. Dedurre il valore incognito della concentrazione X di ciascun analita nel campione di prova mediante un programma dedicato oppure sostituendo nella equazione della retta di taratura il valore della Y ottenuto sperimentalmente per il campione processato.
- 3.10.2.2.3. Il valore della Y nel campione di prova deve sempre cadere all'interno dell'intervallo di linearità o riportato in esso per opportuna diluizione del campione.
- 3.10.2.2.5. Espressione dei risultati: i risultati, espressi in nanogrammi per litro (ng/L), vengono riportati con una cifra significativa per concentrazioni ≥ 100 ng/L e con due cifre significative per concentrazioni < 100 ng/L.

3.11. Validazione del metodo LC/MS/MS

La validazione del metodo analitico sviluppato è stata effettuata ai sensi del DL.vo 31/2001 (3), recepimento della Direttiva Europea 98/83/CE (4), tenendo conto dei criteri della norma UNI ENV ISO 13530: 2001. Le caratteristiche di performance richieste ad un metodo analitico in materia di acque destinate al consumo umano stabilite dal decreto legislativo 31/2001 sono:

1. esattezza
2. precisione
3. limite di rivelazione (*Limit Of Detection*, LOD).

Il metodo proposto è stato validato in termini di linearità, sensibilità, specificità, esattezza e precisione, mediante prove di ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio condotte presso i laboratori dell'ISS. È stato inoltre effettuato un *collaborative trial* per valutare le prestazioni del metodo da parte dei singoli laboratori di prova su campioni contaminati artificialmente e per determinare i contenuti di analiti nei bianchi, anche al fine di determinare eventuali fonti di contaminazione. I dati di esattezza e precisione sono stati valutati su prove sperimentali condotte su bianchi campione contaminati artificialmente con gli analiti e standard di processo al livello di 50 ng/L. Questo livello di concentrazione è stato scelto come limite di prestazione del metodo analitico, in quanto prossimo ai livelli di contaminazione ubiquitaria di alcuni analiti tra quelli selezionati (bisfenolo A e nonilfenolo). Dai dati ottenuti dal *collaborative trial* è stata ricavata l'accuratezza del metodo, espressa come somma di esattezza e riproducibilità inter-laboratorio.

3.11.1. Esattezza e precisione

Per la valutazione della accuratezza, è stato effettuato un *collaborative trial* in cui ciascuno dei 6 laboratori di prova ha effettuato due estrazioni su bianchi campione contaminati artificialmente con analiti e standard di processo alla concentrazione di 50 ng/L (N=12). I dati di esattezza e precisione relativi alle prove interlaboratorio sono riportati in Tabella 2. L'esattezza è stata riportata come recupero % e la precisione come riproducibilità inter-laboratorio. Nella stessa tabella sono riportati i valori di incertezza proponendo un fattore di copertura K pari a 2.

Tabella 2. Risultati relativi all'esattezza $\bar{x}$ (espressa come recupero %), alla precisione (riproducibilità interlaboratorio) (espressa come RSD%), e alla incertezza ottenute dall'analisi inter-laboratorio di n. 12 bianchi campione

Analita	Esattezza	Riproducibilità interlaboratorio	Incertezza, U (K=2)
	$\bar{x}$ (%)	RSD(%)	RSD(%)
17 α -etinilestradiolo	94	4	8
Estrone	89	3	6
β -estradiolo	86	5	10
Bisfenolo A	75	8	16
4-octilfenolo	49	35	70
Nonilfenolo	28	32	64

3.11.2. Linearità e sensibilità del metodo (prove intra-laboratorio)

L'intervallo di linearità del metodo è stato definito considerando sia il contributo strumentale che quello del metodo estrattivo. Per valutare questi parametri sono stati preparati 21 bianchi campione contaminati con quantità variabili di ciascun analita. La valutazione dei risultati è stata effettuata secondo quanto riportato in appendice per la costruzione della curva di taratura.

Il metodo analitico è risultato sufficientemente lineare in tutto l'intervallo considerato, con un R^2 (coefficiente di regressione) compreso tra 0,9804 e 0,9976.

3.11.3. Limite di rivelazione (LOD)

Il LOD del metodo SPE-LC/MS/MS è stato calcolato sui bianchi campione contaminati artificialmente con gli analiti.

Come previsto dal DL.vo 31/2001 essi sono stati determinati sulla base del rapporto S/N. Il LOD del metodo è stato espresso come la concentrazione pari a 3 volte la Deviazione Standard (DS) del rapporto S/N, valutato come media dei valori ottenuti dall'analisi di $n = 20$ bianchi campione. I valori di LOD così calcolati sono riportati in Tabella 3 e differiscono sostanzialmente dai LOD strumentali. Poiché nell'analisi di IE è sempre presente una contaminazione ubiquitaria, non sistematica e non riproducibile, è stato introdotto il *Limit Of Report* (LOR) come parametro indicatore dei limiti di rivelazione del metodo, in luogo del LOD strumentale. Come si può leggere nella sezione seguente, la positività/negatività di un campione sarà determinata dal superamento o meno del valore del LOR)

3.11.4. Specificità e limiti analitici (prove su bianco campione)

Come esposto precedentemente, gli analiti considerati in questo lavoro presentano una diffusione ubiquitaria non riproducibile, soprattutto il bisfenolo A e il nonilfenolo, per cui diventa problematico trovare una matrice che sia priva degli stessi. Campioni usualmente considerati bianchi (acqua di falda, acqua piovana, acqua proveniente da sorgente montana, acqua Milli-Q) in realtà risultano contaminati.

Risultando la contaminazione inevitabile e per di più irriproducibile, si è deciso di proporre dei LOR operativi. I LOR proposti tengono in considerazione sia le prestazioni strumentali del metodo che i livelli di contaminazione ubiquitaria emergenti dalle campagne di monitoraggio e individuati dal LOD del metodo calcolato sui bianchi campione. Dai dati analizzati, i LOR, al di sotto dei quali i risultati non hanno sufficiente attendibilità, sembrano essere necessari soprattutto in presenza di contaminazione frequente, non sistematica e non riproducibile di alcuni composti presi in considerazione, quali bisfenolo A e nonilfenolo.

Per alcuni di questi analiti, il concetto di LOR è stato già introdotto da Thenholm *et al.* (5) è giustificato proprio in virtù della inevitabile contaminazione dei bianchi. I LOR proposti da Thenholm *et al.* sono stati scelti come 3 o 5 volte il LOD strumentale e impostati come il punto più basso della curva di calibrazione, con un rapporto segnale/rumore maggiore di 10.

I valori di LOR proposti, riportati in Tabella 3, si basano essenzialmente sullo studio dei bianchi campioni analizzati e sulla valutazione della contaminazione dovuta a materiale e/o ad ambiente, di natura non sistematica e non riproducibile.

Tabella 3. Valori di LOD e LOR proposti per ciascun analita

Analita	LOD ^a strumentale ng/L	LOD (3xSD di N=20 bianchi) ng/L	LOR ng/L
17 α -etinilestradiolo	1,8	3,0	3,0
Estrone	0,24	0,3	0,3
β -estradiolo	0,9	3,0	3,0
Bisfenolo A	1,8	24	25
4-tert-octilfenolo	5,0	6,0	5,0
Nonilfenolo	6,0	52	50

^a calcolato sulla transizione ione precursore > ione prodotto con S/N peggiore (vedi Appendice A, sezione Analisi LC-MS tandem); ^b DS= Deviazione Standard

3.11.5. Misure di sicurezza

Poiché le sostanze possono essere assorbite dall'organismo per inalazione, attraverso la cute e per ingestione è necessario:

- utilizzare idonee misure di protezione individuale (protezione respiratoria, protezione delle mani, protezione degli occhi, protezione della pelle e del corpo).
- effettuare tutte le operazioni descritte nelle sezioni 3.8 e 3.9 sotto cappa chimica.

Bibliografia

1. Loos R, Wollgast J, Castro-Jiménez J, Mariani G, Huber T, Locoro G, Hanke G, Umlauf G, Bidoglio G, Hohenblum P, Moche W, Weiss S, Schmid H, Leiendecker F, Ternes T, Navarro Ortega A, Hildebrandt A, Barcelò D, Lepom P, Dimitrova I, Nitchewa O, Polesello S, Valsecchi S, Boutrup S, Sortkjaer O, de Boer R, Staeb J. Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water. *TRAC-Trend Anal Chem* 2008;27:89-95.
2. Berkner S, Streck G, Herrmann R. Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples *Chemosphere* 2004;54:575-84.
3. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”. *Gazzetta Ufficiale* n. 52 del 3 marzo 2001 - Supplemento Ordinario n. 41 (2001)
4. Commissione Europea. Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *G.U.C.E.* 5 dicembre 1999 n. L 330. (1998)
5. Trenholm R, Vanderford B, Holady J, Rexing D, Snyder S. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 2006;65:1990-8.

4. VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ACQUE GREZZE E TRATTATE DA DESTINARE A CONSUMO UMANO IN DIVERSI SISTEMI IDRICI ITALIANI

Sara Bogialli (a), Federica Nigro Di Gregorio (b, c), Valentina Fuscoletti (c), Giorgia Di Pofi (d)

(a) *Dipartimento di Scienze chimiche, Università di Padova, Padova*

(b) *Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università "Sapienza" di Roma, Roma*

(c) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) *Dipartimento di Chimica, Università di Tor Vergata, Roma*

4.1. Pianificazione delle azioni di monitoraggio e selezione dei sistemi idrici

Le indagini conoscitive promosse nell'ambito di un progetto multidisciplinare e inquadrato in una collaborazione nazionale che coinvolge numerosi gestori idrici ed enti di ricerca, sono state focalizzate sul ruolo delle acque destinate al consumo umano quale possibile fonte di esposizione agli Interferenti Endocrini (IE). Al fine di considerare matrici a più elevata contaminazione ambientale e definire uno scenario dei rischi rappresentativo del territorio nazionale, le indagini sono state condotte su molteplici tipologie di acque di origine superficiale, differenti per provenienza geografica e per consistenza e composizione del carico antropico, sottoposte a trattamenti convenzionalmente utilizzati nella filiera produttiva delle acque destinate al consumo umano.

Nella prima fase di valutazione dell'esposizione a IE in acque destinate al consumo umano, è stato selezionato lo scenario più critico in termini di probabilità ed entità di contaminazione ambientale, così come è desumibile dai dati di letteratura. È stato quindi proposto il monitoraggio di acque superficiali piuttosto che di falda, interessate in misura diversa da contaminazioni organiche e inorganiche a seguito di fenomeni di antropizzazione, quali presenza di poli industriali, insediamenti agricoli e residenziali.

I campionamenti sono stati condotti nell'arco di un anno, includendo nella pianificazione la variabile stagionalità, con l'intento di fotografare situazioni ambientali diverse per temperatura, luminosità, carico di sostanza organica, intensità della produzione industriale.

In conclusione, sono state effettuate quattro campagne di monitoraggio: nel dicembre 2008, nel giugno 2009, nell'ottobre e novembre 2009.

Nel piano di monitoraggio sono state coinvolte 6 aziende acquedottistiche rappresentative di diverse realtà territoriali per tipologia di acque utilizzate, bacino di utenza e caratteristiche degli impianti di potabilizzazione:

- Acquedotto Pugliese SpA, Bari
- ACSM AGAM Reti Gas Acqua srl, Como
- HERA SpA, Bologna
- Mediterranea delle Acque SpA, Genova
- Publiacqua SpA, Firenze
- SMAT SpA, Torino.

4.2. Trattamenti di rimozione degli IE negli acquedotti

La presenza di IE nelle acque è dovuta essenzialmente ad attività umane e/o a processi di immissione nell'ambiente degli inquinanti. Poiché gli IE si riscontrano di frequente nelle acque superficiali da cui vengono attinte le acque da destinare al consumo umano, è necessaria la loro rimozione nel corso dei processi di potabilizzazione. È fondamentale, quindi, conoscere quali IE sono presenti nelle acque grezze (all'ingresso dell'impianto di potabilizzazione) per operare una efficace rimozione degli stessi e successivamente valutare l'efficacia degli impianti mediante determinazione e quantificazione degli IE nelle acque trattate.

Inoltre va considerato che sostanze con caratteristiche di IE possono venir cedute per contatto con l'acqua dai materiali stessi di cui sono costituiti gli impianti. bisfenolo A, alchilfenoli, ftalati e IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici), possono essere rilasciati nell'acqua potabile quando vengono usati materiali plastici per le condutture (1)

In letteratura è riportato che la rimozione di IE tramite trattamenti convenzionali utilizzati per le acque superficiali, ovvero flocculazione, sedimentazione, filtrazione e disinfezione finale, è inferiore al 25% (2, 3). Viceversa, trattamenti più avanzati come l'ozonizzazione, l'adsorbimento su carbone attivato granulare (*Granular Activated Carbon*, GAC), l'irradiazione UV, la nanofiltrazione riescono a rimuovere gli IE fino al livello di tracce. Sono tuttavia poco usati in quanto la loro applicazione è condizionata dalla grandezza degli impianti, da problemi tecnici e dal rapporto costi/benefici.

Diversi autori affermano che gli alchilfenoli vengono abbattuti completamente dopo filtrazione su GAC, mentre sono abbattuti solo parzialmente durante l'ozonizzazione. È probabile, inoltre, che anche gli estrogeni per il loro elevato grado di lipofilia vengano rimossi dal trattamento con carbone attivo. L'ozonizzazione abbatte efficacemente gli estrogeni, quando l'ozono viene usato in concentrazioni comprese 0,5-3 mg/L (4) con velocità di reazione molto rapida. Anche il bisfenolo A è risultato assente dopo ozonizzazione (5). In Spagna, un gruppo di ricerca diretto da Rodriguez-Mozaz (6), ha riscontrato che la quantità di bisfenolo A diminuisce progressivamente durante le varie fasi del trattamento sino a livelli inferiori al limite di rilevabilità (*Limit of Detection*, LOD = 50 ng/L) nelle acque potabilizzate, raggiungendo basse concentrazioni già al livello della filtrazione.

Anche la clorazione può rimuovere alcuni IE tramite ossidazione. Le molecole che hanno un anello fenolico nella struttura, come il β -estradiolo, l'estrone, l'estriolo, il 17 α -etinilestradiolo, il 4-n-nonilfenolo e il bisfenolo A, sono ossidate dal cloro, mentre il progesterone non subisce modificazioni (7).

4.2.1. Presenza di sottoprodotti di degradazione degli IE

Nella valutazione dell'esposizione agli IE presenti nelle acque da destinare al consumo umano, è opportuno tenere in debita considerazione la presenza di eventuali sottoprodotti di degradazione che si formano durante il processo di potabilizzazione. Attualmente, le informazioni disponibili sulla presenza, l'identità, la quantità di questi sottoprodotti sono alquanto limitate, e quasi esclusivamente relative ai sottoprodotti della clorazione. Di conseguenza una valutazione tossicologica completa dell'esposizione a questi composti è prematura. Tuttavia, vengono di seguito riportate alcune informazioni disponibili in letteratura con lo scopo di richiamare l'attenzione su questo aspetto.

Diversi autori hanno pubblicato di recente studi sull'effetto della clorazione su alcune sostanze ad attività endocrina come il bisfenolo A, il 4-n-nonilfenolo e alcuni estrogeni (estrone, 17 β -estradiolo ed estriolo), ed hanno valutato l'attività estrogenica dei sottoprodotti clorurati in

confronto a quella dei prodotti di origine. Hu *et al.* (8) mediante la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa con interfaccia elettrospray (LC/ESI-MS), identificando sette sottoprodotto della clorazione (2,4-dicloro-17 β -estradiolo, monocloroestrone, 2,4-dicloroestrone e 4 sottoprodotti) operando alle seguenti condizioni: 50 μ g/L di β -estradiolo, 1, 46 mg/L di ipoclorito di sodio, pH 7,5, 25°C.

Yamamoto e Yasuhara (9) hanno dimostrato che i derivati clorurati del bisfenolo A sono ancora presenti dopo 60 minuti quando il bisfenolo A reagisce con alte concentrazioni di cloro. Questi derivati sono più difficilmente biodegradabili rispetto al bisfenolo A, sono stati ritrovati all'uscita degli impianti di depurazione (10). Ed hanno dimostrato un potere estrogenico superiore a quello del composto progenitore (11). Anche i prodotti di degradazione di ottil e nonilfenolo possiedono ancora potere estrogenico, inducendo la sintesi della vitellogenina nelle trote maschio (12).

4.3. Concentrazione di IE nelle acque grezze e trattate: quattro campagne di monitoraggio

Sono state eseguite quattro campagne di monitoraggio durante il periodo di un anno coinvolgendo sei acquedotti rappresentativi di diverse realtà territoriali italiane per tipologia di acque utilizzate, bacino di utenza e caratteristiche degli impianti di potabilizzazione.

I dati sono riportati tenendo conto dei valori finali di LOR (*Limit of Report*) proposti (Tabella 1) e sono riportati come media $\pm$ deviazione standard delle concentrazioni di analita riscontrate nelle 2 diverse aliquote di ciascun campione e relativamente alle quattro campagne di monitoraggio effettuate tra dicembre 2008 e novembre 2009.

