



©kairisky/www.shutterstock.com

Yeast Estrogen Screen

(*Saccharomyces cerevisiae* RMX 326)

Test per la valutazione della presenza di sostanze simil-estrogeniche (ftalati) in prodotti alimentari

ULRICA ILARIA ANGELA VITALE
Biologa Nutrizionista

È stata condotta una indagine sulla costituzione dei filtri-tessuto delle bustine di tè, comunemente in commercio. Si è accertato, per la prima volta, che in essi vi è la presenza di ftalati; questi si ritrovano anche nella bevanda ottenuta dall'infuso corrispondente (tè+filtro). Nei filtri esaminati sono stati individuati sedici diversi ftalati e tra questi ve ne sono tre (DEHP) (BBP) (DBP) già messi al bando nel 2006 dalla CE quali sostanze tossiche per la salute umana. La metodica di tipo biologico è stata affiancata da quella di tipo chimico che è stata effettuata attraverso gas-cromatografia-spettrofotometria di massa. La presenza di questi ftalati induce a riflettere sulle possibili conseguenze sulla salute umana.

Introduzione

Il tè, è costituito dalle foglie di una pianta affine alle camelie, la *Camelia* e con esse si prepara l'infuso che è usato come bevanda. Questa esercita un'azione leggermente eccitante sul sistema nervoso, aumenta la pressione sanguigna, favorisce la digestione e la diuresi; ha acclerate proprietà antiossidanti.

Il tè venne introdotto in Europa dalla Compagnia olandese delle Indie verso la metà del secolo XVI; però solo un secolo più tardi si diffuse l'uso della bevanda, specie in Inghilterra.

Tra i più antichi paesi produttori di tè ci sono Cina, Giappone, India e Ceilon, dove il tè è conosciuto da oltre mille anni. Il tè può essere verde o nero, ma le foglie che li costituiscono sono le stesse e la distinzione deriva dalla fermentazione che si fa avvenire nel tè nero (Delaveau P. et al.)

Per l'indagine in questione è stato utilizzato il tè nero, commercializzato in bustine monodose.

Gli ftalati sono ottenuti per esterificazione tra l'anidride ftalica e un alcol opportuno, generalmente compreso tra i 6 ed i 13 atomi di carbonio (Klaus Weissermel et al. 2003). Fanno parte della categoria di sostanze classificate quali interferenti endocrini (Endocrine Disruptor Compounds = EDCs) (Giorgio Bonaga et al. 2011). Secondo la definizione adottata dalla Unione Europea

"un Interferente Endocrino è una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto) popolazione". European Commission (2-4 December, 1996).

Gli ftalati sono i plastificanti più co-

muni al mondo. Sono una famiglia di sostanze chimiche usate da oltre 50 anni, principalmente per rendere morbido e flessibile il cloruro di polivinile (PVC). (European Union, 2004); (European Union, 2007); (Ruthann A. Rudel et al. 2009).

Molti altri sono, però, gli usi degli ftalati, ad esempio impediscono allo smalto per unghie di sfaldarsi, consentono al profumo di durare più a lungo, si aggiungono a saponi, deodoranti, adesivi, sigillanti, pigmenti delle vernici (Shen H et al. 2007).

Da studi effettuati si è accertato che cibi grassi come il latte, burro e carni sono una fonte importante di accumulo di ftalati (Rhind SM. 2007) (Kusu R et al. 2008) (Damstra T. 2002) Sannino A. (2010).

Inoltre ftalati a basso peso molecolare come DEP, DBP, possono essere assorbiti per via cutanea. L'esposizione per inalazione è anche significativa con gli ftalati più volatili (Guo Y et al. 2011).

Gli ftalati sono, altresì, classificati quali Persistent Organic Pollutants (POPs) e come tali sono persistenti nell'ambiente (aria, acqua, suolo), il loro bioaccumulo avviene attraverso la catena alimentare, determinano effetti nocivi sulla salute umana e sull'ambiente (Per Axel Clausen et al. 2004). L'esposizione agli ftalati è ubiquitaria per l'ambiente e per l'uomo (Schettler T. 2006); la Comunità Europea ha più volte esaminato le problematiche relative all'uso di ftalati. (CE 2002)(CE 2003/04) (CE 2008 a) (CE 2008 b)

b) (Regolamento CE n° 1907/2006-REACH) REGOLAMENTO (UE) N. 109/2012 DELLA COMMISSIONE del 9 febbraio 2012 recante modifica del regolamento (CE) n. 1907/2006.

