



21° Congresso Nazionale

Società Italiana di Tossicologia

**Pericolo, rischio
e rapporto
rischio-beneficio**

BOLOGNA

20-22 Febbraio 2023

www.sitox.org

Nuova procedura standardizzata per estrarre GLIFOSATO e acido aminometilfosfonico (AMPA) da matrici organiche e inorganiche: verso un pratico kit per la rilevazione HPLC-UV

Sarah ALLEGRA,

Francesco CHIARA, Elisa ARRIGO, Silvia DE FRANCIA, Daniele MANCARDI

Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin



UNIVERSITÀ
DI TORINO

Dipartimento
Scienze Cliniche
e Biologiche

2023 - 2027
DIPARTIMENTO
DI ECCELLENZA

Ministero dell'Università e della Ricerca



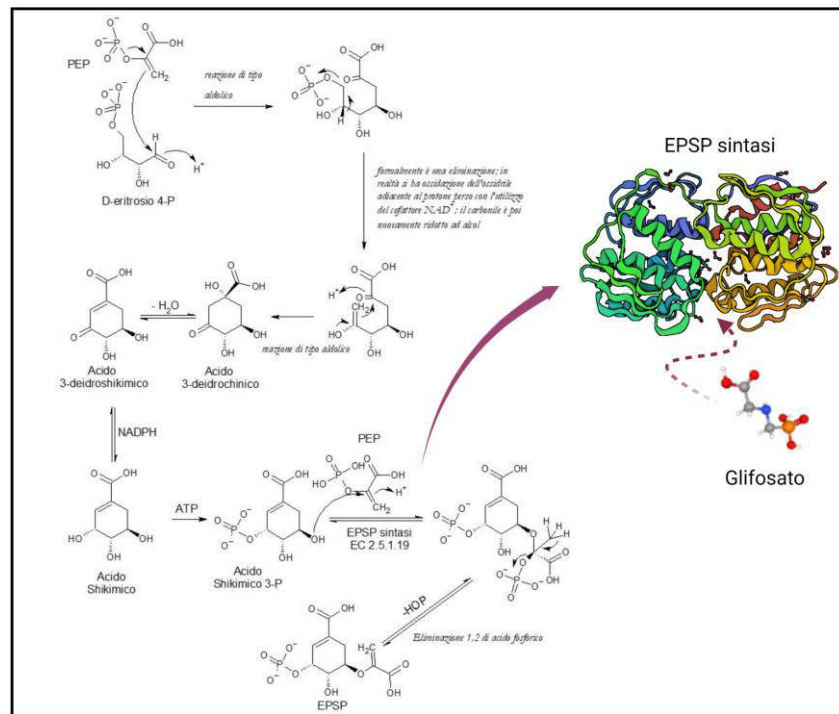
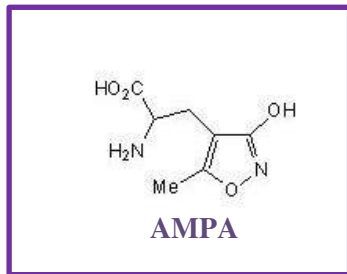
life

an Open Access Journal by MDPI

INTRODUZIONE

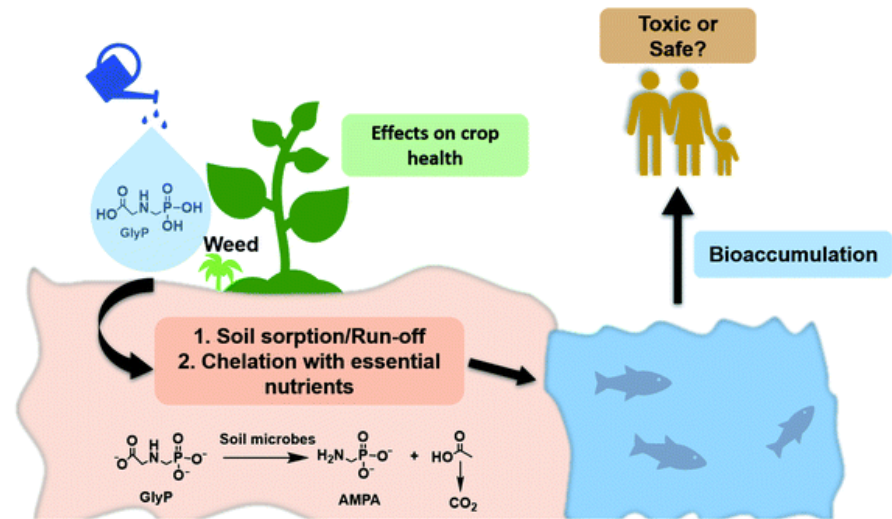
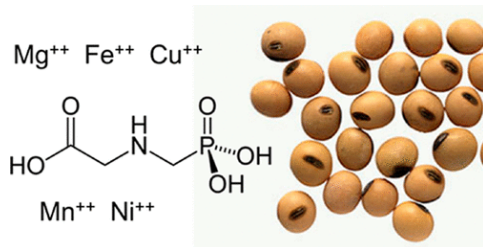
La **N-(fosfonometil)glicina (glifosato)** è un erbicida in grado di inibire selettivamente la **via dell'acido shikimico**, una via enzimatica fondamentale che supporta la crescita delle piante.

