

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**Sanità Pubblica e Medicina del Lavoro**

**Ciclo XXI**

**Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: MED/44 Medicina del Lavoro**

**TITOLO TESI**

**Sviluppo di tecniche di analisi ifenate per la quantificazione di biomarcatori di esposizione a tossici ambientali: gli acidi mercapturici**

**Presentata da: Dr. Indiveri Paolo**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Chiar.ma Prof.ssa M.P. Fantini**

**Chiar.mo Prof. F. S. Violante**

**Esame finale anno 2009**

## INDICE

### **1. INTRODUZIONE** **pag 1**

---

### **2. HUMAN BIOMONITORING** **pag 4**

---

- 2.1. *Cenni storici*
- 2.2. *Caratteristiche dello Human Biomonitoring*
  - 2.2.1 *Matrici Biologiche*
  - 2.2.2. *Biomarker*
  - 2.2.3. *Classificazione degli effetti tossici, le relazioni dose-effetto e dose-risposta*
  - 2.2.4. *I valori di riferimento e livelli d'azione biologici*
  - 2.2.5. *Metodi analitici e controlli di qualità*
  - 2.2.6. *Il ruolo del monitoraggio biologico in salute pubblica, la sorveglianza sanitaria e l'approccio epidemiologico*

### **3. TOSSICI AMBIENTALI ED INDUSTRIALI** **pag 23**

---

- 3.1. *Benzene*
  - 3.1.1. *Assorbimento e distribuzione*
  - 3.1.2. *Metabolismo e eliminazione*
  - 3.1.3. *Tossicologia e meccanismi di tossicità*
- 3.2. *Toluene*
  - 3.2.1. *Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione.*
  - 3.2.2. *Tossicologia e meccanismi di tossicità*
- 3.3. *Xilene*
  - 3.3.1. *Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione*
  - 3.3.2. *Tossicologia e meccanismi di tossicità*
- 3.4. *Le reazioni di biotrasformazione degli xenobiotici*
  - 3.4.1. *La coniugazione con il glutatione*
  - 3.4.2. *Gli acidi mercapturici come indicatori di esposizioni a basse dosi di tossici industriali: l'acido S-Fenilmercapturico, S-Benzilmercapturico e gli isomeri dell'acido metil benzilmercapturico*

### **4. PARTE SPERIMENTALE** **pag 51**

---

- 4.1. *Prodotti chimici e reagenti*
- 4.2. *Strumentazione*
  - 4.2.1 *Fase preanalitica e analitica*
- 4.3. *Soluzioni*
  - 4.3.1. *Soluzioni di Standard Chimici e Standard Interni*
  - 4.3.2. *Soluzioni fase preanalitica*
  - 4.3.3. *Soluzioni per separazione cromatografica: le fasi mobili*
- 4.4. *Procedura di Estrazione in Fase Solida (SPE)*
  - 4.4.1. *Valutazione di diversi supporti per Estrazione in Fase Solida (SPE)*
- 4.5. *Cromatografia liquida*

- 4.6. *Spettrometria di Massa*
- 4.7. *Campioni biologici urinari*
- 4.8. *Curve di calibrazione*
- 4.9. *Procedure di validazione del metodo analitico*
  - 4.9.1. *Limite di detection e limite di quantificazione*
  - 4.9.2. *Precisione e accuratezza*
  - 4.9.3. *Recupero*
  - 4.9.4. *L'effetto matrice: fenomeno della soppressione ionica*
  - 4.9.5. *Specificità*
  - 4.9.6. *Stabilità*
- 4.10. *Elaborazione statistica dei dati del monitoraggio biologico*
- 4.11. *Variazioni al metodo di analisi in HPLC-ESI-MS/MS originale*
  - 4.11.1. *Soluzioni di Standard Chimici e Standard Interni*
  - 4.11.2. *Spettrometria di massa*
  - 4.11.3. *Condizioni della separazione cromatografia*
  - 4.11.4. *Procedure di estrazione del campione biologico*
  - 4.11.5. *Validazione del metodo analitico*

## **5. RISULTATI E DISCUSSIONI**

**pag 69**

- 5.1. *Caratteristiche analitiche*
  - 5.1.1. *Spettrometria di massa*
  - 5.1.2. *Cromatografia liquida*
- 5.2. *Validazione del metodo*
  - 5.2.1. *Linearità, LOD e LOQ*
  - 5.2.2. *Precisione, accuratezza e recupero*
  - 5.2.3. *Effetto Matrice: la soppressione ionica*
  - 5.2.4. *Specificità*
  - 5.2.5. *Stabilità*
- 5.3. *Applicazione del metodo: determinazione degli acidi mercapturici in un gruppo di vigili urbani della polizia municipale di Bologna*
- 5.4. *Variazioni al metodo di analisi in HPLC-ESI-MS/MS originale*
  - 5.4.1. *Spettrometria di massa*
  - 5.4.2. *Condizioni della separazione cromatografia*
  - 5.4.3. *Procedure di estrazione del campione biologico*
  - 5.4.4. *Validazione del metodo analitico*

## **6. CONCLUSIONI**

**pag 83**

## **7. FIGURE**

**pag 85**

## **8. TABELLE**

**pag 93**

## **9. ISTOGRAMMI**

**pag 99**

## **10. BIBLIOGRAFIA**

**pag 101**

## 1. INTRODUZIONE

Nel XX secolo l'enorme crescita del comparto industriale e il conseguente aumento dell'inquinamento ambientale hanno esteso lo studio della tossicologia, sino ad allora di interesse strettamente occupazionale, all'intera popolazione. Il miglioramento del benessere sociale e la quasi totale accessibilità a prodotti chimici e a nuove tecnologie espongono, oggi, la totalità degli individui al "contatto" con innumerevoli sostanze tossiche.

Negli ultimi decenni, l'ampia legislazione e la crescente sensibilità in materia di tutela ambientale e salute pubblica hanno contribuito a ridurre al minimo l'emissione di tossici nell'ambiente; seppur raggiunti buoni standard di qualità dell'aria, l'elevata tossicità intrinseca e/o carattere cancerogeno dei chimici obbligano, comunque, la comunità scientifica e gli organi di controllo nazionali e internazionali a valutare l'esposizione della popolazione generale ed il rischio per la salute ad esso associato.

Tra i maggiori inquinanti ambientali di natura antropica, il benzene, toluene e xilene suscitano, certamente, elevato interesse tossicologico. La consistente presenza di queste componenti nelle benzine ed il loro conseguente rilascio nell'ambiente, direttamente per fenomeni evaporativi legati al ciclo di produzione dei carburanti, o indirettamente per l'emissione dei gas di scarico dai veicoli a motore, hanno reso ubiquitaria la presenza di questi tossici nell'aria che respiriamo quotidianamente.

Il benzene, la cui presenza nei carburanti è limitata all'1% v/v per disposizioni di legge (n. 413/97), è riconosciuto storicamente come cancerogeno per l'uomo (evidenze di ematotossicità) ed è stato incluso dalla IARC nel gruppo 1. Tale classificazione, come agente cancerogeno, obbliga il perseguimento di obiettivi di qualità dell'aria sempre più elevati (0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  nel 2010 D.M. 60/2002). Le numerose evidenze scientifiche rivelano una maggiore incidenza di specifici tumori, a carico del tessuto ematopoietico, anche per concentrazioni di benzene nell'aria molto basse, conseguentemente è continuo lo sforzo scientifico teso alla comprensione dei meccanismi di induzione neoplastica, ancora non completamente chiariti, ed alla valutazione dell'esposizione al tossico derivata da concentrazioni di benzene ambientale sempre più basse.

Il toluene e xilene, pur non mostrando caratteri di cancerogenità, sono presenti nell'aria in concentrazioni superiori al benzene e data la loro elevata presenza nelle benzine (non superiore al 40% v/v come da legge n. 413/97) esplicano sulla popolazione effetti di tossici di tipo acuto e cronico anch'essi molto importanti.

La misura dell'esposizione a sostanze chimiche e la ben più importante stima dell'impatto che tali tossici hanno sulla salute pubblica prevedono l'utilizzo di due differenti approcci, il monitoraggio ambientale e biologico. Il primo approccio misura, attraverso tecniche differenti, la quantità di tossico direttamente nell'aria. Tale strumento di valutazione, normalmente, si limita a fornire informazioni sull'inquinamento dell'ambiente in un periodo di tempo definito, valuta esclusivamente esposizioni di tipo inalatorio e soprattutto non fornisce informazioni sulla quantità di tossico effettivamente assorbito dal soggetto interessato.

Enormi capacità informative ed innumerevoli potenziali applicazioni vengono, bensì, acquisite utilizzando il monitoraggio biologico (MB). L'applicazione di questo strumento di indagine tossicologica permette, attraverso la misura di un biomarcatore nei fluidi biologici, di superare specificamente i limiti imposti dal monitoraggio ambientale. Esso, infatti, consente la misura del tossico realmente assorbito dal soggetto attraverso tutte le vie di assorbimento dei chimici (inalatoria, cutanea e per ingestione), misura l'esposizione relativa ad un periodo di tempo prolungato (differenti biomarcatori per lo stesso tossico), sia come risultato della mobilità dell'individuo sia per le differenti condizioni espositive dipendenti dalla forma chimica del tossico (gas, liquido o solido). In ultimo, e ben più importante aspetto, il MB valuta gli effetti biologici associati all'assorbimento del tossico e permette di ricavare informazioni più precise sull'efficacia delle misure preventive adottate, sempre più focalizzate alla protezione e tutela del singolo individuo.

Un adeguato disegno di *human biomonitoring* permette, grazie al riconoscimento specifico di differenti tipologie di biomarker (marcatori di esposizione, effetto e suscettibilità), di poter identificare la quantità del tossico stesso o un suo metabolita nei fluidi biologici, il tipo e l'entità degli effetti biologici da esso causati, ed in ultimo di valutare le capacità individuali di rispondere all'insulto chimico e risolvere il danno ricevuto.

Lo studio condotto nei tre anni di dottorato si è focalizzato principalmente sulla determinazione quantitativa di una particolare categoria di indicatori biologici: i marcatori di esposizione.

Le maggiori difficoltà che si incontrano nel campo del monitoraggio biologico di soggetti esposti a tali sostanze dipendono fondamentalmente dal fatto che alcuni metaboliti non sono specifici dell'esposizione a tali tossici, oppure che i metodi analitici non sono sufficientemente sensibili per valutare concentrazioni biologiche corrispondenti a bassi livelli di esposizione. I tempi di emivita biologica dei biomarcatori (sostanze tal quali o i corrispondenti metaboliti) nei compartimenti biologici utilizzabili per il monitoraggio sono

piuttosto brevi e quindi la scelta del momento di raccolta dei campioni biologici rispetto all'esposizione è un fattore essenziale, oltretutto, la scelta dell'indicatore biologico ed il prelievo relativo della matrice biologica su cui affettiamo l'analisi, non dovrebbe creare alcun disagio o rischio per la salute del soggetto sottoposto allo screening tossicologico.

La scelta è ricaduta su specifici metaboliti: gli acidi mercapturici. L'acido S-fenilmercapturico (SPMA), S-benzil-mercapturico (SBMA) e dell'orto-metil-benzil-mercapturico (o-MBMA) rispettivamente del benzene, toluene e xilene, superano agevolmente i problemi citati in precedenza. In particolare l'elevata sensibilità che questi, come nel caso specifico del SPMA, hanno evidenziato per basse esposizioni ambientali di benzene e la loro facile determinazione analitica nelle urine rendono questi metaboliti perfetti per gli scopi di screening tossicologica su un numero elevato di campioni provenienti dalla popolazione in generale. I tradizionali marcatori di esposizione utilizzati tra cui principalmente il benzene, toluene e xileni urinari, l'acido trans-trans muconico per il benzene, gli acidi ippurici e o-cresolo per il toluene e i metilippurici per gli xileni, mostrano delle limitazioni di impiego. Infatti, l'urina prelevata per l'analisi dei solventi tal quali necessita di fastidiosi accorgimenti, pena la perdita del tossico per le elevate volatilità dei chimici; il trans-trans muconico mostra aspecificità (metabolita anche dell'acido ascorbico introdotto con la dieta) e sensibilità solo a concentrazioni ambientali elevate. Medesime carenze di sensibilità a basse concentrazioni ambientali vengono mostrate anche dai marcatori urinari di toluene e xileni.

Sulla base di queste premesse, l'indagine tossicologica effettuata in laboratorio ha previsto l'utilizzo e analisi quantitativa degli acidi mercapturici urinari SPMA, SBMA e o-MBMA sviluppando specificamente un metodo in cromatografia liquida accoppiata a detector di massa ( $\mu$ HPLC-ESI-MS/MS) altamente specifico e sensibile (rivelazione in tandem massa).

La completa validazione del metodo di analisi, secondo le linee guida della FDA per i metodi bioanalitici, ne ha permesso l'applicazione su di uno specifico gruppo di popolazione esposta ai tossici valutando l'effettiva capacità e sensibilità dello screening tossicologico sul campo.

## 2. HUMAN BIOMONITORING

### 2.1. Cenni storici

La determinazione delle sostanze chimiche tal quali o dei loro metaboliti nei fluidi biologici umani sono stati tra i primi approcci utilizzati in sanità pubblica e medicina del lavoro per la valutazione del grado di esposizione a sostanze xenobiotiche nei lavoratori e nella popolazione generale.

Il piombo [1] ed i metaboliti del benzene [2] rispettivamente nel sangue e nelle urine sono i primi pionieristici esempi di applicazione ed utilizzo dello *Human Biomonitoring* (HBM) negli ambienti di lavoro.

Dai primi anni '60 lo sviluppo ed il progresso delle tecniche analitiche hanno permesso la determinazione delle sostanze tossiche nei fluidi biologici in concentrazioni sempre più basse garantendo una più sensibile determinazione dell'inquinante (fino a concentrazioni dell'ordine di  $10^{-10}$  g/l).

L'impiego delle tecniche analitiche più sofisticate in supporto all'indagine epidemiologica permisero, attraverso la determinazione del piombo nel sangue della popolazione screenata (spettrometria di assorbimento atomico), di evidenziare il raggiungimento di concentrazioni ematotossiche del metallo. Tali concentrazioni furono così elevate da richiedere l'attivazione di un immediato intervento legislativo comunitario volto alla riduzione del contenuto di piombo nelle benzine.

Attraverso la direttiva 77/312/EEC fù, quindi, approvata l'attivazione di un protocollo di screening biologico specifico per il piombo plasmatico su ampia scala [3]. Questa direttiva, rimasta unico esempio legislativo in trenta anni di attività della commissione UE, richiedeva ad ogni stato membro di adottare una comune strategia di monitoraggio biologico, volta alla valutazione dell'entità dell'esposizione al metallo e dell'efficacia delle misure adottate per la sua riduzione.

Nel 2004, la stessa UE ha stabilito un programma di azione comunitario, in cui si richiedeva la conferma degli investimenti e dell'interesse degli stati membri nello sviluppo di approcci coerenti con lo Human Biomonitoring per le attuali tematiche di inquinamento ambientale a rischio per la popolazione.

Fortunatamente autorità nazionali iniziarono a legiferare in materia di protezione e salute pubblica, applicando disegni di human biomonitoring per la rivelazione dell'esposizione a vari inquinanti.

In Germania, nazione da sempre tra le più sensibili ed all'avanguardia in materia di tutela ambientale e salute pubblica, già dal 1985 è attivo un programma di rilevamento ambientale per numerose sostanze tossiche su ampia scala[4,5], anche gli Stati Uniti attraverso l'*US National Health and Nutritional Examination Survey* (NHANES 1976-2004) regolarmente si attua un programma di screening di sostanze tossiche nel sangue e nelle urine della popolazione generale [6, 7].

A livello internazionale, l'*Health and Environmental Science Institute* (HESI, 2004) dell'Istituto Internazionale delle Scienza della Vita (ILSI), ha creato un Comitato Tecnico sul Biomonitoraggio allo scopo di delineare l'uso scientifico appropriato dei dati di HBM e definire i criteri necessari per l'integrazione dei dati ottenuti dallo HBM nel processo di valutazione del rischio da esposizione ad inquinanti ambientali [8].

Le pratiche di monitoraggio, siano esse intese come ambientale o biologico, consistono in attività connesse con lo stato di salute dell'uomo (*health-related activity*) finalizzate all'adozione di idonee misure di riduzione correttive.

Riportando una definizione di Zielhuis (1984), viene descritto l'HBM come "*un'attività sistematica continua o ripetitiva per la raccolta di campioni biologici per l'analisi di concentrazioni di inquinanti, metaboliti o di specifici parametri di effetto biologico di immediato utilizzo, con l'obbiettivo di valutare l'esposizione e rischio per la salute di soggetti esposti, comparando i dati osservati con i livelli di riferimento*" [9].

L'HBM è considerato un'integrazione al monitoraggio ambientale (MA), ma non lo sostituisce completamente, pur identificando e quantificando marcatori biologici siano essi di esposizione o di effetto che ben correlano con i valori ambientali di tossico, il MA è fondamentale per identificare le sorgenti di emissione e definirne l'entità della stessa.

L'HBM è, invece, indispensabile per la stima della dose realmente assorbita e del rischio per la salute ad esso associato. Infatti, è scopo e capacità dell'HBM dimostrare se e quanta sostanza chimica presente nell'ambiente è realmente assorbita dall'organismo cercando, laddove possibile, di quantificare la dose interna che esplica realmente l'azione tossica.

L'identificazione dell'idoneo marcatore biologico correlato o rappresentante esso stesso la dose di tossico assorbito dall'organismo, la conoscenza dei rapporti dose-effetto e dose-risposta e in ultimo l'acquisizione del dato ambientale, permettono una valutazione più veritiera dell'esposizione al chimico e dei danni alla salute senza generare facili allarmismi.

La pubblicazione di due articoli rispettivamente di Suchenwirth et al. ed Angerer et al. sono esempi e dimostrazioni della regolare sovrastima del calcolo dall'esposizione a tossici attraverso sistemi differenti dall'HBM [10,11].

L'utilizzo di diversi metodi di valutazione dell'esposizione a tossici in Germania ha determinato l'attivazione di programmi di decontaminazione dai Policlorobifenili (PCB) con spese dell'ordine di miliardi di euro; successivamente l'adozione del monitoraggio biologico ha dimostrato come il reale assorbimento fosse di 2 o addirittura 3 ordini di grandezza inferiori a quelli originariamente calcolati [12].

La conferma delle capacità dell'HBM di identificare esposizioni a nuovi agenti chimici nella popolazione è attualmente rappresentato dal suo utilizzo per la rivelazione di composti perfluorinati nel sangue della popolazione generale [13-16].

Ulteriormente i vantaggi dell'utilizzo del monitoraggio biologico sono stati dimostrati dalla capacità di tal strumento di osservare trend e cambiamenti nell'esposizioni a tossici, come dimostrato dalla diminuzione del piombo e PCB o totale scomparsa di prodotti come il DDT dall'ambiente e conseguentemente dalle matrici biologiche analizzate [17-19].

L'HBM molto spesso permette di identificare gruppi della popolazione in cui l'esposizione al tossico determina un grave rischio per la salute, come ad esempio l'identificazione di un maggior assorbimento di pesticidi organoclorurati o piretroidi attraverso la dieta nei bambini rispetto agli adulti [20] o come sempre nei bambini si dimostri, nel caso degli ftalati, un maggior uptake ed una maggiore capacità di trasformare il chimico assorbito nel corrispondente metabolita tossico [21].

Per concludere questa premessa allo studio condotto, rimane da citare l'ultimo, ma non meno importante, vantaggio mostrato dall'adozione dell'HBM come strumento di indagine tossicologica; esso, infatti, tiene conto di tutte le vie di assorbimento rilevanti per l'uomo, non solo quella respiratoria o dermica maggiormente considerate a livello occupazionale ed ambientale.

Le potenzialità dell'HBM sono state recentemente valutate e riassunte da enti nazionali o internazionali come la National Academy of Sciences degli USA (2006), l'Health and Environmental Science Institute (HESI, 2004) dell'International Life Science Institute e dal Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, 2002).

## *2.2. Caratteristiche del Human Biomonitoring*

Le condizioni essenziali richieste per programmare il monitoraggio biologico di un tossico sono:

- ✓ una dettagliata conoscenza del metabolismo della sostanza nell'organismo umano e delle alterazioni che questa causa a carico dell'organo critico o all'organismo;
- ✓ l'esistenza di un idoneo indicatore biologico, capace di rispecchiare la dose interna (o l'esposizione), l'effetto biochimico o l'effetto biologico;
- ✓ l'esistenza di una idonea matrice biologica;
- ✓ il setup di un metodo analitico idoneo e riproducibile garantito da controlli di qualità;
- ✓ la conoscenza delle relazioni dose-effetto e dose-risposta (ovvero l'esistenza di valori limite e riferimenti che rendano possibile l'interpretazione del dato ottenuto).

Numerosi tossici non rispondono adeguatamente a tali requisiti e ciò comporta limitazioni in partenza sulla possibilità di programmare un monitoraggio biologico e da questo conseguentemente ricavare informazioni utili ed integrali.

Allo stato attuale delle conoscenze il monitoraggio biologico, non può essere applicato per la prevenzione degli effetti derivanti dalle sostanze cancerogene, mutagene, allergogene in quanto per queste non sono note le dosi soglia. Per soggetti esposti a tali sostanze l'HBM potrà essere effettuato solo allo scopo di valutare l'entità dell'esposizione [22].

Per l'applicazione pratica di un programma di monitoraggio biologico è necessario conoscere il comportamento degli indicatori utilizzati in relazione alle caratteristiche dell'esposizione al tossico (l'entità, la continuità, la durata, l'intervallo tra termine dell'esposizione e la determinazione analitica) e tutti i fattori indipendenti dall'esposizione, quindi i caratteri individuali (fisiologici e/o patologici), che possono modificare i livelli degli indicatori biologici scelti.

La precisa caratterizzazione di un programma di human biomonitoring, assieme all'analisi di specifici marcatori biologici, permette di ottenere numerosi ed evidenti vantaggi informativi. L'aspetto che, principalmente, caratterizza questo tipo di approccio è l'estrema dinamicità dell'informazione potenzialmente ottenibile permettendo così, in condizioni di piena soddisfazione dei requisiti dell'HBM, di scegliere perfettamente il tipo di indicatore biologico in funzione delle specifiche richieste dello studio.

I dati ottenibili dall'HBM permettono di poter caratterizzare le condizioni lavorative potenzialmente a rischio determinando, ad esempio, le esposizioni relative ad un periodo di tempo prolungato, le quantità di sostanza tossica presente nell'ambiente di lavoro al momento dell'analisi dell'inquinamento ambientale; oppure l'esposizione come risultato della mobilità del lavoratore nell'ambiente di lavoro, pertanto non solo la quantità di sostanza presente nel suo posto di lavoro teorico ma l'esposizione individuale globale derivante da differenti sorgenti di inquinamento, professionali ed extraprofessionali. In aggiunta, possono essere

determinate informazioni sulla tossicità della sostanza in studio (tossicità dipendente o non dipendente dalla dose assorbita); valutare l'entità dell'assorbimento per condizioni espositive influenzate dal tipo di utilizzo del chimico (in forma gassosa, liquida o solida), dalla mansione ricoperta dal lavoratore, dal carico di lavoro, dalle condizioni climatiche tenendo conto di tutte le vie di penetrazione potenziali dei tossici.

Esaminando gli aspetti indipendenti dall'esposizione discriminati dal monitoraggio biologico questo permette di determinare la quantità di una sostanza assorbita del soggetto in funzione di fattori individuali che influenzano la farmacocinetica dell'agente tossico nell'organismo; fattori che dipendono, ad esempio, dall'età, sesso, da caratteristiche genetiche, dalle condizioni di funzionalità degli organi deputati alla biotrasformazione ed alla eliminazione del tossico.

Ricordando, infine, il determinante apporto del dato ambientale nel chiarimento dei rapporti di correlazione tra la concentrazione di inquinante nell'ambiente alla dose di marcatore biologico nei fluidi biologici, è merito e scopo del monitoraggio biologico poter stabilire la correlazione di questi ultimi all'intensità dell'effetto biologico provocato negli individui esposti al tossico, relazioni queste fondamentali per la definizione dei livelli biologici di sicurezza.

### *2.2.1. Matrici Biologiche*

Il materiale biologico utilizzato per l'analisi chimica deve essere disponibile, in linea di principio, in quantità sufficiente in condizioni normali senza discomfort e rischi per la salute dell'individuo.

Per questo motivo il sangue e le urine sono le matrici biologiche più comunemente utilizzate. Il sangue è il compartimento centrale in equilibrio con tutto l'organismo. L'urina invece è la matrice più prontamente disponibile, l'ampio volume raccolto permette poi la determinazione di sostanze chimiche in concentrazioni molto basse per livelli minimi di esposizione ambientale.

Altre matrici biologiche come i capelli, l'aria alveolare (o polmonare), denti, unghie e saliva sono state utilizzate per lo human biomonitoring. Vari motivi limitano l'utilizzo di queste matrici in programmi di HBM, determinante è la mancanza di procedure operative standard (SOPs) validate e pubblicate e di disponibilità per queste matrici di schemi di valutazione

esterni della qualità del dato prodotto, di valori di riferimento o limite robusti per la corretta interpretazione dei risultati. Ognuna di queste matrici presentano dei difetti.

Nel caso dei capelli, le contaminazioni esogene, il grado di salute del capello ed altri fattori influenzano il risultato analitico [23,24]. Un'elevata variabilità inter-individuale della concentrazione di piombo nelle unghie rende non idonea questa matrice nel suo impiego in un HBM [25]. Comunque, per scopi specifici i capelli e le unghie sono utilizzate come matrice biologica idonea per la valutazione dell'esposizione in epidemiologia ambientale, ad esempio, per la valutazione dell'intake del metil-mercurio attraverso il consumo di pesce [26] o dell'arsenico [27, 28] ed ampiamente in medicina forense. La raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni di aria alveolare sono oltretutto critici per la potenziale perdita di campione per fenomeni di assorbimento impedendone il suo potenziale largo utilizzo.

La saliva, in ultimo, è stata proposta come potenziale matrice biologica utilizzata nel caso di esposizioni a piombo ed organofosfati [29]. Dati contrastanti prodotti da due autori non confermano l'idoneità della matrice saliva in casi di esposizioni al piombo, limitandone ad oggi il suo utilizzo in misure individuali e in studi sulla popolazione [29,30].

## *2.2.2. I BIOMARKER*

### *2.2.2.1. Definizioni e classificazione*

Il monitoraggio biologico consiste nella misura singola o ripetuta nel tempo, di fluidi o tessuti biologici atta a documentare e quantificare l'interazione di un qualsiasi agente lesivo (fisico, chimico o biologico) con l'organismo per valutare l'esposizione e il rischio per la salute in rapporto ad appropriati riferimenti. Con il termine di indicatore biologico (IB) ci si riferisce ad un qualsiasi indicatore di un evento o modificazione in un sistema o campione biologico che sia in rapporto con l'esposizione ad un agente lesivo [31]. Nel nostro campo di applicazione il termine IB è più spesso usato in riferimento all'esposizione, risposta o suscettibilità ad agenti chimici e possono essere classificati in base a criteri diversi:

- a) alla matrice biologica in cui vengono testati (es. urine, sangue, tessuti, aria espirata),
- b) all'organo o tessuto in cui hanno origine o che li ha prodotti (es. renali, epatici, del sistema nervoso),

c) alle caratteristiche chimico-fisiche (es. volatili, idro/liposolubili),

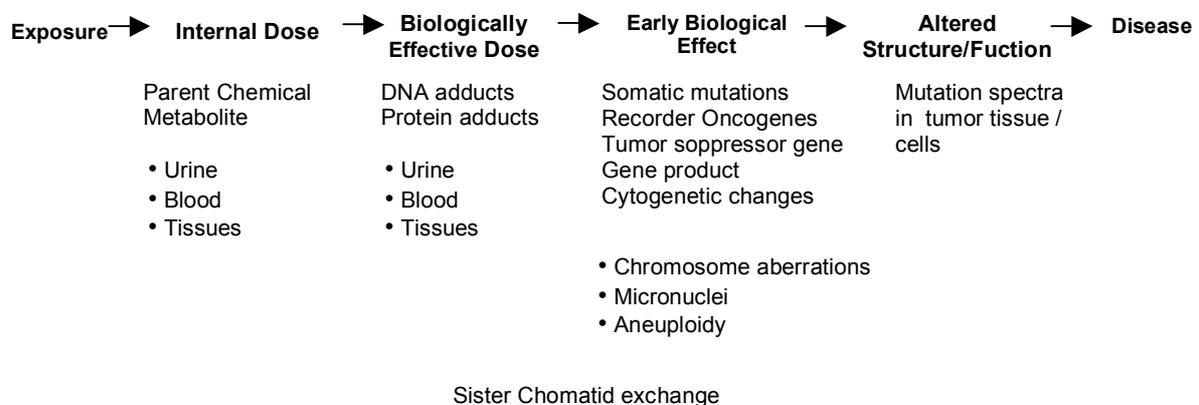
d) al significato tossicologico e al valore predittivo che viene loro attribuito rispetto al fattore di rischio di cui sono appunto indicatori.

Tradizionalmente gli IB sono classificati in base al significato tossicologico e, pertanto, sono suddivisi in tre categorie ulteriori:

- indicatori di *dose o esposizione*
- indicatori di *risposta* (o effetto)
- indicatori di *suscettibilità*

All'interno di queste categorie sono stati individuati dei sottogruppi le cui caratteristiche distintive permettono di chiarire il loro significato e ruolo biologico nel continuum di eventi biologici che vanno dall'esposizione al tossico alla comparsa della malattia. Questo continuum di eventi può essere rappresentato diversamente chiarendo i rapporti tra gli eventi tossicocinetici / tossicodinamici in atto e le varie classi (e sottogruppi) di indicatori biologici potenzialmente analizzabili [31].

Nella sezione successiva tratteremo ampiamente gli indicatori di dose, limitandoci solo a definire il significato e ruolo tossicologico degli indicatori di effetto e suscettibilità; non tratteremo invece in alcun modo gli indicatori precoci di malattia perché di ambito strettamente medico-diagnostico che esulano dal nostro campo di studio.



### Biomarker of Exposure

### Biomarker of Effect

Relazione tra eventi biologici e biomarker [32].

