

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente

Campus di Ravenna

Interferenti endocrini nelle acque potabili:
presenza ed effetti su cellule MCF7 in coltura

Tesi di Laurea in Fisiologia applicata all'ambiente

Relatore:

Dott.ssa Paola Valbonesi

Laureanda:

Marta Belluzzo

Correlatore:

Prof.ssa Elena Fabbri

III sessione

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

Indice

1. Introduzione	5
1.1 Interferenti Endocrini	5
1.1.1 Definizione	5
1.1.2 Criticità relative agli IE	7
1.1.3 Meccanismo di azione degli IE	8
1.1.4 Effetti sulla salute umana	11
1.1.5 Fonti e modalità di esposizione	18
1.1.6 Il percorso Europeo in tema di IE	21
1.1.7 Norme relative agli IE	30
1.1.7.1 <i>Dalla Direttiva 2000/60/CE, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, alla Decisione 2015/495/EU</i>	31
1.1.7.2 <i>Regolamento 1907/2006/CE, "REACH"</i>	33
1.1.7.3 <i>Regolamento UE 1272/2008, "CLP"</i>	35
1.1.7.4 <i>Direttiva 98/24/CE relativa ai rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro</i>	36
1.1.7.5 <i>Regolamento 315/93 relativo ai contaminanti nei prodotti alimentari</i>	37
1.1.7.6 <i>Direttive relative alle sostanze ad azione ormonale negli alimenti di origine animale</i>	38
1.1.7.7 <i>Regolamento 1935/2004/CE riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari</i>	40
1.1.7.8 <i>Regolamento 1107/2009/CE relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari</i>	41
1.1.7.9 <i>Regolamento UE 528/2012 relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi</i>	42
1.1.7.10 <i>Regolamento 1223/2009/CE sui prodotti cosmetici</i>	44
1.1.7.11 <i>Direttiva 2009/48/CE sulla sicurezza dei giocattoli</i>	44
1.1.8 Descrizione degli IE oggetto del presente lavoro di tesi	45
1.1.8.1 <i>PFOA e PFOS</i>	45
1.1.8.2 <i>BPA</i>	49
1.1.8.3 <i>Nonilfenolo e ottilfenolo</i>	52
1.1.8.4 <i>Estrogeni naturali e sintetici</i>	56
1.1.8.5 <i>Diclofenac</i>	61
1.1.8.6 <i>Ibuprofene</i>	64
1.2 Potabilizzatore della Standiana	68
1.2.1 Grigliatura	69
1.2.2 Preclorazione	70

1.2.3 Coagulazione (Flash mixer)	70
1.2.4 Flocculazione	71
1.2.5 Ultrafiltrazione	71
1.2.6 Trattamento con ammoniaca (Break point)	74
1.2.7 Filtri a carbone attivo	75
1.2.8 Accumulo finale	76
1.2.9 Sollevamento finale	77
2. Scopo della ricerca	78
3. Materiali e metodi	80
3.1 Campionamenti	80
3.2 Preparazione dei campioni per le analisi chimiche e biologiche .82	
3.2.1 Vetreria, materiali e attrezzatura di base	82
3.2.2 Procedura di campionamento e conservazione dei campioni d'acqua . . .	82
3.2.3 Filtrazione	84
3.2.4 Procedura estrattiva	85
3.3 Analisi chimiche: cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem	89
3.3.1 Descrizione della tecnica analitica LC/MS/MS tandem	90
3.3.1.1 HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	90
3.3.1.2 MS tandem	92
3.3.2 Procedura sperimentale per le analisi in LC/MS/MS	95
3.3.2.1 <i>Analisi dei campioni sperimentali</i>	95
3.3.2.2 <i>Il bianco campione</i>	97
3.3.2.3 <i>La necessità di utilizzare lo standard interno/ di processo</i>	97
3.3.2.4 <i>Reagenti e standard utilizzati</i>	98
3.3.3 Quantificazione dei composti selezionati	99
3.3.4 Validazione del metodo LC/MS/MS	101
3.4 Analisi biologiche: E-SCREEN e test dei micronuclei	104
3.4.1 Linee cellulari MCF7 di adenocarcinoma mammario	105
3.4.1.1 <i>Congelamento e scongelamento delle linee cellulari</i>	107
3.4.1.2 <i>Allestimento delle colture cellulari MCF7 in vitro</i>	107
3.4.1.2.1 <i>Preparazione del mezzo completo</i>	107
3.4.1.2.2 <i>Condizioni colturali delle cellule MCF7</i>	108
3.4.1.2.3 <i>Controllo della sterilità</i>	109
3.4.1.2.4 <i>Tripsinizzazione della coltura cellulare</i>	110

3.4.1.3 <i>Semina per esperimenti</i>	111
3.4.2 E-screen: cell proliferation assay	112
3.4.2.1 <i>Condizioni di esposizione delle cellule e sviluppo del modello sperimentale in vitro</i>	113
3.4.2.2 <i>Test di vitalità (MTT assay)</i>	114
3.4.3 Test dei MN	115
3.4.3.1 <i>Condizioni di esposizione delle cellule e sviluppo del modello sperimentale in vitro</i>	117
3.4.3.2 <i>Analisi in microscopia a fluorescenza</i>	118
3.4.4 Analisi statistica dei dati biologici	119
4. Risultati	121
4.1 Valutazione della concentrazione di IE nei campioni di acqua saggiati: risultati delle analisi chimiche (LC/MS/MS)	121
4.2 Valutazione dell'attività estrogenica nei campioni d'acqua saggiati: risultati del saggio E-SCREEN	125
4.3 Valutazione dell'attività genotossica dei campioni d'acqua saggiati: risultati del test dei micronuclei	126
5. Discussione	128
6. Conclusioni	140
6.1 Prospettive	141
7. Riferimenti bibliografici	143
8. Siti consultati	159

*Il presente lavoro di tesi è stato condotto nell'ambito di una convenzione di
ricerca con Romagna Acque-Società delle Fonti S.p.A.*

1. Introduzione

1.1 Interferenti Endocrini

1.1.1 Definizione

Gli Interferenti Endocrini (IE), indicati altrimenti con il termine anglosassone di Endocrine Disrupting Chemicals (EDC), sono stati definiti la prima volta nella relazione conclusiva del workshop tenutosi a Raleigh, North Carolina, come "un agente esogeno che interferisce con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali dell'organismo responsabili del mantenimento dell'omeostasi e la regolazione dei processi di sviluppo ..." (EPA, 1995).

Successivamente, in occasione di un workshop tenutosi nel dicembre 1996 a Weybridge, Regno Unito, al quale hanno partecipato esperti scientifici, rappresentanti politici dell'Unione Europea (UE), degli Stati Uniti ed organizzazioni internazionali come OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) e OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), è stata concordata la seguente definizione: "Un distruttore endocrino è una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un individuo, oppure della sua progenie o di una (sotto) popolazione" (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, 1996).

Tale definizione è stata in seguito adottata dall'UE e integrata dalle valutazioni di diverse agenzie internazionali, che indicano gli IE come un ampio, eterogeneo e tuttora incompletamente conosciuto gruppo di sostanze che spazia da contaminanti ambientali persistenti a composti utilizzati come fitosanitari e antiparassitari a composti utilizzati in prodotti industriali e di consumo ed infine a composti naturali come i fitoestrogeni.

Le sostanze che possono alterare il sistema endocrino sono state raggruppate in due categorie: ormoni naturali e sostanze sintetizzate.

Gli ormoni naturali sono quelli naturalmente prodotti dall'organismo umano o animale, come gli estrogeni, il progesterone e il testosterone, e le sostanze contenute in alcune piante, come i germogli di alfalfa e i semi di soia che, se ingerite, esercitano un'attività analoga a quella degli estrogeni.

Le sostanze sintetizzate, invece, includono sia gli ormoni di sintesi che le sostanze chimiche sintetizzate dall'uomo. Negli ormoni di sintesi sono 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. Le sostanze chimiche sintetizzate dall'uomo sono quelle concepite per usi industriali (ad es. alcuni detergenti industriali), agricoli (ad es. alcuni antiparassitari), e per taluni beni di consumo (ad es. alcuni additivi per materiale plastico), non che le sostanze chimiche derivate dai processi industriali (ad es. le diossine), di cui si sospettano effetti negativi sul sistema endocrino di soggetti umani e animali (COM(1999)706, 1999).

Gli IE possono essere suddivisi in tre categorie:

i. Pesticidi. I pesticidi sono sostanze progettate appositamente per avere un'elevata efficacia sul sistema nervoso e riproduttivo degli organismi parassiti. Il problema è la stretta somiglianza di questi sistemi con quello fisiologico umano, per cui queste sostanze possono rappresentare un pericolo anche per l'uomo stesso. I pesticidi usati comunemente includono il DDT e il Clorpirifos (Gore et al., 2014). Il primo ha una lunga storia come IE, ed è stato usato casualmente come pesticida nel settore agricolo, nelle colture e nel bestiame, in ambiente domestico, nei giardini, nei luoghi pubblici e nelle istituzioni, ma per via della sua natura pericolosa, è stato bandito pochi anni dopo, anche se attualmente risulta ancora in uso in alcuni Paesi. Il DDT, avendo un'influenza diretta sul sistema riproduttivo, cardiovascolare e metabolico del corpo umano, può interferire con il sistema tiroideo, estrogenico, androgenico, pancreatico e neuroendocrino. I pesticidi organofosforici, come il Clorpirifos, risultano essere gli insetticidi più comunemente usati sia in ambiente domestico che in ambiente agricolo per controllare parassiti come scarafaggi, mosche, termiti, formiche e zanzare. Da vari studi è stato però confermato che il composto risulta essere altamente tossico, con enormi effetti sul sistema nervoso (Gore et al., 2014).

ii. Sostanze chimiche all'interno di prodotti di uso quotidiano. Gli IE sono presenti in molti prodotti, a partire da quelli per l'infanzia, prodotti elettronici e prodotti di cura personale, come creme, dentifrici e saponi, i quali vengono spesso addizionati con agenti antimicrobici. Ad esempio, i ritardanti di fiamma (Brominated Flame Retardands, BFR) sono composti che si ritrovano ampiamente in molti prodotti utilizzati nella vita quotidiana. Questi possono

variare dai computer, alle attrezzature elettroniche, tessili, schiume isolanti e altri materiali da costruzione. Questi prodotti sono indicati come una potenziale fonte di IE, in quanto vengono facilmente rilasciati in ambiente e, sebbene siano stati proibiti in molti Paesi, sono ancora considerati una fonte vulnerabile di esposizione, in quanto persistenti in ambiente per lunghi periodi di tempo (Gore et al., 2014).

iii. Materiali di contatto alimentare. Il Bisfenolo A (BPA) è un composto un tempo usato frequentemente nei contenitori di plastica ed anche nei rivestimenti dei cibi in scatola. A causa degli effetti dannosi riscontrati nell'essere umano, questo composto non è stato più utilizzato nella produzione di biberon per bambini, anche se lo si trova ancora in alcuni contenitori alimentari, come quelli per zuppe e verdura, in quanto usato come rivestimento per dare protezione contro i patogeni. Il problema, però, è che dal momento che il BPA viene a diretto contatto con gli alimenti, questi possono diventare veicoli per l'ingestione da parte dall'uomo (Gore et.al., 2014).

1.1.2 Criticità relative agli IE

Al fine di avere una chiara panoramica sulle possibili conseguenze derivate dall'esposizione agli IE, vi sono una serie di aspetti che dovrebbero essere presi in considerazione, descritti di seguito.

- Periodo di esposizione. Gli IE possono avere effetti differenti a seconda dell'età degli individui con cui vengono a contatto. Vi è perciò una sostanziale differenza se il contatto con queste sostanze si presenta in età adulta, piuttosto che nel feto in via di sviluppo o nel corso dell'infanzia. L'ambiente di un organismo in via di sviluppo è in grado di interagire con la genesi degli individui, determinando la propensione per un individuo a sviluppare una malattia o una disfunzione nel corso della vita. Questa propensione dipende anche dall'esposizione agli IE dal periodo fetale a quello di sviluppo post-natale, quando gli organi continuano a subire sostanziali cambiamenti (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).
- Gli effetti degli IE possono essere persistenti. Dalle ricerche risulta evidente come gli IE rappresentino un maggiore rischio nel primo periodo di sviluppo, piuttosto che nell'età adulta. Inoltre, una ricerca svolta dal NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) ha dimostrato come gli effetti

avversi di queste sostanze possano essere trasmessi alle generazioni future nonostante queste non ne siano direttamente esposte (NIEHS, 2010).

- Latenza rispetto all'esposizione. L'esposizione agli IE può sfociare in malattie che potrebbero però non apparire nel corso del periodo di esposizione stesso, manifestandosi invece nell'età adulta o in età avanzata. Il periodo di latenza tra l'esposizione e il verificarsi di particolari malattie ha creato una sfida globale nel determinare il coinvolgimento degli IE nel manifestarsi di particolari disturbi (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).
- Coinvolgimento di altri inquinanti. L'inquinamento ambientale non riguarda i singoli elementi, ma miscele di composti. In questo modo, se gli individui e la popolazione si trovano in qualche modo esposti agli IE, è altresì possibile che, oltre a queste sostanze, possano essere coinvolti altri tipi di inquinanti ambientali, creando degli effetti finali additivi o di sinergia (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).
- Agiscono a basse dosi (low dose effects), non rispettando le normali regole della tossicologia ovvero, generalmente, sono sufficienti bassi livelli di contaminanti per riscontrare un effetto sul corpo umano. Nel 1990, l'US National Academy of Sciences ha istituito un comitato per esaminare e studiare gli IE e, le informazioni che ne sono derivate, dimostrate nel corso di osservazioni durante la campagna di monitoraggio 2007-2011, è che una bassa esposizione a contaminanti come cadmio e organoclorurati, è associata ad un cambiamento del livello ormonale del siero, della maturazione sessuale e dell'indice di altezza o della massa corporea (Dhooge et al., 2011).
- Gli IE sono ubiquitari, in quanto entrano in ambiente da varie e disparate fonti. Le persone sono esposte, anche se a basse dosi, a questi contaminanti nella vita di tutti i giorni, essendo presenti in molti prodotti di uso quotidiano, che vanno dall'acqua potabile ai prodotti di consumo, come farmaci, prodotti alimentari e così via (Shudong et al., 2011).

1.1.3 Meccanismo di azione degli IE

L'attenzione al meccanismo con cui gli IE esercitano il loro effetto sugli organismi umani ed animali è cresciuta enormemente negli ultimi anni. Gli IE esercitano la loro azione primariamente attraverso interazione diretta con i recettori ormonali nucleari, come i recettori per gli estrogeni (ER) e per gli androgeni (AR) (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Per comprendere gli IE, si deve innanzi tutto avere un chiaro concetto del sistema endocrino, consistente in una serie di tessuti interconnessi, comunicanti tra loro e con il resto del corpo mediante la trasmissione di segnali mediati da molecole denominate ormoni. Questo sistema è responsabile del controllo di numerosi processi nel corpo, dai primi processi di sviluppo, come la differenziazione cellulare atta allo sviluppo e alla formazione ossea, fino al controllo delle funzioni dei tessuti e degli organi in età adulta. Il sistema agisce tramite ormoni, i quali viaggiano per via ematica per produrre effetti su svariate cellule e tessuti tramite percorsi di segnalazione complessi e interagenti, generalmente coinvolgendo i recettori degli ormoni. Nell'uomo vi sono circa 50 differenti ormoni e molecole correlate agli ormoni stessi (citochine e neurotrasmettitori) che integrano e controllano le normali funzioni corporee attraverso i tessuti e gli organi per tutto il corso della vita. Gli ormoni, così come le loro vie di trasduzione del segnale, spesso molto simili tra le specie, risultano davvero fondamentali ai fini del buon funzionamento di tutti i tessuti e degli organi sia negli organismi vertebrati che in quelli invertebrati (UNEP e WHO, 2013).

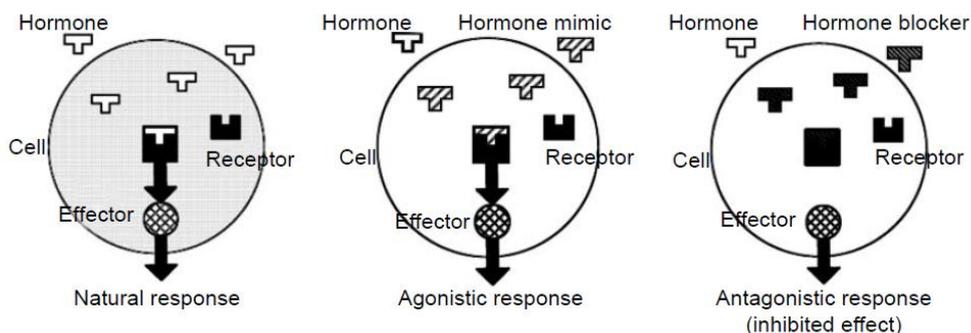


Figura 1.1 Meccanismo di azione degli IE

Il problema principale degli IE è che sono in grado di esibire le medesime caratteristiche degli ormoni. Essi sono infatti in grado di interferire in vario modo con le funzioni di questi ormoni, e nel fare questo sono in grado di alterare le funzioni endocrine, conducendo così ad effetti avversi per la salute. Gli IE sembrano interferire sul funzionamento di questo complesso meccanismo agendo almeno a tre livelli (Figura 1.1):

- i. Effetto agonistico, simulando l'azione degli ormoni naturali, come estrogeni (ormone sessuale femminile), androgeni (ormone sessuale maschile), e ormoni tiroidei, inducendo così reazioni chimiche analoghe a quelle normalmente prodotte, ma al tempo stesso in grado eccessivo o sbagliato;

ii. Effetto antagonistico, bloccando i recettori delle cellule che riconoscono e si legano agli ormoni (recettori ormonali), impedendo in questo modo la normale azione solitamente esercitata dagli ormoni naturali. In questo modo, l'ormone endogeno non è in grado di legarsi ai recettori e non si verifica perciò alcun segnale. Sostanze in grado di bloccare o antagonizzare gli ormoni sono ad esempio gli anti-estrogeni e gli anti-androgeni.

iii. Effetto di interferenza sulla sintesi, sul trasporto, sul metabolismo e sull'escrezione degli ormoni naturali.

E' stato riportato che l'esposizione a sostanze chimiche nel corso della gravidanza può avere gravi effetti sulla salute delle future generazioni.

Gli IE possono avere effetti fisiologici sull'uomo in vari modi, qui di seguito descritti.

- Stress ossidativo. E' stato recentemente scoperto che lo stress ossidativo, causato da specie reattive all'ossigeno (ROS) e dalla formazione di radicali liberi, risulta la principale causa per il presentarsi di vari disturbi (Saednia et al., 2013). La produzione di ROS, causata dagli IE, conduce a danni al DNA non che a danni alla produzione di proteine e lipidi nella cellula.
- Gli IE possono colpire il metabolismo degli ormoni steroidei. Gli enzimi coinvolti nella biosintesi degli ormoni steroidei sono il bersaglio ideale per gli IE, producendo conseguentemente seri danni alla fisiologia umana, come cancro, problemi al sistema riproduttivo, disordini nervosi e anomalie alla crescita (Sanderson, 2006). Ad esempio, il citocromo P450 (CYP450) risulta avere un ruolo fondamentale nella biosintesi degli ormoni steroidei regolata da differenti organi come le ghiandole surrenali, i testicoli, le ovaie, il cervello, la placenta e i tessuti adiposi. I composti organostannici, ampiamente usati nelle vernici antivegetative, in agricoltura e nelle industrie, possono provocare un'inibizione dell'attività di CYP450, non che dell'aromatasi nei pesci (Fent et al., 1991), conducendo ad effetti noti come "imposex", ovvero di sviluppo degli organi sessuali maschili negli individui di sesso femminile, tramite l'inibizione dell'aromatasi negli individui femmina (Fent, 2003).
- Gli IE possono avere come bersaglio i recettori nucleari, i quali consistono in fattori di trascrizione ligando-inducibili in grado di modulare l'espressione di specifici geni coinvolti nel metabolismo, nella differenziazione e nelle funzioni sessuali. A regolare la risposta agli ormoni da parte delle cellule bersaglio sono presenti più di 100 recettori nucleari, ed è stato osservato che, sotto

l'influenza di una dieta ad alto contenuto di grassi e di calorie, i recettori nucleari possono essere attivati dai composti organostannici, i quali possono stimolare la differenziazione degli adipociti e la predisposizione progressiva verso l'obesità (Grun et al., 2006). L'esposizione umana ai composti organostannici può avvenire principalmente attraverso fonti alimentari contaminate, come frutti di mare e molluschi, fungicidi derivanti dalle colture e acqua contaminata dalle industrie tessili (Golub et al., 2004).

- Gli IE possono colpire ogni fase del ciclo di produzione ormonale. Molte sostanze come i policlorobifenili (PCB), ftalati, diossine e furani sono in grado di agire come stimolatori tiroidei, mentre i BFR sembrano portare ad una riduzione dei livelli di ormone tiroideo (Moriyama et al., 2002).

In ogni modo, anche se il meccanismo con cui gli IE lavorano nei sistemi biologici è oramai conosciuto, il coinvolgimento di queste sostanze nel verificarsi di particolari patologie non può essere affermato con certezza. Inoltre, il presentarsi di vari disturbi è più probabilmente il risultato di esposizioni croniche a basse quantità di miscele di IE (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

1.1.4 Effetti sulla salute umana

Diversi studi condotti su animali, osservazioni cliniche e studi epidemiologici hanno indicato un ruolo potenziale degli IE nel colpire il sistema riproduttivo, non che organi e ghiandole come la prostata, il seno, i polmoni, il fegato, la tiroide, il metabolismo e nel causare obesità. Di seguito verranno descritti i principali effetti degli IE sui sistemi biologici e sugli organi del corpo umano (Figura 1.2).

- **Alterazione della funzione tiroidea.** La fisiologia umana, il controllo metabolico e gli stadi di sviluppo cerebrale sono regolati dagli ormoni tiroidei e la loro distruzione o il loro rilascio ritardato può causare disturbi alla crescita e al metabolismo, portando eventualmente a danni cerebrali (WHO, 2013). Gli IE possono influenzare il sistema tiroideo in vari modi, alterando il percorso o il trasporto degli ormoni tiroidei, agendo sia come agonisti che come antagonisti. I principali inquinanti ambientali identificati come IE includono PCB, BPA, tetracloro-dibenzo-diossina (TCDD), dibenzofurano policlorinato (PCDF), pentaclorofenolo, triclosan, polibromurati difenileteri (PBDE) e BFR, non che sostanze chimiche che si trovano in natura come isoflavonoidi di soia, tiocianato nelle verdure crocifere ecc. Da studi animali si è visto come alcune sostanze, ad esempio gli ftalati, possano influenzare la funzione tiroidea.

Esistono evidenze anche per sostanze come i parabeni, utilizzati in ambito cosmetico, per pesticidi come il diclorodifeniltricloroetano (DDT), l'esaclorobenzene (HCB) e per composti come il metossicloro e il clordano, che sembrano avere un effetto di IE tiroidei sugli animali e sull'uomo. Si è osservato ad esempio che sostanze come gli organoclorurati sono in grado di ridurre il livello degli ormoni tiroidei in molte specie, colpendo particolarmente l'ormone T4 (Goldey et al., 1995). Altri studi compiuti su animali hanno provato che i PCB sarebbero in grado di causare notevoli danni fisiologici agli ormoni tiroidei, conducendo ad effetti avversi sullo sviluppo, sulla crescita e sulle funzioni surrenali del corpo umano. L'esposizione agli ftalati, invece, sarebbe in grado di causare danni al funzionamento degli ormoni tiroidei nei neonati (Green et al., 2005). Altri composti presi in considerazione da vari studi sono i parabeni, comunemente usati come conservanti negli alimenti, i quali hanno mostrato esercitare una potenziale attività estrogenica, correlata con effetti tossici sul metabolismo tiroideo, mentre altri composti come i metilparabeni avrebbero mostrato al contrario un decremento dell'attività tiroidea (Soni et al., 2005). Pesticidi come il DDT e l'HCB, hanno invece mostrato un effetto di interferenza nella produzione di ormone tiroideo. Infatti, mentre il DDT sarebbe in grado di ostacolare l'attività dell'ormone tiroideo, l'HCB ha mostrato un'elevata tossicità verso gli ormoni tiroidei come T3 e T4 (Rozman et al., 1986).

- **Effetti sul sistema nervoso.** Il sistema nervoso, uno dei più importanti del corpo umano, risulta necessario al mantenimento della sincronizzazione di tutte le parti del corpo e può essere anch'esso esposto all'azione degli IE, attraverso vari meccanismi. Le funzioni corporee e ormonali possono essere infatti alterate a causa dell'effetto diretto degli IE nelle ghiandole endocrine, portando a disfunzionalità neuroendocrine, ad alterazioni del tasso metabolico, ad effetti indiretti sul comportamento e ad alterazioni nella differenziazione e nello sviluppo sessuale, portando a varie complicazioni come il dimorfismo sessuale. Esempi riguardanti l'esposizione agli IE e il loro effetto sul comportamento, sull'apprendimento, sull'attenzione, sulle funzioni sensoriali e sullo sviluppo neurologico sono forniti da vari studi. Esempi di distruttori diretti e/o indiretti neuroendocrini includono PCB, diossine, DDT con relativi pesticidi clorurati e metaboliti, metalli pesanti come il mercurio, composti organostannici, agrofarmaci come gli insetticidi regolatori di crescita,

ditiocarbammati, steroidi sintetici, tamoxifene, fitoestrogeni ed erbicidi contenenti atrazina (Mellanen et al., 1996). IE che si sono visti avere un'influenza sul sistema nervoso, agendo attraverso vari recettori e modificandone infine la risposta morfologica e comportamentale, sono gli erbicidi e i POP (Persistent Organic Pollutants). Vari studi hanno riportato che l'esposizione agli IE durante alcuni stadi di sviluppo cruciali, come quello intrauterino, perinatale e la pubertà, può portare al verificarsi di vari disturbi (Frye et al., 2012) come la schizofrenia e altre patologie neurologiche nel caso di esposizione al BPA, che sono poi associate con altri tipi di malfunzionamenti, come il mancato sviluppo fisiologico degli organi, dell'anatomia delle cellule, degli ormoni, dei neurotrasmettitori e risposte comportamentali non corrette (Brown, 2009). Gli IE sono in grado di colpire direttamente molti steroidi neuroattivi (o neurosteroidi), come il pregnenolone, regolandone il meccanismo ed evocando così disordini psichiatrici. Inoltre, essendo in grado di affliggere anche alcune regioni cerebrali, questi possono causare conseguenti problemi di schizofrenia e disordini bipolari. Livelli alterati di steroidi sono direttamente collegati anche con il mutamento del livello di estrogeni nel corpo che, oltre a causare schizofrenia per quanto riguarda l'esposizione a sostanze come il BPA, sembrano essere anche coinvolti in una serie di ulteriori disordini cerebrali, come la sindrome di deficit di attenzione e di iperattività (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) (Masuo et al., 2004). A causa dell'esposizione a sostanze come il BPA, sono stati osservati disordini neurali, comportamentali e bipolari anche in soggetti come bambini e neonati (Brown, 2009). Si è riportato, inoltre, che gli astrociti, cellule spesso riportate come bersaglio del BPA, se colpite possono portare al verificarsi di alcuni disturbi come la schizofrenia. L'esposizione ad alcuni PCB ha invece riportato degli effetti di danneggiamento a soggetti esposti durante la fase di sviluppo.

- **Effetti sul sistema riproduttivo maschile e femminile.** E' ormai risaputo come estrogeni e androgeni possano produrre diversi disordini sia negli individui di sesso maschile che femminile (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Disturbi al sistema riproduttivo femminile che potrebbero essere associati con la presenza di IE includono la pubertà precoce, la sindrome dell'ovaio policistico (Poly-Cystic Ovary Syndrome, PCOS) e l'insufficienza ovarica precoce (POF, Primary Ovarian Failure) (Costa et al., 2014). Nelle donne,

alcune patologie causate dalla presenza di IE consistono nell'ispessimento dell'endometrio e nell'alto rischio di sviluppare cancro al seno. Inoltre, a causa di queste sostanze, la prole futura di queste donne si troverà a combattere contro alcune gravi malattie, come il cancro vaginale. In uno studio condotto in Belgio su 120 ragazze, è stato osservato come i PCB causino un danno allo sviluppo del sistema riproduttivo (Staessen et al., 2001), mentre sostanze come il BPA, rilasciate da materie plastiche come biberon e utensili domestici, espongono i bambini ad un elevato pericolo di contrarre patologie al sistema endocrino (Biles et al., 1997). Si è osservato inoltre che topi esposti accidentalmente al BPA tramite la gabbia e la bottiglia in plastica dalla quale si abbeveravano, ha provocato in loro diverse anomalie, come casi di aneuploidia agli ovociti, causante quest'ultima casi di aborto spontaneo (Hunt et al., 2003). Similmente, attraverso altri studi, è stato osservato che il rischio di aborto spontaneo fosse elevato per le donne esposte a sostanze come il BPA (Sugiura-Ogasawara et al., 2005). Nel corso dell'ultimo secolo è anche stato osservato come l'età del menarca sia diminuita da 16-17 anni a meno di 13 (Costa et al., 2014). Ulteriori studi hanno dimostrato come la POF, che si presenta in circa l'1% della popolazione femminile inferiore ai 40 anni, sia associata all'esposizione agli IE (Costa et al., 2014). Gli IE potrebbero anche interferire con la regolazione ormonale del ciclo mestruale, in tal modo causando irregolarità, quali cicli di lunga durata che potrebbero avere ripercussioni sulla fecondità (Costa et al., 2014). Il disturbo prevalente nelle donne collegato all'esposizione agli IE è però il PCOS, una malattia caratterizzata dalla mancata ovulazione e dall'iperandrogenismo, spesso associata ad un'elevata prevalenza di obesità, ad insulino-resistenza e ad anomalie metaboliche (Costa et al., 2014).

Anche gli uomini possono soffrire di malfunzionamenti agli organi sessuali associati agli inquinanti ambientali in grado di interferire con il sistema endocrino, come anomalie allo sperma, ipospadia e testicoli ectopici. Esiste una forte possibilità che queste malattie siano causate dall'esposizione agli IE durante le fasi più sensibili e delicate della differenziazione sessuale e dello sviluppo fetale, come la fase perinatale. Un certo numero di studi compiuti in diversi Paesi a partire dal 1930, hanno riportato un declino della qualità dello sperma probabilmente ascrivibile alla presenza di IE, come una diminuzione del numero di spermatozoi e del volume di sperma, entrambe variabili che

potrebbero avere delle ricadute sulla fertilità (Fechner et al., 2011). Anche la fertilità degli uomini ha subito infatti un decremento negli ultimi decenni, almeno in alcuni Paesi. Alcuni studi compiuti sull'uomo e su animali hanno mostrato una correlazione tra l'esposizione ambientale e/o lavorativa ad elevati livelli di pesticidi e PCB, con una riduzione della fertilità (Nicolopoulou-Stamati et al., 2001).

- **Tumori.** In Gran Bretagna, dal 1978 al 2007, il tasso di incidenza del cancro è incrementato del 25%: 14% di incremento per gli uomini e 32% per le donne. Vari studi hanno dimostrato che molti IE possono avere effetti devastanti sul corpo umano, come tumori alle ghiandole tiroidee e alla prostata, effetti mutageni e disturbi metabolici e cardiovascolari (Sot et al., 2010). Uno studio eseguito sulle aree agricole maggiormente interessate dalla presenza di pesticidi, ha provato un incremento di malattie come leucemia e linfomi sui neonati e sui bambini (Alexander et al., 2001). Similmente, l'atrazina, comunemente usata come pesticida per il controllo delle malerbe, è stata associata a malattie come il cancro alle ghiandole mammarie (Cooper et al., 2000). Mentre sostanze come gli xenoestrogeni, sono stati assunti come la causa più probabile di tumore al seno negli ultimi cinquanta anni (Davis et al., 1993). Altre sostanze individuate come IE in grado di indurre il cancro al seno sono il toxafene, il DDT e altri pesticidi. Il cancro alle ovaie risulta essere la quarta causa principale di tumore mortale nella società occidentale, ed è inoltre la malattia ginecologica maligna più fatale (Boente et al., 1993). È stato dimostrato che gli estrogeni sarebbero in grado di indurre la proliferazione delle cellule epiteliali ovariche, causando un incremento del rischio di sviluppare il cancro alle ovaie (Lacey et al., 2002). In questo contesto, è stato osservato che l'esposizione al BPA potrebbe imitare gli effetti degli estrogeni nelle cellule ovariche. Si è dimostrato che nei topi anziani di sesso femminile, esposti in età neonatale al BPA, sono state provocate gravi patologie associate ad un incremento del tasso di proliferazione cellulare, come alterazioni della ciclicità mestruale, dell'ovulazione e della morfologia ovarica, provocando un'elevata incidenza di patologie come cisti ovariche, iperplasia endometriale, endometriosi adenomiosi, iperplasia atipica e polipi stromali (Newbold et al., 2007). Il nesso tra l'esposizione al BPA e il cancro alle ovaie è però ancora in gran parte sconosciuto, e sono necessari ulteriori studi al fine di determinarne una concentrazione tossica. D'altra parte, il cancro

alle ovaie sembra essere sensibile all'azione di altri IE, come il metossicloro e il triclosan, composti ampiamente utilizzati, rispettivamente, nei pesticidi e come componente di saponi, deodoranti, dentifrici e altri prodotti per l'igiene quotidiana (Kim et al., 2014).

Il cancro al seno affligge circa il 10% delle donne ed è per queste considerata la causa principale di morte per cancro. Parecchi studi hanno mostrato come estradiolo e progesterone siano coinvolti nell'avvio di cancro al seno. Specificamente, gli estrogeni sono in grado di incrementare sia la divisione che il tasso di proliferazione cellulare del tessuto mammario umano. La proliferazione cellulare è elevata nel seno adulto, dove livelli di estradiolo e progesterone sono elevati (Hofseth et al., 1999). Il BPA agisce come xenoestrogeno, ed il suo contributo nello sviluppare il cancro al seno è stato studiato approfonditamente sia *in vitro* che *in vivo*. L'esposizione al BPA nella fase pre-puberale e perinatale ha mostrato un incremento del rischio di sviluppare cancro al seno, innescando la proliferazione nelle ghiandole mammarie nei topi femmina adulti (Wang et al., 2014). In aggiunta, parecchi studi hanno investigato sugli effetti del BPA nella ghiandola mammaria adulta, mostrando infine come l'esposizione a questa sostanza inneschi la proliferazione cellulare e induca chemioresistenza nelle cellule tumorali del seno ER-positivo (recettori estrogenici positivi) (Jung et al., 2011). Per quanto riguarda altri IE, tra i policlorurati bifenili, soltanto il PCB-153 a concentrazioni piuttosto alte (35µM) sembra mostrare uno stimolo alla proliferazione cellulare, mentre altri PCB sembrano privi di un effetto significativo. Uno sguardo va infine ai pesticidi organoclorurati che, secondo parecchi studi, sembrerebbero promuovere anch'essi la patogenesi e la progressione del cancro al seno (Parada et al., 2016).

- **Obesità e diabete.** La CDC (United States Centre for Disease Control and Prevention) ha riportato, dal 1980 al 2011, un aumento del tasso di incidenza del diabete del 176% (dal 2,5% al 6,9%). Per quanto riguarda l'obesità, invece, questa è duplicata nei bambini e quadruplicata negli adolescenti negli ultimi 30 anni. Negli Stati Uniti, la prevalenza dell'obesità infantile tra i 6 e gli 11 anni è aumentata dal 7% nel 1980 al 18% nel 2012. Nello stesso periodo, l'obesità è cresciuta dal 5% al 21% anche tra gli adolescenti. Gli IE sono risultati come la maggiore causa di obesità, la quale è in grado di provocare ulteriori patologie come il diabete di tipo 2 e problemi cardiovascolari, come

l'ipertensione cardiaca (Newbold et al., 2008). In studi compiuti su animali, è stato osservato che quando un farmaco chimico come il DES viene somministrato ai topi in fase neonatale, questi aumentano di peso in modo significativo (Newbold et al., 2007). Vari studi hanno inoltre osservato che IE come estradiolo e altri inquinanti ambientali come BPA, diossine e pesticidi possono colpire i recettori estrogeni ER α e ER β , evocando cambiamenti nell'omeostasi glucidica e nel meccanismo di rilascio dell'insulina, fattori che determinano il presentarsi del diabete (Nadal et al., 2009). Uno studio eseguito sui POP, ha rivelato uno stretto collegamento tra la presenza di questi in ambiente e il verificarsi di malattie come il diabete e l'obesità nella popolazione residente (Lee et al., 2006). Studi epidemiologici hanno invece stabilito un nesso tra composti come la diossina e il presentarsi del diabete (Remillard et al., 2002). Proprio a basse dosi, il BPA è in grado di causare iperinsulinemia, collegata al diabete di tipo 2 e all'obesità (Alonso-Magdalena et al., 2010). Vari studi hanno riportato che anche il glucagone, uno dei principali ormoni prodotto dalle cellule α del pancreas che controlla il metabolismo glucidico, è suscettibile alla presenza di basse dosi di BPA e DES (Alonso-Magdalena et al., 2011).

- **Effetti sul sistema cardiovascolare.** In aggiunta all'obesità e al diabete, gli IE giocano un ruolo centrale nei problemi cardiovascolari (Poirier et al., 2003). Studi compiuti su animali hanno provato una connessione tra l'esposizione a sostanze come il DES e la comparsa di problemi cardiovascolari, mentre l'obesità causata dagli IE è in grado di provocare ulteriori disturbi cardiovascolari, che possono sfociare a loro volta in ictus e problemi di pressione sanguigna (Collins, 2005). Vari studi hanno provato una forte relazione tra IE, come il BPA e gli ftalati, e il manifestarsi di problemi cardiovascolari (Lind et al., 2011). Anche un'elevata concentrazione in ambiente di POP può essere associata con un incremento del tasso di malattie coronariche (Bertazzi et al., 1998). Infine, vari studi hanno riportato un'associazione tra sostanze come bottiglie di plastica, composti diossina-simili, pesticidi e farmaci e la comparsa di squilibri ormonali (Schug et al., 2011).

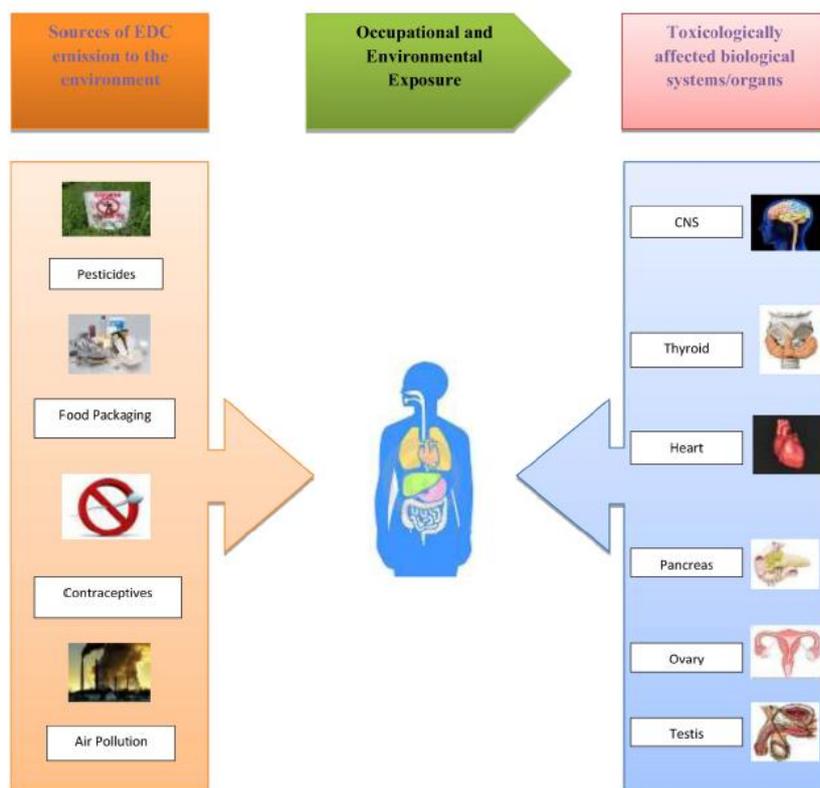


Figura 1.2 Fonti di IE in ambiente e bersagli di effetti tossicologici nel corpo umano (Maqbool et al., 2016)

1.1.5 Fonti e modalità di esposizione

Le fonti di esposizione agli IE sono diverse e ampiamente distribuite in ambiente e nelle società del mondo. Non vi è alcun modo per evitare di venire a contatto con determinate sostanze impiegate nella produzione di cibo (verdura e carne), nel controllo dei patogeni (insetticidi), nella produzione di materiali moderni (plastica) e nei materiali da costruzione (isolanti, BFR). La situazione però non è costante e non può essere predetta facilmente, poiché esistono differenze sostanziali nell'utilizzo di queste sostanze tra le varie nazioni. Tutto lo scenario diventa poi complicato se si considera che alcune sostanze sono state vietate in alcuni Paesi, mentre in altri il loro uso rimane ancora comune.

Gli IE possono entrare nel corpo umano attraverso varie strade, dal semplice consumo orale di cibo e acqua o per via endovenosa. Differenti studi hanno osservato che gli adulti ne entrano in contatto principalmente ingerendo acqua contaminata, carne, latticini grassi e attraverso inalazione di aria inquinata. I bambini possono invece venire a contatto mediante l'allattamento al seno, contatto con prodotti e giochi per l'infanzia e attraverso inalazione (Polyzos et al., 2012).

IE come PCB, diossine, composti perfluorati (PFC) e DDT si trovano comunemente nei rifiuti industriali e nei pesticidi e, attraverso contatto con il

suolo, sono poi in grado di contaminare sia quest'ultimo che le acque sotterranee e quelle di scorrimento. Questi composti sono poi assunti dall'uomo attraverso l'alimentazione (Gore et al., 2014).

Un individuo può venire a contatto con pesticidi comunemente usati in agricoltura o in ambiente domestico attraverso contatto dermico o mediante inalazione. Vari studi hanno riportato che sostanze come i BFR, comunemente usate in ambiente domestico, sono in grado di entrare nel corpo umano proprio tramite questa via. In aggiunta, è noto come prodotti per la cura personale, cosmetici, antibatterici, creme solari e farmaci (ftalati, repellenti per insetti e parabeni), applicati sulla pelle, siano in grado di penetrare nel corpo umano (Gore et al., 2014). Si è osservato inoltre come gli ftalati, comunemente usati nei tubi intravenosi, siano in grado di essere assunti per via endovenosa (Gore et al., 2014).

Infine, il corpo umano può essere esposto alle sostanze endocrine anche in assenza di contatto diretto con esse. Questo può avvenire ad esempio mediante trasferimento biologico dalla madre al figlio, mediante la placenta e il latte materno (Gore et al., 2014).

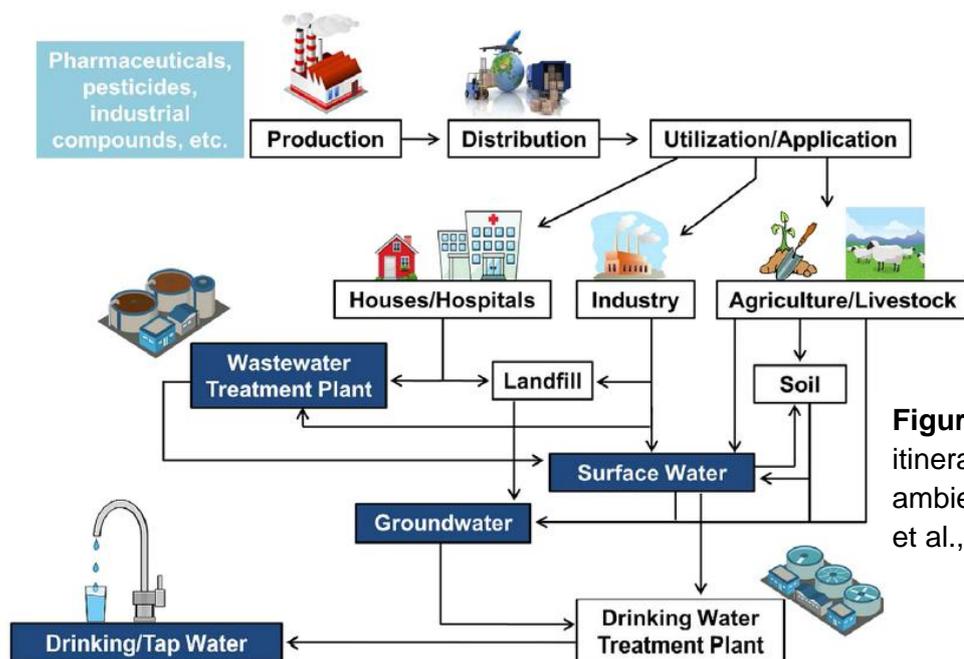


Figura 1.3 Fonti e itinerari degli IE in ambiente (Barbosa et al., 2016)

Le fonti di IE in ambiente possono essere varie e disparate, e vanno dagli scoli agricoli, municipali e industriali agli impianti di incenerimento e ai prodotti di consumo (Figura 1.3). I motivi potrebbero essere l'incompleta rimozione dei contaminanti durante i processi di trattamento, il ruscellamento delle acque lungo il suolo e lo scarico indiscriminato all'interno dei corsi d'acqua (Veerasingam et al., 2013).

L'esposizione agli IE potrebbe allora avvenire tramite ingestione di acqua o di alimenti contaminati, respirazione di aria contaminata e contatto con suoli contaminati da composti comunemente usati in agricoltura, nell'industria e in ambito domestico, come pesticidi, plastiche, alchilfenoli e BFR.

La problematica fondamentale di queste sostanze risiede sostanzialmente nell'elevata emivita, perciò, anche nel caso queste siano in disuso da molti anni, riescono a persistere in ambiente, rappresentando così un pericolo anche se presenti in basse dosi (Gore et al., 2014). Inoltre non esistono ancora dei trattamenti specifici in grado di rimuovere completamente questi inquinanti dall'ambiente, concentrati prevalentemente nelle acque di scarico. Infatti, anche se queste subiscono numerosi processi di trattamento, come flocculazione, sedimentazione, clorazione e filtrazione, questi non sono in grado di eliminare o rimuovere i contaminanti presenti nelle acque stesse, rendendo la situazione particolarmente allarmante (Westerhoff et al., 2005).

La permanenza degli IE è comunque largamente dipendente dalla loro persistenza in ambiente. Alcuni infatti sono in grado di degradarsi abbastanza velocemente mediante alcuni processi chimici guidati ad esempio dalla luce solare e dai batteri, mentre altri sono in grado di persistere per mesi o anni (Kidd et al., 2012).

Le acque reflue provenienti dalle industrie, in particolare quelle farmaceutiche, rappresentano la maggiore fonte di esposizione a causa del loro effetto potenzialmente avverso in ambiente (Stumm-Zollinger et al., 1965). Queste possono infatti contenere ormoni umani naturali, ormoni derivanti da prodotti farmaceutici, come le pillole anticoncezionali, e potenziali IE da vari detergenti, saponi, plastiche, cibo e prodotti per la cura personale. Da vari studi è stato osservato che IE come estrogeni e androgeni, ubiquitari e presenti in tracce in ambiente, sono rilasciati nelle acque reflue comunali da diverse industrie (Halling-Sorensen et al., 1998). Le industrie possono allora essere considerate una potenziale fonte di sostanze endocrine, fabbricando regolarmente prodotti di uso comune come pesticidi contenenti DDT, articoli di plastica contenenti BPA e ftalati e prodotti di cura personale contenenti antimicrobici. Questi sono solo alcuni dei potenziali candidati a IE, facilmente rilasciati in ambiente ad esempio tramite lisciviazione nel suolo e in acqua, assunti poi dai microrganismi, alghe e piante e diventando quindi fonte di alimentazione per gli animali.

Successivamente gli IE trovano la loro strada risalendo la catena alimentare, partendo dagli animali e arrivando all'uomo (Gore et al., 2014).

Oltre alle fonti industriali, un'altra importante fonte di IE è rappresentata dagli allevamenti di bestiame. Il problema è riconducibile all'utilizzo di steroidi sessuali in ambito agricolo, come estradiolo, progesterone e testosterone, identificati come IE, al fine di promuovere un effetto di crescita sugli animali. Avendo infatti un effetto estrogenico, queste sostanze sono in grado di promuovere sia un aumento di peso che migliorare l'efficienza di alimentazione del bestiame. Il risultato è che, quando un centinaio di animali si ritrova a sussistere su di un'area limitata, provoca un'elevata concentrazione di queste sostanze, avendo perciò un pericoloso impatto sull'ambiente (Kim et al., 2005).

1.1.6 Il percorso Europeo in tema di IE

A partire dagli anni '90, le sostanze chimiche in grado di interferire con il sistema endocrino hanno suscitato un notevole interesse nel panorama europeo ed internazionale della ricerca e della valutazione del rischio nei campi della salute, della sicurezza alimentare ed ambientale, costituendo argomento prioritario anche per i responsabili politici e gli organi governativi.

Come già detto in precedenza, la prima definizione di IE è stata pubblicata in occasione di un workshop organizzato dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (EPA) tenutosi a Raleigh, North Carolina, nel 1995.

Successivamente, nel dicembre 1996, a Weybridge, Regno Unito, si è tenuto un workshop organizzato al fine di affrontare il problema delle sostanze alteranti il sistema endocrino, al quale hanno preso parte esperti scientifici, rappresentanti politici dell'UE, degli Stati Uniti ed organizzazioni internazionali come l'OCSE e l'OMS. In tale occasione, in seguito ad una valutazione del potenziale impatto dell'interferenza a livello endocrino sulla salute umana ed animale, è stato stabilito un piano integrato condiviso per le future attività di ricerca e di controllo in questo campo.

Nel marzo 1999, il Comitato Scientifico della tossicità, ecotossicità e ambiente (Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, SCTEE), istituito dalla Commissione Europea nel 1997, con competenza specifica su questioni relative alla valutazione della tossicità e dell'ecotossicità dei composti chimici, biochimici e biologici il cui impiego potrebbe comportare conseguenze

dannose per la salute umana e per i diversi bacini ambientali, ha pubblicato il rapporto "Effetti degli IE sulla salute umana e sulla fauna selvatica". In tale rapporto viene individuato un "potenziale problema globale" per la fauna selvatica, confermando l'esistenza di dati dimostranti la correlazione causale tra sostanze chimiche alteranti il sistema endocrino e disturbi della riproduzione e dello sviluppo, non che modificazioni di individui o popolazioni, in numerose specie selvatiche (CSTEE, 1999).

