



PFAS E BIOMONITORAGGIO PER LA SALUTE PUBBLICA

I PFAS sono una classe di composti chimici sintetici che tendono ad accumularsi nei fluidi e nei tessuti del corpo umano. Diversi effetti tossici sono stati riportati in associazione ad alti livelli di esposizione. Il biomonitoraggio su sangue si configura, quindi, come uno strumento fondamentale al servizio delle politiche di salute pubblica. Il microcampionamento di tipo Dried Blood Spots (DBS) rappresenta un approccio innovativo e vantaggioso per questo scopo.

Introduzione

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche, indicate con l'acronimo PFAS, rappresentano una classe di composti chimici di sintesi ubiquitari nel mondo moderno. I PFAS sono persistenti nell'ambiente e tendono a bioaccumularsi nei fluidi e nei tessuti umani ed animali.

Dal punto di vista della struttura chimica, i PFAS sono costituiti da uno scheletro carbonioso caratterizzato da saturazioni degli atomi di carbonio con atomi di fluoro e dalla presenza di un gruppo funzionale, solitamente un acido carbossilico o un acido solfonico, al termine della catena (Fig. 1) [1]. La peculiare caratteristica molecolare definisce le proprietà fisiche e chimiche dei PFAS, le quali ne hanno decretato l'intenso impiego per una vasta gamma di applicazioni a partire dagli anni Quaranta in molti prodotti di consumo e settori industriali, quali elettronico, aerospaziale, militare, tessile e dell'automotive. Tali composti, infatti, presentano lipofobicità e idrofobicità al tempo stesso; inoltre, grazie al legame carbonio-fluoro sono altamente resistenti alla degradazione termica [2].

L'allarme PFAS è scattato all'inizio del ventunesimo secolo quando due delle più conosciute molecole, l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS) e l'acido perfluorooctanoico (PFOA), sono state rilevate a concentrazioni quantificabili in parti per miliardo (ppb) in campioni biologici umani. Ricercatori e scienziati hanno iniziato, di conseguenza, ad indagare i possibili effetti tossici provocati dalla presenza di PFAS nell'organismo, evidenziando poi il fatto che, a causa di elevata persistenza, stabilità e tendenza al bioaccumulo, il valore di emivita nel sangue può raggiungere anche un intervallo di tempo pari a otto anni per alcune molecole, influenzando ulteriormente sugli aspetti avversi per la salute umana [3]. È comprensibile, quindi, come ai PFAS sia valsa la denominazione di 'forever chemicals'.

Tossicità ed effetti avversi per la salute umana

In letteratura sono riportati numerosi studi inerenti ai potenziali effetti tossici dei PFAS sulla salute umana. In particolare, alcuni studi epidemiologici hanno cercato di correlare le concentrazioni di PFAS rilevate su sangue umano ai problemi di salute.

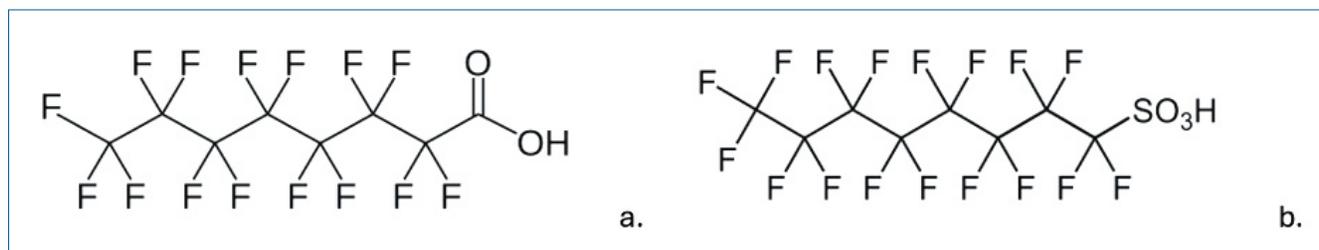


Fig. 1 - Molecole di acido perfluorooctanoico (a) e di acido perfluorooctansolfonico (b)



te dei soggetti appartenenti alla coorte analizzata. Dai più recenti dati pubblicati sono emersi diversi effetti correlati all'esposizione all'agente PFOA [4]: dislipidemia, con particolare riferimento al colesterolo; ipertensione; alterazioni a livello tiroideo; cancerogenicità renale e testicolare; immunosoppressione. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato come i PFAS siano in grado di attraversare la barriera placentare nelle donne in gravidanza, provocando così effetti avversi sul futuro nascituro, tra i quali, possibili ritardi nella crescita e nello sviluppo fisico e mentale.