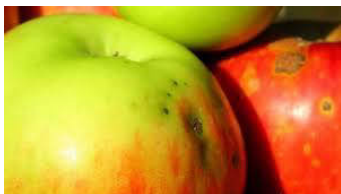
Il glifosato viene trasformato in acido aminometilfosfonico (**AMPA**) dalle piante e nel suolo tramite **deaminazione ossidativa** e ulteriore degradazione ad acido 2-metilfosfinico acetico.



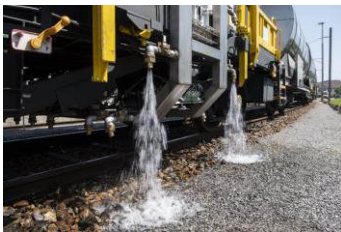
Il Glifosato è un **chelante** degli **ioni metallici** ad ampio-spettro, brevettato come erbicida nel **1974** dalla **Monsanto Company**.

Il glifosato è in grado di formare un complesso chelante in grado di immobilizzare nutrienti minerali come Ca, Fe, Co, Cu, Mn, Mg, Ni, Zn, ecc. Questi nutrienti metallici fungono da **co-fattori per vari sistemi enzimatici in piante, microorganismi e gli animali**. Una volta che questi nutrienti metallici sono chelati con glifosate diventano **fisiologicamente indisponibili per molte funzioni fisiologiche ed enzimatiche**.





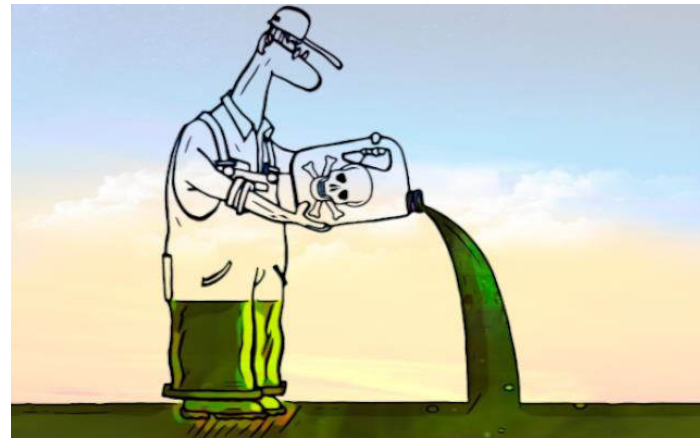
Considerato **sicuro** in termini di **impatto ambientale ed effetti tossici sugli animali**, con bassi costi di produzione ed elevata domanda di mercato, il glifosato ha rapidamente raggiunto una **diffusione mondiale** per usi agricoli estensivi ed è stato l'erbicida più adottato negli ultimi **40 anni**.



Fatta eccezione per **l'esposizione professionale ad alti livelli di erbicidi** a base di glifosato, non ci sono state segnalazioni iniziali di tossicità nell'uomo.

A differenza di funghi, piante, alghe e batteri, **gli animali recuperano gli aminoacidi aromatici derivati dall'acido shikimico attraverso la loro dieta e sono privi dell'enzima bersaglio.**

Tuttavia, gli effetti dimostrati sul **microbiota** possono indirettamente spiegare gli esiti deleteri **sui processi fisiologici dei mammiferi** [Front.Behav.Neurosci. (2017), 11: 146].



Nel 2015 è stato dimostrato che il glifosato ha una tossicità **neurologica** e per la funzione **riproduttiva** (*Mesnager et al., 2015*).

