

SORGENTI ELETTROMAGNETICHE AD ALTA ENERGIA NELL'ANALISI AMBIENTALE

Roberto Mandrioli, Maria Addolorata Saracino, Francesca Bugamelli, Alessandro Musenga,
Laura Mercolini, Maria Augusta Raggi

Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia,
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna

SOMMARIO

La protezione e la sorveglianza dell'ambiente sono ormai divenute tematiche che rivestono una drammatica importanza ed urgenza a tutti i livelli della vita quotidiana, politica, civile e scientifica. Per affrontare seriamente questi problemi è necessario poter disporre di strumenti adeguati alla valutazione del rischio, sia dal punto di vista biologico, sia da quello chimico, in attesa che le fonti di energia rinnovabili e meno inquinanti diventino più ampiamente utilizzate.

Pertanto, sono di basilare importanza tutte quelle metodiche che consentono di determinare con accuratezza i livelli degli inquinanti in differenti matrici (aria, acqua, suolo, ecc.). Recentemente, tra le metodiche più promettenti, si è molto sviluppata l'elettroforesi capillare grazie alla sua versatilità ed efficienza. Se accoppiata a sorgenti elettromagnetiche ad alta energia, quali i rivelatori a fluorescenza laser-indotta, questa tecnica permette di analizzare in tempi brevi un ampio range di sostanze inquinanti con alta sensibilità e selettività.

Il nostro gruppo di ricerca si propone di mettere a punto metodi analitici basati sull'accoppiamento di elettroforesi capillare e fluorescenza laser-indotta per il monitoraggio di *endocrine disrupting chemicals*, sostanze che, interferendo con i sistemi endocrini, possono portare gravi danni all'uomo ed all'ecosistema.

L'analisi chimica tossicologica riveste una fondamentale importanza nella protezione dell'ambiente e nello sviluppo di adeguate politiche di prevenzione ambientale. Infatti, a questi scopi è necessario conoscere approfonditamente la natura del rischio chimico e la sua entità, e quindi l'analisi qualitativa e quantitativa di inquinanti ambientali è la necessaria premessa di tale attività.

Negli ultimi anni, la sempre maggiore consapevolezza ambientale del pubblico e delle Istituzioni ha contribuito a porre attenzione a inquinanti presenti in aria, acque e suolo a concentrazioni tossiche per l'uomo e l'ecosistema, anche a livelli estremamente bassi, di parti per bilione o parti per trilione.

GLI ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDC)

Gli *endocrine disrupting chemicals* (EDC, sostanze che interferiscono con i sistemi endocrini) sono definiti come "sostanza esogena o insieme di sostanze che possono alterare le funzioni del sistema endocrino e causare effetti indesiderati all'interno dell'organismo integro o della sua progenie" [1]. Gli EDC sono quindi composti che, legandosi a recettori ormonali cellulari, possono espletare azioni agoniste, antagoniste o di modificazione della biosintesi, metabolismo ed eliminazione degli ormoni endogeni.

L'esposizione a queste sostanze è associata ad alte percentuali di individui di sesso femminile nelle popolazioni di pesci, indebolimento dello strato esterno delle uova di uccelli e modificazioni delle gonadi nei rettili. L'attenzione è ora rivolta alle possibili implicazioni per la popolazione umana esposta, visto che alcuni EDC sono già sospettati di effetti quali anomalie riproduttive, cancro alla ghiandola mammaria e infertilità maschile. I composti identificati come EDC includono diverse categorie chimiche come

bioflavonoidi, estrogeni naturali e sintetici, fenoli, alchilfenoli, composti bifenilici policlorurati, pesticidi organoclorurati, diossani e furani. La diversa natura chimica di questi composti è riflessa nelle loro diverse applicazioni, e il loro esteso utilizzo porta ad un'ampia distribuzione nell'ambiente e negli organismi viventi.