Considerazioni sul ruolo degli Ftalati sullo stato di salute

Gli ftalati vanno ad interferire con il normale funzionamento del sistema endocrino, con ripercussioni dannose che possono provocare alterazioni degli organi, delle funzioni del sistema riproduttivo, dello sviluppo dell'organismo, fino all'insorgenza di tumori. (Diamanti-Kandarakis E. et al. 2009) (Lewis et al. 2001) (Muto et al. 2002). Si verifica una modifica del funzionamento in particolare della tiroide (Meeker J D et al. 2008) (Meeker J D. 2011) (Ferguson KK et al. 2012) (G. Bonaga et al. 2011). Gli ftalati risultano avere capacità di bio-accumulo nei tessuti biologici (avendo carattere lipofilo) per cui li troviamo nei tessuti e nel latte di ruminanti, in determinate condizioni di esposizione (Rhind et al. 2007) (Frederiksen H et al. 2007). Le donne che partoriscono prematuramente hanno, in media, fino a tre volte il livello di ftalati nelle urine rispetto alle donne che portano a termine la gravidanza (Giuseppe Latini et al. 2003). I bambini, specialmente i più piccoli, sono particolarmente a rischio; è stato dimostrato che l'esposizione dei bambini

agli ftalati influisce in modo più drastico rispetto agli adulti sia per il loro metabolismo più elevato, sia per il minore peso corporeo, sia per il consueto portare

tutto dalla mano alla bocca (Jan Sundell et al. 2009) (John D. Meeker.

2012). Gli ftalati ridurrebbero anche il livello di

testosterone, che gioca un ruolo critico nello sviluppo cerebrale (Toppari J. et al. 1996/2006) (Gray, EL et al. 2000).



©Millof/www.shutterstock.com

Limiti di legge per gli Ftalati

Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 sulle sostanze chimiche e il loro uso sicuro: "La Commissione Europea ritirerà gradualmente dal mercato sei sostanze pericolose entro i prossimi tre-cinque anni, a meno che le imprese non abbiano avuto un'autorizzazione ad usarle". Tra queste sostanze troviamo i seguenti tre ftalati:

- di (2-etilesil) ftalato (Dehp),
- ftalato benzilico butilico (Bbp),
- ftalato dibutilico (Dbp) (REACH 2006).

Altrei i cinque ftalati DEHP, DBP, BBP, DINP, DIBP, DNOP, sono inseriti nell'allegato XVII del Regolamento Reach, quali sostanze SVHC (Substances Very High Concern) "sostanze estremamente preoccupanti". Per questi ftalati il limite di concentrazione non deve essere superiore allo 0,1% della massa del materiale plastificato nei giocattoli e negli articoli di puericoltura (Al fine del presente punto, per "articoli di puericoltura" si intende qualsiasi prodotto destinato a conciliare il sonno, il rilassamento, l'igiene, il nutrimento e il succhiare dei bambini) (Regolamento CE N. 552/ 2009) (REACH 16 gennaio 2010) (Reach, acronimo di Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals). Per quanto riguarda il TDI (tolerable daily intake) vi sono valori di riferimento solo per pochi ftalati (tab.1) (Public Health Europa Phthalates-Salute e tutela dei consumatori).

Materiali e metodi

Valutazione della presenza di ftalati nei filtri tessuto delle bustine di tè mediante due diverse metodiche.

Per valutare la presenza di ftalati (sostanze chimiche simil-estrogeniche) che sospettavamo essere presenti nei filtri delle bustine dei tè in commercio, abbiamo utilizzato, - in una prima fase, lo YES test (Yeast Estrogen Screen), eseguito nei nostri laboratori - in una seconda fase, la gas-croma-

tografia-spettrofotometria di massa per un'ulteriore conferma e approfondimento del significato dei risultati ottenuti; indagine

eseguita dal Laboratorio Chimico Merceologico, LCM, sito in Corso Meridionale, 58, Napoli (Camera del Commercio).