Tabella 1. Valori di LOR proposti in ng/L

Analita	LOR
17 α -etinilestradiolo	3,0
Estrone	0,3
β -estradiolo	3,0
Bisfenolo A	25
4-tert-octilfenolo	5,0
Nonilfenolo	50

Sono di seguito riportate le concentrazioni di IE nei campioni di acque prelevate in entrata ed in uscita dai diversi impianti, seguendo la codifica indicata dall'ente coordinatore (Tabella 2-7).

Le concentrazioni riscontrate nei campioni di acqua in entrata rivelano ridotte e sporadiche contaminazioni per estrogeni, più spesso per 17 β -estradiolo, con concentrazioni che vanno da valori <LOR fino ad un massimo di 469 ng/L. L'estrone è stato registrato sporadicamente a concentrazioni spesso prossime al LOR, mentre il 17- α -etinilestradiolo è stato rivelato solo in due campioni. I livelli riscontrati nelle acque grezze risultano però sempre efficacemente abbattuti durante il processo di potabilizzazione.

In generale, le contaminazioni più significative e frequenti si riscontrano per bisfenolo A e nonilfenolo. Per quest'ultimo i livelli di contaminazione sono risultati generalmente inferiori ai 100 ng/L, raggiungendo un picco di concentrazione pari a 806 ng/L.

Tabella 2. NONILFENOLO: concentrazioni medie e deviazioni standard (in ng/L) delle due repliche dei campioni reali in entrata (E) e in uscita (U), analizzate da ciascun acquedotto nel corso delle quattro campagne di monitoraggio (2008-2009) (ogni acquedotto partecipante al progetto è indicato con una sigla stabilita dall'ente coordinatore)

ACQ *	Dicembre 2008		Giugno 2009		Ottobre 2009		Novembre 2009	
	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS
Y	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	64,4±0,6	60,9±3,0	50,7 ±6,6
X	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	91,1± 11	490±534	<LOR	<LOR
Q	494± 55	<LOR	261 ^a	621±126	806± 145	431±246	159±92,2	89,9±18,9
K	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	60,3±23,5	75,4±52,8	<LOR	<LOR
W	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
Z	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	56,6±22,6	<LOR	<LOR

ACQ: Acquedotto ;^acampione in unica aliquota

Tabella 3. 17α-ETINILESTRADIOLO: concentrazioni medie e deviazioni standard (in ng/L) delle due repliche dei campioni reali in entrata (E) e in uscita (U), analizzate da ciascun acquedotto nel corso delle quattro campagne di monitoraggio (2008-2009) (ogni acquedotto partecipante al progetto è indicato con una sigla stabilita dall'ente coordinatore)

ACQ *	Dicembre 2008		Giugno 2009		Ottobre 2009		Novembre 2009	
	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS
Y	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
X	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
Q	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	7,9±11,1	<LOR	<LOR	<LOR
K	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
W	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
Z	83 ^a	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR

ACQ: Acquedotto ;^acampione in unica aliquota

Tabella 4. β-ETRADIOLO: concentrazioni medie e deviazioni standard (in ng/L) delle due repliche dei campioni reali in entrata (E) e in uscita (U), analizzate da ciascun acquedotto nel corso delle quattro campagne di monitoraggio (2008-2009) (ogni acquedotto partecipante al progetto è indicato con una sigla stabilita dall'ente coordinatore)

ACQ *	Dicembre 2008		Giugno 2009		Ottobre 2009		Novembre 2009	
	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS
Y	3,9±0,2	<LOR	6,2±0,6	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
X	6,0±2,0	<LOR	27,5±2,5	<LOR	20,1±0,6	3,1±3,8	5,0±1,0	<LOR
Q	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	469±33	<LOR	41,0 ±23,8	<LOR
K	<LOR	<LOR	22,9±32,4	<LOR	13,0±1,0	<LOR	<LOR	<LOR
W	3,8±0,3	<LOR	7,4±0,4	<LOR	3,7±0,5	<LOR	3,0±0,3	<LOR
Z	5 ^a	<LOR	9,9±1,6	<LOR	6,2±2,8	<LOR	5,1±0,9	<LOR

ACQ: Acquedotto ;^acampione in unica aliquota

Tabella 5. ESTRONE: concentrazioni medie e deviazioni standard (in ng/L) delle due repliche dei campioni reali in entrata (E) e in uscita (U), analizzate da ciascun acquedotto nel corso delle quattro campagne di monitoraggio (2008-2009) (ogni acquedotto partecipante al progetto è indicato con una sigla stabilita dall'ente coordinatore)

ACQ *	Dicembre 2008		Giugno 2009		Ottobre 2009		Novembre 2009	
	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS
Y	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	1,0±0,1	<LOR	0,5±0,04	<LOR
X	<LOR	<LOR	0,34±0,03	<LOR	4,3±0,04	8,8±7,0	0,7±0,6	0,9
Q	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	19,5±23,2	<LOR	1,1±0,9	0,4±0,5
K	<LOR	<LOR	0,49±0,30	<LOR	3,1±1,5	0,4±0,1	0,8±0,1	0,7±0,2
W	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	1,2±0,2	<LOR	0,7±0,2	<LOR
Z	0,3 ^a	<LOR	<LOR	<LOR	0,4±0,6	<LOR	<LOR	<LOR

ACQ: Acquedotto ;^acampione in unica aliquota

Tabella 6. BISFENOLO A: concentrazioni medie e deviazioni standard (in ng/L) delle due repliche dei campioni reali in entrata (E) e in uscita (U), analizzate da ciascun acquedotto nel corso delle quattro campagne di monitoraggio (2008-2009) (ogni acquedotto partecipante al progetto è indicato con una sigla stabilita dall'ente coordinatore)

ACQ *	Dicembre 2008		Giugno 2009		Ottobre 2009		Novembre 2009	
	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS
Y	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
X	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	63,1±81,4	<LOR	<LOR
Q	<LOR	<LOR	134	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	30,8±0,9
K	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
W	<LOR	<LOR	82±10	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
Z	55 ^a	<LOR	28,1±4,3	<LOR	<LOR	111±150	<LOR	<LOR

ACQ: Acquedotto ;^acampione in unica aliquota

Tabella 7. TERT-OCTILFENOLO: concentrazioni medie e deviazioni standard (in ng/L) delle due repliche dei campioni reali in entrata (E) e in uscita (U), analizzate da ciascun acquedotto nel corso delle quattro campagne di monitoraggio (2008-2009) (ogni acquedotto partecipante al progetto è indicato con una sigla stabilita dall'ente coordinatore)

ACQ *	Dicembre 2008		Giugno 2009		Ottobre 2009		Novembre 2009	
	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS	E ± DS	U ± DS
Y	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
X	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	27,2±38,4	<LOR	<LOR
Q	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
K	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
W	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR
Z	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR	<LOR

ACQ: Acquedotto ;^acampione in unica aliquota

Le concentrazioni di bisfenolo A risultano spesso inferiori al valore del LOR, ad eccezione di alcuni valori rilevati nelle acque in uscita da imputare presumibilmente all'incertezza da attribuire al dato, soprattutto in prossimità del valore del LOR. Non sono state riscontrate, invece, criticità di alcun tipo per l'octilfenolo.

4.4. Valutazioni conclusive

Sulla base dei risultati ottenuti nelle 4 campagne di monitoraggio limitatamente ai sei acquedotti rappresentativi di diverse realtà territoriali per tipologia di acque utilizzate, bacino di utenza e caratteristiche degli impianti di potabilizzazione, non è stato evidenziato un rischio significativo di esposizione per le sostanze oggetto di indagine, sia in considerazione delle ridotte concentrazioni riscontrate nelle acque in entrata che per effetto dei trattamenti di potabilizzazione eseguiti. Le concentrazioni riscontrate rivelano ridotte contaminazioni, dell'ordine dei ng/L (ppt, parti per trilione), soprattutto dovute alla presenza di bisfenolo A e nonilfenolo. I dati rilevati sono sostanzialmente in linea con il range di valori riportati a livello europeo nelle acque superficiali (Capitolo 2) e comunque inferiori ai valori rilevanti dal punto di vista tossicologico (Capitolo 1). Interessanti sono i dati ottenuti sulle acque ottenute al termine del processo di potabilizzazione che hanno evidenziato come i trattamenti convenzionalmente effettuati sulle acque grezze risultino generalmente efficaci per l'abbattimento pressoché totale dei contenuti degli analiti in entrata.

Bibliografia

1. Rahman MF, Yanful EK, Jasim SY. Occurrences of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in the aquatic environment and their removal from drinking water: challenges in the context of the developing world. *Desalination* 2010;252:161-68.
2. Kim SD, Cho J, Kim IS, Vanderford BJ, Snyder SA. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters *Water Res* 2007;41:1013-21.
3. Westerhoff P. Removal of endocrine disruptors, pharmaceuticals and personal care products during water treatment. *Southwest Hydrol* 2003;2:18-9.
4. Ternes TA, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch H-J, Haist-Gulde B, Preuss G, Wilme U, Zulei-Seibert N. Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment *Environ Sci Technol* 2002;36:3855-63.
5. Wenzel A, Müller J, Ternes T. *Study on endocrine disruptors in drinking water. Final report.* Francoforte: Fraunhofer IME, ESWE; 2003. (ENV. D. 1/ETU/2000/0083).
6. Rodriguez-Mozaz S, López de Alda M, Barcelò D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction- liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1045:85-92.
7. Gallard H, Leclercq A, Croué JP. Chlorination of bisphenol A: kinetics and byproducts formation. *Chemosphere* 2004;56:465-73.
8. Hu J, Aizawa T, Ookubo S. Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environ Sci Technol* 2002;36:1980-7.
9. Yamamoto T, Yasuhara A. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds. *Chemosphere* 2002;46:1215-23.

10. Fukazawa H, Hoshino K, Shiozawa T, Matsushita H, Terao Y. Identification and quantification of chlorinated bisphenol A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere* 2001;44:973-9.
11. Kuruto-Niwa R, Ito T, Goto H, Nakamura H, Nozawa R, Terao Y. Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol* 2002;12:27-35.
12. Shao B, Han H, Hu JY, Zhao J, Wu GH, Xue Y, Ya L, Zhang SJ. Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005;530:245-52.

5. APPLICAZIONE DI METODI BIOLOGICI PER LA DETERMINAZIONE DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ACQUE GREZZE E TRATTATE DA DESTINARE A CONSUMO UMANO

Daniela Reali (a), Katy Sanfilippo (a), Laura Canesi (b), Rita Fabbri (b)

(a) *Dipartimento Patologia Sperimentale biotecnologie mediche, infettivologia, epidemiologia, Università di Pisa, Pisa*

(b) *Dipartimento per lo studio del territorio e delle sue risorse, Università di Genova, Genova*

5.1. Introduzione

Molta attenzione è stata posta dalla comunità scientifica internazionale alle sostanze chimiche che possiedono una struttura tale da interferire con l'azione degli ormoni steroidei in particolare gli estrogeni, in relazione alla capacità di indurre effetti di “disregolazione” conseguente all'azione estrogeno mimetica che molte di esse possono svolgere.

Gli Interferenti Endocrini (IE) inducono piccoli cambiamenti molecolari che tuttavia sono sufficienti per impedire la corretta risposta delle cellule bersaglio ai normali segnali inviati dagli ormoni, importanti per il mantenimento dell'omeostasi di tutto l'organismo. Gli estrogeni agiscono attraverso specifici recettori (*Estrogen Receptor*, ER) che sono membri della superfamiglia dei recettori intracellulari per gli steroidi. I recettori estrogenici nello stato inattivo sono legati a *Heat Shock Proteins* (HSP); il legame con l'ormone provoca il distacco delle HSP, il recettore assume una conformazione attiva, dimerizza, si lega a specifiche sequenze del DNA (*Estrogen Responsive Elements*, ERE) e promuove la trascrizione di specifici geni. Tale via, detta ‘genomica’, rappresenta il principale meccanismo di azione delle sostanze estrogeniche a livello cellulare. Un elevato numero di composti IE interagiscono con recettori nucleari e le diverse sostanze possono svolgere azione agonista in alcuni tessuti e antagonista in altri; infatti nei diversi tessuti sono presenti coattivatori e corepressori che modulano l'azione dei ligandi con azione tessuto-specifica.

Sono stati clonati due sottotipi di recettore estrogenico (ER α ed ER β) nei topi, ratti e nell'uomo. Il recettore α è il più diffuso in vari organi e apparati: sistema nervoso centrale (ghiandola pituitaria, ipotalamo, cellule di Schwann, cellule gliali), sistema immunitario (macrofagi, cellule linfoidi), apparato cardiovascolare, sistema cardiocircolatorio (cellule endoteliali, apparato riproduttore femminile (ghiandole mammaria, ovaie, utero, vagina) e maschile (prostata, testicoli, cellule di Leydig, vescicole seminali) oltre che in organi (reni, pancreas, fegato) e tessuto osseo.

Inoltre, gli estrogeni naturali come gli IE, possono agire a livello cellulare attraverso meccanismi rapidi, o ‘non genomici’, dipendenti o indipendenti da recettori associati alla membrana, che comprendono variazioni di flussi ionici, produzione di secondi messaggeri, e attivazioni di cascate fosforilative. Tali meccanismi determinano effetti molteplici sul metabolismo cellulare e contribuiscono alla modulazione dell'espressione genica.

A livello internazionale è stata definita la necessità di identificare e caratterizzare l'attività endocrina di pesticidi, composti chimici commerciali e contaminanti ambientali specificatamente in relazione all'azione estrogeno-mimetica per il grave impatto, ormai accertato, che essi hanno avuto ed hanno sul biota animale (comparsa di intersessi e di imposex

con conseguente scomparsa di specie o riduzione della popolazione a causa dell'insuccesso riproduttivo) e che possono avere sull'uomo (aumentata incidenza di infertilità e ipospadia nei maschi, tumore della mammella e endometriosi nelle femmine) la cui esposizione si realizza principalmente attraverso la catena alimentare.

Per il raggiungimento di questo obiettivo sono state definite strategie analitiche che si basano sull'utilizzo di una batteria di test biologici *in vitro* e *in vivo* (Tier 1 e Tier 2, *Environmental Protection Agency's Endocrine Disruptor Screening Program*, 2009) secondo una scala gerarchica di complessità strutturale e funzionale del sistema biologico utilizzato in grado di predire vari tipi di effetto. La caratterizzazione dei meccanismi d'azione biologica è fondamentale per collegare gli effetti osservati nei sistemi sperimentali con potenziali ricadute sulla salute umana e valutare effetti additivi l'azione additiva fra sostanze presenti in miscela.

Per un primo livello di valutazione della potenziale attività xeno-estrogenica di composti puri o miscele complesse derivate da alimenti, comprese le acque da bere e da matrici ambientali è quindi internazionalmente accettato l'uso di test a breve termine *in vitro*.

5.2. Test a breve termine *in vitro*

Sono stati sviluppati vari modelli che si basano su meccanismi d'azione ben conosciuti e utilizzano differenti *end-point*. I più utilizzati sono di seguito descritti.

5.2.1. *Competitive Estrogen Receptor Binding Assay*

Il test valuta la competizione di legame tra uno xenobiotico e l'ormone naturale 17- β estradiolo con il recettore estrogenico α umano. Una soluzione del presunto Interferente Endocrino viene incubata con una soluzione di ormone e una soluzione di recettore. Tramite una successiva reazione immunologica (metodo immunoenzimatico ELISA; metodo radio-immunologico-anticorpi estradiolo marcati) viene valutata la quantità di ormone libero in soluzione conseguente al mancato legame con il recettore.

Questo test è stato largamente impiegato anche se non è in grado di distinguere tra sostanze ad azione agonista e/o antagonista; questo è da ritenersi un limite importante in quanto la sola evidenziazione di legame al recettore non è sufficiente per determinare l'estrogenicità di una sostanza, poiché la potenza estrogenica è dipendente, oltre che dall'affinità di legame, dalla capacità del ligando di mantenere il legame con il recettore così da iniziare ad indurre una serie di eventi a cascata che culminano con una risposta misurabile per via biologica o biochimica. Perciò il solo legame di una sostanza al recettore nucleare può essere meramente suggestiva dell'attitudine a comportarsi da estrogeno, ma non fornisce sufficiente evidenza di effetto.

5.2.2. *Recombinant Gene assay/Recombinant Receptor*

Il test utilizza un costrutto genetico consistente di un complesso costituito da un promotore endogeno associato a una sequenza responsiva agli estrogeni (ERE) collegata a un gene Reporter codificante un enzima (luciferasi, cloranfenicolo acetiltransferasi, β -galattosidasi, fosfatasi alcalina). I geni reporter vengono trascritti successivamente al legame "ligando-recettore" e inducono la sintesi di attività enzimatica stabile e misurabile. Sono state costruite in vari laboratori in varie parti del mondo linee cellulari di mammifero e linee di lievito *Saccharomyces cerevisiae* ingegnerizzate con varie tipologie di costrutti: linee cellulari di provenienza umana possono essere transfettate con geni reporter (luciferasi) derivati da altre

specie animali e differenti linee sono state geneticamente costruite nel tempo. Così pure per *Saccharomyces cerevisiae* sono stati prodotti vari costrutti (*Yeast Estrogen Screen*) che esprimono o l'enzima luciferasi (gene Reporter tratto da *Photinus pyralis*, specie di lucciola del Nord America) o l'enzima β -galattosidasi (derivante dalla rana *Xenopus laevis*).