Gli effetti di una esposizione a EDC durante lo sviluppo embrionale e/o la vita postnatale possono essere permanenti e irreversibili. È stato inoltre dimostrato da uno studio di Arnold et al. [2] che una miscela di sostanze estrogenomimetiche può avere effetto sinergico (può cioè agire sull'organismo producendo un effetto maggiore dell'effetto prodotto dalla somma delle stesse sostanze prese singolarmente).

Esistono tre fonti principali di esposizione agli EDC: ambiente, dieta, e applicazioni medicinali e cosmetiche.

Fonti di Esposizione

AMBIENTE: Per quanto riguarda l'ambiente, è noto che le acque marine e fluviali agiscono come un grande ricettacolo per molte sostanze che derivano dal trattamento di acque di scarico. Il maggior input di EDC in campo ambientale è dovuto proprio agli scarichi domestici e industriali ed esse sono stati rilevate in fanghi, alghe e acque di scarico [3], nelle acque di superficie e sotterranee, e infine in sedimenti organici e nel terreno [4]. I metodi convenzionali usati oggi per il trattamento delle acque di scarico, compreso il trattamento primario e secondario, non sono sufficienti per l'eliminazione completa delle EDC di maggiore importanza [5, 6]. Le concentrazioni di queste classi di composti EDC nei fiumi e nelle acque superficiali sono generalmente molto basse, nell'ordine dei ng/L, ma queste concentrazioni sono comunque sufficienti per indurre una risposta estrogenica in molte specie marine [7, 8]. Le EDC che sono trattenute nei residui organici dopo trattamento delle acque di scarico possono anche trovare

la loro via di uscita nell'ambiente come risultato della concimazione e dell'utilizzo di fanghi ed alghe come fertilizzanti. Altre fonti di EDC potrebbero essere rappresentate da depositi atmosferici di composti organici volatili come per esempio il DDT (diclorodifeniltricloroetano) [9]. L'escrezione degli estrogeni naturali dalle femmine di alcune specie di animali presenti in allevamenti può contribuire ad aumentarne la concentrazione, così come vari tipi di piante possono aumentare il contributo di fitormoni. In ultimo, le diffuse sorgenti di inquinamento, raramente controllabili e monitorabili, forniscono una fonte di EDC tale da rendere oltremodo difficile determinare in quale entità il fenomeno sia ad esso attribuibile.

DIETA: Un'altra fonte di EDC può essere la dieta, con componenti come i bioflavonoidi e i fitormoni. Questi estrogeni naturali prodotti principalmente dalle piante sono meno potenti degli estrogeni secreti dei mammiferi [10], ma possono accumularsi nelle riserve di grasso corporeo, in contrasto con il rapido metabolismo dei fitoestrogeni. Ad esempio, una fonte di esposizione può derivare da residui di pesticidi in verdure e ortaggi, ed è stata anche ipotizzata una migrazione di EDC al cibo per mezzo di container trattati chimicamente [11]. La contaminazione su larga scala delle acque marine o fluviali con composti come PBC produce esposizione massiccia delle popolazioni ittiche anche edibili; quindi questa è un'altra fonte di esposizione ad estrogeni ambientali nella dieta. Un'altra fonte ovvia sono i trattamenti ormonali effettuati prima della macellazione su allevamenti animali per aumentarne il peso corporeo o la produzione di latte. Questa è ovviamente proibita dalla legislazione vigente: il Comitato Scientifico Veterinario UE ha dichiarato recentemente riguardo alla salute pubblica che "l'uso di ormoni per promuovere la crescita del bestiame può provocare potenziali rischi alla salute dei consumatori".