Alla luce dei dati sperimentali condotti sulla valutazione della cancerogenicità dei due composti più studiati, PFOA e PFOS, nel novembre 2023 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha inserito il PFOA nel Gruppo 1 dei "cancerogeni per l'uomo", mentre il PFOS è stato classificato come "possibilmente cancerogeno" all'interno del Gruppo 2B.

Esposizione dell'uomo a fonti di PFAS

L'organismo umano può essere esposto ad agenti xenobiotici, incluse le sostanze per- e polifluoroalchiliche, attraverso tre vie.

Specificatamente, l'incorporazione di PFAS può aver luogo principalmente secondo le seguenti modalità [5]: ingestione di acqua potabile e di cibi contaminati; inalazione di polveri sia *indoor* sia *outdoor*; contatto dermico con tessuti contenenti i composti in questione. Mentre le prime due vie sono riconducibili soprattutto ad un tipo di esposizione non-occupazionale, la terza può essere tipica di mansioni che riguardano lavoratori altamente esposti ad agenti fluoro-chimici, come ad esempio i vigili del fuoco e i tecnici degli impianti sciistici.

Human Biomonitoring (HBM)

Il biomonitoraggio umano (*Human Biomonitoring*, HBM) si configura come uno strumento di notevole efficacia e beneficio al fine di caratterizzare i livelli di contaminanti ambientali e di tossine esogene presenti nell'organismo, e di offrire quindi informazioni utili per lo sviluppo di politiche di salute pubblica. Esso offre la possibilità di monitorare longitudinalmente le concentrazioni di un pannello di molecole selezionate durante un arco temporale predefinito.

La matrice di elezione sulla quale effettuare le analisi è il sangue, il quale a seguito dell'incorporazione degli xenobiotici attraverso le vie di esposizione illustrate in precedenza, porta ad avere nel circolo sanguigno, in forma legata o libera, quantità di agenti tossici che possono essere facilmente identificati e quantificati [6].

Negli ultimi vent'anni, diversi programmi di biomonitoraggio su larga scala sono stati implementati negli Stati Uniti e in Europa per caratterizzare i livelli di alcuni contaminanti organici persistenti, come i pesticidi organoclorurati e i ritardanti di fiamma bromurati. I biomonitoraggi relativi alle sostanze per- e polifluoroalchiliche sono stati attuati in misura maggiore nel Nord America, luogo in cui si è iniziato a prendere coscienza sulla reale entità dell'emergenza PFAS. In Europa, invece, è nato nel 2020 un ambizioso progetto, l'*Human Biomonitoring for Europe* (HBM4EU), il quale si è prefissato l'obiettivo di armonizzare le procedure di biomonitoraggio di sostanze chimiche [7]. Tra queste, molta attenzione è stata dedicata allo studio dell'esposizione ai PFAS per rintracciare i fattori determinanti che incidono sui livelli di concentrazione e per stabilire dal punto di vista tossicologico la relazione dose-effetto; in tal modo, si conta di poter fornire un supporto nella ridefinizione delle politiche regolatorie.

Selezione del pannello di analiti

L'insieme delle sostanze per- e polifluoroalchiliche è molto ampio. Per quelli che sono gli scopi del biomonitoraggio, le molecole di cui è utile avere dati epidemiologici sono quelle a cui sono stati associati i maggiori effetti avversi per la salute dell'uomo e che sono state misurate ad alte concentrazioni in passato, richiedendo quindi una valutazione della loro variazione nel corso del tempo. Le due principali molecole di interesse sono PFOA e PFOS, a cui si aggiungono PFHxS e PFNA in quanto le regolamentazioni in ambito alimentare gestite dall'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) hanno stabilito i limiti di legge in merito a queste quattro molecole. Il *National Academies of Science, Engineering, and Medicine* (NASSEM) nel 2022 ha pubblicato una guida molto dettagliata circa gli aspetti clinici sull'esposizione e l'analisi di PFAS (*Guidance on PFAS Exposure, Te-*



Fig. 2 - Biomonitoraggio di una coorte di soggetti attraverso l'analisi di campioni DBS

sting, and Clinical Follow-up), dove viene suggerito di misurare 9 PFAS nei campioni di plasma o siero, ovvero MeFOSAA, PFHxS, PFOA (isomeri lineare e ramificato), PFDA, PFUnDA, PFOS (isomeri lineare e ramificato), e PFNA [8].