Alle preoccupazioni e raccomandazioni espresse in tali report si è avuta, nel dicembre 1999, una pronta risposta da parte della Commissione Europea attraverso la pubblicazione della "Strategia comunitaria in materia di sostanze che alterano il sistema endocrino - una serie di sostanze con sospetta azione di interferenza sui sistemi ormonali nei soggetti umani e nella fauna selvatica".

Tale documento si prefiggeva come obiettivi sia quello di inquadrare il problema delle sostanze che alterano il sistema endocrino, le sue cause e le sue conseguenze, sia di definire un'adeguata azione politica ispirata al principio della precauzione per affrontare in maniera rapida ed efficace il problema e fugare le preoccupazioni della collettività.

La nozione di principio di precauzione è stata stabilita durante la Conferenza di Rio, il cui principio 15 recita: "Al fine di proteggere l'ambiente, il principio di precauzione sarà ampiamente applicato dagli Stati secondo le rispettive capacità. In caso di rischio di danno grave o irreversibile, l'assenza di certezza scientifica assoluta non deve servire da pretesto per differire l'adozione di misure adeguate ed effettive, anche in rapporto ai costi, dirette a prevenire il degrado ambientale" (Dichiarazione di Rio sull'Ambiente e lo Sviluppo, 1992). Successivamente, nel febbraio del 2000, in una comunicazione della Commissione sul ricorso al principio di precauzione, lo stesso viene così definito: "...il Principio di Precauzione fa parte di un approccio complessivo finalizzato all'analisi dei rischi, ed è anche utile per la loro gestione. Si riferisce a casi in cui le prove scientifiche sono insufficienti, non convincenti o incerte e in cui le valutazioni scientifiche preliminari indicano che ci sono notevoli motivi di preoccupazione" (COM(2000)1, 2000).

Ritornando alla Strategia, questa si prefissava di affrontare il problema attraverso una serie di interventi adeguati, ovvero:

- la necessità di svolgere ulteriori ricerche al fine di raccogliere altri dati scientifici sulla valutazione dell'esposizione, sull'identificazione delle popolazioni sensibili, sui meccanismi di azione del sistema endocrino, sullo sviluppo e la validazione di metodologie di esami e di screening, sui legami tra gli effetti nocivi per la salute umana e la fauna selvatica e l'esposizione a specifiche sostanze o miscele di sostanze;
- la necessità di coordinamento a livello internazionale al fine di evitare la duplicazione delle conoscenze e degli sforzi e per facilitare l'armonizzazione dell'attività normativa, promuovendo lo sviluppo e l'applicazione di criteri di valutazione riconosciuti a livello internazionale;
- la necessità di comunicare con il pubblico;
- la necessità di un'azione politica per il controllo e la regolamentazione delle sostanze chimiche, attraverso l'adozione di nuovi strumenti legislativi comunitari che affianchino quelli esistenti che già disciplinano in parte molte delle sostanze potenzialmente interferenti, anche se non direttamente per tali proprietà.

Allo scopo di rendere la Strategia rispettosa dei principi di precauzione e di trasparenza delle azioni intraprese, la Commissione ha previsto una serie di azioni da sviluppare nel breve, nel medio e nel lungo termine.

- Tra le azioni a breve termine è stata prevista la compilazione di un elenco prioritario di sostanze di cui occorresse valutare le possibili implicazioni nel processo di alterazione del sistema endocrino e successivamente la messa a punto di programmi di monitoraggio per stimare l'esposizione diretta e indiretta alle sostanze inserite nel suddetto elenco e gli effetti negativi che ne derivano. Altre azioni a breve termine consistevano in scambio di informazioni e coordinamento a livello internazionale, consultazione dei soggetti interessati e informazione al pubblico adeguata e accessibile.
- Le azioni a medio termine sono state individuate nel sostegno alla ricerca, riconosciuta come elemento essenziale, e nello sviluppo da parte degli Stati membri di nuovi test standardizzati ad hoc, approvati in ambito OCSE, per l'identificazione e la valutazione delle sostanze alteranti il sistema endocrino.
- Infine, tra le azioni a lungo termine è stata prevista la revisione e l'adeguamento degli strumenti legislativi comunitari in vigore in materia di sostanze chimiche e di tutela del consumatore, della salute e dell'ambiente (COM(1999)706, 1999).

Nel giugno 2001, rispondendo alla richiesta del Consiglio Europeo, è stata presentata la prima relazione intermedia sulle attività della Commissione, COM(2001)261, riguardante il periodo compreso tra il 1999 e il 2001.

In accordo con quanto previsto dalla Strategia, in tale documento è stato definito un elenco prioritario di sostanze da sottoporre ad ulteriori analisi per poterne accertare la sospetta azione sul sistema endocrino. La realizzazione della lista è stata affidata alla società olandese BKH Consulting Engineers, attraverso uno studio finanziato dalla DG Ambiente della Commissione Europea.

Tale studio ha prodotto un elenco di 553 sostanze "candidate", suddivise in tre diversi gruppi in funzione dei dati disponibili relativi a quattro criteri di selezione precedentemente stabiliti: volume di produzione, persistenza nell'ambiente, riscontri di effetti sul sistema endocrino in base alle pubblicazioni scientifiche esistenti, considerazioni in riferimento all'esposizione. Di queste 553 sostanze, 118 presentavano evidenza o potenziale evidenza di proprietà interferenti e, di queste, 109 erano già regolamentate per divieto o restrizione, anche se per ragioni non necessariamente correlate agli interferenti sul sistema endocrino. Per le restanti 453 sostanze, invece, è stata rilevata l'insufficienza dei dati disponibili (Figura 1.4).

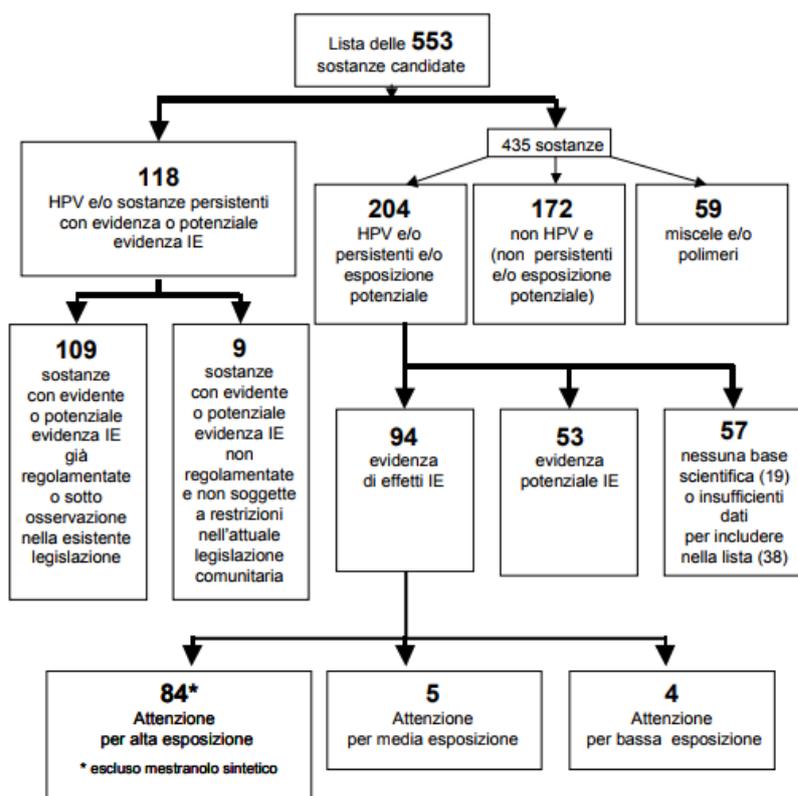


Figura 1.4 Lista prioritaria di sostanze per ulteriori valutazioni degli IE.

HPV: High Production Volume (sostanze con elevato volume di produzione annua)

Oltre a quanto appena detto, all'interno della relazione è stato compilato, di concerto con le parti interessate e i comitati scientifici della Commissione, un

elenco prioritario di azioni da intraprendere nell'immediato futuro, per procedere ad un'analisi più approfondita degli effetti di tali sostanze sul sistema endocrino. In seguito alle consultazioni, lo studio BKH è stato considerato, sia dalle parti interessate che dai comitati scientifici, adatto ad essere utilizzato come base di partenza per la stesura dell'elenco prioritario. Tuttavia è stata riconosciuta la presenza di lacune e la necessità di migliorare detto elenco, sviluppandolo ulteriormente (COM(2001)262, 2001).

Nell'ottobre del 2004 è stato presentato dalla Commissione il secondo rapporto intermedio che documenta e riassume l'attuazione della strategia comunitaria nel periodo 2001-2003. Anche in questo documento il punto chiave resta la creazione della lista prioritaria. Nel periodo in esame sono stati finanziati due nuovi studi in seguito alle raccomandazioni derivanti dal parere dello SCTEE e dalle consultazioni con i portatori di interesse sui risultati del precedente studio del 2000 di BKH.

Il primo progetto, condotto dalla società inglese WRC-NSF, ha preso in considerazione 9 delle 118 sostanze con evidenza di potenziali effetti sul sistema endocrino, non ancora disciplinate da alcuna normativa comunitaria. Lo studio si è occupato della raccolta di dati riguardanti la persistenza, i volumi di produzione e lo status giuridico di dette sostanze.

Il secondo studio, affidato al BKH-RPS Group, si è occupato delle 435 sostanze per le quali i dati scientifici disponibili erano stati ritenuti insufficienti. Di queste 435 sostanze valutate, 204 sono state raggruppate in tre categorie: 94 hanno mostrato una chiara evidenza di interferenza sul sistema endocrino, 53 hanno mostrato una potenziale evidenza, mentre per le restanti 57 sostanze i dati sono stati ritenuti insufficienti per poterne decidere l'inclusione o meno nella lista prioritaria (Figura 1.4).

- Per quanto riguarda le azioni di breve termine, la Commissione ha finalizzato uno studio allo scambio di informazioni e al coordinamento internazionale sugli IE che ha prodotto raccomandazioni per promuovere una migliore cooperazione in questo settore, creando inoltre un sito con l'intento di informare il pubblico sulle diverse iniziative comunitarie relative a questo tema. Tra dette azioni è stata inclusa anche l'azione di monitoraggio per la stima dell'esposizione agli IE.
- Per quanto riguarda le azioni a medio termine, il documento attesta la prosecuzione della partecipazione della Commissione e degli Stati membri

alla Task Force OCSE per la valutazione e le sperimentazioni sugli IE, e le azioni a sostegno della ricerca. Nel 2003 è stato lanciato un gruppo di ricerca sugli IE in Europa (CREDO), un cluster costituito da quattro progetti che hanno coinvolto 63 laboratori in Europa per i quali sono stati stanziati 20 milioni di euro. Nel 2004 è stato avviato il progetto CASCADE, una rete di eccellenza su larga scala che si occupa della "ristrutturazione" della ricerca europea in questo settore.

- Infine il rapporto documenta e riporta i progressi compiuti nel periodo di riferimento nell'ambito delle azioni a lungo termine che, come visto precedentemente, includono la revisione e l'adattamento alle normative esistenti (SEC(2004)1372, 2004).

Nel novembre 2007 è stata presentata dalla Commissione la terza relazione sull'avanzamento delle attività previste nella strategia 2004-2006 (SEC(2007)1635, 2007).

Il documento attesta che il lavoro intrapreso nel 2000 per l'individuazione di un elenco prioritario di sostanze si è concluso nel 2006, in seguito allo studio finanziato dalla Commissione nel 2005 e condotto dalla DHI Water and Environment. Tale studio si è concentrato sulle Low Production Volume Chemicals (LPVC), ovvero sulle sostanze chimiche prodotte o importate nell'UE con peso superiore a 10 tonnellate annue ma inferiore a 1000 tonnellate annue.

Una volta conclusa la valutazione, compiuta su 107 sostanze: 34 hanno mostrato una chiara evidenza di effetti negativi sul sistema endocrino, in almeno un organismo intatto (categoria 1), 21 sostanze hanno mostrato alcune prove suggerenti potenziali disturbi endocrini (categoria 2) e 52 sostanze hanno mostrato dati insufficienti per decidere una loro inclusione nella lista prioritaria (categoria 3a o 3b).

La valutazione dello stato giuridico delle sostanze dannose o potenzialmente dannose prese in considerazione nello studio ha dimostrato che 29 di queste erano già oggetto di divieto o restrizione o regolate da altra normativa comunitaria, mentre 27 di queste non lo erano. I risultati finali dello studio sono stati inseriti in un database disponibile sul sito della DG Ambiente, il quale oggi comprende tutte le informazioni scientifiche che hanno portato alla definizione della lista prioritaria, oltre ai dati scientifici sugli effetti sulla salute umana e ambientale raccolte nel corso dei tre studi precedenti.

Per quanto riguarda le azioni a lungo termine, il documento registra importanti sviluppi in campo legislativo, in particolare l'adozione del Regolamento REACH (Registration Evaluation Authorisation and restriction of CHemicals) entrato in vigore nel giugno 2007 e che stabilisce la procedura di autorizzazione per le sostanze definite "estremamente preoccupanti" e per quelle aventi proprietà di IE considerate di "preoccupazione equivalente" (Regolamento 1907/2006/CE).

Nell'ambito della Direttiva quadro sulle acque (Direttiva 2000/60/CE), i passi avanti sono stati fatti sia attraverso la determinazione di un primo elenco di 33 sostanze particolarmente preoccupanti che attraverso la proposta di Direttiva della Commissione per la definizione degli standard di qualità ambientale (SQA) per le sostanze prioritarie individuate. Nel giugno 2006, è stata inoltre adottata la nuova Direttiva sulle acque sotterranee (Direttiva 2006/118/CE).

Altre rilevanti iniziative a livello normativo sono state sia la proposta di modifica, da parte della Commissione, della Direttiva sui prodotti fitosanitari (Direttiva 91/414/CEE), sia l'adozione della Direttiva concernente il divieto di uso, al di fuori delle ipotesi ammesse, di sostanze con azione ormonale per la stimolazione della crescita degli animali da allevamento (Direttiva 2003/74/CE).

Nell'agosto 2011, in seguito alle esortazioni del Consiglio, è stato pubblicato dalla Commissione il quarto rapporto intermedio sul progresso delle attività previste dalla strategia avviata nel 1999, con riferimento al periodo 2007-2011 (SEC(2011)1001, 2011).

Prima di procedere a riassumere i progressi avvenuti nel periodo di riferimento, il documento parte dall'ammissione di una grande inadeguatezza della legislazione europea sul tema degli IE ed evidenzia come l'obiettivo principale, in Europa e a livello internazionale, sia quello di trovare dei criteri concordati per l'identificazione e valutazione degli IE.

Per quanto riguarda le attività di ricerca, il documento descrive i progressi dei progetti nati negli anni precedenti, tra cui la rete di eccellenza CASCADE, progetto avviato nel 2004 che ha coinvolto 24 gruppi di ricerca di ben 9 stati membri, tra cui l'Italia e conclusosi nel 2010, quando si è trasformato nell'associazione CASCADE per la collaborazione nella ricerca sugli IE. Il finanziamento di ulteriori studi sugli IE (NECTAR, OBELIX, PERFOOD) è proseguito nell'ambito del settimo programma quadro per la ricerca e lo sviluppo tecnologico (2007-2013).

A livello internazionale, l'OCSE, nell'ambito del suo programma sulle sostanze chimiche ha dedicato un importante progetto agli IE, il quale ha dato luogo ad una serie di linee guida per l'identificazione di potenziali IE. Un contributo attivo a questo programma è stato dato dalla Commissione europea, dall'EFSA e dall'ECHA (European CHemicals Agency).

Gran parte del documento è però stata dedicata alle azioni a lungo termine riguardanti gli interventi legislativi. Grande importanza riveste l'attuazione del Regolamento REACH, che nell'allegato XIV elenca tutte le sostanze soggette ad autorizzazione ai sensi del Regolamento. Con il Regolamento 143/2011, la Commissione ha inserito in questo allegato 6 nuove sostanze tra le quali gli ftalati, DEHP, BBP e DBP, classificate come tossiche per la riproduzione e identificate come IE. Di conseguenza è stato modificato anche l'allegato XVII, il quale elenca tutte le sostanze sottoposte a restrizione in materia di fabbricazione, immissione sul mercato e uso.

Un altro importante progresso in campo legislativo è rappresentato dall'adozione del Regolamento 1107/2009/CE riguardante i prodotti fitosanitari, nel quale le sostanze identificate come IE, che possono causare effetti avversi negli esseri umani, non possono essere autorizzate.

Per quanto riguarda l'attività legislativa inerente al tema dei biocidi, nel giugno 2009, la Commissione ha presentato al Parlamento europeo e al Consiglio una proposta di Regolamento relativa all'immissione sul mercato e all'uso di biocidi, come stabilito dall'articolo 251 del trattato CE. L'obiettivo della proposta di Regolamento, successivamente approvata dal Parlamento e dal Consiglio nel 2012, è stato quello di migliorare il funzionamento del mercato interno dei biocidi, garantendo nel contempo un livello elevato di tutela della salute umana e di protezione dell'ambiente (Regolamento 528/2012).

Viene poi considerato, tra le azioni a lungo termine, il Regolamento sui cosmetici (Regolamento 1223/2009/CE).

In tema di materiali a contatto con gli alimenti, nel settembre 2010 lo Scientific Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing AIDS (CEF) dell'Efsa ha pubblicato un parere scientifico sul BPA (EFSA Journal, 2010). Sulla base di tale parere e in applicazione del principio di precauzione, la Commissione ha vietato l'uso di questa sostanza nei biberon (Direttiva 2011/8/UE), mentre ne resta autorizzato l'uso in altri materiali plastici a contatto

con alimenti ma con lo specifico limite di migrazione di 0,6 mg per chilogrammo di cibo.

Altri campi in cui si è lavorato nel triennio di riferimento e che toccano la tematica degli IE sono quelli degli additivi alimentari, delle sostanze prioritarie rientranti nel quadro della normativa sulle acque e sugli SQA e infine quello della sicurezza e della salute sul lavoro.

L'elenco dei progressi a lungo termine si conclude con la nuova Direttiva 2009/48/CE sulla sicurezza dei giocattoli che ha ampiamente modificato la vecchia normativa, e in particolare prevede limiti sulle quantità di certe sostanze chimiche che possono essere contenute in materiali utilizzati per fabbricare giocattoli.

Il quarto ed ultimo report sulla Strategia Europea in materia di IE si chiude poi con le conclusioni tratte dalla Commissione in seguito all'esame condotto sulle modalità con cui la legislazione europea ha affrontato, fino a quel momento, il problema dell'esposizione multipla agli IE, rispondendo ad una esplicita richiesta del Consiglio. Quel che è emerso è che l'attuale legislazione offre possibilità ancora molto limitate (un esempio è il caso dei prodotti fitosanitari) e che sarebbe dunque necessario un quadro normativo che preveda la valutazione dei potenziali effetti di singole sostanze chimiche sul sistema endocrino e al tempo stesso la possibilità di valutare l'impatto cumulativo di combinazioni di sostanze sul sistema endocrino.

Nel 2011 è stato istituito l'Endocrine Disrupters Expert Advisory Group, costituito da tossicologi ed ecotossicologi designati dalle autorità competenti degli Stati membri, dalle associazioni di categoria, dalle ONG di tutela ambientale e dai consumatori.

Nel giugno del 2012 si è tenuta a Bruxelles la conferenza "Endocrine Disruptors: current challenges in science and policy" organizzata dalla Commissione europea e a cui hanno partecipato circa 300 tra responsabili, politici, esperti, scienziati, gruppi industriali, organizzazioni di categoria e ONG. Gli esiti della conferenza, nella quale si è discusso di identificazione delle sostanze di effetti sulla salute e sull'ambiente, di rischi e di obiettivi politici, hanno prodotto la revisione della Strategia attuale della Commissione europea ed hanno contribuito a stabilire i criteri per l'individuazione di sostanze con proprietà di IE.

Nel febbraio 2013 si è svolta la quinta riunione del gruppo, nel corso della quale sono stati affrontati temi rilevanti quali l'identificazione e la caratterizzazione delle sostanze IE e la determinazione di una soglia. In tale occasione è stato redatto un rapporto (Report on key scientific issues relevant to the identification and characterisation of endocrine disrupting substances) che verrà successivamente utilizzato dalla Commissione come base per lo sviluppo dei criteri identificativi, nel quale viene evidenziato che l'identificazione di una sostanza come IE deve essere basata sul nesso causale tra effetto avverso e meccanismo di azione, applicando un approccio basato sul "Weight of evidence", impiegando tutti i dati disponibili, inclusi i dati epidemiologici, quelli *in vitro*, sugli animali, ecc.

Secondo quanto previsto da due atti di legislazione primaria (Regolamento sui prodotti fitosanitari del 2009 e quello sui biocidi del 2012) che hanno introdotto per la prima volta il divieto di utilizzo di sostanze con proprietà di IE, la Commissione avrebbe dovuto adottare, entro dicembre del 2013, la puntuale definizione dei criteri scientifici per la determinazione delle proprietà di interferenza con il sistema endocrino. La mancata adozione di tali provvedimenti ha dato vita a numerose discussioni, a due risoluzioni del Parlamento europeo e ad una pronuncia di condanna della Corte di Giustizia nel 2015. Soltanto nel 2016 la Commissione, con l'ausilio tecnico dell'EFSA e di altri organismi scientifici europei come l'ECHA e l'EEA, ha presentato un pacchetto sugli IE composto di quattro documenti: una Comunicazione illustrante i criteri scientifici sfociati nella definizione di IE, una valutazione di impatto e due distinte proposte di Regolamento relative rispettivamente ai prodotti fitosanitari e ai biocidi.

1.1.7 Norme relative agli IE

Nella legislazione europea esistono varie disposizioni in materia di IE, anche se la maggior parte di queste li disciplinano in modo indiretto. Essi sono infatti disciplinati mediante atti legislativi settoriali in tema di salute e sicurezza sul lavoro, di sicurezza degli alimenti e dei mangimi, di prodotti di consumo come cosmetici o giocattoli e di tutela dell'ambiente, come ad esempio la normativa sulla qualità delle acque. Questo è principalmente dovuto alla scarsità di conoscenze scientifiche, ancora incomplete e in continua evoluzione e alla mancanza, fino a poco tempo addietro, di criteri che consentissero di stabilire quando una sostanza fosse da considerare IE, pregiudicando la corretta applicazione delle disposizioni legislative.

Un altro elemento critico consiste nel fatto che le normative europee miranti alla protezione dei cittadini dall'esposizione a sostanze chimiche dannose, anzi che fornire una valutazione globale e integrata degli effetti cumulativi che tenga conto delle diverse vie di esposizione o dei diversi tipi di prodotti, valuti al contrario la tossicità individuale di ciascuna esposizione (ad esempio la valutazione di pesticidi e biocidi è disciplinata da normative separate).

Nel presente capitolo si andranno perciò a trattare tutti quegli atti legislativi che, direttamente o indirettamente, vanno a toccare gli IE.

1.1.7.1 Dalla Direttiva 2000/60/CE, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, alla Decisione 2015/495/EU

La Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, ha istituito un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Al fine di proteggere e migliorare la qualità delle acque, la Direttiva mira ad impedire il deterioramento dello stato dei corpi idrici dell'UE e a conseguire un "buono stato" dei fiumi, dei laghi e delle acque sotterranee in Europa entro il 2015.

In particolare è prevista la protezione di tutte le forme d'acqua (di superficie, sotterranee, interne e di transizione), il ripristino degli ecosistemi interni ed adiacenti a questi corpi d'acqua, la riduzione dell'inquinamento nei corpi idrici e la promozione di un uso sostenibile delle acque da parte degli individui e delle imprese.

La normativa prevede inoltre chiare responsabilità in capo alle autorità nazionali, designando delle autorità di bacino con il compito di gestire i bacini idrografici di loro competenza, monitorando lo stato delle acque di ciascun bacino, producendo e mettendo in atto piani di gestione dei bacini idrografici al fine di evitare il deterioramento delle acque superficiali, proteggendo e migliorando le acque sotterranee e preservando le aree protette.

Nell'Allegato VIII della Direttiva 2000/60/CE è riportato un elenco indicativo dei principali inquinanti, nel quale al punto 4 sono riportate quelle "sostanze e preparati, o i relativi prodotti di decomposizione, di cui è dimostrata la cancerogenicità o mutagenicità e che possono avere ripercussioni sulle funzioni steroidea, tiroidea, riproduttiva o su altre funzioni endocrine connesse nell'ambiente acquatico o attraverso di esso".

Per quanto riguarda la qualità delle acque specificatamente destinate al consumo umano, si deve far riferimento alla Direttiva 98/83/CE, la quale fissa valori

parametrici applicabili alle acque destinate al consumo umano al fine di tutelare la salute pubblica prevenendo rischi microbiologici e chimici. Questa non prevede valori di parametro per la categoria degli IE in generale, ma ne fa riferimento in questi termini: "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 di sostanze nocive per la salute" (Direttiva 98/83/CE).

Nel 2004, l'OMS, nella terza edizione delle Linee Guida per la qualità dell'acqua potabile, principale documento di riferimento per la normativa comunitaria sulla qualità delle acque potabili, ha introdotto un nuovo approccio per il controllo della qualità delle acque per il consumo, definito attraverso l'acronimo WSP (Water Safety Plans), successivamente ribadito e consolidato nella quarta edizione pubblicata nel 2011 (WHO, 2008).

I criteri stabiliti dal WSP hanno come obiettivo principale l'organizzazione e la sistemazione delle pratiche di gestione già applicate alla produzione di acqua potabile e parimenti incoraggiano la valutazione e la gestione dei rischi lungo l'intera filiera idro-potabile. Proprio mediante l'approccio dei WSP, la Commissione si propone di controllare gli IE ed in generale tutte le sostanze pericolose che possono contaminare le acque destinate al consumo umano.

Con la Direttiva 2008/105/CE sono stati stabiliti SQA al fine di limitare le concentrazioni di talune sostanze chimiche presenti nei corpi idrici superficiali che presentano un significativo rischio per l'ambiente o la salute dell'uomo nelle acque superficiali dell'UE (Direttiva 2008/105/CE).

Nuovi SQA a livello europeo, per tutte le sostanze prioritarie elencate, sono stati poi introdotti dalla Direttiva 2013/39/UE, in modo che in tutta l'Unione vi sia uniformità di monitoraggio, necessaria per ottenere gli obiettivi di tutela delle acque. Questa ha modificato la Direttiva 2000/60/CE, incrementando l'elenco delle sostanze prioritarie (12 nuove sostanze prioritarie, tra le quali il Nonilfenolo e Ottilfenolo), contenute nell'allegato X, e ha rappresentato un importante progresso necessario per gestire la problematica delle sostanze prioritarie ed emergenti. Le sostanze prioritarie sono definite come quelle sostanze chimiche con un rischio significativo per l'ambiente acquatico per le quali l'UE stabilisce priorità di intervento ai fini del loro monitoraggio. Esaminando tale elenco, composto da 45 sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque, si può

notare come molte delle sostanze inserite siano IE: al punto 28 si trovano ad esempio gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), mentre al punto 37 le diossine e i composti diossina-simili. Tale elenco deve essere inoltre periodicamente riesaminato dalla Commissione, al massimo ogni sei anni (Direttiva 2013/39/UE). In questa Direttiva è stato inoltre consigliato di includere nel primo elenco di 10 sostanze/gruppi di sostanze da sottoporre a monitoraggio nell'UE, sia due farmaci (il farmaco non-steroido anti-infiammatorio Diclofenac e l'ormone sintetico 17-alfa-etinilestradiolo, EE2) che l'ormone naturale 17-beta-estradiolo, E2. Nel primo quadrimestre del 2015, la prima Watch list di sostanze largamente monitorate nell'UE (come stabilito dalla Direttiva 2008/105/EC) è stata modificata con la Decisione 2015/495/EU del 20 Marzo 2015. Oltre alle sopraccitate sostanze (Diclofenac, EE2 e E2), in questa lista sono presenti anche 3 antibiotici macrolidi (Eritromicina, Claritromicina Azitromicina), l'estrone (E1), alcuni pesticidi, filtri UV e antiossidanti comunemente utilizzati come additivi alimentari (Decisione di esecuzione 2015/495/UE).

1.1.7.2 Regolamento 1907/2006/CE, "REACH"

Il Regolamento 1907/2006/CE, denominato "REACH", concernente la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche e l'istituzione dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche, prevede la registrazione di tutte le sostanze prodotte o importate nell'UE in quantità maggiori di 1 tonnellata per anno.

Il Regolamento, che ha subito negli anni una serie di modifiche, si prefigge come obiettivo quello di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente, di promuovere metodi alternativi per la valutazione dei pericoli che le sostanze comportano, di favorire la libera circolazione di sostanze nel mercato interno rafforzando, nel contempo, la competitività e le capacità innovative dell'industria chimica dell'UE.

Il Regolamento ha inoltre istituito l'ECHA, che svolge un ruolo di coordinamento tecnico-scientifico delle attività previste dal Regolamento stesso e organizza una banca dati al fine di raccogliere e gestire i dati forniti dall'industria attraverso la registrazione di nuove sostanze.

In sintesi, il Regolamento prevede:

- la registrazione delle sostanze, che comporta per i fabbricanti e gli importatori di sostanze e preparati l'obbligo di presentare all'ECHA una serie di

informazioni di base sulle caratteristiche delle sostanze fabbricate o importate in quantitativi pari o superiori ad una tonnellata l'anno e, in mancanza di dati disponibili, l'obbligo di eseguire test sperimentali per caratterizzare le relative proprietà fisico-chimiche, tossicologiche e ambientali. Tali informazioni sono comunicate all'ECHA tramite un fascicolo di registrazione che contiene le informazioni relative ai pericoli e, se pertinente, una valutazione dei rischi che l'uso della sostanza potrebbe comportare;

- la valutazione, da parte dell'ECHA e degli Stati membri, delle informazioni presentate dalle imprese, al fine di esaminare la qualità dei fascicoli di registrazione e di verificare se i rischi di ciascuna sostanza per la salute umana e l'ambiente siano adeguatamente controllati;
- l'autorizzazione obbligatoria delle sostanze "estremamente preoccupanti" incluse nell'allegato XIV. Queste sono le sostanze cancerogene, mutagene e tossiche per la riproduzione (CMR), le sostanze persistenti, bioaccumulabili e tossiche (PBT), le sostanze molto persistenti e molto bioaccumulabili (vPvB) e gli IE. La procedura di autorizzazione mira a garantire che i rischi derivanti da sostanze estremamente preoccupanti siano adeguatamente controllati e che le stesse siano gradualmente sostituite da alternative idonee, assicurando il buon funzionamento del mercato interno dell'UE;
- l'adozione di restrizioni di portata generale, riguardanti le imprese produttrici o utilizzatrici di sostanze che presentano pericoli specifici per l'ambiente e la salute umana;
- l'accesso del pubblico alle informazioni sulle proprietà delle sostanze chimiche e l'attività di informazione e assistenza tecnica alle imprese (helpdesk nazionali);
- l'attività di controllo e vigilanza da parte degli Stati membri per garantire il rispetto dei requisiti previsti dal Regolamento.

Come già accennato gli IE, secondo il Regolamento REACH, appartengono alla categoria delle sostanze individuate come "estremamente preoccupanti", per le quali è previsto l'obbligo di autorizzazione. Tali sostanze sono oggetto di particolare attenzione e possono essere prodotte e utilizzate solo previa specifica autorizzazione della Commissione europea, rilasciata sulla base di un'istruttoria effettuata dall'ECHA.

1.1.7.3 Regolamento UE 1272/2008, "CLP"

Il Regolamento UE 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele, è entrato in vigore negli Stati membri il 20 gennaio 2009, ed ha subito negli anni numerose modifiche, fino alla più recente con il Regolamento della Commissione 776/2017.

La nuova disciplina CLP (acronimo di "Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures), costituisce una revisione ed un aggiornamento del sistema di classificazione ed etichettatura dei prodotti chimici, basato sulla Direttiva 67/548/CEE sulle sostanze pericolose e sulla Direttiva 1999/45/CE sui preparati pericolosi. Le direttive appena citate sono state quindi modificate da questa nuova disciplina e, dopo un periodo di transizione, definitivamente sostituite nel giugno 2015.

Il Regolamento si propone di armonizzare i criteri per la classificazione delle sostanze e delle miscele e le norme relative alla loro etichettatura ed imballaggio e di assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente, non che la libera circolazione delle sostanze chimiche e delle loro miscele.

Obiettivo del Regolamento è quello di determinare quali proprietà di una sostanza o di una miscela permettano di classificarla come pericolosa, identificando e rendendo noti i pericoli che essa comporta. Tali proprietà comprendono i pericoli di natura fisica per la sicurezza, quelli per la salute dell'uomo e quelli per l'ambiente.

Il Regolamento è rivolto a tutte le sostanze chimiche e alle miscele, compresi i biocidi e gli antiparassitari, senza limiti di quantità prodotte per anno.

Il metodo di classificazione e di etichettatura delle sostanze chimiche da esso introdotto è basato sul sistema mondiale armonizzato definito dalle Nazioni Unite (Globally Harmonized System, GHS, dell'ONU).

Il Regolamento ha previsto che le sostanze fossero riclassificate e rietichettate entro il 1 dicembre 2010, e le miscele entro il 1 giugno 2015. A partire da questa data, comunque, le norme di classificazione ed etichettatura previste dal Regolamento sono diventate definitivamente e completamente obbligatorie.

Il Regolamento CLP garantisce che i rischi presentati dalle sostanze chimiche siano chiaramente comunicati ai lavoratori e ai consumatori dell'UE attraverso la classificazione e l'etichettatura delle sostanze chimiche. A tal fine, le sostanze

chimiche pericolose devono essere etichettate in base al sistema standardizzato in modo che i lavoratori e i consumatori possano conoscerne gli effetti prima di utilizzarle.

Prima di immettere sostanze chimiche sul mercato, gli operatori del settore devono stabilire quali sono i rischi per la salute umana e per l'ambiente, classificandole in linea con i rischi individuati. L'obbligo di classificare le sostanze immesse sul mercato, non che di etichettarle ed imballarle correttamente, è a carico delle imprese produttrici ed importatrici. La classificazione di una sostanza o miscela ne riflette il tipo e la gravità dei pericoli intrinseci.

Vengono così definite delle classi di pericolo, riportate all'allegato I del Regolamento, intitolato "disposizioni relative alla classificazione e all'etichettatura delle sostanze e delle miscele pericolose", che però non prevedono una specifica classificazione per le sostanze potenzialmente dannose per il sistema endocrino. Tuttavia, molte di queste sostanze vengono comunque disciplinate in relazione ad altre loro proprietà, rientrando così in alcune classi di pericolo per la salute e per l'ambiente, ad esempio come mutagene, cancerogene, tossiche per la riproduzione o bioaccumulabili in ambiente acquatico.

1.1.7.4 Direttiva 98/24/CE relativa ai rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro

La Direttiva 98/24/CE, del 7 aprile 1998, "sulla protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro", stabilisce i requisiti minimi per la protezione dei lavoratori contro i rischi per la salute e la sicurezza che derivano, o possono derivare, dagli effetti di agenti chimici presenti sul luogo di lavoro o come risultato di ogni attività lavorativa che comporti la presenza di agenti chimici.

Essa stabilisce valori limite di esposizione e misure preventive e viene applicata ai lavoratori esposti a sostanze chimiche pericolose quando le sue disposizioni sono più favorevoli di quelle della Direttiva 2004/37/CE relativa alla protezione dei lavoratori dai rischi derivanti da agenti cancerogeni.

Il diritto comunitario in materia di sicurezza e salute dei lavoratori non affronta gli IE come gruppo separato di sostanze. Tuttavia, laddove questi possono presentare un rischio per la salute e la sicurezza dei lavoratori, saranno applicati i requisiti della Direttiva 98/24/CE. Questa infatti attesta che, al fine di proteggere i lavoratori dai rischi chimici, la Commissione debba proporre valori limite indicativi

di esposizione sul lavoro da fissare a livello europeo. Nell'eseguire tale compito, la Commissione è assistita dal Comitato scientifico per i limiti di esposizione professionale agli agenti chimici (SCOEL). Ad esempio, seguendo le raccomandazioni dello SCOEL, la Commissione ha adottato un valore indicativo di esposizione professionale per il BPA da polvere inalabile di 10 mg/m³.

Per quanto riguarda gli obblighi dei datori di lavoro, ad essi sono rimesse la valutazione e la prevenzione dei rischi. Il datore di lavoro deve infatti valutare l'eventuale presenza di agenti chimici pericolosi sul luogo di lavoro e, in caso affermativo, valutare i rischi per la sicurezza e la salute dei lavoratori derivanti dalla presenza di tali agenti chimici. Il datore di lavoro deve poi adottare le misure preventive necessarie al fine di eliminare o ridurre al minimo i rischi. Ove possibile, le sostanze chimiche o i processi devono essere sostituiti con altri meno pericolosi.

1.1.7.5 Regolamento 315/93 relativo ai contaminanti nei prodotti alimentari

Il Regolamento 315/93/CEE del Consiglio, dell'8 febbraio 1993, stabilisce le procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari, includendo così molte sostanze che alterano il sistema endocrino, pur non prendendo in considerazione tali sostanze per questi specifici effetti. Con l'espressione "contaminante", secondo l'articolo 1 del Regolamento, viene intesa "ogni sostanza non aggiunta intenzionalmente ai prodotti alimentari, ma in essi presente quale residuo della produzione, della fabbricazione, della trasformazione, della preparazione, del trattamento, del condizionamento, dell'imballaggio, del trasporto e dello stoccaggio di tali prodotti, o in seguito alla contaminazione dovuta all'ambiente".

Tale Regolamento è stato adottato al fine di garantire che nessun prodotto alimentare contenente quantità inaccettabili di sostanze contaminanti possa essere commercializzato. L'articolo 2 del Regolamento, infatti, contiene il divieto di commercializzare un prodotto alimentare che contenga "contaminanti in quantitativi inaccettabili sotto l'aspetto della salute pubblica e in particolare sul piano tossicologico".

La contaminazione può avvenire nel corso delle diverse fasi che caratterizzano la filiera di produzione, a partire dal campo fino al consumo a tavola, e determina la necessità di verificare la matrice chimica, biologica o microbiologica delle singole

sostanze, la cui presenza deve essere, di volta in volta, esclusa o mantenuta a livelli inferiori a quelli fissati in base ad una soglia accettabile di rischio.

La scienza chiarisce come, allo stato attuale delle conoscenze, sia impossibile escludere la presenza di contaminanti negli alimenti, e di questo se ne tiene conto all'articolo 2, il quale dichiara che "i contaminanti devono essere mantenuti ai livelli più bassi che si possono ragionevolmente ottenere attraverso buone pratiche" in tutte le fasi in cui è coinvolto il prodotto, dalla produzione alla vendita al pubblico.

I limiti massimi di residui e le sostanze regolamentate sono aggiornati periodicamente tramite regolamenti specifici della Commissione. I limiti attualmente vigenti sui contaminanti più importanti sono contenuti nel Regolamento 1881/2006/CE della Commissione, modificato da numerosi regolamenti, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (come nitrati, micotossine, metalli pesanti e diossine) e ne prevede una revisione periodica (Regolamento 1881/2006/CE).

Alla Commissione sono poi attribuiti sia poteri di intervento in caso di motivi imperativi di urgenza, sia la competenza di confermare, modificare o abrogare i provvedimenti di sospensione o limitazione temporanea di misure previste dal diritto dell'Unione, assunti da uno Stato membro sulla base del sospetto motivato che un contaminante presente in prodotti alimentari costituisca un rischio sanitario, pur rispettando le regole vigenti.

Infine, per quanto riguarda le modalità con le quali si perviene alla definizione delle quantità massime tollerabili, ai sensi dell'articolo 3 del Regolamento 315/93, le disposizioni che possono incidere sulla salute pubblica devono essere adottate dalla Commissione "previa consultazione del comitato scientifico dell'alimentazione umana", oggi sostituito dall'EFSA ai sensi del Regolamento 178/2002.

1.1.7.6 Direttive relative alle sostanze ad azione ormonale negli alimenti di origine animale

Un ambito rilevante è la somministrazione di sostanze farmacologiche o di altre sostanze da ingrasso ad animali destinati alla produzione alimentare. L'UE limita la somministrazione di ormoni agli animali le cui carni o prodotti siano destinati al consumo umano. Qualsiasi altra somministrazione, come quella volta a stimolare la crescita, è vietata, mentre la detenzione di ormoni è strettamente controllata.

Le prime direttive emanate a riguardo sono state la 81/602/CEE, del 31 luglio 1981, relativa alla proibizione di certe sostanze aventi azione ormonica o tireostatica e la 88/146/CEE, del 7 marzo 1988, relativa alla proibizione di certe sostanze aventi azione ormonica contenute nei farmaci.

Queste sono state poi abrogate e sostituite dalla Direttiva 96/22/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e di sostanze β agoniste nelle produzioni animali. Questa ha confermato le misure della precedente Direttiva, estendendole anche a nuove sostanze ad azione anabolizzante, come i β agonisti, impiegati in modo illecito negli allevamenti al fine di stimolare la crescita e la produttività degli animali. Altre sostanze oggetto di divieto di somministrazione agli animali da allevamento restano, invece, consentite a scopo terapeutico, ma il loro impiego deve essere strettamente controllato (Direttiva 96/22/CE).

La Direttiva 96/22/CE è stata successivamente modificata dalla Direttiva 2003/74/CE che ha vietato in via definitiva l'uso dell'E2 ai fini della stimolazione della crescita degli animali, riducendo inoltre le altre circostanze in cui può essere somministrato a tutti gli animali da azienda per fini terapeutici o di trattamento zootecnico (Direttiva 2003/74/CE).

Ulteriori modifiche sono state poi introdotte dalla Direttiva 2008/97/CE del 19 novembre 2008.

Nel periodo più recente, tuttavia, la sicurezza dei prodotti di origine animale è stata messa a rischio dall'utilizzo di mangimi, composti da sostanze indesiderabili o vietate, capaci di forzare le capacità produttive degli animali.

Il 7 maggio 2002 è stata quindi introdotta la Direttiva 2002/32/CE relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali che, all'articolo 2, le definisce come "qualsiasi sostanza o prodotto, ad eccezione dei microrganismi patogeni, che sia presente nei mangimi destinati all'alimentazione degli animali e costituisca un pericolo potenziale per la salute animale o umana, o per l'ambiente, o che sia tale da influire sfavorevolmente sull'allevamento". La Direttiva specifica un elenco e stabilisce i valori soglia tolleranza, in corrispondenza a quantità precisate e ad un livello ridotto con riguardo a parametri di tossicità acuta, bioaccumulabilità e degradabilità di ogni singola sostanza indicata, di modo da impedire il verificarsi di effetti indesiderati e nocivi. Oltre tali soglie, stabilite nell'allegato I, la presenza di tali sostanze dell'alimentazione degli animali è vietata. L'elenco e i livelli massimi stabiliti per

ogni sostanza vengono regolarmente aggiornati alla luce di nuove evidenze scientifiche e tecniche o della diversa sensibilità dei metodi di analisi introdotti (Direttiva 2002/32/CE).

1.1.7.7 Regolamento 1935/2004/CE riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari

Il Regolamento 1935/2004/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004, riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari, stabilisce norme comuni per i materiali e gli oggetti destinati agli imballaggi, quali bottiglie e contenitori, che entrano o possono entrare in contatto con i prodotti alimentari, direttamente o indirettamente, e ne stabilisce i requisiti generali e specifici.

Il principio base di tale disciplina è che tali materiali od oggetti devono risultare sufficientemente inerti di modo da escludere il trasferimento di sostanze ai prodotti alimentari in quantità tali da mettere in pericolo la salute umana o da determinare una modifica inaccettabile della relativa composizione o un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche.

Solo alcuni dei materiali ammessi sono attualmente oggetto di misure specifiche dell'UE. Per gli altri materiali, gli Stati membri possono adottare disposizioni nazionali. Inoltre, le autorità nazionali possono sospendere l'impiego di un particolare materiale qualora, in seguito a nuove informazioni o ad una nuova valutazione delle informazioni esistenti, emergano motivazioni circa la possibilità dello stesso di nuocere alla salute umana.

L'articolo 15 del Regolamento attesta che i materiali utilizzati per gli imballaggi devono riportare la dicitura "per contatto con i prodotti alimentari" ed essere accompagnati da logo idoneo.

La normativa, all'allegato I, individua 17 gruppi di materiali e oggetti, che vanno dal sughero al vetro, alla plastica e ai tessuti, relativamente ai quali possono essere adottate misure specifiche.

In relazione ai materiali plastici, come già detto precedentemente, il Regolamento UE 321/2011 ha introdotto restrizioni relative al BPA, utilizzato nei biberon di plastica. In applicazione del principio di precauzione ne è stato vietato l'uso nei biberon destinati all'alimentazione dei neonati in seguito ad un parere scientifico dell'EFSA del settembre 2010, nel quale sono state evidenziate proprio le proprietà tossiche di tale sostanza (EFSA Journal, 2010).

1.1.7.8 Regolamento 1107/2009/CE relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari

Il Regolamento 1107/2009/CE, che ha abrogato la Direttiva 91/414/CE, stabilisce le norme relative all'autorizzazione della vendita, dell'utilizzo e del controllo dei prodotti fitosanitari nell'UE.

In base a quanto stabilito dall'articolo 2 del Regolamento, con il termine "prodotto fitosanitario" si identificano le sostanze attive e i preparati, in pratica i prodotti commerciali formulati dall'industria, nella forma in cui sono stati forniti agli utilizzatori, contenenti una o più sostanze attive, antidoti agronomici, sinergizzanti, coformulanti, coadiuvanti, destinati a: proteggere i vegetali o i prodotti vegetali da tutti gli organismi dannosi o prevenirne gli effetti (insetticidi, acaricidi, fungicidi, ecc.); favorire o regolare i processi vitali dei vegetali (fitoregolatori), con esclusione dei fertilizzanti; conservare i prodotti vegetali, con esclusione dei conservanti specificatamente disciplinati; controllare le piante infestanti, indesiderate o dannose presenti all'interno della coltura (erbicidi); eliminare parti di vegetali, frenare o impedire un loro indesiderato accrescimento (eccetto alghe).

Il Regolamento 1107/2009/CE si basa di fatto sulla considerazione che l'impiego di prodotti fitosanitari è necessario per la produzione vegetale, in quanto uno dei principali modi per proteggerli contro gli organismi nocivi, comprese le erbe infestanti, migliorando la produzione agricola. Tale considerazione è basata però sulla consapevolezza che tali prodotti possono avere anche effetti non benefici sulla produzione vegetale, comportando invece rischi e pericoli per l'uomo, gli animali e l'ambiente, soprattutto se immessi sul mercato senza essere stati ufficialmente testati e autorizzati o se utilizzati in modo scorretto.

Rispetto alla precedente Direttiva 91/2014/CE, i criteri per l'approvazione dei prodotti fitosanitari risultano più rigidi e tengono conto dei possibili rischi per la salute umana (tossicità acuta e cronica) e per l'ambiente (persistenza, bioaccumulo, possibile inquinamento delle acque, possibili effetti su organismi acquatici, api o altri organismi non bersaglio). Al fine di ottenere l'approvazione, una sostanza attiva, oltre a dover essere sufficientemente efficace, non deve avere alcun effetto nocivo sulla salute umana, compresa quella dei gruppi vulnerabili, sulla salute animale, prendendo in considerazione gli effetti cumulativi e sinergici noti, sulle acque sotterranee, e sull'ambiente.

Per quanto riguarda i livelli massimi di residui di prodotti fitosanitari sui prodotti alimentari e mangimi, questi sono stabiliti dal Regolamento 396/2005/CE. Tale Regolamento ha definito livelli di residui per ogni prodotto e sostanza attiva uguali in tutti i Paesi dell'UE, in precedenza stabiliti dai singoli Stati con conseguenti problemi di circolazione delle derrate.

Per quanto riguarda gli IE, l'articolo 23 del Regolamento 1107/2009/CE stabilisce che una sostanza attiva possa essere autorizzata solamente se non possiede una capacità intrinseca di provocare effetti nocivi sul sistema endocrino o effetti neurotossici o immunotossici. La procedura e i criteri per l'approvazione delle sostanze attive sono descritte nell'allegato II, nel quale viene specificato ulteriormente che l'assenza di proprietà che alterano il sistema endocrino che possano produrre effetti nocivi sull'uomo o in organismi non bersaglio, deve risultare da una valutazione fondata su orientamenti per l'esecuzione dei test riconosciuti a livello comunitario o internazionale (Direttiva 1107/2009/CE).

1.1.7.9 Regolamento UE 528/2012 relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi

Il Regolamento 528/2012/UE, che ha abrogato la precedente Direttiva 98/8/CE, tratta l'immissione sul mercato e l'uso di biocidi utilizzati per la tutela dell'uomo, degli animali, dei materiali o degli articoli contro organismi nocivi, quali parassiti e batteri, mediante l'azione dei principi attivi contenuti nel biocida. Lo scopo del Regolamento è quello di migliorare il funzionamento del mercato dei biocidi nell'UE, garantendo allo stesso tempo un elevato livello di tutela per l'uomo e l'ambiente.

I biocidi sono definiti dall'articolo 3 come "qualsiasi sostanza o miscela nella forma in cui è fornita all'utilizzatore, costituita da, contenente o capace di generare, eliminare e rendere innocuo, impedire l'azione o esercitare altro effetto di controllo su qualsiasi organismo nocivo, con qualsiasi mezzo diverso dalla mera azione fisica o meccanica". Il medesimo articolo definisce anche il termine principio attivo come "una sostanza o un microrganismo che agisce su o contro gli organismi nocivi" (Regolamento 528/2012/UE).

Tutti i biocidi necessitano di un'autorizzazione prima di poter essere immessi nel mercato, ma i principi attivi in essi contenuti devono essere stati approvati precedentemente. Esistono tuttavia alcune eccezioni a tale prassi, per le quali è ammessa un'autorizzazione provvisoria.

Come nella Direttiva 1107/2009/CE sui prodotti fitosanitari, l'approvazione dei principi attivi avviene a livello dell'Unione, mentre la successiva autorizzazione dei biocidi a livello degli Stati membri. Tuttavia, il nuovo Regolamento fornisce ai richiedenti anche la possibilità di ottenere un nuovo tipo di autorizzazione a livello dell'Unione.

Per quanto riguarda gli IE, l'articolo 5 del Regolamento esclude che possano essere approvati principi attivi che siano considerati in possesso di proprietà di IE in grado di produrre effetti nocivi sull'uomo. Sono esclusi anche tutti quei principi attivi classificati conformemente al Regolamento 1271/2008 come cancerogeni, mutageni o tossici per la riproduzione, e i principi attivi considerati come attivi PBT o vPvB conformemente al Regolamento 1907/2006.