APPLICAZIONI MEDICINALI E COSMETICHE: Una delle più importanti applicazioni mediche in cui si fa uso di ormoni in campo femminile è la pillola contraccettiva; il componente più importante, l'etinilestradiolo, è un potente estrogeno sintetico. Il detergente nonoxinolo, il cui componente fondamentale è il nonilfenolo (estrogenomimetico), è usato come lubrificante vaginale e come spermicida. Il Tamossifene è usato come trattamento per stadi avanzati di cancro al seno nelle donne in menopausa [12]; agisce competitivamente al sito di legame recettoriale con l'estradiolo ed è un agonista parziale. Alcuni rimedi tradizionali a base di erbe, utilizzati per curare la calvizie, contengono alte concentrazioni di fitormoni (allo scopo di indurre un effetto simile alla risposta ormonale nel corpo

umano). Alcuni prodotti cosmetici per l'igiene personale possono contenere ftalati, come il Dibutilftalato, che possono essere considerati e identificati come EDC.

Classi di *Endocrine Disrupting Chemicals*

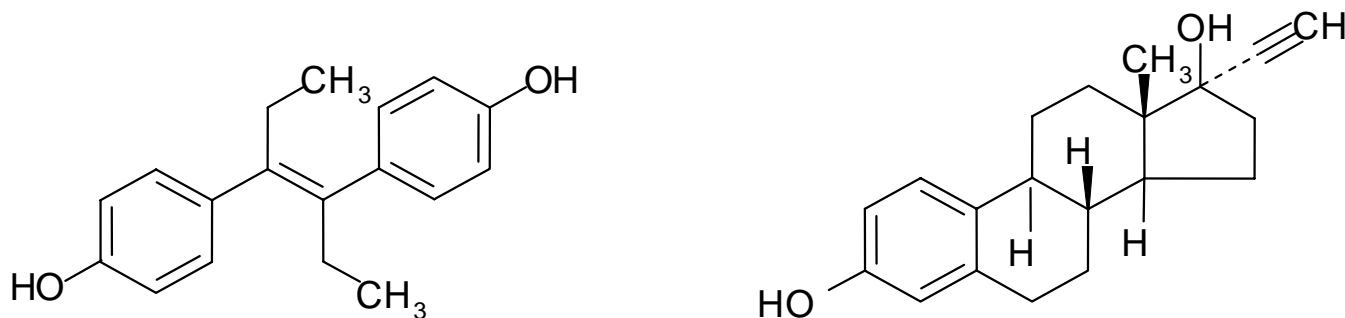
La caratterizzazione in modo specifico dei composti d'interesse è importante allo scopo di determinare il metodo analitico più adatto per la loro quantificazione. I principali EDC sono gli estrogeni naturali e sintetici, ma altri gruppi di EDC comprendono fenoli, detergenti alchilfenolici polietossilati e i loro prodotti di degradazione.

ORMONI NATURALI: Gli estrogeni naturali possono essere considerati EDC: alcuni di essi non possono essere rimossi dagli impianti tradizionali di depurazione delle acque di scarico o reflue causa la loro composizione chimica stabile e la loro resistenza alla biodegradazione. Desbrow *et al.* [6] hanno sviluppato un sistema di frazionamento il quale ha permesso di identificare i maggiori componenti estrogenici negli effluenti a partire da diversi tipi di sedimenti organici presenti nelle acque. Gli ormoni naturali 17 β -estradiolo ed estrone sono stati ben isolati da questi tipi di acque. Shore *et al.* [13] hanno eseguito analisi su acque di lago in Israele e hanno trovato tracce di estrogeni, come era prevedibile in funzione del livello di inquinamento e dai residui organici delle acque di scarico.

ESTROGENI SINTETICI: Il dietilstilbestrolo (Fig. 1) è un ormone sintetico somministrato in larga scala a milioni di donne per prevenire l'aborto negli anni '40. Nel 1970 è stato scoperto come una esposizione del feto a questo ormone prima della diciottesima settimana di gravidanza potesse causare il cancro in età adulta [12]. Il Dietilstilbestrolo può avere un'azione di soppressione diretta di alcune forme di cancro sia nell'uomo che nella donna, ed è stato inoltre usato in vari trattamenti per disturbi ginecologici [14].

La pillola contraccettiva è un altro esempio di applicazione degli estrogeni sintetici; un largo numero di contraccettivi orali contiene estrogeni, progestinici o entrambi.