<b>Evento tossicologicamente rilevante</b>	<b>Indicatore Biologico (IB)</b>
1. Assorbimento dello xenobiotico nell'organismo (via inalatoria, digestiva, cutanea, ecc.)	di esposizione (IBE) <ul style="list-style-type: none"> <li>• corrente (IBEC)</li> <li>• recente (IBER)</li> <li>• pregressa/remota (IBEP)</li> </ul>
2. Distribuzione ed accumulo (ossa, lipidi, SNC, ecc.)	di dose interna (IDI)
3. Escrezione (urinaria, epatica, polmonare)	di esposizione (IBE) o di dose interna (IDI)
4. Legame con bersaglio critico o non critico (DNA, HB, enzimi, ecc.)	di dose biologicamente efficace (IDBE)
5. Alterazioni biochimiche, funzionali o strutturali precoci	di risposta/ effetto (IBR) <ul style="list-style-type: none"> <li>• deterministico (d'organo, sistemici)</li> <li>• stocastico (tumore, effetti immunoallergici)</li> </ul>
6. Suscettibilità genetica o acquisita	di suscettibilità (IBS)
7. Lesione d'organo o sistema	precoce di malattia (IPM)

Sequenza di eventi tossicologicamente rilevanti nel continuum che va dall'esposizione al manifestarsi della patologia e relative classi di indicatori biologici [31].

#### 2.2.2.2. Indicatori biologici di dose (o esposizione)

Fondamentale, per la descrivere e distinguere le varie classi di indicatori di dose (o esposizione), è la definizione di dose, ovvero, *“la concentrazione di una determinata sostanza a livello dei siti dell'organismo dove essa esplica gli effetti biologici”*. Nella maggior parte dei casi, la misurazione diretta della dose non è possibile per problemi pratici e tossicocinetici; a tal punto solo mediante la determinazione di differenti tipologie di indicatori biologici di dose (misure surrogate) potremo ricavare un dato quantitativo riferito o correlato alla dose reale assorbita.

Con il termine di indicatori di dose (o esposizione) generalmente vengono distinti:

indicatori “veri” di dose interna;

indicatori di esposizione o dose;

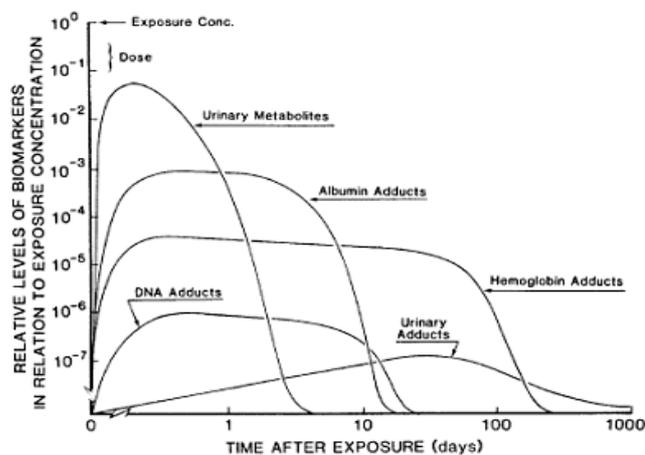
indicatori di accumulo o deposito.

Gli indicatori “veri” di dose interna misurano la dose laddove esplica l’azione tossica e permettono di valutare la quantità di tossico metabolicamente attivo. Rappresentano una particolare e rara categoria di indicatori di dose in quanto sono in grado di misurare direttamente o indirettamente, attraverso la misura dei metaboliti, la quantità/concentrazione di xenobiotico presente o accumulata in un determinato compartimento od organo. Gli indicatori di dose interna “vera” sono spesso più informativi dei corrispondenti indicatori di esposizione in quanto forniscono un’informazione più mirata e che si presta ad una valutazione del rischio più precisa. Purtroppo sono pochi gli esempi che possiamo riportare per questa particolare tipologia di indicatori, ad esempio il piombo diffusibile plasmatico (determinato indirettamente attraverso l’analisi in urina del piombo “chelato” a seguito di somministrazione di una sale, il varsenato di calcio, che lega specificamente il piombo extracellulare ovvero la frazione diffusibile responsabile dell’azione tossica del metallo) oppure il 2-5 esandione per l’esposizioni ad esano e a metiletilchetone o quello relativo agli addotti al DNA indicati, più specificamente, come indicatori di dose biologicamente efficace [33].

Gli indicatori di esposizione o dose (definita quest’ultima come dose corrente) valutano l’esposizione di un soggetto ad un tossico grazie all’esistenza di una correlazione con il dato ambientale. La distinzione tra indicatori di dose corrente o di esposizione permette di identificare nella matrice biologica testata nel primo caso la medesima sostanza a cui siamo esposti, mentre, nel secondo caso, un prodotto della sua trasformazione metabolica. Esempi ne sono il cadmio ematico che correla con il cadmio presente nell’aria come indicatore di dose corrente e l’acido ippurico, metabolita del toluene quindi definito indicatore di esposizione, che correla, in maniera ottimale, con la concentrazione ambientale di toluene. Gli indicatori di accumulo misurano la concentrazione del tossico in quegli organi o tessuti dai quali, una volta depositato, il tossico viene rilasciato difficilmente o molto lentamente [33].

Oltre a questo tipo di distinzione tossicologica, aggiungiamo che per uno stesso chimico possono essere disponibili differenti biomarker, che questo specifico biomarker dovrà essere analizzato in un campione biologico raccolto entro un termine preciso di tempo e che in ultimo esso tale indicatore biologico potrà essere espressione di una recente o passata esposizione al tossico. Per meglio chiarire questo aspetto faremo degli esempi pratici: nel caso di marcatori con tempo di emivita corta, tipo i composti misurati nel sangue, la dose interna può riflettere la quantità di tossico assorbita subito prima della raccolta del campione

biologico. I marcatori con tempi di emivita intermedi, come i metaboliti urinari, stimano la dose interna, che può essere quella assorbita nei giorni precedenti o durante un turno lavorativo. Gli addotti al DNA o all'emoglobina, esempi di marcatori con emivita lunga, riflettono dosi interne che possono coprire interi mesi. Le sostanze chimiche con caratteristiche di accumulo stimano la dose interna riferita alla quantità di tossico immagazzinata nel tessuto o in un organo per periodi maggiori anche di un anno.



Ipotetica relazione tra differenti biomarker di esposizione ed i loro relativi livelli e tempi di comparsa dopo singola esposizione [34].

### 2.2.2.3. I biomarcatori di dose biologicamente efficace

I biomarcatori di dose biologicamente efficace, come descritto dal continuum degli eventi biologici nello sviluppo di una malattia, si collocano fra gli indicatori di esposizione.

Essi riflettendo, a differenza degli indicatori di dose interna (xenobiotici o loro metaboliti contenuti nei fluidi biologici) la dose vera, ovvero la frazione di tossico biologicamente attiva (xenobiotico tal quale o suo metabolita) nel sito bersaglio, che è specificatamente capace di legare covalentemente solo le macromolecole cellulari che trasportano l'informazione genetica come il DNA, RNA o le proteine. Attraverso l'analisi e determinazione di questi tipi di addotti è infatti possibile non solo ricavare informazioni sulla dose interna, ma essi possono anche rappresentare un indice della dose al bersaglio ed, ulteriormente, informativi di effetto e di suscettibilità evidenziando le possibili differenze nel metabolismo del cancerogeno tra individui [35,36].

#### 2.2.2.4. Utilizzo degli indicatori di esposizione nel monitoraggio biologico

Il loro uso, individuale o di gruppo, costituisce un'utile integrazione dei dati di monitoraggio ambientale; come detto in precedenza, uno dei vantaggi del monitoraggio biologico (MB) è quello di valutare qualsiasi via di penetrazione del tossico (esposizioni aeree, cutanee o gastriche) nell'organismo, rigido limite imposto dal monitoraggio ambientale. Altro vantaggio dell'MB deriva dalla modalità di utilizzo degli indicatori di esposizione scelti, potendo così allestire saggi di determinazione tossicologica specificamente rivolti ai composti da valutare, siano essi intesi come molecole o elementi specifici o analizzandoli per classi di composti (come nel caso dei congeneri dei PCB o delle diossine).

La principale applicazione pratica degli IBE sta nella possibilità di confrontare i valori riscontrati nei lavoratori con i valori limite di esposizione disponibili, quali ad esempio i Biological Exposure Indices (BEI) dell'American Conference of Government Industrial Hygienists (ACGIH) o con i BAT tedeschi o gli Occupational Exposure Limits (OEL) dell'Unione Europea (EU). L'utilizzo degli IBE in molti casi è condizionato, tuttavia, alla possibilità di confrontare i valori misurati nei lavoratori con quelli presenti in una adeguata popolazione di controllo non professionalmente esposta, detta di riferimento [37].

#### 2.2.2.5. Indicatori di effetto

Gli indicatori di effetto sono definiti come: *“alterazioni biochimiche, morfologiche e funzionali che, in funzione della loro gravità, indicano un ampio spettro di risposte biologiche, da semplici adattamenti fisiologici a quadri patologici ben definiti e a malattie conclamate”* [38].

Essi comprendono gli indicatori di effetto critico ed effetto subcritico; per effetto critico si intende come già detto un effetto, ossia un'alterazione biologica precoce e reversibile, che si manifesta a carico dell'organo nel quale la concentrazione del tossico, raggiunta la dose critica, determina un primo effetto biologico. [33]. Con il termine di indicatore di effetto subcritico viene definito, invece, l'effetto causato sullo stesso organo critico quando la concentrazione del tossico sia inferiore alla concentrazione critica e che non comporta, di per se, una alterazione della funzione delle cellule.

Nel monitoraggio biologico gli indicatori di effetto possono essere impiegati per stimare indirettamente la dose, quando la misura dell'inquinante primario è disponibile o affidabile

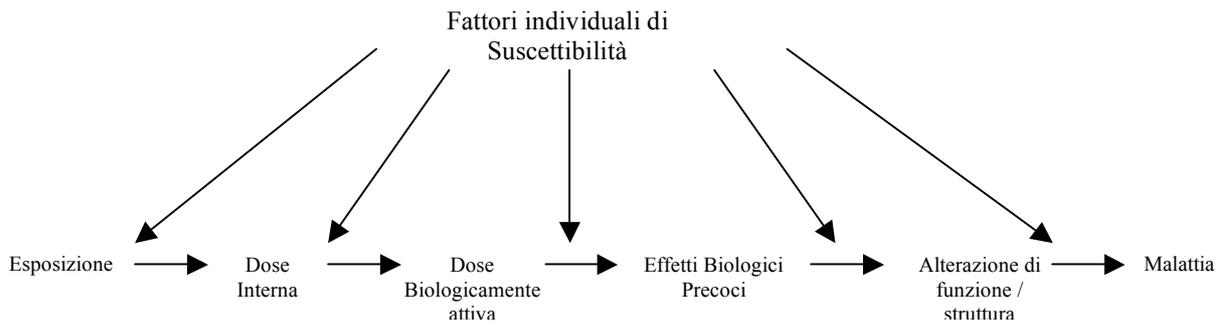
(es. l'ALAD e l'ALA-U indicatori indiretti dell'esposizione a piombo prima del perfezionamento delle specifiche tecniche analitiche oggi impiegate), o la suscettibilità individuale per valutare le capacità individuali di riparazione del DNA. L'uso più appropriato degli indicatori di effetto è tuttavia la stima del rischio degli effetti a lungo termine, allo scopo di individuare eventuali interventi di prevenzione primaria se gli effetti considerati sono reversibili o come strumenti diagnostici per l'identificazione precoce se, gli effetti a carico dell'organo bersaglio, fossero irreversibili [37,39].

Il monitoraggio degli effetti biologici è utile per la stima del rischio nei casi in cui non siano note o esistano relazioni dose-effetto e dose-risposta; in tal caso, le limitate conoscenze tossicologiche derivanti dall'utilizzo dei soli indicatori di esposizione o di dose (monitoraggio ambientale o biologico) risultano insufficienti per la stima del rischio per effetti a lungo termine. Tal limite è superato dal riconoscimento, proprio attraverso l'utilizzo di tali indicatori, delle manifestazioni precoci di effetto (vedi continuum) che caratterizzano e precedono la comparsa della malattia conclamata.

#### *2.2.2.6. Indicatori di suscettibilità*

Con il termine di indicatori di suscettibilità si intende un indicatore che esprime una condizione che può essere acquisita nel corso della vita o presente sin dalla nascita. Questa condizione esprime una differente capacità di un organismo a compensare o combattere l'esposizione ad un tossico. Questo tipo di indicatori possono riferirsi alle caratteristiche che influenzano una delle varie fasi tossicocinetiche (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione) a cui la sostanza esogena va incontro nell'organismo, alla capacità di causare modificazioni all'organismo e/o influenzare il processo di inizio e/o decorso della malattia.

Per valutare correttamente il rischio soggettivo o di gruppo, associato con lo sviluppo di una determinata malattia, è fondamentale la conoscenza di tali fattori genetici predisponenti [35]. Gli enzimi acetilanti della biotrasformazione di fase II, la cui maggiore attività acetilante verso alcune ammine aromatiche è inversamente correlata alla probabilità di sviluppare il tumore della vescica, sono un esempio tipico di indicatori di suscettibilità [40].



Potenziati suscettibilità nel continuum tra l'esposizione ad un tossico e la malattia conclamata [40].

### 2.2.3. Classificazione degli effetti tossici, le relazioni dose effetto e dose risposta

Un tossico per poter determinare un effetto nocivo all'organismo deve innanzitutto presentare delle caratteristiche chimico-fisiche che ne permettano l'entrata nell'organismo. Qualora il tossico espliciti un effetto tossico unicamente nel sito di contatto con l'organismo (ad esempio irritazione locale), senza fenomeni di assorbimento corporei, non avrà alcun senso applicare o attivare programmi di monitoraggio biologico poiché il monitoraggio ambientale sarà già in grado di valutare l'esposizione al tossico e fornire le misure preventive o correttive per la tutela della salute dei lavoratori e della popolazione in generale.

Oltre alla capacità del tossico di penetrare nell'organismo, esso dovrà possedere tutte quelle caratteristiche tossicocinetiche necessarie per il raggiungimento della dose critica nel sito bersaglio e tossicodinamiche necessarie perché questo espliciti anche un'azione biologica nociva o effetto tossico.

Questi effetti tossici possono essere classificati in 3 importanti categorie: effetti **deterministici**, effetti **stocastico – probabilistici**, ed effetti **immuno-allergici**

Tali alterazioni possono essere ricondotte, attraverso l'oramai profonda conoscenza dei meccanismi con cui un tossico esplicita la sua azione tossica ed al riconoscimento di forme clinicamente apprezzabili delle "work and environmental related disease", a cause precise che devono essere identificate, corrette o prevenute attraverso l'adozione di misure di riduzione dell'esposizione o completa sostituzione della sostanza chimica che provoca l'effetto tossico [33].

Alla prima categoria appartengono sostanze chimiche la cui tossicità, in base all'assunto di Paracelso secondo cui "Tutte le sostanze sono dannose ed è la dose che determina il danno",

può essere valutata con parametri quantitativi attraverso la determinazione della relazione esistente tra entità della dose e entità degli effetti [41].

Alla seconda e terza categoria appartengono sostanze che determinano effetti di tipo stocastico-probabilistici (agenti cancerogeni, mutageni e teratogeni) e immuno-allergici per le quali non sono state ancora individuate, se esistenti, delle dosi soglia per le quali, per definizione, non esistono dosi di sicurezza certamente capaci, allo stato di conoscenza attuale, di non determinare alcun effetto tossico.

Questi limiti conoscitivi derivano dall'elevata complessità dei meccanismi alla base della loro tossicità, alla mancanza di relazioni dose-effetto che derivano o dall'incapacità nel riconoscere la dose capace di provocare quell'effetto o nel riconoscere quell'effetto precoce indicatore reale dell'inizio, sviluppo o progressione di una specifica malattia, che oltretutto, può avere tempi lunghi di quiescenza prima della sua manifestazione conclamata.

Nella tabella sottostante si raccolgono sinteticamente tutte le informazioni caratterizzanti le tipologie di effetti tossici evocati dall'esposizione alle sostanze chimiche [33].

	<b>Effetti deterministici</b>	<b>Effetti probabilistici</b>	<b>Effetti immuno-Sensibilizzazione</b>	<b>allergici Effetti clinici</b>
<b>Dose soglia</b>	Esistente	Non nota	Probabilmente esistente <i>la sensibilizzazione si verifica per esposizioni elevate</i>	Non nota <i>nei sensibilizzati gli effetti sono scatenati da dosi molto basse</i>
<b>Relazione dose/effetto</b>	Esistente	Non esistente	Non esistente	Esistente
<b>Relazione dose/risposta</b>	Esistente	Esistente	Esistente	Esistente
<b>Reversibilità degli effetti</b>	Reversibili	Effetti mutageni reversibili, effetti teratogeni e cancerogeni irreversibili	Generalmente irreversibili	Reversibili (possono reliquare situazioni predisponenti)
<b>Predisposizioni</b>				
<b>a) genetiche</b>	In fase di studio	Esistenti	Atopia	Non nota
<b>b) situazioni fisiologiche o patologiche</b>	Possibili	Importanti	Note	Possibili
<b>Valori limite</b>	Valori <i>health based</i>	Valori limite tecnici	Allo studio	Allo studio

Caratteristiche proprie dei tossici che causano effetti deterministici, probabilistici e immunoallergici.

La misura della concentrazione di una sostanza nell'ambiente e la contemporanea misura degli effetti sull'organismo consentono di studiare le cosiddette relazioni dose-effetto o dose-risposta con il chiarimento del comportamento dell'organismo in seguito all'assorbimento della sostanza.

La prima consente lo studio della relazione tra livelli crescenti di tossico in un dato periodo di tempo, ovvero la dose e le alterazioni osservate nell'organismo, su ciascun individuo appartenente al gruppo studiato, focalizzando l'attenzione sul fenomeno osservato (es. riconoscimento di dose soglia o effetto spontaneo) e sul tipo di dipendenza esistente tra le variabili studiate; la seconda permette invece di individuare la percentuale di soggetti (appartenenti ad un gruppo) che presentano ad una determinata dose un certo effetto riconoscendo le diverse sensibilità dei soggetti al tossico [42].

#### *2.2.4. I valori di riferimento e livelli d'azione biologici*

I risultati ottenuti dal monitoraggio biologico sono valutati attraverso la loro comparazione rispetto ad importanti valori di riferimento. Nel monitoraggio biologico possono essere distinti due differenti gruppi di valori di riferimento: i valori di riferimento per la popolazione non esposta professionalmente ed i BAL (biological action limits) per la popolazione esposta professionalmente.

I primi rappresentano la concentrazione di tossici ritrovati nella popolazione normale sana e non esposta che vive in condizioni ambientali comparabili alla popolazione esposta.

Tali valori di riferimento possono essere marcatamente differenti tra le popolazioni, poiché questi sono correlati alle concentrazioni di tossico derivanti o dallo specifico ambiente circostante, o dalle abitudini della dieta. Per questi valori di riferimento si prevede anche un aggiornamento in conseguenza a nuove disposizioni di legge, esse determinano un abbassamento delle concentrazioni ambientali dei tossici direttamente associati ad una minore esposizione della popolazione [43]. Recentemente, molto importanti per la popolazione non esposta, sono diventati i valori di riferimento per il monitoraggio biologico delle sostanze chimiche classificate come cancerogene. Per definizione, infatti, nessuna esposizione a cancerogeni può essere considerata completamente sicura (causa di effetti biologici stocastici: non dose dipendente). A tal proposito è molto importante essere capaci di valutare livelli di concentrazione sempre più bassi per la distinzione dei soggetti esposti da quelli non esposti.

Durante gli ultimi anni molte nazioni ed organismi internazionali hanno redatto delle liste di biological action limits. Le liste più note ed importanti sono rappresentate dai BEI (Biological Exposure Indices) compilata dall'ACGIH e dai BAT (Biologischer Arbeitsstoff Toleranz-Wert": Biological tolerance values for occupational exposures") della DFG "Deutsche Forschungsgemeinschaft" per i chimici in generale e gli EKA (Expositionsequivalente für

krebserzeugende Arbeitsstoffe) valori biologici equivalenti per esposizioni a chimici classificati come cancerogeni.

I valori BAL rappresentano valori di tossici definiti come accettabili, permettono, quindi, in condizioni di lavoro, un determinato up-take di chimico nel luogo di lavoro.

Questi valori possono essere derivati attraverso due tipi di approcci: direttamente attraverso l'analisi dei rapporti dose-effetto e dose-risposta o indirettamente dalla comparazione rispetto ai valori ambientali ritrovati negli ambienti di lavoro.

Il primo è derivato dagli studi di follow-up su lavoratori esposti, essi rappresentano i valori delle sostanze chimiche o loro metaboliti nel sangue o urina che tengono conto degli effetti avversi prodotti dal tossico in seguito all'esposizione.

Questi valori sono molto difficili da ottenere, e pertanto sono presentati e proposti solo per un numero limitato di sostanze. La WHO ha raccomandato questi valori per il Pb, Hg, Cd per alcuni solventi e pesticidi.

Molti valori BAL sono derivati indirettamente dai valori limite del tossico in aria negli ambienti di lavoro come i TLV (Threshold Limit Value) dell'ACGIH o dai MAK (maximum workplace concentration) o ancora dai TRK (valori guida per le sostanze cancerogene) della DFG tedesca.

I valori limite BEI (Biological Exposure Indices) per le sostanze chimiche rilevate nelle matrici biologiche sono proposti dall'A.C.G.I.H. come valori di riferimento utili per la valutazione dei rischi per la salute dell'uomo. Gli IBE rappresentano i valori del livello dell'indicatore che, con elevata probabilità, è possibile riscontrare in campioni prelevati su lavoratori sani, esposti a livelli di concentrazione nell'aria dell'ordine di grandezza del TLV-TWA. La definizione di un valore numerico non assicura con certezza la distinzione tra un'esposizione pericolosa ed una non pericolosa. Il superamento dei valori limite indicati, a causa della variabilità biologica, non implica automaticamente o necessariamente un aumento del rischio per la salute. Bisogna aggiungere che, pur essendo la valutazione dei tossici nella matrice biologica sempre più accurata rispetto alle sole valutazioni ambientali, i valori BEI così determinati dipendono strettamente dallo standard aereo definito per quel tossico. A questo si aggiungono altre considerazioni, non basate sulla salute, che influenzano l'identificazioni di questi valori di riferimento.

La Commissione per la valutazione dei rischi per la salute dovuti a prodotti chimici industriali, la "Deutsche Forschungsgemeinschaft", usa un approccio maggiormente informativo ed utile, concretamente, ad una "migliore" stima del rischio. La definizione dei MAK (maximum workplace concentration) e quella dei BAT (Biologischer Arbeitsstoff

Toleranz- Wert”: Biological tolerance values for occupational exposures”) sono collegate in modo biunivoco esprimendo le prime le concentrazioni ambientali e le seconde le corrispondenti concentrazioni biologiche che generalmente non si associano ad effetti negativi sulla salute degli operatori esposti. La maggior parte dei BAT derivano dalla relazione tra le concentrazioni ambientali di una sostanza e quelle rilevate in materiali biologici (sangue, urine, aria alveolare) della sostanza stessa o di un suo metabolita. In pochi casi la relazione è precisamente riferita al rapporto tra concentrazioni biologiche di una sostanza e gli effetti biologici indotti sulle persone esposte. Il numero di elementi e sostanze per cui sono stati fissati limiti biologici è ancora ridotto (36 per l’ACGIH, 48 per la DFG).

In Italia il Valore Limite biologico è stato definito utilizzando unicamente la regressione tra le concentrazioni ambientali del prodotto in studio e le corrispondenti concentrazioni nelle varie matrici biologiche, escludendo completamente correlazioni rispetto a parametri (indicatori) che descrivono un qualsiasi effetto biologico associato con l’esposizione al tossico [43].

#### *2.2.5. Metodi analitici e controlli di qualità*

L’ultimo requisito a cui un disegno o progetto di human biomonitoring deve rispondere è puramente analitico. Questo riguarda specificamente il controllo del dato prodotto dal lavoro in laboratorio. Nella medicina ambientale, il monitoraggio biologico gioca un ruolo fondamentale nel processo di valutazione dell’esposizione ad agenti chimici. Proprio a causa della sua importanza sociale, ed allo scopo di ottimizzare gli elevati investimenti economici propri dell’indagine tossicologica o conseguenti all’attivazione delle misure di tutela della salute pubblica da esso derivanti, deve essere garantita la qualità del dato analitico in termini di affidabilità e riproducibilità [44].

Un metodo analitico generalmente consiste di 4 fasi: una fase preanalitica, una analitica, una di controllo di qualità (controllo interno ed esterno) ed una di valutazione ed interpretazione dei risultati.

L’adozione di procedure operative standard (SOP) permette di garantire la riproducibilità del dato analitico del HBM. Tutte le fasi come la modalità di raccolta del campione biologico (tempi di raccolta), cambiamenti della concentrazione dell’analita per fenomeni di degradazione o evaporazione, contaminazione esogena, possono infatti influenzare la qualità del dato analitico finale. La standardizzazione di tutte queste fasi permette di ridurre gli errori da essi derivanti o eventualmente il riconoscimento dell’errore o effetto causato.

Le SOP devono descrivere anche tutti gli step della fase analitica quali: la composizione analitica del campione biologico, i processi di clean-up dello stesso campione biologico, la calibrazione e l'analisi strumentale riducendo, anche in questo caso, le fonti di imprecisione ed inaccuratezza da essi derivanti.

A questo punto il dato prodotto potrà essere valutato in termini di qualità attraverso l'adozione di un metodo di controllo interno e/o esterno.

Il metodo di controllo interno della qualità è un controllo sistematico della precisione, in condizioni costanti e riproducibili, per determinare l'errore casuale e l'accuratezza della misura quantitativa effettuata dal laboratorio stesso (metodi di validazione analitica o linee guida internazionali es. FDA Bioanalytical Method Validation, ecc.).

Il controllo esterno della qualità è un sistema attraverso il quale, invece, altri laboratori valutano oggettivamente le performance analitiche. In Germania, tale sistema (attivo e attivato per l'analisi di numerosi biomarcatori) prevede, prendendo in esame un determinato biomarker in una specifica matrice biologica, l'analisi dello stesso campione in sei laboratori di riferimento, in 5 giorni differenti ognuno in duplicato. La stima della precisione del dato è fornita sia in termini di differenza tra giorni (interday precision) sia in termini di variazione interlaboratorio [44].

#### *2.2.6. Il ruolo del monitoraggio biologico in salute pubblica, la sorveglianza sanitaria e l'approccio epidemiologico*

Il monitoraggio biologico è uno degli strumenti di cui il medico del lavoro dispone per attuare correttamente il programma di sorveglianza sanitaria (S.S). Si definisce la S.S, infatti, l'attività medica finalizzata ad evidenziare, quanto più precocemente possibile, alterazioni dello stato di salute che possano essere la conseguenza dell'esposizione a xenobiotico e possano rappresentare una controindicazione all'esposizione allo xenobiotico stesso. Il campo d'azione della sorveglianza sanitaria mira a valutare lo stato di salute e identificare i soggetti che presentano alterazioni precoci dello stato di salute e, per questo motivo, si avvale anche dell'esame di altri parametri preclinici e di alterazioni funzionali che impongono l'attuazione di opportuni interventi preventivi includendo, a seconda dell'ambito medico di appartenenza, l'aspetti più prettamente diagnostici [45].

I risultati di un programma di monitoraggio biologico possono essere aggregati per una valutazione di gruppo a fini di ricerca e sorveglianza epidemiologica, oppure direttamente

utilizzati per una valutazione a livello individuale in un programma di sorveglianza sanitaria. L'applicazione a livello individuale ha come presupposti la disponibilità di test sufficientemente accurati e di adeguate conoscenze circa la relazione tra gli indicatori e gli effetti avversi sulla salute. L'identificazione di valori limite biologici, siano essi rappresentanti le sostanze con un definito livello o soglia di azione oppure le concentrazioni di tossici con effetti probabilistici a cui si associa un livello di rischio sufficientemente basso, saranno fondamentali per la corretta pratica di questi strumenti di prevenzione delle categorie professionalmente esposte, sempre più utili nella stima del rischio chimico e danno alla salute nella popolazione in generale [45].

### 3. TOSSICI AMBIENTALI ED INDUSTRIALI

#### 3.1. Benzene

Il benzene è un liquido incolore dal caratteristico odore pungente e marcata tendenza al dolce; è caratterizzato da alta infiammabilità, alta tensione di vapore a temperatura ambiente e bassa solubilità in solventi polari.

La sua elevata infiammabilità lo rende particolarmente pericoloso, l'elevata evaporazione è invece primariamente responsabile dei fenomeni di avvelenamento che, ad elevate concentrazioni, possono portare fino alla morte per paralisi del sistema respiratorio e successiva asfissia.

Ad oggi, il benzene è ottenuto dalla distillazione del petrolio, la maggior parte (85%) trova impiego nella chimica come materia prima per numerosi composti secondari, a loro volta utilizzati per produrre plastiche, resine, detergenti, pesticidi, intermedi per l'industria farmaceutica, vernici, collanti, inchiostri, adesivi e prodotti per la pulizia.

Il benzene presente in atmosfera deriva da processi evaporativi diretti come le emissioni industriali, o indiretti derivati dall'uso del petrolio e dei suoi sottoprodotti, da processi di combustione incompleta sia di natura antropica (veicoli a motore), che naturale (incendi boschivi, decomposizione di materia organica, emissioni vulcaniche ) in conseguenza di questa ampia origine è raro trovare nel mondo habitat incontaminati.