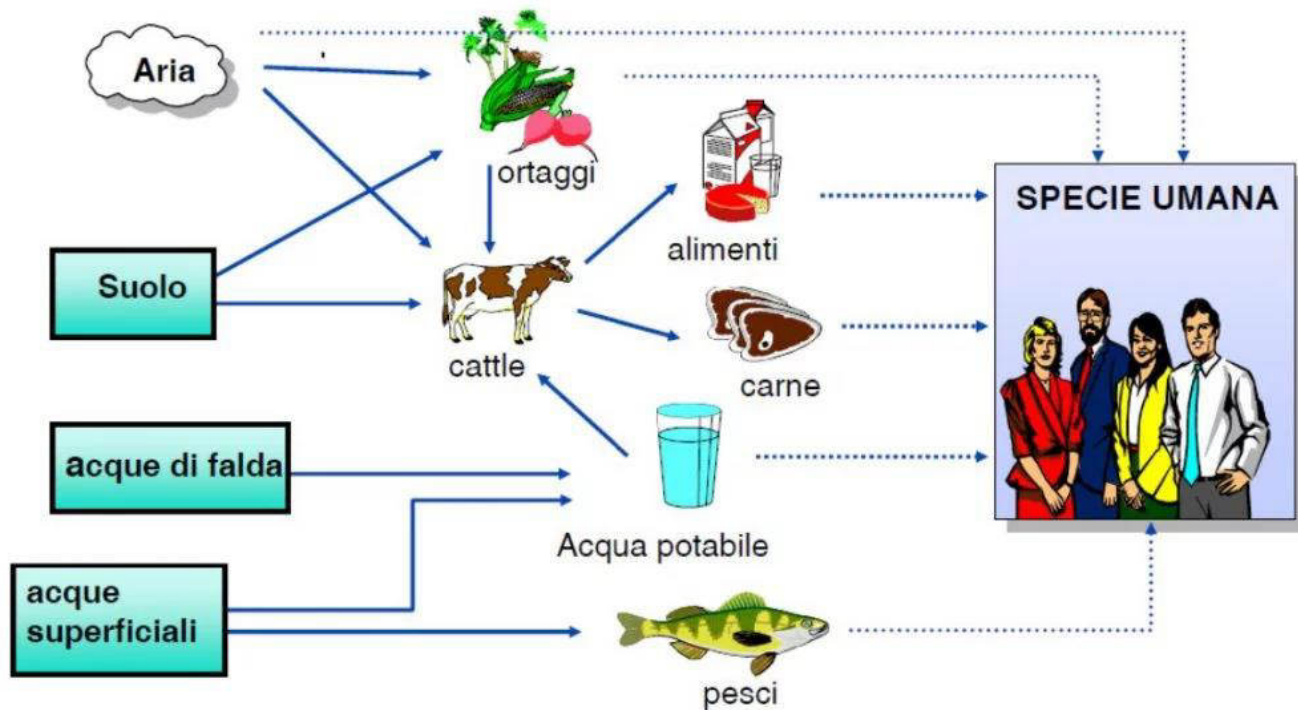
L'AMPA è risultato **genotossico** per le cellule umane in coltura (Hep-2, *Mañas et al., 2009*) e in alcuni studi sui pesci (*Guilherme et al., 2014*).

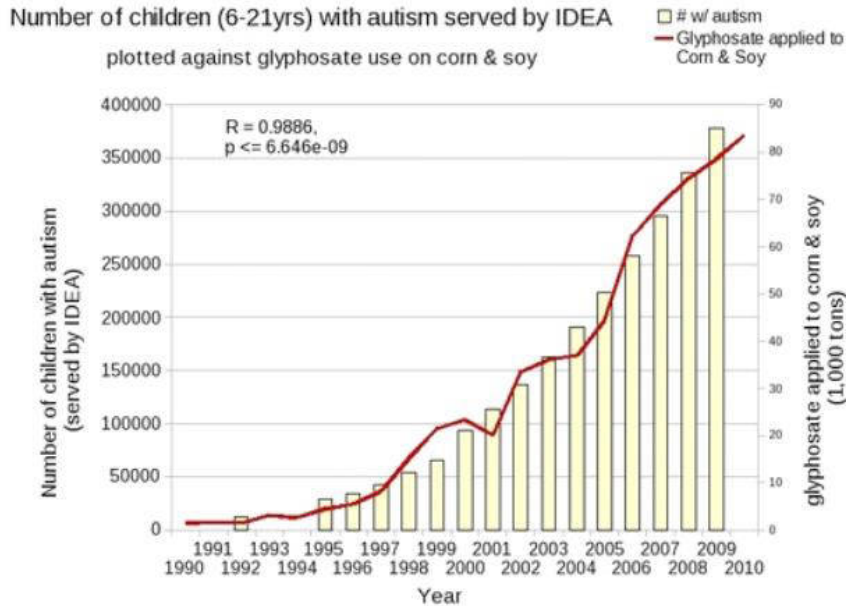
Studi epidemiologici hanno segnalato un possibile aumento del rischio di sviluppare **linfomi non-Hodgkin** tra **gli agricoltori esposti** professionalmente a questa sostanza (*Weisenburge et al., 2021*).

Mancano valutazioni sugli effetti sul microbiota intestinale.

L'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (**IARC**), analizzando un migliaio di studi, nel 2015 lo ha classificato come probabile cancerogeno per l'uomo (**gruppo 2A**).