Riportiamo i risultati dei primi due esperimenti effettuati:

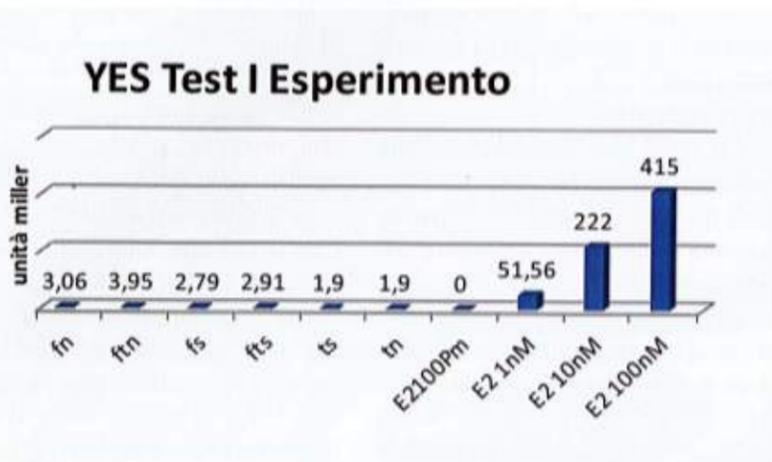


Figura 1.1 Confronto unità miller tra diversi campioni e E2 (estrazione dei campioni è fatta in 50ml di acqua milli Q portata a ebollizione)

- fs = filtro-tessuto del tè in bustina n° 1;
- fn = filtro-tessuto del tè in bustina n° 2;
- E 2 = estrogeno campione
- fts = filtro-tessuto del tè in bustina n° 1 + il contenuto di tè corrispondente;
- fnn = filtro-tessuto del tè in bustina n° 2 + il contenuto di tè corrispondente;

FTALATI(SVHC)	F-1 mg/kg	F-2 mg/kg	F-3 mg/kg	Infuso F1+T1 mg/kg	TDI (mg/Kg/die)	% limite mg/kg
Bis(2EtilsilFtalato) (DEHP)	4,03	25,88	0,41	0,21	0,05	0,1%
Butilbenzil Ftalato (BBP)	1,19	26,40	0,41	0,11	0,5	0,1%
Di-N-Butil Ftalato (DBP)	2,25	9,15	0,97	0,02	0,01	0,1%
Di-N-Octil Ftalato (DNOP)	3,92	19,35	3,44	0,01	non disponibile	0,1%
Diisobutil Ftalato (DIBP)	2,25	10,35	1,14	0,03	non disponibile	0,1%

Tab. 1 Valori di 5 ftalati SVHC (Substances Very High Concern) (Sostanze estremamente preoccupanti) trovati nei campioni esaminati (F-1, F-2, F-3 infuso F1 + T1) relativi a: analisi gas cromatografica-spettrofotometria di massa, TDI e % limite (limiti percentuali da non superare nella massa del materiale plastificato nei giocattoli e negli articoli di puericoltura).

Abbreviazione:

- F-1 = filtro-tessuto della bustina di tè n° 1;
- F-2 = filtro-tessuto della bustina di tè n° 2;
- F-3 = filtro-tessuto della bustina di tè n° 3;
- F1+T1 = filtro-tessuto F1+foglioline di tè in esso contenute.

- TDI = tolerable daily intake (dose giornaliera tollerabile).
- % limite =limiti percentuali da non superare nella massa del materiale plastificato nei giocattoli e negli articoli di puericoltura

YES Test II Esperimento

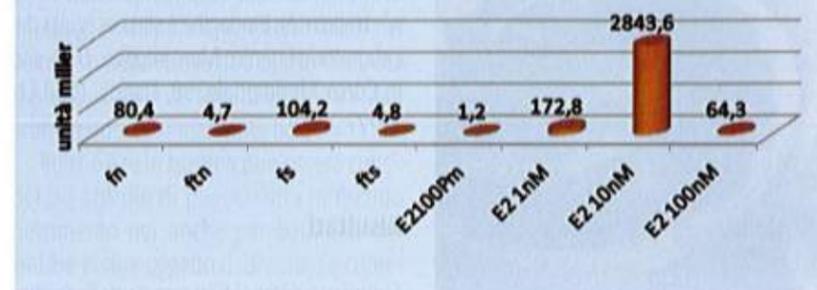


Figura 1.2 Confronto unità miller tra campioni ed E2 (estrazione fatta in 20ml di acqua milli Q)