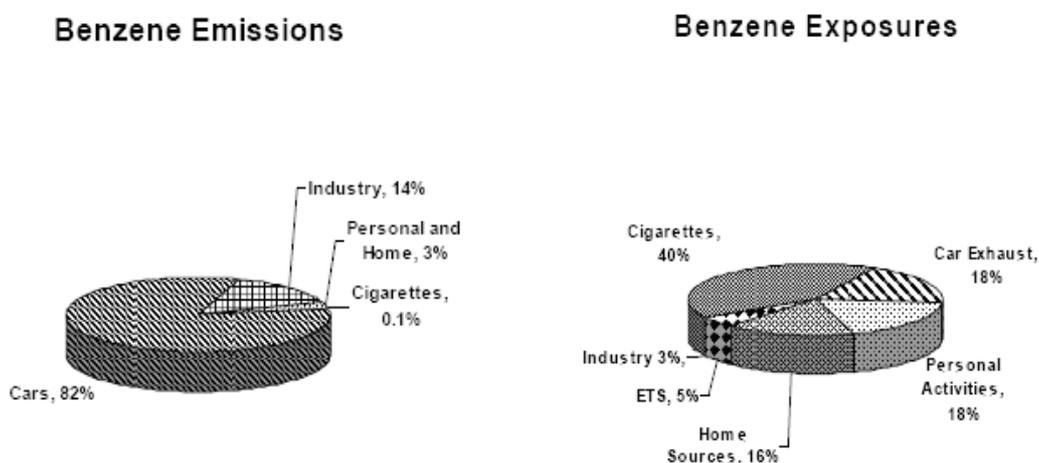
I livelli di benzene nell'aria variano tra 0.1 e 17 ppb nelle regioni non industrializzate, ma crescono fino ad essere comprese tra 0.01 e 0.09 ppm nelle grandi città [46].

I gas di scarico dei veicoli a motore alimentati con benzina rappresentano la principale fonte di emissione di benzene, esso viene aggiunto, in concentrazioni prossime all'1%, insieme ad altri composti aromatici (toluene, etil-benzene, xileni), per conferire le volute proprietà antidetonanti (espresse in "numero di ottano") in sostituzione totale dei composti del piombo (piombo tetraetile) nel caso della benzina "verde". E' dalla frazione di carburante incombusto che il benzene, in maniera simile ad altri solventi contenuti nei carburanti, è rilasciato dai veicoli a motore.

Oltre il 90% delle emissioni di benzene sono attribuibili alle produzioni legate al ciclo della benzina: raffinazione, distribuzione dei carburanti e soprattutto traffico veicolare, che da solo incide per circa l'80% sul totale. Tali risultati vengono evidenziati e confermati da uno studio realizzato negli USA nel 1991 (riportati in figura) in cui si mostra come la sorgente di emissione prevalente, nel caso specifico il traffico veicolare, contribuisca solo in parte

all'esposizione individuale, mentre la stessa esposizione individuale indoor è legata sostanzialmente al fumo di sigaretta (liberazione di 50 µg di benzene per ogni sigaretta completamente combusta) e alle altre genericamente definite come attività individuali [47].

Stime effettuate anche a livello di Comunitario (UE) attribuiscono a questa categoria di veicoli più del 70% del totale delle emissioni di benzene e, assolutamente concordanti alle stime USA, si rivelano, anche, i dati rispetto all'esposizione individuale a benzene derivante dal fumo di tabacco negli ambienti chiusi [48].



Emissioni di Benzene e fonti di individuali di esposizioni al tossico [47].

### 3.1.1. Assorbimento e distribuzione

Generalmente in ambito industriale ed artigianale l'assorbimento dei tossici avviene principalmente attraverso le vie aeree. La dispersione di vapori di queste sostanze nell'ambiente lavorativo è il fattore principale che determina una possibile penetrazione nel tratto respiratorio dei lavoratori.

La via dermica rappresenta un'ulteriore via di penetrazione del tossico nell'organismo, trascurabile in alcuni casi, acquisisce notevole importanza per alcuni solventi, per determinate mansioni e situazioni lavorative d'impiego del solvente o della stessa miscela.

Le dimensioni delle molecole tossiche, sono tra le caratteristiche fisiche che maggiormente influenzano il raggiungimento delle parti più profonde del polmone (comprese le aree di scambio alveolo-capillare). In termini strettamente igienistici l'assorbimento polmonare è

direttamente proporzionale alla concentrazione ambientale del solvente (concentrazione inalatoria), alla sua ritenzione polmonare ed alla ventilazione alveolare, correlata, quest'ultima, alle condizioni di lavoro ed al tempo di esposizione.

Nei primi minuti di esposizione l'assorbimento polmonare per il benzene è prossimo al 70-80% ovvero la sua concentrazione in aria (espressa come pressione parziale del solvente nell'aria) media un suo notevole trasferimento nel sangue [49]. La saturazione completa del compartimento ematico richiederebbe dai 2 ai 3 giorni di esposizione continuativa [50]. Entro 1 ora, l'uptake respiratorio è ridotto approssimativamente al 50%, questo dato è stato ulteriormente confermato da studi condotti da altri autori su volontari esposti per 4 ore a 52-62ppm [51]. La quota assorbita dal sangue si distribuisce altrettanto rapidamente nell'organismo.

Attraverso la via cutanea (contatto con la sostanza allo stato liquido) il benzene viene assorbito in una quantità oraria pari a 0.4mg/cm<sup>2</sup> [52]. Questo aspetto è stato osservato da studi sull'esposizione occupazionale a benzene condotti da Laitinen et al. in cui si dimostrava un assorbimento dermico molto importante in relazione alle varie condizioni e mansioni di lavoro [53].

La distribuzione del benzene nei vari comparti del corpo inizia appena il solvente raggiunge il circolo ematico, essa a questo punto è indipendente dalla via di assorbimento del tossico e dipende strettamente dalle caratteristiche chimico-fisiche del tossico, dalla composizione biochimica dei tessuti e dal flusso ematico ai singoli tessuti.

Le caratteristiche lipofile del benzene determinano un preferenziale tropismo per i tessuti adiposi o ad elevato contenuto lipidico.

Esperimenti effettuati su animali sottoposti ad inalazione di elevate concentrazioni di benzene hanno mostrato che il benzene, composti affini e loro metaboliti si ritrovano presenti in tessuti ricchi di lipidi come il cervello e tessuti adiposi, in tessuti ben perfusi come il fegato, reni, placenta, conseguentemente nel feto [54], milza e nei polmoni.

Utilizzando i metaboliti del benzene (fenolo, catecolo e idrochinone) come traccianti dell'avvenuto assorbimento e distribuzione del tossico, questi sono stati rivelati nel sangue e midollo osseo in seguito ad esposizione a benzene (6 ore), mostrando livelli nel midollo osseo che superano i corrispondenti livelli nel sangue chiarendo, da subito, la preferenziale tossicità nei confronti del tessuto ematopoietico.

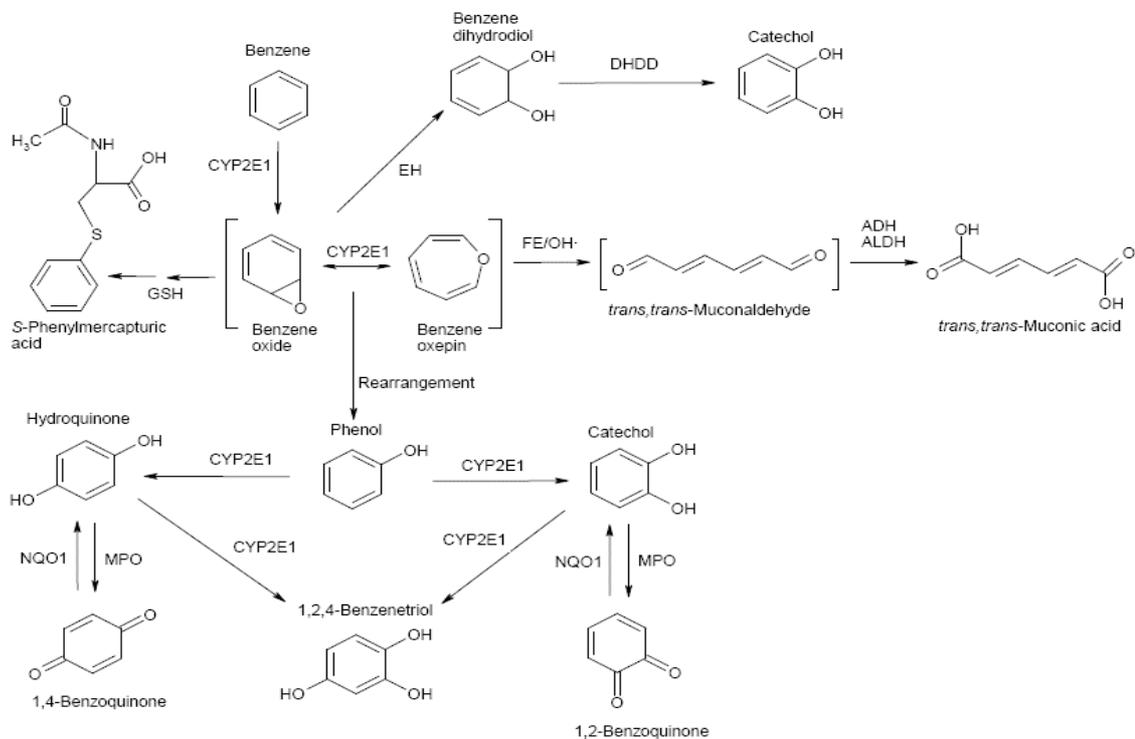
Sempre mediante ulteriori esperimenti su animali si è dimostrato il tropismo del benzene per il tessuto adiposo e midollo osseo mostrando concentrazioni superiori di circa 20 volte a

quelle del benzene nel sangue; capacità, questa, che facilita il raggiungimento dei livelli critici nel midollo osseo e la comparsa rapida di specifici effetti tossici.

La funzione di omeostasi e di distribuzione svolta dal sangue verso gli organi perfusi è stata confermata osservando livelli di concentrazione di benzene nei muscoli e negli organi, sempre superiori rispetto a quelli del sangue. Nello stesso esperimento effettuato somministrando elevate concentrazioni di benzene anche le urine si sono dimostrate capaci di eliminare notevoli quantità di benzene arrivando a raggiungere concentrazioni di benzene superiori di circa 20 volte a quelle del sangue [55].

### 3.1.2. *Metabolismo ed eliminazione*

Lo step iniziale del metabolismo del benzene, mediato dal complesso multienzimatico Cyt P450 (isoenzima 2E1), determina l'ossidazione del benzene a benzene ossido (epossido) in equilibrio con la forma oxepinica. Da questo intermedio prendono vita 3 differenti pathway metabolici.



Metabolismo del benzene.

Il pathway predominante determina la formazione del fenolo. Questo prodotto metabolico, quantitativamente il più importante nell'uomo, si crede derivare per via non enzimatica direttamente dal benzene ossido o in seguito ad un suo riarrangiamento strutturale o mediante un meccanismo di catalisi acida con successiva aromatizzazione ben più complesso.

Il fenolo può essere escreto in urina come solfo o glucurono coniugati (80-90% della dose assorbita) o può essere ossidato, sempre per intervento dell'isoenzima 2E1 del complesso multienzimatico Cyt P450, a idrochinone e catecolo, la cui ulteriore ossidazione determina la formazione dell'1,2,4-benzenetriolo.

A partire dal catecolo ed idrochinone, sempre via citocromo P450, questi possono essere ulteriormente ossidati a para-benzochinone e orto-benzochinone; tale reazione può essere invertita per azione di una ossidoreduttasi (NQ01) ricostituendo nuovamente catecolo ed idrochinone.

I metaboliti idrossilati del benzene (catecolo, idrochinone e 1,2,4 triidrossi benzene), come il fenolo, sono metabolizzati in glucurono-coniugati e solfo-coniugati ed escreti nelle urine.

Il secondo pathway determina la formazione dell'1,2-diidrodiol-benzene via epossido idrolase, che può essere ulteriormente ossidato a trans-trans muconaldeide una specie chimica reattiva ad anello aperto. Il metabolismo subito da quest'ultimo prodotto determina prima la formazione di una specie ibrida a parziale ossidazione (funzione carbossilica e aldeidica) poi la produzione della forma completamente ossidata l'acido trans trans muconico escreto direttamente nelle urine (3-18% della dose assorbita).

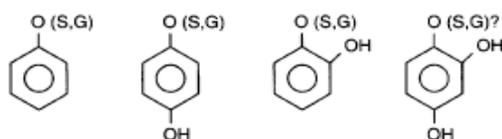
Il benzene ossido, sotto l'influenza della glutazione-S-trasferasi, seguendo un pathway metabolico minore, può reagire con il glutazione formando l'acido pre-fenilmercapturico (6-N-acetilcisteinil-S-2-4-cicloesadienolo). In condizioni acide, questo metabolita è aromatizzato attraverso disidratazione ad acido S fenil-mercapturico e successivamente eliminato attraverso le urine (<1% della dose assorbita) assieme al suo diretto precursore. Una quota di benzene non metabolizzato può essere escreto direttamente nelle urine per diffusione passiva dal sangue durante il processo di filtrazione glomerulare renale (0.1% della dose assorbita) [56].

In figura si mostrano tutti i metaboliti urinari prodotti dal metabolismo del benzene (alcuni dei quali volontariamente trascurati) derivati anche dall'interazione del benzene con macromolecole informazionali nel caso della N7-fenilguanina (es. DNA) [57].

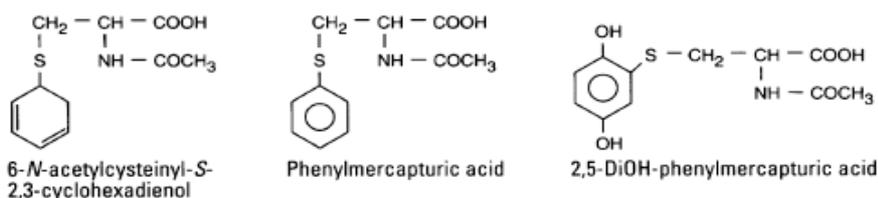
Una percentuale variabile della dose di benzene assorbito è eliminata anche attraverso la respirazione, l'entità della stessa è funzione dei livelli ventilatori e dei livelli individuali di metabolizzazione [50].

In ultimo ricordiamo l'esistenza di una l'interazione metabolica tra etanolo e benzene per soggetti contemporaneamente esposti ai due chimici: questa determina un potenziamento degli effetti ematotossici e di depressione del sistema nervoso centrale [58].

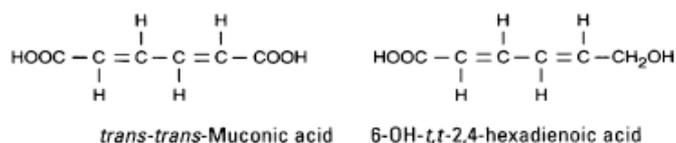
1. Glucuronide and sulfate conjugates



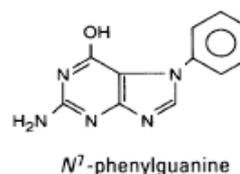
2. Mercapturic acids



3. Ring-opened metabolites



4. DNA adduct residues



Metaboliti urinari del benzene.

### 3.1.3. Tossicologia e meccanismi di tossicità

Nel caso specifico del benzene, i numerosi effetti tossici acuti e cronici, i caratteri di genotossicità, carcinogenesi, l'interferenza con lo sviluppo o ancora effetti di tipo sistemici o in distretti localizzati, o danni specifici a carico di vari sistemi (immunitario, neurologico, riproduttivo) danno un'idea della estrema tossicità di questo composto, della complessità del profilo clinico-patologico risultante dall'esposizione e del costante interesse scientifico suscitato.

L'esposizione discontinua ad alte dosi può provocare effetti tossici acuti a carico del sistema nervoso centrale. Questi possono andare dalla stanchezza, nausea, vertigini, tremori, delirio, convulsioni alla perdita di coscienza, quadro sintomatologico tipico dell'esposizione a miscele di solventi, effetti che possono scomparire alla cessazione dell'esposizione. L'esposizione ad elevate concentrazioni può anche provocare la morte per congestione

vascolare del sistema circolatorio cerebrale. Sul sistema respiratorio gli effetti esplicati sono prettamente irritanti delle mucose polmonari. In funzione della profondità della penetrazione può provocare: irritazioni della mucosa nasale, laringiti, faringiti e bronchiti fino a causare, all'aumentare della concentrazioni, edema polmonare acuto, o edema emorragico, cause, queste, di morte del soggetto esposto. Il cuore per esposizioni acute può subire fibrillazioni ventricolari, extrasistoli e tachicardia ventricolare. Per il fegato non sono stati osservati effetti tossici tranne che un aumento di dimensione dello stesso in soggetti lavoratori esposti cronicamente a concentrazioni ambientali di benzene. Per i reni ed il sistema gastroenterico sono state osservate delle congestioni sistemiche mortali. Per i muscoli sono state evidenziate delle mielofibrosi. Per pelle ed occhi si riferiscono irritazioni e, nel caso di contatto cutaneo con elevate concentrazioni, queste possono determinare la comparsa di ustioni pari al secondo grado in diverse parti del corpo (notazione "skin" per il valore limite indicato dall'ACGIH). Per gli effetti tossici sul sistema riproduttivo si riporta una diminuzione della fertilità femminile, anche se tali osservazioni non sono state confermate, ed alterazioni del ciclo mestruale accompagnate da un aumento della componente dolorosa. Si riporta anche un aumento dell'incidenza degli aborti spontanei.

Il benzene si è dimostrato capace di attraversare la placenta e raggiungere il feto. Non si riportano effetti teratogeni per quelle dosi studiate capaci, comunque, di determinare tossicità materna e fetale. Si sono osservati uno stato di pancitopenia, aumento delle aberrazioni cromosomiche, della rottura cromatidica e dello scambio di cromatidi fratelli. Sono state ulteriormente osservati caratteri di fetotossicità non classificabili come malformazioni [48].

Nel 1982 la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha stabilito che esiste una correlazione tra esposizione ad alti livelli di benzene e l'insorgenza di effetti tossici a carico specifico del sistema ematopoietico ed immunitario come anemia, leucopenia, linfocitopenia, anemia aplastica e leucemie soprattutto in quest'ultimo caso di leucemie mieloidi acute [59-61].

Basandosi su tali evidenze la IARC (assieme alla nazionale US EPA Environmental Protection Agency) lo ha classificato come carcinogeno accertato per l'uomo (Gruppo 1) [62]. Oltre a questi specifici tumori, si riportano anche casi di cancro dei polmoni ed è stata evidenziata una correlazione tra la comparsa di linfomi, nello specifico del tipo di Hodgkin, e l'esposizione a benzene [63-65].

Ultimamente anche l'esposizione a basse dosi di questo solvente è stata associata con una maggiore incidenza nella comparsa di mielomi multipli, leucemia mieloide acuta ed altri tipi di leucemie [66-71]; da qui l'importanza scientifica del monitoraggio biologico attraverso la

determinazione di specifici biomarcatori d'esposizione, come gli acidi mercapturici, su categorie professionalmente e cronicamente esposte a tali livelli purtroppo sempre più drammaticamente simili ai livelli a cui è esposta la popolazione generale.

I meccanismi responsabili dell'ematotossicità e cancerogenicità del benzene non sono stati ancora completamente chiariti, tuttavia, gli intermedi reattivi formati dal metabolismo del benzene rappresentano, certamente, un importante punto di partenza poiché alcuni di questi, sono direttamente capaci di espletare una azione biologica legando DNA, RNA e numerosi tipi di proteine strutturali e funzionali.

Il benzene ossido prodotto nel primo step ossidativo subito dal benzene, è un intermedio elettrofilico reattivo che manifesta un primo carattere lesivo verso macromolecole informazionali, esso infatti, è capace di determinare la formazione, in seguito a depurinazione del DNA, dell'addotto N7 fenil-guanina che è stato ritrovato nelle urine umane ed animali [72,73].

Gli intermedi reattivi del chinone (p-benzochinone e o-benzochinone derivati rispettivamente dall'ossidazione dell'idrochinone e catecolo) e la muconaldeide sono degli agenti alchilanti diretti capaci di reagire con nucleofili cellulari come il DNA [74,75], pur avendo osservato per alcuni di questi uno specifico meccanismo di detossificazione (formazione ed eliminazione urinaria dei solfo e glucurono coniugati). Numerosi studi effettuati sia in vitro che in vivo, hanno dimostrato la genotossicità di questi metaboliti [76-79].

Ulteriormente, durante la seconda metà del XX secolo, si sono ottenute evidenze sulla capacità del benzene di causare anomalie cromosomiche indicative del danno genetico come le aberrazioni cromosomiche, scambio di cromatidi fratelli ed induzione di micronuclei [80-84]

Numerosi sono stati anche i tentativi per dimostrare l'attività mutagena del benzene purtroppo senza produrre dati positivi (test in vitro a breve termine su cellule di differenti specie come il test di Ames su salmonella, test su cellule di lievito e test su linfociti umani HGPRT e TK), tuttavia, il benzene rimane un noto induttore di leucemia e di tumori solidi in modelli animali. Sebbene ognuno di questi effetti nocivi come la tossicità specifica verso il sistema ematopoietico e linfatico, o come i danni cromosomici e la carcinogenesi siano indicativi dell'ultimo impatto del benzene sul midollo osseo, la relazione tra questo fenomeno e il meccanismo attraverso cui le cellule siano "iniziate" nel processo neoplastico rimane ancora da spiegare e comprendere completamente.

### 3.2. Toluene

Il toluene è un solvente incolore dal distintivo odore dolce, con una buona proprietà solvente ovvero la capacità di dissolvere sostanza di natura chimica simile. La soglia olfattiva del toluene nell'aria è pari a 8 ppm.

Tale componente è presente naturalmente nel petrolio e da questo è prodotto nel processo di produzione delle vari combustibili. Altra fonte naturale di toluene è il carbone dal quale viene prodotto nel processo di produzione del "coke", mentre compare come sottoprodotto di reazione nel processo di produzione industriale dello stirene.

Partecipa in modo importante nella composizione delle benzine ricoprendo percentuali dell'ordine del 20-25% assieme ad altri solventi come il benzene e gli xileni e sono proprio queste assieme alla seppur minima percentuale di toluene contenute nei gas di scarico di veicoli a motore, ad essere la fonte principale di esposizione al tossico per la popolazione generale. Per quanto riguarda le esposizioni di specifiche categorie professionali ma non solo, il toluene trova particolare impiego nella produzione di vernici, come componente di diluenti per vernici, negli smalti per unghie, lacche, liquidi o colle adesive, nelle gomme e anche nei processi di abbronzatura del cuoio e nei processi di stampa tipografica professionale.

Oltre a questi soggetti esposti, numerose informazioni tossicologiche sono state ottenute dallo studio degli effetti causati dal toluene da solo, o in miscela con altri solventi, utilizzati come droga d'abuso sugli "sniffer" soggetti esposti cronicamente e volontariamente ad elevate concentrazioni di toluene contenute nelle cosiddette "colle".

Il livello di toluene nell'aria in ambiente urbano, così come in periferia, è solitamente inferiore ad 1 ppm. I valori ambientali in ambiente indoor sono anch'essi vicini ad 1 ppm. Anche i fumatori sono esposti a piccole quantità di toluene contenuto nel fumo di sigaretta [85].

#### 3.2.1. Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione

Il toluene presente nell'aria, direttamente o per effetto dell'evaporazione da sorgenti liquide, penetra nell'organismo principalmente per via inalatoria. Mansioni lavorative che prevedono il contatto cutaneo con il toluene in forma liquida, seppur in maniera minore, contribuiscono all'assorbimento del solvente per via transepidermica [85].

Tale aspetto e rischio per la salute derivante dall'esposizione cutanea allo xenobiotico è confermato anche dalla notazione "skin" ed "H" assegnata al valore limite di esposizione rispettivamente per l'ACGIH e la DFG tedesca.

Entrambe queste tipologie di esposizioni determinano la penetrazione diretta del tossico nel circolo sanguigno. Dallo studio di lavoratori esposti a 80 ppm di toluene si è dimostrato il suo rapido uptake nell'organismo. La sua presenza nel sangue arterioso è rivelabile in 10-15 minuti dall'inizio dell'esposizione e mostra quantità altamente correlate alla quantità di toluene rilevata nell'aria alveolare, sia durante l'esposizione che alla sua cessazione. Sempre in esperimenti condotti su volontari esposti a 80 ppm di toluene per 4 ore, si è osservato il raggiungimento di una concentrazione di plateau in 2 ore [85].

Nel sangue, il rapporto di distribuzione tra plasma ed eritrociti è 1:1. Nei globuli rossi il toluene sembrerebbe associato con l'emoglobina più che con la membrana cellulare. È ipotizzato che il solvente interagisca con il core idrofobico del gruppo prostetico dell'eme.

Tale interazione aumenta la quantità di toluene effettivamente trasportato dalla componente acquosa del sangue e facilita il traghettamento in tutte le aree del corpo, incluso nel SNC, ad un livello maggiore da quello trasportato dal solo plasma.

Tali caratteristiche guidano l'elevata distribuzione per i tessuti riccamente vascolarizzati ed a elevato contenuto lipidico per effetto dello specifico tropismo, come il tessuto adiposo e cervello.

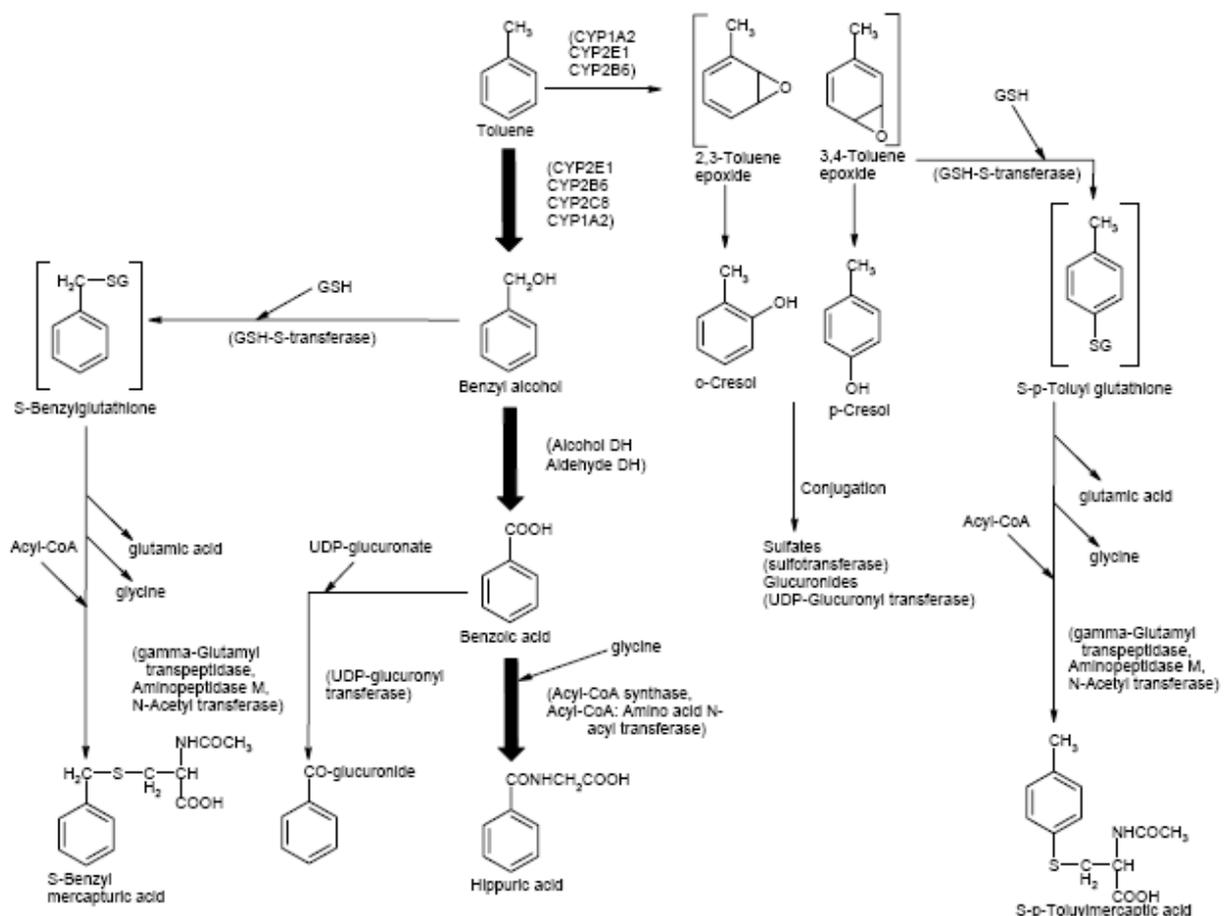
Nel cervello ulteriormente sono le aree ad elevato contenuto di materia bianca come il tronco encefalico a richiamare la maggior parte del solvente [85].

Il toluene è rapidamente distribuito anche nelle ghiandole surrenali, midollo osseo così come anche nei reni, fegato e polmoni (WHO 1985), laddove assieme al cervello, esplicherà gli effetti tossici più importanti [86].

Una porzione di toluene immodificato attorno al 7-20% è eliminato per esalazione diretta dai polmoni, mentre è minima la porzione dello stesso eliminata attraverso le urine. La maggior parte del toluene è eliminata velocemente, mentre la quota distribuita nel tessuto adiposo ha una cinetica di eliminazione più lenta. Brugnone et al. nel 1986 e nel 1995, analizzando un gruppo di lavoratori esposti professionalmente, hanno concluso che un tempo di 17 ore tra due turni lavorativi consecutivi, erano insufficienti per la completa eliminazione del toluene assorbito, che dava conto del possibile accumulo del tossico durante la settimana lavorativa [87,88]. Questa ipotesi era stata confermata da dati acquisiti da Nise ed Orboek nel 1988 che avevano osservato un significativo aumento di toluene nel sangue durante la settimana

lavorativa. In aggiunta, avevano osservato la presenza del toluene anche dopo 13 giorni la cessazione dell'esposizione al solvente [89].

Il destino metabolico del toluene è determinato principalmente dall'effetto di primo passaggio determinato dal fegato. Studi dei metaboliti urinari del toluene effettuati su lavoratori esposti hanno identificato l'acido ippurico come principale prodotto della sua biotrasformazione. I metaboliti urinari minori, in ordine decrescente di abbondanza, sono rispettivamente il coniugato glucuronico dell'acido benzoico (sottoprodotto della principale via metabolica) ed i coniugati con solfato e glucuronici del l'orto-cresolo e para-cresolo (pathway metabolico secondario) ed i prodotti della coniugazione con glutatione: l'acido S-benzil mercapturico ed S-para-toluilmercapturico.



Metabolismo del toluene.