Tuttavia, l'inclusione dei PFAS emergenti, quali GenX e ADONA, permetterebbe di ottenere un quadro di esposizione più completo in termini qualitativi poiché tali molecole stanno sostituendo gradualmente i *legacy* PFAS nei processi produttivi e dal punto di vista epidemiologico è utile apprendere se questo passaggio abbia una reale ripercussione sul grado di esposizione dei soggetti campionati.

Determinazione di PFAS su matrice ematica

Il sangue liquido può essere analizzato come sangue intero, plasma o siero. Nel caso specifico dei PFAS, questi ultimi due rappresentano le matrici solitamente trattate a causa della forte affinità di legame delle molecole con le proteine, in particolare con l'albumina sierica e le proteine che legano gli acidi grassi, ragione per cui si dovrebbero rintracciare nella frazione liquida del sangue. In realtà, i PFAS hanno proprietà chimico-fisiche diverse tra di loro che impattano direttamente sull'affinità di legame con i componenti del sangue. Sono ancora in corso approfonditi studi sulla distribuzione dei PFAS al fine di garantire una corretta caratterizzazione dei loro livelli e di fornire un fattore di conversione che metta in relazione la concentrazione analizzata su sangue intero con quella relativa al plasma/siero [9].

I metodi analitici per la determinazione della dose interna di PFAS si basano sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa in modalità *selected reaction monitoring* (SRM). Molti

metodi sviluppati garantiscono un'ottima sensibilità (con limiti di rilevabilità uguali o inferiori a 0,05 ng/mL) a partire da un campione di volume di sangue compreso tra 50 e 300 µL.

Dried Blood Spots (DBS) come approccio di campionamento alternativo per il biomonitoraggio

Il microcampionamento quantitativo mediante Dried Blood Spots (DBS) si basa sul prelievo di una goccia di sangue capillare dal dito e sulla sua deposizione su un dispositivo che permette di ottenere un campione di volume noto compreso tra 10 e 50 µL di sangue essiccato su un supporto di materiale celluloso o polimerico (Fig. 2).

I vantaggi associati ai DBS sono molteplici [10]:

- il campionamento può essere effettuato senza la presenza di personale sanitario qualificato, anche da casa o in luoghi appositamente allestiti;
- la micro-invasività rende la tecnica maggiormente attrattiva, soprattutto per i bambini ed i soggetti fragili, permettendo anche di compiere campionamenti longitudinali ad intervalli di tempo regolari senza provocare stress e dolore alle persone coinvolte;
- la stabilità degli analiti nella matrice essiccata richiede minori precauzioni legate al trasporto ed alla conservazione dei campioni;
- il minor volume di campione implica un notevole risparmio nell'utilizzo dei reagenti, perfettamente in linea con i principi della *Green Analytical Chemistry*.

Nonostante i benefici illustrati, ad oggi le maggiori azioni di biomonitoraggio di PFAS in popolazioni selezionate si basano sul campionamento tradizionale di sangue venoso e sulla successiva analisi di plasma o siero.



Fig. 3 - Workflow della procedura di estrazione per l'analisi di PFAS su campioni DBS da 10 µL

Nello studio pubblicato dal nostro gruppo di ricerca, *Development and validation of the UHPLC-MS/MS method for the quantitative determination of 25 PFAS in dried blood spots* [11], è stato sviluppato e validato un metodo analitico UHPLC-MS/MS per la determinazione di un pannello di 25 PFAS, sia *legacy* sia *emerging* (Fig. 2). La procedura utilizza volumi di sangue di 10 µL ottenuti con il dispositivo di microcampionamento *Capitainer®B*, il quale garantisce un prelievo quantitativo grazie ad un apposito sistema microfluidico.