5.2.3. E-screen: cell proliferation assay

Il test utilizza una linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario umano (cellule MCF-7) particolarmente responsiva agli estrogeni, in quanto sovraesprime entrambe le isoforme dei recettori ER α ed ER β . Inoltre, in queste cellule oltre agli effetti mediati per via genomica, sono stati dimostrati effetti non genomici degli estrogeni. Dei test *in vitro* utilizzati per lo screening degli IE ad azione estrogenica/antiestrogenica, l'E-screen rappresenta il più elevato livello di complessità biologica, in quanto permette di evidenziare effetti estrogeno-dipendenti (agonista/antagonista) di sostanze individuali e in miscela, e dei loro eventuali metaboliti, in cellule umane. Tali effetti possono con buona approssimazione essere estrapolati ad altri mammiferi e vertebrati data la conservazione dei meccanismi endocrini di base.

In linea generale si può affermare che ogni test *in vitro* presenta vantaggi e limiti:

- la maggior parte dei costrutti di lievito ricombinante contengono il recettore α , solo alcuni anche il β . Sono organismi eucarioti, di facile coltivabilità, elevata sensibilità e specificità, ma non esprimono il complesso metabolismo delle cellule di mammifero e la permeabilità della parete è tale che potrebbe rendere difficile la penetrazione di alcune molecole. Altro limite può essere rappresentato dal fatto che i vari costrutti ricombinanti possono esprimere livelli diversi di recettori; inoltre è riconosciuta una certa variabilità di crescita cellulare anche in condizioni sperimentali standardizzate e strettamente controllate.
- la maggior parte delle linee cellulari derivate da tumori mammari (adenocarcinomi) esprimono sia recettori α che β e possono essere quindi responsive ad una ampia gamma di sostanze estrogeniche con diversa affinità per i due tipi di recettori. Un limite può essere rappresentato dal fatto che i vari cloni di linee cellulari possono esprimere i diversi ER in diversa proporzione, e che le condizioni di coltivazione e il tipo di siero fetale deprivato di estrogeni utilizzato per il saggio possono influenzare la risposta e quindi la potenza relativa dei potenziali xenoestrogeni nei confronti dell'E₂. Sono cellule di mammifero quindi complete di un sistema metabolico in grado di detossificare o rendere più tossico un composto o una miscela riproducendo quanto avviene in natura, e questo è un vantaggio. Possono essere, però più sensibili di altri sistemi biologici all'azione tossica di matrici complesse e quindi in alcuni casi possono essere scarsamente responsive per valutare l'attività agonista/antagonista.

È evidente che questi test non possono identificare tutte le complesse interazioni e meccanismi di risposta che gli ormoni inducono negli organismi pluricellulari, e che nessun singolo test può predire tutti gli effetti delle sostanze attive dal punto di vista ormonale, ma è riconosciuto che costituiscono un valido strumento per uno screening di primo livello per evidenziare l'attitudine di composti o matrici complesse a riconoscere i recettori estrogenici umani, legarsi ad essi e indurre una catena di reazioni biomolecolari caratterizzate da una relazione dose-risposta i cui prodotti sono strumentalmente misurabili: pertanto, questi test forniscono informazioni rilevanti dal punto di vista scientifico e sanitario.

5.3. Test *in vitro* utilizzati nello studio

Per la valutazione della presenza di IE con attività agonista e/o antagonista sul sistema estrogenico nelle acque grezze e trattate oggetto della campagna di monitoraggio esplorativa e conoscitiva, sono stati utilizzati *YES assay* e *E-screen assay*.

5.3.1. *YES assay*: meccanismo d'azione e interpretazione dei risultati

Per valutare la potenziale attività estrogenica/antiestrogenica degli estratti di acqua grezza di approvvigionamento e acqua trattata destinata al consumo umano oggetto di studio è stata impiegata la linea di lievito ricombinante *Saccharomyces cerevisiae* RMY326 (His3 Leu2-3, 112 trp1-1 ura3-52/hER-TRP1-2μ[pG/ER(G)], ERE-CYC-LacZ-URA3-2μ [pUCASS-ERE], HIS-3CEN/ARS[pRS423]), autotrofa per triptofano e uracile, contenente il recettore α umano per gli estrogeni (hER α) inserito nel plasmide pG/ER(G) e un elemento di risposta agli estrogeni (ERE) derivato da *Xenopus laevis* a monte del gene reporter lacZ che codifica per l'enzima β -galattosidasi contenuto nel plasmide pUCASS-ERE (1). Nel plasmide pG/ER (G) è contenuto il gene TRP1 che codifica per un enzima richiesto per la biosintesi del triptofano, mentre nel plasmide pUCASS-ERE è contenuto il gene URA3 che codifica per un enzima richiesto per la biosintesi dell'uracile. Questi markers permettono la selezione del lievito che li contiene su terreni privi di triptofano e uracile.

5.3.1.1. Sviluppo del metodo sperimentale *in vitro*

Il lievito viene coltivato su di un mezzo culturale selettivo sintetico privo di uracile e triptofano preparato aggiungendo a 90 mL di acqua ultrapura per colture cellulari: 0,67 g di yeast nitrogen base, 2% di glucosio, 10 mL di una soluzione stock di aminoacidi (30 mg L-isoleucina, 150 mg L-valina, 20 mg L-arginina-HCl, 30 mg L-lisina-HCl, 20 mg L-metionina, 50 mg L-fenilalanina, 200 mg L-treonina, 30 mg L-tirosina in 100 mL), 1 mL di una soluzione stock di L-istidina-HCl (200 mg in 100 mL acqua), 1 mL di una soluzione stock di L-leucina (1 g in 100 mL acqua) e una soluzione di adenina emiosolfato (200 mg in 100 mL acqua) con aggiunta di 3 g di Agar (OXOID) per i terreni solidi.

Le cellule di lievito vengono conservate in glicerolo al 25% a -80°C. Per l'allestimento della coltura, le cellule vengono seminate su piastre di terreno selettivo agarizzato e cresciute per 72 h a 30°C. Per effettuare il test, un pool di colonie viene inoculato in 2 mL di terreno di crescita selettivo liquido e incubate a 30°C per 7 h in agitazione continua (210 rpm). Le colture sono successivamente risospese in terreno di crescita fresco in modo da ottenere una densità ottica $\leq 0,1$ (OD_{600 nm}). La sospensione di cellule viene dispensata in tubi e incubata a 30°C overnight (max 17 h) in presenza di concentrazioni note del controllo positivo (E₂), del controllo negativo (solvente) e dei campioni in condizioni di agitazione continua.

5.3.1.2. Attività agonista

Per valutare l'attività agonista (estrogenica) concentrazioni crescenti dei campioni vengono aggiunte alla coltura di lievito (2 μL/2 mL) in modo che la concentrazione di solvente (DMSO o MeOH) non ecceda lo 0,1% (v/v). L'induzione della trascrizione dell'enzima da parte del complesso recettore-ligando viene misurata mediante spettrofotometro (OD_{420 nm}). Per ogni punto sperimentale (dosi campione) vengono effettuate tre repliche.

Al momento del saggio, le cellule di lievito vengono raccolte mediante centrifugazione e il pellet risospeso in 1 mL Z-buffer (60 mM Na₂HPO₄ • 7H₂O, 40 mM NaH₂HPO₄ • H₂O, 10 mM

KCl, 1 mM MgSO₄ • 7H₂O e 35 mM 2-mercaptoetanolo, pH 7,0). Dopo centrifugazione il pellet è risospeso in 150 µL Z-buffer. La permeabilizzazione delle cellule è effettuata aggiungendo 50 µL di diclorometano e 20 µL di 0,1% SDS e agitando per 10 s. Per evidenziare la produzione di enzima, 700 µL di 2 mg/mL o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) in Z-buffer vengono aggiunti al mezzo colturale. La coltura è incubata a 30°C per 5 min e la reazione bloccata mediante aggiunta di 500 µL di 1 M Na₂CO₃. La produzione di enzima β-galattosidasi è misurata mediante assorbanza del campione a 420 nm (OD₄₂₀) (2, 3). L'attività β-galattosidasi è normalizzata al numero di cellule usate nel saggio ed espressa come Unità Miller utilizzando la seguente formula:

$$\text{Unità Miller} = (1000 \times OD_{420}) / (t \times V \times OD_{600})$$

dove: t rappresenta il tempo di incubazione (min),

V è il volume della coltura usato nel test (mL).

L'attività estrogenica dei campioni viene espressa come *Relative Inductive Efficiency* (RIE), calcolata come il rapporto tra la massima attività β-galattosidasi indotta da ogni singolo campione e quella indotta dal 17β-E₂ 10 nM x 100 (Figura 1). Per una lettura in termini "relativamente quantitativi" di presenza di composti con attività agonista possiamo esprimere i risultati ottenuti in RIE anche in termini di estradiolo equivalenti (*Estradiol Equivalent*, EEQ, ng/L) utilizzando un modello di corrispondenza (curva dose-risposta 17β-estradiolo elaborata con Graph Pad Prism 4.0, Graph Pad Inc.) in base al quale sono stati definiti range di attività RIE % e corrispondenti EEQ espressi in ng/L (4).

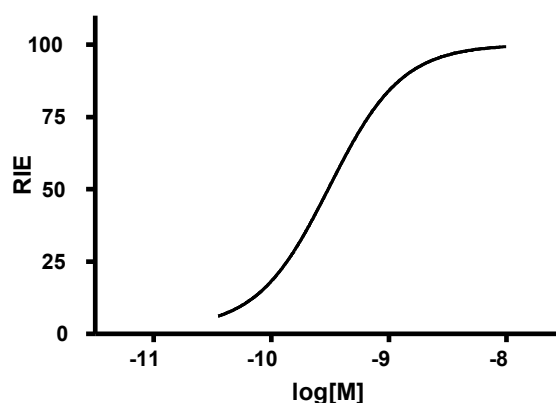


Figura 1. Curva dose-risposta standard del 17β-estradiolo in YES assay

5.3.1.3. Analisi statistica, sensibilità e ripetibilità del test

Poiché l'induzione di attività β-galattosidasi espressa come Unità Miller può variare all'interno di una serie di esperimenti, è stato adottato il criterio di definire quando un composto può essere considerato estrogenico (positivo). Sulla base delle osservazioni di esperimenti dose-risposta ripetuti (n. 15, tre repliche a dose), viene considerato positivo un composto se la variabilità dovuta al trattamento (dosi) è significativamente maggiore di quella dovuta alla variabilità inter-sperimentale (esperimenti). Tale effetto è stato valutato mediante analisi multifattoriale della varianza (*Multivariate Analysis of Variance*, MANOVA). Ulteriore criterio adottato si basa sulla valutazione della presenza di una relazione dose-risposta significativa

all'interno di un range di concentrazioni, almeno due efficaci (multiple range test e analisi di regressione lineare).

L'analisi statistica è stata condotta usando Statgraphic 2.1 Plus. Un valore di p minore di 0,05 è stato usato come livello di significatività.

La sensibilità del saggio è rappresentata dalla minima concentrazione di un composto che ha la capacità di dare una risposta significativamente diversa dal bianco procedurale (tutti i componenti escluso il campione). La concentrazione più bassa di 17 β -estradiolo alla quale si è prodotta una risposta valutabile come positiva è stata minore di 1 ng/L.

La ripetibilità del saggio è stata valutata su 15 determinazioni della curva dose-risposta del 17 β -estradiolo, tre repliche per ciascun punto sperimentale.

L' EC_{50} della linea di lievito utilizzata si colloca tra 0,2 nM e 1.5 nM, range riportato in letteratura per diversi costrutti di lievito ricombinante (5-7), il più vicino valore essendo 0,45 nM (8).

5.3.1.4. Solvente

Il solvente elettivo in YES per la maggior parte dei composti da solubilizzare è il dimetilsolfossido (DMSO). Può essere usato anche il metanolo (MeOH), in dipendenza di eventuali esigenze sperimentali. Tale solvente non ha mostrato indurre tossicità cellulare né produrre interferenze sperimentali, ma le curve dose-risposta relative al 17 β -estradiolo disciolto in DMSO piuttosto che in MeOH, indicano una migliore efficienza (+15%) di induzione di attività β -galattosidasi da parte dell'estradiolo in DMSO rispetto alla soluzione in MeOH.

5.3.1.5. Sensibilità del metodo agli analiti standard oggetto di studio

La concentrazione più bassa degli analiti a cui è stata elicitata una significativa risposta in termini di espressione del gene reporter e produzione di β -galattosidasi (attività agonista) è sotto indicata:

- estrone: 3 ng/L
- 17 α -etinilestradiolo: 3 ng/L
- bisfenolo A: 1000 ng/L (1 ppb)
- 4-octilfenolo: 1000 ng/L
- 4n-nonilfenolo: 1000 ng/L
- nonilfenolo *technical mix*: 2520 ng/L (2,52 ppb)

In Tabella 1 sono riportati i valori massimi di RIE indotta dai singoli analiti e la concentrazione alla quale hanno espresso la massima attività β -galattosidasi.

Tabella 1. Valori massimi di RIE indotta da singoli analiti e concentrazione a cui è stata elicitata

Analita	Concentrazione (ppb)	RIE % (M $\pm$ DS)
E ₂	10	100 $\pm$ 18,6
EE ₂	10	73,7 $\pm$ 4,9
Estrone	10	77,8 $\pm$ 7,4
Bisfenolo A	2000	80,9 $\pm$ 4,7
OP	1000	26,7 $\pm$ 2,1
NP	1000	11,8 $\pm$ 0,6
NP Mix	252	36,9 $\pm$ 3,4

Il 4-octilfenolo ha prodotto tossicità cellulare (98,7% di inibizione della crescita del lievito) alla più alta concentrazione saggiata (2000 ppb), così pure la miscela di isomeri NPMix (97,4% di inibizione della crescita) alla più alta concentrazione saggiata (5040 ppb).

Dall'ISS è stata preparata una miscela equimolare degli analiti in studio per calibrare il metodo di estrazione da parte degli Enti mediante SPE (*Solid Phase Extraction*) su cartucce tipo HLB. È stata valutata la sensibilità di *YES assay* a rilevare l'attività agonista della miscela dei composti selezionati per lo studio (range di concentrazione saggiata: 0,01-100 ppb). La miscela di analiti ha espresso attività agonista secondo una relazione dose-risposta (Tabella 2).

Tabella 2. Attività estrogenica indotta da concentrazioni scalari della miscela Mix ISS

Mix ISS (ppb)	RIE % (M ± DS)
100	85,45 ± 0,16
10	83,81 ± 6,0
1	72,79 ± 5,34
0,1	43,68 ± 4,04
0,01	8,54 ± 3,45

I risultati dimostrano che quando in una miscela, per esempio un estratto di matrice idrica ambientale, sono presenti composti forti induttori di attività agonista, nel caso in studio ormoni naturali e sintetici, essi mascherano l'effetto estrogeno mimetico di altri analiti presenti ancorché attivi, ma meno potenti.

5.3.1.6. Attività antagonista

L'attività antagonista esprime la capacità di composti o miscele di essi di antagonizzare il legame del 17 β -estradiolo al suo specifico recettore. Se l'ormone non si lega al recettore non si attiva il gene reporter che codifica la sintesi dell'enzima β -galattosidasi e nel mezzo di coltura non è rintracciabile l'enzima.

Il saggio si effettua mettendo 1 nM di estradiolo in co-presenza del composto da analizzare e misurando la quantità di enzima la cui produzione è stata indotta dall'E₂ nel mezzo di coltura. Conoscendo quanto enzima viene indotto da 1 nM di estradiolo (M ± DS di tre repliche) si calcola l'entità dell'attività antiestrogenica. Se usiamo varie concentrazioni del composto in esame possiamo anche capire se questa attività biologica di tipo antagonista può essere funzione di una relazione dose-risposta.

Esempio:

$$\begin{aligned} E_2 \text{ 1 nM} &= \text{RIE 100\%} \\ E_2 + \text{composto} &= \text{RIE 85\%} \end{aligned}$$

Questo significa che il composto ha inibito per un 15% l'attività enzimatica inducibile da 1 nM di estradiolo.

Come controllo dell'attività antiestrogenica è stato usato il 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) (9), farmaco antitumorale ad azione antagonista usato in chemioterapia per pazienti affette da tumore della mammella estrogeno dipendente (Tabella 3).