Il medesimo articolo, però, elenca alcune eccezioni. Le sostanze appena elencate possono infatti essere approvate se rispettano almeno una delle seguenti condizioni: "a) il rischio per gli esseri umani, gli animali o per l'ambiente derivante dall'esposizione del principio attivo in un biocida, nelle peggiori realistiche condizioni d'uso, è trascurabile, specie quando il prodotto è utilizzato in sistemi chiusi o in altre condizioni tendenti a escludere il contatto con gli esseri umani e il rilascio nell'ambiente; b) è dimostrato che il principio attivo è essenziale per prevenire o contrastare un pericolo grave per la salute umana, la salute animale o l'ambiente; c) la mancata approvazione del principio attivo avrebbe un impatto negativo sproporzionato sulla società rispetto ai rischi per la salute umana, la salute animale o l'ambiente derivati dall'uso della sostanza".

Se un biocida contiene un principio attivo approvato a norma dall'articolo 5, deve essere utilizzato con le "adeguate misure di mitigazione del rischio, al fine di garantire che l'esposizione degli esseri umani, degli animali e dell'ambiente a tali principi attivi sia ridotta al minimo".

Inoltre l'articolo 19, relativo alle condizioni per il rilascio dell'autorizzazione, prevede che non possa essere autorizzata la messa a disposizione sul mercato per l'uso da parte del pubblico di un biocida che abbia proprietà di interferenza con il sistema endocrino.

Ai sensi dell'articolo 5, la definizione dei criteri scientifici per la determinazione delle "proprietà di interferenza con il sistema endocrino" è rinviata ad atti da adottarsi, da parte della Commissione europea, entro il 13 dicembre 2013. I termini posti, però, sono stati disattesi dalla Commissione europea.

In attesa dell'adozione dei criteri definitivi da parte della Commissione, sempre l'articolo 5 propone dei criteri provvisori per individuare i principi attivi considerati aventi proprietà di interferenza con il sistema endocrino: quelli che a norma del Regolamento 1272/2008 sono classificati o rispondono ai criteri per essere classificati come cancerogeni di categoria 2 e come tossici per la riproduzione di categoria 2. Possono essere inoltre considerate sostanze aventi proprietà di interferenza con il sistema endocrino quelle che, a norma del Regolamento 1272/2008/CE, sono classificate o rispondono ai criteri per essere classificate come tossiche per la riproduzione di categoria 2 e che hanno effetti tossici sugli organi endocrini.

1.1.7.10 Regolamento 1223/2009/CE sui prodotti cosmetici

Il Regolamento 1223/2009/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 30 novembre 2009, sui prodotti cosmetici, mira a migliorare la sicurezza dei prodotti cosmetici venduti nell'UE, rinforzando i requisiti di sicurezza ed elencando una serie di sostanze vietate o sottoposte a restrizioni.

Tale disciplina non pone restrizioni agli IE, ma all'articolo 15 prescrive il divieto di utilizzare nei prodotti cosmetici sostanze classificate come sostanze CMR. Nell'ultimo paragrafo è poi previsto l'obbligo di riesaminare, al più tardi entro il 2015, il Regolamento stesso per quanto riguarda le sostanze alteranti il sistema endocrino, alla luce dei criteri concordati a livello comunitario per l'identificazione di tali sostanze.

Tale riesame è stato ritardato dal fatto che i criteri sono stati fissati solamente nel giugno 2016 e non si è ancora conclusa la procedura per l'adozione dei progetti di Regolamento proposti dalla Commissione (Regolamento 1223/2009/CE).

1.1.7.11 Direttiva 2009/48/CE sulla sicurezza dei giocattoli

Tutti i giocattoli fabbricati o importati all'interno dell'UE sono soggetti a rigorosi requisiti di sicurezza prima che possano essere introdotti sul mercato.

I requisiti di sicurezza che i giocattoli messi a disposizione sul mercato dell'UE devono rispettare sono stabiliti dalla Direttiva 2009/48/CE, che identifica le specifiche responsabilità dei diversi operatori nella catena di fornitura, dal produttore al rivenditore.

La Direttiva viene periodicamente aggiornata, generalmente per stabilire i limiti di sicurezza delle sostanze chimiche, come cadmio, bario o BPA, utilizzate nei giocattoli.

La Direttiva impone alla Commissione di valutare sistematicamente e regolarmente la presenza di sostanze e materiali pericolosi nei giocattoli. Inoltre affida alla Commissione la possibilità di adottare valori limite specifici per le sostanze utilizzate nei giocattoli destinati ad essere utilizzati da bambini sotto i 36 mesi o in altri giocattoli che possono venire a contatto con la bocca (Direttiva 2009/48/CE).

1.1.8 Descrizione degli IE oggetto del presente lavoro di tesi

1.1.8.1 PFOA e PFOS

Gli acidi perfluorooctanoico (PFOA) e perfluorooctansolfonico (PFOS) (Figura 1.5) fanno parte dei composti perfluorurati (PFC), una famiglia di composti creati dall'uomo comunemente utilizzati nei prodotti di consumo e nei processi industriali, così come nei rivestimenti protettivi di tappeti e di mobili, carta e rivestimenti di abiti. Entrambi sono caratterizzati da un forte legame fluoro-carbonio e da un'elevata resistenza alla biodegradazione (Kunacheva et al., 2011).

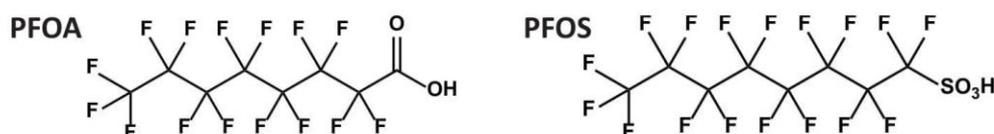


Figura 1.5 Struttura molecolare di PFOA e PFOS

Parecchi studi hanno evidenziato come questa classe di composti sia associata con il presentarsi di vari disturbi, come quelli riguardanti la tiroide, asma, tumore al fegato, iperuricemia, atopia pediatrica, disturbo cronico renale e disturbi comportamentali. Inoltre, da uno studio riguardante l'ecotossicità del suolo è stata rilevata un'inibizione della crescita dei lombrichi (*E. fetida*) esposti a PFOA e PFOS, non che danni al DNA e incrementi del tasso di mortalità (Zheng et al., 2016). Vari studi hanno rilevato la presenza di questi composti nei vari comparti ambientali, comunemente frequentati nella vita di ogni giorno. Complessivamente, la concentrazione di PFC nella polvere interna è generalmente ai livelli di ng/g. PFOS e PFOA, assieme ad altri PFC, hanno mostrato elevate concentrazioni e detengono la più alta frequenza nella polvere domestica. La concentrazione di PFC nella polvere interna è associata con il livello economico di un Paese, visto che si trovano comunemente nei prodotti per la casa. Quattro studi hanno esaminato i PFC nella polvere degli uffici in Belgio,

Boston, Svezia e Norvegia, indicando PFOA e PFOS come i composti chimici più abbondanti e presenti con maggior frequenza. In particolare, la concentrazione media di PFOA e PFOS negli uffici del Belgio era rispettivamente di 2,9 ng/g e 2,2 ng/g (D'Hollander et al., 2010).

Altri due articoli riguardanti la presenza di PFC nella polvere all'interno dei veicoli hanno rilevato dei valori medi di 15,8 ng/g per quanto riguarda i PFOS e 11,4 ng/g per i PFOA (Bjorklund et al., 2009). La presenza di PFOS e PFOA nella polvere dei veicoli potrebbe derivare dagli accessori e dalle componenti interne della macchina, visto che queste sostanze chimiche sono comunemente usate nei trattamenti superficiali di protezione.

Complessivamente, la variabilità di concentrazione di PFC nei diversi Paesi può dipendere da vari fattori, come diversi stili di vita nelle varie culture e da diversi stati economici ma, sebbene vari tipi di PFC siano stati osservati nella polvere di uffici, in ambiente domestico e all'interno di veicoli, l'ingestione di polvere interna non può essere considerata una fonte primaria di esposizione, se comparata con altre, come l'ingestione di cibo e acqua.

Proprio a causa della presenza di PFC nel suolo, nelle acque di irrigazione e nell'aria, le verdure si ritrovano ad assimilare e ad assorbire queste sostanze da queste matrici. In questo modo, le verdure diventano una potenziale fonte di PFC per l'uomo. Uno studio ha riportato che frutta e verdura risultano i più importanti contributori nell'assunzione di PFOA (19%), dopo l'acqua potabile (Noorlander et al., 2011).

Da uno studio è stato rilevato che l'assorbimento di PFC dalla materia organica è positivamente correlato con la lunghezza della catena di PFC (Higgins et al., 2006). Così, PFC con catene corte di gruppi carbossilici, come i PFOA, sono facilmente assimilati dalle radici dei vegetali, venendo così individuati più frequentemente nella verdura. I PFOS, anche se ugualmente composti dominanti in ambiente, presentano una concentrazione nelle verdure inferiore ai PFOA. Questo può indicare che i PFOS sono fortemente associati con il suolo, invece che essere assimilati dai vegetali.

Uno studio ha rilevato la presenza di una varietà di PFC nelle verdure in quattro diversi Paesi europei (Norvegia, Repubblica Ceca, Belgio e Italia) (Herzke et al., 2013). In conclusione è stata rilevata un'ampia contaminazione di queste sostanze in Norvegia, probabilmente a causa del fatto che gli ortaggi in questa nazione sono principalmente importati da altri Paesi, incrementando così la

probabilità dei vegetali di venire a contatto con varie fonti contaminate, incluso l'imballaggio alimentare (Begley et al., 2008).

Uno studio ha misurato la concentrazione di PFC in diversi campioni di cibo raccolti nel 1999, 2005 e 2010 in Svezia (Vestergren et al., 2012). La concentrazione di PFOS in campioni di uova nel 1999 (1280 pg/g) è risultata da 30 a 100 volte superiore rispetto al 2005 (13 pg/g) e al 2010 (39 pg/g). Questo può essere attribuito alla limitazione nell'uso di PFOS negli USA e nei Paesi europei. Un altro studio ha invece rilevato concentrazioni generalmente più elevate di PFOA e PFOS (tra decine e centinaia di pg/g) nelle uova provenienti dalla Cina, suggerendo che in tale Paese la produzione di alcuni PFC non si è fermata.

PFOA e PFOS sono però riportati come i PFC dominanti nella carne e nei suoi derivati (Haug et al., 2010). Similmente a quanto visto per le uova, è stato osservato che la concentrazione di PFOS nei campioni di carne è diminuita nel periodo dal 1999 al 2010 (da 190 pg/g al 25 pg/g) (Vestergren, 2010).

Sono i pesci e i molluschi, però, ad esibire il più alto tasso di concentrazione di PFC. In particolare, il composto dominante risulta essere il PFOS, seguito da altri PFC, tra cui i PFOA. I PFOS sono stati rilevati in pesci e molluschi della Catalogna, Spagna, a concentrazioni superiori a 2,7 ng/g w.w. (wet weight), mentre i PFOA sono stati rilevati negli stessi campioni con concentrazione media di 2,6 ng/g w.w. (Domingo et al., 2012). In uno studio sono state osservate alte concentrazioni di PFOS e PFOA (3,0-53 ng/g w.w.) nei pesci commestibili del Mar Mediterraneo, sebbene questi siano localizzati in un bacino semi-chiuso con scarsi scambi d'acqua (Nania et al., 2009). In un altro studio sono stati trovati livelli considerevolmente alti di PFOS e PFOA nei pesci carnivori come le carpe (*Carassius carassius*), rispetto ai pesci erbivori. Questi risultati suggeriscono che la concentrazione di PFC incrementa lungo la catena trofica (Zhang et al., 2011). In aggiunta, le matrici ambientali come l'acqua e i sedimenti possono essere altri importanti fattori che influenzano la concentrazione dei PFC nei pesci e nei molluschi.

Infine, la contaminazione da PFC nei pesci e nei molluschi può dipendere dalle emissioni industriali, la più importante fonte di scarico. Uno studio ha riportato un'elevata concentrazione di PFOS legata alla densità di popolazione e alla presenza di aree industriali nelle vicinanze del sito di campionamento (Vassiliadou et al., 2015).

L'acqua potabile risulta un'altra fonte comune di PFC per l'uomo. Una varietà di PFC è stata rilevata in diversi campioni di acqua potabile raccolta da diversi Paesi (Boiteux et al., 2012). PFOS e PFOA appaiono tra i composti PFC con la più alta concentrazione e frequenza nelle acque potabili. Le più alte concentrazioni di PFOA nelle acque potabili sono state rilevate in Giappone e in Ghana, rispettivamente a 100 ng/L e ad 800 ng/L, mentre per gli altri Paesi le concentrazioni sono presenti fino a 20 ng/L. Per quanto riguarda i PFOS, le concentrazioni più elevate sono state riscontrate in Ghana ed in Spagna, rispettivamente a 100 ng/L e a 40 ng/L (Essumang et al., 2017). Raggruppando inoltre i campioni di acqua potabile, è stato rilevato che i livelli di PFC in essi risultano in questo ordine: acqua di pozzo>in acqua di rubinetto>acqua di bottiglia>acqua potabile>acqua grezza. Una maggiore concentrazione di PFC nell'acqua di pozzo sta ad indicare che la contaminazione da parte di queste sostanze può avvenire principalmente da fonti puntuali. Una maggiore concentrazione di PFC nelle acque di rubinetto e in quelle potabili, rispetto alle acque grezze, starebbe ad indicare il ruolo dei processi di trattamento delle acque nella contaminazione da PFC (Domingo et al., 2012).

Uno studio ha dimostrato come il carbone attivo granulare (GAC, Granular Activated Carbon) possa ridurre efficientemente le catene lunghe di PFC, ma con scarsi effetti sulle catene corte (Eschauzier et al., 2012). In un altro studio è stato invece riportato come le catene corte di PFC abbiano una maggiore resistenza ai processi di fotolisi rispetto alle catene lunghe di PFC, diventando così una potenziale fonte significativa di catene corte di PFC (Taniyasu et al., 2013).

Lo SQA ($\mu\text{g/L}$) relativo ai PFOS per le acque superficiali interne (fiumi, laghi e corpi idrici artificiali o fortemente modificati) e per altre acque di superficie, è incluso nell'allegato II della Direttiva 2013/39/UE. Lo SQA, riportato in Tabella 1.1, viene espresso come valore medio annuo (SQA-AA) e come concentrazione massima ammissibile (SQA-CMA).

Denominazione della sostanza	SQA-AA Acque superficiali interne	SQA-AA Altre acque di superficie	SQA-CMA Acque superficiali interne	SQA-CMA Altre acque di superficie
PFOS	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2

Tabella 1.1 SQA ($\mu\text{g/L}$) relativi ai PFOS, stabiliti dalla Direttiva 2013/39/UE

Lo SQA ($\mu\text{g/L}$) relativo ai PFOA per le acque superficiali interne e per altre acque di superficie (acque marino-costiere e altre acque di transizione), è stabilito dal Decreto legislativo n. 172 del 13 ottobre 2015 in attuazione della Direttiva 2013/39/UE. Lo SQA, riportato in Tabella 1.2, viene espresso come valore medio annuo (SQA-MA).

Denominazione della sostanza	SQA-MA Acque superficiali interne	SQA-MA Altre acque di superficie
Acido perfluorooottanoico (PFOA)	0,1	0,02

Tabella 1.2 SQA ($\mu\text{g/L}$) relativi a PFOA, stabiliti dal Decreto Legislativo n.172 del 13 ottobre 2015

In particolare per i PFOA, così come per altre sostanze perfluorate presenti all'interno del Decreto, i relativi SQA saranno applicati con effetto dal 22 dicembre 2018, al fine di concorrere al conseguimento di un buono stato ecologico delle acque entro il 22 dicembre 2027. A tal fine le Autorita' di bacino, le regioni e le province autonome elaboreranno, entro il 22 dicembre 2018, un programma di monitoraggio supplementare e un programma preliminare di misure relative a tali sostanze, trasmettendoli al Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare ed al SINTAI per il successivo inoltro alla Commissione europea. Le Autorita' di bacino, le regioni e le province autonome elaboreranno inoltre, entro il 22 dicembre 2021, un programma di misure definitivo attuato e reso operativo entro e non oltre il 22 dicembre 2024. Qualora, invece, gli esiti di monitoraggi pregressi, anche condotti a scopo di studio, abbiano già evidenziato la presenza di tali sostanze in concentrazioni superiori agli SQA, le Autorita' di bacino, le regioni e le province autonome elaboreranno e riporteranno nei piani di gestione, entro il 22 dicembre 2015, i programmi di monitoraggio ed un programma preliminare di misure relative a tali sostanze, immediatamente operativi (D. Lgs. n.172 del 13 ottobre 2015).

1.1.8.2 BPA

Il BPA, noto anche come 2,2-bis(4-idrossifenil) propano, è un composto chimico artificiale dotato di due gruppi fenolici (Figura 1.6), inserito tra le sostanze soggette a riesame per l'eventuale classificazione come sostanze prioritarie o sostanze pericolose prioritarie, inserite nell'allegato III della Direttiva 2008/105/CE relativa agli SQA nel settore della politica delle acque.

La richiesta di BPA è di molto incrementata negli ultimi anni, in quanto comunemente usato nell'industria della plastica, come rivestimento per le carte plastificate (es. scontrini e ricevute) e nei ritardanti di fiamma. Circa il 95% della produzione industriale di BPA è comunque usato per la produzione della plastica, in particolare di resina policarbonata (71%) ed epossidica (29%) (Rikz, 2001).

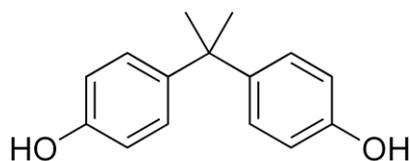


Figura 1.6 Struttura molecolare di BPA

L'ingestione di cibo contaminato risulta essere la maggiore fonte di esposizione al BPA per gli l'uomo, mentre l'inalazione e il contatto dermico risultano le potenziali fonti di esposizione per i lavoratori coinvolti nella manifattura del BPA.

Il BPA non è prodotto naturalmente, e può essere rilasciato in ambiente durante operazioni di produzione e trasporto, da molti prodotti durante il loro uso o successivamente allo smaltimento nelle discariche, tramite gli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue e dai fanghi di depurazione usati in agricoltura.

Nel 2011 è stato stimato che il consumo globale di BPA fosse di 5,5 milioni di tonnellate (Flint et al., 2012).

Questo composto è moderatamente solubile in acqua a temperatura ambiente e, a causa del suo coefficiente di partizione carbonio-acqua ($K_{oc}=2,2-3,4$) e del suo coefficiente di partizione octanolo-acqua ($K_{ow}=2,5-4,5$), si presta sia ad un considerevole assorbimento nel suolo che ad un modesto bioaccumulo negli organismi (Flint et al., 2012). In particolare, il BPA può essere biodegradato nel suolo e nei sedimenti in condizioni aerobiche, stimandone un'emi-vita tra 3 e 37,5 giorni, ma osservandone una mancata degradazione in suoli anaerobici durante 70 giorni di esperimento e in sedimenti estuarini anossici durante 120 giorni di esperimento (Rikz, 2001).

La concentrazione ambientale di BPA nella matrice suolo risulta essere di 4-14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. (dry weight, peso secco) degli USA (USEPA, 2010) e di 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. in Europa (Staples et al., 2010). Uno studio eseguito su campioni di sedimenti raccolti in quattro stazioni della Laguna di Venezia, vicino agli scarichi delle acque reflue municipali e industriali, ha rilevato la presenza di BPA in sette campioni su otto, con valori superiori a 118 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. nei campioni delle stazioni vicine agli impianti di scarico (Pojana et al., 2007).

Anche per quanto riguarda le acque superficiali e sotterranee la presenza di BPA è quasi ubiquitaria. Specificatamente, il BPA è stato rilevato nel 41% e nel 34% dei campioni di acqua superficiale provenienti rispettivamente dagli USA e dall'Europa, e nel 30% e nel 40% dei campioni di acqua sotterranea dei medesimi Paesi (Barnes et al., 2008).

Il BPA riesce a trovare accesso alle acque superficiali da diverse strade, in particolar modo dagli scarichi industriali e dallo smaltimento e trattamento degli scarichi civili. Tipicamente si ritrova più frequentemente nelle acque superficiali che in quelle sotterranee, a causa del diretto contatto tra queste e le fonti di contaminazione (Barnes et al., 2008). Vari studi concordano sul fatto che la concentrazione media di BPA nelle acque superficiali sia tra 3 e 30 ng/L, anche se le acque superficiali provenienti da aree densamente industrializzate ne riportano una concentrazione considerevolmente più elevata (da 1 a 28 µg/L) (Barnes et al., 2008). Per quanto riguarda le acque sotterranee, invece, vari studi sembrano concordare su concentrazioni di BPA che vanno da 0 a 20 ng/L, anche se questi valori possono aumentare di 10 volte in siti suscettibili alla contaminazione da parte di acque reflue (Bono-Blay et al., 2012).

In particolare, uno studio eseguito sulle acque del Fiume Tevere al fine di investigarne la presenza di BPA, ne ha riportato delle concentrazioni pari a 0,06-0,09 mg/m³ nei mesi estivi e <0,03-0,14 mg/m³ per quanto riguarda i mesi invernali (Patrolecco et al., 2006). Un ulteriore studio si è invece occupato di misurare il BPA in campioni d'acqua della Laguna di Venezia, valutandone una concentrazione tra <0,001 e 0,145 mg/m³. I valori più elevati sono stati rilevati nei campioni dei siti prossimi ai punti di scarico industriale e agli impianti di trattamento delle acque municipali e industriali (Pojana et al., 2007).

A partire dal 2007 sono state pubblicate numerose valutazioni sull'esposizione umana e studi epidemiologici riguardanti il BPA, che mostrano la correlazione tra questo composto ed effetti riguardanti la sfera riproduttiva, tumori al seno e alla prostata e sindromi metaboliche come l'obesità.

Negli USA, il NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) ha eseguito uno studio su 1455 e 1493 soggetti di età compresa tra i 18 e i 74 anni, rispettivamente per i periodi di tempo 2003-2004 e 2005-2006 (Melzer et al., 2010). Da questo studio è emerso che la media del BPA nelle urine per il periodo 2003-2004 era di 2,49 ng/mL, mentre per il periodo 2005-2006 di 1,79 ng/mL. I modelli di regressione sono stati adeguati ad un certo numero di parametri, come

l'età, il sesso, l'etnia e l'educazione, trovando infine una correlazione tra BPA e il presentarsi di disturbi alla salute, come il diabete.

Un altro studio ha misurato il BPA urinario in 167 uomini, riscontrandolo nell'89% dei campioni di urina, con una media di 1,3 ng/mL (Meekker et al., 2010).

Un ulteriore studio ha voluto esaminare gli effetti dell'esposizione occupazionale al BPA sul rischio di sviluppare disfunzioni sessuali maschili. A questo scopo sono stati esaminati 230 lavoratori esposti e 404 non esposti, aggiustando successivamente i risultati ottenuti con le caratteristiche demografiche, storia occupazionale e sessuale, uso di alcol, presenza di disturbi cronici ed esposizione ad altre sostanze chimiche. I risultati hanno confermato che l'esposizione al BPA può avere effetti avversi sulle funzioni sessuali maschili. Inoltre, tre studi addizionali hanno associato il BPA con una diminuzione della qualità dello sperma (Li et al., 2010).

Un altro studio è stato realizzato nella Città del Messico, nella quale le concentrazioni di BPA sono correlate con nascite premature (<37 settimane). Allo studio hanno partecipato 60 donne in gravidanza, ed il BPA è stato rilevato nell'80% dei campioni di urina presenti, con concentrazioni totali tra <0,4 ng/mL e 6,7 ng/mL e una media finale di 1,52 ng/mL (Cantonwine et al., 2010).

Infine, uno studio riguardante la concentrazione urinaria di BPA e altri composti, correlati con l'uso di dispositivi medici su 42 neonati prematuri, ha riportato una percentuale di BPA superiore al 90% nella maggior parte dei neonati, con una concentrazione urinaria media di 30,3 ng/mL. Da questo si è arrivati alla conclusione che tra i neonati sottoposti ad interventi medici terapeutici intensivi la concentrazione di BPA risultava essere più alta rispetto al resto della popolazione (Calafat et al., 2009).

1.1.8.3 Nonilfenolo e ottilfenolo

Nonilfenolo e ottilfenolo (Figura 1.7) sono composti fenolici con catene alchiliche di varia lunghezza che, essendo caratterizzati da buone proprietà antiossidanti, vengono spesso impiegati nella produzione di plastiche trasparenti utilizzate nell'industria alimentare, al fine di ritardarne l'ingiallimento o l'opacamento. Quello che si ritrova più frequentemente in ambiente rispetto ai due è il nonilfenolo (Ferrara et al., 2001).

Nonilfenolo è un termine usato per riferirsi ad un ampio gruppo di composti isomerici (C₁₅H₂₄O) consistenti in 9 catene alchiliche di carbonio legate ad un

anello fenolico. I vari fenoli possono differire tra loro nel grado di ramificazione della catena alchilica o nella posizione dell'anello fenolico. L'isomero del nonilfenolo più prodotto e misurato in ambiente è il 4-nonilfenolo. Questo composto è comunemente usato nei pesticidi, come lubrificante, come catalizzatore nell'indurimento delle resine epossidiche, nelle lavanderie industriali e, in passato, nella produzione del nonilfenolo etossilato (NPEs) per prodotti di consumo come tensioattivi, detergenti e agenti antistatici.



Figura 1.7 Struttura molecolare di nonilfenolo e ottilfenolo

Il nonilfenolo risulta essere un agonista estrogenico (ECHA, 2014), inoltre è altamente irritante e corrosivo per la pelle e gli occhi e risulta avere un'elevata tossicità verso i pesci, gli invertebrati acquatici e le piante acquatiche. L'istituto di sicurezza e tossicologia della Danimarca (DIST, Danish Institute of Safety and Toxicology) ha riportato un valore di 5 µg/giorno/kg di peso corporeo come valore di assunzione di nonilfenolo giornaliero tollerabile (DanishEPA, 2000).

Il nonilfenolo, a temperatura ambiente, si presenta come un liquido viscoso ed è rilasciato principalmente in ambiente tramite le acque reflue municipali e industriali, arrivando poi ai corpi d'acqua superficiali. Il nonilfenolo può anche derivare dall'applicazione di pesticidi, dalle discariche e dall'applicazione di fanghi di cellulosa e di carta sui terreni coltivati. Inoltre, può anche essere prodotto dalla biodegradazione dell'alchilfenolo polietossilato.

Si è visto che la formazione di nonilfenolo è favorita in condizioni anaerobiche, ma la sua formazione può avvenire anche in presenza di condizioni aerobiche. Uno studio ha riportato che questo può formarsi anche durante i trattamenti anaerobici dei fanghi, nei sedimenti superficiali ed in quelli estuarini (Micic et al., 2009).

A causa delle sue proprietà fisico-chimiche, come la bassa solubilità in acqua, un coefficiente di partizione carbonio organico-acqua (K_{oc}) pari a 3,4-5,6 e un coefficiente di partizione ottanolo-acqua (K_{ow}) pari a 4,48-5,76, il composto si presta ad essere assorbito nel suolo e ad essere moderatamente bioaccumulato (Caragnini et al., 2015).

Uno studio ha riportato che la quantità di materia organica nel suolo domina la capacità di assorbimento nel nonilfenolo nei differenti suoli, anche se non con una chiara relazione lineare. Il processo di assorbimento raggiunge una fase di equilibrio dopo sei ore, con una prima fase di assorbimento rapida (30 minuti), seguita da una fase di assorbimento lenta (30 minuti successivi). Risultati simili sono stati ottenuti anche nell'assorbimento nei sedimenti acquatici (Liao et al., 2014).

Risulta improbabile che il composto riesca a volatilizzarsi dal suolo, e in atmosfera viene rapidamente degradato dal radicale ossidrile. Inoltre, è rapidamente bioaccumulabile e in acqua è suscettibile alla fotolisi (USEPA, 2010).

Il nonilfenolo è suscettibile alla biodegradazione aerobica in acqua, nei sedimenti e nel sistema suolo, ma elevate concentrazioni di esso possono risultare tossiche per i microrganismi. Uno studio ha comparato la biodegradazione cinetica di vari isomeri del nonilfenolo nei sedimenti fluviali, sia sotto condizioni ossidanti che riducenti, riportando dei valori di emi-vita degli isomeri del nonilfenolo nei sedimenti che vanno da 0,9 a 13,2 giorni in condizioni ossidanti e da 15,1 a 20,1 giorni in condizioni riducenti (Lu et al., 2014).

In letteratura sono disponibili vari studi riguardanti la presenza di nonilfenolo nei suoli. Uno studio eseguito sui suoli agricoli in Danimarca ha riportato concentrazioni di nonilfenolo tra 0,01 e 0,98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. nei suoli non ammendati ed in quelli fertilizzati con il letame o con quantità limitate di fanghi di depurazione, e concentrazioni di 34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. nei punti di deflusso (Vikelsee et al., 2002). In uno studio eseguito sui campi agricoli del Messico irrigati con acque reflue non trattate per periodi di tempo da 10 a 90 anni, sono state misurate concentrazioni di nonilfenolo tra <25 e 299 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w., indicando come questo composto tenda ad accumularsi nel suolo, migrando con difficoltà nei diversi orizzonti del suolo (Gibson et al., 2010).

Nei sedimenti, elevate concentrazioni di nonilfenolo sono generalmente associate con fonti puntuali specifiche, come impianti industriali o grandi importi di acque reflue domestiche che si riversano nei fiumi dalle aree urbane. La presenza di nonilfenolo nei sedimenti d'acqua dolce è primariamente associata agli scarichi domestici e industriali, e in misura minore dalle attività colturali. In Italia, la concentrazione di nonilfenolo è stata misurata in aree con diversi usi di suolo (urbano, industriale, colturale, aperta campagna), nei pressi di Rieti, lungo il

Fiume Tevere e nella Laguna di Venezia, ottenendo risultati simili, che vanno da 44 a 970 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w. (Vitali et al., 2004).

Per quanto riguarda le acque superficiali, le concentrazioni di nonilfenolo vanno da 3×10^{-4} a $37,3 \text{ mg}/\text{m}^3$. Considerando che questo composto è altamente idrofobico, passibile ad essere assorbito dai solidi sospesi ed eventualmente ad essere accumulato nei sedimenti, uno studio ne ha comparato le concentrazioni in campioni di sedimenti e di acqua superficiale nelle stesse località, osservandone elevate concentrazioni nei sedimenti superficiali piuttosto che in acqua (Wu et al., 2007).

Un ulteriore studio ha riportato un andamento stagionale della dissoluzione del nonilfenolo, con valori di concentrazione elevati in estate piuttosto che in inverno. Tale scoperta è principalmente collegata alla temperatura e all'attività microbica, portando ad un incremento nella concentrazione di nonilfenolo nella colonna d'acqua durante il periodo estivo (Fu et al., 2007).

Infine, significative concentrazioni di nonilfenolo sono state trovate in diversi alimenti, con valori tra 0,1 e $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ f.w. (fresh weight, peso umido) e $<7,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $0,30 \text{ mg}/\text{m}^3$ nelle acque potabili e nelle bevande commercialmente vendute in diversi Paesi. Uno studio ha investigato sulla presenza di nonilfenolo in bottiglie d'acqua commercializzate di diversi materiali (HDPE, PET, PVC), rilevandone delle concentrazioni nelle acque contenute negli imballaggi in HDPE e PVC, rispettivamente con valori di 29-180 e 15-300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (LoyoRosales et al., 2004). Un altro studio ha valutato le concentrazioni di nonilfenolo nelle acque potabili provenienti da fontane pubbliche di 35 città italiane e nell'acqua minerale in bottiglia. In tutti i campioni, i valori di concentrazione sono risultati variare da un minimo di $7,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ad un massimo di $84 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Maggioni et al., 2013).

Basandosi sulle concentrazioni misurate negli alimenti e sul tasso di consumo di essi, la media di assunzione giornaliera del nonilfenolo risulta variare tra 0,067 e $0,370 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$ per adulti di peso corporeo di 60 kg (Guenther et al., 2002).

Si può quindi dedurre come la dieta sia la maggiore fonte di esposizione per l'uomo, e gli effetti sono stati valutati da vari studi nel corso del tempo. Uno studio ha misurato il 4-t-octilfenolo, un isomero dell'ottilfenolo, nei campioni di urina provenienti da 2.517 soggetti. Il composto è stato rilevato nel 57,4% dei partecipanti totali, in concentrazioni tra 0,2 ng/mL e 20,6 ng/mL (Calafat et al., 2008). Allo stesso modo, un altro studio ha misurato il 4-t-octilfenolo in 180 cordoni ombelicali, rilevandolo in 31 campioni con concentrazioni tra $<0,05$ e 1,15

ng/mL (Tan et al., 2003). Un ulteriore studio ha studiato la presenza di 4-t-octilfenolo e 4-nonilfenolo nel latte materno, rilevando il primo in concentrazioni medie di 0,08 ng/mL e il secondo a concentrazioni medie di 32 ng/mL (Ademollo et al., 2008). Infine, uno studio ha determinato le concentrazioni di 4-nonilfenolo e 4-t-octilfenolo nel tessuto adiposo di 20 donne non occupazionalmente esposte nel sud della Spagna. Il 4-nonilfenolo e il 4-t-octilfenolo sono stati rilevati rispettivamente nel 100% e nel 23,5% dei soggetti, con livelli medi riscontrati nel tessuto adiposo di 57 ng/g e 4,5 ng/g (Lopez-Espinosa et al., 2009).

Gli SQA ($\mu\text{g/L}$) relativi a nonilfenolo e ottilfenolo per le acque superficiali interne (fiumi, laghi e corpi idrici artificiali o fortemente modificati) e per altre acque di superficie, sono inclusi nell'allegato II della Direttiva 2013/39/UE. Gli SQA, riportati in Tabella 1.3, vengono espressi come valore medio annuo (SQA-AA) e come concentrazione massima ammissibile (SQA-CMA).

Denominazione della sostanza	SQA-AA Acque superficiali interne	SQA-AA Altre acque di superficie	SQA-CMA Acque superficiali interne	SQA-CMA Altre acque di superficie
Nonilfenoli	0,3	0,3	2,0	2,0
Ottifenoli	0,1	0,01	non applicabile ⁽¹⁾	non applicabile

Tabella 1.3 SQA ($\mu\text{g/L}$) relativi a nonilfenoli e ottilfenoli, stabiliti dalla Direttiva 2013/39/UE.

(1) Quando compare la dicitura “non applicabile” riferita agli SQA-CMA, si ritiene che i valori SQA-AA tutelino dai picchi di inquinamento di breve termine, in scarichi continui, perché sono sensibilmente inferiori ai valori derivati in base alla tossicità acuta

1.1.8.4 Estrogeni naturali e sintetici

Gli estrogeni sono i principali ormoni sessuali femminili, responsabili dello sviluppo e della regolazione del sistema riproduttivo e, secondariamente delle caratteristiche sessuali.

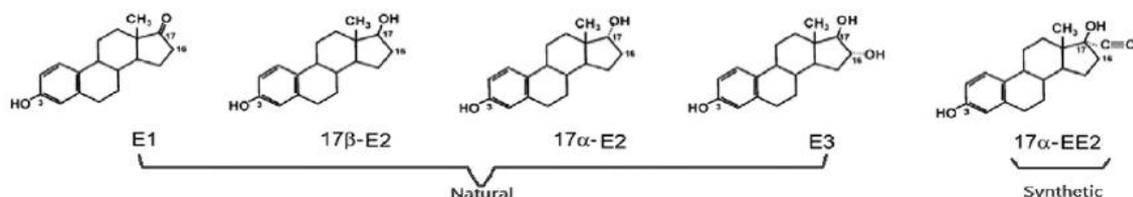


Figura 1.8 Struttura molecolare degli estrogeni naturali e sintetici (Adeel et al., 2017)

Le tre forme di estrogeni naturali sono l'estrone (E1), il 17-β-estradiolo (E2) e l'estriolo (E3). Queste derivano dal colesterolo e sono in grado di diffondersi rapidamente attraverso le membrane all'interno della cellula, legandosi e

attivando i recettori estrogeni (ER α) che regolano l'espressione di molti geni. Il termine "estrogeni" può anche riferirsi ad altre sostanze, naturali o sintetiche, che mimano l'effetto degli ormoni naturali, usati nell'ambito della contraccezione orale e nelle terapie sostitutive ormonali femminili (European Molecular Biology Laboratory, 2015).

Gli estrogeni steroidei naturali condividono la medesima struttura molecolare tetraciclica, comprendente quattro anelli, un gruppo fenolico, due ciclo-esani e un anello ciclo-pentano (Figura 1.8).

Tra i diversi tipi di estrogeni, soltanto tre risultano importanti ai fini delle indagini ambientali. E2 è il più importante estrogeno naturale biologicamente attivo. Nella pre-menopausa, E2, prodotto dalle ovaie, risulta l'estrogeno più abbondante, e il suo livello nel sangue varia nel corso del ciclo mestruale.

Livelli di E3, prodotto in larga parte dalla placenta, che collega il feto con la madre, sono invece misurati solo durante la gravidanza. Questo ormone si può infatti rilevare, misurandolo nelle urine, già alla nona settimana di gravidanza, ed i suoi livelli incrementano nel tempo.

L'E1, è il metabolita più abbondante nella post-menopausa. In questa fase, infatti, le ovaie cessano di produrre E2 per lasciare il posto ad E1 come estrogeno principale.

Sebbene E3 sia l'estrogeno più abbondante dei tre, risulta quello più debole, mentre E2 è il più forte a causa della sua elevata affinità di legame con ER α e per potersi legare ad entrambi i recettori ER α ed ER β . Così, E2 è l'estrogeno più importante per le donne non in gravidanza, che sono tra la fase del menarca e quella della menopausa. Invece, durante la gravidanza, il ruolo principale si sposta verso E3 e nella post-menopausa verso E1, che diventa la forma principale di estrogeno nel corpo umano (David, 2012).

Le proprietà fisico-chimiche di E1, E2 ed E3 influenzano il loro destino ambientale. La distribuzione degli inquinanti organici tra acqua ed altri solidi naturali è spesso considerata come processo di partizione tra fase acquosa e organica. Il coefficiente di partizione acquosa (K_{ow}) è il tasso di concentrazione del composto in n-ottanolo e acqua sotto condizioni di equilibrio a particolare temperatura. I composti con alto peso molecolare ed elevato $\log K_{ow} > 5$ sono facilmente assorbiti dai sedimenti e possono prevalentemente essere rimossi tramite processi di coagulazione. Gli estrogeni ci si aspetta siano assorbiti dalla fase solida a causa del loro significativo $\log K_{ow}$. Tra gli estrogeni, E2 risulta

essere quello con più elevata idrofobicità, ma generalmente gli estrogeni steroidi sono moderatamente idrofobici ($\log K_{ow}=2,4-4,0$), non volatili (con pressione di vapore tra 9×10^{-13} e 3×10^{-8} Pa) e acidi deboli ($p_{Ka}=10,3-10,8$). A causa di queste caratteristiche, ci si aspetterà che questi composti tendano a legarsi ai substrati solidi piuttosto che dissolversi nelle soluzioni acquose (Pal et al., 2010).

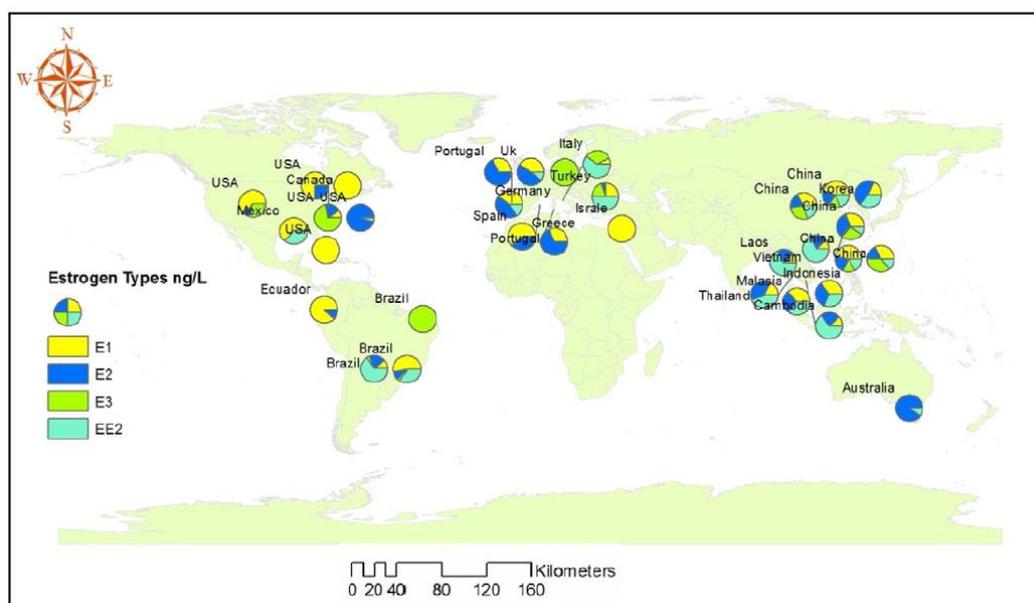


Figura 1.9 Distribuzione mondiale di estrogeni naturali e sintetici nei fiumi e nelle acque superficiali (Adeel et al., 2017).

La preoccupazione per gli estrogeni steroidei nei corsi d'acqua è cresciuta negli ultimi anni, in quanto questi non riescono ad essere rimossi efficacemente e convenientemente dagli impianti di trattamento delle acque reflue. Perciò, questo carico di contaminanti viene rilasciato in ambiente tramite fanghi ed effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue e, recentemente, la presenza di estrogeni naturali è stata riportata sia nelle acque potabili che in quelle superficiali (Figura 1.9) (Esteban et al., 2014).

In generale, i soggetti più a rischio ad elevate concentrazioni ambientali di E2, risultano essere sia i bambini che la fauna selvatica di piccola taglia, a causa della sua minuta massa corporea. Vari studi sull'uomo hanno mostrato che l'esposizione ad E2 durante la fase della pre-pubertà e della pubertà può portare ad una crescita rapida eccessiva, così come ad una pubertà precoce negli individui di sesso femminile ed un'insorgenza tardiva della stessa negli individui di sesso maschile (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 2007). In aggiunta, nella fase della post-pubertà, E2 in concentrazioni particolarmente elevate contribuisce all'insorgenza di disordini di vario tipo,

incluso il cancro ai testicoli e alle ovaie, endometriosi, osteoporosi, disturbi cardiovascolari e neurodegenerativi, alterazioni cognitive e comportamentali, ipertensione, disordini metabolici (come obesità e diabete) e altri disordini immunitari (Wright-Walters et al., 2007). Gli estrogeni naturali sono generalmente assorbiti velocemente dal tratto gastrointestinale, mostrando poche differenze nell'assunzione tra E1, E2 ed E3. Tutti e tre gli estrogeni, inoltre, vengono distribuiti a vari organi bersaglio e non tramite il sistema circolatorio, sebbene siano prodotti localmente e immagazzinati in vari tessuti, particolarmente in quelli adiposi. Infine, gli estrogeni naturali e i loro metaboliti sono espulsi tramite le urine (National Center for Biotechnology Information, 2016).

Gli ormoni sono rilasciati continuamente in ambiente. Si è stimato che le donne rilascino approssimativamente 5 µg/giorno di E1 ed E2. Il tasso di escrezione giornaliera può anche essere di 10 e 100 µg nel corso del ciclo mestruale, in dipendenza dalla fase del ciclo stessa (Hoffmann et al., 1986). Sebbene gli ormoni naturali siano prodotti in tutti gli organismi vertebrati, l'escrezione umana risulta essere la principale fonte di elevate concentrazioni di essi in ambiente (Combalbert et al., 2010).

L'ammontare di estrogeni, principalmente E3, rilasciati dalle donne in gravidanza, può essere 1000 volte più alto del normale, in dipendenza dello stadio della gravidanza. E1 ed E2 sono rilasciati nelle urine con un tasso di 4,4 kg/anno per milione di abitanti (Johnson et al., 2000).

Il letame animale è la principale fonte di estrogeni naturali in ambiente (Knight, 1980). Grandi quantità di letame dal pollame e dal bestiame sono usati come fertilizzanti e ammendanti per migliorare le qualità chimiche dei terreni, e questi composti organici sono resistenti alla degradazione nel suolo. In questo modo, durante il deflusso delle acque piovane, i composti estrogenici possono essere sospesi in soluzione ed entrare nei corpi d'acqua.

Per quanto riguarda la presenza degli estrogeni negli alimenti, ne è stato calcolato un consumo medio giornaliero di 0,1 µg, che è un valore basso se comparato con la produzione estrogenica endogena nel corpo umano. Le due principali fonti di composti estrogenici risultano essere la carne e i latticini. Si stima che la carne contenga una quantità di steroidi tra 3 e 5 ng/kg (Hoffmann et al., 1986). Anche il latte bovino è ricco di una grande varietà di ormoni. Gli ormoni steroidi sono infatti lipofili, e possono concentrarsi in tutti i prodotti caseari, a seconda del loro contenuto di grassi (Koldovsky et al., 1987).

Queste elevate concentrazioni di composti estrogenici nei prodotti caseari causa preoccupazione e crescente attenzione verso le abitudini alimentari della popolazione, specialmente verso i bambini. Il consumo medio di latte bovino da parte dei bambini è risultato approssimativamente di 300-700 mL/giorno (1-2 bicchieri), che si traducono in un'ingestione potenziale di 40-100 ng/giorno di estrogeni. Questo largo consumo di composti estrogenici da parte di soggetti come i bambini che si trovano in una fase di crescita e sviluppo, può portare ad effetti non ancora chiari e può contribuire alla formazione di tumori in stadi più avanzati della vita (Pape-Zambito et al., 2010).

Gli estrogeni ed i relativi composti sono usati per una vasta gamma di scopi terapeutici, inclusa la contraccezione, malattie come endometriosi, osteoporosi, cancro al seno e alla prostata e malattie cardiache. Si è stimato che le donne che assumono contraccettivi orali sono in grado di rilasciare approssimativamente 10 µg di EE2 al giorno (Johnson et al., 2000). Inoltre, molti studi hanno riportato valori di estrogeni coerenti tra loro, che vanno da 0,2 a 1,5 ng/L tra varie tipologie di fonti d'acqua superficiale (Yang et al., 2014). EE2 è stato rilevato nel 15% dei campioni d'acqua degli USA però, molti studi non sono riusciti a rilevare o misurare adeguatamente EE2 perché non tutti i metodi impiegati sono così sensibili da raggiungere lo stesso LOD (limite di rilevazione) (Fine et al., 2003). Per esempio, EE2 è stato rilevato nel 40% dei campioni di uno studio fatto in Germania utilizzando un valore di LOD pari a 0,05 ng/L, mentre è stato rilevato soltanto nell'1% dei campioni prelevati in Austria utilizzando un valore di LOD pari a 0,1 ng/L.

EE2, assieme a E2 e ad E1 è inserito nell'elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'UE (Watch List), di cui alla Decisione 2015/495/UE. Il limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione di questi composti è riportato in Tabella 1.4.

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Metodi di analisi indicativi ⁽¹⁾	Limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione (ng/L)
17-alfa-etinilestradiolo (EE2)	SPE-LC-MS-MS su grandi volumi	0,035
17-beta-estradiolo (E2), estrone (E1)	SPE-LC-MS-MS	0,4

Tabella 1.4 Metodi di analisi indicativi e limiti massimi ammissibili del metodo di rilevazione (ng/L) relativi a EE2, E2 ed E1, stabiliti dalla Decisione 2015/495/UE.

(1) SPE-estrazione in fase solida, LC-MS-MS-cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem

1.1.8.5 Diclofenac

Il Diclofenac viene spesso riconosciuto come il più popolare antidolorifico al mondo, e risulta il farmaco anti infiammatorio non steroideo (NSAIDs, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) più comunemente usato. Il nome "Diclofenac" deriva proprio dalla sua dicitura chimica: acido 2-(2-(2,6-diclorofenilammino)-fenil)-etanoico (Figura 1.10). Il farmaco è stato formulato da Ciba-Geigy, la compagnia farmaceutica Swiss, nel 1973 (ora unita alla Novartis), e da allora viene comunemente usato per ridurre le infiammazioni e come anti dolorifico, ad esempio nel caso di artriti o di lesioni acute. Può essere sia applicato sulla pelle che assunto oralmente. Il Diclofenac è contenuto in una grande varietà di farmaci sotto forma di vari nomi commerciali. In Canada e in Italia viene venduto come Voltaren Emulgel, in Spagna come Diclofenaco Normon, in Germania come Diclo-Denk e come Voltaren in molti altri Paesi.

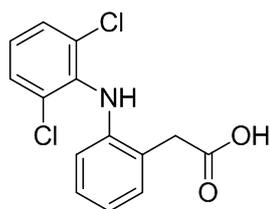


Figura 1.10 Struttura molecolare di Diclofenac

Risulta abbastanza impossibile calcolare l'esatto consumo globale di Diclofenac, tuttavia uno studio ha stimato che ammonta a circa 940 tonnellate su base annuale (Zhang et al., 2008). Circa 877 tonnellate di Diclofenac sono state vendute nel 2007 in 76 principali Paesi, e le vendite totali dello stesso nel 2011 sono state stimate a \$1,61 milioni di dollari (Palmer, 2012). In Europa, il consumo totale di Diclofenac è stato stimato essere di 179,8 tonnellate all'anno, ed il più grande uso lo detiene la Germania con 86 tonnellate utilizzate nel 2011 (Henry, 2013). Nonostante lo scopo delle sostanze farmaceutiche sia quello di avere un effetto positivo sia per la salute umana che animale, spesso queste si ritrovano ad avere degli effetti avversi per l'ambiente. Quando questi farmaci entrano infatti in ambiente, questi possono influenzare allo stesso modo anche gli animali, prendendo di mira organi, tessuti, cellule o biomolecole (Fent, et al., 2006). Vari studi hanno dimostrato il potenziale effetto avverso del Diclofenac in ambiente (Clevers, 2004) la cui fonte sono le industrie farmaceutiche e, successivamente alla somministrazione umana o animale, questo farmaco finisce negli impianti di trattamento delle acque reflue e nelle discariche. I processi di trattamento convenzionali delle acque reflue risultano spesso inefficaci per composti come il

Diclofenac, che può finire così nei corpi d'acqua superficiali e successivamente nelle acque potabili (Figura 1.11).