Lo step iniziale del metabolismo è l'idrossilazione del gruppo metile della catena laterale dell'anello aromatico del toluene e l'idrossilazione diretta dell'anello aromatico catalizzata dall'enzima citocromo P450. La via di detossificazione predominante, a carico dei microsomi epatici, è l'idrossilazione del metile, mentre le idrossilazioni secondarie sull'anello aromatico, con formazione dell'orto e para cresolo, sono stimate essere solo pari al 5% del totale dei metaboliti urinari prodotti.

L'isoenzima 2E1 del citocromo P450 è responsabile principale della produzione dell'alcool benzilico, esso è convertito successivamente nel corrispondente acido per azione consecutiva di una alcool e di una aldeide deidrogenasi. La coniugazione con glicina è infine responsabile della formazione dell'acido ippurico che può rappresentare dal 83 al 94% del totale dei metaboliti urinari prodotti. La sua formazione, a partire dall'acido benzoico (componente comune della dieta umana), è determinata dall' Acil CoA Sintetasi la presenza di Coenzima Acetilato, e dall'intervento di una N acil trasferase.

L'acido benzoico alternativamente può essere coniugato con acido glucuronico (benzoil glucuronide) ricoprendo dal 3 al 9% del totale dei metaboliti urinari.

Gli intermedi epossidici (2,3 e 3,4 epossido) precursori dell'orto e para-cresolo sono ossidati per azione catalitica di differenti isoforme enzimatiche del cyt P450. L'orto e para cresolo ed i loro coniugati solfato e glucuronici sono stimati essere pari a 0.5-1,1% e 2,5-14,2% [85].

L'SBMA ( acido S-benzil mercapturico) è un metabolita urinario identificato nell'uomo e prodotto dalla coniugazione dell'alcool benzilico con glutatione (catalizzato dalla glutatione S-trasferase) seguita da una azione concertata della gamma glutamil transpeptidase, amino peptidasi M, e N acetil trasferase per il rilascio dell'acido glutammico, della glicina e per l'aggiunta di un gruppo acetilico [90].

Assieme a quest'ultimo metabolita è stato identificato l'acido S-p-toluilmercapturico come prodotto di una simile reazione di coniugazione a partire dal 3,4 toluen epossido [90].

### *3.2.2. Tossicologia e meccanismi di tossicità*

Le conoscenze degli effetti tossici indotti dall'esposizione al toluene sono state acquisite studiandone le risposte biologiche riportate da lavoratori esposti a vari tipi ed entità di concentrazioni ambientali del solvente.

Studi condotti su animali da esperimento sono stati e continuano a essere necessari per la dimostrazione e conferma degli effetti teratogeni o cancerogeni indotti dalla inalazione o contatto con lo xenobiotico.

L'esposizione, per brevi o lunghi periodi, a basse concentrazioni di toluene ambientale nell'uomo provoca i principali effetti tossici a carico del sistema nervoso centrale. La sintomatologia tipica comprende effetti come l'insonnia, manifesta difficoltà alla concentrazione, confusione mentale, stanchezza, stati di ebbrezza simili all'assunzione di etanolo, perdita di memoria e appetito effetti questi che svaniscono alla cessazione dell'esposizione.

L'esposizione cronica a basse concentrazioni di toluene può determinare anche alterazioni dell'udito e della percezione visiva dei colori. [85].

Purtroppo, i dati acquisiti fino ad oggi e le conoscenze dei reali meccanismi di azione tossica, non permettono di poter affermare con certezza un danno irreversibile al cervello su soggetti esposti per anni a basse concentrazioni di toluene.

Se i livelli ambientali di toluene aumentano i sintomi iniziano col manifestare un lieve mal di testa, se il carattere dell'esposizione è continuo si può accusare sonnolenza o ancora vertigini o provocare stati d'incoscienza.

Anche per questa tipologia di effetti biologici riconosciamo ancora un carattere di reversibilità.

Gli effetti causati su soggetti detti "sniffer" possono invece assumere caratteristiche permanenti.

Alti livelli di toluene possono inoltre danneggiare i reni, mentre l'esposizione contemporanea ad etanolo provoca effetti sinergici molto più elevati degli effetti provocati dai due tossici presi singolarmente. Anche l'assunzione di prodotti medicinali come l'aspirina o l'amminoacetofenone possono aumentare gli effetti sulla capacità visiva. L'aumento della concentrazione ambientale verso livelli molto elevati causa la morte andando ad interferire con il ritmo respiratorio o provocando l'arresto cardiaco.

Alcuni report hanno osservato un aumento dell'incidenza degli aborti spontanei su soggetti esposti a esposizione professionale a toluene tuttavia i fattori potenzialmente confondenti per l'end-point studiato, come fumo, alcool, esposizioni ad altri chimici, rendono incerta la responsabilità singola del toluene [85].

Studi effettuati su categorie esposte professionalmente indicano, generalmente, che tale solvente non induce il cancro. La IARC basandosi proprio su queste osservazioni, oltre che su

esperimenti effettuati su animali da laboratorio, non ha classificato il toluene come cancerogeno per l'uomo [91].

Effetti neurologici associati con alterazioni strutturali nel cervello per esposizioni croniche sono stati rivelati invece con strumenti di diagnostica per immagini. Questi hanno dimostrato un aumento del segnale dovuto alla sostanza bianca, perdita della differenziazione della materia bianca e grigia, una diminuzione della perfusione sanguigna della corteccia cerebrale, dei gangli alla base, del talamo ed atrofia cerebrale e cerebellare.

Alterazioni della conduzione elettrica nel cuore e dei potenziali evocati nella traduzione degli impulsi a livello dell'area del cervello deputata alla vista.

I risultati derivanti dallo studio degli effetti genotossici (test di induzione di micronuclei, scambio di cromatidi fratelli e aberrazioni cromosomiche) sono stati inconcludenti.

Per quanto riguarda lo studio dei danni provocati dal contatto cutaneo con lo xenobiotico, si riportano effetti associati alla rimozione dei lipidi, o irritazioni degli occhi (limitato alla membrana congiuntivale) anche per deposizione diretta del solvente negli occhi.

Il meccanismo di tossicità è determinato dall'interazione tra toluene (non i metaboliti) e i componenti strutturali o funzionali delle cellule del sistema nervoso (principalmente lipidi e proteine), si ipotizza che questa interazione possa variare le caratteristiche di permeabilità delle membrane cellulari, interferire con l'attività degli enzimi coinvolti nella sintesi e/o degradazione dei neurotrasmettitori o infine alterare la capacità di legame tra neurotrasmettitori e recettori di membrana.

Dal punto di vista della reattività chimica anche i precursori dell'orto e para-cresolo (molecole altamente reattive) possiedono la capacità di legare le proteine cellulari e l'RNA portando alla disfunzione o degenerazione cellulare, tuttavia, pur non essendo confermato un nesso di causa-effetto, sembra proprio essere questo il meccanismo di azione tossica alla base di esposizioni (<100 ppm) d'interesse pubblico ed occupazionale [85].

### 3.3. *Xilene*

Con il termine di xilene ci si riferisce ad una miscela contenente tutti e tre gli isomeri strutturali (orto, meta e para-xilene). Questa miscela contiene comunemente tra il 6 e 15% di etilbenzene.

In natura lo xilene è contenuto nel petrolio, nel carbone ed è liberato nell'aria in seguito a grandi incendi boschivi.

Similmente ai solventi trattati in precedenza è anch'esso incolore, infiammabile e dal distintivo odore dolce. Esso è principalmente utilizzato come solvente nei processi di stampa professionale, nella produzione della gomma e nel trattamento del cuoio. In miscela, invece, è utilizzato come componente di agenti sgrassanti e nella produzione di vernici o loro diluenti; in misura minore, come materia prima nell'industria chimica, nella produzione di plastiche, di fibre sintetiche, nelle miscele di rivestimento, nella produzione e trattamento della carta. Costituisce una percentuale importante della composizione chimica delle benzine e carburanti per aerei.

La popolazione maggiormente esposta ad alti livelli di tossico sono pertanto tutte le categorie professionali coinvolte nei processi produttivi o di utilizzo dello xilene, mentre la popolazione generale è esposta a concentrazioni aeree outdoor comprese tra 1 e 30 ppb ed indoor tra 1 e 10 ppb, dovute al rilascio da raffinerie di petrolio, industrie chimiche, gas di scarico delle automobili ed anche della quota di xilene evaporata dai prodotti che lo contengono [92].

### *3.3.1. Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione*

Lo xilene entra nell'organismo attraverso la via inalatoria e cutanea o per evaporazione dai prodotti che lo contengono o per contatto diretto con la pelle nuda. Esso è rapidamente assorbito dai polmoni arrivando al 50-75% della quantità totale contenuta nell'aria. Anche in questo caso, le mansioni lavorative con maggiore esercizio fisico o specificamente caratterizzate da esposizioni a concentrazioni maggiori di solvente accrescono le quantità di solvente assorbito [93].

La penetrazione cutanea dei vapori del solvente è anch'essa importante ricoprendo, a parità di concentrazione ambientale, circa il 12% della quota assorbita attraverso la via inalatoria.

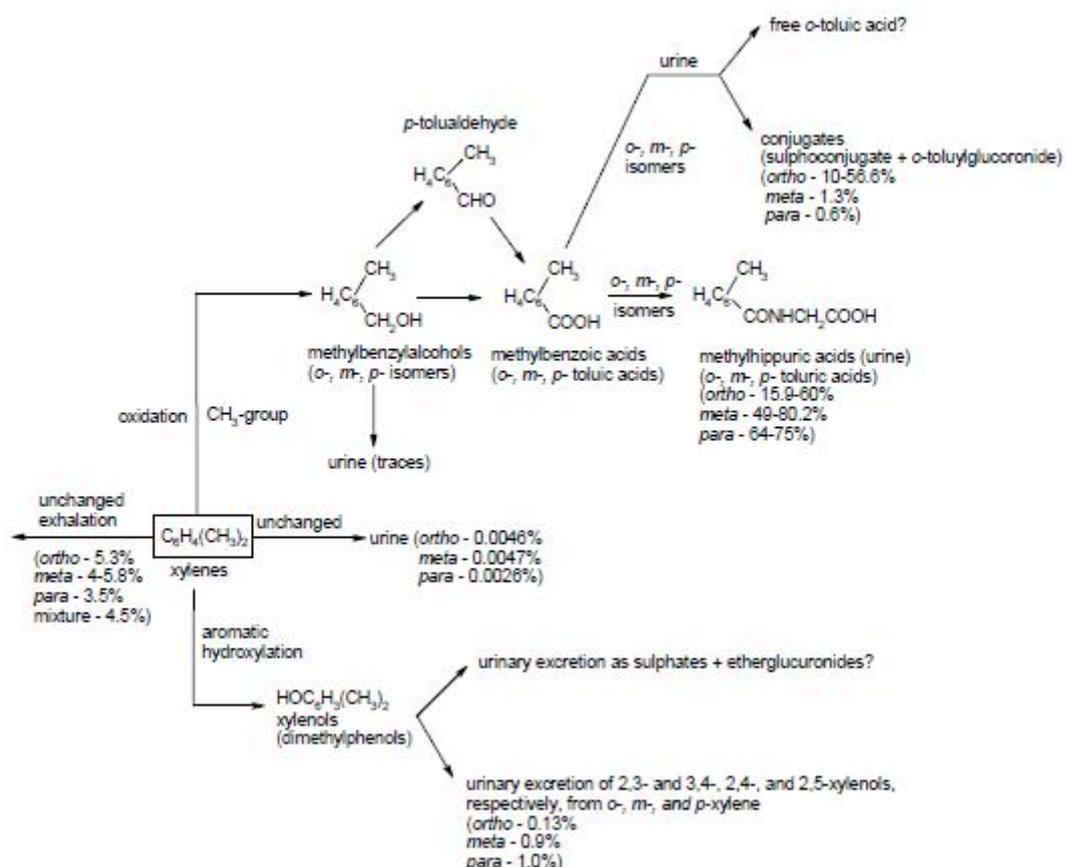
Le membrane alveolari sono attraversate facilmente dallo xenobiotico consentendone una veloce entrata nel circolo sanguigno. Nel sangue si lega alle proteine sieriche e in fase di distribuzione si accumula principalmente nel tessuto adiposo (4-10% della dose totale assorbita) [94], ma anche nel cervello, reni, polmoni, fegato e grazie alla sua elevata capacità di attraversamento delle membrane biologiche anche nei feti e nel latte materno [54,94].

La trasformazione metabolica dello xilene avviene principalmente nel fegato producendo differenti metaboliti maggiormente idrosolubili e pertanto eliminate con maggiore facilità

delle urine. Una quota di chimico immodificato lascia l'organismo attraverso la respirazione in pochi secondi mentre la restante è assorbita del circolo sanguigno. I prodotti della sua metabolizzazione sono presenti nelle urine dopo 2 ore dall'esposizione al solvente. La maggior parte di xilene assorbito viene eliminato dal corpo entro 18 ore dalla cessazione dell'esposizione.

Tutti e tre gli isomeri strutturali dell'xilene (orto, meta e para) sono principalmente metabolizzati attraverso l'ossidazione del gruppo metile (da enzimi microsomiali a funzione mista), producendo l'acido metil benzoico che successivamente coniugato con la glicina determina la formazione dell'acido metil ippurico [92].

Una quota minore al 10% del totale della dose di xilene assorbita tiene conto dell'eliminazione del composto immodificato attraverso la respirazione e le urine, dell'eliminazione urinaria del metil benzil alcool, degli orto toluil glucuronidi, degli acidi mercapturici dello xilene e del dimetil fenolo derivati da attività metaboliche secondarie (derivanti dalle ossidazioni dirette sull'anello aromatico [95]).



Metabolismo dello xilene.

Circa il 95% dello xilene assorbito è eliminato in urina come acido metil ippurico, il 5% circa non modificato attraverso la respirazione e l'urina (solo lo 0.005% dello xilene assorbito). Meno del 2% è eliminato, invece, come xilenoli. Differenze inter-individuali, nelle quote di metaboliti urinari escreti e nelle quote eliminate attraverso la respirazione, sono state osservate per influenza della ventilazione polmonare e di ritenzione dei vari isomeri dello xilene [92, 93].

Lo xilene è rapidamente eliminato da tutti i compartimenti del corpo; la quota di solvente distribuita ai muscoli ed al tessuto adiposo mostra, invece, una cinetica di eliminazione più lenta (rispettivamente tempo di emivita di 1 ora e 20 ore) [93, 96].

### *3.3.2. Tossicologia e meccanismi di tossicità*

Non esistono evidenze definitive degli effetti cancerogeni osservati sull'uomo. Studi epidemiologici, atti a correlare la comparsa di specifici tumori con l'esposizione ambientale a toluene, o non riportano alcun caso o ne riportano un numero limitato, oltretutto con vari fattori confondenti [92].

Anche in questo caso la IARC, per la mancanza di evidenze certe, non ha classificato lo xilene come cancerogeno per l'uomo.

Il potenziale genotossico è stato valutato mediante esperimenti effettuati sia in vivo che in vitro; le osservazioni indicano che lo xilene non è mutageno e non induce alcun tipo di anomalia cromosomica.

Effetti sulla riproduzione e sul feto sono stati osservati solo per concentrazioni dell'ordine delle centinaia di ppm (>300ppm), concentrazioni potenzialmente mortali per le stesse donne gravide.

Le tre forme isomeriche di xilene sembrano causare effetti sulla salute umana molto simili. Nessun effetto è stato osservato nella popolazione generale esposta a livelli di concentrazione aerea quotidiana di xilene.

Esposizioni di breve durata ad elevate concentrazioni possono causare irritazioni della pelle, degli occhi, della mucosa nasale e della gola. Possono anche causare difficoltà respiratorie, ritardi nella risposta allo stimolo visivo, alterazioni della memoria, disagi gastrici ed alterazioni epatiche e renali. Esposizioni, sia brevi che lunghe ad elevate concentrazioni ambientali di xenobiotico, possono causare numerosi effetti a carico del S.N.C quali:

emicranee, debolezza, mancanza di coordinazione muscolare, vertigini, confusione mentale (osservazioni su categorie professionali) [92].

La neurotossicità dello xilene, osservata in studi di inalazione a breve e lungo termine, sembra essere correlata con l'interferenza della quota di xilene non metabolizzato sulle membrane delle cellule neuronali. Questo effetto sembra derivare dall'intercalazione chimica del solvente nelle membrane neuronali che ne altera le proprietà chimico-fisiche con conseguente variazione della capacità di trasmissione dell'impulso elettrico. Altre interferenze sono quelle rispetto al target proteico, per queste si ipotizzano variazioni della conformazione proteica tridimensionale dirette o indirette, le prime causate dall'ancoraggio delle stesse proteine in un ambiente con nuovo rapporto lipo-idrofilico e le seconde causate dalla degenerazione delle membrane cellulari con perdita della locale funzione proteica [92].

#### *3.4. Le reazioni di biotrasformazione degli xenobiotici*

I composti tossici assorbiti dai sistemi biologici sono sostanze generalmente lipofile, caratteristica, questa, rispettata anche dal benzene, che, al pari di toluene e xilene, rende tali solventi difficilmente eliminabili, anche per i fenomeni di riassorbimento che avvengono in determinati distretti del corpo (nel rene e nel tratto biliare). Il processo di biotrasformazione di una sostanza esogena (xenobiotico) avviene principalmente nel fegato, qui tali sostanze, dapprima assorbite e trasportate dal corrente sanguigno, sono sottoposte ad una complessa sequenza di reazioni biochimiche ad opera di enzimi detossificanti presenti in notevoli quantità nelle cellule epatiche con specifiche localizzazioni subcellulari: microsomi o REL, citosol e mitocondri [97].

Tale processo mira principalmente a trasformare le molecole in metaboliti più polari, aumentare peso e dimensione molecolare, favorendo una maggiore escrezione del composto in esame.

La polarità, l'aumento del peso e della dimensione molecolare sono ottenute in conseguenza a reazioni che prevedono l'aggiunta o la messa in evidenza di un gruppo ionizzabile o ancora attraverso reazioni di coniugazione con macromolecole endogene [97].

Le conseguenze metaboliche, oltre che determinare modifiche nel processo ultimo di escrezione, determinano anche delle variazioni dell'attività biologica degli xenobiotici, fattori determinanti nel modificare le caratteristiche tossico-cinetiche ( aumentando o riducendo il tempo di permanenza del tossico nell'organismo) e tossico-dinamiche (aumentando o

riducendo le capacità di causare direttamente o indirettamente l'effetto tossico nei confronti dell'organismo-organo- cellula o bersaglio cellulare) dei composti chimici.

Il metabolismo dei composti chimici è catalizzato da enzimi, alcuni dei quali sono specifici per il metabolismo degli xenobiotici. Il pathway del metabolismo è dipendente dal tipo di enzimi disponibili nel tessuto esposto ma utilizzano comuni trasformazioni sempre dirette a modificare la struttura e le proprietà chimico-fisiche del composto [97].

Il metabolismo degli xenobiotici può essere suddiviso in due fasi: la fase 1 e la fase 2. La fase 1 è l'alterazione dei composti xenobiotici attraverso l'aggiunta di un gruppo su una specifica funzione chimica che potrà essere coniugata nella fase 2. Raramente queste due fasi possono essere accompagnate da una terza, ulteriore e specifica metabolizzazione dei soli prodotti della coniugazione con glutazione.

<i>Fase 1</i>	<i>Fase 2</i>	<i>Fase 3</i>
Ossidazione Riduzione Idrolisi Idratazione Dealogenazione	Coniugazione con Glutazione Solfatazione Glucuronazione Acetilazione Coniugazione con Amminoacidi Metilazione	Ulteriore metabolismo dei glutazione-coniugati

Fasi e reazioni metaboliche di detossificazione dell'organismo.

Tra le reazioni di fase 1 utili alla metabolizzazione dei solventi studiati, notevole importanza occupano le reazioni di ossidazione. Un sottogruppo particolare, mediato da enzimi microsomiali, prevede l'idrossilazione aromatica e l'idrossilazione alifatica osservata sempre tra i primi step metabolici subiti.

Anche le idratazioni, altro tipo di reazioni di fase 1, rientrano in questo campo specifico. Ad esempio l'eossido idrolase media la detossificazione degli epossidi (intermedio altamente reattivo) centrali nel metabolismo di questa tipologia di tossici. Questa classe enzimatica è localizzata principalmente nel reticolo endoplasmatico, vicine al Cyt P450, in notevoli quantità per abbattere quantitativamente proprio il sottoprodotto eossido risultato principale dell'azione enzimatica delle ossidasi (Cyt P450).

Le reazioni di coniugazione (fase II) prevedono la donazione di un gruppo chimico da una molecola endogena; è la formazione di un intermedio ad alta energia, mediante due tipi di meccanismi di attivazione, a rendere energeticamente possibili le varie reazioni.

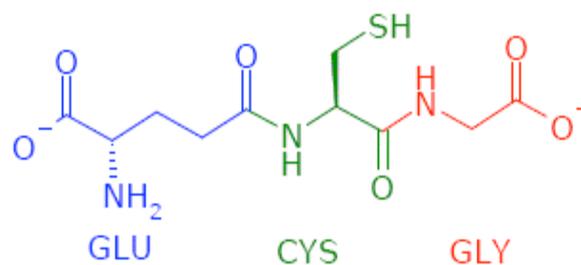
Il primo meccanismo prevede l'attivazione del composto endogeno e la successiva reazione con lo xenobiotico; nel secondo tipo si attiva direttamente il composto xenobiotico che reagirà con il composto endogeno coniugante [97].

Anche in questo caso, concentreremo la nostra attenzione sulle reazioni di fase II specifiche per i solventi trattati. Del primo tipo sono le reazioni di coniugazione con acido glucuronico (principale coniugazione per l'uomo) e con il gruppo solfato; queste prevedono l'attivazione del composto endogeno in acido glucuronico uridin di fosfato ed in PAPS (3'-fosfoadenosil-5'-fosfosolfato) rispettivamente e la successiva reazione con il target xenobiotico.

La coniugazione con glutazione prevede l'utilizzo di una delle più importanti biomolecole per la difesa cellulare contro i composti tossici. Da questo processo di detossificazione sono prodotti specificamente gli acidi mercapturici studiati che, per tal motivo, tratteremo in maniera più approfondita.

### 3.4.1. La coniugazione con il glutatione

Il glutatione è un tripeptide, composto da acido glutammico, cisteina e glicina. Si ritrova in molte cellule, ma è abbondante specialmente nel fegato dove raggiunge concentrazioni pari a 5mM e rappresenta il più abbondante composto sulfidrilico del citosol cellulare [98-99].



Struttura chimica del glutatione.

Il gruppo sulfidrilico è fornito dalla cisteina. La sua natura nucleofila rende il glutatione, nella forma tiolato  $GS^-$ , capace di reagire con numerosi elettrofili. Questi composti elettrofili possono derivare sia dal metabolismo di composti di natura esogena (xenobiotici) [100] che endogena.

Il glutatione non è attivato energeticamente, bensì lo sono molto spesso i substrati; alcuni di questi, già nella loro forma assorbita manifestano questa reattività, rendendosi disponibili alla reazione.

Una caratteristica peculiare del glutatione è quella di poter coniugare con o senza l'intervento dall'enzima glutatione S- trasferase.

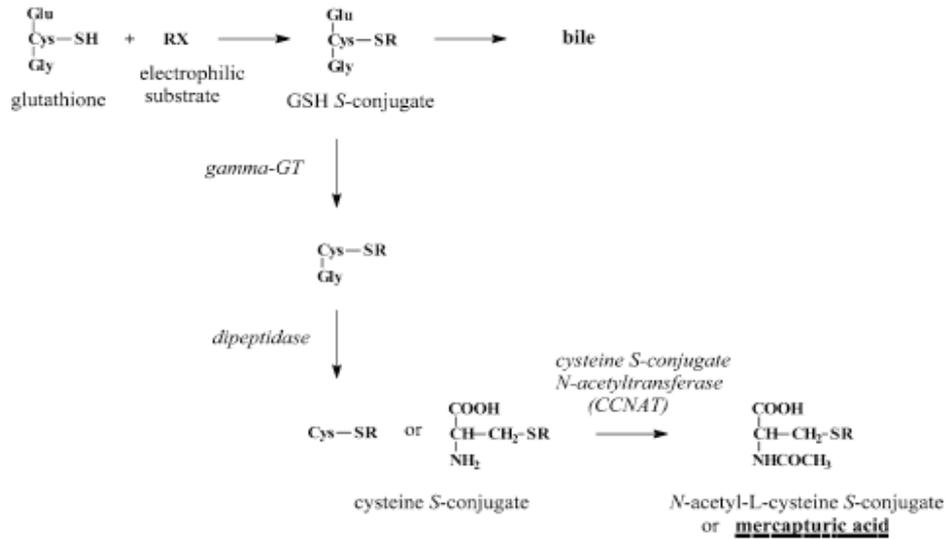
Questo enzima è un prettamente citosolico ma è stato ritrovato anche nella frazione microsomiale. Si ritrova in cellule appartenenti a differenti organi (fegato, rene, intestino, ghiandola surrenale e testicolo) e tessuti laddove la sua concentrazione varia in dipendenza dello stato nutrizionale ed ormonale [98].

Esistono differenti isoenzimi citosolici della glutatione S-trasferase, ognuna delle quali esprime una specificità di substrato; la funzione ed il tipo isoenzimatico è determinato dalla differente combinazione in dimeri delle differenti subunità monomeriche codificate (5 famiglie di geni identificate come alpha, mu, pi, sigma, and theta GST) [101].

Nonostante sia accettata l'estrema variabilità dei substrati target di tale coniugazione, i substrati mostrano comuni caratteristiche chimiche come l'idrofobicità, un atomo di carbonio elettrofilico ed una limitata capacità di reagire non enzimaticamente con il glutatione.

La coniugazione con il glutatione, riportata in figura, determina la formazione di prodotti direttamente eliminabili attraverso la bile o sottoforma di acidi mercapturici (composti N-acetilcisteinici) mediante tre step catabolici successivi in urina.

Il primo step catabolico di rimozione del residuo glutammico, avviene ad opera di un enzima di membrana la  $\gamma$ -glutamiltrasferase. Il secondo step catabolico prevede, invece, la rimozione del residuo glicinico da parte di una peptidase, la cistein-glicinase. Questo metabolita intermedio può subire diverse reazioni, la più importante delle quali è l'acetilazione catalizzata dall'N-acetiltrasferase presente nella frazione microsomiale che, in presenza dell' Acetil CoA, media il trasferimento dell'acetile sul gruppo amminico della cisterna con formazione del relativo acido mercapturico successivamente eliminato in urina.



Reazioni cataboliche di formazione degli acidi mercapturici.

Ottenuta la biotrasformazione ad acido mercapturico questo metabolita sarà eliminato nelle urine proporzionalmente alla sua concentrazione nel plasma. Maggiore è la concentrazione nel plasma tanto più grande sarà l'escrezione renale nell'unità di tempo. I parametri caratterizzanti la clearance renale, come il calcolo della velocità di eliminazione ed il tempo di emivita plasmatici, possono essere calcolati dalla curva ottenuta riportando in grafico la concentrazione plasmatica del metabolita rispetto al tempo.

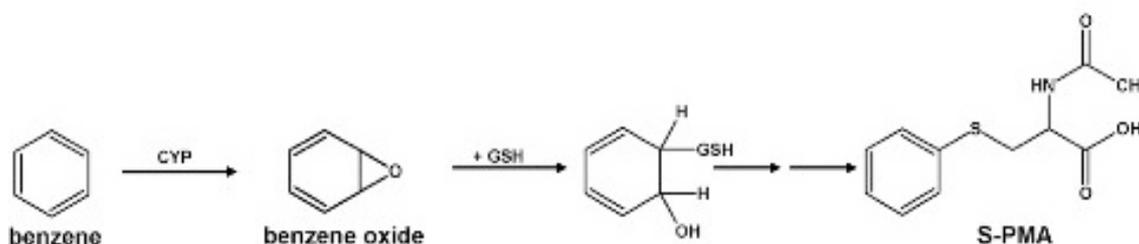
La capacità dell'organismo di espellere le sostanze esogene ed endogene varia nell'arco della giornata in relazione alla variazione della funzionalità renale, di qui la necessità di correggere i valori di concentrazione degli analisi urinari per un fattore di normalizzazione che possa tenere conto di queste fluttuazioni funzionali organiche. Molto diffusa è la correzione delle concentrazioni dei metaboliti urinari rispetto al valore di creatinina, infatti, questa, nell'arco delle 24 ore e in maniera indipendente dal volume di urina filtrato, viene escreta in quantità relativamente costante (circa 1.7g valore medio). Queste due proprietà sono alla base della correzione della concentrazione del metabolita urinario per il valore di creatinina rilevato nel medesimo campione urinario [102].

3.4.2. *Gli acidi mercapturici come indicatori di esposizioni a basse dosi di tossici industriali: l'acido S-Fenilmercapturico, S-Benzilmercapturico e gli isomeri dell'acido metil benzilmercapturico*

Tra gli step iniziali del metabolismo del benzene, toluene e xilene riconosciamo la formazione comune di specie chimiche reattive (tra cui principalmente epossidi, alcoli ed in misura minore chinoni). La complessità molecolare crescente dei solventi studiati determina però un aumento delle trasformazioni metaboliche potenzialmente possibili e confermate dallo studio fine del metabolismo di questi tossici.

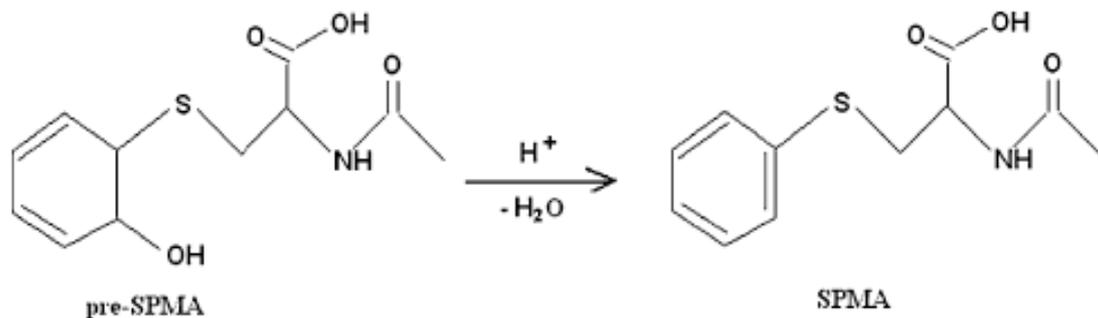
In questo paragrafo, il nostro principale compito sarà descrivere il percorso specifico di formazione di questi metaboliti ed identificare, nel caso di toluene e xilene, quali acidi mercapturici siano stati maggiormente valutati per il loro impiego come biomarcatori di esposizione.