Per valutare l'attività antagonista (antiestrogenica) dei campioni, le cellule vengono trattate overnight in presenza di 17 β -estradiolo (1 nM) e di concentrazioni crescenti dei singoli campioni. Viene poi misurata la produzione di β -gal secondo il protocollo. Come controllo positivo è stata utilizzata una coltura cellulare contenente solo 17 β -estradiolo (1nM), come controllo negativo è stata usata una soluzione di tamoxifen a concentrazione finale massima dello 0,2%. La capacità degli estratti di inibire l'attività inducibile dall'estradiolo, è espressa come inibizione (%) dell'attività elicitata dal 17 β -estradiolo 1 nM (100%) (10). Per ogni punto sperimentale vengono effettuate tre repliche.

Tabella 3. Attività antagonista dose-dipendente espressa da 4-OHT

4-idrossitamoxifen (4-OHT) µg/mL	Inibizione attività E ₂ 1 nM (%)
0,0000387 (10 ⁻¹⁰)	< 1
0,000387 (10 ⁻⁹)	12
0,00387 (10 ⁻⁸)	26
0,0387 (10 ⁻⁷)	45
0,387 (10 ⁻⁶)	54
3,87 (10 ⁻⁵)	65
38,7 (10 ⁻⁴)	tossico

Per valutare l'attività antagonista (antiestrogenica) dei campioni, le cellule vengono trattate overnight in presenza di 17β-estradiolo (1 nM) e di concentrazioni crescenti dei singoli campioni. Viene poi misurata la produzione di β-gal secondo il protocollo. Come controllo positivo è stata utilizzata una coltura cellulare contenente solo 17β-estradiolo (1 nM), come controllo negativo è stata usata una soluzione di tamoxifen a concentrazione finale massima dello 0,2%. La capacità degli estratti di inibire l'attività inducibile dall'estradiolo, è espressa come inibizione (%) dell'attività elicitata dal 17β-estradiolo 1nM (100%) (10). Per ogni punto sperimentale vengono effettuate tre repliche.

I risultati ottenuti in YES indicano che il bisfenolo A non è caratterizzato da attività antagonista mentre OP, 4nNP e NPMix sono in grado di antagonizzare il legame di E₂ al recettore estrogenico α umano con potenza diversa. La miscela MixISS ha inibito l'attività enzimatica inducibile da E₂ del 35, 2% alla concentrazione di 0,1 ppb.

5.3.2. E-screen assay: meccanismo d'azione e interpretazione dei risultati

Il test *in vitro* E-screen (*cell proliferation assay*) utilizza una linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario umano (cellule MCF/7) particolarmente responsiva agli estrogeni, in quanto sovraesprime entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni ER α ed ER β. In queste cellule estrogeni naturali come il 17β-estradiolo (E₂), estrogeni sintetici (17α-etinilestradiolo, estrone) e IE ad azione estrogenica (es. alchilfenoli) inducono la proliferazione cellulare (11). Sia estrogeni naturali che IE agiscono sulle cellule MCF-7 attraverso meccanismi sia genomici che non genomici (12).

Il saggio sfrutta il fatto che in cellule MCF-7 mantenute in un mezzo deprivato di estrogeni, l'aggiunta di E₂ o sostanze estrogeniche induce la proliferazione. L'E-screen confronta la proliferazione dopo 5 giorni di coltura in presenza o assenza di diverse concentrazioni di E₂ o delle sostanze o campioni incogniti da testare. La proliferazione può essere valutata semplicemente mediante conta cellulare o determinazione della vitalità cellulare mediante l'MTT assay.

L'attività sperimentale del gruppo ha avuto come obiettivo iniziale quello di valutare la sensibilità e specificità del test nel rilevare gli analiti scelti per la sperimentazione, anche in funzione del solvente scelto per le soluzioni, e l'applicabilità del test all'analisi glidi estratti di matrici acquose.

5.3.2.1. Valutazione dell'Estrogenicità di un campione

- Effetto proliferativo (*Proliferative Effect*, PE): rapporto tra l'effetto massimo indotto dalla sostanza test e il controllo in assenza di E₂.
- *Relative Proliferative Effect* (RPE): 100x [(PE -1) sostanza test]/[(PE-1) estradiolo]

- *Relative Proliferative Potency* (RPP): rapporto tra le dosi di E₂ e di sostanza test in grado di produrre il PE max x100

La valutazione del PE viene inizialmente effettuata utilizzando diverse concentrazioni di E₂.

5.3.2.2. Sviluppo del modello sperimentale *in vitro*

Culture cellulari

La linea cellulare umana MCF-7 da tumore mammario (human breast cancer cell line) è stata fornita dalla banca cellule presso il CBA (Centro Biotecnologie Avanzate, Genova, Italia). Le cellule sono state coltivate nel terreno di coltura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-Sigma) con rosso fenolo 15 mg/L addizionato di siero fetale bovino (FBS-Sigma) al 10%, amminoacidi non essenziali 1%, antibiotici streptomicina/penicillina 1% e glutamina 1%, in un incubatore a 37°C in aria umida con il 5% di CO₂ in fiasche di plastica da 25 cm².

Il saggio di *E-screen* è stato effettuato secondo Körner *et al.* (13). Al raggiungimento della fase di sub-confluenza (70%), le cellule vengono tripsinizzate e seminate in piastre Microwell (Coastar, Celbio) da 96 pozzetti (5x 10³ cellule in 200 µL di DMEM). Dopo 24 ore, il mezzo viene aspirato e sostituito con il terreno di coltura sperimentale DMEM senza rosso fenolo (*Experimental Medium*, EM) con CD-FCS al 5% (siero trattato con carchoal dextrane per rimuovere gli estrogeni, Hyclone, USA), penicillina-streptomicina 1% e glutamina 1%, a cui vengono addizionati, rispettivamente, i campioni di cui si vuole saggiare la potenziale attività estrogenica alle opportune diluizioni, o il veicolo in cui sono disciolte alle stesse concentrazioni finali. In un set di campioni le cellule vengono addizionate con diverse concentrazioni dell'estrogeno naturale 17β-estradiolo (E₂) (controllo positivo). Parallelamente, sono stati preparati campioni di controllo negativo, contenenti solo EM. I campioni vengono quindi incubati per 5 giorni in atmosfera umida con il 5% di CO₂ a 37°C e allo scadere del termine viene effettuato il test dell'MTT.

MTT assay

Il test dell'MTT 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)2-5difeniltetrazolio bromuro rappresenta un semplice e sensibile test quantitativo colorimetrico per determinare il numero di cellule vive presenti in coltura (14). Il test è basato sulla capacità degli enzimi ossidativi mitocondriali di convertire il substrato, 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)2-5difeniltetrazolio bromuro, giallo, solubile in acqua, in un formazano blu scuro, insolubile e fornisce quindi un'indicazione sull'integrità funzionale mitocondriale; la quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura e viene quindi essere utilizzata come misura della vitalità cellulare. I campioni vengono addizionati di una soluzione di MTT 5 mg/mL PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (100 µL /mL di terreno) filtrata su filtri da 0,20 µm. e incubati a 37°C per 3 ore. Il mezzo viene quindi rimosso e i precipitati di formazano solubilizzati mediante l'aggiunta di isopropanolo acido (alcool isopropilico 1N:HCl 1:24). Le letture vengono effettuate spettrofotometricamente a 570 nm contro bianco di HCl/isopropanolo utilizzando uno spettrofotometro Varian Cary 50 e dotato di accessorio con lettore per micro piastre.

Prove preliminari sono state effettuate in cellule coltivate in piastre da 24 pozzetti (circa 20 x 10⁵ cellule in 1 mL DMEM) in cui la proliferazione cellulare è stata valutata mediante conta delle cellule totali al microscopio. Anche se in queste condizioni l'effetto proliferativo (PE) massimo indotto da E₂ è risultato generalmente più elevato di quello osservato mediante il saggio MTT, quest'ultima metodica è stata adottata per gli esperimenti successivi in quanto rivela soltanto le cellule vive e metabolicamente attive e risulta quindi maggiormente informativa, attendibile e riproducibile rispetto alla semplice conta cellulare.

5.3.2.3. Attività agonista

Una curva standard di estrogenicità è stata costruita utilizzando 7 diverse concentrazioni di E_2 (da 10^{-14} a 10^{-8} M). L'attività estrogenica dei campioni viene espressa come Effetto Proliferativo (PE), calcolato come rapporto tra l'effetto massimo indotto dalla sostanza test e il controllo in assenza di E_2 ($PE = 1$). E_2 determina una proliferazione dose-dipendente, con effetto proliferativo massimo a 10^{-9} M (1 nM E_2), in accordo a dati di letteratura (Figura 2). Gli effetti di E_2 sono prevenuti in presenza dell'antiestrogeno 4-OHT o TAM (10^{-7} M), confermando dati bibliografici (14).

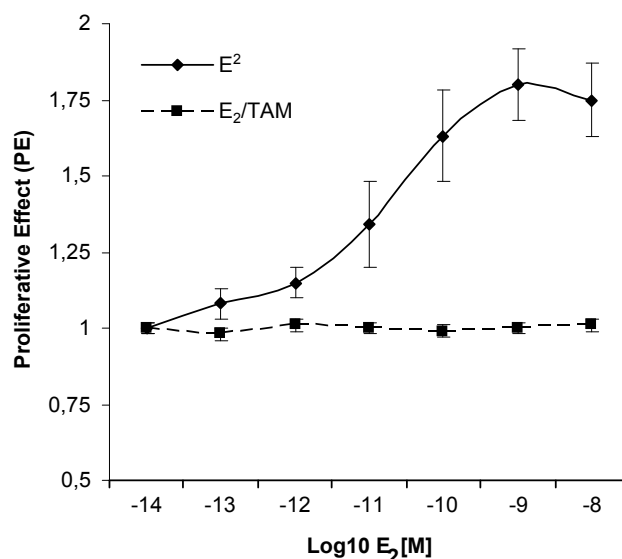


Figura 2. Curva dose-risposta del saggio di *E-screen* per il 17 β -estradiolo (E_2) nelle cellule MCF-7. I valori rappresentano la media $PE \pm DS$ di almeno 8 esperimenti in quadruplicato

5.3.2.4. Analisi statistica, sensibilità e ripetibilità del saggio

La curva è stata analizzata mediante regressione non lineare (equazione logistica a 4 parametri) (*GraphPad Prism software package*, GraphPad Inc.) come indicato dall'*American Water Works Association* (AWWA) (15). Ciò permette di esprimere i dati ottenuti con composti ad attività agonista in termini "relativamente quantitativi" ed esprimere i risultati ottenuti in PE anche in termini di EEQ ng/L.

Dall'analisi di questi dati abbiamo ottenuto il valore medio di EC_{50} per l'*E-screen* di 4,37 ng/L; tale valore è in accordo con quanto riportato utilizzando la linea di MCF-/ BUS breast cancer cells utilizzata nella messa a punto del metodo originale (11).

La sensibilità del saggio è rappresentata dalla minima concentrazione di un composto che ha la capacità di dare una risposta significativamente diversa dal bianco sperimentale (solvente etanolo 0,001%). La concentrazione più bassa di 17 β -estradiolo alla quale si è prodotta una risposta valutabile come positiva è stata inferiore a 1 ng/L. La ripetibilità del saggio è stata valutata su almeno 8 determinazioni del PE della curva di 17 β -estradiolo in quadruplicato, ottenute in esperimenti diversi e tempi diversi.

Le procedure e le analisi statistiche effettuate sono in linea con quelle descritte dall'AWWA (15).

5.3.2.5. Attività antagonista

Parallelamente, il test di *E-screen* può essere utilizzato anche per la valutazione dell'Antiestrogenicità di un campione. L'attività antagonista viene misurata come percentuale di inibizione dell'effetto proliferativo massimo indotto dall'E₂ da parte di un campione. Come sostanza antagonista di riferimento abbiamo utilizzato il Tamoxifene che produce, come mostrato in Figura 2, la totale inibizione (100%) dell'effetto proliferativo di E₂.

Il saggio si effettua in presenza di E₂ alla concentrazione in cui si ottiene il PE massimo (10⁻⁹ M) e del campione da testare in quadruplicato. In parallelo per ogni esperimento si effettua la curva standard di E₂ come controllo positivo e un set di campioni in quadruplo addizionati di E₂ (10⁻⁹ M) e Tamoxifen 100 nM come controllo negativo. Per ogni campione ignoto si può calcolare il:

$$\text{Relative Proliferative Effect (RPE): } 100 \times [(\text{PE} - 1) \text{ sostanza test}] / [(\text{PE} - 1) \text{ estradiolo}]$$

Per esempio, analogamente a quanto descritto per il RIE nello *YES assay*:

$$\text{E}_2 \text{ 1nM} = \text{RPE } 100\%$$

$$\text{E}_2 + \text{campione} = \text{RPE } 85\%$$

Questo significa che il composto ha inibito per un 15% l'attività enzimatica inducibile da 1 nM di estradiolo.

5.3.2.6. Solvente

I campioni analizzati in questo studio erano disciolti in metanolo (MeOH). Tale solvente non ha mostrato indurre tossicità cellulare né produrre interferenze sperimentali in un ampio intervallo di concentrazioni.

5.3.2.7. Sensibilità del metodo agli analiti standard oggetto di studio

Effetto proliferativo del bisfenolo A e del 4-nonilfenolo (NP)

Per confronto, abbiamo valutato l'effetto di un modello di IE ad azione estrogenica, il bisfenolo A (Sigma). Dai risultati riportati in Figura 3, il bisfenolo A induce un PE dose dipendente a partire dalla concentrazione 10⁻⁶ M.

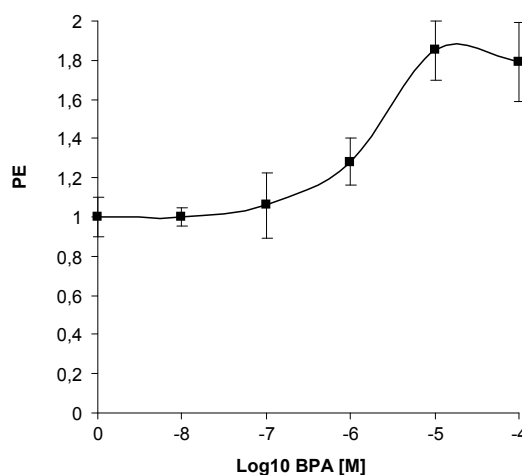


Figura 3. Curva dose-risposta del saggio di E-screen per il bisfenolo-A nelle cellule MCF-7.
I valori rappresentano la media PE±DS di almeno 4 esperimenti in quadruplicato

Il massimo dell'attività proliferativa, confrontabile con quella di E_2 10^{-9} M, si osserva per il bisfenolo A alla concentrazione 10^{-5} M ($p = <0,01$), quindi a una concentrazione circa 10.000 volte inferiore, confermando dati bibliografici ottenuti mediante la stessa metodica (13). La concentrazione più bassa a cui è stato osservato un effetto significativo è risultata inferiore a 3000 ng/L (3 ppb). Simili risultati sono stati ottenuti con il 4-nonilfenolo (dati non riportati). Tali osservazioni sono in linea con quanto riportato in AWWA Report (15).

Confronto tra l'effetto proliferativo di E_2 e IE singolarmente e in miscela binaria

Studi condotti su miscele di IE ad azione estrogenica indicano che la presenza di alcuni alchilfenoli (4-NP e 4t-NP) determina effetti antagonisti nell'*E-screen assay* (16). Secondo gli autori, gli effetti antagonisti osservati nell'*E-screen* sono attribuibili a effetti citotossici di certi composti che possono non essere ugualmente rilevabili in saggi basati sulla valutazione dell'espressione genica, come lo *YES assay*, o l'induzione della vitellogenina in cellule di pesce. Questo tipo di interferenza deve essere considerata quando si analizzano mediante *E-screen assay* campioni ambientali che possono contenere miscele di IE.

Pertanto, sono stati testati gli effetti di E_2 e 4-nonilfenolo-NP (Sigma), sia singolarmente che in miscela binaria, addizionati alle cellule a concentrazioni equimolari 10^{-10} e 10^{-9} .

I dati ottenuti sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4. Effetto proliferativo (PE) di E_2 e NP singolarmente e in miscela binaria. I valori rappresentano la media $PE \pm DS$ di almeno 4 esperimenti in quadruplicato.

B	$E_2 10^{-10}$	$E_2 10^{-9}$	NP 10^{-10}	NP 10^{-9}	$E_2 + NP 10^{-10}$	$E_2 + NP 10^{-9}$
1	1,32* $\pm$ 0,11	1,68* $\pm$ 0,2	1,04 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,29	1,06 $\pm$ 0,2	1,23* $\pm$ 0,14

* $p < 0.001$ Campione vs Bianco Mann-Whitney U test

Come precedente osservato e in accordo a dati bibliografici, il NP da solo, a concentrazioni confrontabili con quelle di E_2 (10^{-10} e 10^{-9} M), non determina effetti proliferativi nel saggio di E-screen. È interessante notare però, che quando aggiunto in miscela binaria con E_2 , a concentrazioni equimolari, il NP annulla o diminuisce significativamente l'effetto proliferativo dell'estradiolo, rispettivamente, alle concentrazioni di 10^{-10} e 10^{-9} M, confermando le osservazioni riportate in letteratura.