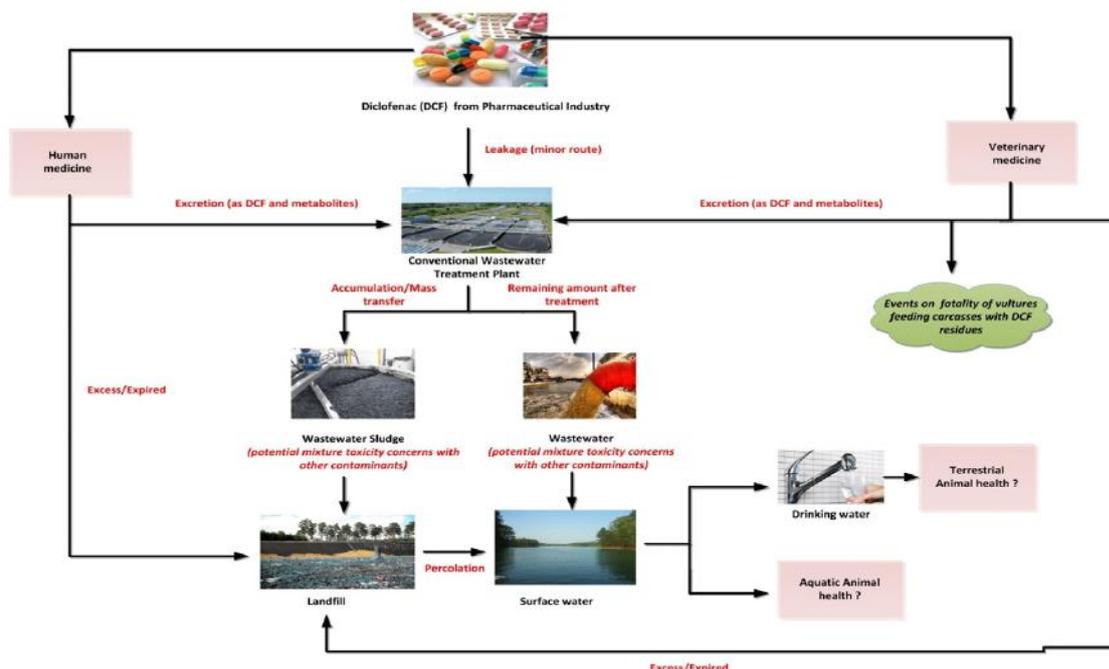


Figura 1.11 Modalità attraverso le quali il Diclofenac entra in ambiente (Lonappan et al., 2016)

Il potenziale effetto dannoso del Diclofenac in ambiente acquatico è stato rilevato da vari studi, tutti a scala di laboratorio (Cleuvers, 2003). Nei corpi d'acqua superficiale, il Diclofenac è stato rilevato in concentrazioni di ng/L, mentre nelle acque reflue la concentrazione è risultata superiore ai $\mu\text{g/L}$. La concentrazione decrementa tramite l'aiuto di processi naturali, come la ritenzione nel suolo, la biodegradazione e processi di foto-trasformazione, ma anche tramite processi fisico-chimici negli impianti di trattamento delle acque reflue (Buser et al., 1998). Uno studio ha affermato che la più elevata concentrazione di Diclofenac è stata rilevata nei fiumi del Pakistan con 4900 ng/L (Scheurell et al., 2009) e una delle potenziali ragioni potrebbe essere dovuta all'assenza di impianti di trattamento delle acque reflue nei Paesi asiatici. Nel frattempo, un recente report del Canada, mostra che gli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue contengono un'elevata concentrazione di Diclofenac, pari a 16 $\mu\text{g/L}$ (Lonappan et al., 2016). I corpi d'acqua tedeschi, fortemente contaminati dal Diclofenac, detengono una concentrazione massima di 1030 ng/L nelle acque di fiume (Heberer, 2002). Residui di Diclofenac sono comunque rilevati in quasi tutti i Paesi dell'UE (Hernando et al., 2006).

Vari studi di tossicità sono stati condotti globalmente per valutare la tossicità del Diclofenac negli organismi acquatici. Uno studio sull'ecotossicità effettuato sulle alghe e su crostacei come *Daphnia magna*, ha rivelato come il Diclofenac sia potenzialmente dannoso per gli organismi acquatici. Nello stesso studio è stato anche mostrato che sotto le concentrazioni ambientali gli effetti avversi erano minori o trascurabili e un mix di farmaci può essere considerato tossico anche ad una più bassa concentrazione. Nella *Daphnia magna* a concentrazioni acute come i mg/L, il Diclofenac può indurre un elevato tasso di mortalità (Cleuvers, 2004).

Il Diclofenac si è visto esercitare un effetto mortale in molti vertebrati, come nei pesci, provocando danni ai reni e ai tessuti gastrointestinali. Nei pesci *Oryzias latipes* è stato visto che il Diclofenac ha effetti avversi sulla crescita delle uova, con ritardi significativi della loro schiusa. I medesimi risultati sono stati riportati anche in uno studio condotto sugli Zebra fish (Lee et al., 2011). In *Salmo trutta* è stato osservato che il Diclofenac non viene completamente espulso dal metabolismo, ma una parte significativa riesce ad entrare nella circolazione enteroepatica. Il risultato consiste in una prolungata disponibilità di Diclofenac nell'organismo, che ne promuove l'accumulo. Per le stesse specie, gravi danni a branchie, fegato e reni sono stati osservati a concentrazioni di 50 µg/L (Hoeger et al., 2008). Per quanto riguarda le trote arcobaleno, a concentrazioni ambientali il Diclofenac pare sia in grado di interferire con le funzioni biochimiche, conducendo a danni ai tessuti. Il Diclofenac si può successivamente accumulare nel fegato, nei reni, nelle branchie e nei tessuti muscolari, causando alterazioni citologiche anche a 1 µg/L (Schwaiger et al., 2004).

Anche i mitili possono subire danni derivanti da concentrazioni di Diclofenac spesso presenti in ambiente. A concentrazioni di ng/L, il Diclofenac è significativamente in grado di indurre nei mitili la perossidazione lipidica, provocandone dei danni ai tessuti (Schmidt et al., 2011).

Ad eccezione dei mitili, concentrazioni ambientali rilevanti appaiono essere meno tossiche per gli animali acquatici. Molti studi suggeriscono che la continua esposizione al Diclofenac, anche a basse concentrazioni, può portare diversi effetti avversi negli animali acquatici. La concentrazione di non effetto è stata stimata a 0,1 mg/L (Lee et al., 2011), che è veramente alta se comparata con quelle osservate nei sistemi acquatici e nelle reali condizioni ambientali.

Oltre ai corpi d'acqua, il Diclofenac può raggiungere i terreni colturali tramite irrigazione con acque contaminate. La tossicità di questo composto nel suolo, verso le piante ed i microorganismi, è ancora poco conosciuta ma può essere affermato che il Diclofenac esibisce una bassa tossicità e una moderata persistenza. Nei suoli aventi un'elevata percentuale di materia organica, però, il Diclofenac può essere assorbito nel suolo, esibendo un'elevata resistenza verso la degradazione aerobica ed anaerobica, percolando successivamente nelle acque sotterranee e conducendo ad effetti tossici dovuti all'accumulo (Al-Rajab et al., 2010).

Il Diclofenac è inserito nell'elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'UE (Watch List), di cui alla Decisione 2015/495/UE. Il limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione per questo composto è riportato in Tabella 1.5.

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Metodi di analisi indicativi ⁽¹⁾	Limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione (ng/L)
Diclofenac	SPE-LC-MS-MS	10

Tabella 1.5 Metodi di analisi indicativi e limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione (ng/L) relativi al Diclofenac, stabiliti dalla Decisione 2015/495/UE.

(1) SPE-estrazione in fase solida, LC-MS-MS-cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem

1.1.8.6 Ibuprofene

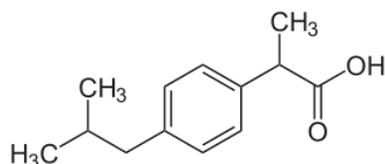


Figura 1.12 Struttura molecolare dell'Ibuprofene

Nel 1961 i ricercatori stavano cercando di trovare un nuovo farmaco che potesse sostituire l'aspirina e che avesse meno effetti collaterali, arrivando ad una nuova combinazione nota come acido 2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoico), conosciuta successivamente come Ibuprofene (Figura 1.12). Questo farmaco, in grado di entrare nel flusso sanguigno legandosi a più del 90% delle sue proteine, viene metabolizzato nel fegato e successivamente eliminato attraverso l'urina mediante forme non modificate, come molecole in coniugazione con glucuronide (prodotto dalla seconda fase di detossificazione che può essere idrolizzata in ambiente) o come molecole modificate (metaboliti) (Zwiener et al., 2002). L'Ibuprofene viene comunque completamente eliminato dal corpo umano nel giro di 24 ore dall'assunzione (Katzung et al., 2012). Considerando il fatto che l'Ibuprofene

risulta disponibile in molti Paesi senza che serva una prescrizione da parte del medico, esso risulta il terzo farmaco più utilizzato al mondo, e ciò ha portato allo sviluppo di diversi studi e ricerche per quanto riguarda gli effetti collaterali dovuti alla sua assunzione. L'assunzione annuale di Ibuprofene risulta essere fino a 300 t in Germania, 162 t nel Regno Unito e 58 t in Polonia (Guzik et al., 2013). L'Ibuprofene viene comunemente usato per il controllo del dolore, specialmente nelle malattie reumatiche, in casi di febbre, mal di testa, mal di denti e dismenorrea. Come il Diclofenac, anche questo fa parte dei NSAID, ovvero dei farmaci anti infiammatori non steroidei, ampiamente utilizzati nella terapia umana e veterinaria per ridurre infiammazioni, stati febbrili e dolorosi. La preoccupazione globale sui rischi ambientali a lungo termine dei NSAID è stata sollevata a causa della comparsa di vari problemi sulla salute umana, come infarto miocardico, sanguinamento gastrointestinale e insufficienza renale, ed effetti tossici sulla riproduzione e sul sistema endocrino degli organismi acquatici, originati da tali farmaci (Marchlewicz et al., 2015).

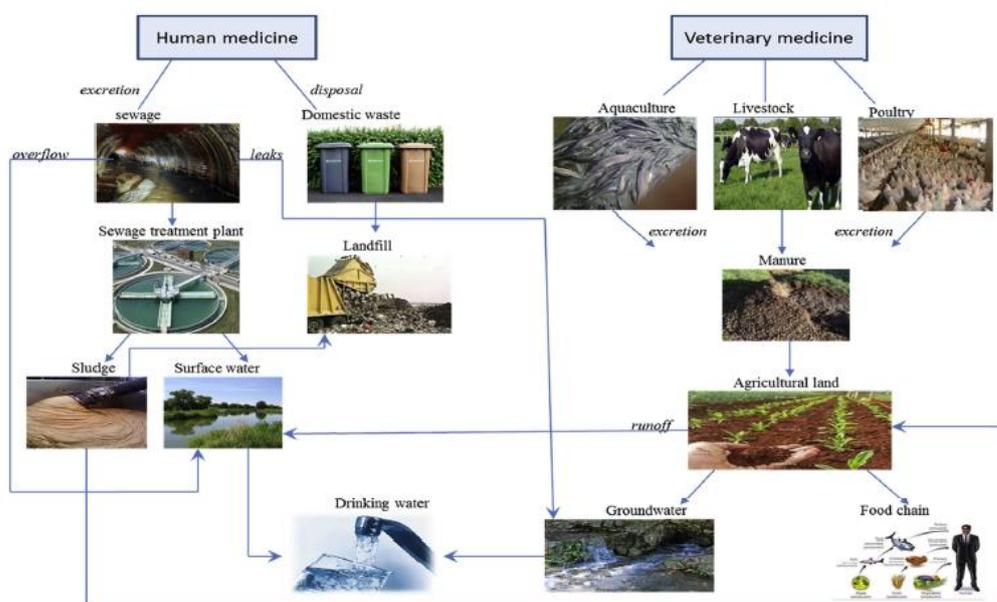


Figura 1.13 Fonti di contaminazione ambientale relative ai farmaci (Ebele et al., 2017)

L'Ibuprofene è anche uno dei farmaci dominanti nelle acque reflue, a causa della sua dose terapeutica relativamente alta (600-1200 mg/giorno) e del suo elevato tasso di espulsione dal corpo umano (70-80%) (Lockwood et al., 1983). Studi effettuati sugli impianti convenzionali di trattamento delle acque reflue hanno riportato una distruzione incompleta dei NSAID, la quale contribuisce per un 10-70% all'immissione di questi farmaci non degradati in ambiente acquatico (Figura 1.13) (Schröder et al., 2016). Uno studio compiuto eseguendo il test di tossicità

Microtox sull'organismo *Photobacterium phosphoreum*, ha evidenziato come i derivati dell'Ibuprofene, presenti anch'essi nelle acque superficiali e di scarico, siano più tossici del composto progenitore e possano accumularsi in ambiente, rappresentando un pericolo per gli ecosistemi anche se presente in basse concentrazioni (Marco-Urrea et al., 2009). Tuttavia, gli effetti a lungo termine dell'esposizione a questo farmaco non sono ancora completamente conosciuti. Sulla base delle leggi dell'UE, l'Ibuprofene non è stato classificato come tossico per gli organismi acquatici tuttavia, uno studio riguardante gli effetti tossici a breve termine ad alte dosi su un crostaceo come *Daphnia magna* e su alghe verdi ha dimostrato che l'Ibuprofene può risultare tossico, soprattutto in presenza di altri farmaci (Cleuvers, 2004). Dopo 14 giorni di esposizione all'Ibuprofene alla concentrazione di 20, 40 e 80 mg/L, il crostaceo *Daphnia magna* ha riportato infatti danni significativi alla riproduzione. Questa infatti ha subito una diminuzione all'aumentare della concentrazione del farmaco, ed è stata totalmente interrotta ad una concentrazione massima di 80 mg/L. Inoltre, ad una concentrazione pari a 40 mg/L è stato ritardato il momento della prima riproduzione (Brausch et al., 2012).

In realtà, la maggior parte dei dati esistenti sulla tossicità dell'Ibuprofene si basano su test di tossicità acuta e di tossicità cronica a breve termine. Nei test di tossicità acuta vengono solitamente utilizzate alte concentrazioni di sostanze che possono provocare effetti non realistici, in molti casi non prendendo nemmeno in considerazione i metaboliti dei farmaci. In ambiente, però, i prodotti farmaceutici non sono presenti in concentrazioni elevate, perciò risulta necessario dare maggiore enfasi a studi sulla tossicità cronica dei farmaci stessi. I livelli di concentrazione di residui di NSAID nelle acque superficiali e quelle ad uso potabile possono variare da µg/L a ng/L (Figura 1.14) (Pailler et al., 2009). Uno studio riguardante la presenza di farmaci come Diclofenac, Naproxene, Ketoprofene e Ibuprofene nei corsi d'acqua del bacino dell'Elba in Repubblica Ceca, ha riportato una concentrazione di quest'ultimo pari a 3200 ng/L, la più abbondante di tutti i composti analizzati (Marsik et al., 2017). Un ulteriore studio ha riportato che una concentrazione di Ibuprofene ricadente nell'intervallo di 1-100 ng/L può causare una diminuzione dell'attività di una specie di crostaceo, il *Gammarus pulex*, informazione molto importante in quanto questo intervallo di concentrazione corrisponde a quella possibilmente osservata in ambiente (de Lange et al., 2006).

Un altro studio ha osservato un ritardo nella schiusa delle uova nei pesci *Oryzias latipes*, successivamente all'esposizione a concentrazioni di 0,1 µg/L di Ibuprofene. Dopo 120 giorni di esposizione, invece, la sopravvivenza del pesce risultava significativamente inferiore rispetto alla popolazione di controllo (Han et al., 2010).

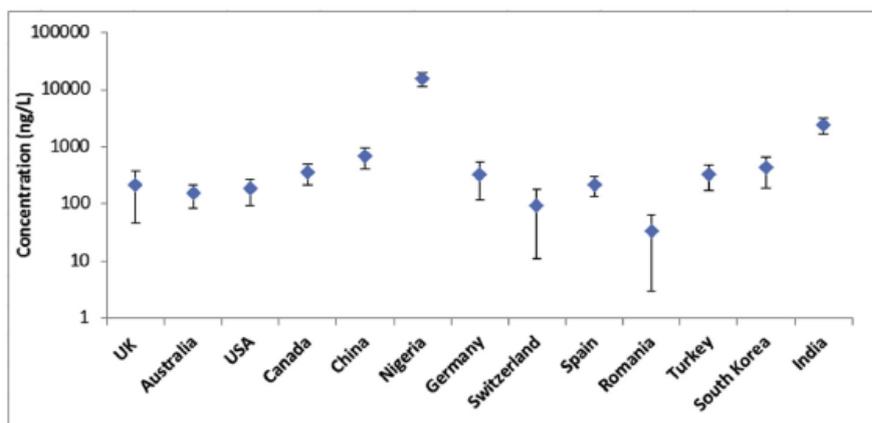


Figura 1.14 Concentrazioni (ng/L) di NSAID (tra i quali Ibuprofene e Diclofenac) nelle acque superficiali di diversi Paesi (Ebele et al., 2017)

Uno studio eseguito sugli impianti di trattamento delle acque reflue in Germania ha riportato concentrazioni massime di Ibuprofene rilevate nei campioni d'acqua in entrata e in uscita dall'impianto, rispettivamente di 3,5 mg/L e 0,3 mg/L (Huppert et al., 1998). Un altro studio ha esaminato dei campioni di acque reflue e superficiali nel Regno Unito, a Nord di Londra, rilevando dieci prodotti farmaceutici, tra i quali l'Ibuprofene, con una frequenza di rilevazione dell'84% ad una concentrazione mediana di 3086 ng/L (Ashton et al., 2004). Un altro studio condotto sempre nel Regno Unito ha voluto rilevare dei farmaci, tra i quali l'Ibuprofene, nei campioni d'acqua superficiale prelevati dai fiumi Tyne, Tees, Mersey e Tamigi, rilevandolo a concentrazioni variabili tra 4 ng/L e 2370 ng/L (Thomas et al., 2004). Nel 1999 è stato condotto uno studio sulla presenza e sul comportamento dell'Ibuprofene in campioni di acque reflue e superficiali di laghi e fiumi in Svizzera e nel Mare del Nord, raccolti negli impianti di trattamento delle acque reflue in città a Nord della Svizzera. La concentrazione di Ibuprofene rilevata negli affluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue è risultata fino ad un massimo di 3 mg/L, mentre nei fiumi e nei laghi fino a 8 ng/L (Buser et al., 1999). Infine, uno studio eseguito su campioni di acqua superficiale provenienti da Lettonia e Norvegia, ha rilevato la presenza di Ibuprofene in 7 campioni su 10 con concentrazioni che variavano tra 1,0 e 9,2 ng/L nei campioni

provenienti dalla Norvegia, e in 3 campioni su 14 con concentrazioni tra 3,9 e 17 ng/L nei campioni provenienti dalla Lettonia (Reinholds et. al., 2017).

1.2 Potabilizzatore della Standiana

Il potabilizzatore della Standiana è stato inaugurato da Romagna Acque–Società delle Fonti S.p.A. nel settembre 2015, ed è situato alle porte di Ravenna, con entrata da Via Fosso Ghiaia. I lavori di costruzione sono durati esattamente due anni, dall'8 aprile 2013 al 9 aprile 2015, ma questi sono stati ovviamente preceduti da un'articolata fase di progettazione e autorizzazione, avviata nel 2004 e terminata nel 2012, per una durata complessiva di otto anni. Le condotte di interconnessione con il territorio, di 40 km di lunghezza complessiva, collegano il nuovo impianto della Standiana alla rete del lughese, al potabilizzatore NIP di Ravenna ad alla dorsale adriatica dell'Acquedotto della Romagna. Le principali aree servite sono dunque la bassa Romagna, il territorio ravennate e la riviera adriatica, da Cervia a Cesenatico e anche oltre.

La messa a regime dell'impianto, di potenzialità massima di 1100 litri al secondo, rende disponibile alla Romagna una rilevante quantità di risorsa, per almeno 20 milioni di metri cubi annui potenziali, che si vanno ad aggiungere ai 110 mediamente distribuiti precedentemente, per un totale di 130 milioni di metri cubi. Questo garantisce un rapporto fra disponibilità di risorse e domanda superiore a 1,3, garantendo una sicurezza dell'approvvigionamento superiore al 30% del possibile fabbisogno, permettendo così a Romagna Acque di ridurre il prelievo di oltre il 50% e consentendo ad una consistente parte del territorio di avere risorsa sufficiente anche in caso di situazioni siccitose.

Il potabilizzatore è alimentato con le acque provenienti dal CER (Canale Emiliano Romagnolo), una delle più importanti opere idrauliche italiane sia per la sua lunghezza che per l'importanza del progetto, nato per rendere disponibili le acque del Po per l'irrigazione della pianura emiliano-romagnola.

Secondo il D.Lgs. 152/2006 "Norme in materia ambientale", all'articolo 80 "Acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile", le acque dolci superficiali, a seconda della categoria di appartenenza, devono essere sottoposte ai seguenti trattamenti:

- a) Categoria A1: trattamento fisico semplice e disinfezione;
- b) Categoria A2: trattamento fisico e chimico normale e disinfezione;

c) Categoria A3: trattamento fisico e chimico spinto, affinamento e disinfezione.

Le acque del CER risultano ricadere nella categoria A3.

L'impianto è stato realizzato secondo le più moderne concezioni e tecnologie all'avanguardia. La sezione più importante dell'impianto è rappresentata dal trattamento di ultrafiltrazione, che consiste nella filtrazione dell'acqua attraverso membrane con porosità esterna così piccola (0,04 micron) da trattenere, oltre a tutti i solidi sospesi, anche la carica batterica e spore di organismi potenzialmente patogeni. Moderno inoltre risulta anche il sistema di controllo dei processi, fortemente automatizzato e dotato di controlli remoti.

Di seguito verranno descritti i principali processi di trattamento a cui sono sottoposte le acque all'interno dell'impianto.

1.2.1 Grigliatura

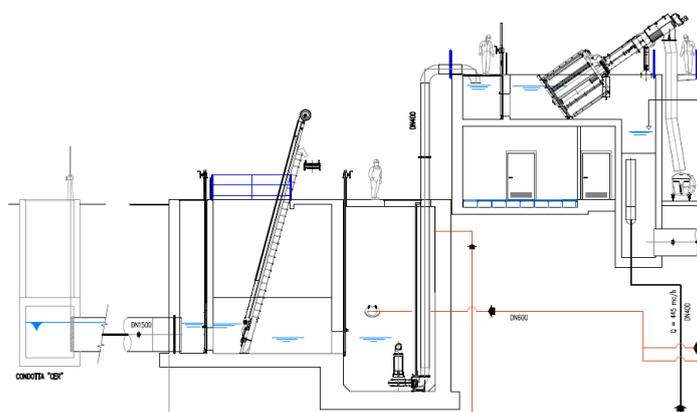


Figura 1.15 Schema progettuale del trattamento di grigliatura

Il primo processo di tipo fisico che subiscono le acque all'interno del potabilizzatore, dopo essere state captate dalla condotta del CER, è quello di grigliatura (Figura 1.15). Il trattamento ha l'obiettivo di trattenere i solidi grossolani non sedimentabili, come rami e foglie, e i solidi grossolani sedimentabili, come la ghiaia. Questi infatti potrebbero creare diversi problemi all'interno del ciclo di potabilizzazione, come otturare o danneggiare le pompe, ostruire canali e tubazioni e influenzare negativamente l'efficienza dei successivi processi di trattamento.

Inizialmente viene eseguita una grigliatura grossolana tramite due griglie automatiche con spaziatura di 1x1 cm e un sollevamento delle acque mediante quattro pompe con portata (Q) pari 299 L/s e potenza di 55 kW. A questi processi segue una grigliatura fine tramite due griglie automatiche con foratura di 1x1 mm, al fine di eliminare le particelle superiori ad 1 mm.

Infine, tramite una pompa dosatrice da 0-120 L/h, viene effettuato un dosaggio con acido cloridrico (HCl) al 33% allo scopo di diminuire il valore di pH fino a valori ottimali in modo da limitare il discioglimento dell'alluminio dosato nella fase di chiariflocculazione. La solubilità dell'alluminio è infatti fortemente dipendente dal pH e, se questo esce dall'intervallo 7,3-7,6, la sua solubilità cresce rapidamente.

1.2.2 Preclorazione

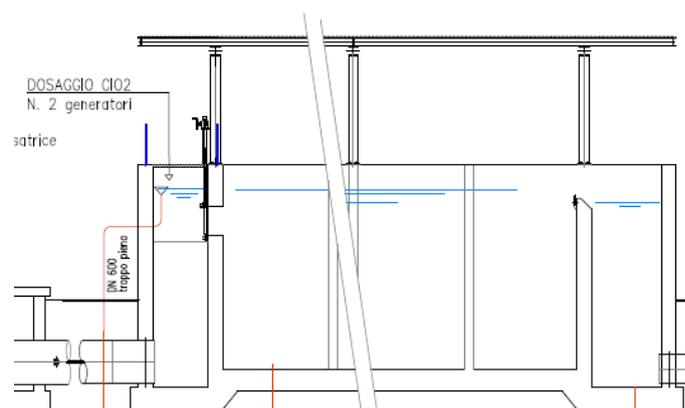


Figura 1.16 Schema progettuale del trattamento di preclorazione

L'acqua proveniente dal torrino di carico viene successivamente suddivisa e raccolta in quattro vasche di preclorazione in cemento armato (Figura 1.16), ciascuna avente dimensioni interne di 21,7x9,7x5,60 m. Qui viene effettuata una prima blanda sterilizzazione tramite trattamento con biossido di cloro (ClO_2), al fine di ossidare i composti inorganici (come ferro, manganese e ammoniaca) e limitare la proliferazione di alghe e flora batterica nelle fasi successive. Il tempo di contatto necessario risulta pari a 55,6 minuti.

1.2.3 Coagulazione (Flash mixer)

L'acqua in uscita dalla vasca di preclorazione è ancora ricca di torbidità e per questo viene inviata per gravità ad un manufatto che in due fasi, una ad alta turbolenza e l'altra destinata alla flocculazione, ha la funzione di aggregare in fiocchi le particelle solide e colloidali ancora presenti.

La coagulazione è un processo di tipo fisico-chimico durante il quale i cationi dei coagulanti utilizzati interagiscono con la superficie delle sostanze colloidali, solitamente rivestite di cariche negative. Questo porta alla destabilizzazione delle sostanze colloidali sospese nell'acqua che, rivestite dagli ioni derivanti dal coagulante, possono interagire tra loro agglomerandosi in fiocchi.

Il trattamento avviene in due vasche della dimensione interna di 1,6x1,6x4,8 m e portata di 597.8 L/sec. Attraverso una pompa dosatrice da 0-140 L/h, in una

vasca avviene il dosaggio con cloruro ferroso (FeCl_2), mentre nella seconda vasca, attraverso un'altra pompa da 0-100 L/h, avviene il dosaggio con cloruro di poli-alluminio (PACI). Sono presenti inoltre due agitatori a mescolamento rapido in grado di creare un moto vorticoso che consenta una buona dispersione del prodotto.

1.2.4 Flocculazione

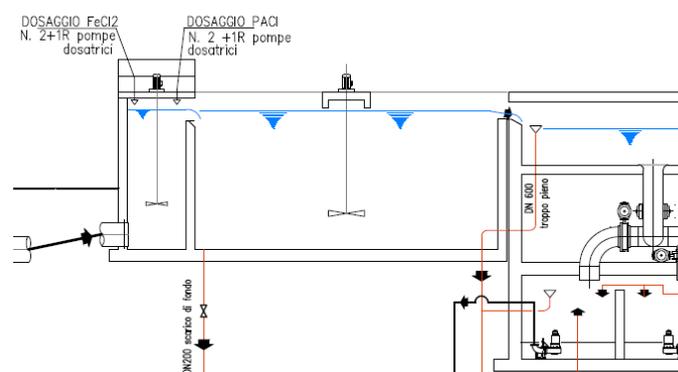


Figura 1.17 Schema progettuale del trattamento di flocculazione

Figura 1.18 Vasca di flocculazione



La flocculazione (Figura 1.17) consiste nell'ulteriore destabilizzazione delle sostanze colloidali sospese in acqua, processo iniziato nella precedente fase di coagulazione, ma soprattutto nell'agglomerazione di particelle destabilizzate che danno poi origine a fiocchi che precipitano facilmente.

Anche in questo caso l'acqua viene fatta convogliare in due vasche di dimensioni interne di 9,5x9,5x4,8 m (Figura 1.18), dotate ognuna di un agitatore lento. Al contrario della fase di coagulazione, infatti, la velocità di agitazione non dovrà essere troppo bassa, per evitare la sedimentazione dei fiocchi, ma nemmeno troppo alta, per evitare la rottura del fiocco.

Infine, i fiocchi formati verranno convogliati in un punto del fondo vasca e quindi pompati in una vasca di raccolta reflui per essere poi eliminati sotto forma di fanghi.

1.2.5 Ultrafiltrazione

Il trattamento di ultrafiltrazione (Figura 1.19), che come già accennato in precedenza è ciò che rende il potabilizzatore della Standiana particolarmente innovativo e all'avanguardia, ha lo scopo di eliminare eventuali particelle, batteri e virus che non sono stati eliminati nelle precedenti fasi di coagulazione e

flocculazione. La fase di lavoro normale del trattamento consiste nel riempire completamente d'acqua 8 vasche (dette altrimenti treni), contenenti ciascuna 5 cassette formate da membrane di filtrazione a fibra cava con porosità compresa tra 0,04-0,1 μm (Figura 1.20).

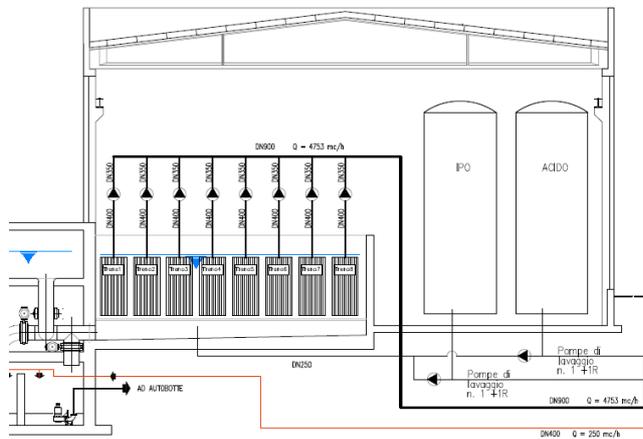


Figura 1.19 Schema progettuale del trattamento di ultrafiltrazione

Figura 1.20 Cassetta di ultrafiltrazione durante un trattamento di manutenzione



Queste membrane sono realizzate in PVDF (Polivinilidene fluoruro), un elastomero parzialmente fluorurato ad elevate prestazioni, caratterizzato da buona resistenza chimica agli acidi forti e agli ossidanti, resistenza ai raggi ultravioletti e un campo di applicabilità termico da 40-150°C. A questo punto l'acqua viene prelevata mediante pompe per depressione, e le fibre cave fanno passare l'acqua, trattenendo però in superficie eventuali particelle o patogeni presenti (Figura 1.21). La percentuale di recupero, ovvero l'acqua totale passata dalle fibre e resa potabile, risulta pari al 92%, mentre il restante 8% dell'acqua, proveniente dallo scarico della fibra cava, viene eliminato e mandato all'autobotte. La fase di lavoro normale dell'impianto può essere quindi riassunta in cicli di carico-scarico, ovvero di riempimento e di svuotamento delle vasche.

A lungo andare sulla superficie della fibra si accumula dello sporco, che può essere sia di natura biologica che fisico-chimica (calcare, metalli ecc.). Al fine di rimuovere quanto accumulato vengono quindi eseguiti lavaggi di mantenimento e cicli di recupero.

Il lavaggio di mantenimento, eseguito per mantenere sia l'efficienza che la permeabilità delle fibre, viene eseguito mettendo le cassette in ammollo per 1 ora

in ipoclorito di sodio (IPO) per rimuovere i residui biologici e in acido fosforico (H_3PO_4) per quanto riguarda quelli chimico-fisici. Il lavaggio in IPO, a concentrazione di 100 ppm, viene eseguito 2 volte la settimana, mentre il lavaggio in acido fosforico, a concentrazione di 800 ppm, 1 volta la settimana.

Il ciclo di recupero, invece, viene eseguito ogni 15-20 giorni con le medesime sostanze, ma a dosi più concentrate, rispettivamente 600 ppm per l'IPO e 2000 ppm per l'acido fosforico. Al fine di avere una maggiore forza pulente, viene utilizzata in soluzione acqua calda con temperatura attorno a 30-35 °C, lasciando le cassette in ammollo per 12 ore.

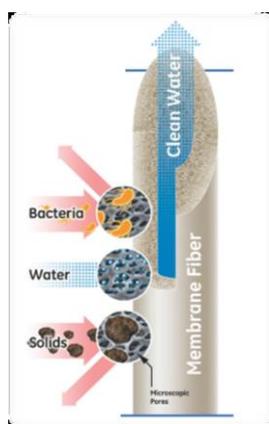


Figura 1.21 Funzionamento delle membrane di filtrazione in PVDF

Infine, vengono periodicamente eseguiti interventi di manutenzione straordinaria. Se qualche membrana dovesse infatti rompersi, a causa di corpi taglienti o di particelle più grossolane eventualmente presenti, le particelle o i batteri avrebbero libero accesso alle fasi successive, senza essere bloccati. Questi interventi periodici consistono nell'immettere dell'aria con flusso inverso all'interno delle membrane, lasciando le cassette immerse nelle vasche d'acqua. Le fibre in PVDF, che lasciano passare l'acqua ma non l'aria, se danneggiate fanno passare quest'ultima, rendendo visibili delle bollicine sulla superficie dell'acqua.

La durata minima delle cassette è prevista per 10 anni e, per determinare l'esatto momento in cui debbano essere sostituite si deve tenere conto sia dell'efficienza di eliminazione dei solidi sospesi, alghe e batteri, sia dei consumi compiuti per estrarre per depressione l'acqua. Infatti, quando questi ultimi saranno troppo elevati, risulterà più conveniente sostituire anzi che continuare ad utilizzare la cassetta. In particolare, le prestazioni dell'impianto dovranno soddisfare i seguenti requisiti:

i. Per il primo 90% della durata minima garantita (10 anni), la torbidità in uscita dal comparto di ultrafiltrazione dovrà essere sempre inferiore o uguale a 0,1 NTU (Nephelometric Turbidity Units);

ii. Per la restante parte della durata minima garantita, le membrane dovranno assicurare una torbidità in uscita dal comparto di ultrafiltrazione inferiore o uguale a 0,2 NTU.

Per quanto riguarda le prestazioni riguardanti i microrganismi come *Giardia* e relative oocisti, *Cryptosporidium* e relative cisti, *Clostridium*, *Escherichia* e Coliformi fecali e le alghe, la riduzione logaritmica dovrà sempre risultare superiore a 4.

Con il trattamento di ultrafiltrazione viene eliminato tutto ciò che è sospeso in acqua, ma non le sostanze presenti in forma disciolta, come microinquinanti (pesticidi e in genere sostanze prodotte dall'uomo). Queste ultime verranno infatti eliminate definitivamente dai filtri a carbone attivo.

1.2.6 Trattamento con ammoniaca (Break point)

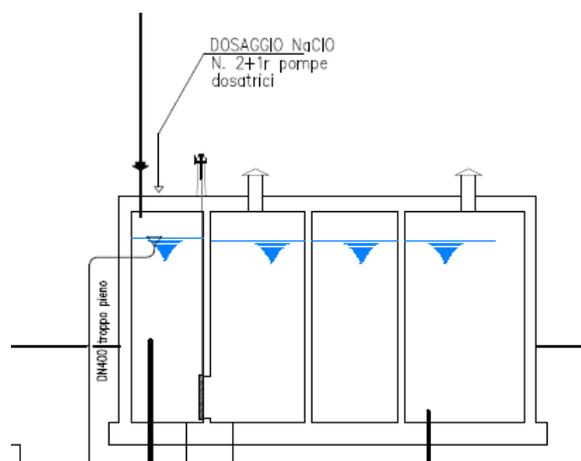


Figura 1.22 Schema progettuale del trattamento con ammoniaca (Break point)

L'acqua a questo punto viene trasferita in due vasche in parallelo, con dimensione interna totale di 27,1x14,8x4,71 m e un volume totale di 1800 mc, per subire il trattamento con ammoniaca (Figura 1.22). Questo, chiamato anche clorazione a break point, è un metodo di sterilizzazione che permette la completa ossidazione dell'ammoniaca e delle sostanze organiche presenti nell'acqua a cloroammine, per reazione con una quantità controllata di IPO. L'IPO, dosato al 14%, viene immesso nelle vasche da due pompe dosatrici da 0-100 L/h.

Dal punto di vista sanitario, lo svantaggio principale della clorazione risiede nella presenza nelle acque superficiali di sostanza organica con la quale l'IPO tende a reagire formando composti organoalogenati, come acidi aloacetici (HAA) e trialometani (THM cloroformio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromoformio). Maggiore attenzione va riservata a questi ultimi, sospettati di creare danni al fegato, ai reni e al sistema nervoso centrale, considerati potenzialmente cancerogeni dall'OMS e ricadenti nella categoria 2B-probabile

cancerogeno per la IARC. Sia gli acidi aloacetici che i trihalometani sono regolamentati all'Allegato I del Decreto Legislativo 31/2001 "Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano".

Risulta quindi importante ridurre i tempi di contatto tra sostanza organica e IPO al fine di ridurre la formazione di THM, i quali vengono successivamente adsorbiti sui filtri a carbone. Il tempo di contatto risulta allora pari a 27,5 minuti, per il successivo rilancio dell'acqua ai carboni attivi mediante 16 pompe con portata di 263 mc/h e potenza di 18,5 kW.

1.2.7 Filtri a carbone attivo

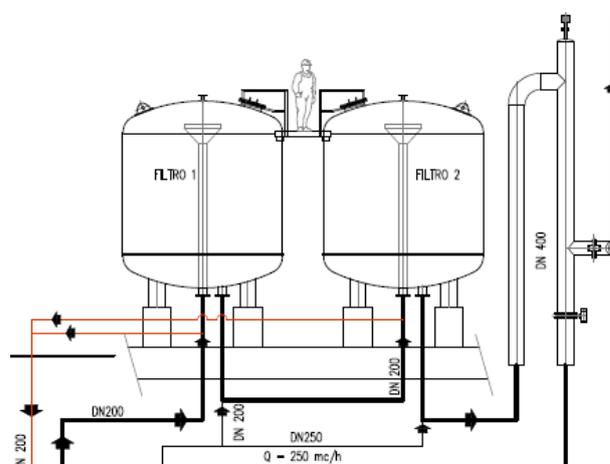


Figura 1.23 Schema progettuale del trattamento con filtri a carbone attivo

Figura 1.24 Batterie di filtri a carbone attivo



Il trattamento con filtri a carbone attivo consta di 16 batterie, ognuna delle quali costituita di due unità filtranti (Figura 1.23, 1.24). L'altezza dello strato filtrante risulta pari a 2,20 m e il diametro del filtro di 4 m, per un volume totale del filtro di 27,5 mc e un volume complessivo di 880 mc.

La velocità di filtrazione risulta invece pari a 20,2 m/h, e il tempo di contatto dell'acqua con il carbone di 13,3 minuti.

Sfruttando le proprietà adsorbenti del carbone attivo, caratterizzato da una elevata area superficiale per unità di peso (dell'ordine dei 1000 m²/g), viene effettuata la rimozione della sostanza organica presente nell'acqua. Data la sua capacità di adsorbimento, questa si esplica in modo particolarmente rilevante nei confronti di sostanze organiche ad elevato peso molecolare e di natura non polare e nei confronti dei THM, che si formano durante la clorazione per reazione della sostanza organica con IPO.

La presenza di torbidità o di solidi in sospensione nell'acqua da potabilizzare riduce, però, la capacità di adsorbimento del carbone, in quanto, provocando una

parziale occlusione della struttura porosa, diminuisce la superficie disponibile per l'adsorbimento. Risulta quindi necessario, oltre che inviare al trattamento su carbone un'acqua preventivamente filtrata, effettuare un'estrazione delle sostanze che per adsorbimento sono rimaste incorporate nei granuli del carbone. Per ottenere questi risultati viene quindi effettuato un controlavaggio una volta al mese tramite una pompa con portata di 250 mc/h e potenza di 18,5 kW. Il trattamento consiste nel far passare vapore a 120 °C per 8-12 ore all'interno del letto filtrante al fine di ottenere un'estrazione delle sostanze bassobollenti, poi si sospende il trattamento e si lascia raffreddare il filtro, viene effettuato un altro controlavaggio con acqua e si rimette il filtro in attività.

Il controlavaggio a vapore, però, non è in grado di estrarre le sostanze inquinanti che a lungo andare si accumulano nelle particelle di carbone e, se arrivano a saturare il carbone stesso, riducono di molto il suo effetto filtrante. Ogni 12-18 mesi, perciò, il carbone deve essere rigenerato mediante opportuno trattamento termico eseguito da aziende specializzate. Questo viene fatto inserendo il carbone in forni con temperatura di circa 800 °C e privi di ossigeno, per evitare la combustione del carbone stesso, decomponendo così le molecole organiche presenti.

1.2.8 Accumulo finale

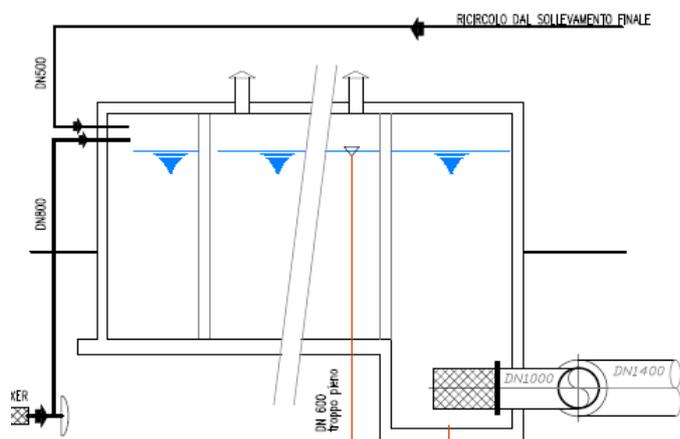


Figura 1.25 Schema progettuale della vasca di accumulo finale

L'acqua in uscita dai filtri a carbone attivo è stata completamente liberata dagli agenti inquinanti, però è priva di disinfettante. Viene allora effettuata una sterilizzazione di copertura, fatta dosando biossido di cloro (ClO_2) in concentrazione di 0,12-0,20 ppm, limitando così lo sviluppo in rete di microrganismi patogeni e garantendo la potabilità dell'acqua fino al rubinetto della singola utenza.

Un altro trattamento necessario è la correzione del pH tramite utilizzo di due pompe dosatrici da 0-120 L/h che, immettendo idrossido di sodio (NaOH), hanno lo scopo di portare il pH dell'acqua verso valori alcalini. Questo eviterà la corrosione delle tubature della rete di distribuzione, in parte realizzate in cemento armato.

L'acqua prodotta dall'impianto viene infine stoccata in due vasche chiuse in cemento armato (Figura 1.25), di dimensioni interne totali di 39x57x4,7 m e volume utile complessivo di 10.000 mc. Queste due vasche, utilizzate in parallelo, riescono a compensare i picchi di consumo che si verificano e riescono inoltre a garantire l'approvvigionamento di acqua potabile anche in caso di brevi interruzioni del funzionamento dell'impianto.

1.2.9 Sollevamento finale

A valle delle vasche di stoccaggio è presente, infine, una stazione di sollevamento che consente l'invio dell'acqua trattata alla rete di distribuzione, mediante tre condotte: una verso l'entroterra (comuni di Russi e Lugo), una verso il centro di Ravenna e una verso la costa (comuni di Cesenatico e Rimini).

2. Scopo della ricerca

L'acqua è una risorsa naturale vitale per l'uomo, ed indispensabile per l'esistenza di tutti gli ecosistemi. Il fatto di poter trovare in una risorsa così importante sostanze in grado di interferire con il sistema endocrino è diventato negli ultimi anni un problema di crescente preoccupazione. Un'ulteriore problematica consiste nel fatto che, nella maggior parte dei casi, gli impianti di trattamento delle acque non siano in grado di rimuovere dalle acque destinate al consumo umano questi inquinanti, che ingeriti possono avere effetti negativi sulla salute.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in questo contesto di crescente attenzione verso gli interferenti endocrini (IE) in un comparto ambientale importante come quello delle acque ad uso potabile. Per perseguire tale scopo sono state effettuate due campagne di campionamento in due diversi periodi dell'anno, presso il potabilizzatore della Standiana di Ravenna, uno tra i più innovativi, gestito da Romagna Acque-Società delle Fonti. L'acqua è stata campionata sia all'entrata dell'impianto, che in uscita, al fine di verificare l'eventuale presenza di IE nelle acque prima di essere trattate e, nel caso queste siano presenti, l'efficienza di rimozione di queste sostanze da parte del potabilizzatore stesso. Inoltre, sono state prese in considerazione anche alcune fasi intermedie tra l'ingresso e l'uscita al potabilizzatore, per verificare se e quanto i singoli processi intermedi contribuiscano alla qualità finale delle acque, rispetto alla rimozione degli IE.

A tal fine sono state svolte sia analisi chimiche che biologiche. Le prime con lo scopo di valutare la presenza di dieci sostanze rappresentative di differenti classi di IE nei campioni di acqua prelevata, e le seconde al fine di valutare l'eventuale presenza di sostanze ad azione estrogenica e/o genotossica.

In particolare ci si è serviti di una metodologia chimica molto sensibile, basata sulla cromatografia liquida accoppiata con la spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS) per ricercare e quantificare gli IE selezionati, e di due test biologici quali l'E-Screen e il test dei micronuclei per valutare rispettivamente l'eventuale attività estrogeno-mimetica delle sostanze presenti in matrice acquosa e per evidenziare una eventuale genotossicità nei campioni d'acqua prelevati. Le cellule utilizzate per entrambi i test biologici sono le MCF-7, appartenenti alla linea cellulare epiteliale di adenocarcinoma mammario.

Risulta di fondamentale importanza, negli studi di monitoraggio ambientale, accompagnare indagini di tipo chimico con test biologici, visualizzandoli in un'ottica di complementarietà. Infatti da un lato, i test chimici sono in grado di fornire una determinazione quantitativa delle sostanze presenti all'interno del campione da analizzare, con successive valutazioni riguardanti il superamento o meno dei limiti normativi, quando essi sono definiti; dall'altro i test biologici sono invece in grado di dare una valutazione qualitativa degli effetti, che una matrice eventualmente contaminata può avere sugli organismi viventi. I soli test biologici in uno studio di monitoraggio ambientale non risulterebbero sufficienti al perseguimento dello scopo, in quanto sono sì in grado di offrire una misura integrata della potenza estrogenica di una determinata matrice ambientale, ma non di conoscerne i singoli costituenti, rimandando a test di tipo chimico per ulteriori chiarimenti. Si può quindi affermare che i due tipi di analisi sono tra loro complementari al fine di avere informazioni più complete sulla qualità dell'acqua oggetto di studio.

3. Materiali e metodi

Il presente lavoro di tesi ha previsto sia l'impiego di una metodologia chimica analitica basata sulla ricerca e sulla quantificazione di IE selezionati, sia l'applicazione di due test biologici al fine di valutare da una parte la presenza di xenoestrogeni mediante il saggio E-SCREEN, dall'altra la presenza di composti con attività genotossica mediante il test dei micronuclei.

Non essendo ancora presenti linee guida e protocolli standard per quanto riguarda l'argomento trattato, per le fasi di preparazione dei campioni e per le metodiche analitiche svolte ci si è attenuti alle indicazioni date dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), riportate nel rapporto 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" (2011).

3.1 Campionamenti

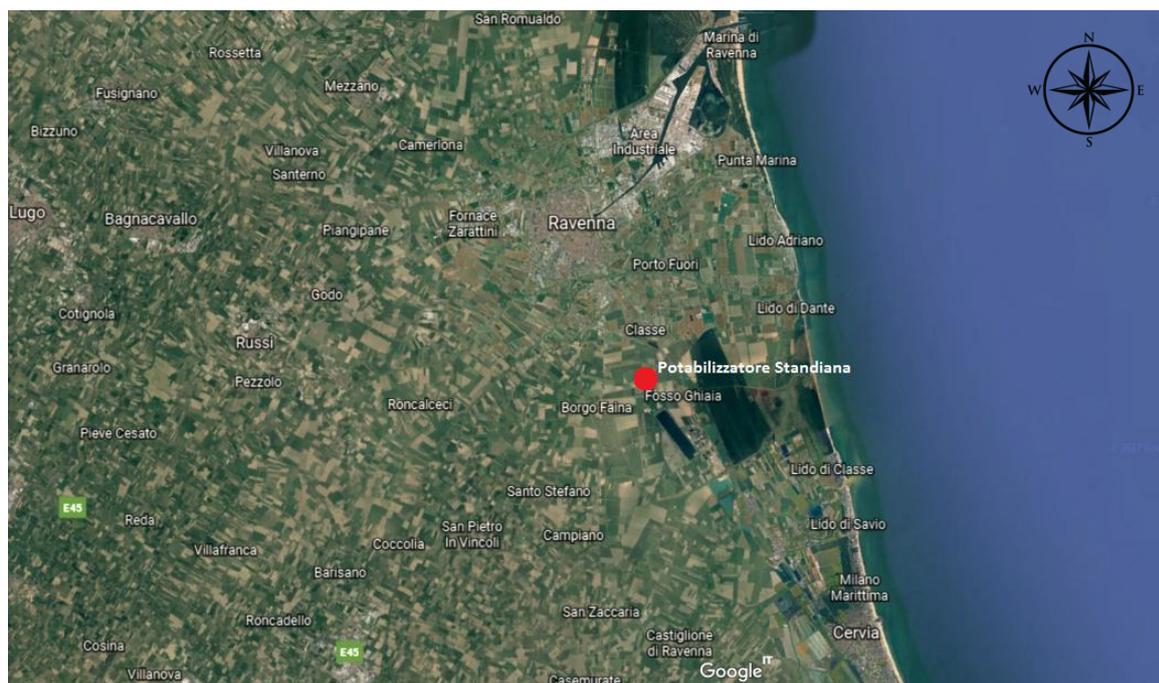


Figura 3.1 Inquadramento territoriale del potabilizzatore della Standiana

L'impianto oggetto di questo lavoro di tesi è il potabilizzatore della Standiana (Figura 3.1). Si è deciso di concentrarsi proprio su questo impianto, tra quelli gestiti da Romagna Acque-Società delle Fonti, in quanto è uno dei potabilizzatori più recenti e all'avanguardia, e per questo si è voluto verificare se fosse particolarmente selettivo anche verso sostanze difficili da eliminare come risultano essere gli IE.