L'etinilestradiolo (Fig. 1) è presente in basse quantità a livelli di circa 30-100 μ g per pastiglia. Gli ormoni sintetici contenuti nei contraccettivi sono poi escreti e vanno a far parte degli scarichi domestici, e il largo uso di queste preparazioni farmaceutiche ha rivolto l'interesse alla loro persistenza e difficoltà di degradazione nelle acque di scarico. Desbrow *et al.* [15] hanno determinato che la concentrazione dell'estrogeno sintetico etinilestradiolo in campioni di scarichi domestici era compresa tra 0.2 e 0.7 ng/L, e tali concentrazioni erano sufficienti per indurre risposta estrogenica. Visto che la



Diethylstilbestrol

Ethinyloestradiol

Fig. 1 – Formule di struttura degli ormoni sintetici dietilstilbestrolo ed etinilestradiolo.

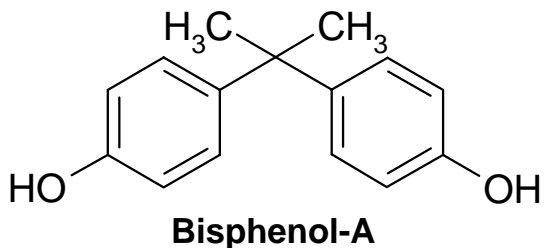


Fig. 2 – Formula di struttura del Bisphenol-A.

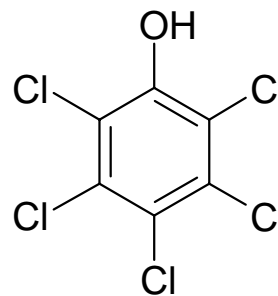
maggioranza degli estrogeni non legati è praticamente insolubile in acqua, è probabile il depositarsi di queste sostanze nel suolo e nei vari sedimenti organici dopo lo scarico degli effluenti [16]. La stabilità naturale dell'etinilestradiolo fa sì che più dell' 80% di esso venga escreto non modificato, mentre rimane immutato in fanghi aerobici per cinque giorni [17].

FENOLI: I fenoli nel terreno e nei vari sedimenti possono derivare da risorse naturali o da degradazione di pesticidi come risultato di emissione diretta da parte delle industrie. Essendo biodegradabili, questi composti sono raramente riscontrati in analisi riguardanti sedimenti e terreni. La presenza di un gruppo ossidrilico nell'anello aromatico fa sì che esso possa essere maggiormente adsorbito su superfici minerali e componenti organiche del terreno. L'aggiunta di sostituenti all'anello fenolico incrementa la persistenza nei sedimenti organici specialmente nelle vicinanze di impianti di discariche.

Il bisphenol-A (Fig. 2) è utilizzato nella produzione di resine epossidiche e materie plastiche policarbonate. Questi composti sono anche utilizzati in prodotti quali protesi odontoiatriche e materiali di riempimento in otturazioni, ma anche come rivestimento interno di scatolette per cibi preconfezionati [18]. BPA è stato identificato essere una sostanza che mima l'azione estrogenica, che compete con il sito recettoriale dell'estradiolo. Il BPA ha mostrato di legarsi al recettore e conseguentemente di indurre attività estrogenica, inclusa la proliferazione del cancro alle cellule mammarie [19]. Visto il suo largo utilizzo, il BPA è stato identificato come componente di materiali solidi e liquidi prelevati da fosse settiche, vecchi recipienti, e nelle acque di scarico a concentrazioni intorno a 1 µg/L [3].

Il pentaclorofenolo (PCP, Fig. 3) è stato incluso da tempo all'interno della categoria delle EDC [14]. Il suo utilizzo primario è quello di conservante per legno: è dissolto in gasolio ed iniettato a pressione nel materiale [20]. Un eccessivo rigonfiamento del legno trattato può portare ad un'accelerazione del rilascio di PCP nell'ambiente.