La formazione dell'acido mercapturico per il benzene deriva unicamente dall'attacco del glutatione al benzene ossido (epossido) identificato come acido S-fenil mercapturico; possibile, ma priva di interesse tossicologico per l'uomo poiché non ancora dimostrata, è la formazione (via idrochinone) di un ulteriore acido mercapturico escreto nelle urine animali a partire dal para-benzochinone [103].



Specifico pathway metabolico di formazione dell'acido S-fenilmercapturico (SPMA).

L'addotto benzene –glutatione sottoposto a specifica metabolizzazione (vedi paragrafo precedente) determina la formazione dell'acido S-fenilmercapturico. Sotto condizioni acide il precursore è aromatizzato dalla deidratazione per formare l'acido S-fenilmercapturico (SPMA), che è escreto nelle urine [104, 107].



Idrolisi dell'acido pre-S-fenilmercapturico ad acido S-fenilmercapturico.

L'utilizzo di questo acido mercapturico è specificamente indicato per evidenziare esposizioni a bassi livelli di benzene. Questa limitazione, è stata dimostrata da Mueller e collaboratori nel 1987; in questo studio si dimostrava l'aumento non lineare della produzione dell'acido mercapturico all'aumentare della concentrazione di benzene ambientale. Tali risultati indicavano la saturazione del pathway metabolico del glutatione restringendo, pertanto, l'applicazione del biomarcatore a soggetti o gruppi esposti a livelli massimi di benzene ambientale intorno a 5-7 ppm [73].

La presenza dell'SPMA nelle urine di animali e uomini esposti a benzene è stata confermata da numerosi studi condotti a partire dal 1953 [73,106-108]. Il saggio per la determinazione dell'S-PMA è stato successivamente validato in uno studio, risultato di 12 separati esperimenti, condotto in varie raffinerie ed industrie chimiche [109]. Lo scopo principale era la caratterizzazione della cinetica di escrezione (picchi di concentrazione SPMA nel tempo), della sensibilità e specificità del metodo analitico, della relazione tra livelli di benzene ambientale ponderati nelle 8 ore (TWA 8 ore) e i livelli degli indicatori di esposizione tradizionali e non, come l'SPMA, alla fine del turno di lavoro.

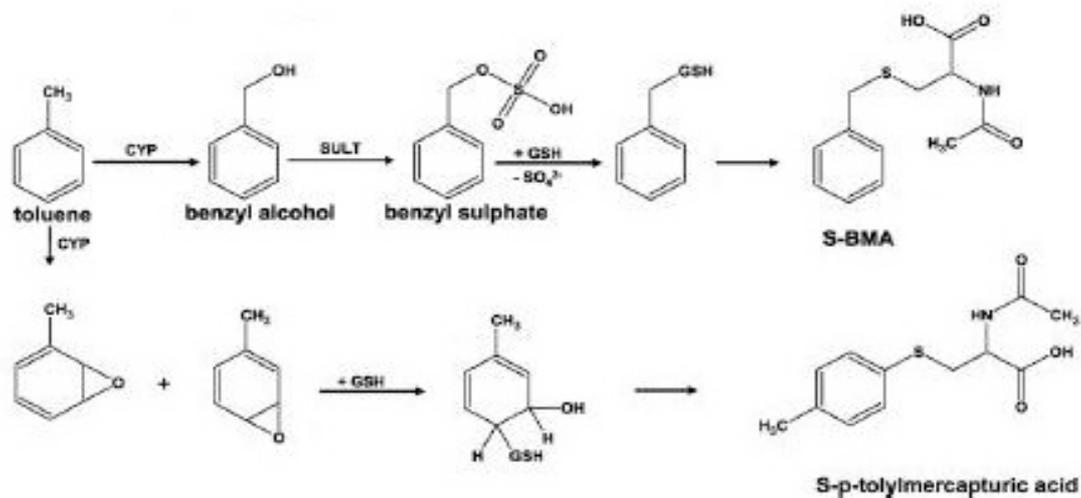
I risultati acquisiti hanno dimostrato che l'SPMA veniva escreto in una fase singola con il picco massimo in corrispondenza della fine di un turno di 8 ore. Altri soggetti mostravano un picco massimo all'inizio del successivo turno di lavoro che gli autori giustificavano derivante o dalla differente via di assorbimento del benzene (dermica) o dalle differenze individuali della farmacocinetica [110]. Su questa precisa caratterizzazione cinetica sono stati basati molti degli studi ulteriormente compiuti; questa cinetica giustificava la raccolta di campioni urinari definiti "spot" molto più facili da raccogliere a fine turno, alternativi alla raccolta dell'intera diuresi giornaliera.

La dimostrazione dell'elevata specificità dell'SPMA, già peraltro dimostrata da uno studio precedente [111], è stata ottenuta evidenziando valori di bassa concentrazione in soggetti controllo fumatori e non fumatori e raccogliendo le urine di soggetti esposti all'inizio della settimana (valori urinari di SPMA sotto i 5µg/g creatinina).

Una forte correlazione tra la concentrazione di benzene ambientale ponderato nel tempo (campionamento personale per 8 ore) e la concentrazione di SPMA urinario alla fine del turno lavorativo di 8 ore è stata osservata per livelli di esposizione aerea di tossico tra 0.3 ppm e circa 2ppm. Gli autori hanno indicato che per esposizioni ambientali di 1 ppm (3.25mg/m<sup>3</sup>) di benzene (intese come risultato del campionamento personale) corrispondeva una concentrazione di SPMA in urina pari a 46µg/g creatinina [109]. L'elevata qualità dei dati prodotti da questo studio, le conferme ottenute da altri autori hanno indotto l'ACGIH a proporre l'SPMA come indicatore biologico di esposizione per bassi livelli di benzene [105,111,112]. Il valore limite biologico BEI, indicato nel 2000 dall'ACGIH per l'SPMA, è di 25µg/g creatinina (esposizioni a benzene pari al TLV-TWA 8h 0.5ppm), valore assolutamente in linea con quanto emerso dallo studio di Van Sitter e collaboratori. Il rispetto degli obiettivi posti inizialmente e la completezza di design del progetto scientifico rendono esemplare questa pubblicazione. La correlazione tra i livelli di acido S-fenil mercapturico e l'esposizione professionale a benzene è stata confermata da ulteriori studi ribadendone il valore scientifico dell'indicatore biologico [56,113].

Per il toluene e xilene il metabolismo iniziale procede consentendo l'ossidazione diretta o sulla catena laterale (detta *side-chain reaction*) o sull'anello aromatico.

Nel caso del toluene, l'ossidazione della catena laterale (gruppo metilico) determina la formazione dell'alcool benzilico, l'attacco del glutatione al gruppo alcolico e la metabolizzazione seguente dell'addotto prodotto, determina la formazione dell'acido S-benzilmercapturico [90,114]. L'ossidazione diretta sull'anello aromatico determina invece la produzione di due forme epossidiche in equilibrio (2,3 e 3,4 toluen epossido), dal 3,4 toluen epossido, attaccato dal glutatione, si origina la formazione del secondo acido mercapturico originato dal toluene, l'acido S-p-toluilmercapturico [90].



Pathway metabolici di formazione degli acidi mercapturici del toluene.

In uno studio effettuato da alcuni ricercatori, l'SBMA è stato comparato rispetto all'esposizione ambientale a toluene e rispetto a due biomarkers tradizionali utilizzati per documentare l'esposizione al solvente: l'acido ippurico e l'orto-cresolo. La concentrazione urinaria di SBMA ed i valori di toluene ambientale hanno mostrato la migliore correlazione ( $r = 0.7$ ), mentre meno correlati si sono dimostrati i dati del nuovo biomarcatore proposto rispetto ai valori dei tradizionali. Gli autori ulteriormente hanno evidenziato la capacità dell'SBMA di discriminare soggetti esposti dai non esposti quando le concentrazioni di solvente erano minori ad 1ppm (LOD= 0.2 ppb), mentre l'acido ippurico e l'orto-cresolo dimostravano lo stesso potere discriminante rispettivamente per concentrazioni di 50ppm e 3ppm [115]. Basandosi su questi parametri di regressione (correlazione dato ambientale e valore di SBMA in urina) è stato calcolato un indice biologico di esposizione (proposta di BEI) di 76.3  $\mu\text{g SBMA/ g creatinina}$  che dovrebbe corrispondere al TLV-TWA di 50 ppm di toluene (aggiornato a 20 ppm dall'ACGIH nel 2006).

In un precedente studio Angerer e collaboratori avevano valutato e ricercato l'associazione tra valori di toluene ambientale, di acido ippurico e orto-cresolo per l'SBMA e l'acido mercapturico derivato dall'ossidazione dell'anello aromatico, l'acido p-toluilmercapturico. In questo caso però l'SBMA presentava una concentrazione di 30  $\mu\text{g/l}$  anche nel gruppo di controllo (popolazione non esposta), portando a concludere che l'SBMA non si dimostrava biomarcatore idoneo a causa dell'elevato valore fisiologico di background (livello basale).

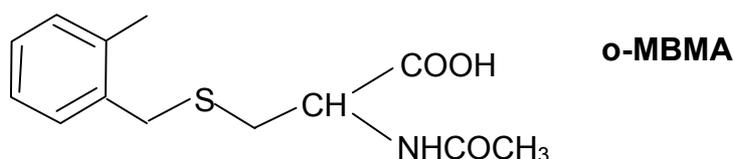
Contrariamente, il p-toluilmercapturico, non presente in soggetti non esposti (LOD < 5ppb), mostrava, invece, una cattiva correlazione col dato ambientale di toluene, spiegabile dalla precoce raccolta delle urine (dopo 8 ore) rispetto a tempo di emivita dimostrato nello stesso studio (10 ore), ma correlava significativamente con i valori di acido ippurico ed orto-cresolo [90].

Complessivamente il lavoro compiuto da Angerer e collaboratori ha stimolato fortemente l'interesse verso tali biomarker mostrando evidenti vantaggi nel loro utilizzo rispetto ai tradizionali marcatori biologici, ponendosi come base scientifica per i numerosi lavori successivamente effettuati che, ad oggi, mancano della conferma del valore di questi acidi mercapturici come indicatori d'esposizione a toluene.

Lo xilene subisce la medesima sorte del toluene. Nell'uomo, la via metabolica principale prevede l'ossidazione della catena laterale formando specifici metaboliti urinari, gli acidi metilippurici (somma dei tre isomeri orto, meta e para). L'ossidazione in questa posizione determina invece, via glutazione, la formazione di specifici acidi mercapturici, gli isomeri dell'acido metil-benzilmercapturico.

La letteratura ad oggi, non riporta per l'uomo alcuna valutazione dell'esposizione a xilene mediante questi acidi mercapturici, gli unici dati si riferiscono ad esperimenti effettuati su animali [116]. Nel 2000 Moriwaki et al. hanno invece pubblicato un metodo analitico per determinare tutti i prodotti della coniugazione con il glutazione (side chain reaction) del toluene, o-xilene e trimetilbenzene aggiungendo gli specifici acidi mercapturici in urine di soggetti non esposti [117].

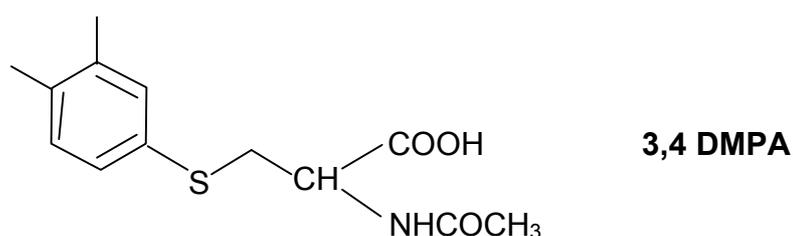
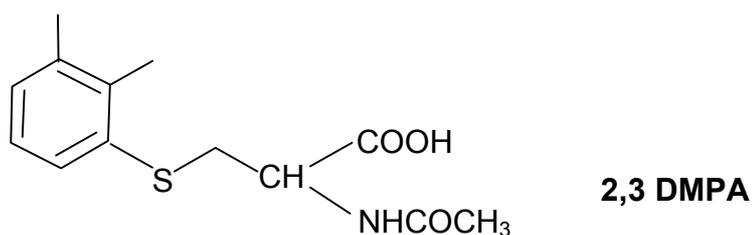
In base alle pubblicazioni di nostra conoscenza, solo un articolo valuta l'esposizione specifica ad un isomero dello xilene (orto-xilene) determinando, quantitativamente, la presenza in urina dell'acido orto-metil-benzilmercapturico (o-MBMA) [118].



Coniugazione con glutazione diretta sul metile dell'o-xilene (side chain reaction).

L'ossidazione diretta sull'anello aromatico dello xilene determina la formazione degli acidi dimetil fenilmercapturici (DMPA- miscela di isomeri) recentemente confermati come prodotti di questo metabolismo e pubblicati in un lavoro di Gonzalez-Reche et al. 2003 [119]. L'acido dimetil fenil mercapturico (somma dell'orto, meta e para coniugato) è stato ritrovato in soli 8 dei 25 campioni esposti a xilene e sono stati calcolati essere lo 0.0003% della quantità del maggior metabolita acido metil ippurico, mostrando un'ordine di grandezza simile con quanto descritto per l'acido p-toluilmercapturico rispetto al maggior metabolita, l'acido ippurico, per il toluene [90].

Ulteriormente, in questo lavoro, gli autori hanno confermato che le proporzioni degli isomeri degli acidi dimetil fenilmercapturici rispecchiano le proporzioni degli xileni (miscela di isomeri) in aria [119]. Il numero esiguo di studi effettuati per gli acidi mercapturici specifici dello xilene non consente alcuna considerazione in merito alla sua potenziale idoneità come indicatore di esposizione al solvente rispetto ai tradizionali biomarcatori.



Prodotti della coniugazione con glutatione diretta sull'anello aromatico dell'o-xilene.

## 4. PARTE SPERIMENTALE

### 4.1. Prodotti chimici e reagenti

L'acido formico al 98% è stato acquistato dalla Fluka (Buchs, Svizzera), il metanolo di grado analitico è stato acquistato dalla Merk (Darmstadt, Germania). L'acqua deionizzata (18.2M $\Omega$ cm) è stata prodotta con un sistema Direct-Q Millipore della Waters (Millford, MA, USA).

Le cartucce per la Solid Phase Extraction (SPE) Isolute® ENV+ (50 mg, 1 ml), Isolute® C18 (50 mg, 1 ml), sono state acquistate dalla IST (Mid Glamorgan, GB), mentre le cartucce per SPE Evolute™ (25 mg, 1 ml) sono state acquistate dall'Argonaut Technologies Ltd (Mid Glamorgan, GB).

Gli standard chimici dell'acido s-fenilmercapturico (SPMA), s-benzilmercapturico (SBMA) e orto-metil-s-benzilmercapturico (o-MBMA) sono stati forniti dalla Tokyo Kasei (Prodotti Gianni, Milano, Italia).

Gli analoghi deuterati SPMA-d-5 and SBMA-d-7 utilizzati come standard interni sono stati sintetizzati su richiesta dall'Alchemy s.r.l. (Bologna, Italia). Tutti i composti chimici utilizzati come standard sono al più alto grado di purezza disponibile sul mercato (>99%).

### 4.2. Strumentazione

#### 4.2.1. Fase preanalitica e analitica

L'estrazione in fase solida (SPE) dei campioni biologici è stata condotta utilizzando un sistema a vuoto con piastra a 96 pozzetti VacMaster della IST (Mid Glamorgan, GB).

La fase preanalitica di evaporazione del solvente dai campioni biologici è stato utilizzato un Evaporatore EZ-2plus (GeneVac Ltd., Ipswich, GB).

Le analisi in HPLC-ESI-MS/MS sono state effettuate attraverso un sistema HPLC serie 1100 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germania), con controllo remoto (via software di gestione strumentale o proprio comando manuale), equipaggiato di autocampionatore termostato e modulo per l'alloggiamento della colonna analitica termostato.

Il sistema HPLC, utilizzato in modalità microflussi, è stato interfacciato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 2000 della PE Sciex (Concord, ON, Canada) fornito di sorgente ionica TurboIonSpray™ (ESI, "ElectroSpray ionization"). Lo spettrometro di

massa è dotato di una pompa per infusione integrata al sistema per condurre esperimenti di FIA (Flow Injection Analysis). L'azoto è stato fornito da un sistema generatore 75-72 Whatman (Maidstone, Kent, GB) usato come gas "curtain" e gas ausiliario. Una versione del software Analyst Software PE Sciex (rev. 1.3.2) è stata utilizzata per la gestione strumentale del sistema HPLC-MS-MS e l'acquisizione del dato analitico.

La separazione analitica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare Synergi 4u Max-RP (0.5mm x 50mm, 4µm, 80Å Phenomenex® Torrance CA, USA) preceduta da una precolonna "guard column" (Synergi 4u Max-RP, 0.5mm x 20mm, 4µm, 80Å, Phenomenex®).

Una pompa per infusione esterna allo spettrometro di massa (Modello 11 plus, Harvard Apparatus, Holliston, MA) è stata utilizzata per la valutazione dell'influenza dell'effetto della matrice biologica sul segnale massa/massa degli acidi mercapturici in studio.

### 4.3. Soluzioni

#### 4.3.1. Soluzioni di Standard Chimici e Standard Interni

Preparazione a partire dalle polveri, opportunamente conservate in freezer a -20 C, delle soluzioni stock 200 mg/l (ppm) dei tre analiti SPMA, SBMA, o-MBMA e dei relativi analoghi deuterati di SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> in Metanolo puro.

A partire dalle soluzioni stock degli standard chimici e degli analoghi deuterati preparo delle soluzioni in **Fase Mobile** (soluzione acquosa di acido formico 0.07% v/v e metanolo puro, ovvero Solvente A e Solvente B cromatografici in rapporto 1:1 v/v) a diversa concentrazione degli analiti in studio per:

a) l'ottimizzazione dei parametri di massa e scelta delle transizioni massa/massa in modalità MRM da utilizzare nell'analisi in spettrometria di massa:

preparando singoli standard chimici degli analiti e degli internal standard 0.5 mg/l (ppm) (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub>) mediante l'aggiunta di un opportuno volume della soluzione stock 200 mg/l (ppm) degli stessi in un'adeguato volume di **Fase Mobile**,

preparando uno standard chimico Mix 5 (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub>) 0.5 mg/l (ppm) in Fase Mobile 1:1 v/v per FIA (flow injection analysis: infusione diretta in spettrometro di massa), mediante l'aggiunta di un opportuno volume delle singole soluzioni stock 200 mg/l (ppm) degli analiti in un'adeguato volume di **Fase Mobile**,

b) l'ottimizzazione dei gradienti cromatografici durante la fase di sviluppo del metodo analitico, l'accertamento della sensibilità strumentale e condizionamento della colonna analitica prima di ogni sessione analitica effettuata su campioni biologici:

preparando uno standard chimico Mix 5 di SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> 12.5 µg/l (ppb) in **Fase Mobile**, mediante l'aggiunta di un'opportuna diluizione di un volume di soluzione dello standard chimico Mix 5 0.5 mg/l (ppm) con **Fase Mobile**,

c) la composizione degli standard di calibrazione urinaria delle curve di calibrazione analitica e dei livelli quality control su matrici biologiche:

preparando uno standard chimico A: Mix 3 A di SPMA, SBMA, o-MBMA 1 mg/l (ppm) in Fase Mobile 1:1 v/v, mediante l'aggiunta di un opportuno volume di ogni singola soluzione stock dei tre analiti a 200 mg/l (ppm) in metanolo, in un'adeguato volume di **Fase Mobile**,

preparando uno standard chimico B: Mix 3 B di SPMA, SBMA, o-MBMA 0.05 mg/l (ppm) in Fase Mobile 1:1 v/v, mediante l'aggiunta di un opportuno volume di standard chimico Mix 3 di SPMA, SBMA, o-MBMA 1 mg/l (ppm) in Fase Mobile 1:1 v/v, in un'adeguato volume di **Fase Mobile**,

preparando uno standard chimico degli standard interni ISs: Mix 2 ISs dei deuterati SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> 0.5 mg/l (ppm) in Fase Mobile 1:1 v/v, mediante l'aggiunta di un opportuno volume di ogni singola soluzione stock di standard chimico di SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> 200 mg/l (ppm) in metanolo, in un'adeguato volume di **Fase Mobile**.

#### *4.3.2. Soluzioni fase preanalitica*

##### *4.3.2.1. Soluzioni per la preparazione dei campioni biologici all'estrazione in fase solida*

Una Soluzione acquosa di acido formico 1% v/v, ottenuta addizionando all'acqua deionizzata un adeguato volume di acido formico al 98% fino all'ottenimento della concentrazione desiderata, è stata utilizzata per la diluizione 1:1 v/v del campione urinario.

##### *4.3.2.2. Soluzioni e solventi per estrazione in fase solida (SPE)*

Soluzioni e solventi utilizzati per le fasi di attivazione, condizionamento, lavaggio ed eluizione del campione biologico dalle cartucce SPE:

**Fase di attivazione:** 1ml di Metanolo puro.

**Fase di condizionamento:** 1ml di Soluzione acquosa di acido formico 0.1% ottenuta addizionando all'acqua deionizzata un adeguato volume di acido formico al 98% fino all'ottenimento della concentrazione desiderata.

**Fase di lavaggio dopo caricamento del campione biologico:** 1 ml Soluzione acquosa di Metanolo al 10% v/v, ottenuta addizionando all'acqua deionizzata un adeguato volume di metanolo puro fino all'ottenimento della concentrazione desiderata.

**Fase di eluizione degli analiti:** aggiunta di 2 aliquote successive di 250 µl di metanolo puro.

**Fase di recupero del campione del campione biologico dopo evaporazione:** 50µl di **Fase Mobile**

##### *4.3.3. Soluzioni per separazione cromatografica: le fasi mobili*

Le fasi mobili utilizzate per il condizionamento della colonna capillare Synergi 4u Max-RP e la separazione analitica degli acidi mercapturici di interesse tossicologico dal campione biologico trattato sono state:

**Soluzione A:** Soluzione acquosa di acido formico 0.07% v/v a pH 2.76, ottenuta aggiungendo all'acqua deionizzata un adeguato volume di Acido formico al 98% fino all'ottenimento della concentrazione desiderata.

**Soluzione B:** Metanolo puro.

#### *4.4. Procedura di Estrazione in Fase Solida (SPE)*

I campioni di urina raccolti sono stati conservati in freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e mantenuti nelle medesime condizioni di stoccaggio fino al giorno dell'analisi. Ogni campione, prima dell'analisi, è stato scongelato a temperatura ambiente, agitato vigorosamente ed in seguito centrifugato a  $1500\times g$  per 10 minuti per ottenere un supernatante limpido.

Le cartucce SPE (Solid phase extraction) utilizzate per l'estrazione sono state sottoposte ad una fase di lavaggio e condizionamento mediante l'aggiunta in successione di 1 ml di Metanolo e 1ml soluzione acquosa di acido formico 0.1% v/v.

Nelle cartucce è stato poi caricato 1ml di campione biologico (urina centrifugata diluita 1:1 con una soluzione di acqua di acido formico all'1%, v/v), a cui erano stati preventivamente aggiunti  $5\mu\text{l}$  di soluzione di Standard Interni SPMA<sub>5</sub> e SBMA<sub>7</sub> a 0,5 mg/l (ppm) in Fase Mobile

La fase stazionaria è stata poi sottoposta ad una fase di lavaggio con 1 ml di soluzione acquosa di metanolo al 10% v/v. Gli analiti sono stati successivamente eluiti dalle cartucce SPE mediante il lavaggio con due aliquote successive di  $250\mu\text{l}$  di Metanolo puro. L'eluato raccolto, è stato fatto evaporare a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  in condizioni di vuoto spinto nell'evaporatore EZ-2 Plus.

Il residuo è stato poi ridissolto in  $50\mu\text{l}$  di una soluzione 1:1 (v/v) di acido formico 0,07% v/v e Metanolo ed un volume di  $0.5\text{ }\mu\text{l}$  è stato iniettato mediante autocampionatore nel sistema  $\mu\text{-HPLC-MS-MS}$ .

L'intera procedura preanalitica di diluizione del campione biologico, estrazione, evaporazione e ridissoluzione del residuo biologico, consente la concentrazione del campione urinario (pari ad un fattore 10).

#### *4.4.1. Valutazione di diversi supporti per Estrazione in Fase Solida (SPE)*

La procedura di separazione, purificazione e simultanea concentrazione è stata ottimizzata comparando tre differenti tipi di cartucce in fase inversa per estrazione su supporto solido (SPE): le Isolute® C18, Isolute® Env+ ed in ultimo le Evolute™ ABN. La scelta è ricaduta sulle cartucce Evolute™ ABN per la loro alta percentuale di recupero analitico.

#### *4.5. Cromatografia liquida*

Le analisi HPLC sono state effettuate con un flusso di 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  usando un gradiente binario di una soluzione acquosa di acido formico 20mM (Solvente A) e Metanolo (Solvente B). La separazione analitica è stata ottenuta utilizzando una colonna capillare Synergi 4u Max-RP (0.5mm x 50mm, 4 $\mu\text{m}$ , 80A° Phenomenex® Torrance CA, USA) preceduta da una appropriata guard column (Synergi 4u Max-RP, 0.5mm x 20mm, 4 $\mu\text{m}$ , 80A°, Phenomenex®) allo scopo di evitare il progressivo deterioramento della colonna capillare, prolungandone il tempo di vita.

Il gradiente binario di eluizione utilizzato è stato il seguente: dopo 1 minuto di eluizione isocratica con il solvente A al 65% e il solvente B a 35%, il solvente B è stato portato in 2 minuti seguendo una curva di crescita lineare al 90%. Questa composizione isocratica è stata mantenuta per 12 minuti, successivamente il solvente B è stato riportato in 1 minuto al 35% e mantenuto per 11 minuti in questa composizione isocratica per il tempo di ricondizionamento della colonna analitica adeguatamente valutato. La durata complessiva della corsa cromatografica è di 27 minuti.

La colonna cromatografica è stata mantenuta a +20°C e la piastra dell'autocampionatore a +15 °C.

Per testare il tempo di condizionamento della colonna prima dell'inizio di ogni sessione analitica, la mancanza di effetti memoria della colonna analitica ed in aggiunta valutare la sensibilità e riproducibilità strumentale, è stato utilizzato lo standard chimico Mix 5 (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMAd5 e SBMAd7) 12.5  $\mu\text{g/l}$  (ppb) in **Fase Mobile** (vedi paragrafo 2.3.1. *Soluzioni di Standard Chimici e Standard Interni*)

#### 4.6. Spettrometria di Massa

L'analisi in tandem massa (Massa-Massa) è stata effettuata utilizzando detector a triplo quadrupolo operante in modalità negativa. Una soluzione standard di Polipropilen Glicole è stata utilizzata per la calibrazione dello strumento in un intervallo di massa/carica a 100-900 m/z, per il controllo e settaggio della risoluzione ad un valore di rapporto massa/carica pari a 0.7 unità.

Allo scopo di caratterizzare la frammentazione degli analiti (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d</sub>-5 e SBMA<sub>d</sub>-7), per ciascun di essi e separatamente, abbiamo, dapprima, registrato in Q1 (primo quadrupolo) lo spettro di massa degli ioni molecolari deprotonati [M-H]<sup>-</sup> nel range di massa/carica compreso tra 100–300 m/z. Successivamente, per ogni analita, selezionando sul Q1 (primo quadrupolo) lo ione molecolare deprotonato, abbiamo registrato in Q3 (terzo quadrupolo) lo spettro di massa dei frammenti specificamente generati dallo ione molecolare nel medesimo range di massa/carica. Il frammento figlio a più alta intensità, assieme al progenitore, sono stati scelti per essere valutati in modalità multiple reaction monitoring (MRM ovvero modalità che permette di valutare l'intensità del segnale specificamente generato dalla "coppia di reazione" individuati nel procedimento precedente). Per ogni coppia così generata (per ciascun analita) sono stati valutati e ottimizzati i parametri elettrici che condizionano il segnale in spettrometria di massa (parametri dipendenti dal composto, sorgente e gas). La figura 1, mostra lo spettro di massa prodotto dalla frammentazione degli analiti. Le transizioni degli ioni molecolari deprotonati [M-H]<sup>-</sup> e dei frammenti figli prodotti degli analiti e degli standard interni deuterati sono state monitorate per l'analisi quantitativa modalità multiple reaction monitoring MRM con rapporto dwell time/channel a 600 ms e risoluzione unitaria.

Le transizioni scelte sono state: 238→109 per SPMA, 252→123 per SBMA, 266→137 per o-MBMA, 243→114 per SPMA<sub>d</sub>5 e infine 259→130 per SBMA<sub>d</sub>7.

I parametri strumentali per ogni composto sono stati ottimizzati mediante l'infusione della corrispondente soluzione standard a concentrazione 0.5 mg/l in fase mobile (soluzione 1:1 v/v di acido formico 20mM/Metanolo) ad un flusso di 10µl min<sup>-1</sup>, usando una pompa per siringa integrata allo spettrometro di massa. Come curtain gas e gas ausiliario è stato utilizzato l'azoto, mentre come gas nebulizzante è stata utilizzata l'aria.

Il metodo di tandem massa per l'analisi simultanea di queste 5 coppie di reazione è stato infine ottimizzato con la suddetta procedura analizzando una soluzione standard MIX5 a concentrazione 0.5 mg/l (per ciascun analita) in fase mobile. Le condizioni dell'elettrospray

per l'analisi in tandem massa dell'SPMA, SBMA, o-MBMA e gli standard interni SPMA<sub>5</sub> ed SBMA<sub>7</sub> sono state: curtain gas, 20 psi; ion-spray voltage, -4500V; gas nebulizzante e ausiliario, rispettivamente 40 e 60 psi; temperatura 250 °C; collision energy, -18.0 eV; declustering potential, -10V; focusing ed entrance potentials, rispettivamente -350V e -8V.