Ai fini delle analisi, sono state effettuate due campagne di campionamento, una a Luglio ed una a Settembre 2017, al fine di valutare la qualità dell'acqua nei periodi di contaminazione massima attesa. Infatti, il periodo estivo risulta caratterizzato da una scarsa piovosità e da una massima presenza turistica.

Per ogni campagna di campionamento sono stati prelevati i seguenti campioni d'acqua (Figura 3.2):

- Canale Emiliano Romagnolo (CER);
- Ingresso del potabilizzatore;
- Trattamento di pre-ossidazione;
- Trattamento di flocculazione;
- Trattamento di ultra-filtrazione;
- Uscita dal potabilizzatore.

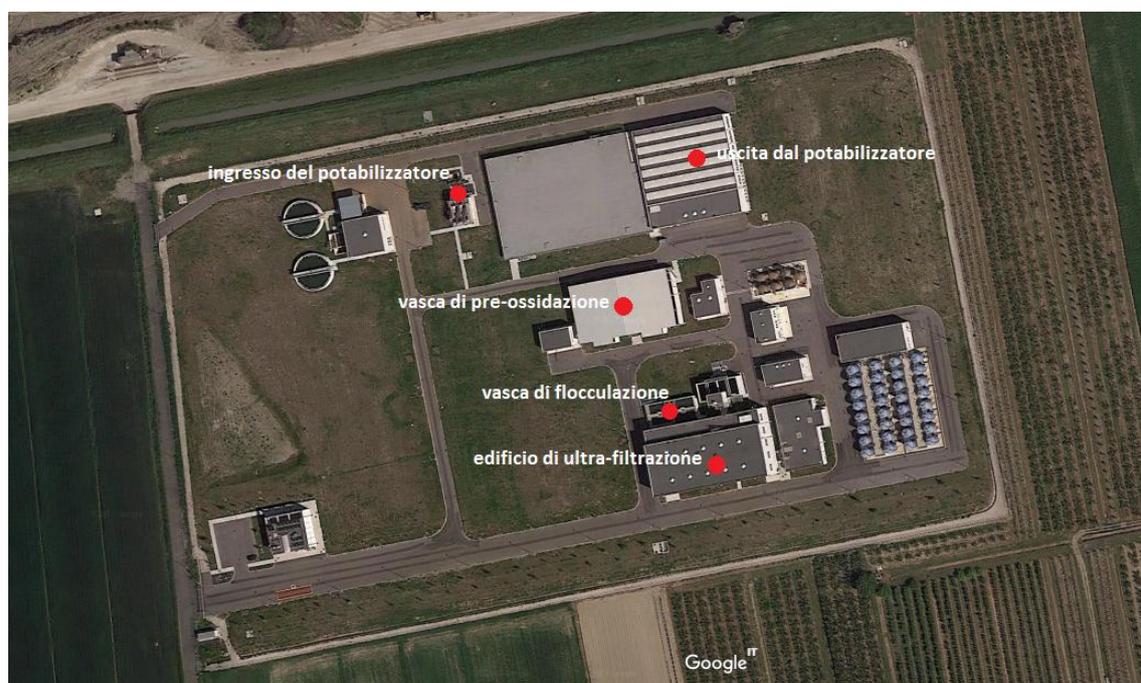


Figura 3.2 Planimetria del potabilizzatore della Standiana con indicati i punti di campionamento

La scelta di prelevare, oltre ai campioni di acqua in ingresso e uscita, anche tre campioni nelle fasi intermedie del processo, può trovar ragione nel voler constatare se ci fosse stato un trattamento che, più di altri, contribuisse alla rimozione di IE eventualmente presenti.

I campionamenti hanno interessato anche il CER, il canale dal quale vengono derivate le acque trattate dal potabilizzatore della Standiana (Achene et al., 2011).

3.2 Preparazione dei campioni per le analisi chimiche e biologiche

3.2.1 Vetreria, materiali e attrezzatura di base

Prima di procedere con il campionamento, si è provveduto dapprima a lavare le bottiglie in polietilene (PE) che dovranno contenere l'acqua da analizzare. Questo passaggio risulta particolarmente importante in quanto sia le acque superficiali grezze che quelle trattate dal potabilizzatore possono presentare una concentrazione di IE anche di pochi ng/L, e proprio per questo motivo nel corso dell'analisi si deve cercare di ridurre al minimo le contaminazioni. In letteratura è ormai noto come il materiale utilizzato, come la vetreria, i solventi, possa risultare fonte di contaminazione non sistematica nell'analisi di composti ubiquitari, in particolare per il BPA e gli alchilfenoli (Loos et al., 2008). Questi analiti possono infatti essere rilasciati dai materiali plastici, dalla vetreria e dai solventi utilizzati, non che essere presenti nello stesso ambiente di laboratorio. La contaminazione della vetreria riguarda in particolar modo il nonilfenolo, ed è ascrivibile in gran parte all'uso di detergenti contenenti alchilfenoli come impurezze/prodotto di degradazione. Al fine di eliminare o ridurre l'entità di possibili contaminazioni dovute all'uso di materiali plastici, viene raccomandato di utilizzare materiali inerti, sostituendo i materiali plastici con quelli in PE, come nel nostro caso. Per questo motivo, sia le bottiglie in PE atte al campionamento, sia il materiale e la vetreria utilizzati nei vari passaggi successivi saranno accuratamente lavati e risciacquati rispettivamente con acqua e metanolo (CH₄O).

3.2.2 Procedura di campionamento e conservazione dei campioni d'acqua

I campioni d'acqua sono stati prelevati dai 6 punti descritti precedentemente tramite campionamento istantaneo (Figure 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7), ovvero raccogliendo un campione singolo 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), consente di fotografare istantaneamente l'eventuale livello di contaminazione presente al momento del campionamento. Per la raccolta ed il trasporto dei campioni sono state utilizzate bottiglie in PE, materiale particolarmente resistente agli agenti chimici, alle variazioni termiche e ad eventuali urti meccanici che le bottiglie potrebbero subire nel corso del trasporto, della capienza di 1 litro. Sia per quanto riguarda il campionamento di

Luglio che quello di Settembre, la quantità di acqua prelevata in ingresso e in uscita dal potabilizzatore è stata pari a 4 L (4 bottiglie da 1 L), mentre per i trattamenti intermedi (pre-ossidazione, flocculazione e ultra-filtrazione) 3 L (3 bottiglie da 1 L).

Per ogni punto campionato sono state utilizzate:

- 2 bottiglie da 1 L per i campioni di acqua in ingresso e in uscita dal potabilizzatore, per le analisi biologiche, svolte solamente per i campioni suddetti;
- 1 bottiglia da 1 L, per le analisi chimiche, svolte su tutti e 6 i campioni.

Anche se non tutti i campioni prelevati sono risultati utili al fine dell'analisi, risulta importante e necessario applicare una maggiorazione nei campioni di acqua da prelevare, nel caso vi fosse necessità, per qualsiasi motivo, di dover replicare l'analisi. Una volta giunti in laboratorio, i campioni di acqua prelevati sono stati conservati ad una temperatura di refrigerazione di 4 °C, fino al momento dell'analisi.

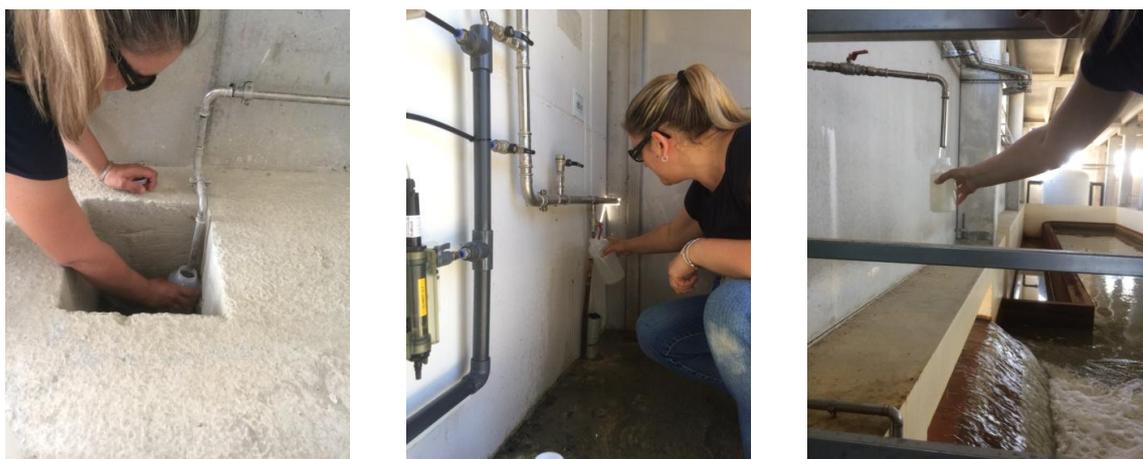


Figure 3.3, 3.4, 3.5 (da sinistra) Campionamento in ingresso del potabilizzatore, dopo il trattamento di preossidazione e dopo il trattamento di flocculazione



Figure 3.6, 3.7 (da sinistra) Campionamento dopo il trattamento di ultrafiltrazione e in uscita dal potabilizzatore

3.2.3 Filtrazione

Successivamente i campioni d'acqua da analizzare sono stati sottoposti a filtrazione, un'operazione consistente nella separazione fisica dei materiali grossolani con lo scopo di eliminare le impurità solide che potrebbero falsare o ostacolare l'analisi del liquido in esame. Questa operazione può essere effettuata per gravità o, come nel nostro caso, operando sottovuoto tramite una pompa meccanica e l'impiego di vetreria a tenuta, al fine di velocizzare il processo. Il sistema di filtrazione utilizzato nelle presenti analisi si compone di diversi elementi (Figura 3.8), quali:

- imbuto büchner;
- bicchiere graduato;
- pinza bloccante;
- tubo aspirante, per creare il vuoto;
- beuta da vuoto.

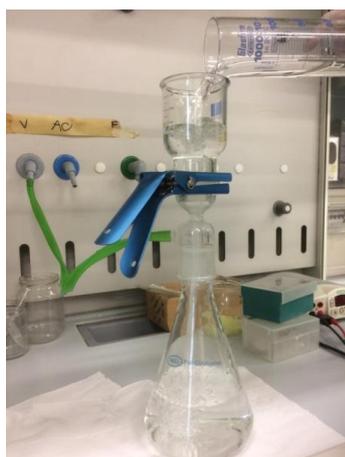


Figura 3.8 Sistema di filtrazione

Il campione di acqua da analizzare viene dapprima versato all'interno di un cilindro graduato per misurarne precisamente la quantità di 1 L e, soltanto per quanto riguarda i campioni da sottoporre ad analisi chimica, questi sono artificialmente contaminati con 300 μL di standard di processo, ovvero una soluzione di standard marcati a concentrazione di 100 $\mu\text{g/L}$ (PFOA-C₁₃, estradiolo deuterato, Ibuprofene deuterato, BPA deuterato), con lo scopo di assicurare correttezza alla procedura analitica, sia in fase di estrazione SPE (Solid Phase Extraction) che in fase di determinazione finale dei composti, garantendo in tal modo la qualità del dato analitico. Una volta attivata la pompa che genera il vuoto, il campione di acqua viene gradualmente versato all'interno del bicchiere graduato e fatto passare attraverso una carta filtrante adeguatamente posizionata ed adesa alla parete dell'imbuto büchner. La scelta

del filtro è dipendente alla qualità della filtrazione che si vuole ottenere e alla torbidità iniziale della matrice acquosa, dal momento che la presenza di particolato nei campioni di acqua potrebbe provocare un'occlusione delle cartucce SPE nel corso della successiva fase di estrazione.

Nel nostro caso specifico si è deciso di procedere con una doppia filtrazione, che risulta particolarmente utile per i campioni di acqua grezza prelevati prima dell'ingresso al potabilizzatore:

- una prima filtrazione, più grossolana, con filtro in microfibra di vetro di 1,6 μM ;
- una seconda filtrazione, con filtro in acetato di cellulosa, di 0,45 μM , in grado di trattenere particelle di diametro inferiore.

Il campione di acqua filtrato verrà raccolto in una bottiglia di vetro preventivamente lavata e risciacquata con metanolo, per poi procedere con il successivo trattamento di estrazione.

3.2.4 Procedura estrattiva

Tutti i campioni filtrati, sia quelli da sottoporre ad analisi biologica che quelli destinati all'analisi chimica, sono stati sottoposti alla procedura estrattiva, la quale porterà a concentrare il volume iniziale di ciascun campione di circa 2000 volte, passando da 1 L a 500 μL .

La SPE rappresenta attualmente la tecnica di preparazione del campione più nota e utilizzata nei laboratori analitici in diversi settori, da quello clinico a quello ambientale. Il processo di estrazione è basato sull'interazione degli analiti da estrarre, in questo caso residui di farmaci ambientali e altri IE, disciolti in una fase liquida, con una fase adsorbente solida. Dopo un preliminare condizionamento dell'adsorbente, il processo di estrazione prevede una fase di caricamento del campione liquido e ritenzione degli analiti, seguita da una fase di eluizione con un opportuno solvente.

La SPE è stata inizialmente introdotta come alternativa all'estrazione liquido-liquido (LLE, Liquid-Liquid Extraction), per isolare e concentrare tracce di contaminanti organici apolari da campioni acquosi. Mentre la LLE richiede l'impiego di una presa del campione adeguata e quindi elevati volumi di solventi organici che devono poi essere riconcentrati, la SPE sfrutta le interazioni polari tra un adsorbente polare e gli analiti polari, caricando elevati volumi di campione acquoso su piccole quantità di adsorbente ed eluendo gli analiti con pochi mL di solvente organico, ottenendo così elevati fattori di arricchimento dell'analita e

riducendo nel contempo i tempi di analisi e le possibili contaminazioni da impurezze presenti nei solventi. Come principio di funzionamento, la SPE risulta estremamente simile alla cromatografia liquida, essendone legata dalle medesime leggi e considerazioni. Dal momento in cui la fase solida, contenuta nella cartuccia, entra in diretto contatto con la fase liquida ed i soluti in essa contenuti, questa deve essere in grado di separare l'analita dalla fase liquida. Per far ciò è necessario che l'analita presenti una maggiore affinità per il mezzo solido responsabile della separazione e, nel dettaglio, occorre che la forza di legame tra analita e sito attivo dell'assorbente sia più elevata rispetto a quella esistente tra analita e fase liquida, nella quale si trova inizialmente inserito.

In detto lavoro di tesi, sono state utilizzate delle cartucce di estrazione del modello OASIS-HLB 6 cc, 200 mg (Waters Spa, Milano), realizzate in speciale materiale composito nel quale, su una matrice di divinilbenzene, sono inseriti sia gruppi polari idrofilici che gruppi polari lipofilici. La SPE risulta un passaggio di fondamentale importanza soprattutto in vista della cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem in quanto una diminuzione della complessità della matrice di partenza porta necessariamente ad un abbattimento dell'effetto matrice, la quale può essere diretta responsabile di una quantificazione sotto- o sovra-stimata della reale quantità di analita presente.

Di seguito sono riportate le 5 fasi successive eseguite durante il procedimento multi-step dell'estrazione in fase solida SPE.

- 1. Condizionamento.** Questo passaggio preliminare ha come scopo quello di attivare i siti attivi della cartuccia SPE, così che l'analita venga correttamente trattenuto nella fase solida. Questo si ottiene facendo passare per caduta 6 mL di metanolo, solvente scelto per la successiva fase di eluizione.
- 2. Equilibratura.** Successivamente, si procede facendo fluire attraverso la cartuccia, sempre per caduta, 6 mL di acqua ultrapura MilliQ. Questo passaggio viene fatto sia per asportare il solvente di condizionamento, sia per permettere all'analita del campione di interagire con i siti attivi della cartuccia.
- 3. Caricamento del campione.** La fase più lunga e delicata dell'intero processo consiste nel passaggio del campione d'acqua da 1 L attraverso la cartuccia. In questo caso, l'acqua del campione non viene fatta passare per caduta all'interno della cartuccia come nelle fasi precedenti, ma ad una velocità che non deve comunque superare i 10 mL/min. Questo per far sì che le molecole abbiano modo di legarsi ai siti attivi della fase solida. La velocità di flusso viene regolata

con una pompa che genera il vuoto in un apparecchio vacuum manifold (Figura 3.9), scartando il percolato.

4. Risciacquo. Una volta che tutto il campione è stato fatto passare attraverso la cartuccia, viene caricata un'aliquota pari a 6 mL di acqua ultrapura Milli-Q allo scopo di far passare attraverso la cartuccia tutta l'acqua del campione sperimentale. Anche in questo caso il flusso non deve risultare superiore a 10 mL/min. Successivamente a questo lavaggio, la pompa di aspirazione è stata mantenuta in azione per 15 min circa, al fine di ridurre al minimo la fase acquosa nell'eluato. Anche in questo caso il percolato viene infine scartato.

5. Eluizione. L'ultima fase del processo SPE consente, attraverso l'ausilio di un opportuno solvente, di portare in soluzione gli analiti di interesse trattenuti nella fase solida della colonnina. Questo passaggio, estremamente delicato, consiste nell'eluizione lenta, per caduta, con 6 mL di metanolo, allo scopo di eluire tutte le molecole trattenute dalla fase solida di estrazione. Quanto eluito viene raccolto in opportune provette di vetro. L'esecuzione della procedura SPE è stata possibile attraverso l'utilizzo di un apparecchio vacuum manifold che ha permesso di effettuare l'estrazione di quattro campioni per volta (Figura 3.10).



Figura 3.9 Vacuum manifold per SPE



Figura 3.10 Cartucce SPE

Al termine della procedura di estrazione, i campioni eluiti in metanolo sono sottoposti alla successiva fase di evaporazione sotto flusso di azoto (Figura 3.11). Questo per permettere la considerevole riduzione del volume del campione di interesse grazie alla volatilizzazione del metanolo, impiegato come solvente di eluizione nell'ultimo passaggio di estrazione SPE. Mentre il solvente verrà rimosso per evaporazione, le molecole di nostro interesse, avendo invece una tensione di vapore minore rispetto al solvente stesso, sono teoricamente le sole a rimanere adese alla parete della provetta di vetro contenente l'eluato. Al fine di

evitare perdite e fuoriuscite delle specie chimiche di interesse, il flusso gassoso deve essere accuratamente controllato.

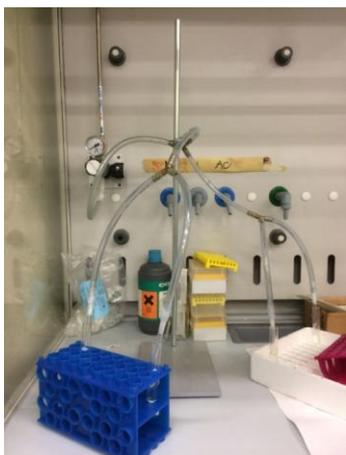


Figura 3.11 Evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto

Successivamente all'evaporazione, l'analita deve essere ricostituito mediante una miscela di acqua:metanolo, a seconda del tipo di analisi a cui il campione andrà sottoposto in seguito.

- Campioni da sottoporre ad analisi biologica. Il volume dell'eluato viene ridotto a 50 μL in modo da mantenere in soluzione le molecole presenti. A questi 50 μL di metanolo sono quindi aggiunti 200 μL di acqua. Il campione così ricostituito è mantenuto ad una temperatura di 4 $^{\circ}\text{C}$ nelle medesime provette di vetro fino al momento dell'esposizione alle cellule. In sede di esperimento sulle colture cellulari, il campione di acqua:metanolo è ulteriormente diluito in mezzo di coltura cellulare, portandolo ad una soluzione di lavoro di 50 mL. Tenendo conto che si è partiti da un volume di acqua iniziale di 1L, la concentrazione finale di campione acqua:metanolo è pari a 20x, con metanolo residuo allo 0,1%. Studi preliminari effettuati nel nostro laboratorio mostravano infatti che una concentrazione di 200x risultava tossica per le cellule con cui veniva a contatto. Prima di procedere con l'esperimento, inoltre, i campioni di acqua:metanolo sono sottoposti ad un processo di filtrazione/sterilizzazione, mediante l'impiego di filtri a siringa con porosità estremamente ridotta ($\phi < 0,2 \mu\text{M}$), al fine di ridurre il rischio di inquinamento biologico.
- Campioni da sottoporre ad analisi chimica. Il volume dell'eluato, anche in questo caso, non viene portato a secco, ma ridotto ad un volume di 50 μL di metanolo. Tale residuo sarà successivamente suddiviso in due aliquote uguali, ognuna da risospendere in opportune miscele di acqua:metanolo, coerentemente con le condizioni di analisi in LC/MS/MS. Per le analisi di estrogeni, BPA, nonilfenolo e ottilfenolo il campione è stato risospeso in

metanolo:acqua in rapporto 50:50 (125 μ L metanolo: 125 μ L acqua), mentre per l'analisi di Diclofenac, Ibuprofene, PFOS e PFOA in rapporto 10:90, (25 μ L metanolo: 125 μ L acqua). La miscela di solventi corrisponde a quella impiegata all'inizio della separazione cromatografica, in modo da non falsare le dinamiche di separazione in colonna. In entrambi i casi, la soluzione ottenuta risulterà concentrata 2000 volte rispetto a quella di partenza. Prima dell'analisi in LC/MS/MS, è stato necessario procedere ad una centrifugazione dei campioni per circa 5 minuti a $17000 \times g$, di modo di rimuovere il particolato eventualmente rimasto in sospensione. Da questo momento risulta infatti essenziale e doveroso garantire la purezza di quel che viene iniettato in colonna cromatografica, di modo da evitare intasamenti e conseguenti problemi di sovra-pressione del sistema. I campioni vengono allora travasati in appositi boccini da autocampionatore e mantenuti ad una temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi.

3.3 Analisi chimiche: cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem

Le sostanze ricercate tramite analisi chimica (LC-MS-MS) nel presente lavoro di tesi sono:

- tre estrogeni: 17-alfa-etinilestradiolo (EE2), 17-beta-estradiolo (E2), estrone (E1) e il farmaco Diclofenac. Queste sostanze sono state recentemente inserite nell'elenco di sostanze per le quali devono essere raccolti dati di monitoraggio a livello dell'UE, in quanto potrebbero presentare un rischio significativo per l'ambiente acquatico, ma per le quali l'insufficienza di dati di monitoraggio non consente di giungere ad una conclusione circa i rischi reali che esse presentano (Decisione 2015/495/UE).
- due alchilfenoli (nonilfenolo, ottilfenolo) e PFOS. Queste sostanze sono presenti nella Direttiva 2013/39/CE, riguardante le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque.
- PFOA: questa sostanza è riportata nel Decreto Legislativo n. 172 del 2015, in attuazione della Direttiva 2013/39/UE, che per quanto riguarda le sostanze perfluorate avrà effetto dal 22 dicembre 2018. Inoltre, l'inquinamento da sostanze perfluoro-alchiliche (PFAS) che interessa una sessantina di comuni nelle provincie di Vicenza, Verona e Padova, e scoperto nel 2013 grazie ad

uno studio del CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), commissionato due anni prima dal Ministero dell'Ambiente, ha portato ad una crescente attenzione verso questi composti, ricercati appunto anche in questo lavoro di tesi.

- BPA ed il farmaco Ibuprofene: queste sostanze sono state selezionate tenendo conto della frequenza di contaminazione nelle acque europee e sulla evidenza sperimentale di effetti tossicologici, derivanti dall'esposizione a tali sostanze.

3.3.1 Descrizione della tecnica analitica LC/MS/MS tandem

Prima di procedere con la descrizione vera e propria delle analisi chimiche compiute nel corso del lavoro di tesi, si ritiene opportuno dare una breve descrizione della strumentazione utilizzata, ovvero del cromatografo per HPLC e dello spettrometro di massa.

3.3.1.1 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

La cromatografia liquida ad alta prestazione risulta ad oggi uno degli strumenti più potenti della chimica analitica, avendo la capacità di separare, identificare e quantificare i composti presenti in un campione liquido. Per l'esecuzione delle nostre analisi, è stato impiegato l'HPLC di marca AGILENT, serie 1200, dotato di una colonna di analisi a cromatografia di adsorbimento di tipologia RP (Reversed Phase).

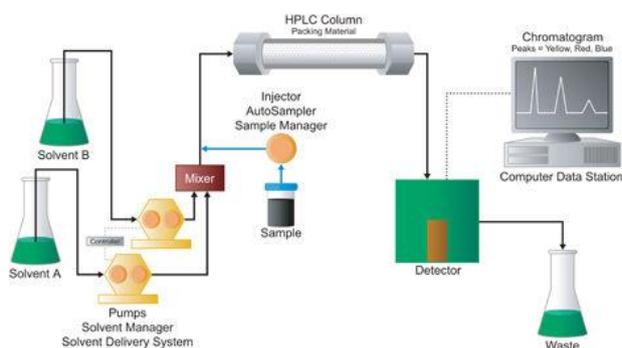


Figura 3.12 Sistema HPLC

I componenti di base di un sistema HPLC (Figura 3.12) consistono in:

- un serbatoio che contiene il solvente, chiamato anche fase mobile;
- una pompa ad alta pressione, utilizzata per generare e misurare una portata specifica di fase mobile, generalmente mL/min;
- un sistema di iniezione dotato di autocampionatore o autosampler, in grado di iniettare il campione nel flusso di fase mobile, che con flusso continuo porta il campione nella colonna HPLC;

- la colonna, che contiene il materiale cromatografico necessario per effettuare la separazione, chiamato fase stazionaria in quanto tenuto in posizione dalla colonna. Nel nostro caso è stata utilizzato un modello XSELECT C18 di marca Waters (L:15 cm, ϕ colonna: 2,1 mm, ϕ fase stazionaria: 3,5 μ m), che si presta all'analisi di molecole organiche in matrice polare;
- un rivelatore, in questo caso lo spettrometro di massa.

In HPLC possono essere utilizzati due modalità di eluizione. Nella prima, chiamata eluizione isocratica, la fase mobile, consistente in un solvente puro o in una miscela, rimane la stessa per tutta la durata di separazione. La seconda tipologia, da noi utilizzata, è chiamata eluizione di gradiente, nella quale la composizione di fase mobile cambia nel corso della separazione. Quest'ultima, particolarmente utile per campioni contenenti composti che coprono un'ampia gamma di polarità cromatografiche, consiste nell'aumentare la forza di eluizione della fase mobile nel procedere della separazione, al fine di eluire gradualmente tutti componenti del campione.

Sono allora presenti due bottiglie di solventi e due pompe, la cui velocità è gestita dal controllore di gradiente, in grado di fornire la giusta quantità di solvente nel corso della separazione. I due flussi sono poi combinati nel mixer al fine di creare l'effettiva composizione di fase mobile consegnata alla colonna nel corso del tempo. Inizialmente, la fase mobile contiene una percentuale più elevata di solvente più debole (solvente A), aumentando però nel tempo, secondo un gradiente prestabilito, la percentuale di solvente più forte, in termini di apolarità (solvente B), al fine di eluire gli analiti.

I sistemi HPLC differiscono tra loro anche per via della modalità con cui viene creata la separazione. Nel nostro caso è stata utilizzata la modalità di cromatografia a fase inversa, consistente nell'uso di una fase mobile polare e di una fase stazionaria non polare, ovvero idrofobica. Questa modalità è quella maggiormente utilizzata tra tutti i metodi HPLC, in quanto quella più riproducibile e con più ampia applicabilità. La maggior parte dei protocolli utilizza come fase mobile una miscela acquosa con un solvente organico miscibile, come acetonitrile o metanolo, che assicurano in genere una corretta interazione degli analiti con la superficie polare e idrofobica. In questo caso i solventi immessi in colonna in percentuali diverse nel corso dell'analisi, sono state per la fase acquosa acqua ultrapura Milli-Q, e per la fase organica acetonitrile (CH_3CN). Una o entrambe le fasi sono state addizionate con piccole percentuali di altri solventi,

al fine di favorire la ionizzazione negativa degli analiti di interesse: 10 mM di ammonio acetato aggiunto soltanto alla fase acquosa, ma non all'acetonitrile per via della scarsa solubilità del sale in esso, oppure 0,1% di idrossido d'ammonio aggiunto ad entrambi i solventi.

3.3.1.2 MS tandem

Lo spettrometro di massa è uno strumento utilizzato al fine di misurare la massa di una molecola successivamente alla sua ionizzazione, ovvero dopo che le è stata impartita una carica elettrica. In realtà, uno spettrometro di massa non misura direttamente la massa molecolare, ma piuttosto il rapporto massa/carica degli ioni che si formano dalla molecola in esame. Questa metodologia rappresenta, per le sue caratteristiche di sensibilità e selettività, la tecnica analitica più all'avanguardia e per questo largamente utilizzata nella determinazione di sostanze presenti in tracce in matrici ambientali e biologiche.

I tre elementi principali che vanno a costituire lo spettrometro di massa sono lo ionizzatore, l'analizzatore e il rivelatore (detector).

La ionizzazione elettrospray del campione in arrivo dal sistema HPLC, si realizza tramite il passaggio dalla fase condensata liquida a quella gassosa, mediante un procedimento di nebulizzazione in uno spazio in cui è presente un campo elettrico in intensità di migliaia di Volt per cm (Figura 3.13). La soluzione analitica da ionizzare viene nebulizzata mediante un ugello posto ad una differenza di potenziale di circa 4 kV, utilizzando azoto compresso. L'aerosol che viene a formarsi contiene delle goccioline di soluzione che subiscono una progressiva desolvatazione, in seguito alla quale il loro diametro diminuisce fino ad un valore critico (limite di Rayleigh), oltre il quale si ha la loro esplosione Coulombiana. Questo processo, che avviene a pressione atmosferica, porta alla formazione di ioni molecolari variamente protonati in fase gassosa a partire da una soluzione liquida. In tal modo all'analizzatore arrivano cluster di ioni molecolari protonati o deprotonati desolvatati ottenuti a pressione ordinaria. Poiché lo stato di carica dell'analita in soluzione è influenzato dal pH, la ionizzazione elettrospray produce uno spettro di massa in cui per un singolo analita possono essere registrati più ioni quasi molecolari del tipo $[M+Hn]^+n$ o $[M-Hn]^-n$. La tecnica di Ionizzazione Electrospray, non trasferendo un eccesso di energia nel processo di ionizzazione, non produce frammentazioni significative ed è considerata per questo una tecnica di ionizzazione soft.

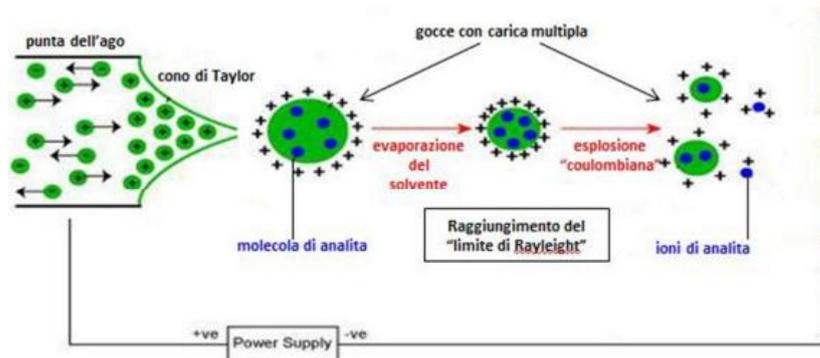


Figura 3.13
Ionizzazione elettrospray

Lo spettrometro di massa, in questo caso a triplo quadrupolo, è costituito dalla sequenza di tre quadrupoli con due analizzatori quadrupolari (Q1 e Q3) e la cella di collisione (Q2), posta fra loro (Figura 3.14). Anteriormente ai quadrupoli è posizionato un ulteriore quadrupolo (Q0) che provvede unicamente alla focalizzazione degli ioni entranti in Q1. Le modalità di utilizzo di un triplo quadrupolo sono molteplici e le più semplici vedono l'utilizzo dello strumento come un singolo quadrupolo mediante scansioni in Fullscan o in SIM utilizzando Q1 o Q3.

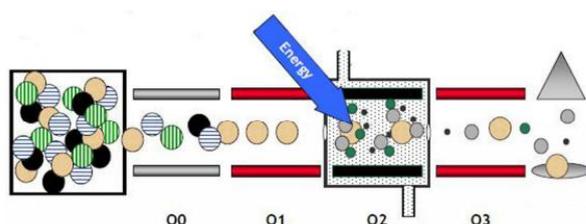


Figura 3.14 Sequenza di tre quadrupoli

Con la spettrometria di massa tandem nel primo stadio di analisi lo ione precursore, avente un determinato rapporto m/z , viene selezionato ed isolato. Nel secondo stadio a tale ione viene fornita energia o per collisione o per radiazione elettromagnetica, inducendo la frammentazione dello stesso. Gli ioni prodotti risultanti, separati da un secondo analizzatore di massa sono rivelati ed acquisiti in uno spettro di massa tandem. Le più comuni tipologie di analisi eseguite con questa tecnica risultano essere SIR (Single Ion Recording) o monitoraggio di reazioni multiple (MRM – Multiple Reaction Monitoring), quest'ultima usata nel nostro lavoro di tesi, al fine di ottenere analisi quantitative sensibili e specifiche. Infine, gli ioni selezionati sono convogliati attraverso un sistema di lenti focalizzatrici e indirizzati, per mezzo di un deflector, nel "detector" dello spettrometro di massa, costituito da un elettromoltiplicatore CEM (Channel Electron Multiplier), composto da un dispositivo a dinodo continuo. I rivelatori più comuni nella spettrometria di massa sono i moltiplicatori di elettroni, dispositivo a forma di corno, in vetro drogato con un elevato tenore di piombo. Un potenziale

di 1,8 – 2 kV viene applicato lungo il rivelatore. Gli ioni che colpiscono la superficie determinano l'emissione di elettroni, che a loro volta colpiscono la superficie interna, con un ulteriore aumento di elettroni emessi ad ogni impatto. All'uscita del canale il segnale elettrico è raccolto e convertito in un segnale digitale che fornisce il conteggio degli ioni in relazione alla loro massa. Il numero di elettroni emessi dipende dal tipo di ione, dall'angolo e dall'energia di collisione e dal tipo di superficie con cui vengono a contatto.

I dati consistono in una serie di spettri di massa che vengono acquisiti in sequenza uno dopo l'altro. Per generare queste informazioni, lo spettrometro scandisce l'intervallo di massa selezionato (ad esempio 30-500 unità di massa) in maniera ripetitiva durante il corso della cromatografia.

L'accoppiamento di due stadi di analisi di massa MS/MS è molto utile per identificare composti in miscele complesse e per determinare la struttura di sostanze incognite. Nell'analisi MS/MS di ioni prodotto, è possibile ottenere lo spettro di ioni prodotto derivanti da uno qualsiasi degli ioni presenti nello spettro di massa convenzionale. Uno ione avente un determinato rapporto m/z può essere selezionato tra quelli formati nella sorgente ionica o contenuti in una trappola ionica nel primo stadio di analisi di massa. Questo ione "genitore" o "precursore" viene quindi frammentato. Gli "ioni figli" o "ioni prodotto" risultanti da questa frammentazione vengono quindi analizzati in un secondo stadio di analisi di massa.

Nel nostro caso specifico, per l'identificazione dell'analita di interesse ci si baserà su segnali ionici (massa/carica) relativi alle transizioni ione precursore>ione frammento, oltre che sul confronto, in identiche condizioni sperimentali, tra il tempo di ritenzione cromatografico relativo alla transizione diagnostica dello ione riferito al campione in esame ed il tempo di ritenzione cromatografico relativo alla transizione diagnostica riferita alla soluzione di riferimento (curva di taratura). Nello specifico, l'effettiva presenza dell'analita nella matrice sperimentale potrà essere verificata solo se entrambe le transizioni diagnostiche saranno presenti in un rapporto segnale/rumore (S/N) ≥ 3 , calcolato mediante algoritmi disponibili sul software. Soltanto in questo caso, infatti, l'analita sarà in grado di produrre un segnale, corrispondente ad un picco cromatografico, significativamente diverso da quello di fondo, ovvero dal segnale non dovuto all'analita, ma a tutti gli altri componenti/interferenti presenti all'interno del campione.

Oltre a questo, un altro fattore di cui tener conto sono i rapporti delle aree dei picchi relativi alle transizioni diagnostiche, che devono essere costanti, con una variabilità accettabile entro il 20% rispetto ai rapporti ottenuti dalle molecole di standard.

3.3.2 Procedura sperimentale per le analisi in LC/MS/MS

3.3.2.1 Analisi dei campioni sperimentali

Nell'ambito delle presenti analisi ci si è avvalsi di uno spettrometro di massa MS tandem (MS/MS) a triplo quadrupolo con interfaccia ESI (Waters, Quattro Premier XE) e modalità di acquisizione MRM (Multiple Reaction Monitoring) (Figura 3.15).



Figura 3.15 Cromatografo HPLC e spettrometro di massa Waters -Quattro premier XE

Gli analiti di interesse sono stati divisi in due gruppi, che si possono analizzare in modalità di ionizzazione e di condizioni cromatografiche simili tra loro. I dettagli delle due differenti condizioni analitiche sono riassunte in Tabella 3.1 e 3.2.

Modalità di ionizzazione negativa				
LC	Cromatografo Agilent			
Colonna	HPLC Agilent con colonna C18 X bridge (3,5 µm, 2,1 x 150 mm x Select, Waters Spa)			
	Per analisi estrogeni, NP, OP, BPA		Per analisi PFOA, PFOS, DICLO, IBU	
Fase mobile	A: acqua Milli-Q+ idrossido d'ammonio 0,1% B: acetonitrile (ACN)+ idrossido d'ammonio 0,1%		A: acqua Milli-Q+ 0,1 mM ammonio acetato B: acetonitrile (ACN)	
Flusso	0,2 mL/min		0,2 mL/min	
	Tempo	% B	Tempo	% B
	6	5%	6	5%
	8	80%	13	99%
	14	80%	18	99%
	15	99%	20	5%
	21	99%	27	5%
	23	5%		
	35	5%		
Volume iniettato	20 µL			

Tabella 3.1 Condizioni di analisi cromatografica relativi all'analisi HPLC

MS	Spettrometro di massa a triplo quadrupolo con interfaccia ESI (Waters, quattro premier XE)	
Ionizzazione	ESI -	ESI -
Capillare	2,9 V	2,7 V
Estrattore	5 V	3 V
Temperatura	130 °C	130 °C
Temperatura di desolvatazione	400 °C	350 °C
Desolvatazione del flusso del gas	800 L/h	850 L/h
Flusso del gas del cono	80 L/h	85 L/h
Multiplier (fotomoltiplicatore)	715	715

Tabella 3.2 Parametri relativi all'analisi in spettrometria MS/MS di E1, E2, EE2, NP, OP, BPA, PFOS, DICLO, IBU

L'identificazione e la quantificazione degli analiti di interesse avviene sulla base dell'intensità del segnale ionico relativo alle due transizioni principali ione precursore > ione frammento. Le transizioni monitorate per i diversi analiti e i relativi SI (standard interni) sono riportate nelle Tabelle 3.3 e 3.4.

Sigla	Nome	Vtaggio cono (V)	ione precursore (m/z)	ione frammento I (m/z)	Energia collisione (eV)	ione frammento II (m/z)	Energia collisione (m/z)
E1	Estrone	54	269,2	145	39	159	37
E2	β-estradiolo	58	271,1	145	44	183	38
EE2	17-α- etinilestradiolo	50	295,1	145	38	159	42
E2-d₃	β-estradiolo-d ₃	52	273,1	185	40		
OP	Octilfenolo	36	205,2	106	20		
NP	Nonilfenolo	34	219,1	132,9	30	147	26
BPA	Bisfenolo A	36	227,1	133	24	212	18
BPA-d₆	Bisfenolo A-d ₆	36	233,0	215	19		

Tabella 3.3 Transizioni monitorate ione precursore>ione frammento per estrogeni, alchilfenoli e BPA

Sigla	Nome	Vtaggio cono (V)	ione precursore (m/z)	ione frammento I (m/z)	Energia collisione (eV)	ione frammento II (m/z)	Energia collisione (m/z)
PFOS	Perfluorooottano sulfonato	59	498,8	79,9	47	98,9	45
PFOA	Acido perfluorooottanoico	14	412,9	168,8	20	368,8	10
DICLO	Diclofenac	15	294,06	249,9	13	214	20
IBU	Ibuprofene	17	205	161	7		
IBU-d₃	Ibuprofene d ₃	20	208	164	7		
PFOA-¹³C	Acido perfluorooottanoico- ¹³ C	14	417,1	372,2	12		

Tabella 3.4 Transizioni monitorate ione precursore>ione frammento per PFOS, PFOA e alcuni farmaci

3.3.2.2 Il bianco campione

Per bianco campione viene inteso un campione di natura identica a quella del campione correntemente oggetto di analisi - nella fattispecie acqua destinata a consumo umano - ma virtualmente privo di analiti. Considerata 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 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 BPA.

I campioni di acqua oligominerale possono essere utilizzati come bianco campione e non richiedono pretrattamenti, anche se nel nostro caso si è deciso di sottoporli ai medesimi pretrattamenti di filtrazione dei campioni reali, descritti nella sezione 3.2.3. Successivamente, questi sono stati sottoposti a procedura estrattiva SPE, come descritto nella sezione 3.2.4. In particolare, come bianco campione è stata utilizzata una bottiglia di vetro da 1 L contenente acqua oligominerale.

3.3.2.3 La necessità di utilizzare lo standard interno/di processo

Lo standard interno o di processo consiste in una sostanza chimica, aggiunta in quantità nota ai campioni, al bianco e agli standard di calibrazione prima di tutta la procedura estrattiva, con lo scopo di assicurare correttezza della procedura analitica sia in fase di estrazione che di determinazione finale dei contaminanti, garantendo in questo modo la qualità del dato analitico.

All'inizio di una procedura analitica, il fatto di aggiungere una concentrazione nota di standard marcato ai campioni sperimentali, consente di compensare gli errori derivanti dalla perdita di analita durante le fasi di trattamento del campione e di analisi, assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga. Per questa ragione lo standard interno deve essere un composto in grado di comportarsi in maniera simile alla specie chimica di interesse nei campioni, dato che gli effetti della preparazione del campione devono essere il più simili possibile al segnale dello standard interno e dell'analita del campione. Il rapporto fra i due segnali analita/standard interno vengono successivamente utilizzati per ottenere la concentrazione dell'analita dalla curva di calibrazione.

In questo caso, ci si è avvalsi di una soluzione madre contenente quattro diversi standard marcati (E2, BPA, PFOA, IBU), con concentrazione di 60 µg/L. Questa soluzione è stata aggiunta a tutti i campioni di acqua da 1 L da sottoporre ad analisi LC/MS/MS, di modo da ottenere una concentrazione finale di standard interni di 30 ng/L.

Per quanto riguarda gli standard utilizzati per la costruzione delle rette di calibrazione, dosi crescenti delle molecole da analizzare sono state aggiunte a campioni d'acqua Milli Q appositamente contaminati mediante una soluzione di standard marcati a concentrazione costante di 60 µg/L, la stessa che presumibilmente devono raggiungere i campioni sperimentali ai quali è stata aggiunta una quantità iniziale di standard interni pari a 30 ng/L, che al termine del processo di estrazione e concentrazione risultano concentrati 2000 volte.

3.3.2.4 Reagenti e standard utilizzati

Ai fini dell'analisi, sono stati utilizzati reagenti di grado LC/MS e materiale di riferimento al più elevato grado di purezza disponibile in commercio, qui di seguito elencati:

- Acqua ultrapura Milli-Q;
- Metanolo;
- Acetonitrile;
- Ammonio acetato;
- Idrossido di ammonio.

Gli standard degli analiti (MPFOA, perfluoro-n-[1,2,3,4-¹³C₄] octanoic acid, Bisphenol-A-d₆ (dimethyl-d₆) e 17β-Estradiol-16,16-d₂) sono stati acquistati dalla ditta Chemical Research 2000 srl, mentre la maggior parte degli altri prodotti utilizzati nel presente lavoro è stata acquistata dalla ditta Sigma Aldrich.

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 con concentrazione di 1 g/L. Le soluzioni sono conservate in congelatore ad una temperatura di -20 °C, ad eccezione di quelle relative al BPA, NP e OP sono state conservate in frigorifero ad una temperatura di 4 °C al fine di minimizzare la degradazione degli analiti. Conservate in questo modo le soluzioni risultano stabili per almeno 3 mesi. Dalle standard stock

solution vengono poi preparate, tramite opportune diluizioni, le working solution, secondo le esigenze.

3.3.3 Quantificazione dei composti selezionati

Dai cromatogrammi ottenuti con le analisi si è proceduto alla quantificazione degli analiti nei campioni sperimentali. In particolare, sono state costruite rette di calibrazione a sei punti, considerando la variazione del rapporto tra le aree del segnale relativo agli analiti (aree dei picchi cromatografici ottenute per integrazione automatica operata dal software MassLynx in dotazione) e quello relativo agli standard interni corrispondenti (Y_a/Y_{si}). La quantità incognita dell'analita presente nel campione sperimentale è stata allora ricavata calcolando il rapporto tra l'area del picco di ciascuna sostanza e l'area del picco del relativo standard interno, interpolando poi tale valore sulla curva di calibrazione. Ogni campione è stato analizzato in triplicato strumentale ($n=3$), mediante tre iniezioni successive dello stesso campione per ogni analisi in LC/MS.

Il modello di calibrazione lineare utilizzato per determinare le concentrazioni dei diversi analiti viene rappresentato graficamente da una retta costruita con il metodo dei minimi quadrati di equazione: $Y=aX$, dove:

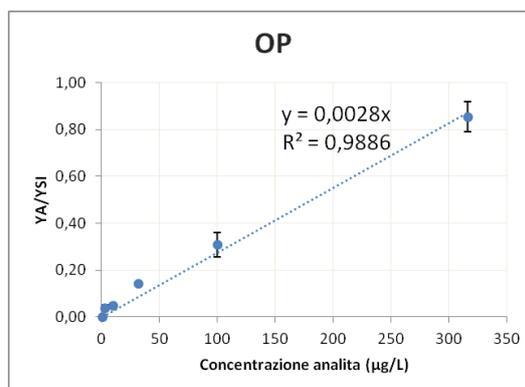
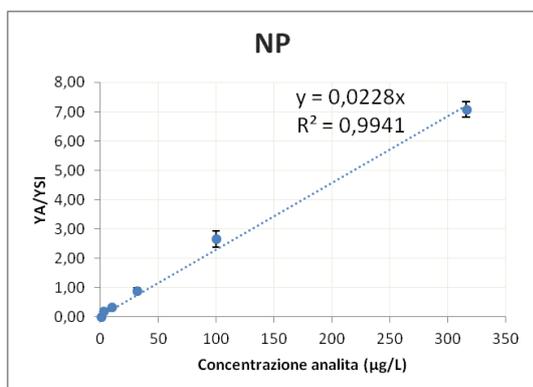
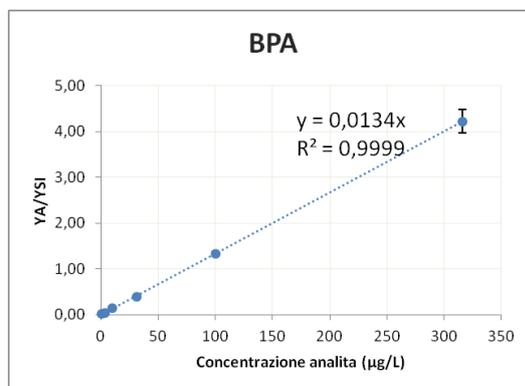
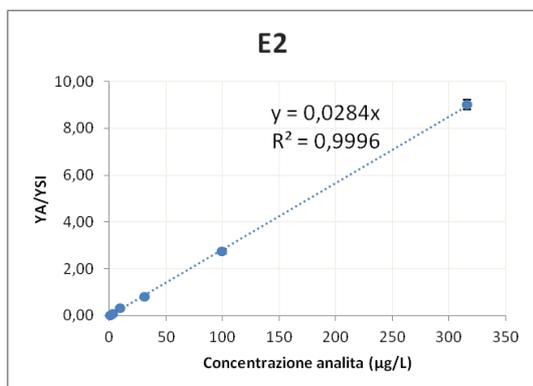
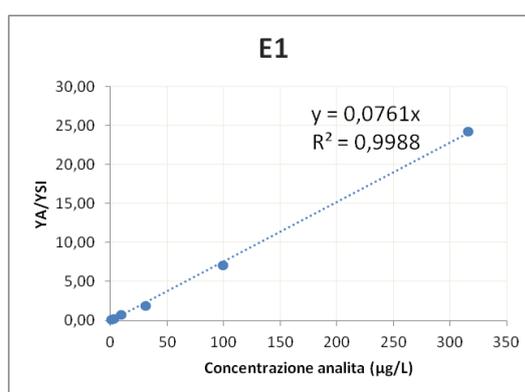
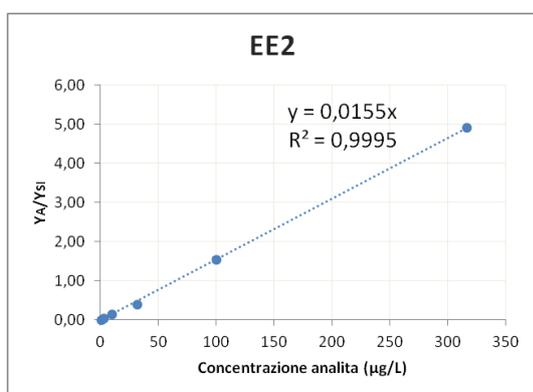
- Y =Area picco analita/Area picco standard interno;
- X =concentrazione di ciascun analita espressa in ng/L;
- a =coefficiente angolare, ovvero la pendenza della retta.

I risultati di concentrazione (X) sono stati espressi in nanogrammi per litro (ng/L), e riportati con una cifra significativa per concentrazioni ≥ 100 ng/L e con due cifre significative per concentrazioni < 100 ng/L.

Nel dettaglio, per la costruzione delle rette di calibrazione ci si è avvalsi di campioni di acqua Milli-Q opportunamente contaminati mediante quantità variabili di ciascun analita (standard non marcati) e una quantità fissa di soluzione di standard marcati (60 $\mu\text{g/L}$). Le concentrazioni di calibrazione scelte, relative alla soluzione di standard di non marcati, risultano essere: 1 - 3,16 - 10 - 31,6 - 100 - 316 $\mu\text{g/L}$.