ALCHILFENOLI: Molte sostanze conosciute come alchilfenoli mostrano un comportamento simile a quello estrogenico e sono state identificate come componenti delle acque di scarico [3]. Gli alchilfenoli sono utilizzati in una grande varietà di applicazioni; l'octilfenolo e il nonilfenolo



Pentachlorophenol

Fig. 3 – Formula di struttura del pentaclorofenolo.

(Fig. 4) sono utilizzati per esempio come antiossidanti nelle materie plastiche. Il nonilfenolo mima l'effetto estrogenico quando viene rilasciato dal polistirene modificato [11].

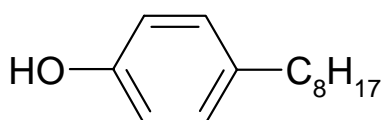
Entrambi gli alchilfenoli sono stati trovati in campo ambientale come risultato della biodegradazione di alchilfenoli polietossilati (APEO, alchilfenoli con catene laterali contenenti molti gruppi etossilati) [21]. I composti alchilfenolici etossilati non ionici si trovano in prodotti industriali e domestici come alcuni detergenti e pesticidi. Le concentrazioni di APEO nei liquami di rifiuto non trattati e nelle acque di scarico primarie sono state investigate da Ahel *et al.* [5], mostrando alti livelli di composti nonilfenolici.

ANALISI DI ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS

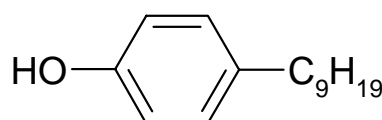
Ovviamente, la ricerca, l'identificazione e la quantificazione di analiti a livelli così bassi presuppone la messa a punto e l'applicazione di metodi analitici estremamente sensibili ed affidabili. A questo fine sono necessari sia personale adeguatamente preparato ed esperto, sia strumentazioni sofisticate e a loro volta a basso impatto ambientale.

Tra le tecniche più promettenti da questo punto di vista vi è l'elettroforesi capillare, che permette di effettuare analisi anche automatizzate in tempi brevi e con scarsissimo impatto ambientale. Infatti, rispetto al più diffuso HPLC, mediamente un apparato per elettroforesi utilizza solo quantità minime (2-5 mL al giorno) di solventi ed altri materiali tossici e potenzialmente inquinanti.

Questa tecnica, per poter essere adeguatamente applicata alle analisi tossicologiche ambientali, richiede l'accoppiamento con mezzi di rivelazione ad altissima sensibilità, tra cui recentemente è stato introdotto il detector a LIF (*laser-induced fluorescence*, fluorescenza laser-indotta). Questo tipo di apparecchiatura permette di indirizzare sul campione un fascio laser (cioè energia elettromagnetica altamente coerente e ad alta intensità) che esalta l'intensità di fluorescenza nativa degli analiti e/o di sonde fluorescenti



Octylphenol



Nonylphenol

Fig. 4 – Formule di struttura di octilfenolo e nonilfenolo.

appositamente introdotte.

Per questo motivo, il rivelatore LIF permette di ottenere livelli di sensibilità che sono da due a tre ordini di grandezza più alti di quelli dei rivelatori tradizionali a spettrofotometria ultravioletta, abbassando così il range delle concentrazioni potenzialmente analizzabili, da microgrammi per millilitro a nanogrammi per millilitro.

Il Laboratorio di Analisi Farmaco-Tossicologica del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche della Facoltà di Farmacia, Università di Bologna, ha in programma di utilizzare questa tecnica all'avanguardia per effettuare indagini ambientali riguardanti la presenza e l'entità di inquinanti quali gli EDC nell'atmosfera ed in acque di diversa provenienza. La ricerca è già iniziata di recente in collaborazione con l'Università di Dublino, e riguarda lo studio di endocrine disrupting chemicals nelle acque municipali della città di Dublino. Le prove preliminari sono state effettuate utilizzando metodiche di cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con detector fluorimetrico, non essendo ancora disponibile il rivelatore a fluorescenza laser-indotta da abbinare alla strumentazione per elettroforesi capillare.