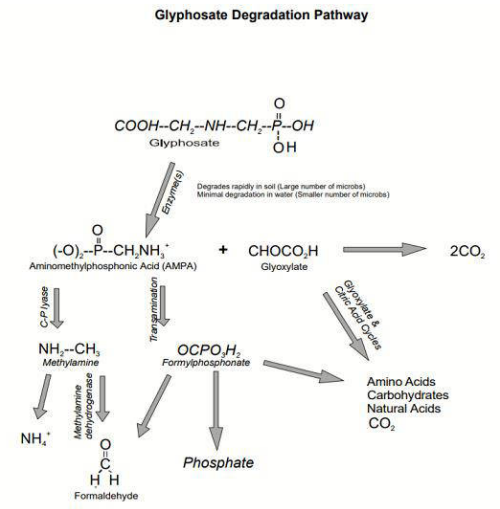


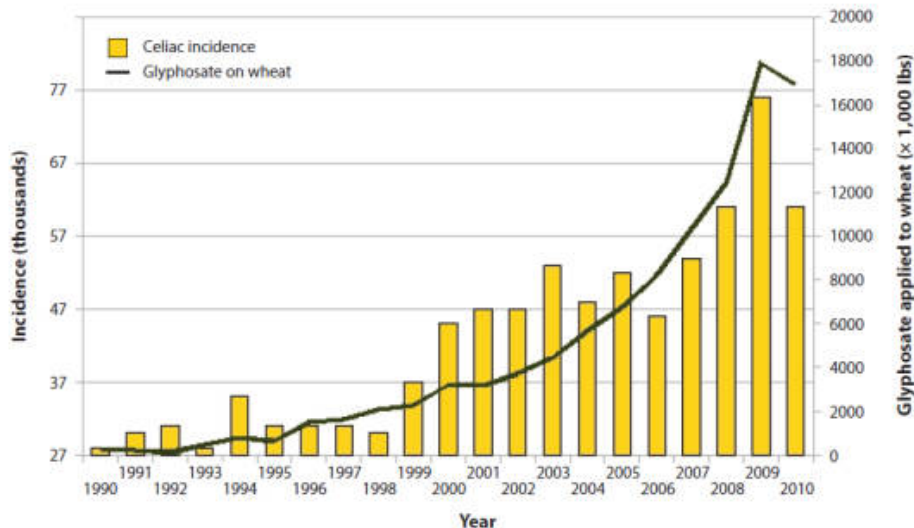




L'accumulo di ammoniaca, un sottoprodotto del catabolismo del glifosate, può portare a infiammazioni del cervello associate con **autismo** e morbo di **Alzheimer** (Samsel & Seneff, 2013).

Nel morbo di Alzheimer, nell'attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) e nell'autismo si rileva un eccesso dei livelli di ammoniaca e un deficit di zinco (Rueda-Ruzafa L, Cruz, Roman, Cardona, 2019)





Relazione fra diagnosi della malattia celiaca e applicazioni di glifosate sul grano negli Stati Uniti, ($R=0.9759$, $p \leq 1.862e-06$, figura tratta da Samsel & Senef, 2013).

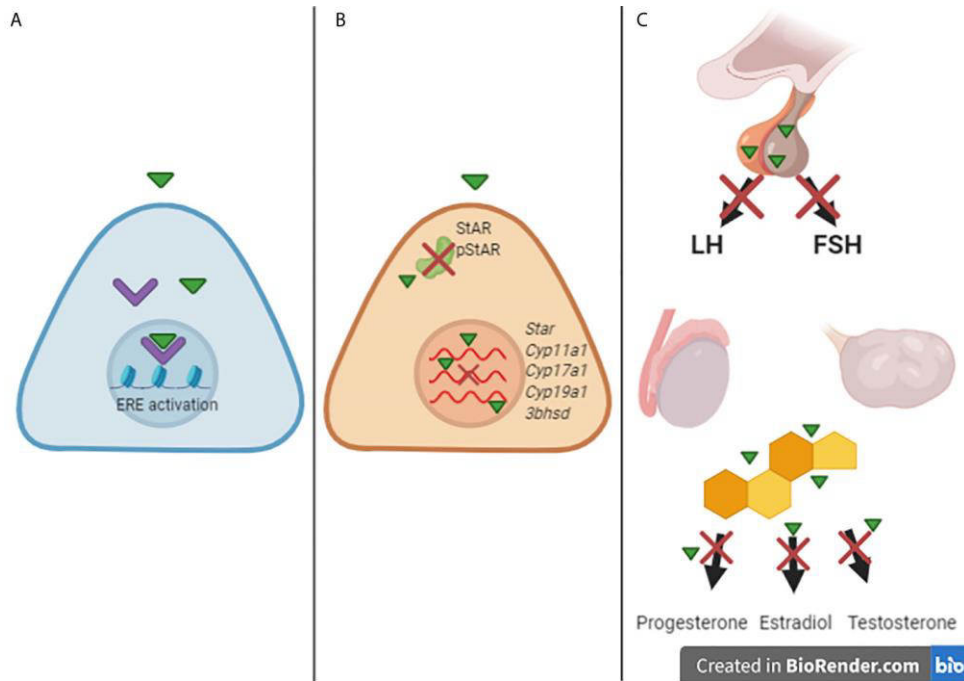
Carenze di ferro, cobalto, molibdeno, rame e altri metalli associate alla **malattia celiaca** possono essere attribuiti alla forte **capacità del glifosato di chelare questi elementi**.