Infine, è stata determinata la corrispondenza biunivoca tra i rapporti delle aree dei picchi cromatografici e le concentrazioni di calibrazione note introdotte in HPLC/MS/MS. La linearità della variazione del segnale (Y_a/Y_{si}) è stata riscontrata per ogni analita, lungo l'intera estensione del range di concentrazioni testate, restituendo coefficienti di correlazione R^2 a partire da 0,9941.

Di seguito sono riportate le rette di calibrazione costruite con il metodo dei minimi quadrati relative ai nostri campioni (Figura 3.16). Per l'analisi spettrometrica delle 10 sostanze analizzate, sono stati utilizzati soltanto 5 standard interni, il che significa che ciascuno standard interno è stato impiegato per la quantificazione di più analiti. In particolare: per la quantificazione degli estrogeni (E1, E2, EE2), ci si è riferiti all'area del picco cromatografico di β -estradiolo- d_3 ; l'area del picco cromatografico di otilfenolo, nonilfenolo e BPA è stata rapportata a quella di bisfenolo-A d_6 ; i segnali di PFOA e PFOS sono stati rapportati a quello di PFOA- ^{13}C ; infine, Diclofenac e Ibuprofene sono stati quantificati rispetto al segnale di Ibuprofen- d_3 .



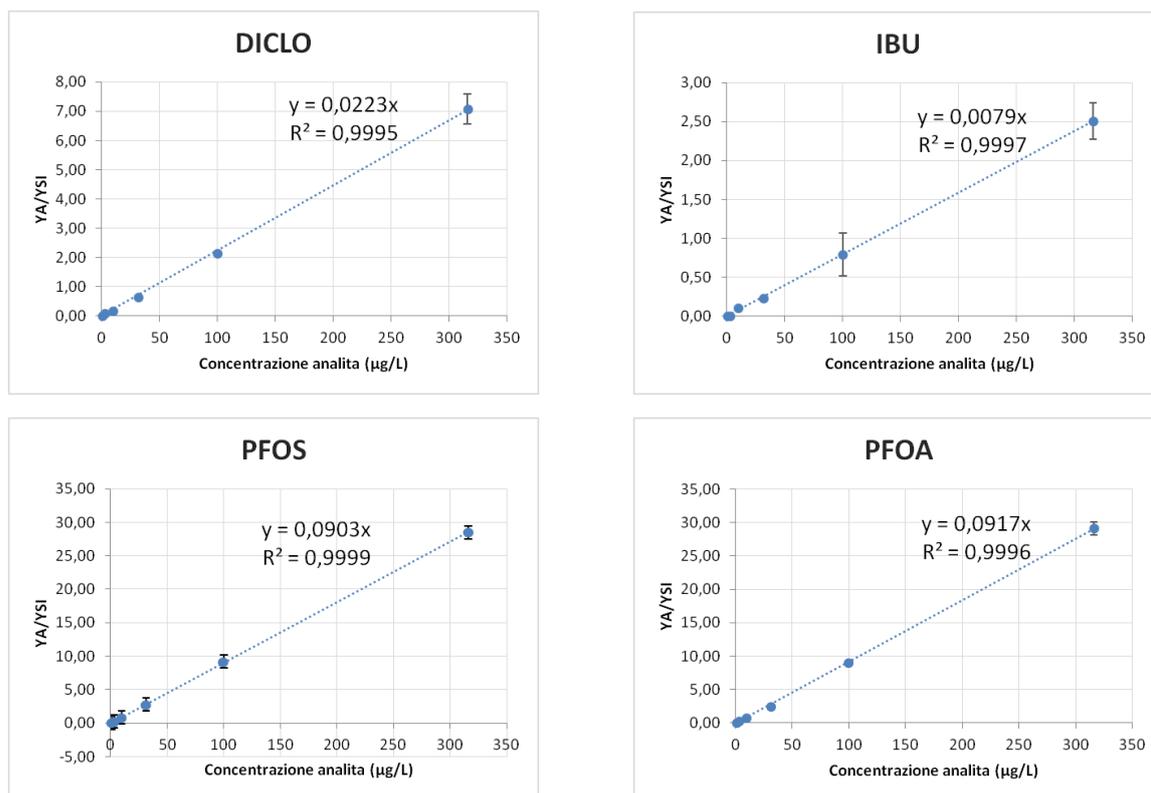


Figura 3.16 Rette di calibrazione costruite con il metodo dei minimi quadrati

3.3.4 Validazione del metodo LC/MS/MS

Il metodo è stato validato in termini di specificità (selettività), precisione (ripetibilità e riproducibilità) e linearità, mediante prove di laboratorio condotte presso il laboratori di Fisiologia e Biochimica Ambientale di Ravenna. Si è provveduto inoltre alla valutazione dei LOD (Limit Of Detection) e dei LOQ (Limit Of Quantification) associati ai singoli analiti ricercati. Di seguito sarà riportata una delucidazione della terminologia impiegata.

- **Selettività.** Per selettività viene intesa la capacità del metodo di originare una diversa risposta per l'analita e gli altri componenti della matrice di indagine, di modo da poter distinguere ciò che è di interesse da ciò che non lo è. Detto parametro risulta essere irrinunciabile nel caso si vogliono condurre, come in questo caso, analisi di tipo quantitativo, ovvero determinare la quantità precisa di una o più molecole di interesse. Questa inoltre può essere migliorata sia andando a rimuovere eventuali interferenti durante le varie fasi del metodo (SPE, HPLC, spettrometria di massa) che, come in detto caso, mediante l'utilizzo di uno spettrometro di massa MS tandem con modalità di acquisizione MRM, nel quale il doppio stadio di selezione della transizione

ionica scelta (ione parent nel primo quadrupolo e ioni figli nel terzo) va ad incrementare la sicurezza di determinare la sostanza indagata;

- Precisione strumentale. Viene espressa come ripetibilità intra-laboratorio, ed è valutata mediante ripetute iniezioni (n repliche=3) di miscele di standard (marcati e non) a diverse concentrazioni. Per ciascun analita sono state ricavate le deviazioni standard relative (RSD%) strumentali, le quali forniscono una misura relativa all'errore casuale che può essere associato a ciascun valore di concentrazione ottenuto, evidenziando inoltre la distribuzione dei risultati delle varie repliche rispetto alla loro media. I valori di RSD% strumentale, riportati in Tabella 3.5, sono stati valutati alla concentrazione di standard pari a 10 µg/L e restano generalmente al di sotto del 20%

$$RSD\% = \frac{\text{deviazione standard}}{Xm} \times 100$$

- Linearità e sensibilità del metodo. Lo strumento che rende possibile la concentrazione di analita presente nella matrice di interesse deve mostrarsi in grado di presentare una corrispondenza biunivoca tra quantità (o concentrazione se la si rapporta al volume in ingresso per ogni analisi) e segnale fornito. Questo deve accadere per un range che copra svariati ordini di grandezza (intervallo dinamico di linearità) o, per lo meno, per l'intervallo di concentrazioni atteso per i campioni. L'intervallo di linearità del metodo è stato definito considerando sia il contributo strumentale che quello del metodo estrattivo. Per la valutazione di questi parametri sono stati utilizzati campioni utilizzati per la calibrazione, contaminati con quantità variabili di ciascun analita e una quantità fissa di soluzione di standard marcati (60 µg/L). La valutazione dei risultati è stata poi effettuata secondo quanto riportato per la costruzione della curva di taratura. Il metodo analitico è risultato sufficientemente lineare per tutto l'intervallo di concentrazioni considerato (da 1 a 316 µg/L), con un valore di R² (coefficiente di regressione) tra 0,9941 e 0,999 per tutta la gamma di composti analizzati, indicando un'ottima correlazione tra segnale e concentrazione.
- Limite di rivelazione (LOD). I limiti di rivelabilità rappresentano la più bassa concentrazione di analita che può essere rivelata in un campione nelle condizioni sperimentali del metodo, ma non necessariamente quantificata. In altre parole è la minima concentrazione di analita in grado di produrre un

segnale significativamente diverso da quello del bianco (almeno tre volte maggiore del rumore di fondo). Il LOD strumentale è stato calcolato sugli standard utilizzati per la calibrazione, quindi contaminati artificialmente con quantità note di analiti. In particolare, essi sono stati determinati su quegli standard che presentavano la transizione ione precursore>ione frammento con il rapporto S/N più piccolo ottenuto nelle analisi e per ogni analita sono stati espressi come quelle concentrazioni ($\mu\text{g/L}$) associate ad un rapporto S/N = 3 e calcolate come media dei valori ottenuti per le n=3 repliche del medesimo standard:

$$X_{LOD} = \frac{X_A \times 3}{(S/N)_A}$$

Dove X_{LOD} è la minima concentrazione di analita che riesce ad essere rivelata; X_A è la concentrazione nota di analita presente nello standard; 3 è il rapporto S/N associato a X_{LOD} ; $(S/N)_A$ è il rapporto S/N relativo alla transizione ione precursore>ione frammento. In questo lavoro di tesi i valori di LOD sono espressi in termini di pg iniettati (anzi che in forma di concentrazione) considerando che il volume di campione iniettata ad ogni corsa cromatografica è pari a 20 μL .

- Limiti di quantificazione (LOQ). Tale limite è associato alla minima concentrazione di analita in un campione sperimentale che può essere determinata quantitativamente con accuratezza e precisione. A differenza dei LOD strumentali, la cui determinazione è stata effettuata sugli standard utilizzati per la calibrazione, per il calcolo dei LOQ sono stati impiegati campioni sperimentali, quindi matrici ambientali, nei quali gli analiti erano già presenti oppure, quando assenti, sono stati addizionati in matrice. In particolare, per ogni analita sono stati individuati quei campioni sperimentali (almeno 3) nei quali la transazione ione precursore > ione frammento, seppur presente, era associata ad un picco cromatografico il più piccolo possibile (con un rapporto S/N il più vicino possibile a 10). I LOQ sono quindi stati determinati sulla base del rapporto S/N = 10, calcolate per ciascun analita come media dei valori ottenuti per gli n=3 campioni sperimentali individuati.

$$X_{LOQ} = \frac{X_A \times 10}{(S/N)_A}$$

Dove X_{LOQ} la minima concentrazione di analita che possa essere quantificata; X_A è la concentrazione (rilevata con lo strumento) con cui è presente l'analita

in quel campione sperimentale; $(S/N)_A$ è il rapporto segnale rumore associato a quella specifica concentrazione e 10 è il rapporto segnale rumore associato a X_{LOQ} .

Analita	RSD%	LOD strumentale (pg iniettati)	LOQ (ng/L)
17- α -etinilestradiolo	21,94	41	2,66
Estrone	14,80	9	0,92
17- β -estradiolo	8,72	15	2,35
Bisfenolo A	4,29	9	0,99
Nonilfenolo	3,08	5	2,05
4-octilfenolo	12,90	13	0,66
Ibuprofene	9,24	24	1,96
Diclofenac	13,57	6	0,51
PFOS	5,23	2	0,08
PFOA	2,92	1	0,07

Tabella 3.5 Valori di RSD%, LOD strumentale (Limit Of Detection) e LOQ (Limit Of Quantification)

3.4 Analisi biologiche: E-SCREEN e test dei micronuclei

A livello internazionale è stata definita la necessità di identificare e caratterizzare l'attività endocrina di 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 e che possono avere sull'uomo, 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* ed *in vivo* 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 di azione biologica è fondamentale per collegare gli effetti osservati nei sistemi sperimentali con potenziali ricadute sulla salute umana e valutare 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*.

In linea generale può essere affermato che ogni test *in vitro* presenta vantaggi e limiti. La maggior parte delle linee cellulari derivate da tumori mammari (adenocarcinomi) esprimono sia i recettori α che β , e possono quindi essere

responsive ad un'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 ed 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. In quanto cellule di mammifero, il vantaggio è che risultano complete di un sistema metabolico in grado di detossificare o rendere più tossico un composto o una miscela riproducendo quanto avviene in natura. 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.

Nell'ambito di tale lavoro di tesi sono stati applicati due differenti bioassays: l'Escreen assay (Cell Proliferation Assay) al fine di valutare la potenziale attività estrogenica di miscele complesse di composti chimici presenti negli estratti delle acque, ed il test dei micronuclei (MN) al fine di verificare la capacità di interferire con il corretto processo di divisione da parte dei metaboliti degli IE selezionati. Per entrambi i test sono state impiegate linee cellulari MCF7 di adenocarcinoma mammario.

Risulta 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.

3.4.1 Linee cellulari MCF7 di adenocarcinoma mammario

La linea cellulare MCF7 è una linea epiteliale di carcinoma mammario umano, isolata nel 1970 da una donna americana Caucasica di 69 anni. MCF7 è l'acronimo di Michigan Cancer Foundation 7, istituto di Detroit (USA) e ora meglio conosciuto come il Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, dove la linea cellulare è stata coltivata e linearizzata nel 1973 da Herbert Soule e i suoi

collaboratori. Prima di ottenere la linea cellulare MCF7 era cosa impensabile per un ricercatore nel campo della ricerca oncologica ottenere una linea di cellule mammarie in grado di sopravvivere in coltura cellulare abbastanza a lungo da poter completare degli esperimenti di laboratorio *in vitro*. Le cellule della paziente dalla quale è stata originata la linea cellulare MCF7 sono all'origine di tutte scoperte e attuali conoscenze riguardanti il tumore mammario.

Le caratteristiche principali delle MCF7 sono quelle di essere un tumore primario con le potenzialità di un carcinoma invasivo, originate da effusione pleurale (Soule et al., 1973) con:

- presenza di recettori per gli estrogeni (ER);
- risposta proliferativa positiva agli estrogeni;
- presenza di recettori progestinici;
- potenziale tumorigenicità nel topo da esperimento in presenza di supplemento estrogeno;
- fenotipo di cellula epiteliale luminare.

Questa linea cellulare possiede diverse caratteristiche delle cellule dell'epitelio mammario differenziato, compresa la capacità di metabolizzare l'E2 grazie alla presenza di recettori ER citoplasmatici. Le cellule MCF7 esprimono infatti entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni ER α e ER β e sono per questo motivo in grado di evidenziare, in maniera dose dipendente, attività di tipo agonista, ovvero induzione alla proliferazione cellulare in risposta agli estrogeni, ma anche antagonista e quindi antiproliferativa, sia attraverso meccanismi genomici che non genomici.

Per le caratteristiche sopra citate, la linea cellulare MCF7 è ritenuta attualmente una linea cellulare di controllo positiva dei recettori ER che offre delle indiscusse potenzialità per indagare i complessi meccanismi che regolano le interazioni tra i recettori ER e le numerose molecole ad attività estrogenica, diffuse in ambiente in modo ubiquitario.

L'entità della proliferazione cellulare, indotta attraverso meccanismi sia genomici che non genomici, dall'esposizione di queste cellule ad estrogeni naturali (E1, E2), sintetici (EE2) o altri IE ad azione estrogenica può infatti essere facilmente misurata attraverso la costruzione di curve dose-risposta, esponendo le cellule a concentrazioni sempre crescenti di una medesima molecola, in condizioni sperimentali che rispecchiano il più possibile scenari di esposizione ambientale. Quando vengono allestite colture cellulari *in vitro*, esse sono in grado di formare

dei tappeti monostratificati di cellule di natura epiteliale la cui crescita può essere inibita mediante trattamenti con anti-estrogeni.

3.4.1.1 Congelamento e scongelamento delle linee cellulari

Il congelamento di una linea cellulare viene realizzato per garantire la conservazione delle cellule ad un determinato stadio della loro vita, al fine di avere sempre a disposizione delle colture *in vitro* con caratteristiche cellulari originali che potrebbero altrimenti variare in seguito ad un mantenimento prolungato in coltura. Si tratta di una tecnica particolarmente delicata, da eseguire periodicamente ogni due o tre mesi e che potrebbe danneggiare o stressare le cellule se non eseguita in modo adeguato. Per il congelamento viene utilizzato un siero bovino fetale al quale viene addizionato DMSO (dimetilsolfossido) al 10%, un agente crioprotettivo che impedisce alle cellule di subire danni da shock termico. Le cellule in sospensione verranno allora trasferite in fiale crioresistenti, le quali saranno a loro volta posizionate all'interno di contenitori in polistirolo, allo scopo di garantirne un congelamento graduale, conservate in congelatore ad una temperatura di -80 °C, non oltre ai sei mesi di tempo.

Lo scongelamento della linea cellulare, al contrario del congelamento, risulta una procedura che deve essere svolta molto rapidamente al fine di evitare alle cellule uno shock che potrebbe portare alla loro morte. Lo scongelamento avviene mettendo le fiale crioresistenti in bagnetto termostato a 37 °C per pochi minuti. Successivamente la sospensione di cellule sarà trasferita in una fiasca vuota alla quale saranno aggiunti 20 mL di mezzo completo, goccia a goccia, di modo da evitare il verificarsi di stress osmotico. La piastra sarà quindi mantenuta in incubatore per 24 ore, di modo da permettere alle cellule di aderire alla sua superficie. Infine, il terreno verrà eliminato e sostituito con un nuovo terreno fresco completo al fine di eliminare completamente il DMSO aggiunto durante la fase di congelamento.

3.4.1.2 Allestimento delle colture cellulari MCF7 *in vitro*

3.4.1.2.1 Preparazione del mezzo completo

Il terreno base di coltura utilizzato nell'ambito di tale lavoro di tesi è risultato essere il DMEM (Dulbecco's Modification of MEM) il quale, conservato a 4 °C, prima di essere utilizzato verrà opportunamente completato con:

- glutammina (amminoacido essenziale molto labile);
- antibiotici (penicillina/streptomicina);
- gentamicina;
- amminoacidi non essenziali;
- tampone Hepes;
- sodio piruvato;
- siero fetale di bovino (FBS).

Per quanto riguarda il siero, esso contiene una miscela complessa di proteine ed elementi fondamentali per la crescita *in vitro* della maggior parte delle cellule, come fattori di crescita (PDGF, EGF, IGF), fattori di adesione (fibronectina, vitronectina) ed altri elementi tra cui transferrina, albumina, colesterolo, acidi grassi e glucorticoidi ed elementi minerali. Oltre a proteggere le membrane delle cellule grazie al corretto grado di viscosità e favorire interazioni tra cellule e substrato, il siero svolge anche l'importante funzione di andare ad inibire l'azione della tripsina, in quanto contiene suoi inibitori.

3.4.1.2.2 Condizioni colturali delle cellule MCF7

Le cellule MCF7 sono state coltivate con terreno di coltura, ponendole in fiasche di plastica T75 da 75 cm² (Figura 3.17) ed incubandole ad una temperatura fisiologica di 37 °C in aria umida con il 5% di CO₂. La coltivazione delle cellule *in vitro* è essenziale che avvenga assicurando il mantenimento delle medesime condizioni fisico-chimiche, in quanto all'interno dell'organismo esistono specifici sistemi di controllo atti a regolare le funzioni vitali come nutrizione, controllo del pH, protezione e mantenimento della temperatura. Per questa ragione il terreno di base impiegato per la coltura cellulare consiste in una soluzione isotonica tamponata in grado di fornire tutte le sostanze fondamentali per la sopravvivenza delle cellule. Inoltre, il sistema tampone carbonato/bicarbonato risulta in grado di garantire condizioni di stabilità del pH, che deve mantenersi compreso tra i valori di 7,0 e 7,4, anche durante l'avanzamento della proliferazione cellulare, mediante insufflazione all'interno dell'incubatore di anidride carbonica, fino al raggiungimento di una pressione parziale del 5%. A differenza del terreno impiegato per gli esperimenti, il terreno di coltura contiene al suo interno un indicatore di pH, chiamato rosso fenolo, il quale permetterà di avere un controllo visivo dello stato del pH durante la fase di crescita delle cellule, consentendo così di verificare nell'immediato se all'interno del terreno si stiano verificando

variazioni di pH eccessive. Esso si mantiene di colore rosso in condizioni di neutralità, mentre si sposterà verso un giallo/arancione o verso un colore viola nel caso in cui l'ambiente di coltura stia diventando, rispettivamente, troppo acido o troppo alcalino. Per quanto riguarda la temperatura, essa dovrà mantenersi attorno ai 37°C, consistente in un valore ottimale per la crescita delle cellule di mammifero.



Figura 3.17 Fiasca di coltura T75

L'ambiente fisico necessario alla crescita *in vitro* verrà fornito dall'incubatore, uno strumento in grado di mantenere temperatura e atmosfera controllate. Le cellule coltivate *in vitro* richiedono infatti un controllo della temperatura rigoroso, come anche per la pressione parziale di CO₂, che deve essere il più possibile vicina a quella misurata all'interno dei tessuti (35-45 mmHg, pari al 4,6-5,9% di CO₂). Proprio per questo motivo l'atmosfera all'interno degli incubatori è costituita dal 95% di aria e dal 5% di CO₂.

3.4.1.2.3 Controllo della sterilità

Le colture cellulari sono sistemi estremamente sensibili e, per maneggiarle, occorrono specifiche competenze e strumentazione in grado di garantire la sterilità. Tutte le attività che richiedono la manipolazione della coltura sono allora state svolte sotto cappa a flusso laminare verticale (Figura 3.18), nella quale l'aria proveniente dall'esterno viene filtrata, di modo da trattenere particelle contaminanti, e poi spinta dal flusso laminare e da una pressione positiva per attraversare lo spazio di lavoro in senso verticale dall'alto al basso. Questo sistema garantisce il mantenimento, nello spazio di lavoro, di aria sterile.

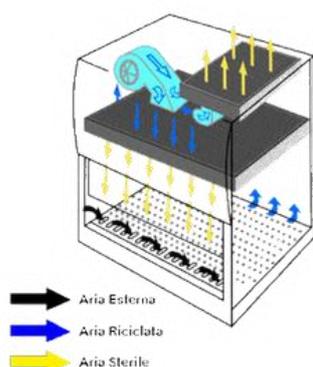


Figura 3.18 Principio di funzionamento di una cappa a flusso laminare verticale

Oltre a questo, anche tutti i materiali di contatto cellulare devono risultare sterili. Nel presente lavoro di tesi è stato impiegato del materiale plastico sterile usa e getta, oppure materiale sterilizzato con calore umido mediante l'utilizzo dell'autoclave a 121 °C per almeno 15 minuti, tecnica particolarmente indicata per mezzi liquidi non sensibili al calore, non che per la vetreria di laboratorio.

Sono state inoltre impiegate delle soluzioni di lavoro opportunamente filtrate mediante filtri da 0,22 µm. Le contaminazioni che colpiscono più comunemente una coltura cellulare sono infatti quelle dovute a microrganismi, come batteri e micoplasmi, ma anche lieviti e muffe. La contaminazione batterica risulta un evento facile da riconoscere, in quanto provoca un'irreversibile e repentina acidificazione e intorbidimento del terreno di coltura, che dovrà essere eliminata. Le infezioni da organismi intracellulari, come i micoplasmi, risultano invece meno evidenti e, almeno nelle prime fasi, non interferiscono con la vitalità cellulare. Anche per questo motivo può risultare allora opportuno intervenire con antibiotici nel tentativo di debellare il contaminante.

3.4.1.2.4 Tripsinizzazione della coltura cellulare

Le cellule MCF7 sono cellule aderenti che derivano da tessuto solido e, come tali, per vivere ed accrescersi necessitano di aderire ad un opportuno supporto solido. Nel corso degli esperimenti, tale supporto può essere rappresentato dal fondo delle fiasche, delle piastre e delle capsule petri, tutti dotati di supporto in polistirene che facilita l'adesione delle cellule. La superficie così trattata è infatti in grado di legare in modo stabile, ma non covalente, i fattori di adesione presenti nel FBS, come la vitronectina e la fibronectina.

Nel corso della coltura cellulare, che come già detto si verifica a precise condizioni di temperatura e pH, le cellule continueranno a proliferare fino a che lo spazio a loro disposizione non sarà esaurito, e queste si ritroveranno a confluenza, ovvero nella condizione in cui le cellule formano un unico strato che ricopre interamente la superficie di adesione. Sia per poter essere contate che per mandare avanti la coltura cellulare in coltura, sarà allora necessario un periodico distacco di tali cellule dalla parete della fiasca di coltura alla quale sono adese.

Il metodo impiegato per favorire tale distacco è quello della tripsinizzazione, un procedimento consistente nel far reagire le cellule con tripsina, un enzima proteolitico capace di degradare le proteine di adesione della matrice che

mantiene le cellule aderenti, rompendo i legami tra le singole cellule e quelli che si formano tra le cellule e la parete trattata della fiasca. Questo processo di tripsinizzazione è stato eseguito solo successivamente ad una prima fase di osservazione mediante microscopio invertito, al fine di valutare il grado di confluenza delle cellule. Una volta osservata tale condizione si è allora proceduto al distacco mediante tripsina, seguendo le diverse operazioni elencate di seguito.

- svuotare la piastra dai 20 mL di mezzo completo in cui le cellule sono cresciute fino a quel momento;
- lavare le cellule adese alla parete della fiasca con 10 mL di D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), una soluzione tampone contenente KCl 2,67 Mm, KH_2PO_4 1,47 Mm, NaCl 137,93 Mm, Na_2HPO_4 8,06 Mm, allo scopo di allontanare ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} contenuti nel mezzo completo i quali, se presenti, andrebbero ad inibire l'azione enzimatica della tripsina;
- introdurre nella fiasca 2 mL di soluzione di tripsina EDTA, una sostanza chelante gli ioni calcio e magnesio, sottraendoli alla soluzione di lavoro, a 37 °C, lasciando agire per 5 minuti in incubatore.

La durata della reazione di tripsinizzazione non dovrà superare i 5-6 minuti, trascorsi i quali possono presentarsi effetti tossici sulle cellule. Trascorso questo tempo, inclinando la fiasca, sarà possibile vedere le cellule ormai distaccate scivolare lungo la parete.

L'azione della tripsina viene allora bloccata mediante l'aggiunta di mezzo completo con FBS, contenente appunto degli inibitori della tripsina. Le cellule saranno allora risospese in 20 mL di mezzo completo (2 mL di tripsina + 18 mL di mezzo) per essere poi riseminate in modo più diluito, sempre in 20 mL di mezzo completo, su nuove fiasche T75.

3.4.1.3 Semina per esperimenti

Successivamente alla fase di tripsinizzazione una parte delle cellule viene seminata in piastre da 12 o 24 pozzetti, a seconda del quantitativo di cellule necessario per i saggi. Nell'ambito del presente lavoro di tesi, per il saggio di proliferazione cellulare E-screen sono state impiegate piastre da 24 pozzetti, mentre per il test dei MN piastre da 12 pozzetti.

Nel dettaglio, le piastre da 12 pozzetti sono state seminate aggiungendo:

- 1 mL di sospensione di cellule opportunamente diluite dopo tripsinizzazione;

- 0,5 mL di mezzo completo.

Le piastre da 24 pozzetti sono invece state seminate aggiungendo:

- 500 μ L di sospensione di cellule opportunamente diluite dopo tripsinizzazione;
- 500 μ L di mezzo completo.

Le diluizioni della sospensione cellulare sono tali per cui per il test E-screen vengono seminate circa $0,7 \times 10^4$ cellule per pozzetto, mentre per il test dei MN circa $1,4 \times 10^4$ cellule per pozzetto. Al termine della semina si avvina in modo che le cellule vadano a ricoprire l'intera superficie di adesione di ogni pozzetto, lasciando poi le piastre in incubatore per una durata di 24 ore così da permettere alle cellule di aderire e crescere nelle opportune condizioni.

Trascorse le 24 ore, si passa ad aspirare il terreno di coltura da tutti i pozzetti per sostituirlo con un terreno di coltura per esperimenti (Experimental Medium, EM), il quale differisce dal precedente per due importanti caratteristiche:

- il siero aggiunto al terreno solo al 5%, deve aver subito un trattamento specifico, chiamato charcoal stripping, ovvero con carbone attivato, in grado di ridurre la quantità di ormoni presenti in esso (CS-FBS);
- il DMEM impiegato deve essere privo di rosso fenolo, il quale possiede una debole attività estrogenica che potrebbe andare ad alterare l'attendibilità del risultato (Berthois et al., 1986).

Tali modifiche renderanno il terreno di coltura sperimentale maggiormente adatto ad essere impiegato in esperimenti biologici volti a valutare l'attività estrogenica di una matrice ambientale.

3.4.2 E-screen: cell proliferation assay

Di tutti i test *in vitro* utilizzati per lo screening degli IE ad azione estrogenica/antiestrogenica, il saggio E-screen è quello che 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 anche ad altri mammiferi e vertebrati, data la conservazione dei meccanismi endocrini di base.

Il saggio sfrutta il fatto che le cellule MCF7 mantenute in un mezzo di coltura privo di estrogeni risultano particolarmente sensibili all'aggiunta di E2 o di altre sostanze estrogeniche, le quali inducono proliferazione cellulare. Il saggio

E-screen confronta allora la proliferazione dopo 5 giorni di coltura, in presenza o assenza di diverse concentrazioni di E2 o delle sostanze incognite da testare. La proliferazione può essere poi valutata semplicemente mediante conta cellulare o tramite determinazione della vitalità cellulare mediante l'MTT assay.

La metodica adottata per gli esperimenti eseguiti nell'ambito di tale lavoro di tesi è stata proprio quella dell'MTT assay, in quanto rivela soltanto le cellule vive e metabolicamente attive. Il saggio inoltre risulta estremamente sensibile anche a basse concentrazioni di E2 o di sostanze simil-estrogeniche e, sebbene esso risulti essere riconosciuto universalmente valido ed ampiamente utilizzato in diversi studi di letteratura (Körner et. al., 1998, Bicchi et. al., 2009) in quanto permette di rilevare in tempi brevi e con costi ristretti la presenza di molecole estrogeniche in campioni sperimentali, la sua applicabilità a matrici complesse e/o miscele presenti in ambiente e negli alimenti dovrà essere ulteriormente elaborata al fine di garantirne la replicabilità.

E2 è la molecola di riferimento utilizzata per quantificare le potenzialità estrogeniche dei diversi contaminanti ambientali. La valutazione dell'estrogenicità di ciascun campione d'acqua è stata espressa in termini di effetto proliferativo (PE), calcolato come rapporto tra PE massimo indotto dalla sostanza test ed il controllo in assenza di E2.

Come sostanza antagonista di riferimento, e quindi come controllo positivo dell'attività estrogenica, si è scelto di utilizzare il Tamoxifene (TAMO), principio attivo di un noto farmaco antitumorale che agisce andandosi a legare ai recettori ER e bloccando conseguentemente il legame degli estrogeni, inibendo la proliferazione cellulare. Tale molecola è stata saggiata sulle cellule MCF7 assieme agli estratti di acqua da valutare, al fine di confermare l'eventuale presenza di un agente avente attività estrogenica. Infatti, qualora nelle cellule esposte ai campioni d'acqua venisse evidenziato un aumento significativo del PE, anche le cellule esposte al TAMO non dovrebbero più mostrare questo effetto, ad indicare che l'aumentata proliferazione delle cellule esposte ad acqua campione era realmente correlata ad agenti estrogenici in grado di stabilire legami con i recettori ER.

3.4.2.1 Condizioni di esposizione delle cellule e sviluppo del modello sperimentale *in vitro*

Il saggio E-screen viene effettuato esponendo le cellule MCF7 agli estratti di acqua concentrata (20x). Ogni campione di acqua è stato saggiato in

quadruplicato all'interno di ogni esperimento (4 pozzetti per piastra) al fine di poter prendere in considerazione la variabilità dovuta al saggio biologico, sia in presenza che in assenza di TAMO e di E2. All'interno di ogni esperimento erano inoltre presenti pozzetti di controllo (C), preparati con acqua ultrapura e metanolo nella medesima quantità dei campioni saggiati, i quali rappresentano il valore di PE pari a 1, e pozzetti di cellule coltivate unicamente in EM (Figura 3.19).

Le piastre così preparate sono state allora incubate in atmosfera umida con il 5% di CO₂ a 37 °C per una durata di 5 giorni (tempo di esposizione necessario per rilevare gli effetti estrogenici) al termine dei quali è stato possibile effettuare il test di vitalità dell'MTT.

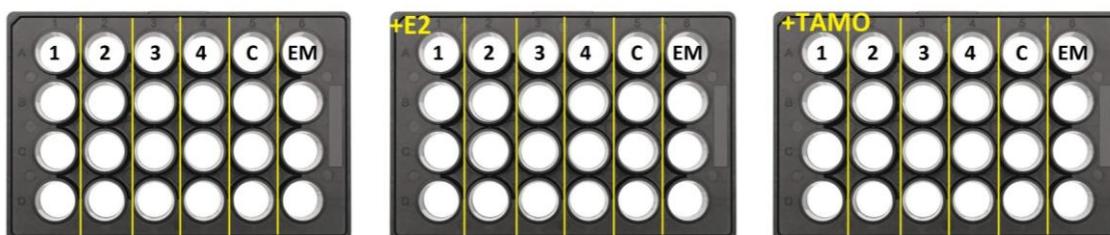


Figura 3.19 E-Screen assay: esempio di schema sperimentale. Le tre piastre rappresentano cellule MCF7 esposte ai campioni d'acqua prelevati (sinistra), con aggiunta di E2 (al centro) e con aggiunta di Tamoxifene (destra). (1) Acqua in ingresso, Luglio 2017; (2) Acqua in uscita, Luglio 2017; (3) Acqua in ingresso, Settembre 2017; (4) Acqua in uscita, Settembre 2017; (C) Controllo con acqua ultrapura e metanolo allo 0,1%; (EM) Cellule coltivate in mezzo per esperimenti senza aggiunta di estratti d'acqua

3.4.2.2 Test di vitalità (MTT assay)

Il test dell'MTT rappresenta un semplice e sensibile test quantitativo colorimetrico impiegato per determinare il numero di cellule vive, ovvero aventi ancora attività mitocondriale, presenti in coltura. Il test si basa sull'impiego di un indicatore metabolico, l'MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2-5difeniltetrazolio bromuro), un sale solubile di tetrazolio di colore giallo che, nelle cellule vitali, viene ridotto nel mitocondrio ad opera dell'enzima succinato deidrogenasi, a formare un cristallo (formazano) insolubile in acqua di colore viola. Tale conversione fornisce allora un'indicazione sull'integrità funzionale mitocondriale, infatti la quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura e viene per questo motivo utilizzata come misura della vitalità cellulare. I cristalli solubilizzati sono quantificati con metodo colorimetrico alla lunghezza d'onda di 570 nm (assorbanza del colorante ridotto) con correzione di background a 650 nm. La reazione può avvenire soltanto nelle cellule vive metabolicamente attive e

il valore dell'assorbanza, ottenuto mediante lettura spettrofotometrica, può essere correlata al quantitativo di cellule vitali presenti.

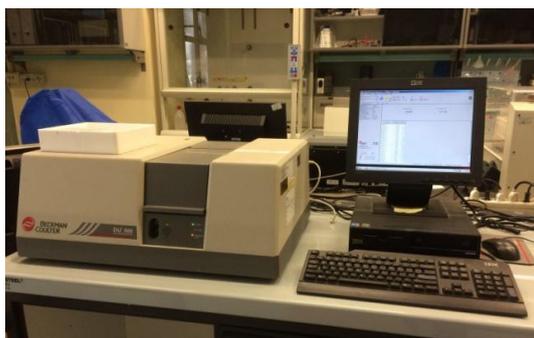


Figura 3.20 Spettrofotometro multicuvetta

Seguendo le indicazioni fornite dal protocollo, l'applicazione dell'MTT test è stata così eseguita:

- i pozzetti in cui sono cresciute le cellule (Figura 3.21) sono svuotati dal mezzo di coltura e addizionati con 0,5 mL di una soluzione di MTT (0,5 mg/mL), ottenuta diluendo 10 volte la soluzione madre (5mg/mL), precedentemente filtrata mediante filtri da 0,20 μm , in DMEM senza rosso fenolo;
- le piastre sono trasferite in incubatore a 37 °C per una durata di 1,5 ore;
- al termine di tale periodo la soluzione di MTT viene rimossa e si aggiunge ad ogni pozzetto 1 mL di isopropanolo acidificato (100 mL di isopropanolo addizionato a 332 μL di HCl al 37%), allo scopo di rompere le membrane cellulari e solubilizzare il formazano;
- infine, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro multicuvetta (DU800, Beckam Coulter) (Figura 3.20), sono effettuate le letture a 570 nm ed a 650 nm, utilizzando come soluzione di riferimento la soluzione di isopropanolo acidificato.

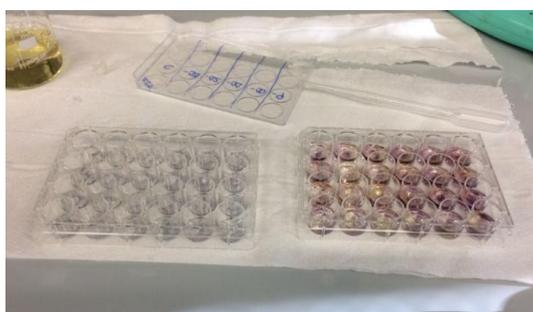


Figura 3.21 Piastre da 24 pozzetti

3.4.3 Test dei MN

Molti composti rilasciati in ambiente, tra cui gli IE, sono potenzialmente genotossici, ovvero in grado di interagire con il materiale genetico direttamente o a seguito di attivazione metabolica, apportando delle modifiche. Il metabolismo cellulare delle sostanze genotossiche è un fenomeno relativamente complesso e

la mancanza di una detossificazione completa può condurre alla formazione di metaboliti elettrofili altamente reattivi, che possono attaccare i centri nucleofili in macromolecole come DNA, lipidi e proteine.

In tale lavoro di tesi, si è provveduto ad esporre le cellule MCF7 a campioni di acqua di interesse, per sottoporle poi al test dei MN, consistente in un test di mutagenesi che permette di identificare, *in vitro*, la potenziale capacità di interferire col processo di mitosi cellulare da parte di IE selezionati presenti nella matrice acquosa. Per micronucleo viene inteso un piccolo nucleo addizionale che si origina nelle cellule nel corso dell'anafase in conseguenza ad un'anomala divisione mitotica nella quale si verifica la perdita di uno o più frammenti cromosomici acentrici, ovvero privi di centromero, o di un cromosoma intero. In entrambi i casi, comunque, sia i frammenti che i cromosomi interi non verranno inclusi nel nucleo principale quando questo si formerà.

Osservati al microscopio a fluorescenza, i MN appaiono come piccole porzioni di cromatina al di fuori del nucleo principale di una cellula, e sono morfologicamente identici ad esso, sebbene di dimensioni notevolmente ridotte e rivestiti di membrana nucleare (Evans, 1997) la quale ha lo scopo di proteggere il contenuto dei MN nel citosol e di permettere la replicazione e la trascrizione del DNA micronucleare, che avviene in sincrono con quella del DNA della cellula madre.

Il test dei MN venne messo a punto la prima volta nel 1975 (Schmid, W., 1975) nei linfociti di sangue periferico, ma presentava una serie di limiti qui di seguito elencati.

- una cellula che ha subito un danno al DNA può esprimere tale condizione sotto forma di micronucleo solo se ha completato un ciclo mitotico dopo l'insulto genotossico;
- il livello di MN osservato in una popolazione in divisione dipende dalla proporzione di cellule che si dividono;
- la frequenza di MN diminuisce se la cellula va incontro a più divisioni mitotiche dopo l'insulto genotossico (Castello e Silvestri, 1999).

Per cercare di superare tali limitazioni venne quindi introdotto l'utilizzo della citocalasina B, una tossina inibitrice della citodieresi che consente una più accurata identificazione dei MN in quanto permette il riconoscimento soltanto di quelle cellule che sono andate incontro ad un'unica divisione, rispetto a quelle che non si sono divise affatto o si sono divise due o più volte. Il test dei MN, per la sua estrema semplicità, riproducibilità ed efficacia nel rilevare gli effetti

genotossici nelle cellule esposte è stato inserito nelle linee guida OECD. Tuttavia, in riferimento alle acque potabili, non esiste ancora un protocollo standardizzato che preveda l'applicazione di test *in vitro* su sistemi biologici di interesse.

Per questo motivo, in detto lavoro di tesi si è deciso di proporre il test dei MN quale test biologico da applicare al fine di valutare la genotossicità di matrici acquose. Questo ha portato a seguire un metodo, messo a punto in un precedente lavoro di tesi, che fosse applicabile a campioni d'acqua sperimentali ed adatto ad essere impiegato su cellule MCF7.

3.4.3.1 Condizioni di esposizione delle cellule e sviluppo del modello sperimentale *in vitro*

Ogni esperimento ha previsto il saggio di ciascun campione di acqua in doppio (due pozzetti), dai quali sono stati ricavati rispettivamente due vetrini. All'interno di ogni esperimento, inoltre, erano presenti campioni di controllo preparati con acqua ultrapura e metanolo, nella medesima quantità dei campioni saggiati (Figura 3.22). Trascorse 48 ore in incubatore, si è provveduto al blocco della divisione cellulare aggiungendo ad ogni pozzetto 2 µg/mL di citocalasina B, ottenuta diluendo 1000 volte la soluzione madre in DMSO con EM. Le cellule sono allora state esposte alla citocalasina per 24 ore, al termine delle quali si è potuto procedere all'allestimento dei vetrini (Figura 3.23), come di seguito descritto.

- rimozione del mezzo mediante pipetta Pasteur;
- lavaggio dei pozzetti utilizzando 1 mL di PBS;
- trattamento con 300 µL di tripsina al fine di staccare le cellule dalla superficie di adesione, lasciando agire in incubatore per non oltre 5 minuti;
- aggiunta di 300 µL di mezzo completo al fine di bloccare l'azione della tripsina;
- semina dei vetrini con 300 µL di cellule in sospensione. A partire da un singolo pozzetto potranno essere allestiti due vetrini;
- posizionamento dei vetrini in camera umida e al buio per 15 minuti, seguiti da ulteriori 10 minuti all'aria;
- aggiunta di 200 µL di Carnoy, agente fissativo costituito da metanolo e acido acetico (3:1);

- congelamento in freezer alla temperatura di 20 °C fino al momento dell'analisi al microscopio.

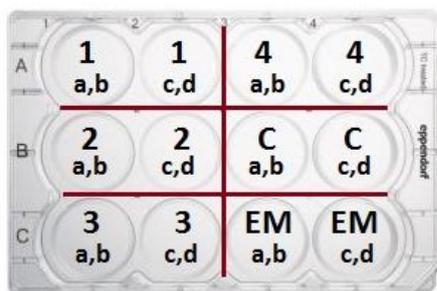


Figura 3.23 Vetrini per test MN

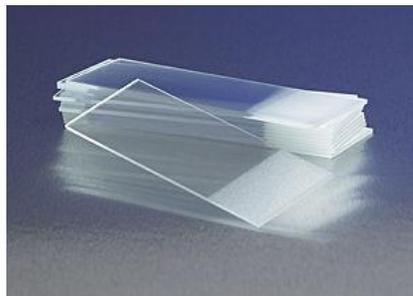


Figura 3.22 Test dei MN: esempio di schema sperimentale. Piastra da 12 pozzetti con (1) Acqua in ingresso, Luglio 2017; (2) Acqua in uscita, Luglio 2017; (3) Acqua in ingresso, Settembre 2017; (4) Acqua in uscita, Settembre 2017; (C) Pozzetti di controllo con acqua ultrapura e metanolo allo 0,1%; (EM) Pozzetti di cellule coltivate in mezzo completo. Da ciascun pozzetto vengono allestiti due vetrini (a,b), (c,d).

I vetrini così preparati sono individuati mediante una sigla o un codice di riferimento che garantisce univocità. Prima di proseguire con l'analisi in microscopia a fluorescenza, si provvede alla colorazione dei vetrini mediante l'impiego del DAPI (4', 6-diamidin-2-fenilindolo), un colorante organico fluorescente in grado di legarsi fortemente a specifiche regioni di DNA ricche in sequenze A-T. La fluorescenza emessa nel blu da parte del colorante DAPI permetterà allora di evidenziare il nucleo delle cellule, rendendolo visibile al microscopio a fluorescenza, il quale è dotato di un'apposita lampada a vapori di mercurio. Per una corretta colorazione è stato necessario avere cura di ricoprire l'intera superficie del vetrino con 200 μ L di soluzione DAPI (250 ng/mL), ottenuta a partire da una soluzione madre concentrata, conservata in freezer. Dopo aver fatto agire il DAPI per 5 minuti al buio, si è infine provveduto a due operazioni di risciacquo dei vetrini in acqua deionizzata, lasciando infine asciugare i vetrini sotto cappa aspirante.

3.4.3.2 Analisi in microscopia a fluorescenza

L'analisi è stata condotta con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza (Nikon "Eclipse" Mod. 80), sfruttando l'elevata capacità di risoluzione di un obiettivo ad immersione 100x. Il termine "ad immersione" viene giustificato dal fatto che l'obiettivo, adeguatamente progettato allo scopo, lavora correttamente quando a contatto con una piccola goccia di olio, interposta tra l'obiettivo ed il preparato da osservare. In tali condizioni è possibile aumentare sensibilmente la capacità di

risoluzione dell'obiettivo, dal momento che la goccia d'olio consente la formazione di un canale unico tra il vetrino e l'obiettivo, dove la luce non verrà dispersa per riflessioni indesiderate.

Per quanto riguarda l'indagine genotossica, il metodo ha previsto l'osservazione, per ogni vetrino, di almeno 1000 cellule con citoplasma integro (Figura 3.24). Per il riconoscimento dei MN ci si è affidati a criteri standardizzati ben precisi, qui di seguito elencati.

- il diametro dei MN deve essere inferiore di 1/3 del diametro del nucleo principale;
- devono essere sullo stesso piano ottico del nucleo principale;
- possono essere sia tondi che ovali;
- non devono essere connessi al nucleo, ma staccati da esso;
- possono toccarsi, ma non sovrapporsi tra loro e devono avere confini ben definiti;
- la struttura della cromatina deve essere simile a quella del nucleo principale.

L'esistenza di tali regole non porta comunque ad escludere la possibilità di incorrere in errori di valutazione, dal momento che la lettura al microscopio risente molto spesso di interpretazioni soggettive che potranno essere ridotte solo con la maturata esperienza dell'operatore nella lettura dei vetrini.

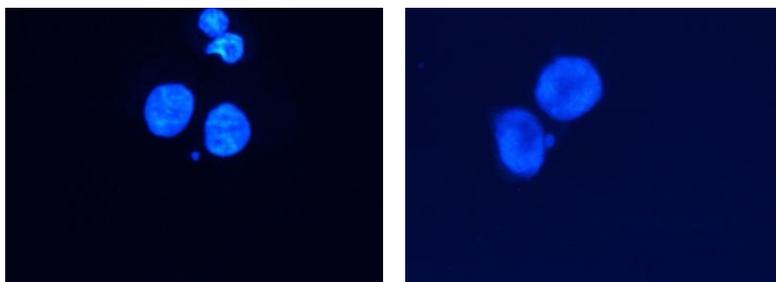


Figura 3.24 Esempi di MN visualizzati con l'obiettivo ad immersione (100×)

3.4.4 Analisi statistica dei dati biologici

Per effettuare i saggi biologici, per ogni sito campionato sono stati utilizzati due campioni da 1 L di acqua, processati in modo indipendente e saggiando ciascun eluato in quattro e otto esperimenti indipendenti, rispettivamente per il test dei MN e per l'E-screen.

Per quanto riguarda l'E-screen assay, i risultati degli esperimenti sono espressi in termini di PE, rispetto al controllo (PE=1), come media \pm errore standard (ES), e sono ricavati da 8 esperimenti indipendenti (N=8), in ciascuno dei quali ogni campione è stato saggiato in quadruplicato (4 pozzetti per ogni piastra). I risultati degli esperimenti del test dei MN sono invece espressi come media \pm deviazione

standard (DS), e sono stati ricavati da 4 esperimenti indipendenti, ovvero dalla lettura in microscopio a fluorescenza di 4 vetrini (N=4). La significatività dei risultati è stata infine valutata grazie al programma Sigma Plot (ver 13, Systat Software Inc.) mediante il test statistico ANOVA (Analysis of Variance) ad una via, seguita da test di Dunnett. Le differenze tra i dati sono state considerate significative per valori di $p < 0,05$.

4. Risultati

4.1 Valutazione della concentrazione di IE nei campioni di acqua saggiati: risultati delle analisi chimiche (LC/MS/MS)

Le Tabelle 4.1 e 4.2 riportano i risultati conseguiti mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC/MS/MS) per quanto riguarda le due campagne di campionamento eseguite a Luglio e Settembre 2017.

CAMPIONI	DATA	ANALITA				
		PFOS	PFOA	Bisfenolo A	Nonilfenolo	4-Octilfenolo
CER	13/07/2017	0,66	5,64	10,49	9,86	< 0,66
INGRESSO	10/07/2017	1,03	5,54	3,62	7,09	1,75
PREOSSIDAZIONE	10/07/2017	1,22	5,78	2,00	6,91	0,81
FLOCCULAZIONE	10/07/2017	1,12	5,08	2,39	23,78	< 0,66
ULTRAFILTRAZIONE	10/07/2017	0,67	5,23	6,24	17,95	< 0,66
USCITA	10/07/2017	0,26	5,89	1,42	28,94	< 0,66
CER	13/09/2017	1,03	7,12	99,57	93,52	< 0,66
INGRESSO	12/09/2017	1,67	8,43	2,23	22,72	< 0,66
PREOSSIDAZIONE	12/09/2017	2,04	11,20	2,46	39,72	< 0,66
FLOCCULAZIONE	12/09/2017	1,51	9,18	2,87	14,58	< 0,66
ULTRAFILTRAZIONE	12/09/2017	0,43	8,73	3,92	19,66	< 0,66
USCITA	12/09/2017	0,28	7,51	1,64	15,15	< 0,66
LOQ		0,08	0,07	0,99	2,05	0,66

Tabella 4.1 Concentrazione di PFOA, PFOS, BPA, nonilfenolo e 4-octilfenolo nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017 e rispettivi LOQ. I risultati sono espressi come ng/L e derivano dalla media di N=3 repliche strumentali.

CAMPIONI	DATA	ANALITA				
		17-beta-Estradiolo	Estrone	17-alfa-etinilestradiolo	Ibuprofene	Diclofenac
CER	13/07/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	2,69
INGRESSO	10/07/2017	<2,35	1,16	<2,66	< 1,96	< 0,51
PREOSSIDAZIONE	10/07/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
FLOCCULAZIONE	10/07/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
ULTRAFILTRAZIONE	10/07/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	4,72
USCITA	10/07/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	3,65
CER	13/09/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
INGRESSO	12/09/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	4,08
PREOSSIDAZIONE	12/09/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
FLOCCULAZIONE	12/09/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
ULTRAFILTRAZIONE	12/09/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
USCITA	12/09/2017	<2,35	< 0,92	<2,66	< 1,96	< 0,51
LOQ		2,35	0,92	2,66	1,96	0,51

Tabella 4.2 Concentrazione di E2, E1, EE2, Ibuprofene e Diclofenac nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017 e rispettivi LOQ. I risultati sono espressi come ng/L e derivano dalla media di N=3 repliche strumentali

La Tabella 4.1 è relativa alla concentrazione di composti perfluorati (PFOA, PFOS), BPA e alchilfenoli (nonilfenolo, 4-octilfenolo), mentre la Tabella 4.2 riporta la concentrazione di estrogeni (E2, E1, EE2) e di farmaci anti-infiammatori non steroidei (Ibuprofene, Diclofenac). Per ogni composto sono riportati inoltre i rispettivi valori di LOQ (Limit Of Quantification).