#### *4.7. Campioni biologici urinari*

Per la validazione del metodo, delle urine "spot" (non derivanti quindi dalla raccolta della diuresi giornaliera completa), sono state raccolte da soggetti sani e non fumatori di entrambi i sessi, non occupazionalmente esposti a nessun solvente organico. La presenza ubiquitaria in ambiente urbano di tracce dei solventi benzene, toluene e xileni (BTX), rende estremamente difficile recuperare campioni con valore di bianco per gli indicatori biologici soggetti alla nostra analisi.

Per l'indisponibilità di urine blank, abbiamo raccolto ed analizzato in HPLC-MS/MS complessivamente trenta lotti di urine allo scopo di determinare quale urina contenesse le minime quantità degli analiti SPMA, SBMA e o-MBMA ricercati (livelli di background o basali). Su tutti e trenta i lotti di urina analizzati è stata determinata la concentrazione di creatinina urinaria con il metodo di Jaffè.

Delle trenta urine la nostra scelta è ricaduta su sei lotti di urine caratterizzati da bassi livelli di acidi mercapturici (SPMA e o-MBMA: non determinato; SBMA compreso tra 1.0 e 3.2 µg/l, media 1.7 µg/l) e livelli di creatinina urinaria compresi tra 0.3 e 3.0 g/l. Queste sei urine sono state utilizzate separatamente per valutare l'effetto matrice ed unite in un pool per ottenere i livelli di concentrazione standard delle rette di calibrazione ed i quality control utilizzati per la validazione del metodo analitico.

#### *4.8. Curve di calibrazione*

I livelli di calibrazione in urina sono stati preparati in triplicato, in accordo con i riferimenti dell'FDA.

Al pool di urine è stato aggiunto un adeguato volume della soluzione di standard chimici dei tre analiti (Mix 3 A ad 1 mg/l e Mix 3 B a 0.05 mg/l in Fase Mobile, vedi paragrafo soluzioni) allo scopo di ottenere sette livelli di concentrazione (0, 0.6, 1, 2, 10, 25, 50 µg/l per SPMA; 0,

0.7, 1, 2, 10, 25, 50 µg/l SBMA e 0, 0.8, 1, 2, 10, 25, 50 µg/l per o-MBMA). Il livello di concentrazione zero è l'urina, derivante sempre dal pool, con la sola aggiunta di un'adeguato volume della soluzione di standard interni (Mix 2 ISs), tale da ottenere una concentrazione pari a 5 µg/l (ppb). I livelli di calibrazione sono stati poi estratti mediante SPE ed analizzati in µ-HPLC-ESI-MS/MS come descritto in precedenza nello stesso giorno e per ogni sessione analitica di 50 campioni biologici. Il rapporto *area sottesa al picco dell'analita relativo / area sottesa al picco dei rispettivi IS* (SPMA<sub>d</sub>-5 è stato usato come IS per SPMA e SBMA<sub>d</sub>-7 per SBMA e o-MBMA) sono stati riportati in grafico rispetto alla concentrazione nominale dei livelli di calibrazione standard ottenendo così la curva di calibrazione degli standard in urina. Dalla stessa retta di calibrazione, la concentrazione è stata poi retrocalcolata dai valori dei rapporti tra aree dei picchi ottenendo così la deviazione del valore di concentrazione calcolato rispetto al valore di concentrazione nominale misura dell'accuratezza del dato analitico, espresso come BIAS% (vedi paragrafo 2.9 *Procedure di validazione del metodo analitico*).

#### 4.9. Procedure di validazione del metodo analitico

Il metodo è stato completamente validato secondo le linee guida della FDA per i metodi bioanalitici. Sono stati, quindi, determinati i parametri caratterizzanti il metodo analitico in µHPLC-ESI-MS/MS sviluppato: il limite di detection (LOD), il limite di quantificazione (LOQ), la linearità, la precisione, l'accuratezza e specificità, e valutati il recupero dell'analita dal processo di solid phase extraction, l'effetto matrice (la soppressione ionica) e la stabilità dell'analita.

##### 4.9.1. Limite di detection e di quantificazione

Il LOD e il LOQ per ogni analita è stato valutato attraverso l'analisi in sestuplicato dei livelli di calibrazione che costituiscono la retta di calibrazione standard in matrice biologica. Il LOD e LOQ sono stati determinati avvelendosi del calcolo dell'errore standard dell'intercetta ( $S_b$ ) sulla curva di calibrazione ( $y=mx+b$ ). Il LOD e LOQ per ogni analita sono stati definiti come rispettivamente 2 e 4 volte il rapporto  $S_b/m$  utilizzando come  $m$ , il coefficiente angolare della curva di calibrazione linearizzata (regressione lineare con equazione  $y= mx+b$ ) e come  $S_b$ , l'errore standard dell'intercetta calcolato sulla curva stessa. La precisione e l'accuratezza del

valore LOQ rispetta i requisiti definiti dalle linee guida dell'FDA (D.S.R.  $\leq 20\%$  e BIAS  $\leq 20\%$ ). Unica osservazione da effettuare, è che per l'SBMA, tale calcolo, è stato effettuato su una curva di calibrazione costruita sottraendo ad ogni rapporto di intensità (area analita/Area IS), che definisce i punti di calibrazione, il valore del rapporto ottenuto per il livello zero, ovvero, il segnale basale osservato (background).

#### *4.9.2. Precisione e accuratezza*

La precisione e l'accuratezza dell'intero metodo sono stati valutati attraverso la preparazione ed analisi di tre concentrazioni definite Quality Control, ottenute mediante lo spikaggio di una soluzione Mix 3 dei mercapturici (MIX 3 A 1 mg/l e MIX 3 B 0.05 mg/l in fase mobile) in un definito volume del pool di urina al fine di ottenere livelli di concentrazione pari a 2, 20 e 50  $\mu\text{g/l}$ .

I QC sono stati estratti e analizzati in sestuplicato nella stessa sessione analitica giornaliera (Precisione ed Accuratezza Intraday). La precisione è stata espressa come la Deviazione Standard Relativa (D.S.R), mentre l'accuratezza è stata calcolata come la differenza relativa tra il valore di concentrazione calcolato dei QC (ottenuto dall'interpolazione dei valori dei rapporti delle aree analita/area IS sulla curva di calibrazione costruita sullo stesso pool di urina durante la medesima sessione analitica) e la concentrazione nominale dello stesso campione QC in esame (espresso come BIAS%).

#### *4.9.3. Recupero*

Il recupero dei tre analiti dall'estrazione in fase solida è stato calcolato, per ognuno di essi, attraverso il confronto delle soluzioni di standard chimico mix3 in **Fase Mobile** estratte e non-estratte, su tre livelli di concentrazione (2, 20 and 50  $\mu\text{g/l}$ ), ognuna analizzata in triplicato.

#### *4.9.4. L'effetto matrice: fenomeno della soppressione ionica*

Il processo di ionizzazione (e/o frammentazione) delle specie chimiche, principio alla base

dello specifico riconoscimento dei chimici in spettrometria di massa (rapporto massa/carica), può essere alterato in maniera più o meno intensa dall'effetto matrice responsabile o della diminuzione (soppressione ionica), nel caso in cui tali sostanze entrino in conflitto con il processo di ionizzazione, oppure dell'incremento della risposta strumentale (incremento ionico).

Tali fenomeni si osservano principalmente in cromatografia liquida accoppiata a detector di massa ed in particolare quando l'interfaccia tra l'HPLC e lo spettrometro di massa utilizza metodi di ionizzazione detti di "Soft-ionization". Come nel nostro caso l'interfaccia ESI (Electrospray Ionization) permette non solo la ionizzazione "debole" delle specie chimiche ma anche la vaporizzazione delle stesse rendendo possibile l'accoppiamento di due strumenti analitici ad alte prestazioni (da qui la nascita del termine metodi analitici "ifenati") che lavorano con differenti stati della materia: HPLC lavora in fase liquida, mentre gli spettrometri di massa lavorano in fase gassosa e vuoto spinto.

Da qui la necessità di valutare, pena l'invalidità dell'intero processo di validazione analitica della metodica, l'effetto matrice e specificamente nel nostro caso la soppressione ionica, in accordo con le linee guida dell'FDA.

Tale effetto, è stato valutato mediante due differenti procedure: nel primo caso, sei differenti campioni di urina umana sono stati processati (come descritto in particolare in estrazione in SPE), portati a secco e ridissolti con l'aggiunta di 50 µl di Standard Chimico in Fase Mobile (vedi paragrafo Soluzioni) contenente una concentrazione pari a 10µg/l di ogni analita. Per ogni analita, il risultato ottenuto dall'analisi in HPLC-ESI-MS/MS di campioni biologici, è stato confrontato con quello ottenuto dalla determinazione diretta dei tre acidi mercapturici da uno Standard Chimico MIX 3 alla medesima concentrazione (10µg/l per ogni analita), disciolti però nella sola fase mobile. Questo confronto tra segnali dà computo diretto dell'entità del fenomeno di soppressione ionica ovvero della percentuale del segnale analitico in MS/MS residuo, attutito o meglio soppresso dalle componenti della matrice biologica, coeluiti con gli stessi analiti durante la separazione cromatografica.

Il secondo test, che identifica le regioni della separazione cromatografica sottoposte ad elevata soppressione ionica, è stato eseguito mediante un esperimento di infusione di una soluzione di standard chimici Mix 3 0.5 mg/l in Fase Mobile contemporaneo alla iniezione cromatografica di un livello zero di urina estratto contenente solo gli Standard Interni (alla solita concentrazione utilizzata per i campioni biologici ovvero 5 µg/l), detto *esperimento in post column infusion*.

L'esecuzione di tale esperimento è stato possibile attraverso l'ausilio di una pompa per

infusione esterna allo spettrometro di massa (Modello 11 plus, Harvard Apparatus, Holliston, MA) che infondeva in maniera continua (con flusso a 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) una soluzione standard di SPMA, SBMA ed o-MBMA 500  $\mu\text{g}/\text{l}$  in Fase Mobile 1:1 v/v (Acido Formico 0,07% v/v e MeOH) introdotta nel sistema analitico  $\mu\text{LC}$  attraverso un connettore a T durante l'iniezione cromatografica (metodo cromatografico di routine) del livello zero in urina. Il segnale di soppressione ionica degli analiti SPMA, SBMA ed o-MBMA derivante dalla matrice urinaria iniettata cromatograficamente è stato valutato per sei differenti urine e definito come il picco cromatografico "negativo" prodotto sul segnale MS/MS dei tre analiti determinato per infusione.

#### 4.9.5. Specificità

La specificità del metodo è stata valutata dall'analisi di tre urine di controllo singole (non in pool), ognuna analizzata al livello LOQ e al livello zero. Secondo gli standard FDA seguiti, l'altezza del picco del livello zero non dovrebbe superare del 20% l'altezza del picco al livello LOQ e l'accuratezza del LOQ dovrebbe essere compresa tra l' 80% ed il 120% del valore di concentrazione nominale.

#### 4.9.6. Stabilità

La stabilità degli analiti e degli standard interni deuterati è stata determinata sia per gli standard chimici che per i livelli di concentrazione in matrici urinary, in accordo con le linee guida dell'FDA.

La stabilità delle soluzioni stock 200 ppm (mg/l) in Metanolo e delle soluzioni di lavoro per la costruzione dei livelli di calibrazione (MIX 3 A 1 ppm e MIX 3 B a 0.05 ppm in Fase Mobile) è stata valutata mantenendo le stesse per 8 ore a temperatura ambiente. Sempre attraverso un esperimento simile sono state valutate le condizioni di stoccaggio normalmente impiegate per le soluzioni stock e le working solution, a -20 °C durante un intero anno e a +4 °C per una intera settimana, rispettivamente.

Sui tre livelli di concentrazione QC (2, 20 and 50  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), analizzati in triplicato, è stata monitorata la stabilità dei analiti in urina valutando per ognuno l'effetto di:

- tre cicli successivi di congelamento e scongelamento,

- un breve periodo di conservazione in freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  (seguito da scongelamento e mantenimento del campione per 24 ore a temperatura ambiente),
- un lungo periodo di conservazione (2 mesi) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , (seguito da scongelamento e mantenimento del campione per 24 ore a temperatura ambiente),

i risultati avuti sono stati confrontati rispetto a quelli ottenuti analizzando gli stessi livelli di concentrazione QC preparati di fresco (stessa urina) con la medesima procedura .

In aggiunta, abbiamo valutato anche la stabilità dei campioni estratti, la cosiddetta stabilità post preparativa, testando la riproducibilità del valore di intensità dei picchi analitici in condizioni di conservazione dei campioni in autocampionatore a  $+15^{\circ}\text{C}$  per 48 ore, ovvero un periodo superiore ad una sessione analitica normalmente effettuata.

#### *4.10. Elaborazione statistica dei dati del monitoraggio biologico*

La valutazione della distribuzione dei dati ottenuti dall'applicazione del nostro metodo analitico su 396 campioni biologici urinari (corretti per il corrispondente valore di creatinina urinaria) è stata effettuata avvalendoci di un test skewness–kurtosis. Osservando un carattere di distribuzione normale, le variabili continue sono state analizzate mediante l'utilizzo di un test di Student. Nel caso di distribuzioni non normali è stato applicato il test Wilcoxon ranksum. Per tutti e tre gli analiti è stato usato un software Stata 8.0 SE (Stata Corporation, TX, USA), con valore di significatività per  $p < 0.05$ .

Per ogni analita (SPMA, SBMA e o-MBMA) sono state valutate l'associazione rispetto ad età, sesso e abitudine al fumo. Ulteriormente concentrandoci sull'abitudine al fumo, è stato possibile analizzare l'andamento degli indicatori biologici rispetto all'individuazione, nella classe dei fumatori, di sottocategorie maggiormente esposte (es. forti fumatori durante il turno di lavoro).

#### *4.11. Variazioni al metodo di analisi in HPLC-ESI-MS/MS originale*

Partendo dal metodo analitico in HPLC-ESI-MS/MS così sviluppato, e testando le performances su centinaia di campioni biologici, abbiamo voluto applicare alcune variazioni alle fasi preanalitiche ed analitiche valutandone gli eventuali effetti da essi derivati. La valutazione *step by step* di alcuni parametri condizionanti la metodologia “ifenata” utilizzata si è avvalso di uno schema di variazione progressiva in funzione dei risultati ottenuti.

#### 4.11.1. Soluzioni di Standard Chimici e Standard Interni

Preparazione a partire dalle polveri, opportunamente conservate in freezer a -20 C, delle soluzioni stock 200 mg/l (ppm) dei tre analiti SPMA, SBMA, o-MBMA e dei relativi analoghi deuterati di SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> in Metanolo puro.

A partire dalle soluzioni stock degli standard chimici e degli analoghi deuterati preparo delle soluzioni in **Fase Mobile I** (soluzione acquosa di acido formico 0.01% v/v e metanolo puro, ovvero Solvente A e Solvente B cromatografici in rapporto 1:1 v/v) a diversa concentrazione degli analiti in studio per:

a) l'ottimizzazione dei parametri di massa e scelta delle transizioni massa/massa in modalità MRM da utilizzare nell'analisi in spettrometria di massa:

preparando i singoli standard chimici degli analiti e degli internal standard 0.5 mg/l (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub>) per FIA (flow injection analysis: infusione diretta in spettrometro di massa) mediante l'aggiunta di un opportuno volume della soluzione stock 200 mg/l (ppm) degli stessi in un'adeguato volume di **Fase Mobile I**,

preparando uno standard chimico Mix 5 (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub>) 0.5 mg/l (ppm) in Fase Mobile 1:1 v/v per FIA (flow injection analysis: infusione diretta in spettrometro di massa), mediante l'aggiunta di un opportuno volume delle singole soluzioni stock 200 mg/l (ppm) degli analiti in un'adeguato volume di **Fase Mobile I**,

b) l'ottimizzazione dei gradienti cromatografici durante la fase di sviluppo del metodo analitico, l'accertamento della sensibilità strumentale e condizionamento della colonna analitica prima dell'inizio di ogni sessione analitica avvalendoci dell'utilizzo di uno standard chimico Mix 5 12.5 µg/l (ppb) in solo metanolo ottenuto per diluizioni successive:

preparando uno standard chimico Mix 5 (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub>) 0.5 mg/l (ppm) mediante l'aggiunta di un opportuno volume delle singole soluzioni stock 200 mg/l (ppm) degli analiti in un'adeguato volume di metanolo,

preparando uno standard chimico Mix 5 di SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> 12.5 µg/l (ppb) in metanolo, mediante opportuna diluizione di un volume della soluzione di standard chimico Mix 5 0.5 mg/l (ppm) con metanolo,

c) la composizione degli standard di calibrazione urinaria delle curve di calibrazione analitica e dei livelli quality control su matrici biologiche avvalendoci di soluzioni di standard chimici e di standard interni preparati in metanolo:

preparando uno standard chimico A: Mix 3 A di SPMA, SBMA, o-MBMA 1 mg/l (ppm) in metanolo, uno standard chimico B: Mix 3 B di SPMA, SBMA, o-MBMA 0.05 mg/l (ppm) in metanolo e dello standard chimico degli standard interni ISs: Mix 2 ISs dei deuterati SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> 0.5 mg/l (ppm) in metanolo attraverso diluizioni successive effettuate in metanolo (mediante gli stessi passaggi visti nel paragrafo 4.3 *Soluzioni* ).

#### 4.11.2. Spettrometria di massa

Partendo dal metodo originale e verificando, dapprima, che nelle nuove condizioni si ottenessero le medesime “coppie di reazione” (valutazione dell’intensità dello ione molecolare deprotonato in Q1, selezione in Q1 del solo ione progenitore e verifica dell’intensità e del comportamento di frammentazione dello ione figlio in Q3) è stata testata, per le medesime transizioni di massa (238→109 per SPMA, 252→123 per SBMA, 266→137 per o-MBMA, 243→114 per SPMA<sub>d5</sub> e infine 259→130 per SBMA<sub>d7</sub>), una soluzione standard MIX5 0.5 mg/l (analiti e standard interni) in una Fase mobile 1:1 v/v di una soluzione acquosa di Acido Formico 0,01% (pH=4.15) e Metanolo. I parametri elettrici dello spettrometro di massa utilizzati per queste valutazioni non sono stati variati (vedi paragrafo 4.6. *Spettrometria di massa*). L’unica variazione al metodo FIA rimane quindi la riduzione della concentrazione della componente acida (acido formico) ed conseguentemente anche del valore di pH della soluzione MIX5 0.5 mg/l.

#### 4.11.3. Condizioni della separazione cromatografia

La colonna capillare e la guard column sono le medesime utilizzate nel precedente metodo

analitico.

La soluzione A e B scelte per il metodo cromatografico sono state rispettivamente una soluzione acquosa di acido formico 0.01% v/v e Metanolo puro. Sono state valutate alcune variazioni della composizione della sola Soluzione A come l'acqua deionizzata MilliQ e soluzioni acquose a differente concentrazione di acido formico (0.035 e 0.01% v/v). Non sono state valutate variazioni nella composizione della Soluzione B (Metanolo puro), così come, al gradiente cromatografico applicato (vedi paragrafo 4.5. *Cromatografia liquida*).

La temperatura di mantenimento della colonna capillare è stata valutata per temperature di 25 e 30°C. Uno standard chimico, Mix 5 (SPMA, SBMA, o-MBMA, SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub>) 12.5 µg/l (ppb) in **fase mobile I** ed uno in **metanolo** sono stati utilizzati per valutare: i tempi di condizionamento, effetto memoria, riproducibilità dello standard chimico e sensibilità del metodo HPLC-MS-MS.

#### *4.11.4. Procedure di estrazione del campione biologico*

Partendo dai risultati ottenuti dal rendimento della nostra estrazione analitica, abbiamo focalizzato la nostra attenzione solo nella modifica della procedura di estrazione variando alcune fasi della procedura di estrazione in SPE:

- eliminando la diluizione 1:1 v/v del campione urinario con Acido Formico 1% portando comunque il campione biologico ad un pH pari al metodo originale ma con Acido formico al 98%,
- riducendo il volume di Metanolo utilizzato per eluizione gli analiti dal supporto solido (solo una aliquota di 250 µl).

La variazione, a questo punto, si è estesa anche sull'annullamento del processo di evaporazione e ridissoluzione del residuo secco con metanolo (vedi paragrafo 4.4. *Procedura di Estrazione in Fase Solida*). La procedura preanalitica consente, in questo caso, una concentrazione del campione urinario pari ad un fattore 4.

#### 4.11.5. Validazione del metodo analitico

##### 4.11.5.1. Linearità e determinazione del LOD e LOQ

La nostra parziale validazione ha previsto l'utilizzo di una sola urina concentrando la nostra sessione analitica in un solo giorno, pertanto, la riproducibilità inter-individuale ed inter-day delle curve di calibrazione, non è stata valutata.

I livelli di calibrazione in urina sono stati preparati in quintuplicato. All'urina è stato aggiunto un adeguato volume delle soluzioni di standard chimici dei tre analiti (Mix 3 A ad 1 mg/l e Mix 3 B a 0.05 mg/l in Metanolo, vedi paragrafo 4.11.1. *Soluzioni di Standard Chimici e Standard Interni*) allo scopo di ottenere otto livelli di concentrazione (0, 0.2, 0.5, 1, 2, 10, 25, 50 µg/l per SPMA, SBMA e o-MBMA). La linearità della curva di calibrazione è stata quindi indagata lungo l'intero range di concentrazioni previsto. La determinazione del LOD e LOQ è stata calcolata mediante il medesimo procedimento visto nel paragrafo 4.9.1. *Limite di detection e limite di quantificazione*. Per l'SBMA e o-MBMA, questi due parametri sono stati calcolati mediante l'utilizzo di rette di calibrazione ottenute dalla sottrazione dei livelli di background osservati, per due dei tre analiti rivelati, da ogni livello di calibrazione analizzato. Anche in questo caso il LOD, LOQ e tutti i livelli di calibrazione considerati rispettano ampiamente i riferimenti dell'FDA (accuratezza e precisione).

##### 4.11.5.2. Precisione e accuratezza

La precisione e l'accuratezza del metodo aggiornato sono stati valutati attraverso la preparazione ed analisi di tre concentrazioni definite Quality Control, ottenute mediante l'aggiunta di una soluzione Mix 3 dei mercapturici (MIX 3 A 1 mg/l e MIX 3 B 0.05 mg/l in Metanolo) in un definito volume della urina al fine di ottenere livelli di concentrazione pari a 0.8, 10 e 50 µg/l.

I QC sono stati estratti ed analizzati nello stesso giorno in cinque replicati (Precisione ed Accuratezza Intraday). La precisione è stata espressa come la Deviazione Standard Relativa (D.S.R), mentre l'accuratezza è stata espressa come percentuale di BIAS. Il metodo applicato è il medesimo visto nel paragrafo 4.9.2. *Precisione e accuratezza*.

#### 4.11.5.3. Recupero e l'effetto matrice

In questo caso, per la variazione della metodica abbiamo inteso il processo di “recovery” come il **total recovery** risultato di due contributi: **l'efficienza di estrazione** (SPE recovery) degli analiti dai livelli di concentrazione in urina e **l'effetto matrice** che influenza la risposta strumentale degli analiti.

L'efficienza di estrazione è stata calcolata comparando l'intensità del picco prodotto dall'analisi dei livelli di calibrazione standard in urina 0.8, 10 e 50 µg/l dei tre analiti (procedura normale di preparazione e pretrattamento SPE dei livelli di calibrazione in urina) con l'intensità ottenuta da livelli di calibrazione in urina preparati in maniera differente, analizzando ogni livello in duplicato. Questi ultimi definibili come “matrix standard” sono stati costruiti sottoponendo dapprima la sola matrice urinaria a estrazione SPE normale e aggiungendo al volume eluito dalla SPE (dopo estrazione SPE) un adeguato volume di standard chimici (MIX 3 A 1 mg/l e MIX3 B 0.05 mg/l in MEOH) tale da raggiungere, per ogni analita, gli stessi livelli di concentrazione 0.8, 10 e 50 µg/l.

L'effetto matrice è stato valutato come il rapporto tra i valori di intensità ottenuti dall'analisi dei matrix standard e i corrispondenti standard chimici (alle medesime concentrazioni) in Metanolo, medesimo esperimento descritto nel paragrafo 4.9.4. *L'effetto matrice: fenomeno della soppressione ionica.*

## 5. RISULTATI E DISCUSSIONI

### 5.1. Caratteristiche analitiche

#### 5.1.1. Spettrometria di massa

Il pattern di frammentazione di massa dei tre analiti nel range di massa compreso tra 100 e circa 300 unità di  $m/z$  è mostrato nella figura 1. Per l'SPMA lo ione figlio prodotto è stato registrato in modalità negativa in Q3 a partire dallo ione precursore molecolare  $m/z$  238 selezionato e rivelato in Q1; lo ione figlio molecolare più intenso è stato rivelato per  $m/z$  109 come mostrato dalla figura 1a.

Per l'SBMA allo stesso modo, lo ione molecolare deprotonato rivelato e selezionato in Q1 con  $m/z$  252 ha prodotto il più abbondante ione figlio in Q3 con  $m/z$  123. Per l'o-MBMA il più abbondante frammento prodotto dallo ione precursore molecolare con  $m/z$  266 è stato rivelato con rapporto di  $m/z$  di 137. Per gli standard interni SPMA<sub>d5</sub> ed SBMA<sub>d7</sub> la stessa procedura ha evidenziato coppie ione molecolare / ione prodotto a 243 / 114 e 259 / 130  $m/z$  rispettivamente. Il frammento a più alto peso molecolare per tutti e tre gli analiti in studio è derivato dallo ione molecolare deprotonato per perdita di CO<sub>2</sub> e CH<sub>2</sub> CH-NHCOCH<sub>3</sub> come peraltro mostrato in figura 1a-c, rispettivamente per l'SPMA, SBMA e o-MBMA. I nostri risultati sulla ionizzazione negativa dell'SPMA e SBMA sono in linea con quanto riportato da altri lavori pubblicati in letteratura [120,121]. In conseguenza di tali risultati, per l'analisi in HPLC-MS/MS in modalità MRM sono state selezionate le coppie  $m/z$  238→109, 252→123 e 266→137 come le transizioni che determinavano il segnale più intenso rispettivamente per SPMA, SBMA e o-MBMA.

#### 5.1.2. Cromatografia liquida

Il gradiente di eluizione e l'influenza della fase mobile sono state valutate allo scopo di ottimizzare le performances del metodo analitico. Sono stati pertanto valutati gradienti binari ottenuti utilizzando una soluzione acquosa di acido acetico 0.1% w/v e metanolo puro gradiente suggerito da un lavoro precedentemente pubblicato [122] senza ottenere dei risultati soddisfacenti. Le proposte di analisi avanzate da studi sul comportamento di acidi contenenti un gruppo carbossilico su sorgente ionica ESI, dimostrano che un gradiente di fasi mobili costituito da acido formico e metanolo risultano ottimali [123].

Abbiamo osservato che la risposta degli acidi mercapturici cresce al diminuire della concentrazione di acido formico. Comunque la presenza dell'acido formico aumenta la ritenzione degli analiti in nella colonna capillare, permettendo così l'eluizione dei componenti dell'urina.

Una colonna capillare di dimensioni ridotte assieme ad un gradiente binario costituito da una soluzione acquosa di acido formico 0.07% e metanolo puro, sono stati scelti come miglior compromesso tra il tempo di ritenzione cromatografica e la ionizzazione dei tre acidi mercapturici e dei relativi standard interni deuterati. In queste condizioni cromatografiche gli analiti e Standard interni sono eluiti in 10 minuti. La figura 2 mostra un cromatogramma acquisito in MRM di un campione urinario con un livello di concentrazione dei tre analiti pari alla relative concentrazione al limite di quantificazione (LOQ) del metodo analitico.

## 5.2. Validazione del metodo

Il metodo è stato completamente validato seguendo le linee guida della Food and Drugs Administration per i metodi bioanalitici [124].

### 5.2.1. Linearità, LOD e LOQ

La linearità delle curve di calibrazione è stata determinata per un range di concentrazioni pari a 0.6–50.0 µg/l, 0.7–50.0 µg/l e 0.8–50.0 µg/l rispettivamente per l'SPMA, l'SBMA e l'o-MBMA (curve di calibrazioni rappresentative in figura 3). Ogni equazione delle curve di calibrazione è stata ottenuta utilizzando l'equazione di regressione lineare  $y = mx + b$ , dove  $y$  è valore ottenuto dal rapporto tra l'area dell'analita e l'area del corrispondente internal standard e  $x$  è la concentrazione dell'analita aggiunto per ogni livello di concentrazione costituente i punti della retta di calibrazione.

Gli analoghi deuterati SPMA<sub>d5</sub> e SBMA<sub>d7</sub> sono stati utilizzati per correggere eventuali fluttuazioni di sensibilità strumentale ed effetti di soppressione ionica degli analiti SPMA e SBMA, mentre in mancanza dell'analogo deuterato dell'o-MBMA, il segnale ottenuto da questo analita è stato corretto con l'analogo deuterato più simile alla sua struttura chimica, quindi l'SBMA<sub>d7</sub>, che, oltretutto, esce con un tempo di ritenzione cromatografica più vicino

all'acido mercapturico relativo all'orto-xilene, fondamentale per ottenere la giusta correzione del segnale strumentale.

Sempre per l'analita o-MBMA, abbiamo verificato mediante comparazione tra dati d'analisi ottenuti in assenza ed in presenza di IS, che quest'ultimi corretti con l'SBMA<sub>d7</sub>, aumentavano sia il coefficiente di correlazione della curva di calibrazione che l'accuratezza delle concentrazioni retrocalcolate rispetto alle nominali, rispondendo adeguatamente ai criteri di validità delle linee guida dell'FDA.

Per ogni analita, la curva di calibrazione ha mostrato un coefficiente di correlazione lineare  $r^2 > 0.999$ . La concentrazione di ogni livello di calibrazione è stata retrocalcolata dalle curve di calibrazione (incluso il LOQ): la deviazione tra la concentrazione nominale e quella calcolata (Bias%) è compresa tra 0.1 e 12.1% per l'SPMA, tra 1.4 e 14.3% per l'SBMA, e tra 0.04 and 4.9% per o-MBMA. La precisione definita come D.S.R "deviazione standard relativa" è risultata essere minore di 5.1 per l'SPMA, minore di 2.7 per l'SBMA e minore del 21.0 % per l'o-MBMA. Le caratteristiche delle curve di calibrazione sono riportate in Tabella 1.