- fs = filtro-tessuto del tè in bustina n° 1;
- fn = filtro-tessuto del tè in bustina n° 2;
- E 2 = estrogeno campione
- fts = filtro-tessuto del tè in bustina n° 1 + il contenuto di tè corrispondente;
- fnn = filtro-tessuto del tè in bustina n° 2 + il contenuto di tè corrispondente;

Prima fase

Yes test (Yeast Estrogen Screen) e suo meccanismo d'azione

I recettori per gli estrogeni (ER), in condizioni basali, sono dei complessi multimerici associati a proteine "heat shock" (hsp 90, hsp 70, hsp 50) e localizzati in gran parte a livello nucleare.

Il legame dell'estrogeno con il relativo recettore causa la dissociazione delle hsp, facendo sì che il complesso si possa legare a siti specifici del DNA, chiamati "elementi estrogeni responsivi" (ERE). La conseguenza di tale legame sarà l'alterazione dell'espressione di alcuni geni target, ed è proprio attraverso il cambiamento dell'espressione genica che gli estrogeni esplicano la loro azione.

Questo meccanismo può essere indotto artificialmente nelle cellule di lievito (Saccharomyces cerevisiae), perché esse contengono la maggior parte del macchinario trascrizionale richiesto dai recettori, sia per legarsi ai rispettivi ormoni sia per attivare la trascrizione.

Il lievito utilizzato nello YES test è Saccharomyces cerevisiae e precisamente il ceppo RMY 326.

CEPPO di Saccharomyces cerevisiae RMY 326

Per effettuare i nostri studi è stata utilizzata una linea di Saccharomyces cerevisiae RMY 326 (Genotipo: his 3 leu2-3, 112 trp 1-1 ura 3-52/hER-TRP1-2µ[pG/ER(G)], ERE-CYC1-LacZ-URA3-2µ[pUC Δ SS-ERE])

Questo ceppo contiene un plasmide [pG/ER(G)], in cui è inserito il gene hER, che esprime il recettore estrogenico umano α ed un altro plasmide [pUCΔSS-ERE], in cui è presente il gene reporter Lac Z di Escherichia Coli, che codifica per l'enzima β-galattosidasi. In questo sistema, il recettore, attivato dal legame con un estrogeno o con una sostanza simil-estrogenica (interferente endocrino), si legherà a sua volta alla sequenza estrogeno-responsiva (ERE), che si trova a monte del gene LacZ, determinando, così, in presenza del substrato, l'espressione di tale gene e la conseguente produzione dell'enzima β-galattosidasi; questo enzima verrà, quindi, secreto nel mezzo di coltura, dove metabolizzerà il substrato, rappresentato dall'ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galattopiranoside). L'attivazione del recettore è dovuta alla formazione di un complesso recettore-ligando che causa l'espressione del gene reporter LacZ. La produzione dell'enzima β-galattosidasi è misurata con uno spettrofotometro (OD- 420nm). Per il mantenimento del ceppo, le cellule di lievito ricombinante vengono conservate in glicerolo al 40% a

FTALATI (SVHC)	EFFETTI TOSSICI	UE DIVIETO
Bis(2-Etilsil Ftalato) (DEHP)	✓ Riproduzione ✓ Fertilità ✓ Sviluppo	VIETATO In tutti i giocattoli e articoli di puericoltura e nei cosmetici
Butilbenzil Ftalato (BBP)	✓ Riproduzione ✓ Sviluppo	VIETATO In tutti i giocattoli e articoli di puericoltura e nei cosmetici
Di-N-Butil Ftalato (DBP)	✓ Riproduzione ✓ Sviluppo	VIETATO In tutti i giocattoli e articoli di puericoltura e nei cosmetici
Di-N-Octil Ftalato (DNOP)	✓ Fegato ✓ Tiroide	
Diisobutil Ftalato (DIBP)	✓ Riproduzione ✓ Sviluppo	

Tab. 2 - Ftalati SVHC (Substances Very High Concern): effetti tossici di 5 ftalati (sui 16 contenuti in ogni filtro) trovati nei campioni esaminati e divieto di utilizzo da parte della Unione Europea per alcuni di essi.