Il protocollo estrattivo è stato ottimizzato attraverso un Design of Experiment allo scopo di massimizzare la resa estrattiva. L'estrazione avviene sonicando per 30 minuti a temperatura ambiente gli spot immersi in 500 µL di metanolo, a cui fa seguito la centrifugazione dell'estratto e la sua pre-concentrazione prima dell'iniezione (Fig. 3). I valori di LOD raggiunti sono compresi tra 0,4 ng/mL e 1,0 ng/mL. Tali limiti di rilevabilità sono comparabili con quelli raggiungibili con i volumi dalle 5 alle 30 volte superiore tipici del sangue venoso.

Perciò, i DBS offrono l'opportunità di un loro utilizzo per scopi tossicologici ed epidemiologici con la potenzialità di poter analizzare un ampio spettro di molecole, concedendo così la possibilità di pianificare degli studi focalizzati sull'impatto sulla salute umana a diversi momenti e gradi di esposizione grazie alla semplicità delle fasi pre-analitiche di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni biologici.

È fondamentale, in questa ottica di valutazione quantitativa dell'esposizione, la validazione delle metodiche analitiche, accompagnate da materiali di riferimento e da campioni di controllo e di qualità per esibire dati accurati e precisi.

La microinvasività del prelievo per i DBS si presta perfettamente ai fini valutativi della salute pubbli-

ca. Infatti, mentre per scopi prettamente medici i pazienti sono più prони a ripetuti prelievi di sangue e raccolte di urina, la popolazione generale potrebbe non essere così accondiscendente per il monitoraggio biologico. Da qui deriva quindi l'enorme supporto offerto dai DBS come inestimabile risorsa per il biomonitoraggio umano su larga scala di xenobiotici ambientali, prime fra tutte le sostanze perfluoroalchiliche.

Definizione dei livelli di concentrazione di allerta dei PFAS nel sangue

Un aspetto cruciale legato al biomonitoraggio dei PFAS è l'interpretazione del risultato, ovvero, una volta quantificati i livelli nella matrice ematica, è necessario comprendere la probabilità di eventuali effetti avversi per la salute.

Nel 2016 la *German Human Biomonitoring Commission* (HBM-C) ha pubblicato una dichiarazione nella quale vengono comunicati i valori di concentrazione di PFOA e di PFOS appellati come 'HBM-I values', ovvero le concentrazioni rilevate in materiale biologico umano al di sotto del quale non sono attesi effetti avversi per la salute. Successivamente, nel 2019 sono stati pubblicati gli 'HBM-II values', da intendersi come le concentrazioni oltre le quali la salute umana potrebbe essere compromessa [12] (Tab. 1). È quindi chiaro come i LOD ottenuti nel nostro recente lavoro (PFOA 1,0 ng/mL; PFOS 0,4 ng/mL) possano essere idonei a verificare la presenza di queste molecole ai livelli ritenuti pericolosi per la salute umana.

| Molecola | HBM - I values | HBM - II values | HBM - II (donne in gravidanza) |
|----------|----------------|-----------------|--------------------------------|
| PFOA | 2 ng/mL | 10 ng/mL | 5 ng/mL |
| PFOS | 5 ng/mL | 20 ng/mL | 10 ng/mL |

Tab. 1 - Valori di concentrazioni di allerta di PFOA e PFOS quantificati su plasma o siero secondo la HBM-C

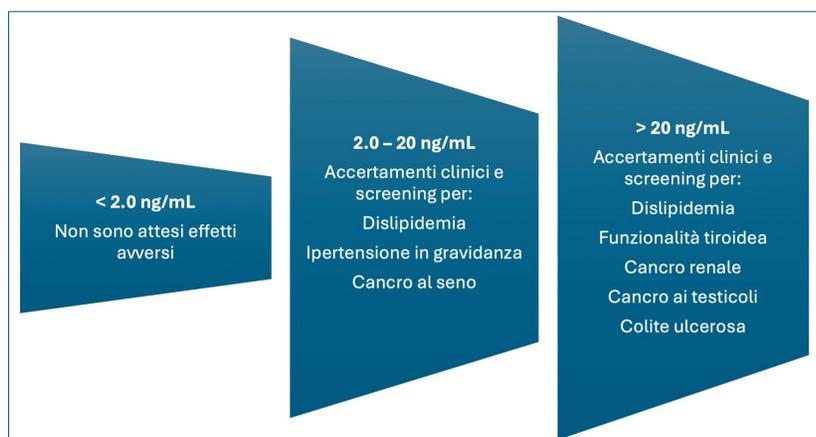


Fig. 4 - Accertamenti clinici raccomandati dalla guida NASEM in relazione alla somma delle concentrazioni su plasma/siero delle 9 molecole del pannello