Il LOQ del metodo per ogni analita è stato determinato dividendo l'errore S.D  $y_x$  (stima dell'errore ottenuto su  $y$  per ogni valore di  $x$  della retta di calibrazione) per il coefficiente angolare  $m$ , ottenuto dalla stessa equazione che descrive le rette di calibrazione, e moltiplicando il risultato per un fattore 4, così come avevamo precedentemente prestabilito ( $LOQ = SD_{y_x/m} * 4$ ;  $LOQ = SD_{y_x/m} * 2$ ).

Inoltre, l'accuratezza della quantificazione al LOQ (limite di quantificazione) è stata valutata per tre differenti urine ed è risultata essere compresa tra l'80 ed il 120% per tutte le urine. Molti metodi in LC-MS pubblicati in letteratura mostrano un limite LOQ più basso per l'SPMA e l'SBMA. Comunque, questi valori sono stati ottenuti da un pool di urine e non da differenti campioni di urina [111,125–129]. A causa dell'indisponibilità di urine completamente prive di SBMA, la determinazione del LOQ per l'SBMA ha presentato alcuni problemi. Il valore di LOQ pari a 0.7  $\mu\text{g/l}$  è stato calcolato su una retta di calibrazione a cui è stato sottratto il bianco (livello basale), la stima di un valore di LOQ più basso potrà essere effettuato, pertanto, solo in urine che non presentano un valore di background di SBMA.

### *5.2.2. Precisione, accuratezza e recupero*

In tabella 2 si mostrano, per i tre acidi mercapturici in studio, la precisione e l'accuratezza (intra-day ed interday) ottenute dall'intera procedura analitica. Per tutti e tre gli analiti

l'accuratezza rientra nell'intervallo compreso tra il 91.1 e il 114.9%, mentre la precisione non supera il 14.0% di DSR (tabella 2). Questi parametri dimostrano che ogni analita rientra nei criteri di validità richiesti per i metodi bioanalitici dalla FDA, per ogni livello di concentrazione dei tre QC (Quality Control) stabiliti e definiti nella parte sperimentale.

Le percentuali di recupero degli analiti ottenute dalla procedura di estrazione in fase solida sono state:  $82.0 \pm 4.4\%$  per l'SPMA,  $71.2 \pm 7.8\%$  per l'SBMA e  $78.3 \pm 11.8\%$  per l'o-MBMA (tabella 3).

### *5.2.3. Effetto Matrice: la soppressione ionica*

Le alterazioni del segnale ESI-MS/MS degli analiti indotte dalla presenza della matrice biologica urinaria (soppressione o amplificazione ionica) possono influenzare negativamente la riproducibilità del metodo analitico, perciò abbiamo posto particolare attenzione nella stima dell'entità di questo effetto durante la procedura di validazione.

In particolare, metodi di analisi degli acidi mercapturici pubblicati precedentemente mancano dei test di valutazione dell'effetto matrice e dell'ion suppression [111,122, 125-129] e per tale motivo, il suggerimento per simili metodi, sarebbe la rivalidazione analitica completa effettuando una stima dell'entità dell'effetto matrice. Proprio a causa della complessità della matrice biologica analizzata e per l'elevata intervariabilità tra soggetti della stessa matrice abbiamo aggiunto la valutazione dell'effetto matrice per differenti campioni di urine singole come parte integrante della procedura di validazione del metodo analitico.

L'esperimento è stato effettuato comparando il segnale dei tre acidi mercapturici ottenuto dall'analisi di sei campioni di urina differenti sottoposti a estrazione ed evaporazione del solvente a cui, successivamente, è stato aggiunto un volume di standard chimici in Fase Mobile tale da ottenere una concentrazione pari a  $12.5 \mu\text{g/l}$  (ppb) direttamente confrontabile con il segnale ottenuto dall'analisi dello standard chimico in Fase Mobile (quindi senza la presenza del residuo urinario prodotto dalla procedura preanalitica cui è sottoposto normalmente il campione biologico) alla medesima concentrazione.

L'esperimento ha dimostrato l'elevato effetto di soppressione ionica tale da ridurre il segnale analitico dei tre acidi mercapturici ad un valore medio pari al 25.3% del segnale analitico dello standard chimico definito come il 100% del segnale ottenibile.

Questi risultati sono confermati dall'esperimento di infusione post-colonna precedentemente descritto (vedi parte sperimentale) che indicano l'uscita degli acidi mercapturici dalla colonna

capillare in una regione caratterizzata da elevato ion suppression (figura 4).

Allo scopo di ridurre la soppressione ionica spostando il tempo di ritenzione verso tempi alti, sono stati testati differenti gradienti. Il risultato di tali variazioni ha comportato però lo spostamento verso tempi di ritenzioni più alti sia della regione ad alta ion suppression che degli analiti studiati. Questo è causato dalla coeluizione dei composti contenuti ad elevata concentrazione nelle urine umane che competono nel processo di ionizzazione spontaneo o indotto dalla sorgente ionica ESI. Tale processo di ionizzazione è il principio alla base della tecnica di rivelazione analitica in spettrometria di massa ( massa rivelata  $m/z$  = massa dello ione / carica ionica).

Per ridurre l'effetto matrice ulteriori tentativi sono stati effettuati valutando differenti cartucce per SPE (Isolute® C18 ed Isolute® Env+) e variando inoltre, per lo stesso supporto solido, i protocolli di estrazioni applicati ai campioni urinari, nonostante ciò, questi test non hanno permesso di ridurre l'effetto matrice. In letteratura pochi metodi analitici per la quantificazione degli acidi mercapturici, in particolare per SPMA e l'SBMA, mostrano l'applicazione dei medesimi test di valutazione. Inoltre, pur utilizzando differenti procedure di cleanup del campione biologico, i nostri dati si rivelano coerenti rispetto ad altre pubblicazioni precedenti [120].

La riproducibilità dell'intera procedura è stata valutata analizzando 9 curve di calibrazione costruite con 3 differenti campioni di urina. A dispetto della alta soppressione ionica dovuta alla matrice urinaria, i coefficienti angolari delle curve di calibrazione ottenute hanno mostrato una elevata precisione (R.D.S < 8%), tabella 4, così come nelle differenti urine si è osservato un simile effetto matrice per gli analiti e standard interni.

Questo carattere, assieme ad una soddisfacente precisione ed accuratezza inter-day dei livelli di concentrazione pari al LOQ, sono indicativi dell'assenza di un errore di quantificazione generato dall'effetto matrice. La soluzione più efficace per compensare l'effetto matrice è rappresentata dall'utilizzo del metodo dello standard interno marcato con un isotopo stabile (acidi mercapturici deuterati), applicato ed adottato precisamente per due dei tre acidi mercapturici. La correzione dei valori di o-MBMA con lo standard interno SBMA<sub>d7</sub> non ha generato alcun problema di accuratezza della misura.

#### *5.2.4. Specificità*

Il metodo ha mostrato buona specificità risultando idoneo rispetto ai criteri dettati dalle linee

guida dell'FDA. Non sono stati rivelati picchi interferenti nei campioni di urina, a concentrazione di analiti pari a zero (blank o bianchi), per le transizioni di massa/massa scelte per gli acidi mercapturici relativi a benzene e orto-xilene (SPMA ed o-MBMA) e gli analoghi deuterati utilizzati come Internal Standard. Tutti i lotti di urina testati con altezza del picco di SBMA superiore a tre volte il rapporto segnale al livello zero di SBMA / rumore di fondo strumentale (S/N "signal/noise" definito sensibilità strumentale), che identifica convenzionalmente il LOD del metodo analitico, corrispondono a campioni urinari con un livello basale di SBMA. L'accuratezza dei campioni individuali di urina a concentrazione degli analiti pari al LOQ risulta rientrare nell'intervallo di validità indicato dalle linee guida seguite ovvero tra 80-120% del valore di concentrazione nominale (tabella 5). Solo in una urina analizzata l'SBMA mostra un BIAS leggermente superiore al consentito, probabilmente a causa di una insufficiente sensibilità strumentale su quel specifico valore basale urinario inficiandone, conseguentemente, il calcolo dell'accuratezza sulla misura analitica effettuata.

#### *5.2.5. Stabilità*

Tutti gli esperimenti condotti per lo studio della stabilità degli analiti soddisfano i criteri richiesti per questo parametro dall'FDA.

Le soluzioni standard degli analiti e relativi standard interni hanno mostrato deviazioni dal valore iniziale inferiori al 6%.

I livelli QC in urina nei vari esperimenti effettuati hanno mostrato delle differenze leggermente più marcate rispetto ai valori di concentrazione iniziale (<14%) ma giustificate, a parer nostro, dalla loro presenza in una matrice complessa sottoposta a naturale alterazione (tabella 6).

#### *5.3. Applicazione del metodo: determinazione degli acidi mercapturici in un gruppo di vigili urbani della polizia municipale di Bologna*

Il metodo analitico così validato è stato applicato per la misura dei livelli urinari di SPMA, SBMA ed o-MBMA per 396 soggetti (60% uomini, 40% donne; 26% fumatori, 74% non fumatori) occupati nel controllo del traffico urbano di Bologna. I Campioni di urina "spot" sono stati raccolti alla fine di un turno lavorativo di 8 ore durante il periodo tra Aprile e Novembre 2006. Poiché la concentrazione di questi metaboliti, escreti in urina per diffusione,

è dipendente della quantità totale di urina che il soggetto espelle, è necessaria una correzione del valore dell'analita rispetto alla concentrazione della creatinina urinaria. La creatinina urinaria è stata determinata mediante il metodo Jaffè.

Come mostrato in tabella 7, tutti i campioni mostrano una concentrazione misurabile di SBMA, mentre l'SPMA e o-MBMA risultano quantificabili solo rispettivamente nel 27% e 23% delle urine analizzate.

L'età delle popolazioni maschili e femminili non sono significativamente differenti e l'età media mostrata è di circa 40 anni. Nessuna sostanziale differenza statistica è stata trovata tra soggetti maschi e soggetti donna per l'escrezione urinaria dei metaboliti screenati (tutti con  $p > 0.05$ ).

Per l'indicatore biologico SPMA tra soggetti fumatori e non fumatori sono state trovate significative differenze nella concentrazione urinaria dell'indicatore ( $p < 0.05$ ), in particolare i fumatori hanno mostrato un valore di SPMA medio pari a  $1.90 \pm 1.66 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ , i soggetti non-fumatori invece pari a  $0.87 \pm 0.80 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$  (tabella 8).

Tale dato, che conferma l'associazione tra abitudine al fumo e un maggior livello di SPMA trova la sua conferma dall'analisi statistica ulteriore effettuata suddividendo la popolazione dei fumatori in tre sottogruppi caratterizzati da un maggior consumo di sigarette quotidiano (tabella 9). Questa suddivisione in categorie ha identificato un gruppo con consumo medio di sigarette inferiore a 15 quotidiano, uno con consumo medio maggiore di 15 e l'ultimo caratterizzato dal consumo quotidiano medio superiore a 15 aggravato da un consumo di almeno 10 nel turno di lavoro realmente indagato. I sottogruppi così formati, pur diminuendo di numero, hanno mostrato un aumento costante del livello di SPMA urinario corrispondente ad un maggior consumo di sigarette, lasciando al terzo gruppo di fumatori identificato il livello più alto ( $2.48 \pm 1.15 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ ). Le rappresentazioni grafiche dei valori di SPMA in relazione al fumo dicotomico e al fumo categorico sono descritte dagli istogrammi 1a e 1b.

Nessun campione analizzato supera il valore BEI (biological equivalent index) proposto per l'SPMA ( $25 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ ) dall'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) [130].

Oltretutto, è interessante notare come l'80% dei campioni che risultano essere quantificabili per l'SPMA risultano provenire da soggetti fumatori. Questo, tuttavia, non sorprende poiché è noto da tempo che il fumo di tabacco rappresenta un'importante fonte di benzene (anche per soggetti passivi esposti ad "environmental tobacco smoke"). Molti altri studi riportano tale distinzione similmente significativa per soggetti fumatori e non fumatori [120, 131].

Ancora, da altri studi si evince che lo smog urbano rappresenta una bassa fonte di esposizione a benzene e che, invece, sia proprio il fumo di sigaretta a rappresentare la maggior fonte di esposizione per i vigili urbani o altre classi di lavoratori esposti professionalmente a traffico veicolare [131,132].

I nostri dati sono quindi in linea a quanto precedentemente pubblicato. Inoltre, i livelli di SPMA riportati dal nostro studio sono molto simili a quanto ottenuto da Bono et al. [131] in un gruppo di 206 vigili urbani.

L'SBMA, seguendo le stesse associazioni ricercate nell'analisi effettuata sul metabolita del benzene e soprattutto alla luce delle indicazioni ricavate dalla applicazione analitica di due metodi di screening simili al nostro studio, ha mostrato un comportamento contrario rispetto al fumo di quanto mostrato dall'SPMA [133, 134].

Questo indicatore sembra evidenziare (tabella 8) valori significativamente differenti tra le popolazioni di fumatori e non fumatori, i fumatori manifestano un valore di SBMA inferiore ( $9.9 \pm 10.7 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ ) di quanto mostrato dai non fumatori ( $15.7 \pm 31.4 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ ). L'applicazione dei test t di student e test di Wilcoxon conferma l'associazione mostrata tra le categorie mostrando per entrambi un  $p < 0.05$ . Anche il fumo categorico (tabella 9) conferma una diminuzione dell'indicatore SBMA all'aumentare del consumo di sigarette (test di Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ).

Le rappresentazioni grafiche dei valori di SBMA in relazione al fumo dicotomico e al fumo categorico sono descritte dagli istogrammi 2a e 2b.

Per l'o-MBMA non è risultata statisticamente significativa la differenza dei valori dell'indicatore rispetto all'abitudine al fumo, mentre lo è (solo rispetto al t-test, test di Wilcoxon risultato negativo anche se con  $p = 0.078$ ) senza alcun dato di conforto in letteratura, l'associazione dei valori dell'indicatore indagato rispetto al sesso  $p < 0.05$  mostrando nei soggetti maschi un valore maggiore dell'indicatore (maschi =  $3.7 \pm 7.4 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ , femmine =  $1.6 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$ ), perciò ci limiteremo a riportare i risultati ottenuti da questa analisi statistica incoraggiati dall'elevato numero di campioni biologici analizzati senza commentarne il significato biologico.

*Basandoci sui risultati derivanti dell'elaborazione statistica è risultata evidente la necessità di allestire un metodo analitico che potesse essere capace, vista la bassa percentuale di soggetti positivi al monitoraggio biologico per l'SPMA (solo il 27% dei soggetti hanno mostrato livelli quantificabili), di esprimere una maggiore sensibilità analitica, fondamentale per evidenziare, nella popolazione individuata, un maggiore numero di soggetti positivi al test biologico.*

*Pur nella convinzione che le concentrazioni ambientali dei tossici indagati siano molto basse, sarà bene confermare tali trend ambientali con un metodo di screening biologico capace di discriminare ancor più basse concentrazioni urinarie di SPMA. A tal scopo nella seguente sezione cercheremo di mettere in evidenza quali eventuali modifiche al metodo analitico fin qui presentato sia possibile proporre in futuro per ottenere miglioramenti nel LOD. Tali risultati dovranno essere confermati da un programma di convalida analitica centrata sulla valutazione della riproducibilità della risposta analitica a lungo termine e sull'applicazione del metodo su urine differenti.*

#### *5.4. Variazioni al metodo di analisi in HPLC-ESI-MS/MS originale*

##### *5.4.1. Spettrometria di massa*

Sono state condotti differenti esperimenti di FIA su differenti composizioni di standard chimici mix5 sempre alla medesima concentrazione di 0.5 mg/l in:

a) una soluzione 1:1 v/v di una soluzione acquosa di Acido formico 0.07% e metanolo (Fase mobile classica), b) metanolo puro, c) una soluzione 1:1 v/v di acqua deionizzata MilliQ e metanolo, d) una soluzione 1:1 v/v di una soluzione acquosa di Acido formico 0.01% e metanolo (Fase mobile I),

a) dall'infusione della soluzione mix5 0.5 mg/l in Fase mobile classica, abbiamo osservato un livello di intensità del segnale delle coppie di reazione in MRM, prendendo come riferimento la coppia di reazione specifica dell'SPMA (238.0/109.0), pari a  $1.1 \times 10^{-5}$ ,

b) dall'infusione della soluzione mix5 0.5 mg/l in metanolo puro, abbiamo osservato un livello di intensità del segnale delle coppia di reazione in MRM almeno 8 volte (da 8 a 10) superiore a quello osservato utilizzando lo standard mix5 0.5 mg/l in fase mobile classica,

c) dall'infusione della soluzione mix5 0.5 mg/l in una soluzione 1:1 v/v di acqua deionizzata MilliQ e metanolo, abbiamo osservato un livello di intensità del segnale delle coppie di reazione in MRM almeno 2 volte superiore a quello osservato utilizzando lo standard mix5 0.5 mg/l in fase mobile classica,

d) dall'infusione della soluzione mix5 0.5 mg/l in Fase mobile I, abbiamo osservato un livello di intensità del segnale delle coppie di reazione in MRM almeno 3 (da 3 a 4) volte superiore a quello osservato utilizzando lo standard mix5 0.5 mg/l in fase mobile classica.

Possiamo concludere pertanto che la diminuzione della concentrazione salina derivante dalla componente acido formico nella Soluzione A (soluzione acquosa ac.formico 0.07% a 0.01%), utilizzata come fase mobile nel gradiente cromatografico, assieme al contemporaneo aumento del pH (da 7.6 del metanolo a 3.4 della fase mobile classica) aumentano la ionizzazione degli analiti consentendo, a parità di concentrazione dello standard chimico, di ottenere un aumento di risposta strumentale per le medesime transizioni di massa indagate.

La scelta della soluzione da utilizzare per l'applicazione cromatografica (composizione binaria del gradiente) è ricaduta sulla fase mobile I, che può mostrare, in aggiunta al segnale MS/MS obiettivamente più elevato, un pH più stabile ritenuto arbitrariamente più affidabile di quello mostrato dall'acqua deionizzata influenzabile dai protocolli di manutenzione applicati all'apparecchio MilliQ e dall'efficienza di funzionamento dello stesso.

La conferma della validità della scelta effettuata è derivata anche dall'osservazione del medesimo comportamento nell'esperimento in *post-infusion* (determinazione delle regioni cromatografiche che subiscono il maggior effetto matrice). Indipendentemente dell'entità dell'effetto matrice possiamo di certo affermare che i livelli del segnale in infusione dei tre analiti a tempo 0 minuti, quindi in partenza, rivelano segnali sempre migliori e mantengono parallelamente questo trend per tutto il gradiente cromatografico di nuova composizione.

#### 5.4.2. Condizioni della separazione cromatografia

*Una nota particolare si deve prestare alle conseguenze di un intervento tecnico-manutentivo sul sistema HPLC utilizzato per le sessioni analitiche condotte di seguito, la ripetizione dell'applicazione del metodo originariamente validato determina tempi di ritenzione degli analiti differenti da quelli precedentemente descritti. Abbiamo pertanto aperto una indagine*

*volta alla identificazione del problema che in passato ha determinato tempi di ritenzione “alti”.*

*Ad oggi le determinazioni effettuate sia col metodo originale che con il metodo variato attestano la riproducibilità dei valori di intensità e dei tempi di ritenzione di tutti gli analiti confermando la validità delle conclusioni scientifiche descritte nei seguenti paragrafi. Tutte le numerose prove effettuate non sono state capaci di riprodurre tempi di ritenzione alti.*

*In particolare i livelli di calibrazione in urina analizzati con il metodo analitico originale ad oggi mostrano tempi di ritenzione di circa 7 minuti, nelle sessioni analitiche precedenti comprese quelle di validazione i tempi di ritenzione si attestano a circa 10 minuti. Analizzando gli stessi con il metodo variato essi mostrano tempi di ritenzione di circa 8.5 minuti.*

Osservando i risultati ottenuti con i soli esperimenti condotti in FIA (flow injection analysis), abbiamo utilizzato i medesimi solventi (Solvente A: soluzione acquosa di acido formico 0.01% v/v e Solvente B: metanolo puro componenti il medesimo gradiente binario utilizzato per il metodo originale) per la separazione cromatografica degli analiti.

Dall’analisi dello standard chimico mix5 12.5 µg/l in fase mobile I (soluzione 1:1 v/v di una soluzione acquosa di acido formico 0.01% v/v e metanolo puro), sottoposto a separazione cromatografica, confermiamo l’aumento del segnale MS-MS (di ogni analita) rispetto al corrispondente valore ottenuto analisi dello stesso standard mix5 12.5 µg/l in fase mobile classica analizzato con le fasi mobili originali.

Ulteriormente dall’analisi di uno standard chimico mix5 12.5 µg/l in metanolo puro, abbiamo evidenziato un mantenimento dell’intensità del segnale MS-MS, conseguentemente le ulteriori valutazioni si sono basate sull’utilizzo dello standard in metanolo, anche per uniformarlo alla condizione reale in cui il campione biologico urinario si trova dissolto in seguito al trattamento SPE nuovo (eluizione dei campioni biologici con un’aliquota di 250 µl di metanolo).

Abbiamo valutato come **Solvente A** anche l’acqua deionizzata MilliQ che ha confermato i valori ottenuti con il FIA e concentrazioni di acido formico pari a 0.035% ( valuta quest’ultima solo in cromatografia) senza notare alcuna migioria all’intensità di segnale.

Sessioni analitiche con mantenimento della colonna capillare a 25 e 30°C hanno escluso il miglioramento delle performances analitiche rispetto alla canonica temperatura di 20°C utilizzata.

In figura 6 e 7 (a-b) si mostrano i guadagni ottenuti dai segnali di MS-MS dell’analita SPMA

ottenuti analizzando gli standard chimici 12.5 µg/l in fase mobile (originale) e in metanolo puro (metodo nuovo) con le condizioni cromatografiche originarie e modificate; medesimi aumenti di sensibilità sono stati evidenziati per gli altri due acidi mercapturici.

Inoltre, si mostrano due sovrapposizioni dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi di una intera curva di calibrazione (0; 0,8; 2; 10; 25; 50 µg/l) in matrice biologica (pre-trattata con la metodica originale) nelle condizioni cromatografiche originalmente proposte e in quelle modificate. Il risultato parziale evidenziato dà merito al solo cambiamento del gradiente binario (figura 8a-b).

Abbiamo potuto osservare anche un'aumento del tempo di ritenzione degli analiti ( $t_{rit}$  circa 8.5 min) nel caso della nuova composizione del gradiente binario rispetto a quelli ottenuti dall'analisi originale ( $t_{rit}$  circa 7 min).

#### *5.4.3. Procedure di estrazione del campione biologico*

La procedura di estrazione modificata, nella diluizione del campione biologico, nella riduzione del volume di eluizione degli analiti dal supporto SPE ed eliminando completamente la procedura di evaporazione e ridissoluzione del residuo biologico, pur comportando una diminuzione del fattore di concentrazione degli analiti nel campione biologico analizzato (concentrazione da fattore 10 ad un fattore 4) non ha comportato una perdita della sensibilità dell'intera metodica analitica ma anzi un aumento. Tale aumento è confortato da effettivi guadagni nei rapporti S/N tra segnali basali degli analiti e rumore di fondo strumentale, dal recupero analitico paragonabile a quello del metodo originale ed in aggiunta dalla diminuzione dell'influenza dell'effetto matrice dimostrato dall'intera procedura analitica. Non meno importante, alla luce degli ottimi risultati che nello specifico andremo ad analizzare più avanti, è la diminuzione del tempo di preparazione del campione biologico all'analisi in HPLC-MS-MS infatti questo processo, rispetto al metodo originalmente proposto (nello specifico eliminando la fase evaporativa), consente un importante guadagno del tempo di analisi anche per un limitato numero di campioni biologici.

#### 5.4.4. Validazione del metodo analitico

##### 5.4.4.1. Linearità e determinazione del LOD e LOQ

La linearità delle curve di calibrazione è stata determinata per un range di concentrazioni (8 punti di calibrazione compreso il punto zero) pari a 0.2–50.0 µg/l per l'SPMA, l'SBMA e l'o-MBMA per un'unica urina (figura 8). Le equazioni delle curve di calibrazione ( $y = mx + b$ ) ed altri parametri caratterizzanti la metodica analitica sono mostrati in tabella 10.

Gli standard interni deuterati hanno acquisito un ruolo fondamentale nella correzione delle fluttuazioni strumentali e degli effetti matrice presenti; il simile comportamento cromatografico osservato per gli analiti rispetto al metodo originale ha reso possibile tale utilizzo (spostamento parallelo dei tre analiti e dei due internal standard verso tempi più alti).

Per ogni analita, la curva di calibrazione ha mostrato un coefficiente di correlazione lineare  $r^2$  vicino all'1.0 ( $0.999 \leq r^2 \leq 1.000$ ). La concentrazione di ogni livello di calibrazione, compreso il LOQ, è stata retrocalcolata dalle curve di calibrazione l'accuratezza (Bias%) è compresa tra -3,6 e 10,6% per l'SPMA, tra -13,8 e 2,9% per l'SBMA, e tra -13,1 and 1,0% per o-MBMA. La precisione definita come D.S.R “deviazione standard relativa” è risultata essere minore di 6,5 per l'SPMA, minore di 5,7 per l'SBMA e minore del 6,9% per l'o-MBMA, rispondendo adeguatamente ai requisiti richiesti dall'FDA. Il LOD e LOQ sono stati determinati mediante l'applicazione del medesimo metodo di calcolo proposto per il metodo originale ( $LOQ = SD_{yx/m} * 4$ ;  $LOQ = SD_{yx/m} * 2$ ).

L'indisponibilità di urine completamente prive di SBMA e o-MBMA anche in questo caso ha condizionato la determinazione del LOQ per i due analiti. La retta di calibrazione considerata era quella risultante dalla sottrazione ad ogni punto di calibrazione del valore basale mostrato dall'analita (vedi paragrafo 5.2.1. *Linearità, LOD e LOQ*).

Il calcolo del LOD e LOQ ha evidenziato le ottime potenzialità del metodo presentando valori molto bassi, tali performance, da convalidare in termini di riproducibilità inter-day e soprattutto inter-individuali, permettono anche in presenza di valori elevati di SBMA di mostrare elevate sensibilità analitiche. La conferma del miglioramento delle performance analitiche del metodo, è dimostrato dell'aumento del rapporto del segnale/rumore e dalla capacità di rivelare concentrazioni di SPMA minori (privo di basale) come peraltro evidenziato dall'utilizzo nella curva di calibrazione di un punto a concentrazione pari a 0.2 µg/l con precisioni ed accuratezza che rispondono ai requisiti dell'FDA (DSR e BIAS  $\pm 20\%$ ).

#### 5.4.4.2. Precisione e accuratezza

In Tabella 11 si mostrano, per i tre acidi mercapturici in studio, la precisione e l'accuratezza (intra-day) ottenute dall'intera procedura analitica. Per tutti e tre gli analiti l'accuratezza media (sui livelli QC 0.8, 10 e 50 $\mu$ g/l) rientra nell'intervallo compreso tra il 93.8 e il 107.7% mentre la precisione non supera il 3.6% di DSR. Questi parametri dimostrano che ogni analita rientra nei criteri di validità richiesti per i metodi bioanalitici dalla FDA, per ogni livello di concentrazione dei tre QC (Quality Control) stabiliti e definiti nella parte sperimentale.

Solo in un caso, per il livello 0.8 $\mu$ g/l del SBMA, si è evidenziato un valore di BIAS leggermente superiore (26.9%) giustificato dal notevole valore di background che l'urina analizzata possedeva per questo acido mercapturico (tabella 11).

#### 5.4.4.3. L'efficienza dell'intero processo analitico: l'efficienza di estrazione e l'effetto matrice

L'applicazione di questo procedimento per la determinazione dell'efficienza del processo analitico come somma dei contributi di estrazione degli analiti dalla fase solida e soppressione del segnale analitico è stata suggerita da un articolo di Paci et al. del 2007 [135]. L'efficienza di estrazione derivata dal rapporto delle aree derivate dai campioni urinari in cui gli standard chimici sono stati aggiunti prima e dopo l'estrazione SPE è stata: 123.8 $\pm$ 16.4% per l'SPMA, 101.1 $\pm$ 39.1% per l'SBMA e 159.8 $\pm$ 25.5% per l'o-MBMA. L'effetto matrice derivato dal rapporto delle aree derivate dai campioni urinari in cui gli standard chimici sono stati aggiunti dopo l'estrazione SPE e lo standard chimico alla medesima concentrazione dissolto in metanolo è stato: 71.2 $\pm$ 12.6% per l'SPMA, 93.8 $\pm$ 11.6% per l'SBMA e 55.0 $\pm$ 8.4% per l'o-MBMA. Il recupero totale derivato dal rapporto tra le aree ottenute dai campioni urinari in cui gli standard chimici sono stati aggiunti prima dell'estrazione SPE ed lo standard chimico alla medesima concentrazione dissolto in metanolo è stato: 86.4 $\pm$ 1.0% per l'SPMA, 82.7 $\pm$ 5.6% per l'SBMA e 80.5 $\pm$ 8.1% per l'o-MBMA (tabella 12).

## 6. CONCLUSIONI

Lo sviluppo della chimica analitica ha permesso di aumentare notevolmente la capacità di caratterizzare nell'uomo esposizioni occupazionali ed ambientali a numerose tipologie di contaminanti attraverso la loro misura, a livelli nanomolari, nei fluidi biologici.

Oggetto della presente tesi è stata l'applicazione di un programma di monitoraggio biologico per valutare l'esposizione a specifiche componenti inquinanti dell'aria, il benzene toluene e l'o-xilene, attraverso lo sviluppo di una metodica analitica in  $\mu$ HPLC-ESI-MS/MS per la determinazione simultanea di tre specifici acidi mercapturici urinari, SPMA, SBMA e o-MBMA.

Lo screening tossicologico effettuato sulle urine dei soggetti reclutati dallo studio, prelevate alla fine del turno lavorativo (8 ore), ha permesso la raccolta di un elevato numero di campioni biologici altrimenti difficilmente ottenibile. La conferma dell'elevata stabilità dei campioni biologici in freezer, il minimo trattamento degli stessi prima dell'analisi strumentale, la possibile automazione delle procedure pre-analitiche e la capacità di analizzare un numero molto elevato di campioni biologici (fino a 48 campioni/die) rendono l'utilizzo di questa tecnica ifenata perfetta per screening tossicologici su ampia scala.