©Africa Studio/www.shutterstock.com.

-20° C. Per l'utilizzo delle cellule si è proceduto con lo scongelamento e la preparazione del mezzo di coltura.

Tre giorni per l'esecuzione dello *yes test*

Primo giorno: messa in coltura, a 37°C per 24 ore, delle cellule di lievito che erano state scongelate, per ottenere una crescita in fase esponenziale.

Secondo giorno: preparazione dei campioni (gli infusi) e messa a contatto di questi con la sospensione di lievito.

Terzo giorno: interpretazione dei risultati mediante lettura spettrofotometrica.

Espressione dei risultati

L'attività della β -galattosidasi è normalizzata al numero di cellule campionate e espressa come MILLER UNITS usando la seguente formula: $\text{Miller units} = \frac{1000 \cdot \text{OD}_{420}}{t \cdot V \cdot \text{OD}_{600}}$. T = tempo di incubazione (min); V = volume di coltura usato nel saggio (ml). Alle letture effettuate con lo spettrofotometro viene sottratto il valore di OD del controllo negativo.

Dal confronto dei valori unità miller in questo esperimento si osserva che:

• è presente una risposta di tipo estrogeno nei nostri campioni;
• è corrispondente a ftn (3,95 u.m.)

non è la somma dei dati corrispondenti a $f_n + t_n$ (3,06 u.m. + 1,9 u.m. = 4,96 u.m.).

Quale possa essere il motivo di ciò noi non lo conosciamo, possiamo fare solo qualche ipotesi: flavonoidi (catechine) e ftalati sono classificati entrambi quali interferenti endocrini e potrebbe essere che, sommati (filtro+tè), esercitino, forse, una azione inibitrice sulla espressione del gene che codifica per la β -galattosidasi, ciò che invece non si rileva nella valutazione dei valori di u.m. ottenuti dall'indagine sul solo filtro e da quella sul solo tè.

Dal confronto dei valori unità miller in questo esperimento si osserva che i dati corrispondenti a ftn (4,7 u.m.) e a fts (4,8 u.m.) sono notevolmente inferiori ai dati rilevati per i soli filtri corrispondenti ($f_n = 80,4$ u.m.; $f_s = 104,2$ u.m.); in questo caso potremmo ipotizzare (sullo studio del primo esperimento), che la somma di ftalati del filtro e catechine del tè (nei test filtro+tè) esercitino una azione inibitrice sulla espressione del gene che codifica per la β -galattosidasi.

Seconda fase

Gas-cromatografia-spettrofotometria di massa
Con la gas-cromatografia-spettrofotome-

tria di massa è stata fatta l'estrazione e la determinazione degli ftalati dai campioni, oggetto del nostro studio: tre filtri-tessuto relativi a tre diverse qualità di bustine di tè (tè n° 1, 2, 3) e l'infuso fatto con l'intera bustina del tè n° 1 (filtro+tè). L'indagine è stata eseguita dal Laboratorio Chimico Merceologico, LCM, sito in Corso Meridionale, 58, Napoli, (UNI EN 15777:2009).

Risultati

Ftalati presenti nei filtri-tessuto delle bustine dei tè

Sono stati individuati sedici diversi ftalati nella composizione dei filtri-tessuto dei tè esaminati e nell'infuso:

- dimetili ftalato (DMP) CAS: 131-11-3,
- dietil ftalato (DEP) CAS:84-66-2,
- diisobutil ftalato (DIBP) CAS:201-553-2,
- di-n-butil ftalato CAS:84-74-2,
- bis (2-metossietil) ftalato CAS:117-82-8,
- bis (4-metil-2fenil) ftalato,
- bis (2-etossietil) ftalato,
- diamil ftalato,
- 2-etisil esil ftalato,
- diesil ftalato,
- butil benzil ftalato(BBP) CAS:85-68-7,
- bis (2-n-butossietil) ftalato,
- diciolesil ftalato (DCHP) CAS:84-61-7,
- bis (2-etilesil) ftalato (DEHP): CAS: 117-81-7,
- dinonil ftalato (DNP) 84-76-4),
- di-n-octil ftalato (DNOP) CAS:117-84-0.