Tuttavia, le linee guida forniscono valori in riferimento alla matrice liquida plasmatica o sierica. Pertanto, sarebbe utile verificare la correlazione delle concentrazioni quantificate su plasma, sangue intero e DBS per ogni composto analizzato per determinare un eventuale fattore di conversione.

La guida fornita dal NASEM, come già citato, considera nel proprio pannello nove molecole da quantificare, prevedendo poi di sommare le concentrazioni rilevate di ciascuno. Sia nel caso di risultati com-

presi tra 2,0 e 20 ng/mL, sia laddove la somma degli analiti target sia superiore a 20 ng/mL, sono raccomandati degli accertamenti clinici con un maggior livello di allerta nell'ultimo caso.

La somma delle concentrazioni delle nove molecole in esame inferiore a 2,0 ng/mL inquadra, invece, uno scenario di esposizione di *background* [13], ovvero data dall'utilizzo quotidiano di oggetti contenenti PFAS riconducibile ad una esposizione non-occupazionale. La Fig. 4 illustra i provvedimenti clinici proposti sulla base della quantificazione risultante.

Al fine di garantire un risultato affidabile e riproducibile, per il futuro è auspicabile una standardizzazione delle metodiche analitiche affiancata da programmi di valutazione esterna di qualità. Inoltre, è di fondamentale importanza avere una precisa indicazione circa la quantificazione degli analiti scelti in relazione al tipo di matrice. In questo modo, ci potrà essere concordanza tra i programmi di biomonitoraggio condotti su matrice plasmatica e quelli basati sul sangue intero.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C.M. Taylor, M.C. Breadmore, N.L. Kilah, *Chemistry-Methods*, 2024, **4**, e202300017.
- [2] L.G.T. Gaines, *Am. J. Ind. Med.*, 2023, **66**, 353.
- [3] R.A. Brase, E.J. Mullin, D.C. Spink, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 995, DOI: [10.3390/ijms22030995](https://doi.org/10.3390/ijms22030995).
- [4] J. Zodrow, U. Vedagiri *et al.*, *Remediat. J.*, 2022, **32**, 29.
- [5] S. Poothong, E. Papadopoulou *et al.*, *Environ Int.*, 2020, **134**, 105244.
- [6] S.A. Batterman, S. Chernyak, S. Feng-Chao, *Frontiers in Genetics*, 2016, **7**, 64.
- [7] M. Uhl, G. Schoeters, *et al.*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2023, **250**, 114168.
- [8] W. Dui, M.P. Smith, S.H. Bartock, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2024, **416**, 6333.
- [9] S. Poothong, C. Thomsen *et al.*, *Environmental Science & Technology*, 2017, **51**(22), 13388.
- [10] J.D. Freeman, L.M. Rosman *et al.*, *Clinical Chemistry*, 2018, **64**(4), 656.
- [11] M. Galletto, C. Ververi, M. Massano *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2024, **416**, 5671.
- [12] M. Schümann, H. Lilienthanl, J. Hölzer, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2021, **63**, 356.
- [13] J. Downs, N. Nacca *et al.*, *Toxicology Communications*, 2024, **8**(1), DOI: [10.1080/24734306.2024.2349474](https://doi.org/10.1080/24734306.2024.2349474).

PFAS and Biomonitoring for Public Health

PFAS are a class of synthetic chemical compounds that tend to bioaccumulate in human body fluids. Several toxic effects have been reported in association with high levels of exposure. Blood biomonitoring thus emerges as a fundamental tool for public health policies. Dried Blood Spots (DBS) microsampling represents an innovative and advantageous approach for this purpose.