Non siete intolleranti al glutine ma al glifosato: il legame tra l'erbicida e la celiachia spiegherebbe la recente epidemia

di Beatrice Raso 28 Nov 2018 | 16:40



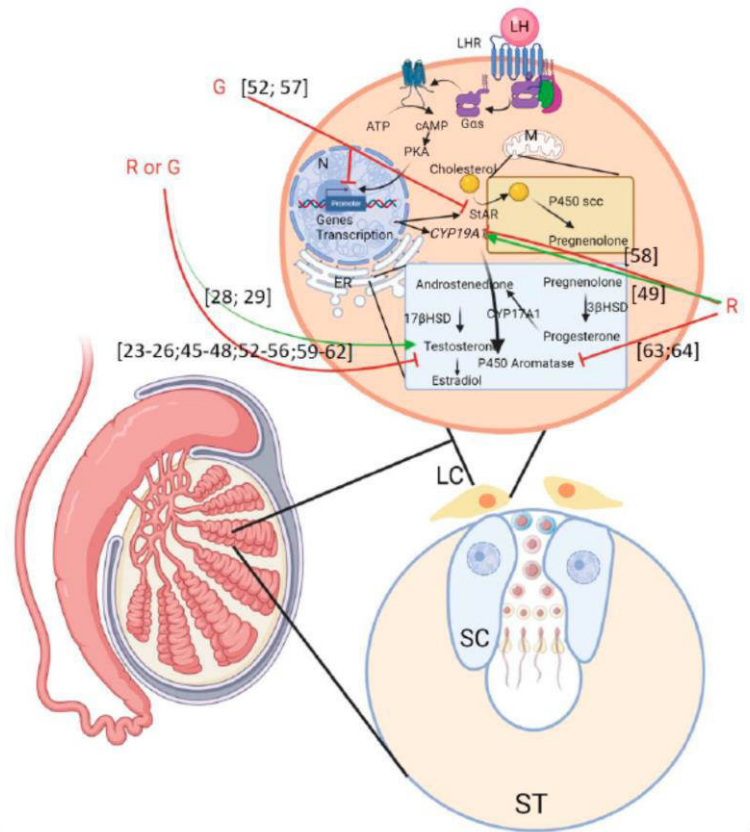
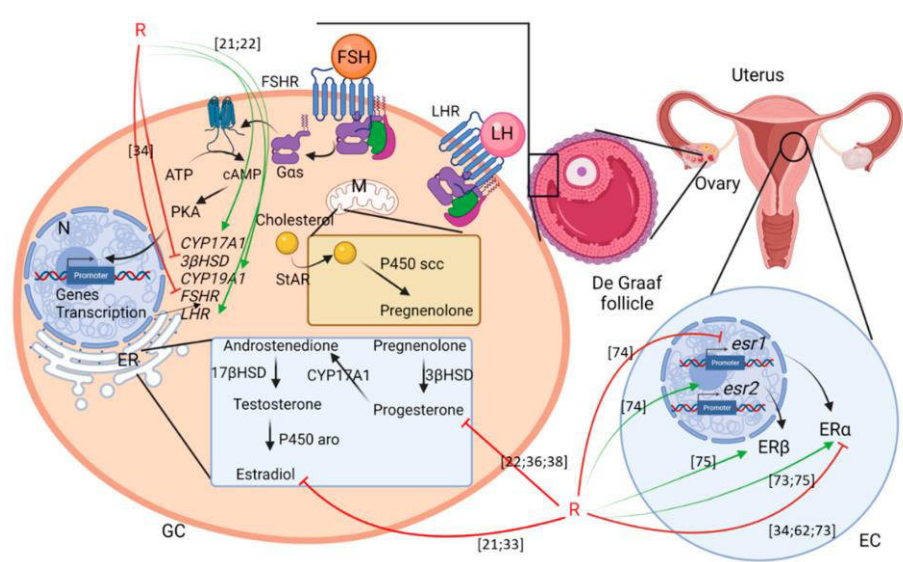




Uno schema che suggerisce alcuni possibili bersagli dell'alterazione endocrina da parte del glifosato.

- (A) Il **glifosato** (triangolo verde) interagiscono con il **recettore degli estrogeni α** (viola) e attiva la **trascrizione degli elementi reattivi agli estrogeni**.
- (B) Il **glifosato** altera l'espressione genica del **macchinario steroidogenico** e diminuisce i livelli di StAR e StAR fosforilato.
- (C) Il **glifosato** **influisce sull'omeostasi ipofisaria**, modificando la produzione di **LH e FSH**, così come nelle gonadi, influenzando la steroidogenesi, alterando i livelli di **progesterone, estradiolo e testosterone**.