In tal modo ci si propone di portare un contributo al monitoraggio dell'inquinamento ambientale e di conseguenza allo sviluppo di adeguate politiche di prevenzione, salvaguardia e risanamento territoriale.

BIBLIOGRAFIA

1. V. A. Baker, Endocrine disrupters -- testing strategies to assess human hazard, *Toxicol. Vitro*, vol. 15, pp. 413-419, 2001.
2. S.F. Arnold, D.M. Klotz, B.M. Collins, P.M. Vonier, L.J. Guillet and J.A. McLachlan, Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals, *Science*, vol. 272, pp. 1489-1492, 1967.
3. R.A. Rudel, S.J. Melly, P.W. Geno, G. Sun and J.G. Brody, Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, sewage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts, *Environ. Science Technol.*, vol. 32, pp. 861-869, 1998.
4. P.S.C. Rao and A.G. Hornsby, Behavior of Pesticides in soil and water, University of Florida, Gainesville, 1989.
5. M. Ahel, W. Giger and M. Koch, Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment, *Water Res.* vol. 28, pp. 1131-1142, 1994.
6. C. Desbrow, E. Routledge, G.C. Brighty, J. Sumpter, and M. Waldock, Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening, *Environ. Science Technol.*, vol. 32, pp. 1549-1558, 1998.
7. C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.J. Bye, n.C. Eno, C.R. Tyler and J.P. Sumpter, Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* vol 8, pp. 275-285, 1994.
8. E.J. Routledge, D. Sheehan, C. Desbrow, C. Brighty, M. Waldock and J.P. Sumpter, Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach, *Environ. Science Technol.*, vol. 32, pp. 1559-1565, 1998.
9. P. Larsson, O. Berglung, C. Backe, A. Breme, A. Eklov, C. Janmark and A. Persson, DDT-fate in tropical and temperate regions, *Naturwissen.*, vol. 82, pp. 559-563, 1995.
10. S.H. Safe, Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?, *Environ. Health Perspect.*, vol. 103, pp. 346-351, 1995.
11. A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray and C. Sonnenschein, p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ. Health Perspect.*, vol. 92, pp. 167-173, 1991.
12. F.S. Greenspan and J.D. Baxter, Basic and Clinical Endocrinology, Appleton & Lange, New York, 1994.
13. L.S. Shore, M. Gurevitz and M. Shemesh, Estrogen as an environmental pollutant, *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, vol. 51, pp. 361-366, 1993.
14. T. Colburn, F.S. Vom Saal and A.M. Soto, Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, vol. 101, pp. 378-384, 1993.
15. C. Desbrow, E. Routledge, D. Sheehan, M. Waldock and J. Sumpter, The identification and assessment of oestrogenic substances in sewage treatment effluent. Research report. UK Environment Agency, London, 1996.
16. H.H. Tabak and R.L. Bunch, Steroid hormones as water pollutants. I. Metabolism of natural and synthetic ovulation-inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage, *Develop. Industrial Microbiol.*, vol. 11, pp. 367-376, 1970.
17. A. Turan, Endocrinically active chemicals in the environment - 9 & 10 Text Series 3, Expert Round, Fa. Verbund und Vertrieb, Berlin, 1995, pp. 15-20.
18. A. Gonzales-Casado, N. Navas, M. Del Olmo and J.L. Vilchez, Determination of bisphenol A in water by micro liquid-liquid extraction followed by silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 36, pp. 565-569, 1998.
19. D. Feldman and A. Krishman, Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers, *Environ. Health Perspect.*, vol. 103, pp. 129-133, 1995.
20. Y.G. Leblanc, R. Gilbert and J. Hubert, Determination of pentachlorophenol and its oil solvent in wood pole samples by SFE and GC with post-column flow splitting for simultaneous detection of the species, *Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 78-85, 1999.
21. Institute for Environment and Health, Environmental oestrogens: Consequences to human health and wildlife. Institute for Environment and Health, University of Leicester, Leicester, 1995.