5.4. Valutazione dell'attività di interferenza endocrina espressa da estratti di acque grezze e trattate: quattro campagne di monitoraggio

Per la valutazione dell'attività di interferenza endocrina in campioni estratti di acqua grezza e trattata sono stati utilizzati lo *Yes assay* e l'*E-screen assay*.

5.4.1. YES assay

5.4.1.1. Attività agonista

In funzione della curva dose-risposta dello standard di riferimento, l'estrogeno naturale 17β -estradiolo (E_2), si propongono i limiti analitici da utilizzare per l'interpretazione dei risultati ottenuti con *Yeast Estrogen Screen* (YES) assay:

- LOD: può essere indicato per ciascun analita
- LOR: è da considerarsi decisamente estrogenico il campione che elicit una attività estrogenica relativa (RIE) maggiore del 10%
- LOQ: valore teorico espresso in Equivalenti di Estradiolo (EEQ ng/L) presenti in un campione ad esempio estratto di acqua. Può essere calcolato per ciascun punto sperimentale facendo riferimento alla curva standard di E_2 . Un teorico valore di EEQ nell'originale volume d'acqua da cui deriva l'estratto può essere calcolato tenendo conto dei fattori di concentrazione (SPE) e diluizione per la realizzazione dei punti sperimentali nel test.

Gli estratti dei campioni di acqua sono stati analizzati a diverse diluizioni corrispondenti a diverse concentrazioni del campione reale. I risultati presentati e valutati si riferiscono alla concentrazione 2x. Sono state evidenziate differenze significative di qualità (per presenza di IE estrogeno-mimetici) dell'acqua grezza di cui si approvvigionano i 6 impianti, in particolar modo un impianto processa acque che già in origine non contengono composti che hanno rilevanza biologica dal punto di vista di interferenza endocrina di tipo agonista (4 campagne di monitoraggio, RIE media $5,49 \pm 3,4$) in *YES assay*.

Pur tenendo conto dei limiti che il campionamento istantaneo comporta e dei limiti connessi alla stagionalità diversa in cui sono stati effettuati i campionamenti, i valori di RIE più alti rilevati nei campioni di acqua trattata destinata al consumo umano consentono di affermare che l'acqua erogata all'utenza dai sei impianti campione presumibilmente conteneva IE con attività simil-estrogenica in quantità compresa tra 0,075 e 0,545 ng/L (un solo campione su 16) di EEQ, valori questi teorici calcolati tenendo conto dei fattori di concentrazione della matrice idrica e diluizione dell'estratto nell'esecuzione del test.

È rilevante l'osservazione che nel complesso il 79% dei campioni esaminati di acqua erogata dagli Enti conteneva meno di 0,075 ng/L di EEQ (Figura 4).

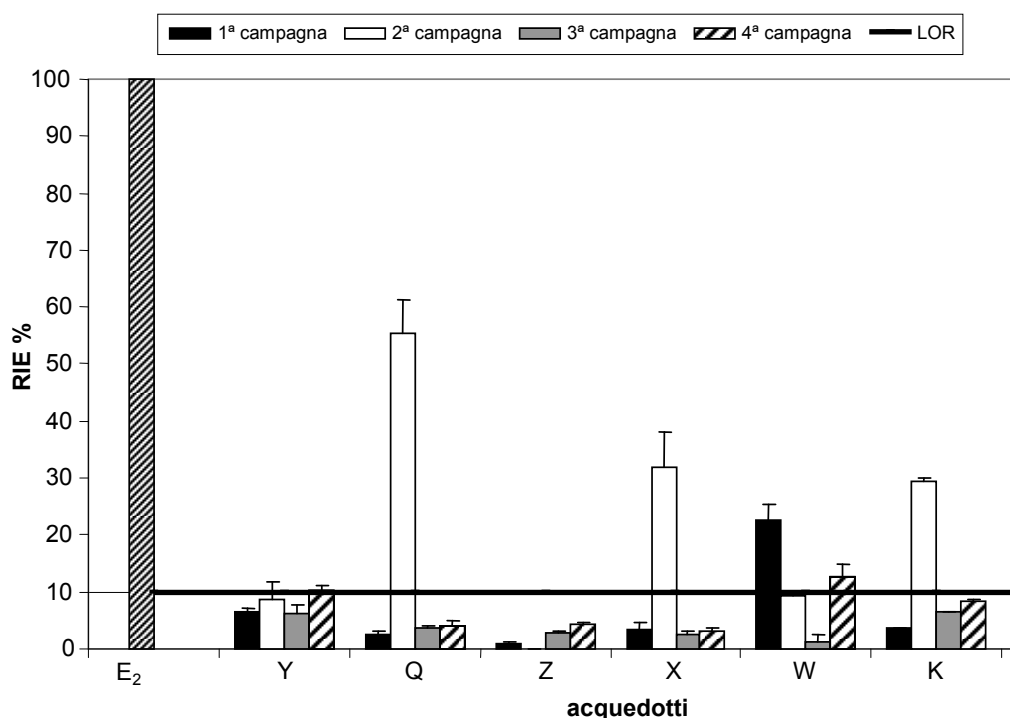


Figura 4. Attività agonista (RIE%) espressa da estratti di acque erogate in rete da sei enti acquedottistici in funzione dello standard di riferimento 17 β -estradiolo (E_2)

Nei casi in cui l'acqua grezza presentava un medio grado di contaminazione da IE estrogeno mimetici, il trattamento è stato parzialmente efficace nel rimuovere tali contaminanti

La seconda campagna di monitoraggio ha fornito i campioni più contaminati da composti ad attività agonista e alcuni hanno manifestato essere debolmente tossici per il lievito; invece, i campioni della terza campagna, invece, sono stati caratterizzati da un minor grado di contaminazione.

5.4.1.2. Attività antagonista

Per quanto riguarda l'attività antagonista rilevata negli estratti di campioni di acqua di approvvigionamento e di acqua trattata in uscita dagli impianti si può osservare che il trattamento di potabilizzazione, in funzione dei processi attuati, può arricchire la matrice idrica di contaminanti tecnologici attivi come antagonisti del 17 β -estradiolo.

5.4.2. E-screen assay

5.4.2.1. Attività agonista

I campioni sono stati analizzati a diverse diluizioni (1:100, 1:50, 1:10, corrispondenti a concentrazioni di 20x, 40x, 200x). Diluizioni inferiori a 200x non hanno permesso di evidenziare attività estrogenica in nessuno dei campioni analizzati. Pertanto, i dati riportati sono stati ottenuti utilizzando i campioni a una concentrazione finale di 200x. Nella Figura 5 sono riportati i valori di PE ottenuti per i 6 diversi enti in quattro cicli di campionamento (I-IV campagna) e per 5 enti in tre campagne (II-IV). Un'attività estrogenica significativa è stata riscontrata solo in alcuni campioni della II e IV campagna. La terza campagna di monitoraggio ha fornito i campioni caratterizzati da un minor grado di contaminazione. In alcuni casi sporadici, i campioni hanno mostrato un certo grado di tossicità (inibizione della crescita cellulare, indicata da un PE<1) ascrivibile alla presenza di analiti non determinati, tra cui possibili contaminanti tecnologici.

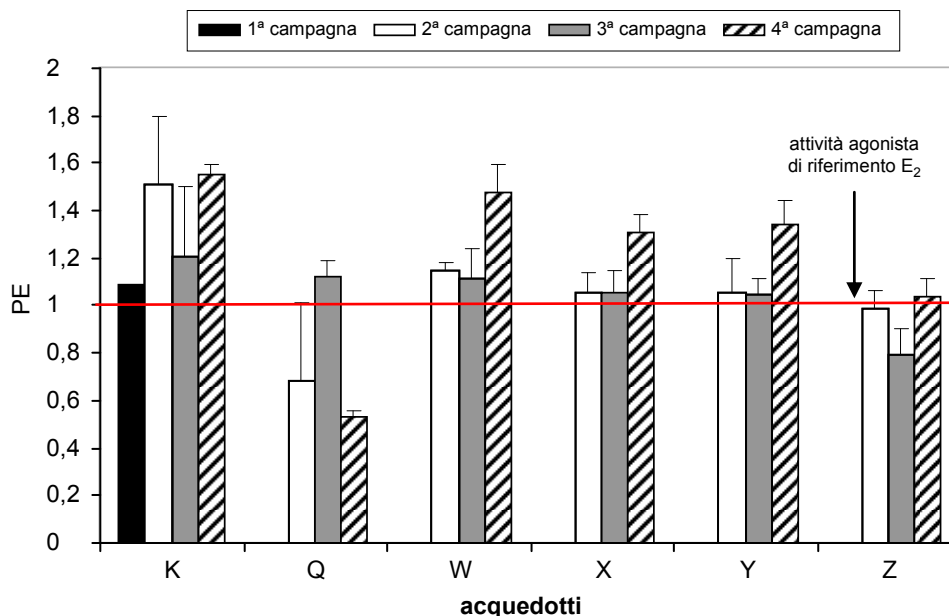


Figura 5. Attività agonista (PE) espressa da estratti relativi alle acque erogate in rete da sei enti acquedottistici in 4 campagne di campionamento

Gli EEQ (espressi in ng/L) dei campioni incogniti sono stati calcolati dall'equazione ottenuta precedentemente in base ai dati di PE della curva standard di estrogenicità di E₂, e corretti per la diluizione del campione utilizzata nell'*E-screen* (1:10) e per la concentrazione dei campioni durante la procedura di estrazione (x2000), secondo quanto illustrato da Arnold *et al.* (5). I risultati ottenuti indicano che, anche nei campioni in cui è stata riscontrata una attività estrogenica (agonista) questa, quando espressa in EEQ, risulta comunque pari o inferiore a 0,06 ng/L.

I valori rappresentano la media PE $\pm$ DS di almeno 2 esperimenti in quadruplicato

5.4.2.2. Attività antagonista

Per quanto riguarda l'attività antagonista rilevata nei campioni di acqua prelevata in entrata e in uscita dagli impianti si può osservare che il trattamento di potabilizzazione, in funzione dei processi attuati, può arricchire o privare la matrice idrica di contaminanti tecnologici attivi come antagonisti del 17 β -estradiolo.

In generale, i risultati ottenuti utilizzando il test biologico di *E-screen* indicano che i campioni di acqua analizzati provenienti dai diversi enti hanno mostrato una attività estrogenica trascurabile nei campioni sia in entrata che in uscita. Alcuni campioni, a seconda dell'ente di provenienza e del ciclo di campionamento, hanno mostrato effetti debolmente tossici o anti-estrogenici.

A tale proposito bisogna considerare il possibile effetto del trattamento di potabilizzazione. Per esempio, è stato osservato che il trattamento di clorazione delle acque potrebbe determinare variazioni nell'estrogenicità dei campioni attraverso processi di ossidazione di diversi IE ad azione estrogenica/antiestrogenica (17). Al tempo stesso, la tossicità di campioni di acque trattate potrebbe essere dovuta alla presenza di composti organo clorurati (18).

5.5. Considerazioni generali

I test biologici *in vitro* YES assay e *E-screen* assay sono risultati di utilità per caratterizzare i composti chimici, selezionati per lo studio in oggetto, in funzione della loro capacità di interagire con i recettori estrogenici umani e indurre una risposta biologica misurabile con il saggio utilizzato.

Per quanto riguarda la matrice acqua nel suo complesso, va ricordato che un bio-assay offre una misura integrata della potenza estrogenica di una miscela ambientale, senza conoscerne i singoli costituenti. Pertanto, tali test non sono idonei qualora si voglia identificare l'attività biologica di singoli analiti ignoti costituenti una miscela; è invece rilevante il loro uso nell'indirizzare l'analisi chimica per definire quali frazioni di miscele possono essere biologicamente attive e quindi nel coadiuvare il chimico nella scelta degli analiti da ricercare tra i costituenti della frazione attiva.

I test biologici di estrogenicità breve termine *in vitro* sono ritenuti dalla comunità scientifica internazionale di grande significato biologico se applicati a singoli analiti, poiché forniscono notizie su attitudini comportamentali delle molecole e sulle loro possibili conseguenze sui sistemi biologici, contribuendo a scelte decisionali per applicare a monte della catena produttiva il principio di precauzione; ove utilizzati su matrici complesse, come quelle ambientali o alimentari, possono fornire utili indicazioni per una valutazione dell'esposizione della popolazione a IE estrogeno-mimetici.

Essi costituiscono quindi un valido approccio per uno screening di primo livello per valutare complessivamente l'acqua erogata in rete in base a teorici valori di EEQ. L'applicazione di

questi test potrebbe contribuire ad elaborare categorie di qualità dal punto di vista dell'interferenza endocrina estrogeno mimetica. Inoltre, specificatamente per le acque destinate al consumo umano, possono costituire un valido strumento sperimentale per valutare l'efficacia delle tecnologie di trattamento impiegate nell'abbattere le concentrazioni di IE presenti in acque grezze, così pure per valutare l'efficacia della disinfezione finale nell'ossidare/eliminare l'eventuale residua presenza di IE.

A tale proposito, va sottolineato che il presente studio rappresenta il primo esempio di applicazione dei test biologici di estrogenicità a campioni di acqua potabile erogati da diversi Enti acquedottistici in Italia. I risultati ottenuti pongono una base importante per un confronto con altre realtà europee.

Bibliografia

1. Liu JW, Picard D. Bioactive steroids as contaminants of the common carboun source galactose. *FEMS Microbiol Lett* 1998;159:167-71.
2. Pinto B, Picard D, Reali D. A recombinant yeast strain as a short term bioassay to assess estrogen-like activity of xenobiotics. *Ann Ig* 2004;16:579-85.
3. Garritano S, Pinto B, Calderisi M, Cirillo T, Amodio Cocchieri R, Reali D. Estrogen like activity of seafood related to environmental chemical contaminants. *Environ Health* 2006;5:9-19.
4. Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF, *et al.* Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 1999;107:89-108.
5. Arnold SF, Robinson MK, Notides AC, Guillette LJ Jr, McLachlan JA. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 1996;104:544-47.
6. Petit F, Le Goff P, Cravedi J-P, Valotaire Y, Pakdel F. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen screen receptor and trout hepatocyte cultures. *J Mol Endoc* 1997;19:321-35.
7. Diel P, Smolnikar K, Michna H. *In vitro* test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Med* 1999;65:197-203.
8. Ahn EM, Nakamura N, Akao T, Nishihara T, Hattori M. Estrogenic and antiestrogenic activities of the roots of *Moghania philippinensis* and their constituents. *Biol Pharm Bull* 2004;4:548-53.
9. Liu JW, Jeannin E, Picard D. The anti-estrogen hydroxytamoxifen is a potent antagonist in a novel yeast system. *Biol Chem* 1999;380:1341-45.
10. Pinto B, Reali D. Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212:228-32.
11. Soto AM, Sonnenschein, Chung KL, Fernandez Olea MF, Olea-Serrano N. The E- Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995;103 (7):113-22.
12. Walsh DE, Dockery P, Doolan CM. Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on [Ca²⁺]_i in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005;230:23-30.
13. Körner W, Hanf V, Schulle W, Bartsch H, Zwirner M, Hagenmaie H. Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere* 1998;37:2395-407.
14. Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.

15. Awwa Research Foundation. *Toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in drinking water*. Awwa Research Foundation; 2008. Disponibile all'indirizzo: http://environmentalhealthcollaborative.org/images/91238_Toxicological_Relevance.pdf; ultima consultazione 4/10/11.
16. Rajapakse N, Silva E, Scholze M, Kortenkamp A. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-Nonylphenol and 4-tert-Octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ Sci Technol* 2004; 38:6343-52.
17. Westerhoff P, Yoon Y, Snyder S, Wert E. 2005. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ Sci Technol* 2005;39:6649-63.
18. Nieuwenhuijsen MJ, Martinez D, Grellier J, Bennett J, Best N, Iszatt N, Vrijheid M, Toledano MB. Chlorination disinfection by-products in drinking water and congenital anomalies: review and meta-analyses. *Environ Health Perspect* 2009;117:1486-93.

CONCLUSIONI

Laura Achene (a), Sara Bogialli (b), Laura Canesi (c), Marina Di Carro (d), Giorgia Di Pofi (d), Rita Fabbri (c), Emanuele Magi (d), Federica Nigro Di Gregorio (a, e), Franca Palumbo (f), Paola Pettine (a), Enrico Raffo (f), Daniela Reali (g), Katy Sanfilippo (g), Giuliano Ziglio (h)
(a) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*
(b) *Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova, Padova*
(c) *Dipartimento per lo studio del territorio e delle sue risorse, Università di Genova, Genova*
(d) *Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Genova, Genova*
(e) *Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università "Sapienza" di Roma, Roma*
(f) *Fondazione AMGA, Genova*
(g) *Dipartimento di Patologia Sperimentale biotecnologie mediche, infettivologia, epidemiologia, Università di Pisa, Pisa*
(h) *Dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale dell'Università degli Studi di Trento, Trento*

L'evidenza di un'associazione fra esposizione a sostanze in grado di interagire con il sistema endocrino – Interferenti Endocrini, IE – e patologie umane quali infertilità e poliabortività, disturbi neuro comportamentali o pubertà precoce ha indirizzato, negli anni recenti, molteplici attività di ricerca ad approfondire le conoscenze sulle potenziali vie e modalità di esposizione della popolazione a tali sostanze.