(de Araújo-Ramos, 2021)



Schema che riassume gli effetti del glifosate sulla fertilità femminile e maschile.

Cells 2021, 10(11), 3079; <https://doi.org/10.3390/cells10113079>

Il glifosato è anche negli assorbenti interni!

Il glifosato è dappertutto: anche nell'85% dei tamponi intimi e nelle garze sterili in commercio. È il risultato imprevisto di uno studio argentino. Si tratta dell'erbicida più utilizzato al mondo, classificato come probabile cancerogeno e associato ai rischi di infertilità...

📅 28 Ottobre 2015

📌 MEDICINA NATURALE 📌 SALUTE E BENESSERE



A metà degli anni '80, sono stati fatti diversi tentativi di quantificare glifosato e AMPA data la frequenza degli episodi di **suicidio** avvenuti con l'ingestione di formulazioni a base di glifosato. La maggior parte delle procedure descritte per determinare le concentrazioni, tuttavia, sono estremamente **complicate**, richiedono tempo e **non forniscono una quantificazione accettabile**.

I ricercatori tentano di quantificare glifosate e AMPA nel **siero** mostrando una forte **interferenza** da parte dei componenti della matrice, che influenza il tempo di ritenzione e i cromatogrammi.

Dickson et al. 1988

Hieda et al. 1991

Tomita et al. 1991

Felton et al. 2018

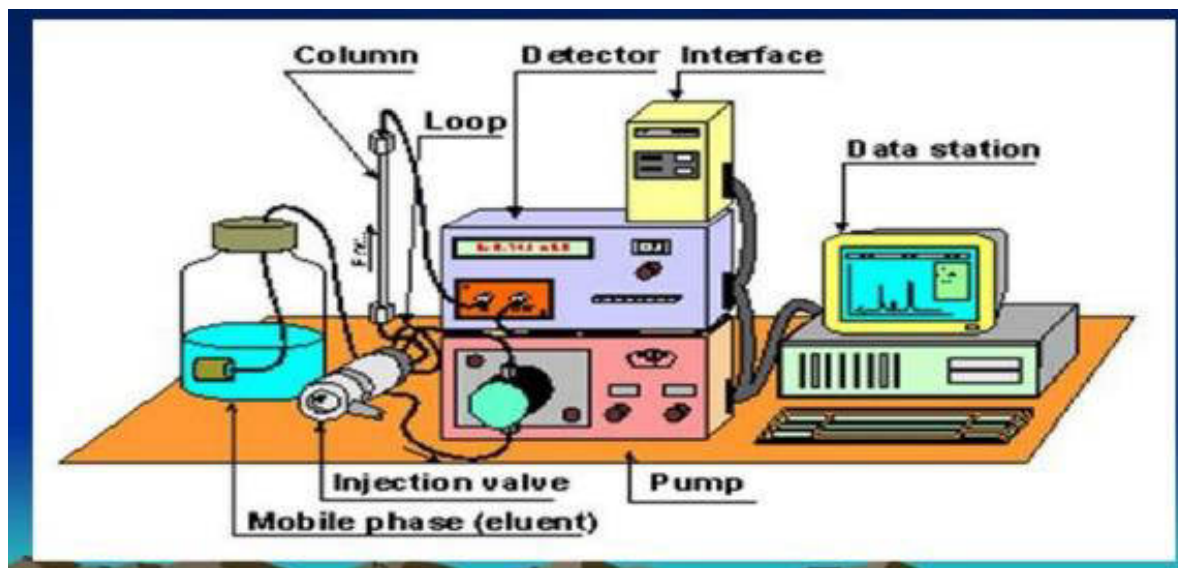
Questo studio descrive un metodo per la determinazione di glifosato e AMPA attraverso l'utilizzo di **derivati tosilati**, ma **non è stata eseguita alcuna estrazione da matrici biologiche** e l'analisi è stata fornita solo per gli **standard**. La procedura richiede tempo e non è precisa.

Studi su terreno in cui il 9-fluorenilmetilcloroformiato (**FMOC**) è stato utilizzato per derivatizzare il glifosato, portando alla formazione di un addotto assorbente nella gamma UV. Un metodo **complesso** e con **scarsa ripetibilità**.

Nonostante negli ultimi anni siano stati sviluppati molti metodi per la rilevazione di glifosate e AMPA, è ancora necessario un metodo che consenta una quantificazione facile e affidabile.

OBIETTIVO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di fornire un **nuovo metodo di determinazione** con **elevata precisione** della **presenza o quantità** di glifosato e AMPA in un campione **organico o inorganico**, che superi gli inconvenienti dei metodi noti.