Discussione

Cinque di questi ftalati sono inseriti nell'allegato XVII del Regolamento Reach quali sostanze SVHC (Sostanze estremamente preoccupanti) per il loro effetto tossico (Tab. 2); altri ftalati, su elencati, quali il diciolesil ftalato (DCHP) e il dinonil ftalato (DNP) hanno proprietà ecotossicologiche e di distruzione ambientale (Direttive 91/155/CEE del). In tabella n°1 sono evidenziati i valori (mg/Kg) per i 5 ftalati SVHC (scaturiti dall'analisi chimica effettuata), relativi

alla costituzione dei filtri-tessuto n° 1,2,3 e all'infuso completo della bustina di tè n° 1 (filtro F1+tè).

Si nota che i valori riferiti al contenuto degli ftalati nell'infuso sono diminuiti rispetto ai corrispondenti valori rilevati nel solo filtro della stesso tipo di tè (n° 1), ma trattandosi di interferenti endocrini agiscono a dosi estremamente basse.

Poiché il tè in bustina può essere considerato articolo di puericoltura in quanto nutrimento per anche per bambini, dovrebbe essere oggetto di divieto, se contenente ftalati. Si augurano ulteriori studi sui filtri-tessuto di altri prodotti alimentari che si possono avvalere di essi quali involucri contenitori.

Conclusioni

Per la prima volta è accertata la presenza di ftalati sia nei filtri-tessuto delle bustine di tè esaminati sia nella bevanda ottenuta dall'infuso totale (contenuto di tè+ filtro-tessuto). Si auspica la completa assenza degli ftalati nei filtri-tessuto per le seguenti considerazioni: 1 - I valori notevolmente più bassi rilevati nell'infuso totale rispetto a quelli dei soli filtri, sono comunque da valutare con attenzione per la salute dei consumatori perché si verifica il loro bio-accumulo nei tessuti biologici: possono accumularsi nel tessuto adiposo come metaboliti lipofili, avendo essi stessi carattere lipofilo (Hatch, E. et al 2008). 2 - Gli ftalati

in quanto ligandi di PPAR- γ (Peroxisome-proliferator-Activating-Receptor) (Desvergne B. et al 2009), potrebbero svolgere un ruolo nello sviluppo del tessuto adiposo sia aumentandone la massa e sia andando a interessare il suo funzionamento come ghiandola endocrina, influenzando gli ormoni da esso secreti, (leptina, resistina, adinopectina) (Desvergne B et al 2009). (Schmidt JS et al 2012) (Stahlhut, R. et al 2007). 3 - Essendo la leptina, un ormone che influenza il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandole sessuali, ci si interroga sulle possibili conseguenze sulla riproduzione e sulla fertilità causate dal bio-accumulo di ftalati nel tessuto adiposo. (Jeffrey M. Friedman et al. 1998). 4 - La

sommatoria e la frequenza con cui gli ftalati vengono quotidianamente assunti, seppure involontariamente, deve far riflettere sulle possibili conseguenze per lo stato di salute individuale.

Si ringraziano i Proff. Francesco Aliberti e Marco Guida, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Biologia, Laboratorio di Igiene; il dott. Luigi Mita I.N.B.B.-Roma, per le proficue discussioni sull'argomento *sub iudice*; la dott. Cristina Palmiero per la collaborazione in laboratorio nella fase dello "yes test".

Elaborato di tesi sperimentale del dott. Ulrica I.A. Vitale, relatore prof. Marco Guida - Università degli Studi di Napoli "Federico II" - Dipartimento di Biologia, Laboratorio di Igiene. a.a. 2010/11. Corso di Laurea Magistrale in Biologia Generale ed Applicata- Curriculum Nutrizione. ●



©BAGSTOCK/WWW.SHUTTERSTOCK.COM

©Riproduzione riservata