Il quadro delle conoscenze, sul piano internazionale, indica il consumo di prodotti alimentari come principale fonte di esposizione a interferenti mentre, sulla base dei dati disponibili, si ritiene che l'acqua potabile dia un apporto piuttosto modesto. Risultati di monitoraggi condotti in diversi paesi rilevano che nelle acque distribuite gli IE possono essere presenti a concentrazioni di ng/L in forza della contaminazione dei corpi idrici di origine delle acque o, per alcune di queste sostanze, come nel caso di ftalati e alchilfenoli, come residuo di cessioni da materiali a contatto utilizzati nella filiera di potabilizzazione e distribuzione. È stato altresì evidenziato che alcuni comuni procedimenti di potabilizzazione, quali filtrazione, flocculazione e disinfezione, non sempre rappresentano una efficace barriera per gli IE, mentre altre tecniche, come l'assorbimento su carboni attivi, l'ozonizzazione e la filtrazione su membrana, possono fornire risultati migliori in termini di abbattimento dei composti presenti nelle acque grezze.

Su tali basi, considerando anche la limitata rappresentatività dei dati e lo stato recente della ricerca inadeguato a stabilire, per molte sostanze, i livelli soglia che presiedono a eventuali effetti dannosi per l'uomo, non sono state intraprese, ad oggi, azioni normative espressamente rivolte al monitoraggio degli IE nelle acque destinate a consumo umano. In fase di preparazione della corrente direttiva sulla qualità delle acque destinate al consumo umano (Direttiva 98/83/CE) è stato, infatti, considerato che non esistono "sufficienti certezze su cui basarsi per fissare valori parametrici a livello comunitario per i prodotti chimici nocivi per il sistema endocrino". A più di quindici anni dall'emanazione della direttiva, nel corso di un complesso processo di revisione, è stato proposto che la potenziale contaminazione da IE sia gestita sulla base dei criteri indicati nei *Water Safety Plans* proposti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per la valutazione e gestione dei rischi nella filiera di produzione delle acque destinate al consumo umano.

In tale contesto risultava necessario e urgente approfondire lo stato delle conoscenze sul ruolo delle acque destinate al consumo umano quale possibile fonte di esposizione agli IE in Italia, esigenza cui lo studio promosso da Fondazione AMGA presentato ha dato, in via preliminare, alcune importanti risposte.

Al fine di considerare matrici a più elevata contaminazione ambientale e definire uno scenario dei rischi rappresentativo del territorio nazionale, le indagini sono state condotte su alcune tipologie di acque superficiali, differenti per provenienza geografica e per consistenza e composizione del carico antropico, sottoposte a trattamenti convenzionalmente utilizzati nella filiera produttiva delle acque destinate al consumo umano. Le sostanze oggetto di indagine sono state selezionate sulla base delle informazioni scientifiche emesse in sede di UE, comprendendo composti con accertata attività di interferente endocrino quali 17 α -etinilestradiolo, 17 β -estradiolo; estrone, bisfenolo A, 4-tert-octilfenolo e nonilfenolo.

In considerazione degli obiettivi dello studio che richiedevano la determinazione degli analiti a livello di traccia, da condurre in parallelo su matrici acquose prelevate allo stato naturale, caratterizzate da una notevole variabilità e su acque sottoposte a trattamenti chimico-fisici di potabilizzazione, è stato sviluppato e validato un metodo analitico altamente specifico e sensibile basato su estrazione in fase solida e separazione in LC accoppiata a rivelazione in spettrometria di massa tandem. Le fasi critiche del metodo, in particolare la procedura estrattiva e di preconcentrazione degli IE sono state sottoposte a validazione mediante circuito interlaboratorio. Il metodo presenta caratteristiche idonee per essere proposto come metodo ufficiale per la determinazione di IE in acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001.

I test biochimici di estrogenicità, sviluppati e validati nell'ambito del progetto, sono ritenuti dalla comunità scientifica internazionale di importante significato biologico se applicati a singoli analiti, poiché forniscono notizie sulle modalità di azione e sugli effetti delle molecole nei sistemi biologici esposti, fornendo elementi decisionali essenziali nel contesto del principio di precauzione; se utilizzati su matrici complesse, come quelle ambientali o alimentari, possono fornire utili indicazioni per una valutazione dell'esposizione della popolazione a IE estrogeno-mimetici. Essi costituiscono quindi un valido approccio in fase di screening per valutare complessivamente il potenziale effetto di interferenza endocrina dell'acqua erogata in rete in base a teorici valori di EEQ. L'applicazione di questi test potrebbe contribuire ad elaborare categorie di qualità dell'acqua destinabile alla potabilizzazione dal punto di vista dell'interferenza endocrina estrogeno mimetica. Inoltre, specificatamente per le acque destinate al consumo umano, i test biologici di estrogenicità possono costituire un valido strumento sperimentale per valutare l'efficacia delle tecnologie di trattamento impiegate nell'abbattere le concentrazioni di IE presenti in acque grezze, come pure per valutare l'efficacia della disinfezione finale nell'ossidare/eliminare l'eventuale residua presenza di IE. A tale proposito, va sottolineato che il presente studio rappresenta il primo esempio di applicazione dei test biologici di estrogenicità a campioni di acqua potabile erogati da diversi Enti acquedottistici in Italia. I risultati ottenuti pongono una base importante per un confronto con altre realtà europee.

Relativamente ai risultati delle campagne di monitoraggio effettuate nel corso del progetto, i livelli di contaminazione delle acque prima della potabilizzazione sono risultati nel complesso trascurabili, tenendo conto dei dati e limiti di tossicità disponibili per i diversi composti; l'estrogeno più spesso riscontrato è stato il 17 β -estradiolo, mentre l'estrone e il 17 α -etinilestradiolo sono stati rilevati sporadicamente. Frequente è la contaminazione da bisfenolo A e nonilfenolo mentre l'octilfenolo è risultato presente a livelli non significativi.

Nel complesso, i livelli di contaminazione delle acque superficiali evidenziati nello studio sono risultati sostanzialmente in linea con il range di valori riscontrati a livello europeo e, per quanto limitatamente rappresentativi e limitati ad alcuni composti, non hanno evidenziato rischi significativi correlabili al consumo. Per quanto riguarda le acque in uscita dai potabilizzatori si è osservato in generale un pressoché totale abbattimento delle sostanze riscontrate in entrata, dimostrando un'elevata efficacia dei trattamenti.

APPENDICE A

**Metodo analitico LC/MS/MS
per la determinazione di interferenti endocrini
in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano**

Sara Bogialli (a), Federica Nigro Di Gregorio (b, c), Giorgia Di Pofi (d)

(a) Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova, Padova

*(b) Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco,
Università "Sapienza" di Roma, Roma*

*(c) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) Dipartimento di Chimica, Università di Tor Vergata, Roma

A.1. Campo di applicazione

La procedura è applicabile per l'estrazione di estrogeni (17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo) e alchilfenoli (4-octilfenolo, nonilfenolo) e bisfenolo A da acque da destinare e destinate al consumo umano ai fini della determinazione degli analiti mediante cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem (LC/MS/MS).

A.2. Principio del metodo

Il campione di prova, del volume di 1 L, viene sottoposto ad estrazione in fase solida (SPE), utilizzando come materiale adsorbente un copolimero divinilbenzene/N-vinilpirrolidone per la preconcentrazione degli analiti (rapporto di concentrazione 2000:1).

Come standard di processo viene utilizzato il β -estradiolo d₃ (β -estradiolo trideuterato).

Gli analiti estratti sono successivamente separati, rivelati e quantificati mediante LC/MS tandem impiegando come sistema di rivelazione uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, equipaggiato con una interfaccia a pressione atmosferica. La misura si basa sull'intensità dei segnali ionici relativi a due transizioni ione pseudo-molecolare > ione frammento degli analiti.

A.3. Interferenze e cause di errore

Molti degli analiti oggetto di determinazione presentano diffusione ubiquitaria. Principali sorgenti di contaminazione e interferenze sono costituite da solventi, reagenti, materiali plastici utilizzati direttamente o indirettamente a contatto con il campione.

È stata in particolare evidenziata contaminazione da alchilfenoli, principalmente nonilfenolo ascrivibile ai materiali utilizzati per le fasi di preparazione dei campioni (es. flaconi, contenitori, provette, cartucce, tubazioni e altro). Si raccomanda pertanto di utilizzare preferibilmente materiali inerti, sostituendo i materiali plastici con materiali in polietilene (PE), (*fluorinated ethylene propylene*) –Teflon od, eventualmente, con vetro trattato preventivamente con misto cromatico.

Tutti i materiali, prima del loro uso, devono essere accuratamente lavati e risciacquati in successione con acqua di rubinetto, acetone (A.5.1.3) e metanolo (A.5.1.2).

A.4. Vetreria, materiali e attrezzature di base

Attrezzatura di uso comune in laboratorio e:

- A.4.1. Recipienti in PE, FEP-Teflon o vetro da 1 L idonei anche per il trasferimento del campione al sistema di estrazione SPE (A.4.4) Si raccomanda di non utilizzare recipienti in policarbonato a causa della potenziale contaminazione con bisfenolo A
- A.4.2. Filtri in fibra di vetro da 0,45 μ m, di diametro adatto a sistema filtrante
- A.4.3. Microsiringhe in vetro
- A.4.4. Cartucce SPE tipo HLB (Waters, Supelco; 200 mg/6cc, 60 μ m)
- A.4.5. Sistema per estrazione SPE, per estrazioni singole o multiple, completo di pompa da vuoto idoneo all'uso di solventi, sistema di regolazione del flusso per singola postazione, manometro e accessori
- A.4.6. Sistema di evaporazione sotto flusso di argon o azoto
- A.4.7. Beuta in PE, FEP- Teflon o in vetro da 50 mL
- A.4.8. Beuta in PE, FEP- Teflon o in vetro da 1 L
- A.4.9. Provette o *vial* per il recupero dell'eluato, preferibilmente in PE, FEP-Teflon o in vetro, da 10-20 mL

- A.4.10. Evaporatore rotante (in alternativa al sistema di evaporazione sotto flusso di gas)
- A.4.11. Matraccio tarato preferibilmente in PE, FEP-Teflon o in vetro da 1 L
- A.4.12. Matraci tarati preferibilmente in PE, FEP-Teflon o in vetro da 50 mL
- A.4.13. Sistema filtrante assistito da pompa da vuoto
- A.4.14. Pipette in vetro tarate classe A

A.5. Reagenti e materiali di riferimento

A.5.1. Reagenti e standard

Utilizzare reagenti di grado RS (HPLC) o superiore e materiale di riferimento al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

- A.5.1.1. Acqua ultrapura esente da tracce di analita (resistenza $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, TOC $\geq 2 \text{ ng/L}$) purificata mediante il sistema MilliQ Plus (Millipore, Bedford, MA, USA) con cartucce EDS-Pak o prodotto analogo; alternativamente è possibile utilizzare acqua ultrapura di grado RS venduta commercialmente in bottiglie
- A.5.1.2. Metanolo Carlo Erba (Milano, Italia) o prodotto analogo
- A.5.1.3. Acetone Carlo Erba (Milano, Italia) o prodotto analogo
- A.5.1.4. Acetato di etile Carlo Erba (Milano, Italia) o prodotto analogo
- A.5.1.5. Miscela acqua:metanolo, 50:50 (v/v): prelevare 500 mL di metanolo (A.5.1.2) e 500 mL di acqua (A.5.1.1), riunire in una beuta (A.4.5) e miscelare accuratamente
- A.5.1.6. Miscela metanolo:acetone:acetato di etile 2:2:1 (v/v/v): prelevare 200 mL di metanolo (A.5.1.2), 200 mL di acetone (A.5.1.3) e 100 mL di acetato di etile (A.5.1.4), riunire in una beuta (A.4.6) e miscelare accuratamente
- A.5.1.7. Standard di processo: β -estradiolo d_3 , 98 atom % d (Sigma-Aldrich), o prodotto analogo
- A.5.1.8. Analiti: 17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-tert-octilfenolo, nonilfenolo, minimo 98%, Sigma-Aldrich
- A.5.1.9. Azoto o argon ultrapuro
- A.5.1.10. Acido cloridrico grado tecnico
- A.5.1.11. Tiosolfato di sodio
- A.5.1.12. Ammoniaca al 30% grado tecnico

A.5.2. Soluzioni standard di lavoro

- A.5.2.1. Soluzione primaria di β -estradiolo d_3 (1 g/L)
 - A.5.2.1.1. Pesare 50,0 mg di materiale standard di β -estradiolo d_3 (A.5.1.7.)
 - A.5.2.1.2. Trasferire quantitativamente il materiale standard (A.5.2.1.1.) in un matraccio tarato da 50 mL (A.4.12.), portando a volume con metanolo (A.5.1.2.), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 1 g/LDopo la preparazione la soluzione è conservata a $5\pm 3^\circ\text{C}$ ed è stabile per almeno 3 mesi.
- A.5.2.2. Soluzione secondaria di lavoro di β -estradiolo d_3 (100 $\mu\text{g/L}$)
Prelevare con una micro siringa (A.4.3.) 100 μL della soluzione primaria di standard di processo (A.5.2.1.), trasferire in matraccio da 1 L (A.4.11.) e portare a volume con metanolo (A.5.1.2.)
- A.5.2.3. Soluzione primaria degli analiti (1 g/L)
 - A.5.2.3.1. Pesare 50 mg di materiale standard di ciascuno degli analiti selezionati (A.5.1.8.)
 - A.5.2.3.1. Trasferire quantitativamente il materiale standard (A.5.2.3.1.) in un matraccio tarato da 50 mL (A.4.12.), portando a volume con metanolo (A.5.1.2.), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 1 g/LDopo la preparazione la soluzione è conservata a $5\pm 3^\circ\text{C}$ ed è stabile per almeno 3 mesi

- A.5.2.4. Soluzione secondaria di riferimento composita (100 µg/L)
Prelevare con una microsiringa (A.4.3) 100 µL di ciascuna delle soluzioni primarie degli analiti (A.5.2.3.), trasferire in matraccio da 1 L (A.4.11.) e portare a volume con metanolo (A.5.1.2.)
- A.5.2.5. Preparazione delle soluzioni secondarie di riferimento composite per le curve di taratura
Le soluzioni secondarie di riferimento composite (A.5.2.4) contenenti una miscela di 17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo, nonilfenolo insieme con lo standard di processo β -estradiolo d₃ (A.5.2.2) in concentrazione nota vengono utilizzate per la preparazione delle curve di taratura.
La preparazione delle soluzioni secondarie di riferimento composite viene eseguita sulla base dello schema riportato in Tabella A1 (*vedi* sezione A.6.4) operando come segue:
A.5.2.5.1. per ciascun livello di taratura viene prelevato un volume noto dalla soluzione secondaria di riferimento composita (A.5.2.4) e trasferito nel bianco campione per raggiungere la concentrazione finale prevista dai livelli di taratura programmati (almeno 5 punti)

A.6. Preparazione dei campioni di prova, bianchi campione, campioni per la curva di taratura

A.6.1. Preparazione campioni di prova per acque superficiali

- A.6.1.1. Trasferire 1 L di campione in recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1);
- A.6.1.2. Aggiungere al campione (6.1.1) 500 µL della soluzione secondaria di lavoro (A.5.2.2.) pari a 50 ng dello standard di processo, utilizzando una microsiringa (A.4.3.);
- A.6.1.3. Se necessario, filtrare i campioni con filtri in fibra di vetro da 0,45µm (A.4.2), altrimenti procedere al punto A.6.1.6;
- A.6.1.4. Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1)
- A.6.1.5. Lavare il particolato trattenuto dal filtro con 10 mL di metanolo (A.5.1.2) al fine di rimuovere eventuali analiti trattenuti in esso, e trasferire la miscela nel campione;
- A.6.1.6. Attivare una cartuccia (A.4.4.) con 5 mL di metanolo (A.5.1.2) e 5 mL di acqua (A.5.1.1.)
- A.6.1.7. Far passare il campione attraverso la cartuccia ad un flusso non superiore a 10 mL/min, scartando il percolato
- A.6.1.8. Lavare la cartuccia con 5 mL di acqua (A.5.1.1.) ad un flusso non superiore a 10 mL/min, scartando il percolato;
- A.6.1.9. Eluire lentamente (goccia a goccia) gli analiti trattenuti dalla fase stazionaria con 6 mL di miscela metanolo:acetone:acetato di etile 2:2:1 (A.5.1.6.) in una provetta o *vial* (A.4.9); sebbene l'eluizione degli analiti possa essere eseguita in tempi brevi (ca. 30 min) dopo il lavaggio (A.6.1.8) è preferibile attendere l'essiccazione della fase adsorbente (ca. 30 minuti) per ridurre la fase acquosa nell'eluato;
- A.6.1.10. Evaporare l'eluato (A.6.1.9.) a temperatura $\leq 50^{\circ}\text{C}$ sotto moderato flusso di gas inerte azoto o argon rimuovendo la fase liquida fino ad un volume pari a circa 100 µL; l'evaporazione dell'eluato può alternativamente essere eseguita in rotovapor (A.4.10.);
- A.6.1.11. Riprendere il residuo (A.6.1.10) con 0,4 mL di miscela acqua:metanolo 50:50 (A.5.1.5.)
- A.6.1.12. Prelevare un aliquota dell'estratto (A.6.1.11) con microsiringa da 20 µL (A.4.3) e iniettare al sistema LC/MS tandem (sezione A.7).