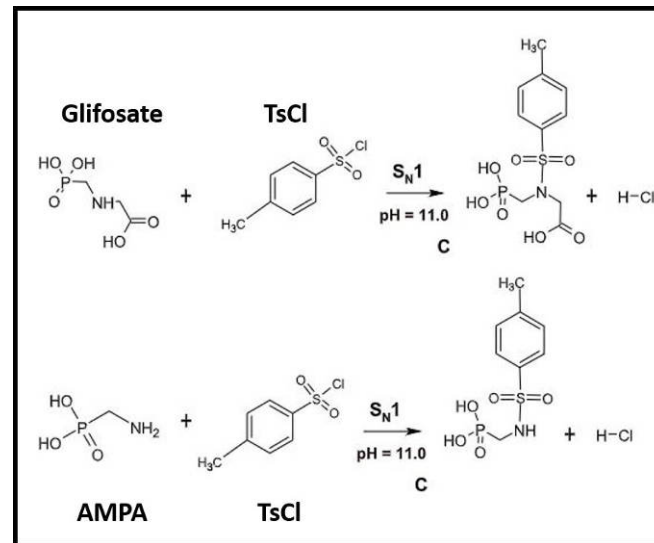
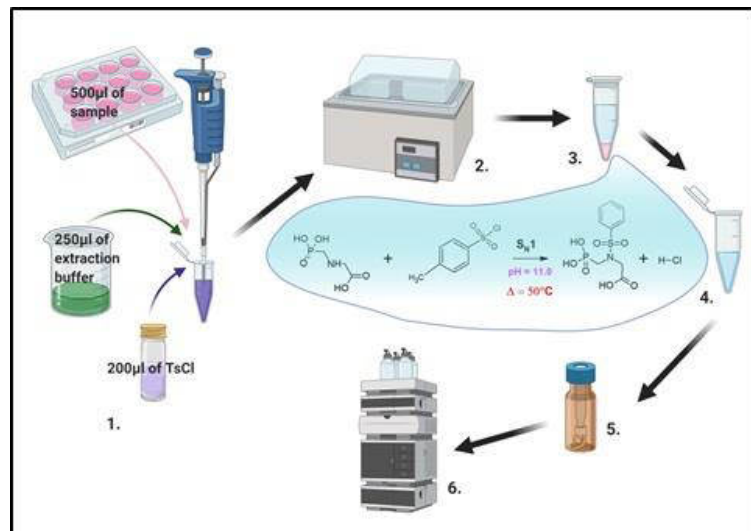


MATERIALI E METODI

Il campione viene derivatizzato mediante **tosilcloruro** (50°C per 5 min) ottenendo così **glifosato tosilato** e **acido aminometilfosfonico tosilato**.

Fase mobile: acqua e acetonitrile tra 90:10 v/v e 50:50 v/v + tampone formiato pH 3,0.

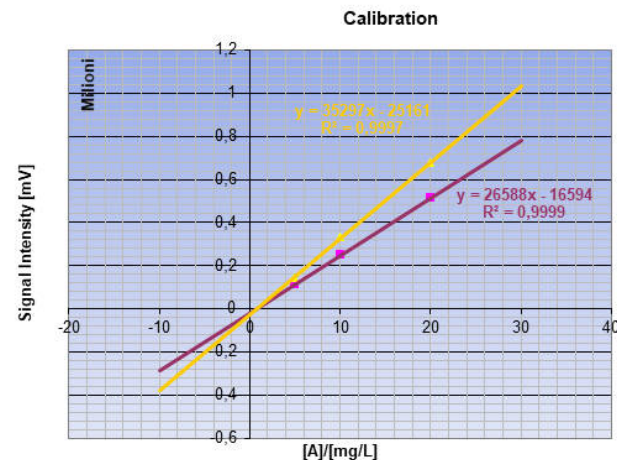
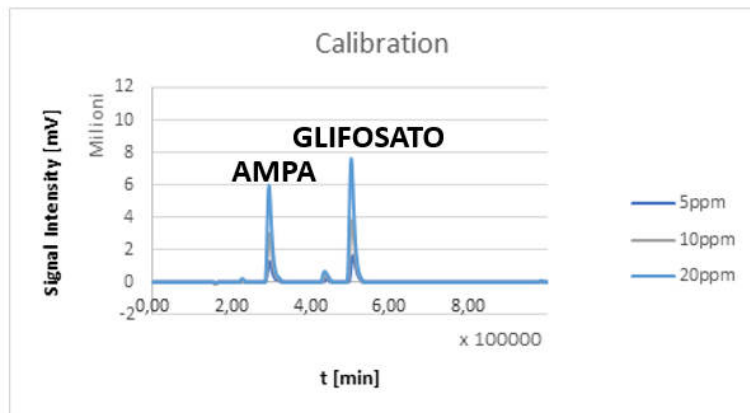
UV: 240 nm



RISULTATI

Il metodo è stato validato secondo i criteri stabiliti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 e secondo le linee guida **EURACHEM** per la validazione dei metodi analitici.