I risultati relativi a PFOA, PFOS, BPA e nonilfenolo sono stati rappresentati graficamente, riportando le concentrazioni in ingresso (IN) e in uscita (OUT) al potabilizzatore, non che nelle fasi intermedie del potabilizzatore stesso: preossidazione (PREOX), flocculazione (FLOCC) e ultrafiltrazione (ULTRA). Questo al fine di individuare eventualmente quale trattamento fosse efficace nell'abbattimento degli IE considerati.

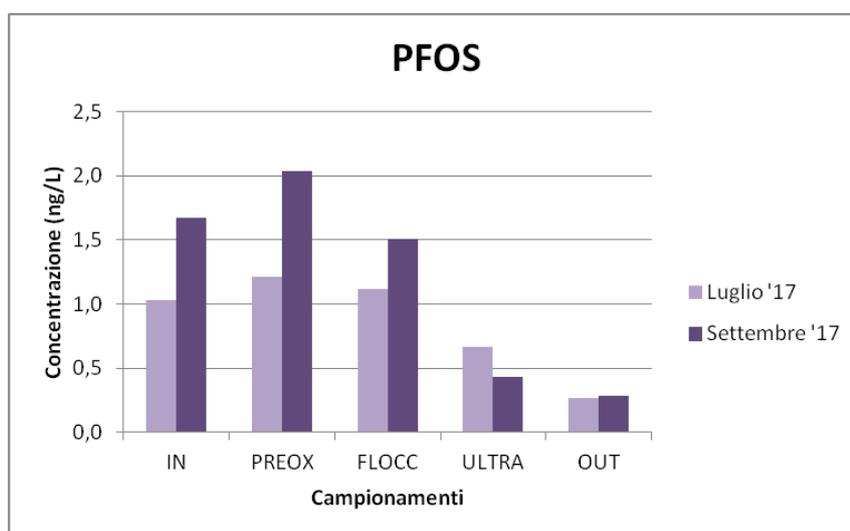


Figura 4.1 Concentrazione di PFOS (ng/L) dall'ingresso all'uscita del potabilizzatore nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017.

Osservando la Figura 4.1 si può notare che i PFOS sono stati rilevati nelle acque grezze in ingresso del potabilizzatore in entrambi i periodi di campionamento, con concentrazioni rispettivamente pari a 1,03 ng/L nel mese di Luglio e 1,67 ng/L nel mese di Settembre. In entrambe le campagne di campionamento il potabilizzatore ha mostrato una buona efficacia di abbattimento, anche se non totale, in quanto le concentrazioni di PFOS diminuiscono in parte dopo passaggio dell'ultrafiltrazione e in parte in prossimità dell'uscita del potabilizzatore. L'acqua in uscita nelle due campagne di campionamento mostra livelli residui di PFOS del tutto simili, pari a 0,26 ng/L nel mese di Luglio e a 0,28 ng/L nel mese di Settembre.

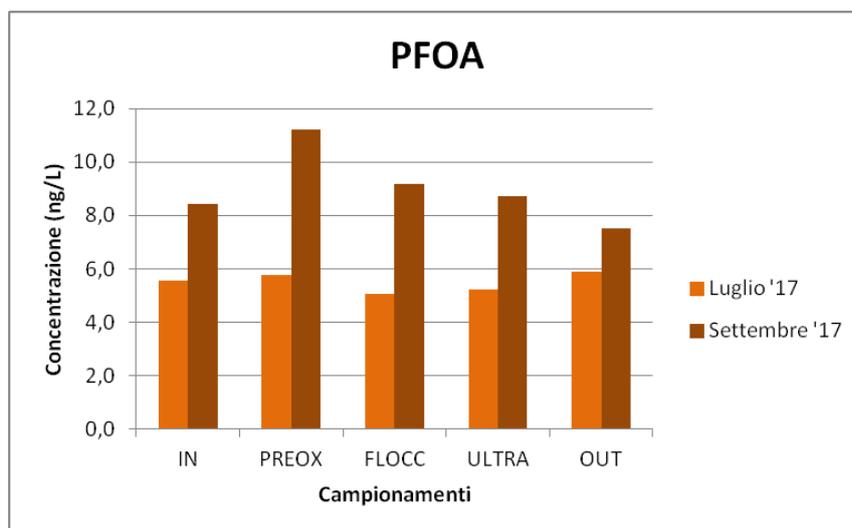


Figura 4.2 Concentrazione di PFOA (ng/L) dall'ingresso all'uscita del potabilizzatore nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017.

Per quanto riguarda i PFOA, osservando la Figura 4.2 si può notare come questi siano stati rilevati, in entrambe le campagne di campionamento, sia in ingresso che in uscita al potabilizzatore in misura sostanzialmente invariata. Le concentrazioni di PFOA tendono infatti a rimanere costanti, senza riscontrare alcun tipo di decremento all'interno dell'impianto di potabilizzazione, andando da una concentrazione in ingresso di 5,54 ng/L a una concentrazione in uscita di 5,89 ng/L nel mese di Luglio e da 8,43 ng/L a 7,51 ng/L nel mese di Settembre.

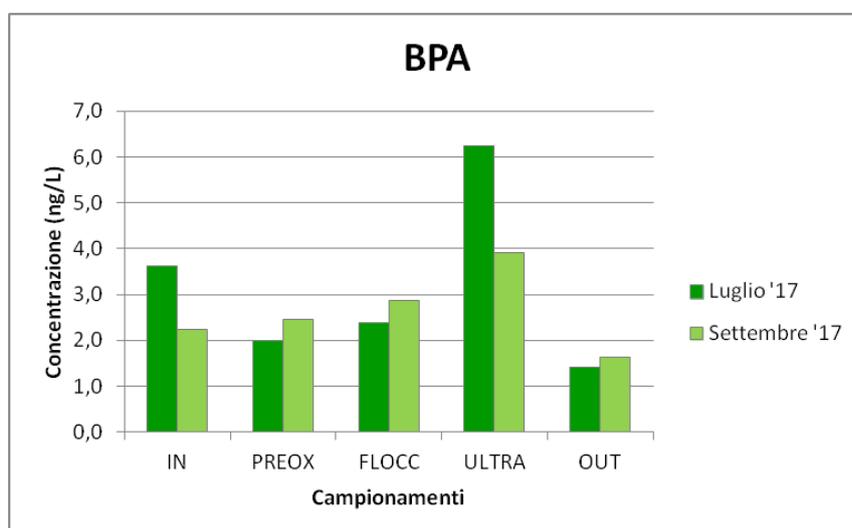


Figura 4.3 Concentrazione di BPA (ng/L) dall'ingresso all'uscita del potabilizzatore nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017.

Un altro composto rilevato sia in ingresso che in uscita al potabilizzatore è il BPA (Figura 4.3) che, a differenza di PFOA, risulta parzialmente abbattuto in seguito al processo di potabilizzazione. Ancora una volta i livelli di IE rilevati nelle due campagne di campionamento mostrano andamenti simili, con la particolarità che

questa volta il passaggio dell'ultrafiltrazione sembra contribuire ad un aumento dei livelli di BPA, che viene poi efficacemente abbattuto prima dell'uscita dal potabilizzatore, presumibilmente grazie al trattamento con il carbone attivo. L'acqua in uscita nelle due campagne di campionamento mostra livelli residui di BPA del tutto simili, pari a 1,42 ng/L nel mese di Luglio e a 1,64 ng/L nel mese di Settembre.

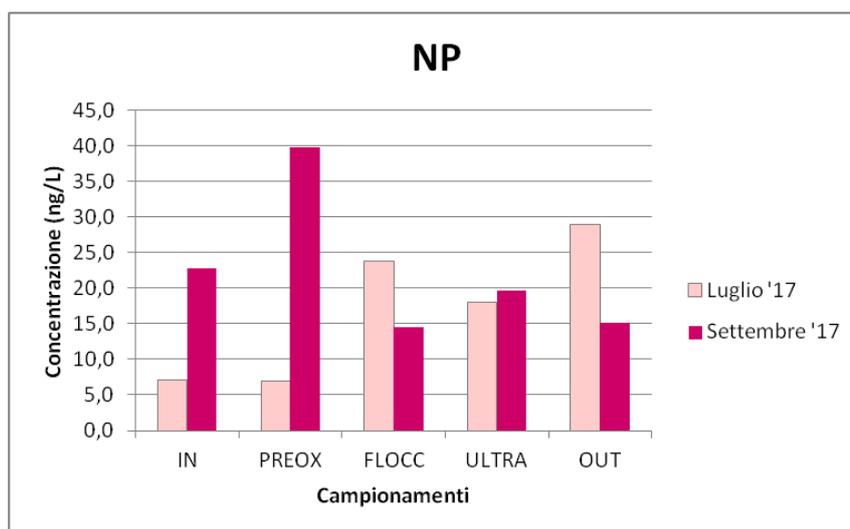


Figura 4.4 Concentrazione di nonilfenolo (ng/L) dall'ingresso all'uscita del potabilizzatore nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017.

A differenza degli altri IE, i livelli di nonilfenolo rilevati nei campioni di acqua raccolti nelle due campagne di Luglio e Settembre, mostrano una elevata variabilità, sia nei valori in ingresso ed in uscita al potabilizzatore, che nei passaggi all'interno del potabilizzatore stesso (Figura 4.4). In particolare, nella campagna di Luglio i livelli di nonilfenolo sono addirittura maggiori nell'acqua in uscita (28,94 ng/L), rispetto a quella in entrata (7,09 ng/L), rivelandosi il potabilizzatore stesso probabile fonte di rilascio di nonilfenolo dal passaggio di flocculazione in poi. Andamento inverso si è osservato nella campagna di Settembre, dove il nonilfenolo, rilevato in quantità di 22,72 ng/L in entrata, è stato solo parzialmente abbattuto in uscita (15,15 ng/L).

I risultati relativi agli altri IE oggetto del presente lavoro di tesi non sono stati rappresentati graficamente, in quanto essi sono stati rilevati solo sporadicamente oppure non sono stati ritrovati in quantità superiore al proprio LOQ. In particolare è degno di nota che il 4-octilfenolo è stato rilevato solo in Luglio nell'acqua in ingresso al potabilizzatore, in quantità di 1,75 ng/L, fino al passaggio di preossidazione, mentre dopo la flocculazione non è stato più rilevato nell'acqua. Non ne è mai stata rilevata la presenza, invece, nel mese di Settembre.

Non sono state riscontrate particolari criticità rispetto alla presenza di estrogeni e farmaci nei campioni di acqua analizzati, in quanto erano quasi sempre in quantità inferiori al proprio LOQ ad eccezione della presenza sporadica di estrone e di Diclofenac. Il primo è stato rilevato solo una volta, in corrispondenza dell'ingresso del potabilizzatore nel campionamento di Luglio, e già dopo il trattamento di preossidazione non è stato più ritrovato in valori superiori al LOQ. Il Diclofenac è stato rilevato in modo sporadico nelle due campagne di campionamento: in Luglio è stato rilevato nel CER, poi anche nell'acqua dall'ultrafiltrazione all'uscita in quantità di 3,60 ng/L, mentre in Settembre è stato ritrovato solo nell'acqua in ingresso al potabilizzatore (4 ng/L).

4.2 Valutazione dell'attività estrogenica nei campioni d'acqua saggiati: risultati del saggio E-SCREEN

In Figura 4.5 è riportato il risultato degli esperimenti preliminari, in cui le cellule MCF7 sono state esposte all'estradiolo (E2) in due differenti concentrazioni, in presenza o assenza dello specifico inibitore dei recettori per gli estrogeni, il Tamoxifene, allo scopo di verificare la buona responsività delle cellule MCF7 messe in linea nel corso di questo lavoro di tesi, rispetto agli estrogeni. I risultati, espressi in PE (Effetto Proliferativo), mostrano che le cellule MCF7 rispondono correttamente a diverse dosi di E2, proliferando e dando come risultato un PE significativamente superiore a quello del controllo.

In presenza dell'antiestrogeno Tamoxifene, il PE è stato completamente inibito, potendo perciò dedurre che la linea cellulare MCF7 da noi utilizzata risponda correttamente all'eventuale presenza di estrogeni nell'acqua saggiata.

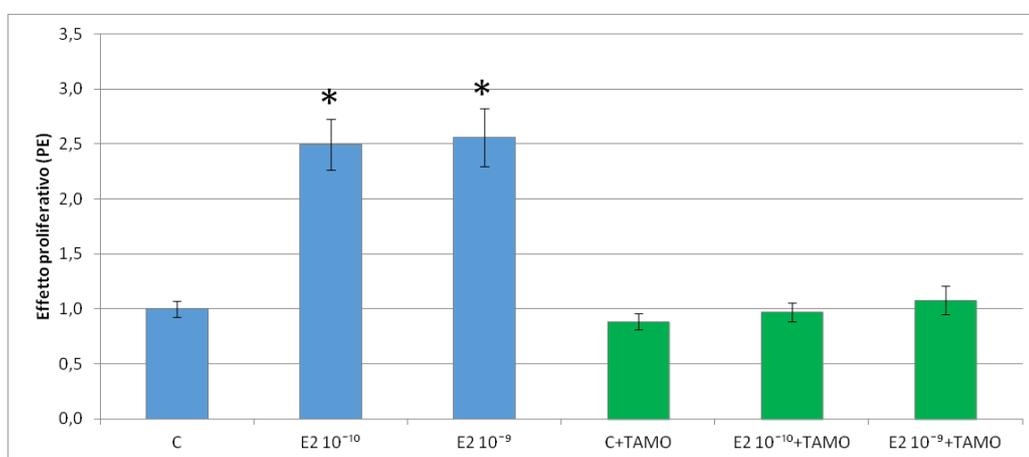


Figura 4.5 Saggio E-screen in cellule MCF7 esposte a E2 con o senza Tamoxifene (10^{-7} M). I dati sono espressi come media PE \pm ES di 4 esperimenti indipendenti saggiati in quadruplicato (N=4). Valore PE di controllo è stato valutato in cellule esposte ad acqua ultrapura in presenza di metanolo allo 0,1% come nei campioni sperimentali. *= $P < 0,05$

La Figura 4.6 riporta il grafico riguardante l'attività estrogenica, rilevata in ingresso e in uscita del potabilizzatore nei campionamenti di Luglio e Settembre 2017.

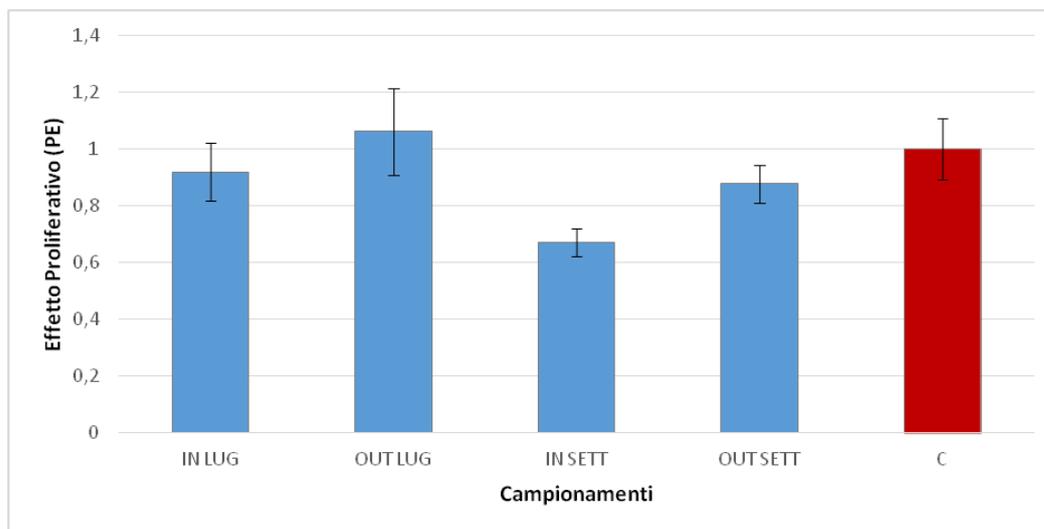


Figura 4.6 Saggio E-screen in cellule MCF7 esposte a campioni prelevati in ingresso (IN) e in uscita (OUT) del potabilizzatore nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017. I dati sono espressi come media PE \pm ES di 8 esperimenti indipendenti (N=8) saggiati in quadruplicato. Valore PE di controllo è stato valutato su cellule esposte ad acqua ultrapura in presenza di metanolo 0,1%, come nei campioni sperimentali.

Come si può notare, in nessun campione sperimentale è stato osservato un PE significativamente superiore a 1, corrispondente alla condizione di controllo in assenza di estrogeni. Da ciò si può dedurre che i campioni di interesse non siano interessati da alcun tipo di attività estrogenica.

Tuttavia, si può notare che l'acqua in ingresso al potabilizzatore nel campionamento di Settembre presenta una vitalità cellulare ridotta rispetto al controllo, indicata da un valore di PE < 1, ascrivibile ad un'inibizione della crescita cellulare. Questo può stare ad indicare la presenza di analiti non determinati, aventi un certo grado di tossicità, in corrispondenza all'ingresso del potabilizzatore, che risultano eliminati successivamente ai trattamenti di potabilizzazione, dove il valore di PE torna ad essere più vicino a quello del controllo.

4.3 Valutazione dell'attività genotossica dei campioni d'acqua saggiati: risultati del test dei micronuclei

In Tabella 4.3 sono riportati i risultati relativi alla frequenza di comparsa di micronuclei nelle cellule MCF7 in seguito all'esposizione agli estratti di acqua.

CAMPIONE DI ACQUA (20x)	MICRONUCLEI
Controllo interno *	14,2 ± 6,1
Acqua in ingresso Luglio	11,5 ± 5,7
Acqua in uscita Luglio	12,0 ± 3,2
Acqua in ingresso Settembre	14,3 ± 5,9
Acqua in uscita Settembre	13,0 ± 7,0

Tabella 4.3 Insorgenza di micronuclei (MN) su cellule MCF7 nei campioni di acqua saggiati in corrispondenza dell'ingresso e dell'uscita del potabilizzatore nelle campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017. I risultati sono espressi come media di 4 esperimenti (N=4) dei MN osservati su 1000 cellule binucleate ± deviazione standard. Controllo interno*: cellule esposte ad acqua ultrapura, in presenza di metanolo 0,1%, come nei campioni sperimentali.

Come si può osservare, i valori ottenuti dai campioni sperimentali non si discostano da quello del controllo interno. Pertanto si può affermare che nei campioni di acqua saggiata, prelevati sia all'ingresso che all'uscita del potabilizzatore nelle due campagne di Luglio e Settembre 2017, non è stata rilevata alcuna attività genotossica.

5. Discussione

Questo lavoro di tesi si poneva come obiettivo il rilevamento di IE eventualmente presenti nelle acque in ingresso e in uscita del potabilizzatore della Standiana, sito a Ravenna e gestito da Romagna Acque-Società delle Fonti S.p.A, e la valutazione di eventuali effetti estrogenici e genotossici su cellule MCF7 in coltura. L'intento era sia di verificare la qualità delle acque a monte del potabilizzatore, sia di valutare, a valle, se l'impianto di potabilizzazione fosse efficace nella rimozione di questi composti. Inoltre, effettuando delle analisi anche in corrispondenza di processi intermedi tra l'entrata e l'uscita del potabilizzatore, si voleva altresì valutare se vi fosse qualche trattamento che contribuisse all'abbattimento di IE eventualmente presenti.

Le analisi chimiche dei campioni di acqua esaminati in questo lavoro di tesi indicano la presenza di alcuni IE, in concentrazioni nell'ordine dei ng/L, sia all'entrata che all'uscita del potabilizzatore della Standiana. I principali risultano essere PFOA, PFOS, BPA e nonilfenolo, per i quali l'efficacia di abbattimento da parte del potabilizzatore varia da sostanza a sostanza.

PFOS e BPA risultano parzialmente abbattuti dall'impianto di potabilizzazione, senza però essere completamente eliminati dalle acque. In particolare, una diminuzione della concentrazione di BPA viene riscontrata tra il trattamento di ultrafiltrazione e l'uscita dall'impianto, e risulta probabilmente ascrivibile al trattamento con filtri a carbone attivo (Figura 4.3). Tuttavia durante il passaggio tra le varie fasi di trattamento si è notato un aumento della concentrazione di BPA dopo l'ultrafiltrazione, fenomeno già riscontrato in una precedente valutazione (Luglio 2015, analisi a cura dell'Istituto Mario Negri). Anche se il passaggio successivo riporta la concentrazione a livelli inferiori rispetto all'ingresso del potabilizzatore, sarà importante verificare l'origine di questa contaminazione.

Una diminuzione della concentrazione di PFOS, per entrambe le campagne di campionamento di Luglio e Settembre 2017, viene invece riscontrata sia in seguito al trattamento di ultrafiltrazione, sia in prossimità dell'uscita, ancora una volta presumibilmente in seguito al trattamento con filtri a carbone attivo (Figura 4.1).

Il potabilizzatore non sembra invece efficace in nessun passaggio nell'abbattimento di PFOA (Figura 4.2) ed anche per quanto concerne il nonilfenolo (Figura 4.4), questo risulta essere sempre presente con una elevata variabilità anche nei processi intermedi dell'impianto di potabilizzazione. Questo può trovare una plausibile spiegazione nella cessione di questo composto da parte di materiali presenti nella filiera di potabilizzazione e distribuzione, così come risultato anche dai rapporti ISTISAN 11/18.

Discorso a parte merita il 4-octilfenolo, non rilevato nelle precedenti campagne di monitoraggio, ma presente nell'acqua in ingresso al potabilizzatore nel campionamento di Luglio 2017. Questo composto è stato efficacemente abbattuto successivamente al trattamento di preossidazione e completamente eliminato conseguentemente al processo di flocculazione.

Le Figure 5.1, 5.2 e 5.3 riportano i livelli di IE riscontrati a monte (CER), ingresso (IN) ed uscita (OUT) nelle campagne di campionamento del 2017 confrontati con quelli rilevati nel biennio 2015-2016, nell'ambito di una convenzione di ricerca con Romagna Acque-Società delle Fonti S.p.A. (Valsecchi, 2016).

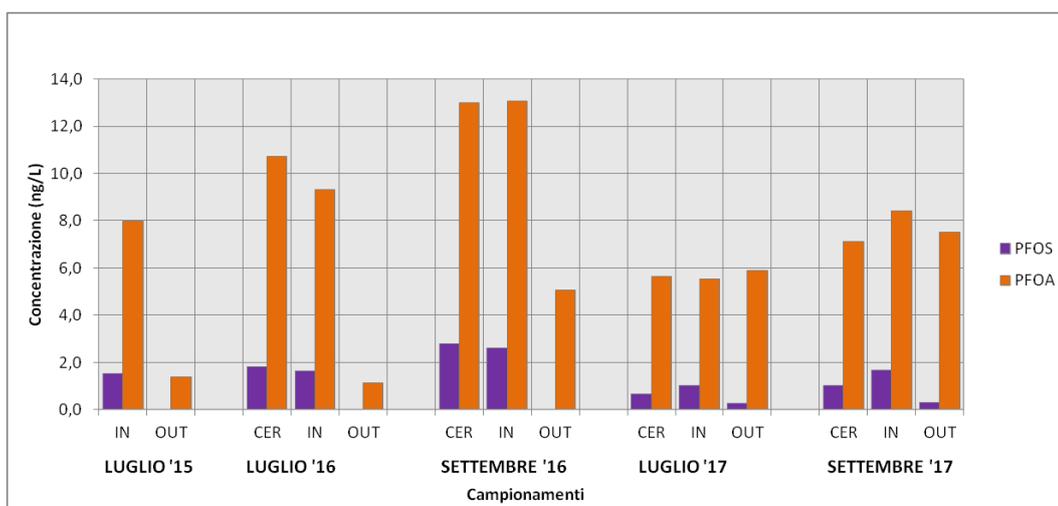


Figura 5.1 Concentrazione di PFOA e PFOS (ng/L) nel periodo 2015-2017 a monte, in ingresso e in uscita del potabilizzatore della Standiana.

Dalla Figura 5.1 si può osservare che i livelli di PFOA, che nelle precedenti campagne di monitoraggio risultavano parzialmente abbattuti dal potabilizzatore, nel 2017 restano essenzialmente costanti dal CER all'uscita del potabilizzatore.

Confrontando i valori di PFOS rilevati dal 2015 al 2017, questi sono stati sempre rilevati a monte e in ingresso del potabilizzatore, a livelli tra 0,66 e 2,78 ng/L, e tutti i dati confermano la sostanziale capacità del potabilizzatore di abbattere queste sostanze nell'acqua. Si può notare, però, che se fino al 2016

l'abbattimento di PFOS era completo, in entrambe le campagne del 2017 è rimasto un residuo seppur minimo di PFOS nell'acqua (0,26 - 0,28 ng/L).

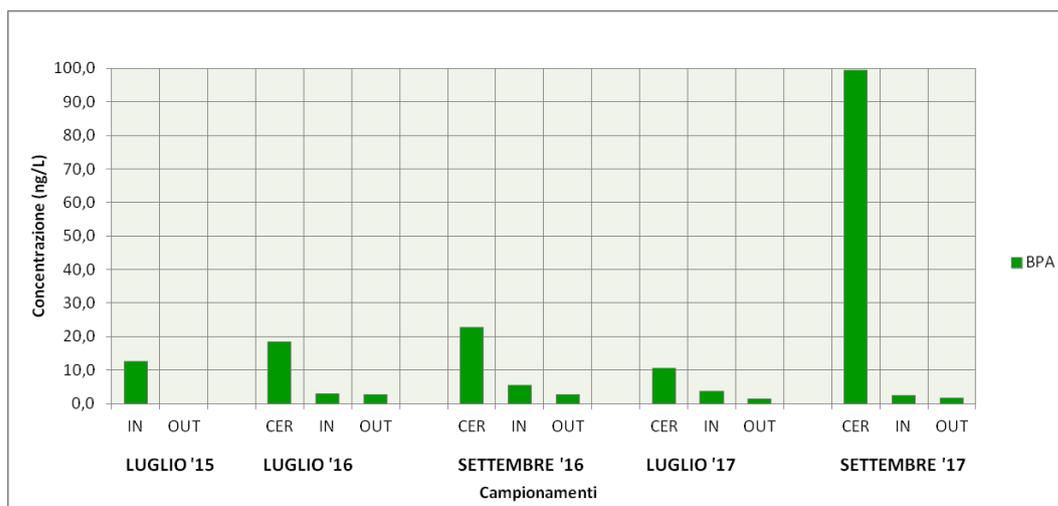


Figura 5.2 Concentrazione di BPA (ng/L) nel periodo 2015-2017 a monte, in ingresso e in uscita del potabilizzatore della Standiana

Per quanto riguarda il BPA, dalla Figura 5.2 si può notare come questa sostanza sia stata sempre rilevata presso il CER in un intervallo di concentrazioni tra 10,49 e 22,63 ng/L ad eccezione del valore più elevato corrispondente a 99,57 ng/L, nel campionamento di Settembre 2017. E' importante osservare che i valori di BPA registrati nell'ambito di tutte le campagne di campionamento dal 2015 al 2017 in uscita dal potabilizzatore risultino sempre abbattuti e si attestino su valori in un ristretto range da <0,99 a 2,77 ng/L. Il BPA risulta quindi abbattuto efficacemente dall'impianto di potabilizzazione, anche se in maniera incompleta.

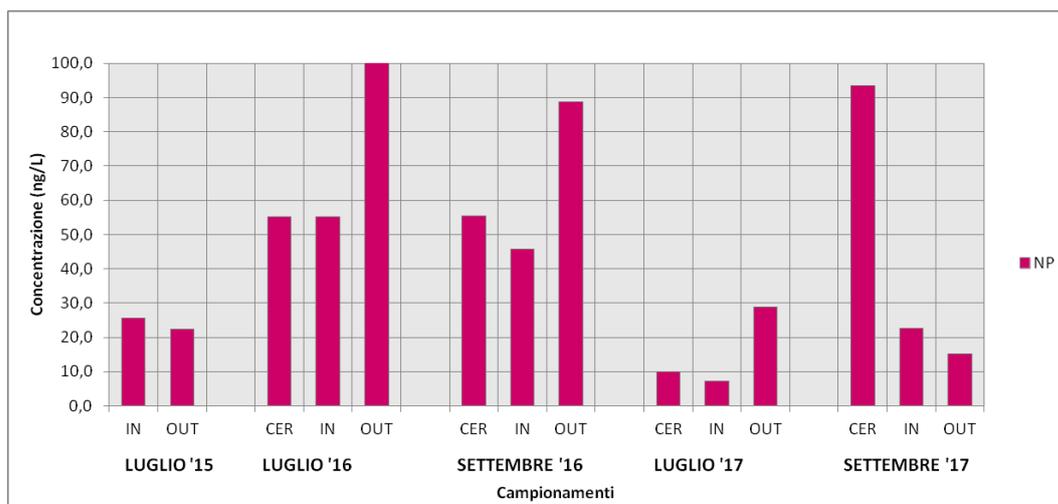


Figura 5.3 Concentrazione di nonilfenolo (ng/L) nel periodo 2015-2017 a monte, in ingresso e in uscita del potabilizzatore della Standiana

Per quanto riguarda il nonilfenolo, dalla Figura 5.3 si può notare come questo assuma dei valori di concentrazione molto variabili nel tempo e spesso elevati

anche in uscita dal potabilizzatore (100,16 ng/L, Luglio 2016 e 88,79 ng/L, Settembre 2016), che non sembra in grado di abbatterlo efficacemente e che anzi talvolta sembrerebbe rappresentare esso stesso una fonte di rilascio di nonilfenolo nelle acque. Soltanto nel campionamento di Settembre 2017, infatti, questo sembra subire una lieve diminuzione, passando da 22,72 ng/L in entrata a 15,15 ng/L in uscita al potabilizzatore. Va sottolineato che, dopo i picchi del 2016, la quantità di nonilfenolo rilevata nell'acqua in uscita dal potabilizzatore nel 2017 si è mantenuta in un range di 15,15 - 28,94 ng/L.

Riguardo agli estrogeni e ai farmaci si conferma quanto osservato nel biennio 2015-2016, cioè l'assenza di valori superiori al LOQ o la sporadicità della loro presenza. In particolare nelle precedenti campagne di campionamento non sono mai stati rilevati estrogeni nel potabilizzatore della Standiana, mentre riguardo ai farmaci si era osservata sporadicità nella presenza dell'Ibuprofene (Luglio 2015 e Luglio 2016). Quest'ultimo nel 2017 non è mai stato rilevato, mentre Il Diclofenac, mai rilevato nelle precedenti campagne del 2015 e 2016, è stato ritrovato sporadicamente nei campioni di Luglio e Settembre del 2017.

La Direttiva 2013/39/UE, a modifica delle Direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque, norma tra le altre, tre sostanze oggetto del presente lavoro di tesi: 4-octilfenolo, nonilfenolo e PFOS. In particolare la Direttiva all'allegato I indica il 4-octilfenolo nell'elenco delle "sostanze prioritarie" e nonilfenolo e PFOS vengono identificati come "sostanze pericolose prioritarie". L'allegato II riporta gli SQA corrispondenti alle medesime sostanze prioritarie. Gli SQA relativi a 4-octilfenolo, nonilfenolo e PFOS, espressi come valore medio annuo (SQA-AA) e come concentrazione massima ammissibile (SQA-CMA), per le acque superficiali interne (fiumi, laghi e corpi idrici artificiali o fortemente modificati) sono riportati in Tabella 5.1.

Denominazione della sostanza	SQA-AA Acque superficiali interne	SQA-CMA Acque superficiali interne
Nonilfenoli	0,3	2,0
Ottiflenoli	0,1	non applicabile
PFOS	$6,5 \times 10^{-4}$	36

Tabella 5.1 SQA ($\mu\text{g/L}$) relativi a nonilfenoli, ottiflenoli e PFOS stabiliti dalla Direttiva 2013/39/UE.

Osservando i valori presenti in Tabella 5.1 risulta evidente come i valori di nonilfenolo misurati nel corso del presente lavoro di tesi siano conformi agli

standard di legge, non superando in nessun momento gli SQA medi annuali (300 ng/L) e massimi ammissibili (2000 ng/L) stabiliti dalla Direttiva 2013/39/UE. La massima concentrazione di nonilfenolo nel 2017 è infatti stata riscontrata in Settembre a monte dell'impianto di potabilizzazione (CER), ad un valore di 93,52 ng/L, di molto inferiore ai limiti stabiliti. Discorso simile può essere fatto per il 4-octilfenolo che, anche se presente solamente all'entrata del potabilizzatore nel campionamento di Luglio 2017 con un valore di 1,75 ng/L, non supera in ogni caso il valore di SQA medio annuo (10 ng/L). Va sottolineato che i valori di questi IE nell'acqua in uscita dal potabilizzatore sono ancora più bassi, confermando la buona qualità dell'acqua erogata dall'impianto riguardo alla presenza di 4-octilfenolo e nonilfenolo.

Per quanto riguarda i PFOS, i valori riscontrati sia all'entrata che all'uscita del potabilizzatore risultano di molto inferiori alla soglia di concentrazione massima ammissibile (36000 ng/L). Lo SQA medio annuo stabilito dalla Direttiva 2013/39/UE relativo ai PFOS (0,65 ng/L) viene lievemente superato nei valori a monte ed in ingresso del potabilizzatore, sia nel campionamento di Luglio che di Settembre (da 0,66 a 1,67 ng/L). C'è da tener presente che i campionamenti sono stati svolti in questi periodi dell'anno proprio per mettersi nelle condizioni di maggior criticità riguardo alla concentrazione di inquinanti, per via della stagione poco piovosa e per il grande afflusso turistico legato al periodo estivo. In ogni caso, i valori di concentrazione sono sempre stati riportati entro i limiti di legge all'uscita dal potabilizzatore, a testimonianza dell'efficacia del processo di potabilizzazione.

Per quanto riguarda i PFOA, questi risultano invece normati dal Decreto Legislativo n. 172 del 13 ottobre 2015 in attuazione della Direttiva 2013/39/UE. Lo SQA ($\mu\text{g/L}$), riportato in Tabella 5.2, per le acque superficiali interne viene espresso come valore medio annuo (SQA-MA). E' importante sottolineare che il valore di SQA relativo ai PFOA sarà applicato con effetto dal 22 dicembre 2018.

Denominazione della sostanza	SQA-MA Acque superficiali interne
Acido perfluorooctanoico (PFOA)	0,1

Tabella 5.2 SQA ($\mu\text{g/L}$) relativo ai PFOA, stabiliti dal Decreto Legislativo n.172 del 13 ottobre 2015

Come si può notare, le concentrazioni di PFOA rilevate nei campionamenti di Luglio e Settembre 2017 non superano mai gli SQA stabiliti per queste sostanze,

anche se non ancora applicati. La massima concentrazione di PFOA è infatti pari a 11,20 ng/L in corrispondenza del trattamento di preossidazione del campionamento di Settembre 2017, valore di molto inferiore rispetto allo SQA stabilito (100 ng/L).

Riguardo al BPA non si può fare riferimento alla normativa, ancora assente. Possiamo confrontare i dati ottenuti nel presente studio con quelli pubblicati da ISTISAN 11/18 (2011), relativi a quattro impianti acquedottistici italiani, dove il limite di rilevabilità del metodo applicato (LOR) corrispondeva a 25 ng/L, soglia sotto la quale l'acqua erogata dal potabilizzatore veniva valutata di buona qualità. I valori di acqua rilevati in uscita dal potabilizzatore della Standiana nel 2017 (come pure nel biennio 2015-2016) si attestano su valori ampiamente inferiori (1,42-1,64 ng/L).

Riguardo alla valutazione della qualità dell'acqua grezza in entrata al potabilizzatore, va sottolineato che i valori di concentrazione degli IE analizzati nel corso di questo lavoro di tesi risultano inferiori rispetto a quanto ritrovato nelle acque superficiali italiane e raccolto in una pubblicazione che confronta i dati rilevati tra il 1997 e il 2013 relativi a diversi contaminanti organici emergenti (EOC) (Meffe e de Bustamante, 2014).

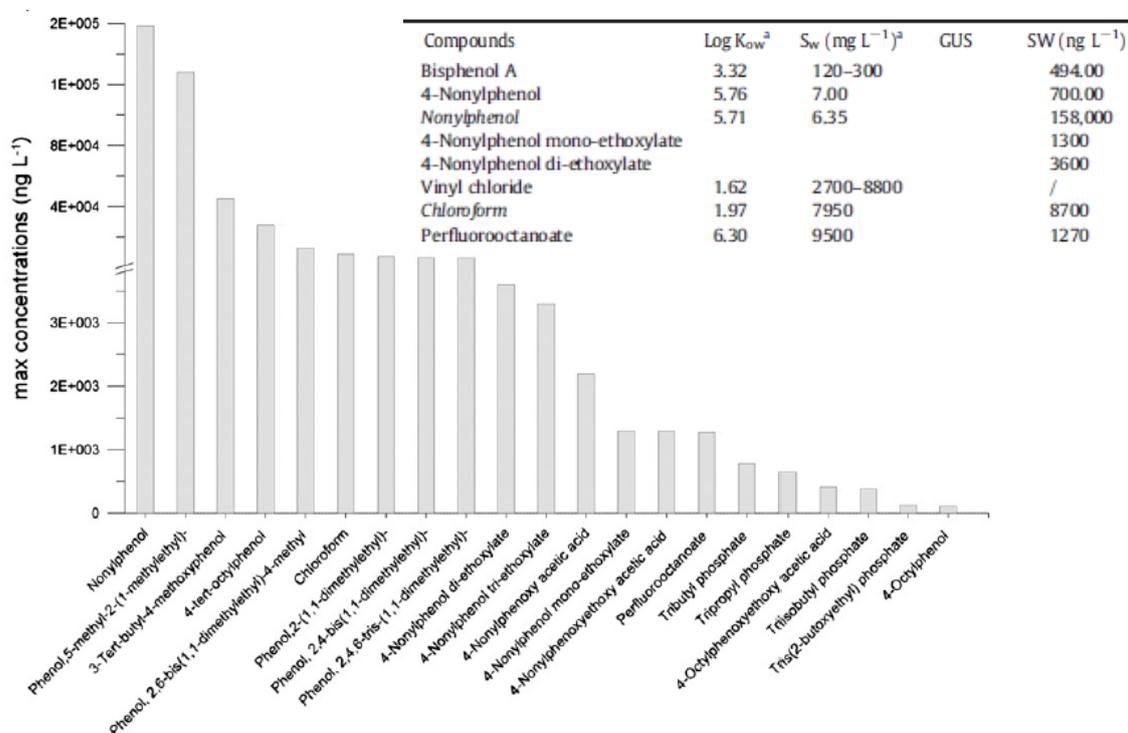


Figura 5.4 Sostanze rilevate nelle acque superficiali italiane con concentrazione massima >100 ng/L e Tabella riportante le concentrazioni massime di EOC con relative proprietà fisico-chimiche K_{ow}: coefficiente di partizione ottanolo-acqua; S_w: solubilità in acqua; GUS: Groundwater Ubiquity Score; SW: concentrazioni massime di EOC nelle acque superficiali (Meffe e de Bustamante, 2014).

Le concentrazioni riportate in questo studio sono espresse in termini di concentrazioni massime e non di valori medi, a causa del numero limitato di campioni raccolti, i quali non fornirebbero un valore medio del tutto affidabile.

Come si può vedere dalla Figura 5.4, il BPA nelle acque superficiali italiane è stato rilevato ad una massima concentrazione di 494 ng/L, valore ben più elevato rispetto a quello massimo da noi riscontrato nel campionamento di Settembre 2017 (99,57 ng/L presso il CER). Stesso discorso può essere fatto per PFOA, il quale è stato rilevato con una massima concentrazione di 1270 ng/L nel fiume Tanaro, uno dei principali affluenti del Po (Loos et al., 2008), mentre nel nostro lavoro di tesi è stato rilevato con una massima concentrazione di 11,20 ng/L. Per quanto riguarda il nonilfenolo, nelle acque superficiali italiane è stato rilevato con una concentrazione massima di 158 ng/L, mentre in questo lavoro di tesi ad una massima concentrazione di 93,52 ng/L in corrispondenza del CER nel campionamento di Settembre 2017.

Altri studi più recenti sugli IE presenti nella Direttiva 2013/39/EU riportano che il nonilfenolo è stato trovato su tutti i campioni analizzati nel corso di vari studi eseguiti in Cina, a concentrazioni tra 20,2-1389 ng/L nel Fiume Huangpu (Zhang et al., 2014) e a concentrazioni tra 34,3-3561 ng/L nel Fiume delle Perle (Chen et al., 2014). Inoltre, lo stesso IE è stato rilevato nel corso di due studi eseguiti in Portogallo, in particolare a concentrazioni superiori a 631 ng/L nel Ria de Aveiro (Rocha et al., 2016) e a concentrazioni superiori a 792 ng/L nell'estuario del fiume Tago, Lisbona (Rocha et al., 2015).

I PFOS sono stati rilevati nei fiumi a sud dell'Inghilterra, a concentrazioni superiori a 119 ng/L (Tong et al., 2014), mentre dati più vicini alla nostra regione provengono da un rapporto di ARPAV (ARPA Veneto) riguardante il monitoraggio di PFAS nei corpi idrici superficiali di una sessantina di comuni nelle province di Vicenza, Verona e Padova nel periodo Giugno 2013 - Giugno 2017; esso riporta valori medi di PFOA di 141 ng/L e dei valori medi di PFOS di 12 ng/L, rilevati rispettivamente in 356 e in 131 dei 562 campioni esaminati nel periodo di campionamento riportato. In particolare, le concentrazioni di PFOA oscillano tra un valore minimo di 10 ng/L e un valore massimo di 3417 ng/L, mentre le concentrazioni di PFOS tra 10 ng/L e 424 ng/L, concentrazioni ben più elevate rispetto a quelle riscontrate nei nostri campionamenti di Luglio e Settembre 2017. Meffe e de Bustamante, 2014 riportano anche che la presenza di IE nelle acque superficiali italiane è correlata a fattori relativi ai parametri fisico-chimici dei

composti e alle caratteristiche delle matrici ambientali. Riguardo le proprietà fisico-chimiche dei composti, il coefficiente di partizione ottanolo-acqua (K_{ow}), così come la solubilità in acqua (S_w) possono dare un'utile indicazione riguardo la mobilità dei composti e la loro affinità all'assorbimento (Pal et al., 2013). Infatti, le sostanze aventi $\log K_{ow} < 4$ sono definite idrofile, mentre quelle con $\log K_{ow} > 4$ idrofobe. Generalmente i composti idrofobici, al contrario di quelli idrofili, mostrano un'elevata affinità all'assorbimento, specialmente nei confronti della materia organica (Pan et al., 2009). Si può allora dedurre che, tra gli IE analizzati in questo lavoro di tesi, il BPA, avendo un valore di K_{ow} di 3,32 (idrofilo), sarà più suscettibile a disciogliersi in acqua, mentre nonilfenolo e PFOA, avendo rispettivamente valori di K_{ow} di 5,71 e 6,30 (idrofobi) saranno più suscettibili all'assorbimento da parte della materia organica. Recentemente si è dimostrato che l'affinità all'assorbimento degli EOC dipende anche dalla loro carica superficiale (Schaffer et al., 2012) e, che queste sostanze sono soggette a degradazione microbica. In riferimento a questo ultimo processo, le condizioni redox dell'ambiente sembrano giocare un ruolo molto importante nel destino e nella distribuzione di molti EOC. La maggior parte di essi, infatti, risulta essere donatore di elettroni e, di conseguenza essi risultano essere soggetti ad ossidazione da parte del metabolismo microbico (Bouwer and Zehnder, 1993). Tra i composti utilizzati industrialmente, quelli fenolici risultano essere i più frequentemente rilevati nelle acque superficiali italiane, anche se il loro rilevamento in ambiente acquatico non dovrebbe avvenire facilmente a causa del loro carattere idrofobico e della loro bassa solubilità in acqua (Meffe e de Bustamante, 2014).

Per quanto riguarda i composti estrogenici e farmacologici, come già detto, non ne è stata rilevata una presenza significativa nell'acqua analizzata nelle campagne di Luglio e Settembre 2017. Il Diclofenac, rilevato solo sporadicamente nell'acqua analizzata è, assieme agli estrogeni, nell'elenco di controllo delle sostanze (Watch list) da sottoporre a monitoraggio a livello dell'UE nel settore della politica delle acque, di cui alla Decisione 2015/495/UE in attuazione della Direttiva 2008/105/CE. Queste sostanze, attualmente pari a 10, stando alle informazioni disponibili, potrebbero rappresentare un rischio significativo a livello dell'Unione, ma l'insufficienza di dati di monitoraggio non consente ancora di giungere ad una conclusione. La normativa, in assenza di elementi sufficienti per definire gli SQA per le sostanze della Watch list, indica un

limite di rilevazione del metodo che si ritiene essere almeno pari o inferiore alla concentrazione senza effetti significativi per ogni sostanza specifica. Viene altresì specificato che se nuove informazioni dovessero portare ad una riduzione della concentrazione senza effetti significativi per particolari sostanze, potrebbe essere necessario abbassare il limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione. In Tabella 5.3 sono riportati i limiti relativi agli estrogeni e al Diclofenac, stabiliti dalla Decisione 2015/495/EU, espressi in ng/L.

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione (ng/L)
17-alfa-etinilestradiolo (EE2)	0,035
17-beta-estradiolo (E2), estrono (E1)	0,4
Diclofenac	10

Tabella 5.3 Limiti massimi ammissibili del metodo di rilevazione (ng/L) relativi a EE2, E2, E1 e Diclofenac, stabiliti dalla Decisione 2015/495/UE.

Il limite massimo ammissibile relativo al Diclofenac è pari a 10 ng/L, mentre il valore massimo riscontrato nel corso delle presenti analisi è stato pari a 4,72 ng/L, quindi allo stato attuale delle cose possiamo affermare che non c'è alcuna criticità relativa alla presenza sporadica di Diclofenac nei campioni analizzati. Anche dal confronto con quanto emerso dagli studi raccolti da Meffe e de Bustamante (2014), emerge un quadro molto positivo relativamente all'acqua analizzata nel presente lavoro di tesi. La Figura 5.5, relativa alla presenza dei farmaci rilevati nelle acque superficiali italiane tra il 1997 ed il 2013, riporta la concentrazione massima relativa all'Ibuprofene, nel fiume Po e nel fiume Lambro suo affluente, pari a 210 ng/L, valore che può essere spiegato tenendo conto del fatto che il fiume Po raccoglie le acque reflue provenienti da utenze presenti in una delle aree più densamente popolate e industrializzate d'Italia, di circa 71.000 Km² (Calamari et al., 2003), mentre il fiume Lambro riceve le acque reflue di una città come Milano, avente più di un milione di abitanti e che fino al 2004 era priva di impianti di trattamento delle acque reflue. Per quanto riguarda il Diclofenac, dalla Figura 5.5 emerge che la concentrazione massima riscontrata nelle acque superficiali italiane risulti pari a 158 ng/L, valore ben più elevato se paragonato a quelli riscontrati nei nostri campionamenti di Luglio e Settembre 2017.

La frequente presenza di farmaci, agenti antimicrobici e anti-infiammatori nelle acque superficiali italiane è in accordo con le loro proprietà fisico-chimiche, caratterizzate da un'elevata idrofilia e un'elevata solubilità in acqua (Figura 5.5).

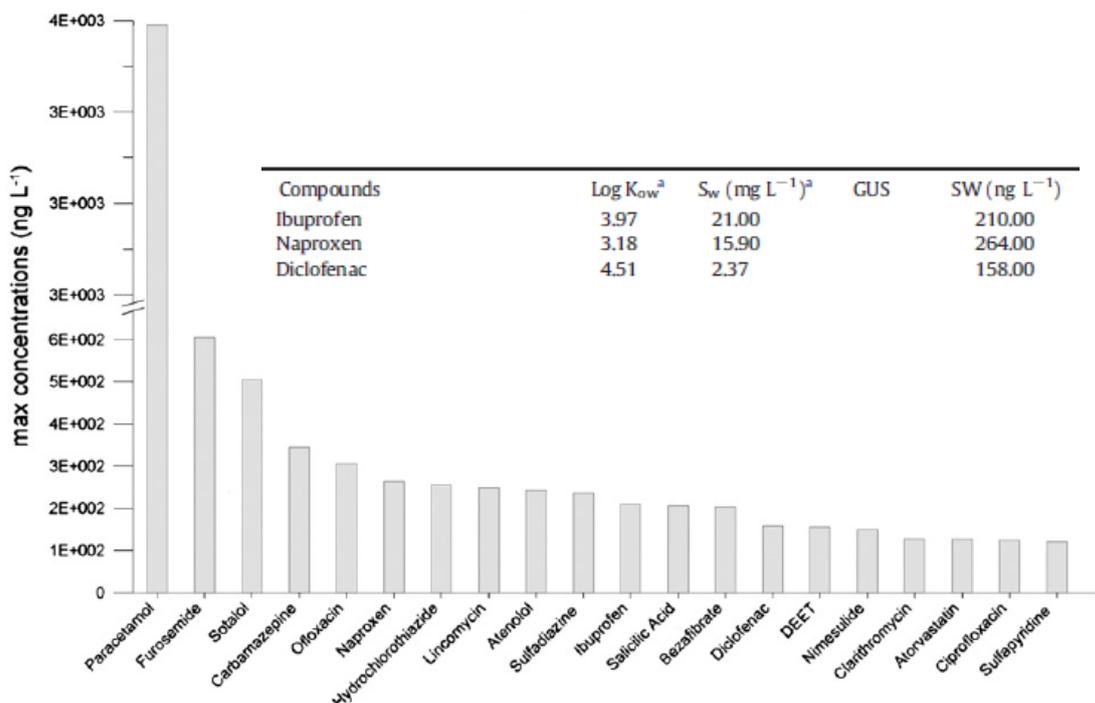


Figura 5.5 Farmaci rilevate nelle acque superficiali italiane con concentrazione massima >100 ng/L e Tabella riportante le concentrazioni massime di EOC con relative proprietà fisico-chimiche. K_{ow}: coefficiente di partizione ottanolo-acqua; S_w: solubilità in acqua; GUS: Groundwater Ubiquity Score; SW: concentrazioni massime di EOC nelle acque superficiali (Meffe e de Bustamante, 2014).