A.6.2. Preparazione campioni di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione

- A.6.2.1. Trasferire 1 L di campione in recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1)

- A.6.2.2. Acidificare il campione a pH 3 con acido cloridrico (A.5.1.10)
- A.6.2.3. Aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (A.5.1.11)
- A.6.2.4. Attendere 1 ora
- A.6.2.5. Aggiungere al campione (A.6.2.1) 500 µL di soluzione di lavoro (A.5.2.2.) pari a 50 ng di standard di processo, utilizzando una microsiringa (A.4.3)
- A.6.2.6. Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza (A.6.1.3-A.6.1.12)

A.6.3. Preparazione del bianco campione

- A.6.3.1. Trasferire 1 L di campione di acqua oligominerale in bottiglie di vetro acquistata presso i supermercati locali in recipiente idoneo per l'estrazione SPE (4.1)
- A.6.3.2. Procedere secondo quanto descritto ai punti A.6.1.2–A.6.1.12

A.6.4. Preparazione dei campioni per la curva di taratura

- A.6.4.1. Predisporre un numero di recipienti idonei per l'estrazione SPE (A.4.1) pari ai livelli di taratura considerati e, in ciascun recipiente, trasferire 1L di bianco campione (A.6.3)
- A.6.4.2. Aggiungere a ciascun bianco campione (A.6.3) con una microsiringa (A.4.3) o una pipetta (A.4.14), un volume di soluzione secondaria di riferimento composta (A.5.2.4), secondo lo schema riportato in Tabella A1 tale da ottenere il livello di concentrazione prefissato per ogni livello di taratura. Ad esempio, per una taratura a 5 livelli (colonna A) possono essere prestabiliti campioni per la taratura aventi concentrazioni teoriche pari a 5 ng/L, 25 ng/L, 50 ng/L, 250 ng/L, 1000 ng/L (colonna B) prelevando un volume di soluzione secondaria di riferimento composta (A.5.2.4) pari al valore riportato in colonna C
- A.6.4.3. Procedere secondo quanto descritto ai punti A.6.1.2–A.6.1.12 per ciascun campione di taratura

Tabella A1. Esempio di uno schema di preparazione delle soluzioni secondarie di riferimento composite per la costruzione della curva di taratura (A.5.2.5)

A Livello di taratura	B Concentrazione corrispondente nel campione* (ng/L)	C Prelievo da soluzione secondaria di riferimento composta (A5.2.4) (mL)
1	5	0,05
2	25	0,25
3	50	0,5
4	250	2,5
5	1000	10

* valore teorico ottenuto per calcolo sulla base della procedura estrattiva adottata nel metodo

A.7. Analisi LC/MS tandem

A.7.1. Strumentazione analitica e accessori

Cromatografo liquido accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, (LC/MS/MS o LC/MS tandem), eventualmente preceduto da sistema automatico di iniezione (autocampionatore), costituito in sequenza da:

- A.7.1.1. Pompa HPLC adatta a gestire microflussi ed eluizione in gradiente binaria equipaggiata di sistema di iniezione a valvola, utilizzando microsiringhe con loop interno da 20 μ L
 - A.7.1.2. Compartimento di termostatazione per la colonna
 - A.7.1.3. Colonna a fase inversa C-18 (150 x 2,1 mm I.D. 5 μ m)
 - A.7.1.4. Analizzatore di massa a triplo quadrupolo equipaggiato con sorgente a pressione atmosferica del tipo TIS (*Turbo Ion Spray*); Il sistema TSI/MS/MS è fatto operare in modalità negativa, utilizzando aria come gas di nebulizzazione, di desolvatazione e nella cella di collisione e azoto come curtain gas.
- L'utilizzo di sorgenti di differenti tipologie può comportare la necessità di un processo di ottimizzazione dei parametri fisici e strumentali
- A.7.1.5. Sistema di acquisizione ed elaborazioni dati

A.7.2. Fase mobile

La fase mobile è costituita da acqua ultra pura e metanolo, entrambi addizionati di ammoniaca 0,045 mM.

- A.7.2.1. Soluzione di ammoniaca 0,045 mM in acqua ultrapura
Prelevare un volume di ammoniaca (A.5.1.12) di 30 μ L pari a 0,10 moli, trasferire quantitativamente in pallone tarato da 1L e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1)
- A.7.2.2. Soluzione di ammoniaca 0,045 mM in metanolo
Prelevare un volume di ammoniaca (A.5.1.12) di 30 μ L pari a 0,10 moli, trasferire quantitativamente in pallone tarato da 1 L e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.7.3. Determinazione LC/MS su campioni di prova

- A.7.3.1. Operazioni preliminari
Attivare l'apparecchiatura e predisporla al funzionamento secondo le procedure operative specifiche o le indicazioni fornite dai manuali d'uso. In particolare:
 - ottimizzare i parametri funzionali dello spettrometro di massa e assicurare la corretta taratura delle masse
 - assicurarsi che lo strumento raggiunga l'equilibrio e scegliere un fondo scala compatibile con la concentrazione degli ioni da determinare
- A.7.3.2. Condizioni operative strumentali
Per le determinazioni in LC/MS tandem predisporre la valvola di iniezione, o in alternativa, un autocampionatore, in modo da iniettare nel sistema un volume fisso pari a 20 μ L dell'estratto concentrato (A.6.1.11) e impostare le condizioni strumentali idonee allo scopo riportate, a titolo di esempio, in Tabella A2 e Tabella A3.
- A.7.3.3. Costruzione della curva di taratura
 - A.7.3.3.1. Analizzare i diversi campioni di taratura (A.6.4), iniettando una aliquota da 20 μ L di ciascuna soluzione (A.6.1.12) per ciascun livello di taratura prefissato
 - A.7.3.3.2. Analizzare mediante LC/MS tandem, e tabulare il valore del rapporto tra l'area prodotta dalla somma dei segnali relativi alle due transizioni ione precursore > ione prodotto selezionate per ciascun analita e l'area prodotta dal segnale relativo alla transizione ione precursore > ione prodotto per lo standard di processo ($A_{\text{analita}} / A_{\text{standard di processo}}$) in corrispondenza di ogni livello di concentrazione per ciascun analita
 - A.7.3.3.3. Con l'ausilio di un programma dedicato (o di idonee espressioni matematiche) determinare con il metodo dei minimi quadrati, per

l'intervallo lineare della curva individuato per esempio con il metodo dei residui, l'equazione della retta di taratura

$$Y = a \cdot X + b$$

dove $Y = A_{\text{analita}} / A_{\text{standard di processo}}$, X = concentrazione di ciascun analita espressa in ng/L, a = coefficiente angolare a valore noto, b = intercetta sull'asse delle Y , a valore noto.

Data la variabilità conseguente alla dipendenza dalle condizioni cromatografiche, verificare periodicamente la presenza della sensibilità prevista dalle prestazioni del metodo, controllando che entrambe le transizioni diagnostiche abbiano un rapporto segnale/rumore (S/N) ≥ 3 nel punto di taratura più basso tra quelli previsti (calcolato utilizzando algoritmi disponibili su software o un metodo grafico). Verificare inoltre periodicamente la validità dell'equazione corrispondente alla retta di taratura, ricavata con il metodo dei minimi quadrati, processando e analizzando due suoi punti.

A.7.3.3.4. Il coefficiente di correlazione " r^2 ", nell'intervallo lineare della curva di taratura, deve essere $\geq 0,98$)

A.7.3.3.5. Memorizzare i dati di taratura nel metodo cromatografico residente sul sistema di gestione (A.7.1.5)

Tabella A3. Esempio di condizioni strumentali^a

Analita	MRM (m/z)	DP	Condizioni MS		CXP	CE
			FP	EP		
Bisfenolo A	227,0>212,2 [*]	-70	-210	-10	-15	-30
	227,0>133,2 [*]	-70	-210	-10	-15	-30
17 α -etinilestradiolo	295,0>145,1 [*]	-70	-210	-10	-15	-50
	295,0>267,4 [*]	-50	-210	-10	-15	-30
β -estradiolo	271,0>145,1 [*]	-70	-210	-10	-15	-50
	271,0>183,2 [*]	-30	-375	-10	-15	-50
β -estradiolo d ₃ (standard di processo)	274,3>145,2 [*]	-90	-375	-10	-15	-55
Estrone	269,5>145,1 [*]	-70	-210	-10	-15	-50
	269,5>159,2 [*]	-70	-210	-10	-15	-50
4-tert-octilfenolo	205,0>133 [*]	-50	-210	-10	-15	-35
	205,0>148,0 [*]	-50	-210	-10	-15	-50
Nonilfenolo	219,3>147,1 [*]	-53	-310	-9	-7	-35
	219,3>133,3 [*]	-50	-210	-10	-15	-35

^a Condizioni del TIS (Turbo Ion Spray): voltaggio: -4500 V; Curtain gas flow: 10 unità arbitrarie; Nebulizer gas flow: 12 unità arbitrarie; Turbo-gas flow: 30 unità arbitrarie; CAD flow: 12 unità arbitrarie

* transizione ione precursore, $[M-H]^+$ > ione frammento

MRM: Multiple Reaction Monitoring; **DP:** Declustering Potential; **FP:** Focusing Potential; **EP:** Entrance Potential; **CXP:** potenziale di uscita dalla cella di collisione; **CE:** energia di collisione;

Tabella A2. Condizioni strumentali LC

Tempo	Flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)	%B
0	200	50
2	200	50
10	200	90
20	200	90
25	200	50
30	200	50

Colonna a fase inversa C-18 (150x 2,1 mm I.D. 5 μm) Ascentis (Supelco) o analoga.

Fase mobile: fase A: acqua 0,045 mM ammoniaca; fase B: metanolo 0,045 mM ammoniaca

Temperatura colonna: 40 °C

A.7.3.4. Controllo del bianco

Secondo quanto predisposto nell'ambito delle procedure di controllo qualità (ISS.PGA.903.revXX) controllare una aliquota di bianco campione (A.6.3) sottoponendola alla stessa procedura analitica prevista per il campione, allo scopo di individuare gli eventuali interferenti presenti nel tracciato cromatografico nell'intorno del tempo di ritenzione degli analiti da ricercare.

A.7.3.5. Identificazione dell'analita

L'identificazione degli analiti deve basarsi sul tempo di ritenzione e sui segnali ionici relativi alle transizioni ione precursore > ione frammento. I dati sull'identificazione degli analiti devono essere ottenuti per confronto - in identiche condizioni sperimentali - tra il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite al campione in esame e il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite all'ultima soluzione di riferimento/(curva di taratura.).

In particolare, l'identificazione dell'analita sarà assicurata dalla presenza di entrambe le transizioni diagnostiche con un rapporto segnale/rumore (S/N) ≥ 3 , calcolato utilizzando algoritmi disponibili su software o un metodo grafico.

Per acquisizioni in MRM, dovranno essere anche osservati i rapporti tra le transizioni diagnostiche. In Figura A1 è riportato un cromatogramma rappresentativo ottenuto dall'analisi LC/MS tandem di un campione addizionato degli analiti e lo standard di processo al livello di 50 ng/L.

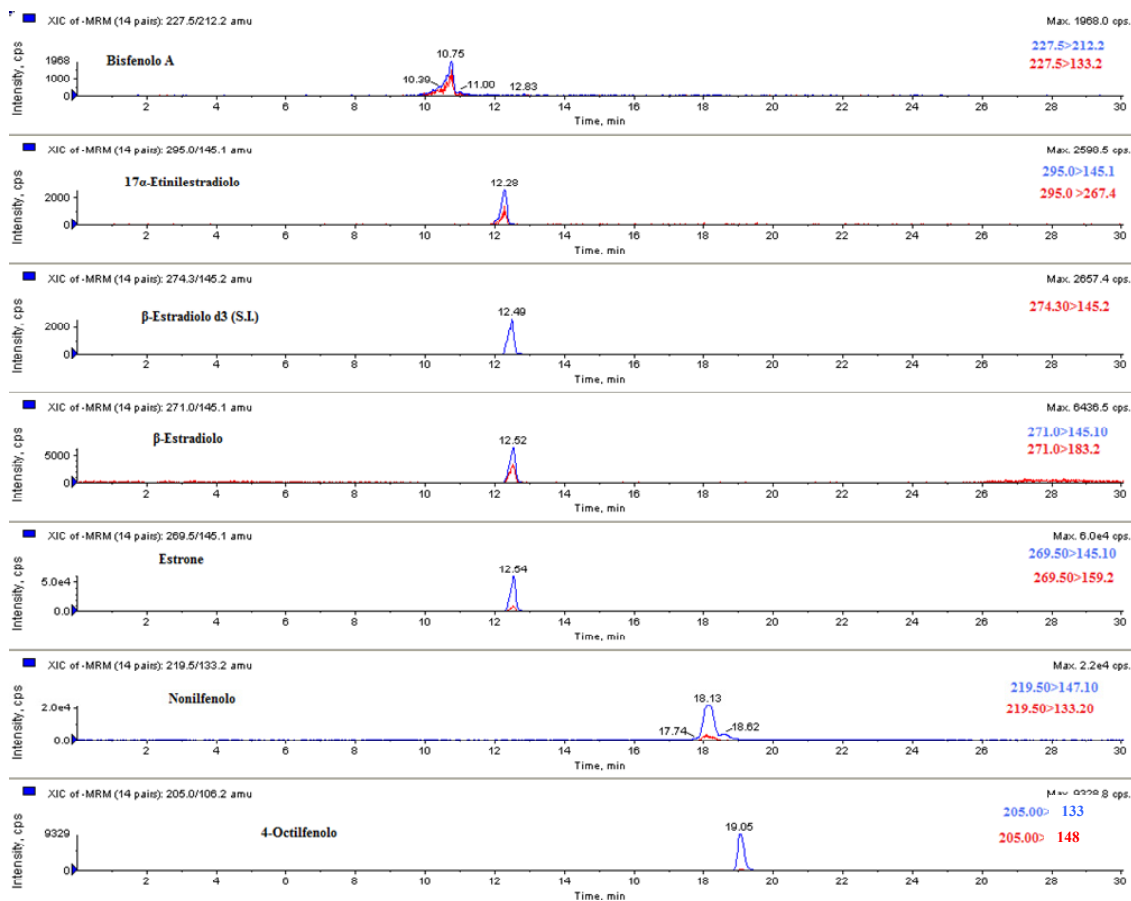


Figura A1. Cromatogramma rappresentativo ottenuto dall'analisi LC/MS tandem di un campione addizionato degli analiti e lo standard di processo al livello di 50 ng/L e acquisito in modalità MRM (Multi Reaction Monitoring)

A.7.3.6. Analisi quantitativa in LC-MS

- A.7.3.6.1. Analizzare ciascuna aliquota di estratto oggetto di indagine (A.6.1, A.6.2, A.6.3, A.6.4).
- A.7.3.6.2. Dedurre il valore incognito della concentrazione X di ciascun analita nel campione di prova mediante un programma dedicato oppure sostituendo nella equazione della retta di taratura (A.7.3.3.3) il valore della Y ottenuto sperimentalmente per il campione processato.
- A.7.3.6.3. Il valore della Y nel campione di prova deve sempre cadere all'interno dell'intervallo di linearità o riportato in esso per opportuna diluizione del campione.
- A.7.3.6.4. Espressione dei risultati: i risultati, espressi in nanogrammi per litro (ng/L), vengono riportati con una cifra significativa per concentrazioni ≥ 100 ng/L e con due cifre significative per concentrazioni < 100 ng/L.

A.8. Misure di sicurezza

Le sostanze possono essere assorbite dall'organismo per inalazione, attraverso la cute e per ingestione. Utilizzare idonee misure di protezione individuale (protezione respiratoria, protezione delle mani, protezione degli occhi, protezione della pelle e del corpo).

Effettuare tutte le operazioni descritte in sezione A.5 e A.6 sotto cappa chimica.

APPENDICE B

**Specifiche tecniche
per i laboratori delle aziende acquedottistiche
coinvolte nell'indagine per la valutazione dei livelli
di 17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A,
4-octilfenolo, nonilfenolo in acque grezze e trattate**

Ciascun acquedotto partecipante all'indagine ha ricevuto un kit completo di materiali e procedure relative alle prove da effettuare per il trattamento dei campioni e la valutazione dei livelli di 17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo, nonilfenolo in acque grezze e trattate.