Analyte	RT/[min]	LOD/ppm	LOQ/ppm	Measure range/ppm
Glyphosate	5.08	0.3	3.0	3.0 - 20.0
AMPA	3.16	0.3	3.0	3.0 - 20.0



Procedimento per determinare glifosato e acido aminometilfosfonico in un campione

Prof. Daniele Mancardi
Prof.ssa Silvia De Francia
Dott.ssa Elisa Arrigo
Dott.ssa Sarah Allegra
Dott. Francesco Chiara

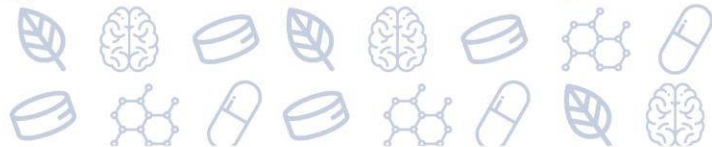



Ministero dello Sviluppo Economico

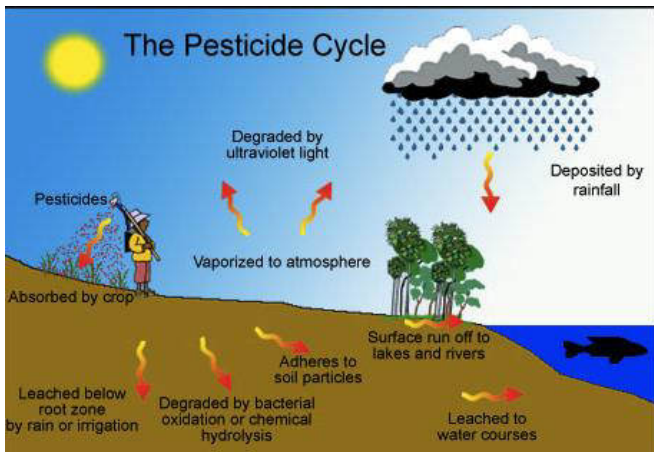
Ricevuta di presentazione
per
Brevetto per invenzione industriale



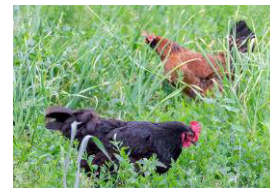
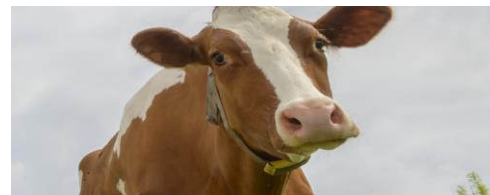
Domanda numero: 102021000013796
Data di presentazione: 27/05/2021



Attualmente l'uso del glifosato (max 0,1 mg/Kg) è approvato nell'UE fino al **15 dicembre 2022 (prorogato a dicembre 2023)**, ma bisogna ancora chiarirne il rischio per l'uomo dovuto a **esposizione lavorativa e/o alimentazione**.



In questo contesto, stabilire un modo coerente e trasversale per **estrarre, determinare e quantificare glifosato e AMPA in campioni biologici**, è di fondamentale importanza per affrontare le potenziali caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche delle due molecole, ancora da descrivere.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!

**Prof.ssa Silvia De Francia
Dott. Francesco Chiara
Dott. Elisa Arrigo
Prof. Daniele Mancardi**





life

an Open Access Journal by MDPI



Journal's Aims and Scope:

Life is an international, peer-reviewed, open access journal of scientific studies related to fundamental themes in life sciences, from basic to applied research, published monthly online by MDPI.

Journal website: <http://www.mdpi.com/journal/life>
Life Editorial Office: life@mdpi.com

Research fields of interest include but are not limited to:

Biochemistry, Biophysics and Computational Biology
Cell Biology and Tissue Engineering
Medical Research
Pharmaceutical Science
Synthetic Biology and Systems Biology
Genetics and Genomics
Radiobiology and Nuclear Medicine



Q2

in "Biology" WoS
Ranking



34 days

Median article processing time



3,846,852 (2022)
article views



@Life_MDPI



life

an Open Access Journal by MDPI

Special Issue "COVID-19 Prevention and Treatment–Volume II"

Guest Editors

Dr. Silvia De Francia

Dr. Sarah Allegra

This Special Issue arises from the need for a new approach both in the clinical setting and in therapeutic regimens developed through the exchange of results from clinical and preclinical studies on COVID-19. Original research articles, reviews, and short reports on various aspects of COVID-19 are welcome. With this Special Issue, we aim to create an interdisciplinary consensus from a new perspective.

Submission deadline: 31 May 2023

Keywords:

COVID-19
SARS-CoV-2
therapies
drug repurposing
tailored treatment
personalized medicine



mdpi.com/si/156510