Situazione migliore per quanto riguarda le acque superficiali italiane è quella riguardante i composti estrogenici, dei quali non è mai stata rilevata una concentrazione superiore a 50 ng/L. Le concentrazioni più elevate sono infatti state rilevate per E1, pari a 47 ng/L, nel fiume Lambro (Viganò et al., 2006), e per E2, pari a 12,9 ng/L nelle acque superficiali della Liguria (Magi et al., 2010). Nel fiume Po, invece, le massime concentrazioni di E1 e E2 oscillano tra 1 e 6 ng/L, mentre l'ormone sintetico EE2 non è stato mai rilevato (Zuccato et al., 2005; Viganò et al., 2006). Tuttavia, anche a basse concentrazioni, questi composti possono risultare molto potenti. Generalmente, i livelli di abbattimento per questi composti sono elevati. I carboni attivi possono infatti eliminare fino al 77% della concentrazione di estrogeni presenti (Suzuki et al., 2009), mentre l'ossidazione con ozono è risultata in grado di ridurre l'attività estrogenica del 99% in campioni di letame preventivamente sottoposti a processi di degradazione anaerobica e aerobica (Ermawati et al., 2007).

Altri studi sulle sostanze elencate all'interno della Decisione 2015/495/EU riportano che le più elevate concentrazioni di Diclofenac sono state trovate nel Fiume Umgeni, in Sudafrica, a concentrazioni di 102000 ng/L (Gumbi et al.,

2017) ed in Antartide a concentrazioni superiori a 7761 ng/L (Gonzalez-Alonso et al., 2017). Nel caso degli estrogeni, invece, EE2 e E2 sono stati rilevati, rispettivamente, a concentrazioni di 150 ng/L e 87 ng/L nel Fiume Piracicaba, in Brasile (Torres et al., 2015). Le più elevate concentrazioni di EE2 sono state rilevate in Taiwan a concentrazioni superiori a 1822 ng/L (Lin et al., 2015), mentre E1 è stato rilevato nel Fiume Huangpu, in Cina, a concentrazioni di 93 ng/L (Zhang et al., 2014)

Le più elevate concentrazioni di Ibuprofene, non ancora normato ma sul quale sono stati condotti numerosi studi, sono state rilevate nelle acque superficiali del Sudafrica a concentrazioni di 17600 ng/L (Gumbi et al., 2017), mentre in uno studio condotto sul Fiume Rakkolanjoki, in Finlandia, l'Ibuprofene è stato rilevato in concentrazioni superiori a 1830 ng/L (Meierjohann, 2016). In uno studio condotto nella Regione dell'Epiro, in Grecia, l'Ibuprofene è stato rilevato in concentrazioni superiori a 1351 ng/L nell'81% dei campioni analizzati (Nannou, 2015), mentre nel Fiume Lis, in Portogallo, l'Ibuprofene è stato trovato a concentrazioni superiori a 1317 ng/L in tutti i 55 campioni analizzati (Paiga et al., 2016).

Le nostre analisi chimiche suggeriscono in conclusione che l'acqua analizzata nel corso del presente studio è di buona qualità anche riguardo alla presenza di sostanze estrogeniche e farmacologiche.

L'assenza di composti ad azione estrogenica nelle acque analizzate in questo lavoro di tesi è stata confermata anche dai risultati ottenuti dal test biologico E-screen assay. Negli studi di monitoraggio ambientale risulta infatti fondamentale, come già detto in precedenza, abbinare indagini di tipo chimico con test biologici, in un'ottica di complementarietà. Va ricordato infatti, che mentre i test biologici sono in grado di offrire una misura integrata della potenza estrogenica di una miscela ambientale, senza conoscerne i singoli costituenti, i test chimici sono in grado di fornire una determinazione quantitativa delle sostanze presenti nel campione ambientale in analisi. I soli test chimici, però, non sarebbero risultati sufficienti al raggiungimento del nostro scopo, in quanto i composti analizzati chimicamente erano in numero ridotto, e comunque sempre inadeguato per escludere la presenza di eventuali IE non ricercati. Da qui l'importanza di abbinare le analisi chimiche con quelle biologiche, di modo da escludere la presenza di contaminanti ad attività estrogenica e/o genotossica nei campioni di acqua saggiati.

Nei campioni di acqua analizzati in ingresso e in uscita del potabilizzatore della Standiana nei due campionamenti di Luglio e Settembre 2017 non è stata riscontrata alcuna attività estrogenica significativa. Questa conclusione può essere dedotta dal fatto che in nessun campione sono stati rilevati valori di PE significativamente maggiori ad 1, corrispondente alla condizione di controllo in assenza di estrogeni. Nel complesso, i risultati delle analisi biologiche ottenuti nell'ambito di questo lavoro di tesi concordano appieno con quelli ottenuti nel corso di precedenti campagne di monitoraggio effettuate nel biennio 2015-2016, dove i valori di PE riscontrati nelle cellule esposte all'acqua erano prossimi a 1, come nei campioni di controllo.

Infine, la buona qualità dell'acqua analizzata è stata constatata anche grazie ai risultati ottenuti dal test dei micronuclei, che provano la mancanza di attività genotossicità. In entrambi i campionamenti di Luglio e Settembre 2017, eseguiti sia all'ingresso che all'uscita del potabilizzatore, non sono stati registrati infatti valori incoerenti rispetto all'intervallo dei valori dei controlli, provando l'assenza di eventuali composti genotossici nella totalità dei campioni analizzati.

6. Conclusioni

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, successivamente, quelle potabili. Le acque superficiali sono infatti suscettibili alla contaminazione da parte delle acque reflue, dai percolati delle discariche dei rifiuti solidi e dalle acque di scorrimento di aree agricole o adibite ad allevamenti di bestiame, le quali possono contenere diversi tipi di inquinanti tra cui, appunto, gli IE. Dal momento che dalle acque superficiali vengono attinte le acque destinate al consumo umano, una efficace rimozione di questi inquinanti nel corso del processo di potabilizzazione risulta perciò fondamentale. Importante è, quindi, conoscere lo stato della presenza degli IE nelle acque grezze, ovvero all'ingresso dell'impianto di potabilizzazione e successivamente in quelle trattate, dopo il trattamento di 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.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, si può affermare che il potabilizzatore della Standiana ha abbattuto in modo completo il 4-octilfenolo, rilevato solo in ingresso al potabilizzatore in Luglio, a livelli molto vicini al LOQ, e completamente eliminato nell'acqua in uscita. Il potabilizzatore ha inoltre abbattuto in gran parte PFOS e BPA, per il primo già dalla fase di ultrafiltrazione, mentre per il BPA dal trattamento con carboni attivi. Il potabilizzatore non è stato invece altrettanto efficace nell'abbattimento di PFOA, che in entrambe le campagne del 2017 è stato rilevato in quantità invariate in ingresso ed in uscita. Anche rispetto all'abbattimento del nonilfenolo, il potabilizzatore non si è mostrato efficace, in quanto questo IE è stato rilevato in concentrazioni molto variabili nell'ambito dei vari passaggi all'interno del potabilizzatore e nelle due campagne di campionamento. Tale situazione è comunque frequentemente riscontrata anche in altri casi di studio, come riportato dai rapporti ISTISAN 11/18, e viene ricondotta al rilascio da parte dei materiali plastici utilizzati per le condutture di cui

sono costituiti gli stessi impianti di potabilizzazione. Nonostante non vengano abbattuti dal potabilizzatore, nonilfenolo e PFOA sono stati rilevati nell'acqua in uscita dal potabilizzatore della Standiana e distribuita in rete, in concentrazioni al di sotto degli SQA previsti, rispettivamente, dalla Direttiva 2013/39/UE e dal D.Lgs. 172/2015. Si può quindi concludere che l'acqua erogata dal potabilizzatore della Standiana sia di buona qualità anche rispetto a questi IE.

Anche i test biologici E-screen assay e di genotossicità dei micronuclei sono risultati di grande utilità nel valutare la qualità dell'acqua erogata dal potabilizzatore. I test di estrogenicità a breve termine *in vitro* sono infatti ritenuti dalla comunità scientifica internazionale di grande significato biologico quando utilizzati su matrici complesse, come quelle ambientali, in quanto possono fornire utili indicazioni ai fini di 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. L'applicazione di questi test, specificatamente per le acque destinate al consumo umano, può costituire un valido strumento sperimentale nel valutare l'efficacia delle tecnologie di trattamento impiegate nell'abbattere le concentrazioni di IE presenti in acque grezze. Relativamente a questo lavoro di tesi, a conferma di quanto ottenuto con le analisi chimiche, non sono stati riscontrati nei campioni di acqua saggiati effetti di tipo estrogenico e neppure genotossico, a conferma del buono stato di qualità delle acque da destinare ad uso potabile.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti nelle 2 campagne di monitoraggio effettuate nel 2017, possiamo affermare che non sussistono situazioni di criticità relative alla presenza di IE nell'acqua erogata dal potabilizzatore della Standiana, sia per le ridotte concentrazioni riscontrate nell'acqua in entrata, sia per l'efficacia del processo di potabilizzazione.

6.1 Prospettive

Nella regolamentazione e rilevazione degli IE nelle acque ad uso potabile, lo Stato italiano, così come l'UE, deve però ancora fare degli importanti passi avanti. Ad oggi le uniche misure di controllo e di prevenzione che possono essere intraprese in tal ambito risultano essere quelle di seguire i principi stabiliti dalla Direttiva 93/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano, che introduce ad un approccio conosciuto come i Water Safety Plans (WSP), ovvero piani di sicurezza dell'acqua. In sostanza, il WSP ridefinisce i limiti dei

sistemi di controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano, sino ad oggi contraddistinti da un monitoraggio a campione sulle acque distribuite. L'evoluzione delle conoscenze in materia di analisi del rischio ha infatti definito le criticità di strategie unicamente incentrate sulla verifica di conformità del prodotto finito, spostando decisamente l'interesse verso la realizzazione di un sistema globale di valutazione e gestione del rischio esteso all'intera filiera idrica dalla captazione al punto di utenza finale. Il modello dei WSP, di fondamentale semplicità nei suoi aspetti generali, è finalizzato a ridurre drasticamente le possibilità di contaminazione delle acque captate dall'ambiente per essere destinate al consumo umano, ad attenuare o rimuovere la presenza di eventuali elementi di pericolo chimico, microbiologico, fisico e radiologico, attraverso trattamenti delle acque adeguatamente progettati, eseguiti e controllati e infine, a prevenire eventuali ricontaminazioni in fase di stoccaggio e distribuzione dell'acqua fino al punto di consegna.

Infine, uno strumento cruciale nel prevenire la presenza di IE nelle acque potabili risulta essere la dotazione, da parte delle aziende acquedottistiche, di tecnologie avanzate, come l'ozonizzazione, l'irraggiamento UV e l'assorbimento su carbone attivo granulare, metodologie maggiormente efficaci nella rimozione di contaminanti organici in tracce rispetto a trattamenti convenzionali come la coagulazione, la sedimentazione e la filtrazione, che presentano un'efficienza di rimozione inferiore al 25% (Soares et al., 2008). In particolare il potabilizzatore della Standiana, oltre ad essere dotato dell'innovativo trattamento di ultrafiltrazione particolarmente adeguato nell'abbattimento della carica batterica e spore di organismi potenzialmente patogeni, possiede la componente di filtri a carbone attivo, che riguardo agli IE si è rivelata particolarmente efficace nell'abbattimento di sostanze come PFOS e BPA.

Riferimenti bibliografici

- Achene, L., Bogialli, S., Lucentini, L., Pettine, P., Ottaviani, M. (2011) *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; (Rapporti ISTISAN 11/18)
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). *Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review*. Environment international
- Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., (2008). *Nonylphenol and octylphenol in human breast milk*. Environ. Int. 34, 984–987
- Alexander, F. E., Patheal, S. L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M. E., Chan, L. C., ... & Hussein, H. (2001). *Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion*. Cancer research, 61(6), 2542-2546
- Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., & Nadal, A. (2011). *Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus*. Nature Reviews Endocrinology, 7(6), 346-353
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010). *Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring*. Environmental health perspectives, 118(9), 1243
- Al-Rajab, A.J., Sabourin, L., Lapen, D.R. Topp, E., (2010). *The non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils*. Sci. Total Environ. 409, 78-82
- Andersen L, Holbech H, Gessbo A, Norrgren L, Petersen GI. (2003). *Effects of exposure to 17alphaethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (Danio rerio)*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol; 134(3):365-74
- Ashton, D., Hilton, M., & Thomas, K. V. (2004). *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom*. Science of the Total Environment, 333(1), 167-184
- ATSDR, (2007). *Sunnyside area groundwater contamination. US department of health and human services*. Public Health Service: Division of Health Assessment and Consultation. Atlanta, Georgia 30333
- Barbosa, M. O., Moreira, N. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F., & Silva, A. M. (2016). *Occurrence and removal of organic micropollutants: an overview of the watch list of EU Decision 2015/495*. Water research, 94, 257-279
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., (2008). *A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States*. Groundwater. Sci. Total Environ. 402, 192-200
- Begley, T.H., Hsu, W., Noonan, G., Diachenko, G., (2008). *Migration of fluorochemical paper additives from food-contact paper into foods and food simulants*. Food Addit. Contam. 25, 384-390
- Bertazzi, P. A., Bernucci, I., Brambilla, G., Consonni, D., & Pesatori, A. C. (1998). *The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review*. Environmental Health Perspectives, 106(Suppl 2), 625

- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (1986). *Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83(8), 2496-2500
- Bicchi, C., Schilirò, T., Pignata, C., Fea, E., Cordero, C., Canale, F., & Gilli, G. (2009). *Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents*. Science of the total environment, 407(6), 1842-1851
- Biles, J. E., McNeal, T. P., Begley, T. H., & Hollifield, H. C. (1997). *Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids*. Journal of agricultural and food chemistry, 45(9), 3541-3544
- Bjorklund, J.A., Thuresson, K., De Wit, C.A., (2009). *Perfluoroalkyl compounds (PFCs) in indoor dust: concentrations, human exposure estimates and sources*. Environ. Sci. Technol. 43, 2276-2281
- Boente, M.P., Hurteau, J., Rodriguez, G.C., Bast Jr., R.C.; Berchuck, A., (1993). *The biology of ovarian cancer*. Curr. Opin. Oncol. 5, 900-907, 1, 2
- Boiteux, V., Dauchy, X., Rosin, C., Munoz, J.F., (2012). *National screening study on 10 perfluorinated compounds in raw and treated tap water in France*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 63, 1–12
- Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B., Pedemonte, M., Pastor, M.C., Borrell, A., Lacorte, S., (2012). *Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and Herbicides in Spanish source waters intended for bottling*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 19, 3339-3349
- Bouwer EJ, Zehnder JB. (1993). *Bioremediation of organic compounds — putting microbial metabolism to work*. Trends Biotechnol;11:360–7
- Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W., & Rand, G. M. (2012). *Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and consideration for toxicity testing*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 218, 1–99
- Brown Jr, J. S. (2008). *Effects of bisphenol-A and other endocrine disruptors compared with abnormalities of schizophrenia: an endocrine-disruption theory of schizophrenia*. Schizophrenia bulletin, 35(1), 256-278
- Buser, H. R., Poiger, T., & Müller, M. D. (1999). *Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater*. Environmental science & technology, 33(15), 2529-2535
- Buser, H.R., Poiger, T., Muller, M.D., (1998). *Occurrence and fate of the pharmaceutical drug Diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a Lake*. Environ. Sci. Technol. 32, 3449-3456
- Calafat, A.M., Needham, L.L., (2009). *What additional factors beyond state-of-the-art analytical methods are needed for optimal generation and interpretation of biomonitoring data?* Environ. Health Perspect. 117, 1481-1485
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., (2008). *Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004*. Environ. Health Perspect. 116, 39–44

- Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. (2003). *Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy*. Environ Sci Technol;37: 1241–8
- Cantonwine, D., Meeker, J.D., Hu, H., Sanchez, B.N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado Garcia, A., Fortenberry, G.Z., Calafat, A.M., Tellez-Rojo, M.M., (2010). *Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study*. Environ. Health 9, 1-7
- Caragnini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., & Sezenna, E. (2015). *Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones and benzotriazoles in soil, groundwater, surface water, sediments and food: a review*. Environ. Sci. & Pollut. Research, 22, 5711-5741
- Castello, G., & Silvestri, I. (1999). *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Caleidoscopio Italiano, 130
- Chen, R., Yin, P., Zhao, L., Yu, Q., Hong, A., & Duan, S. (2014). *Spatial–temporal distribution and potential ecological risk assessment of nonylphenol and octylphenol in riverine outlets of Pearl River Delta, China*. Journal of Environmental Sciences, 26(11), 2340-2347
- Cleuvers, M., (2003). *Aquatic ecotoxicity of pharmaceutical including the assessment of combination effects*. Toxicol. Lett. 142, 185-194
- Cleuvers, M., (2004). *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs Diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 309-315
- Collins, S. (2005). *Overview of clinical perspectives and mechanisms of obesity*. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, 73(7), 470-471
- COM(1999)706 "Strategia comunitaria in materia di sostanze che alterano il sistema endocrino. Una serie di sostanze con sospetta azione di interferenza sui sistemi ormonali nei soggetti umani e nella fauna selvatica", Bruxelles, 1999
- COM(2000)1, "Comunicazione della commissione sul principio di precauzione", Bruxelles, 2 febbraio 2000
- Combalbert S, Hernandez-Raquet G. (2010). *Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure*. Appl Microbial Biotechnol;86(6):1671–92
- Commission staff working document on 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), SEC(2007)1635, Brussels, 2007
- Commission staff working document on implementation of the "Community Strategy for Endocrine Disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of human and wildlife"(COM(1999)706), SEC(2004)1372, Brussels, 2004)
- Commission Staff working paper - 4th Report 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), SEC(2011)1001,Brussels, 10.08.2011
- Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo sulla applicazione della strategia comunitaria in materia di sostanze che alterano il sistema endocrino - una serie di sostanze con sospetta azione di interferenza sui sistemi

ormonali nei soggetti umani e nella fauna selvatica (COM(1999)706), COM(2001)262, Bruxelles, 2001

Cooper, R. L., Stoker, T. E., Tyrey, L., Goldman, J. M., & McElroy, W. K. (2000). *Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function*. *Toxicological Sciences*, 53(2), 297-307

Costa, E.M.F., Spritzer, P.M., Hohl, A., Bachega, T.A.S.S., (2014). *Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract*. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 58 (2), 153-161

CSTEE *Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology Test Method*, March 1999

D.Lgs. 3 Aprile 2006, n.152, *Norme in materia ambientale* (G.U. n.88 del 14 Aprile 2006)

DanishEPA, (2000). *Toxicological evaluation and limit values for nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, tricresyl, phosphates and benzoic acid-* Environmental Project no. 512 2000

David R. (2012). *Integrative medicine*,. 3rd ed. Philadelphia, USA: Publisher: Elsevier Saunders, pp. 336–8. ISSN: 978-1- 4377-1793-8

Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G., & Anton-Culver, H. (1993). *Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer*. *Environmental health perspectives*, 101(5), 372

de Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lurling, M., & Peeters, E. T. H. M. (2006). *Behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals*. *Aquatic Toxicology*, 78, 209–216

Decisione di esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione del 20 Marzo 2015 che istituisce un elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione nel settore della politica delle acque in attuazione della Direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio

D'Hollander, W., Roosens, L., Covaci, A., Cornelis, C., Reynders, H., Campenhout, K.V., Voogt, P., Bervoets, L., (2010). *Brominated flame retardants and perfluorinated compounds in indoor dust from homes and offices in Flanders, Belgium*. *Chemosphere* 81, 478-487

Dhooge, W., Hond, E.D., Koppen, G., Bruckers, L., Nelen, V., et. al., (2011). *Internal exposure to pollutants and sex hormone levels in Flemish male adolescent in a cross-sectional study: associations and dose-response relationships*. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 21, 106-113

Di Donato, M., Cernerà, G., Giovannelli, P., Galasso, G., Bilancio, A., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2017). *Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer*. *Molecular and Cellular Endocrinology*

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P. Giudice, L.C., Hauser, R., et. al., (2009). *Endocrine disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement*. *Endocr. Rev.* 30 (4), 293-342

Dichiarazione di Rio sull'Ambiente e lo Sviluppo, 1992

Direttiva 1107/2009/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE

Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre del 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque

Direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 7 maggio 2002, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali

Direttiva 2003/74/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, che modifica la direttiva 96/22/CE del Consiglio concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β agoniste nelle produzioni animali

Direttiva 2004/37/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro

Direttiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 dicembre 2006 sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento

Direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque

Direttiva 2009/48/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 giugno 2009, sulla sicurezza dei giocattoli

Direttiva 2013/39/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 agosto 2013 che modifica le direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque

Direttiva 96/22/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β agoniste nelle produzioni animali

Direttiva 98/24/CE del Consiglio, del 7 aprile 1998, sulla protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro

Direttiva 98/83/CE del Consiglio, del 3 Novembre 1998, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, modificata dalla Direttiva 2015/1787/CE della Commissione, che ne ha aggiornato gli allegati II e III

Domingo, J.L., Jogsten, I.E., Eriksson, U., Martorell, I., Perello, G., Nadal, M., Bavel, B., (2012). *Human dietary exposure to perfluoroalkyl substances in Catalonia, Spain, temporal trend*. Food Chem. 135, 1575-1582

Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2017). *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment*. Emerging Contaminants

ECHA, 2014. *Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates*. Technical report. European Chemicals Agency, Committee for Risk Assessment (RAC), Committee for Socio-economic Analysis (SEAC)

EFSA Journal, (2010). *Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A*

Ermawati R, Morimura S, Tang YQ, Liu K, Kida K. (2007). *Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation*. J Biosc Bioeng;103:27-31

- Eschauzier, C., Beerendonk, E., Scholte-Veenendaal, P., De Voogt, P., (2012). *Impact of treatment processes on the removal of perfluoroalkyl acids from the drinking water production chain*. Environ. Sci. Technol. 46, 1708–1715
- Essumang, D.K., Eshun, A., Hogarh, J.N., Bentum, J.K., Adjei, J.K., Negishi, J., Nakamichi, S., Habibullah-Al-Mamun, M., Masunaga, S., (2017). *Perfluoroalkyl acids (PFAAs) in the Pra and Kakum River basins and associated tap water in Ghana*. Sci. Total Environ. 579, 729–735
- Esteban S, Gorga M, Petrovic M, Gonzalez-Alonso S, Barcelo D, et al. (2014). *Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain*. Sci Total Environ;466–467:939–51
- European Molecular Biology Laboratory (December 29/2015). CHEBI:50114 – estrogen
- European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, 1996
- Evans, H. J. (1997). *Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 392(1), 5-10
- Fechner, P., Damdimopoulou, P., Gauglitz, G., (2011). *Biosensors paving the way to understanding the interaction between cadmium and the estrogen receptor alpha*. PLoS ONE 6 (8), e23048
- Fent, K. (2003). *Ecotoxicological problems associated with contaminated sites*. Toxicology letters, 140, 353-365
- Fent, K., & Stegeman, J. J. (1991). *Effects of tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish Stenotomus chrysops*. Aquatic Toxicology, 20(3), 159-168
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., (2006). *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquat. Toxicol. 76, 122-159
- Ferrara, F., Funari, E., De Felip, E., Donati, G., Traina, M.E., Mantovani, A., (2001). *Alchilfenoli: valutazione dei rischi per gli ecosistemi acquatici e per la salute umana con particolare riferimento agli interferenti endocrini*. Annali dell'istituto superiore di sanità, 37 (4): 615-625
- Fine, D.D., Breidenbach, G.P., Price, T.L., Hutchins, S.R., (2003). *Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography–negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1017, 167–185
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., & Wallace, E. (2012). *Bisphenol A exposure, effects and policy: a wildlife perspective*. Journal of Environmental Management, 104, 19-34
- Frye, C., Bo, E., Calamandrei, G., Calza, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M., ... & Patisaul, H. B. (2012). *Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems*. Journal of neuroendocrinology, 24(1), 144-159
- Fu, M., Li, Z., Gao, H., (2007). *Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers*. Chemosphere 69:1009-1016
- Gibson, R., Duran-Alvarez, J., Leon Estrada, K., Chavez, A., Jimenez Cisneros, B., (2010). *Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential*

endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. Chemosphere 81: 1437-1445

Goldey, E. S., Kehn, L. S., Lau, C., Rehnberg, G. L., & Crofton, K. M. (1995). *Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats.* Toxicology and applied pharmacology, 135(1), 77-88

González-Alonso, S., Merino, L. M., Esteban, S., de Alda, M. L., Barceló, D., Durán, J. J., ... & Silva, A. (2017). *Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region.* Environmental Pollution, 229, 241-254

Gore, A.C., et.al., (2014). *Introduction to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)- A Guide for Public Interest Organizations and Policy-makers*

Green, R., Hauser, R., Calafat, A. M., Weuve, J., Schettler, T., Ringer, S., ... & Hu, H. (2005). *Use of di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono (2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants.* Environmental health perspectives, 113(9), 1222

Grün, F., & Blumberg, B. (2006). *Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling.* Endocrinology, 147(6), s50-s55. M. Golub, J. Doherty, Triphenyltin as a potential human endocrine disruptor, J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 7 (2004) 281-295

Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T., (2002). *Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food.* Environ. Sci. Technol. 136: 1676-1680

Gumbi, B. P., Moodley, B., Birungi, G., & Ndungu, P. G. (2017). *Detection and quantification of acidic drug residues in South African surface water using gas chromatography-mass spectrometry.* Chemosphere, 168, 1042-1050

Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Mazur, A., & Wojcieszewska, D. (2013). *Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku.* Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 1, 105–112 (in Polish)

Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H.C., Jorgensen, S.E., (1998). *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review.* Chemosphere 36 (2), 357-393

Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Aho, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J. S., Zhang, X., & Giesy, J. P. (2010). *Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka *Oryzias latipes* and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*.* Aquatic Toxicology, 98, 256–264

Haug, L.S., Salihovic, S., Jogsten, I.E., Thomsen, C., van Bavel, B., Lindstrom, G., Becher, G., (2010). *Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway.* Chemosphere 80, 1137-1143

Heberer, T., (2002). *Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.* Toxicol. Lett., 131, 5-17

Henry, D., (2013). *Widely used Diclofenac Associated With Increased Risk for Cardiovascular Events.* Heartwire, Toronto www.medscape.com

- Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A.R. Barcelò, D., (2006). *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*. Talanta 69, 334-342
- Herzke, D., Huber, S., Bervoets, I., D'Hollander, W., Hajslova, J., Pulkrabova, J., Brambilla, G., De Filippis, S.P., Klenow, S., Heinemeyer, G., de Voogt, P., (2013). *Perfluorinated alkylated substances in vegetables collected in four European countries; occurrence and human exposure estimations*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 20, 7930-7939
- Higgins, C.P., Luthy, R.G., (2006). *Sorption of perfluorinated surfactants on sediments*. Environ. Sci. Technol. 40, 7251-7256
- Hoeger, B., Dietrich, D.R., Schmid, D., Hartmann, A., Hitzfeld, B., (2008). *Distribution of intraperitoneally injected Diclofenac in brown trout (Salmo trutta f. fario)* Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 412-418
- Hoffmann B, Evers P. (1986). *Anabolic agents with sex hormonelike activitie: problems of residues*. In: Rico AG, editor. Drug residues in animals. New York: Academic Press:111–46
- Hofseth, L., Raafat, A.M., Osuch, J.R., Pathak, D.R., Slomski, C.A., Haslam, S.Z., (1999). *Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 4559-4565
- Hu JY, Xie GH, Aizawa T. (2002). *Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity*. Environ Toxicol Chem; 21(10):2034-9
- Hunt, P. A., Koehler, K. E., Susiarjo, M., Hodges, C. A., Ilagan, A., Voigt, R. C., ... & Hassold, T. J. (2003). *Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse*. Current biology, 13(7), 546-553
- Huppert, N., Würtele, M., & Hahn, H. H. (1998). *Determination of the plasticizer N-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical Ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME)*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 362(6), 529-536
- Johnson, A.C., Belfroid, A., Di Corcia, A.D., (2000). *Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent*. Sci. Total Environ. 256, 163–173
- Jung, J.W., Park, S.B., Lee, S.J., et al, (2011). *Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression*. PLoS One 6 (11), e28068
- Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). *A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health*. Environmental toxicology and pharmacology, 40(1), 241-258
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, (2012). *Basic and clinical pharmacology*. 12 ed. New York: Mc Graw Hill Lange
- Kidd, K.A., Becher, G., Bergman, A., Muir, D.C.G., Woodruff, T.J., (2012). *Human and wildlife exposures to EDCs*. Chapter 3. State of the science of endocrine disrupting chemicals. UNEP, 189-250

- Kim, J.Y., Yi, B.R., Go, R.E., Hwang, K.A., Nam, K.H., Choi, K.C., (2014). *Methoxychlor and triclosan stimulates ovarian cancer growth by regulating cell cycle and apoptosis-related genes via an estrogen receptor-dependent pathway*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 37, 1264-1274
- Kim, S.S., Kwack, S.J., Lee, R.D., Limm, K.J., Rhee, G.S., et al., (2005). *Assessment of estrogenic and androgenic activities of tetramethrin in vitro and in vivo assays*. J. Toxicol. Environ. Health A 68 (23-24), 2277-2289
- Kiyama, R., & Wada-Kiyama, Y. (2015). *Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action*. Environment international, 83, 11-40
- Knight WM. (1980). *Estrogens administered to food-producing animals: environmental considerations*. In: McLachlan JA, editor. Estrogens in the environment. Developments in toxicology and environmental science, New York: Elsevier/North Holland, 5:391–401
- Koldovsky O, Thornburg W. (1987). *Hormones in milk*. J Pediatr Gastroenterol Nutr;6(2):172–96
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Bartsch, H., Zwirner, M., & Hagenmaier, H. (1998). *Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals*. Chemosphere, 37(9), 2395-2407
- Kunacheva, C., Tanaka, S., Fujii, S., Boontanon, S.K., Musirat, C., Wong-wattana, T. et al. (2011). *Mass flows of perfluorinated compounds (PFCs) in central wastewater treatment plants of industrial zones in Thailand*. Chemosphere, 83, 737-744
- Lacey Jr., J.V., Mink, P.J., Lubin, J.H., et al., (2002). *Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer*. JAMA 288, 334-341
- Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP. (2001). *Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*)*. Environ Tox Chem;20(6):1216-27
- Lee, D. H., Lee, I. K., Song, K., Steffes, M., Toscano, W., Baker, B. A., & Jacobs, D. R. (2006). *A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes*. Diabetes care, 29(7), 1638-1644
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., Choi, K., (2011). *Chronic exposure to Diclofenac on two freshwaters cladocerans and Japanese medaka*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 1216-1225
- Li, D., Zhou, Z., Qing, D., He, Y., Wu, T., Miao, M., Wang, J., Weng, X., Ferber, J.R., Herrington, L.J., Zhu, Q., Gao, E., Checkoway, H., Yuan, W., (2010). *Occupational exposure to bisphenol A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction*. Hum. Reprod. 25, 519-527
- Liao, X., Zhang, C., Yao, L., Li, J., Liu, M., Xu, L., Evalde, M., (2014). *Sorption behavior of nonylphenol (NP) on sewage-irrigated soil: kinetic and thermodynamic studies*. Sci Total Environ. 473-474: 530-536
- Lin, Y. C., Lai, W. W. P., Tung, H. H., & Lin, A. Y. C. (2015). *Occurrence of pharmaceuticals, hormones, and perfluorinated compounds in groundwater in Taiwan*. Environmental monitoring and assessment, 187(5), 256
- Lind, P. M., & Lind, L. (2011). *Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly*. Atherosclerosis, 218(1), 207-213

- Lockwood, G. F.; Albert, K. S.; Gillespie, W. R.; Bole, G. G.; Harkcom, T. M.; Szpunar, G. J.; Wagner, J. G. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1983**, 34, 97-103
- Lonappan, L., Pulicharla, R., Rouissi, T., Brar, S.K., Verma, M., Surampalli, R.Y., Valero, J.R., (2016). *Diclofenac in municipal wastewater treatment plan: quantification using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry approach in comparison with an established liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method.* *J. Chromatogr. A* 1433, 106-113
- Loos R, Locoro G, Huber T, Wollgast J, Christoph EH, de Jager A, et al. (2008) *Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy.* *Chemosphere*;71:306–13
- Loos, R., Wollgast, J., Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Huber, T., Locoro, G., ... & Moche, W. (2008). *Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water.* *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(1), 89-95
- Lopez-Espinosa, M.J., Freire, C., Arrebola, J.P., Navea, N., Taoufiki, J., Fernandez, M.F., Ballesteros, O., Prada, R., Olea, N., (2009). *Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain.* *Chemosphere* 76, 847– 852
- LoyoRosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A., (2004). *Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate.* *J. Agr. Food Chem.* 52: 2016-2020
- Lu, Z., Gan, J., (2014). *Isomer-specific biodegradation of nonylphenol in river sediments and structure-biodegradability relationship.* *Environ. Sci. Technol.* 48:1008-1014
- Maggioni, S., Balaguer, P., Chiozzotto, C., Benfenati, E., (2013). *Screening of endocrine disrupting phenols, herbicides, steroid estrogens and estrogenicity in drinking water from the waterworks of 35 Italian cities and from PET-bottled mineral water.* *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20:1649-1660
- Magi E, Di Carro M, Liscio C. (2010). *Passive sampling and stir bar sorptive extraction for the determination of endocrine-disrupting compounds in water by GC-MS.* *Anal Bioanal Chem*;397:1335–45
- Maqbool, F., Mostafalou, S., Bahadar, H., & Abdollahi, M. (2016). *Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms.* *Life sciences*, 145, 265-273
- Marchlewicz, A., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2015). *Over-the-counter monocyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment—sources, risks, biodegradation.* *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(10), 355
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., & Caminal, G. (2009). *Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*.* *Chemosphere*, 74, 765– 772
- Marsik, P., Rezek, J., Židková, M., Kramulová, B., Tauchen, J., & Vaněk, T. (2017). *Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic.* *Chemosphere*, 171, 97–105
- Masuo, Y., Morita, M., Oka, S., & Ishido, M. (2004). *Motor hyperactivity caused by a deficit in dopaminergic neurons and the effects of endocrine disruptors: a study inspired by the physiological roles of PACAP in the brain.* *Regulatory peptides*, 123(1), 225-234

- Meekker, J.D., Calafat, A.M., Hauser, R., (2010). *Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in man from an infertility clinic.* Environ. Sci. Technol. 44, 1458-1463
- Meffe, R., & de Bustamante, I. (2014). *Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy.* Science of the Total Environment, 481, 280-295
- Meierjohann, A., Brozinski, J. M., & Kronberg, L. (2016). *Seasonal variation of pharmaceutical concentrations in a river/lake system in Eastern Finland.* Environmental Science: Processes & Impacts, 18(3), 342-349
- Mellanen, P., Petanen, T., Lehtimaki, J., Makela, S., Bylund, G., Holmbom, B., et al., (1996). *Woodderived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 136 (2), 381-388
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S., (2010). *Association of urinary bisphenol A concentration with hearth disease: evidence from NHANES 2003/06.* PLoS One 5. e8673
- Micic, V., Hofmann, T., (2009). *Occurence and behaviour of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River.* Environ. Pollut. 157:2759-2768
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., ... & Nakao, K. (2002). *Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 87(11), 5185-5190
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., & Roperio, A. B. (2009). *The pancreatic β -cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes.* Molecular and cellular endocrinology, 304(1), 63-68
- Nania, V., Pellegrini, G.E., Fabrizi, I., Sesta, G., Sanctis, P.D., Lucchetti, D., Pasquale, M.D., Coni, E., (2009). *Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea.* Food Chem. 115, 951-957
- Nannou, C. I., Kosma, C. I., & Albanis, T. A. (2015). *Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment.* International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 95(13), 1242-1262
- National Center for Biotechnology Information. (CID=5757). Pubchem, summary for CID 5757 (estradiol). (online: January 5/2016)
- Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., Jefferson, W. N., & Heindel, J. J. (2008). *Effects of endocrine disruptors on obesity.* International journal of andrology, 31(2), 201-208
- Newbold, R. R., Padilla-Banks, E., Snyder, R. J., & Jefferson, W. N. (2007). *Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity.* Molecular nutrition & food research, 51(7), 912-917
- Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., (2007). *Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract.* Reprod. Toxicol. 253-258
- Nicolopoulou-Stamati, P., Pitsos, M.A., (2001). *The impact of endocrine disrupters on the female reproductive system.* Oxford J. Hum. Reprod. Update 7 (3), 323-330

- Noorlander, C.W., van Leeuwen, S.P., Te Biesebeek, J.D., Mengelers, M.J., Zeilmaker, M.J., (2011). *Levels of perfluorinated compounds in food and dietary intake of PFOS and PFOA in the Netherlands*. J. Agric. Food Chem. 59, 951-957
- Paíga, P., Santos, L. H., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., & Delerue-Matos, C. (2016). *Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation*. Science of The Total Environment, 573, 164-177
- Pailler, J. Y., Pfister, K. L., Hoffmann, L., & Guignard, C. (2009). *Solid phase extraction coupled to liquid chromatography– tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg*. Science of the Total Environment, 40, 4736–4743
- Pal R, Megharaj M, Kirkbride KP, Nidu R. (2013). *Illicit drugs in the environment — a review*. Sci Total Environ;463–464:1079–92
- Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M., (2010). *Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects*. Sci. Total Environ. 408, 6062–6069
- Palmer, E., (2012). *Top 20 genetic molecules worldwide* www.fiercepharma.com
- Pan B, Ning P, Xing B. (2009). *Part V — sorption of pharmaceuticals and personal care products*. Environ Sci Pollut Res;16:106–16
- Pape-Zambito DA., Roberts RF, Kensinger RS. (2010). *Estrone and 17 β - estradiol concentrations in pasteurized-homogenized milk and commercial dairy products*. J Dairy Sci;93(6):2533–40
- Parada Jr., H., Wolff, S.M., Khankari, N.K., Neugut, A.I., et al., (2016) *Mar. Polychlorinated biphenyls and their association with survival following breast cancer*. Eur. J. Cancer 56, 21-30
- Patrolecco, L., Capri, S., De Angelis, S., Pagnotta, R., Polesello, S., Valsecchi, S., (2006). *Partition on nonylphenol and related compounds among different aquatic compartments in Timber River (Central Italy)*. Water Air Soil Poll. 172: 151- 166
- Poirier, P., & Després, J. P. (2003). *Waist circumference, visceral obesity, and cardiovascular risk*. Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention, 23(3), 161-169
- Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A., (2007). *Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*. Environ. Int. 33:929-936
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Deretzi, G., Zavos, C., Mantzoros, C.S., (2012). *The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistant: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease*. Curr. Mol. Med. 12 (1), 68-82
- REACH(Regolamento CE n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 settembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche)
- Regolamento 1223/2009/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici
- Regolamento 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle

miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) 1907/2006

Regolamento 1881/2006/CE della Commissione, del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari

Regolamento 1935/2004/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 ottobre 2004, riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE

Regolamento 315/93/CEE del Consiglio, dell'8 febbraio 1993, che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari

Regolamento 321/2011 della Commissione, del 1 aprile 2011, per quanto riguarda le restrizioni d'uso del Bisfenolo A nei biberon di plastica

Regolamento 528/2012/UE, del 22 maggio 2012, relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi

Reinholds, I., Pugajeva, I., Zacs, D., Lundanes, E., Rusko, J., Perkons, I., & Bartkevics, V. (2017). *Determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in aquatic samples by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry combined with carbon nanotubes-based solid-phase extraction*. *Environmental monitoring and assessment*, 189(11), 568

Remillard, R. B., & Bunce, N. J. (2002). *Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility*. *Environmental health perspectives*, 110(9), 853

Rikz (2001) *Chemical study on bisphenol A*. RIKZ/2001.027. Technical report. Rijksinstituut voor Kust en Zee, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, The Netherlands

Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M. Â., & Rocha, E. (2016). *Pollution by endocrine disruptors in a southwest European temperate coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal)*. *Environmental monitoring and assessment*, 188(2), 101

Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Pardal, M. Â., & Rocha, E. (2015). *Toxicological relevance of endocrine disruptors in the Tagus River estuary (Lisbon, Portugal)*. *Environmental monitoring and assessment*, 187(8), 483

Rozman, K., Gorski, J. R., Rozman, P., & Parkinson, A. (1986). *Reduced serum thyroid hormone levels in hexachlorobenzene-induced porphyria*. *Toxicology letters*, 30(1), 71-78

Saeidnia, S., & Abdollahi, M. (2013). *Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases*. *Toxicology and applied pharmacology*, 273(3), 442-455

Sanderson, J. T. (2006). *The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals*. *Toxicological sciences*, 94(1), 3-21

Schaffer M, Boxberger N, Börnick H, Licha T, Worch E. *Sorption influenced transport of ionizable pharmaceuticals onto a natural sandy aquifer sediment at different pH*. *Chemosphere* 2012;87:513–20

Scheurell, M., Franke, S., Shah, R.M., Huhnerfuss, H., (2009). *Occurrence of Diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan*. *Chemosphere* 77, 870-876

- Schmid, W. (1975). *The micronucleus test*. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, 31(1), 9-15
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., Quinn, B., (2011). *Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and Diclofenac on the marine mussel (Mytilus spp.) and their comparison with standardized toxicity tests*. Mar. Pollut. Bull. 62, 1389-1395
- Schröder, P., Helmreich, B., Škrbić, B., Carballa, M., Papa, M., Pastore, C., Emre, Z., Oehmen, A., Langenhoff, A., Molinos, M., Dvarioniene, J., Huber, C., Tsagarakis, K. P., Martinez- Lopez, E., Meric Pagano, S., Vogelsang, C., & Mascolo, G. (2016). *Status of hormones and painkillers in wastewater effluents across several European states—considerations for the EU watch list concerning estradiols and Diclofenac*. Environmental Science and Pollution Research, 23(13), 12835–12866
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). *Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 127(3), 204-215
- Schultz IR, Orner G, Merdink JL, Skillman A. (2001). *Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17alpha-ethynylestradiol*. Aquat Toxicol;51(3):305-18
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., (2004). *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac*. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. Aquat. Toxicol. 68, 141-150
- Shudong, S., Jingyun, H., Changsheng, Z., (2011). *Polymeric particles for the removal of endocrine disruptors*. Sep. Purif. Rev. 40, 312-337
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. (2008). *Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters*. Environ Int;34(7):1033-49
- Soni, M. G., Carabin, I. G., & Burdock, G. A. (2005). *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)*. Food and chemical toxicology, 43(7), 985-1015
- Soto, A. M., & Sonnenschein, C. (2010). *Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens*. Nature Reviews Endocrinology, 6(7), 363-370
- Soule, HD; Vazquez J; Long A; Albert S; Brennan M. (1973). *"A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma"*. Journal of the National Cancer Institute. 51 (5): 1409–1416
- Sousa, J. C., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. (2018). *A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines*. Journal of hazardous materials
- Staessen, J. A., Nawrot, T., Den Hond, E., Thijs, L., Fagard, R., Hoppenbrouwers, K., ... & Van Hecke, E. (2001). *Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers*. The Lancet, 357(9269), 1660-1669
- Staples, C., Friederich, U., Hall, T., Klecka, G., Mihaich, E., Ortego, L., et al., (2010). *Estimating potential risk to terrestrial invertebrates and plants exposed to bisphenol A in soil amended with activated sludge biosolids*. Environmental Toxicology & Chemistry, 29, 467-475

- Stumm-Zollinger, E., Fair, G.M., (1965). *Biodegradation of steroid hormones*. J. Water Pollut. Control Fed. 37 (11), 1506-1510
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S. I., Makino, T., & Suzumori, K. (2005). *Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage*. Human reproduction, 20(8), 2325-2329
- Suzuki Y, Kubota A, Furukawa T, Sugamoto K, Asano Y, Takahashi H, Sekito T, Dote Y, Sugimoto Y. (2009). *Residual of 17 β -estradiol in digestion liquid generated from a biogas plant using livestock waste*. J Hazard Mat; 165:677–82
- Tan, B.L.L., Mohd, M.A., (2003). *Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph–mass spectrometer*. Talanta 61, 385–391
- Taniyasu, S., Yamashita, N., Yamazaki, E., Petrick, G., Kannan, K., (2013). *The environmental photolysis of perfluorooctanesulfonate, perfluorooctanoate, and related fluorochemicals*. Chemosphere 90, 1686–1692
- Thomas, K. V., & Hilton, M. J. (2004). *The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries*. Marine pollution bulletin, 49(5), 436-444
- Tong, L., Huang, S., Wang, Y., Liu, H., & Li, M. (2014). *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of Jiangnan Plain, central China*. Science of the Total Environment, 497, 180-187
- Torres, N. H., Aguiar, M. M., Ferreira, L. F. R., Américo, J. H. P., Machado, Â. M., Cavalcanti, E. B., & Tornisielo, V. L. (2015). *Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with Daphnia magna*. Environmental monitoring and assessment, 187(6), 379
- USEPA, (2010). *Bisphenol A Action Plan*. United States Environmental Protection Agency, Washington
- USEPA, (2010). *Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates (NPEs) action plan*. RIN 200-ZA09. Technical report. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Valsecchi, L. G., (2016). *Valutazione della presenza di interferenti endocrini in acque ad uso potabile*. Tesi di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente - Alma Mater Studiorum Università di Bologna (Ravenna, Italia) pp 129-131
- Vassiliadou, I., Costopoulou, D., Kalogeropoulos, N., Karavoltsos, S., Sakellari, A., Zafeiraki, E., Dassenakis, M., Leondiadis, L., (2015). *Levels of perfluorinated compounds in raw and cooked Mediterranean finfish and hellfish*. Chemosphere 127, 117-126
- Veerasingam, S.A., Ali, M.M., (2013). *Assessment of endocrine disruptors-DDTs and DEHP (plasticizer) in source water: a case study from Selangor, Malaysia*. J. Water Health 11 (2), 311-323
- Vestergren, R., Berger, U., Glynn, A., Cousins, I.T., (2012). *Dietary exposure to perfluoroalkyl acids for the Swedish population in 1999, 2005 and 2010*. Environ. Int. 49, 120-127
- Viganò L, Mandich A, Benfenati E, Bertolotti R, Bottero S, Porazzi E, et al. (2006). *Investigating the estrogenic risk along the River Po and its intermediate section*. Arch Environ Contam Toxicol;51:641–51
- Vikelsee, J., Thomsen, M., Carlsen, L., (2002). *Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils*. Sci. Total Environ., 296: 105-116

- Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., Guidotti, M., (2004). *Nonylphenols in freshwaters of the hydrologic system of an Italian district: association with human activities and evaluation of human exposure*. Chemosphere 57: 1637-1647
- Wang, K., Dong-Dong Fan, D.D., Jin, S., Xing, N., Niu, Y., (2014). *Differential expression of 5-alpha reductase isozymes in the prostate and its clinical implications* Asian. J. Androl. 16 (2), 274-279
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E., (2005). *Fate of endocrine disruptors, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes*. Environ. Sci. Technol. 39 (17), 6649-6663
- WHO, *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals: An Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors Prepared by a Group of Experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO*, 2013 296
- World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality*, 3rd Edition, Geneva, WHO, 2008
- Wright-Walters M, Volz C, Assessment E. (2007). *Municipal wastewater concentrations of pharmaceutical and xeno-estrogens: Wildlife and human health implications*. In Proceedings of the 2007 national conference on environmental science and technology 3:103–13. doi:10.1007/978-0-387-88483-7_15
- Wu, Z.B., Zhang, Z., Chen, S.P., He, F., Fu, G.P., Liang, W., (2007). *Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China*. Fresen Environ. Bull. 16:227-234
- Yang, J., Li, H., Ran, Y., Chan, K., (2014). *Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China*. Chemosphere 107, 439–446
- Zhang, A., Li, Y., & Chen, L. (2014). *Distribution and seasonal variation of estrogenic endocrine disrupting compounds, N-nitrosodimethylamine, and N-nitrosodimethylamine formation potential in the Huangpu River, China*. Journal of Environmental Sciences, 26(5), 1023-1033
- Zhang, T., Sun, H., Lin, Y., Wang, L., Zhang, X., Liu, Y., Geng, X., Zhao, L., Li, F., Kannan, K., (2011). *Perfluorinated compounds in human blood, water, edible freshwater fish and seafood in China: daily intake and regional differences in human exposure*. J. Agric. Food Chem. 59, 11168-11176
- Zhang, Y., Geissen, S.U., Gal, C., (2008). *Carbamazepine and Diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*. Chemosphere 73, 1151-1161
- Zheng, X.-Q., Shi, Y.-J., Lu, Y.-L. & Xu, X.-B. (2016). *Growth inhibition and DNA damage in the earthworm (Eisenia fetida) exposed to perfluorooctane sulphonate and perfluorooctanoic acid*. Chemistry & Ecology, 32, 103-116
- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. (2005). *Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating Italian aquatic environment*. J Hazard Mater;122:205–9
- Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., & Frimmel, F. H. (2002). *Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors an batch experiments*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372, 569–575

Siti consultati

<http://www.arpa.veneto.it/arpav/pagine-generiche/sostanze-perfluoro-alchiliche-pfas>

<http://www.consorziocer.it/it/p/il-cer/>

<http://www.gruppohera.it/>

<http://www.minambiente.it/pagina/il-percorso-europeo>

<http://www.reach.gov.it/reach-sintesi>

<http://www.reach.sviluppoeconomico.gov.it/reach-in-breve>

http://www.romagnacque.it/fonti_idriche/ravenna/potabilizzatore_della_standiana

<https://www.echa.europa.eu/regulations/reach>

Ringraziamenti

Ringrazio Romagna Acque-Società delle Fonti S.p.A per aver stimolato e finanziato la presente ricerca. Ringrazio inoltre il personale per la collaborazione nel corso dei prelievi di acqua e per le visite guidate all'impianto di potabilizzazione.

Ringrazio la Prof.ssa Elena Fabbri, la quale mi ha permesso di svolgere un lavoro di tesi su un tema di mio forte interesse, non che di attuale importanza, e la Dott.ssa Paola Valbonesi, che con estrema simpatia e dedizione mi ha accompagnata nel corso di questi mesi di ricerca.

Ringrazio la mia famiglia, in particolare i miei genitori, Paola e Renzo, mio esempio, mio punto di riferimento, mio costante insegnamento. Grazie per avermi sostenuta in questi anni di formazione universitaria, la quale ha contribuito ad arricchirmi sul piano istruttivo e culturale, ma soprattutto su quello personale. A voi devo la persona che sono, a voi devo tutto questo.