Il kit comprendeva:

- 17 cartucce tipo HLB (200 mg);
- 8 *vial* da 1 mL, contenenti le miscele di standard interni (contrassegnati con le diciture B1, B2, E1, E2, U1, U2) e analiti e standard interni (H1, H2);
- quattro bottiglie di vetro da 1 L di acqua oligominerale da utilizzare nelle prove di estrazione come bianchi (B1 e B2) e per la preparazione dei campioni fortificati (H1, H2);
- due bottiglie di vetro da 1 L di acqua oligominerale da utilizzare nelle prove di estrazione come bianco (B) per i test biologici
- due *vial* contenenti una soluzione di tiosolfato di sodio, contrassegnate con la dicitura “TU1” e “TU2”;
- richiesta di informazioni sintetica da compilare, relativamente ai campionamenti effettuati.

La procedura è di seguito descritta in dettaglio.

B.1. Prove da effettuare e materiali

Ciascun acquedotto dovrà effettuare in rigorosa sequenza:

- due estrazioni, ciascuna su un'aliquota da 1 L, di un bianco (contaminato con lo standard di processo - soluzioni denominate B1 e B2);
- due estrazioni, ciascuna su un'aliquota da 1 L di acqua grezza in entrata all'impianto di potabilizzazione (contaminata con lo standard di processo - soluzione denominata E1 e E2) e processati secondo la procedura prevista per campioni di acqua superficiale descritta in dettaglio in Appendice A, sezione A.6.1;
- due estrazioni, ciascuna su un'aliquota da 1 L di acqua trattata in uscita dall'impianto di potabilizzazione (contaminata con lo standard di processo (soluzione denominata U1 e U2) e processati secondo la procedura prevista per campioni di acqua superficiale sottoposti a processo di potabilizzazione descritta in dettaglio in Appendice A, sezione A.6.2.
- due estrazioni, ciascuna su un'aliquota da 1 L, di un campione fortificato preparato a partire da un campione bianco contaminato con lo standard di processo e analiti - soluzioni denominate H1 e H2.

B.2. Campione bianco

Il campione da utilizzare come bianco, prelevato con recipienti in vetro (altamente raccomandato), in polietilene (PE) o FEP (fluorinated ethylene propylene) –Teflon per alimenti, idonei all'estrazione SPE, dovrà essere costituito da acqua oligominerale indicata dai laboratori dell'ISS in seguito a precedenti valutazioni e spedita a ciascun laboratorio di prova.

B.3. Procedura di prelievo e preparazione dei campioni

B.3.1. Campione bianco

Prove in duplicato. Contestualmente al prelievo, trasferire quantitativamente il contenuto del *vial* contrassegnato come “Bianco, B” nel campione (1 L) di acqua oligominerale, agitare, contrassegnare i campioni rispettivamente con “Bianco, B1” e “Bianco, B2” e trasferirli in ambiente refrigerato (4 $\pm$ 6°C) per 24 ore.

B.3.2. Campioni “E1”, “E2”

- 1) I campionamenti dell’acqua grezza andranno effettuati prelevando 2 L di acqua in entrata (campioni “E1” e “E2”) dagli impianti, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato), in PE o in FEP (*Fluorinated Ethylene Propylene*) –Teflon per alimenti;
- 2) Suddividere il campione di acqua in entrata in due aliquote da 1 L ciascuna, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato) in PE o in FEP, (*Fluorinated Ethylene Propylene*) –Teflon per alimenti idonei all’estrazione SPE. In alternativa al prelievo dei 2 L e successiva ripartizione in 2 aliquote da 1 L, possono essere effettuati i prelievi di 2 campioni da 1 L in rapida successione;
- 3) Contrassegnare le due aliquote, rispettivamente, con “E1” ed “E2”;
- 4) Trasferire quantitativamente il contenuto dei *vial* contrassegnati con “E1” ed “E2” nei campioni corrispondenti, agitare e trasferire in ambiente refrigerato ($4\pm 6^{\circ}\text{C}$) per 24 ore;
- 5) Procedere all’estrazione come descritto in dettaglio nell’Appendice A, sezione A.6.1 “Preparazione campioni di prova per acque superficiali”.

B.3.3. Campioni “U1”, “U2”

- 1) I campionamenti di acqua trattata andranno effettuati prelevando 2 L di acqua in uscita (campioni “U1” e “U2”) dagli impianti, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato) o in polietilene (PE) o in FEP (*Fluorinated Ethylene Propylene*) –Teflon per alimenti;
- 2) Suddividere il campione di acqua in entrata in due aliquote da 1 L ciascuna, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato), in PE o in FEP (*fluorinated ethylene propylene*) –Teflon per alimenti idonei all’estrazione SPE. In alternativa al prelievo dei 2 L e successiva ripartizione in 2 aliquote da 1 L, possono essere effettuati i prelievi di 2 campioni da 1 L in rapida successione.
- 3) Acidificare i campioni a pH 3 con acido cloridrico.
- 4) Aggiungere la soluzione di tiosolfato di sodio contenuto nei *vial* contrassegnati con la dicitura “TU1” e “TU2” e agitare
- 5) Contrassegnare le due aliquote, rispettivamente, con “U1” ed “U2”;
- 6) Attendere 1 ora;
- 7) Trasferire quantitativamente il contenuto dei *vial* contrassegnati con “U1” ed “U2” nei campioni corrispondenti, agitare e trasferire in ambiente refrigerato ($4 \pm 6^{\circ}\text{C}$) per 24 ore;
- 8) Procedere all’estrazione come descritto in dettaglio nell’Appendice A, sezione A.6.2 “Preparazione campioni di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione”.

B.3.4. Campioni fortificati ottenuti da bianco contaminato con analiti (prove di estrazione)

Prove in duplicato: contestualmente al prelievo, trasferire quantitativamente il contenuto dei *vial* contrassegnato come “H1 e H2” nel campione (1 L) di acqua oligominerale, agitare, contrassegnare i campioni con “H1” e “H2” e trasferirli in ambiente refrigerato ($4\pm 6^{\circ}\text{C}$) per 24 ore.

B.3.5. Estrazione dei campioni

Procedere con l’estrazione solo dopo aver tenuto i campioni in ambiente refrigerato per 24 ore (come precedentemente indicato) e poi per 1 ora a temperatura ambiente.

La procedura estrattiva da applicare è quella trasmessa dall’ISS in data 08/06/09 in rev.3.

I campioni di acqua grezza in entrata potrebbero però necessitare di uno step di filtrazione prima di poter procedere alla fase di estrazione SPE.

Per evitare contaminazioni del sistema, si raccomanda di processare i campioni nell’ordine: “Bianco”, “U1”, “U2”, “E1”, “E2”, “H1”, “H2”.

Operare quindi come di seguito descritto:

- Procedura relativa ai campioni di bianco, “B1 e B2”, e alle prove di estrazione, “H1”, “H2”:
Il bianco non necessita della filtrazione.
Procedere quindi, per il campione di bianco, secondo quanto descritto nella procedura estrattiva ai punti A.6.1.6-A.6.1.11.
- Procedura relativa ai campioni di acqua in entrata, “E1”, “E2”:
Se necessario (cioè laddove si valuti che la torbidità / presenza di particolato potrebbe occludere le colonnine per SPE durante l'estrazione), filtrare i campioni in entrata, procedendo come descritto in Appendice A, sezione A.6.1.3-A.6.1.11, “preparazione campioni di prova per acque superficiali”:
- Procedura relativa ai campioni di acqua in uscita, “U1”, “U2”:
L'acqua in uscita Appendice A non necessita della filtrazione.
Procedere quindi, per il campione di acqua in uscita, procedendo come descritto in Appendice A, sezione A.6.2 “Preparazione campioni di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione”, nello specifico seguire i passaggi da A.6.1.3-A.6.1.11.

B.4. Prove da effettuare per test biologici

B.4.1. Campione bianco

Due bottiglie da 1 litro in vetro di acqua oligominerale su cui effettuare una prova in doppio di estrazione, senza aggiunta di alcuno standard o reagente, per fornire un Bianco di processo utile per i test biologici.

B.4.2. Campioni “EB”, “EB”:

- 1) I campionamenti dell'acqua grezza andranno effettuati prelevando 2 L di acqua in entrata (“EB” e “EB”) dagli impianti, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato), in PE o in FEP (*Fluorinated Ethylene Propylene*) –Teflon per alimenti;
- 2) Suddividere il campione di acqua in entrata in due aliquote da 1 L ciascuna, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato), in PE o in (fluorinated ethylene propylene) –Teflon per alimenti idonei all'estrazione SPE. In alternativa al prelievo dei 2 L e successiva ripartizione in 2 aliquote da 1 L, possono essere effettuati i prelievi di 2 campioni da 1 L in rapida successione.
- 3) Contrassegnare le due aliquote, rispettivamente, con “EB” ed “EB” (un'aliquota serve per il test biologici)
- 4) Procedere all'estrazione come descritto in dettaglio nell'Appendice A, sezione A.6.1 “Preparazione campioni di prova per acque superficiali”, senza alcuna aggiunta di Standard interni.

B.4.3. Campioni “UB”, “UB”

- 1) I campionamenti di acqua trattata andranno effettuati prelevando 2 L di acqua in uscita (campioni “UB” e “UB”) dagli impianti, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato), in PE o in FEP (*Fluorinated Ethylene Propylene*) –Teflon per alimenti;
- 2) Suddividere il campione di acqua in entrata in due aliquote da 1 L ciascuna, utilizzando recipienti in vetro (altamente raccomandato), in PE o in FEP (fluorinated ethylene propylene) –Teflon per alimenti idonei all'estrazione SPE.
- 3) Contrassegnare le due aliquote, rispettivamente, con “UB” ed “UB”;
- 4) Procedere all'estrazione come descritto in dettaglio nell'Appendice A, sezione A.6.2 “Preparazione campioni di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione”, senza alcuna aggiunta di standard interni, tiosolfato di sodio o altri reagenti.

B.5. Spedizione degli estratti

Operando come sopra descritto viene ottenuto, per ogni campione, un volume finale pari a 0,5 mL (A.6.1.11. nella procedura estrattiva), sufficiente per le analisi chimiche e biologiche che verranno effettuate in parallelo dai vari laboratori.

Ciascun estratto (A.6.1.11) deve essere inviato a Fondazione AMGA anteposando al codice sopra descritto la lettera alfabetica inviata dal Coordinamento a ciascun acquedotto (es. X), che contraddistingue ogni acquedotto ai fini della riservatezza.

Trasmettere i campioni ottenuti a Fondazione AMGA a Genova unitamente alle schede fornite.

Qualora le estrazioni vengano effettuate prima della data prevista per la spedizione, conservare le aliquote ottenute in frigorifero ($4\pm 6^{\circ}\text{C}$), ben chiuse, fino al momento della spedizione considerando che, in tali condizioni, gli analiti sono stabili per almeno 30 giorni.

APPENDICE C

Impiego di campionatori passivi per la determinazione di interferenti endocrini in acque per il consumo umano

Emanuele Magi, Marina Di Carro
Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Genova

Lo studio condotto con i campionatori passivi è stato applicato ad alcuni tra gli interferenti endocrini più noti (nonilfenolo, bisfenolo A, estrone, estradiolo ed etinilestradiolo) nelle acque, con particolare riferimento alle acque superficiali che alimentano gli impianti di potabilizzazione nel territorio ligure.

La metodica analitica sviluppata nel nostro laboratorio prevede l'impiego di campionatori passivi POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Samplers*) nella fase di campionamento dell'acqua.

Il campionamento tradizionale, basato sul prelievo puntuale del campione (*spot sampling*), può indicare solamente la situazione istantanea del livello di contaminanti presenti nel momento specifico del campionamento, ma non è in grado di fornire informazioni sulla qualità dell'acqua nel tempo. Infatti la concentrazione degli analiti può variare molto rapidamente a causa di episodi occasionali e un campionamento frequente comporta alti costi e un numero elevato di campioni da analizzare. Il campionamento passivo è una tecnica alternativa, molto nota nel monitoraggio atmosferico, che lentamente sta diffondendosi anche per lo studio di matrici acquose. Si basa sul flusso spontaneo di un analita dal mezzo campionato alla fase ricevente del campionatore; tale flusso è generato dalla differenza del potenziale chimico dell'analita nei due mezzi.

I vantaggi del campionamento passivo sono molteplici:

- riuniscono in un solo passaggio campionamento, purificazione (estrazione selettiva) e preconcentrazione *in situ*
- consentono la rivelazione di contaminazioni episodiche e di ultratracce
- solitamente non alterano la speciazione e campionano soltanto il "disciolto"
- non necessitano di energia e semplificano la procedura di preparazione del campione

I campionatori passivi possono essere utilizzati per il monitoraggio integrativo dei contaminanti nelle acque. Essi forniscono la concentrazione mediata nel tempo degli analiti (TWA, *Time-Weighted Average concentration*) anche per periodi estesi (quattro-cinque settimane).

I POCIS, in particolare, sono campionatori passivi sviluppati per campionare e preconcentrare composti organici polari. Introdotti da Alvarez *et al.* nel 2004 (1) sono formati da due membrane microporose di polieteresulfone che racchiudono una fase stazionaria trifasica, costituita dalla miscela Isolute ENV/Amborsorb1500/SX-3Biobeads: gli analiti diffondono dall'acqua attraverso la membrana semipermeabile e vengono adsorbiti all'interno della fase (Figura C1).

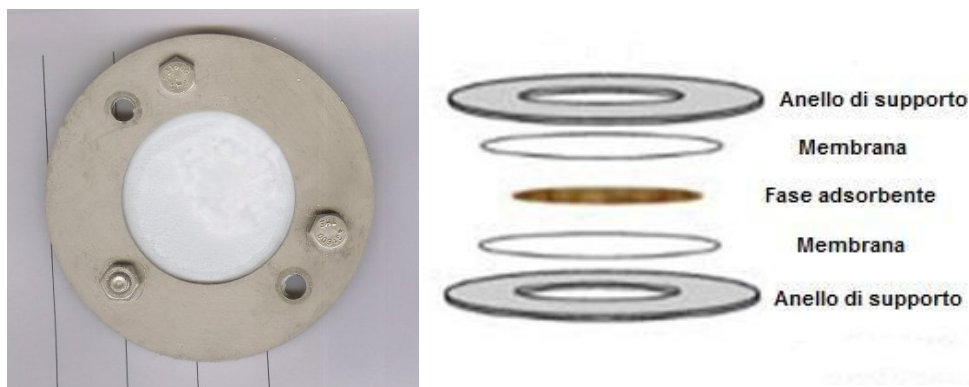


Figura C1. Fotografia e schema "esploso" di un campionatore POCIS

Nel nostro caso i campionatori sono stati esposti in doppio all'ingresso e all'uscita di un impianto di potabilizzazione di Genova, per determinare l'eventuale presenza di ED nelle acque grezze e la relativa efficienza di abbattimento dell'impianto.

Inoltre, sono state monitorate le acque grezze altri due siti liguri. I campionatori sono stati esposti per due e quattro settimane, per verificarne il comportamento integrativo e sfruttare il più possibile la capacità di preconcentrazione *in situ* (2).

La fase adsorbente è stata eluita con una miscela di tetraidrofurano, acetone e metanolo. L'eluato è stato portato a secco, ridissolto in una miscela metanolo-acqua contenente lo standard interno bisfenolo A deuterato e quindi analizzato in LC-MS/MS utilizzando il cromatografo liquido Agilent Liquid Chromatograph Series 1200 SL accoppiato allo spettrometro di massa Agilent 6430 MSD Triple Quadrupole con una sorgente API-Electrospray, in modalità ioni negativi.

Il metodo fast LC impiegato consente di separare gli analiti in meno di quattro minuti, grazie all'impiego di una colonna con particelle sub-2- μm (Pinnacle DB Biphenylic, Restek), che fornisce una migliore efficienza e risoluzione rispetto alle colonne convenzionali (3). La sensibilità necessaria per i livelli di concentrazione attesi nelle acque è stata raggiunta utilizzando il triplo quadrupolo in modalità Selected Reaction Monitoring (SRM), monitorando cioè due transizioni per ciascun analita.

I risultati hanno evidenziato l'assenza di tutti gli analiti nelle acque trattate mentre, nelle acque grezze di quasi tutti i siti, sono stati rilevati nonilfenolo e bisfenolo A. Inoltre, nei campionatori esposti per quattro settimane in una delle acque grezze studiate, sono stati misurati bassi livelli di concentrazione di estrone, non rivelati dal campionamento puntuale; tale dato necessita comunque di ulteriori conferme. In generale, per il periodo di monitoraggio in cui sono state condotte in parallelo analisi di campioni puntuali, si è potuto osservare un discreto accordo tra i dati ottenuti con il campionamento passivo e quello tradizionale.

Bibliografia

1. Alvarez DA, Petty JD, Huckins JN, Jones-Lepp TL, Getting DT, Goddard JP, Manahan SE. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environ Tox Chem* 2004;23:1640-8.
2. Magi E, Di Carro M, Liscio C. Development of a fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of endocrine disrupting compounds in waters. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:1335-45.
3. Magi E, Scapolla C, Di Carro M, Liscio C. Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2010;45:1003-11

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2011 (n. 4) 1° Suppl.