Il monitoraggio biologico, così condotto, ha sfruttato le principali qualità degli acidi mercapturici: l'elevata specificità e sensibilità. Quest'ultimo carattere di sensibilità permette di distinguere adeguatamente e selettivamente livelli di esposizione agli inquinanti molto bassi. In particolare, dalla determinazione del marcatore acido S-fenilmercapturico (SPMA), relativo all'esposizione a benzene, possiamo, grazie all'esistenza di un limite BEI (Biological Exposure Index) e della correlazione tra SPMA e benzene ambientale, affermare che nessuno dei circa quattrocento campioni urinari analizzati supera questo valore limite, rendendo altresì evidente la necessità di impiego di marcatori biologici così sensibili in condizioni espositive molto basse.

I risultati acquisiti dall'analisi degli indicatori di esposizione rivelano, principalmente per SPMA, una coerenza dei dati ottenuti rispetto ai dati già pubblicati in letteratura; estremamente più variabili e difficilmente interpretabili, alla luce della complessità metabolica e ruolo tossicologico dei biomarker considerati, sono i risultati ottenuti per il toluene e o-xilene.

Abbiamo, inoltre utilizzato l'estrema sensibilità del monitoraggio biologico per evidenziare particolari condizioni espositive individuali dei soggetti inclusi nello studio, concentrando la

nostra attenzione sull'abitudine al fumo, fattore che, come dimostrato da numerose pubblicazioni scientifiche, contribuisce notevolmente all'esposizione a benzene. La conferma della bontà del dato analitico è stata rafforzata proprio dalla dimostrazione dell'esistenza di correlazioni dei valori di SPMA e SBMA rispetto all'abitudine al fumo, in linea con quanto pubblicato in letteratura, mentre nessuna associazione statisticamente significativa, rispetto ai parametri analizzati (età, sesso, fumo), è stata evidenziata per il metabolita dell'o-xilene.

L'applicazione futura di questo strumento di indagine tossicologica consentirà lo studio, attraverso la simultanea programmazione ed attivazione di un monitoraggio ambientale, delle potenziali correlazioni esistenti tra le concentrazioni ambientali dei tossici ed i relativi livelli degli indicatori biologici che, nel caso del SBMA e o-MBMA (rispettivamente relativi a toluene e o-xilene), potrebbero permettere la verifica dei requisiti di idoneità dei biomarker proposti e il suggerimento di valori limite BEI (Biological Exposure Index) ancora non individuati.

Ulteriormente, l'affiancamento di questo metodo di indagine a metodi di caratterizzazione genetica, come l'analisi marcatori di suscettibilità, potrebbero arricchire le conoscenze scientifiche fin qui acquisite, riconoscendo nella popolazione caratteri congeniti o acquisiti di maggiore protezione o suscettibilità rispetto a specifici insulti chimici.

In ultimo, a livello strettamente tecnico notevoli sono le migliorie a cui può e deve tendere la tecnica ifenata sviluppata. Ad esempio utilizzando metodi di *clean-up on-line* del campione biologico si può ridurre il *time consuming* dell'intero procedimento analitico e, come dimostrato nell'ultima sessione di sviluppo del metodo analitico, diminuendo l'effetto matrice (tipico per analisi in spettrometria di massa con interfaccia di ionizzazione analitica "soft") ed aumentando il limite di rivelazione, tali tecniche ifenate saranno in grado di monitorare, in prospettiva dei prossimi obiettivi di qualità dell'aria (1° gennaio 2010), livelli di esposizione a benzene, toluene e xilene sempre più bassi.

## 7. FIGURE

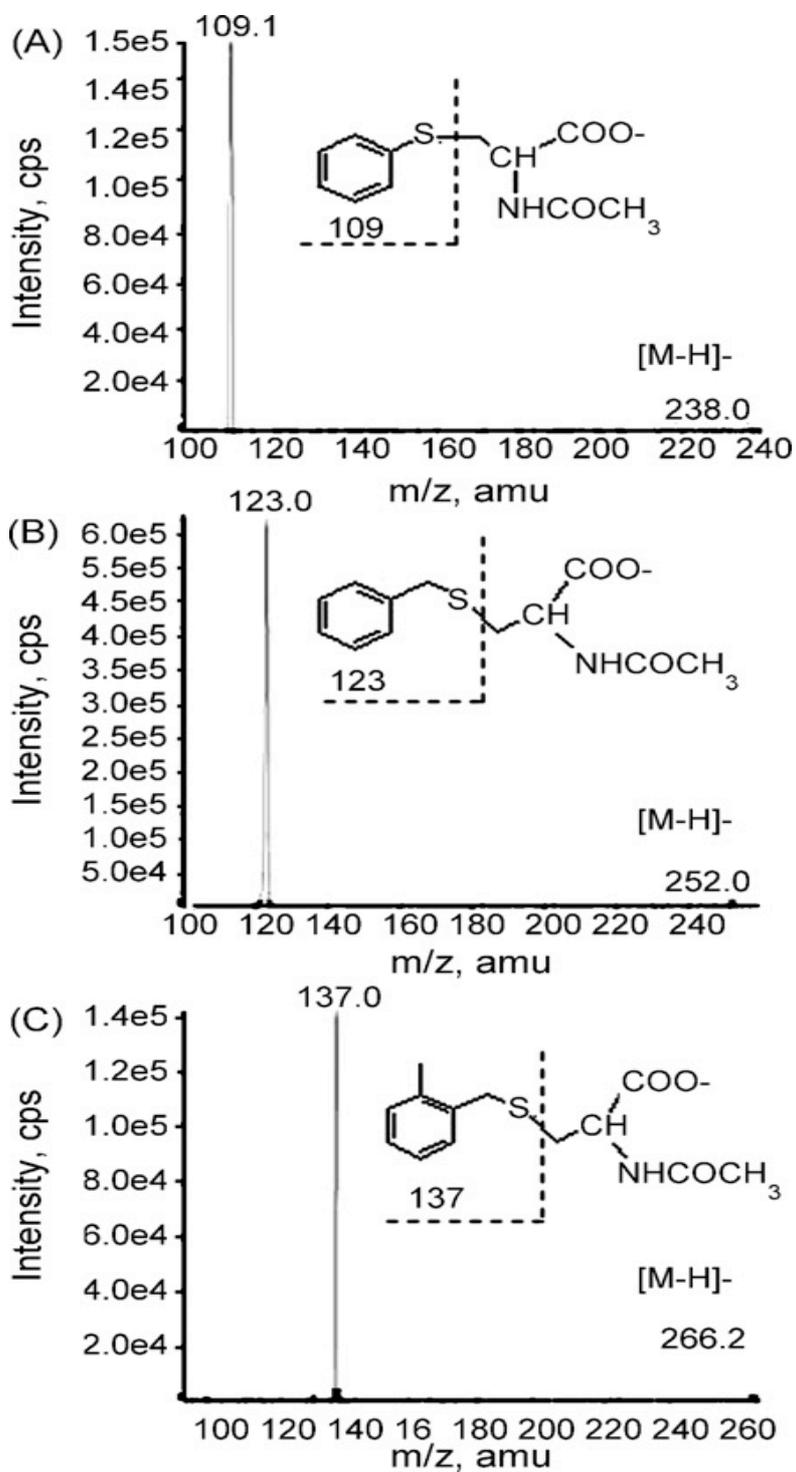


Figura 1. Spettro di massa (ESI<sup>-</sup>) dello ione prodotto e dello ione molecolare di:

- (A) SPMA (precursor ion  $m/z = 238$ );
- (B) SBMA (precursor ion  $m/z = 252$ );
- (C) o-MBMA (precursor ion  $m/z = 266$ ).

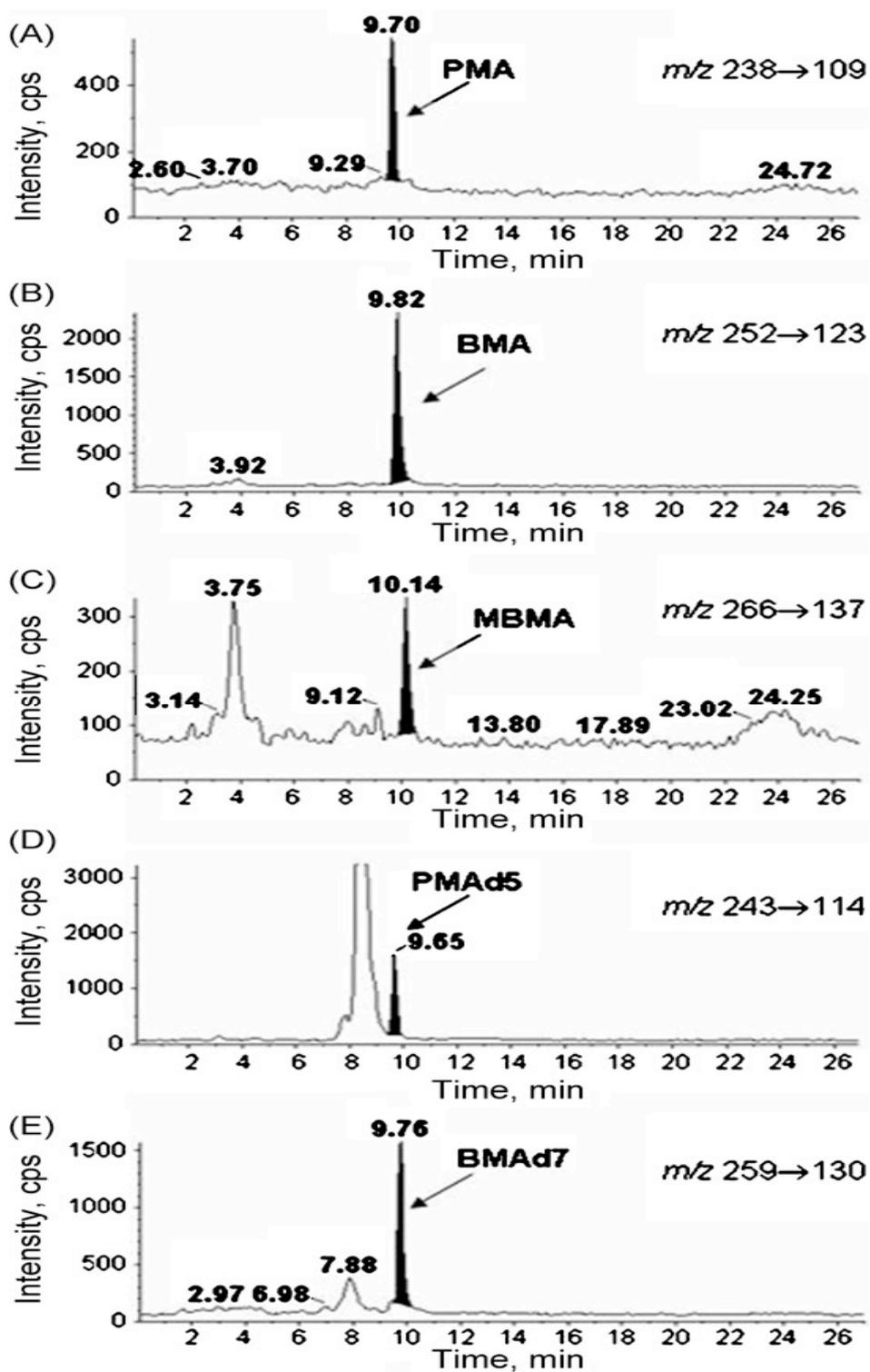


Figura 2. Cromatogrammi rappresentativi dei livelli di calibrazione in urina:

- (A) 0.6  $\mu\text{g/l}$  di SPMA,
- (B) 0.7  $\mu\text{g/l}$  di SBMA,
- (C) 0.8  $\mu\text{g/l}$  di o-MBMA,
- (D e E) 5  $\mu\text{g/l}$  di SPMA<sub>d</sub>5 e SBMA<sub>d</sub>7 (Internal Standard).

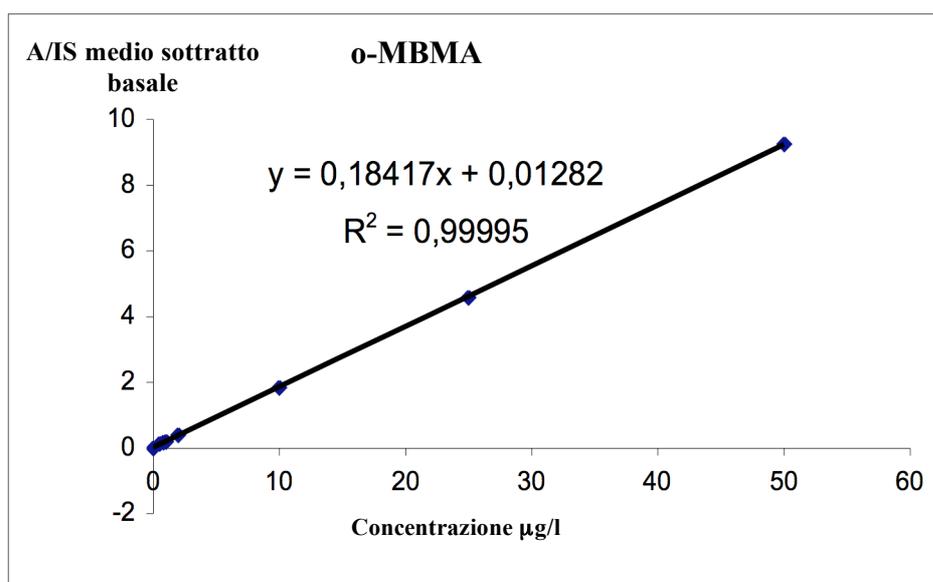
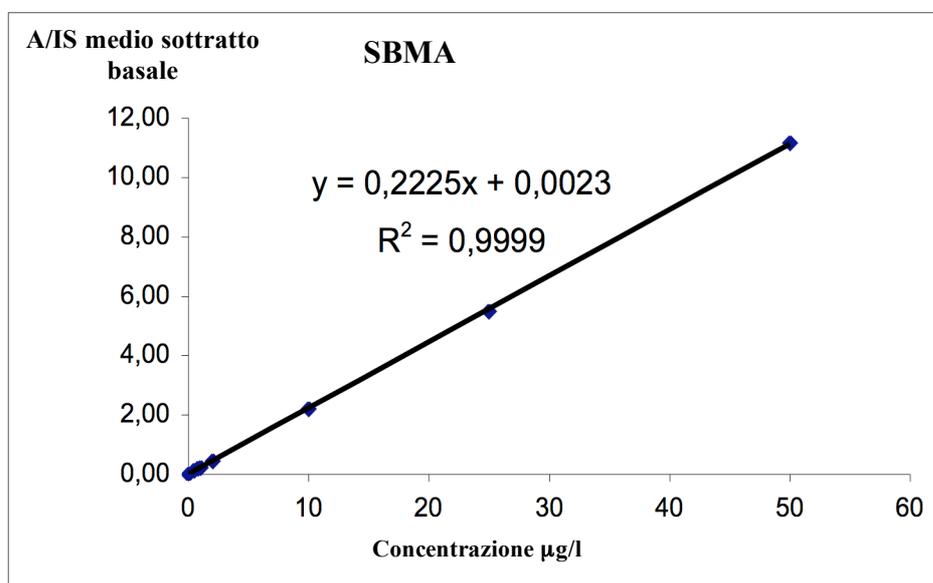
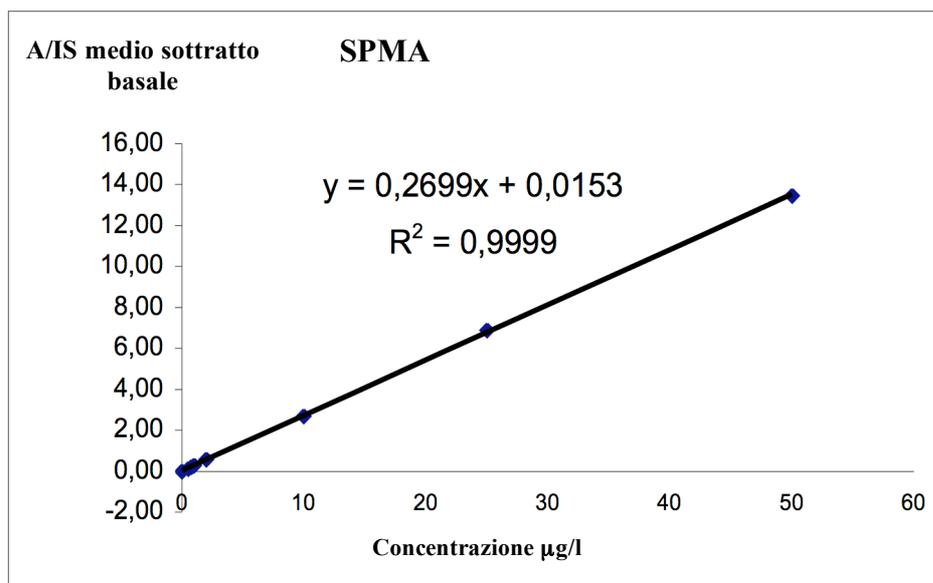


Figura 3. Esempi di curve di calibrazione in matrice biologica (range 0- 50  $\mu\text{g/l}$ ).

Intensity, cps

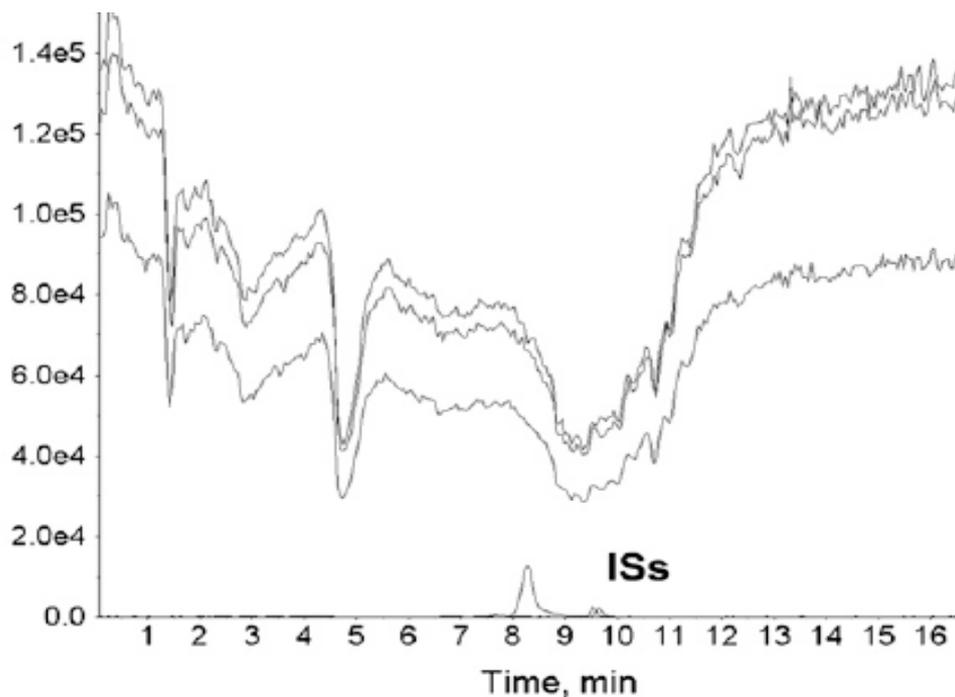


Figura 4. Valutazione dell'effetto matrice: esperimento di *postcolumn infusion*, cromatogramma di un campione biologico urinario (livello zero con IS) ed infusione di una soluzione di 500 µg/l di SPMA, SBMA e o-MBMA in fase mobile.

Intensity, cps

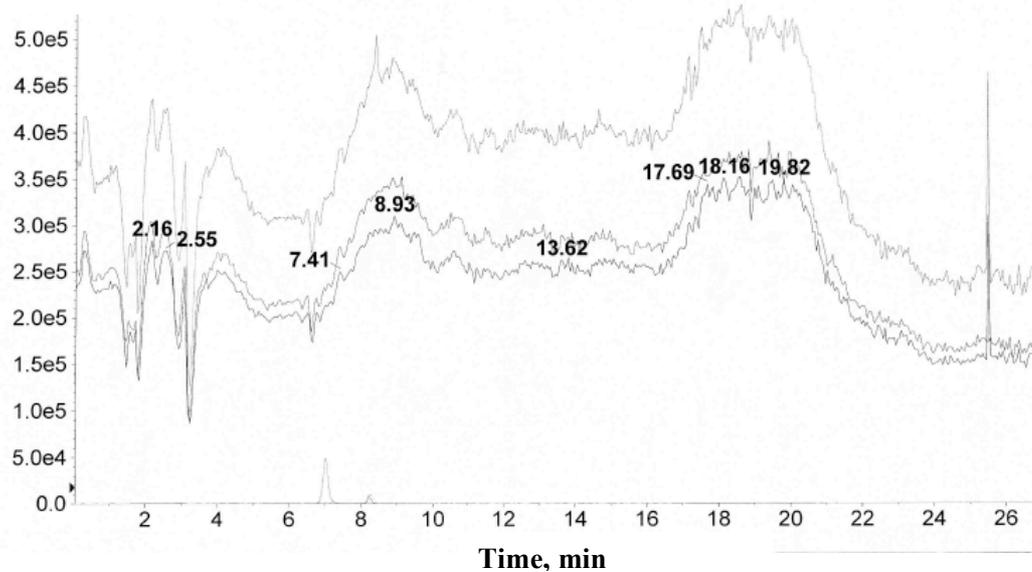
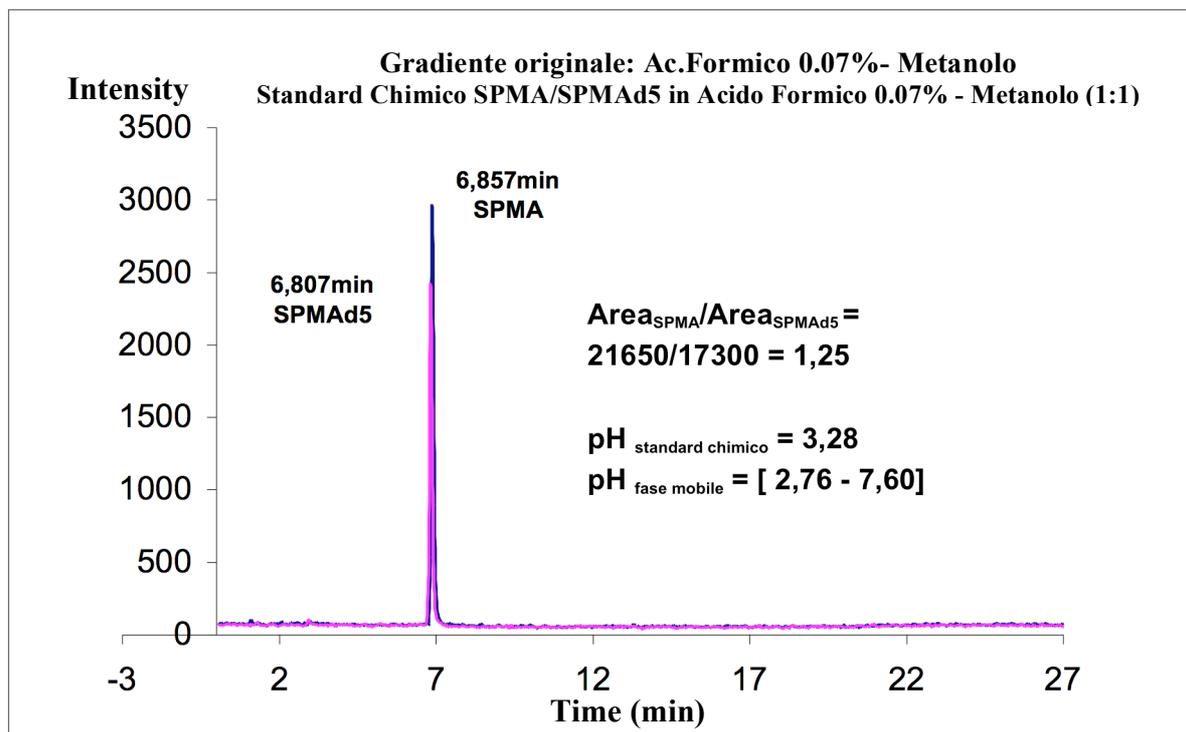


Figura 5. Valutazione dell'effetto matrice metodo modificato: esperimento di *postcolumn infusion*, cromatogramma di un campione biologico urinario (livello zero con IS) ed infusione di una soluzione di 500 µg/l di SPMA, SBMA e o-MBMA in fase mobile.

a)



b)

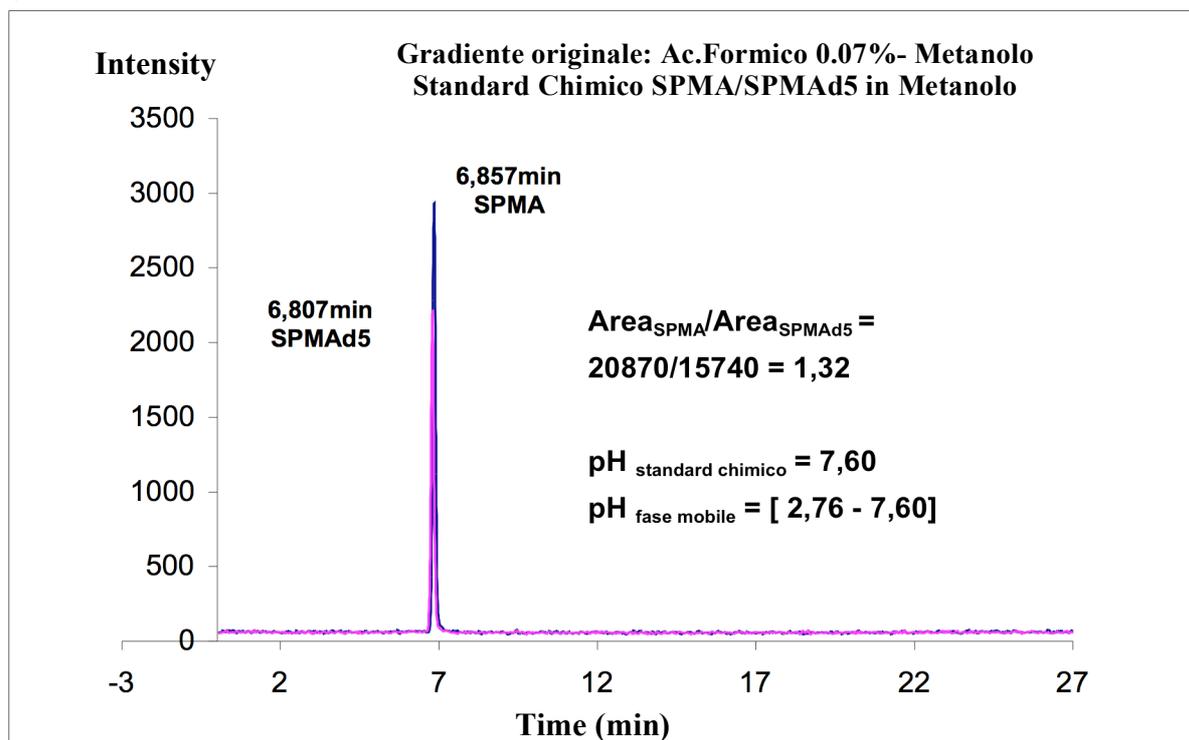
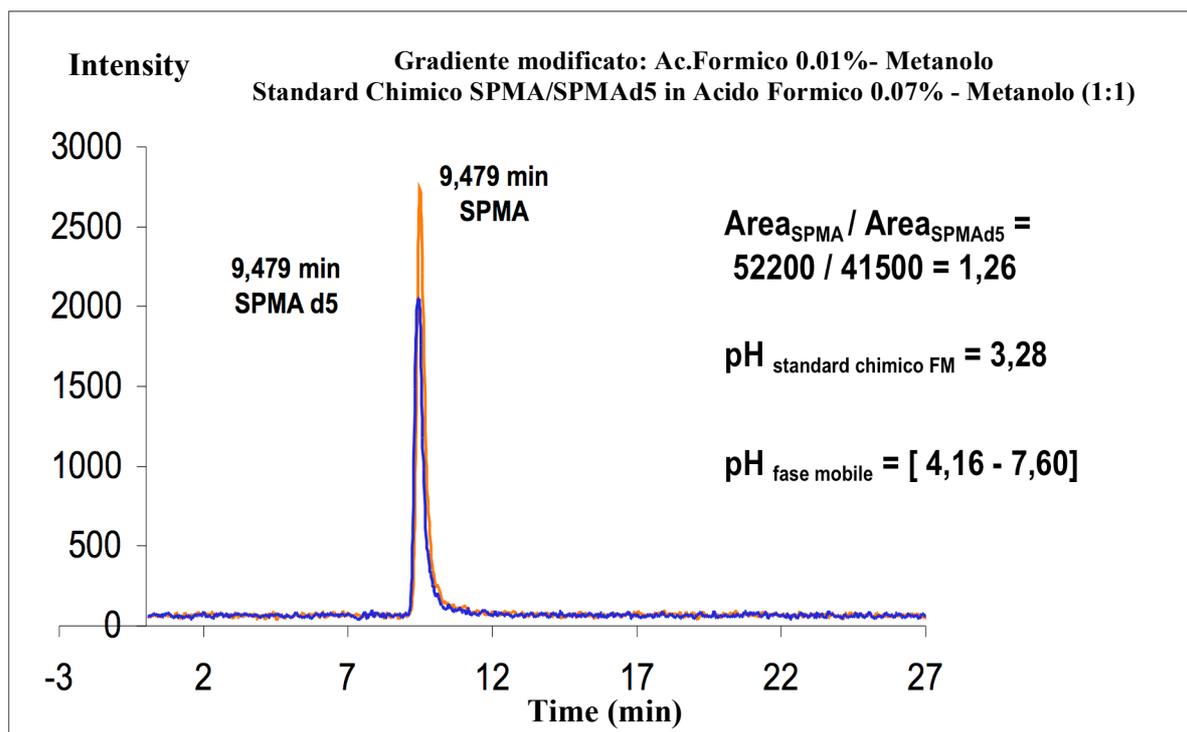


Figura 6. Confronto cromatogrammi segnale di massa SPMA/SPMAAd5 di due standard chimici 12.5 microg/l in fase mobile (a) e in metanolo (b) acquisiti con il gradiente originale.

a)



b)

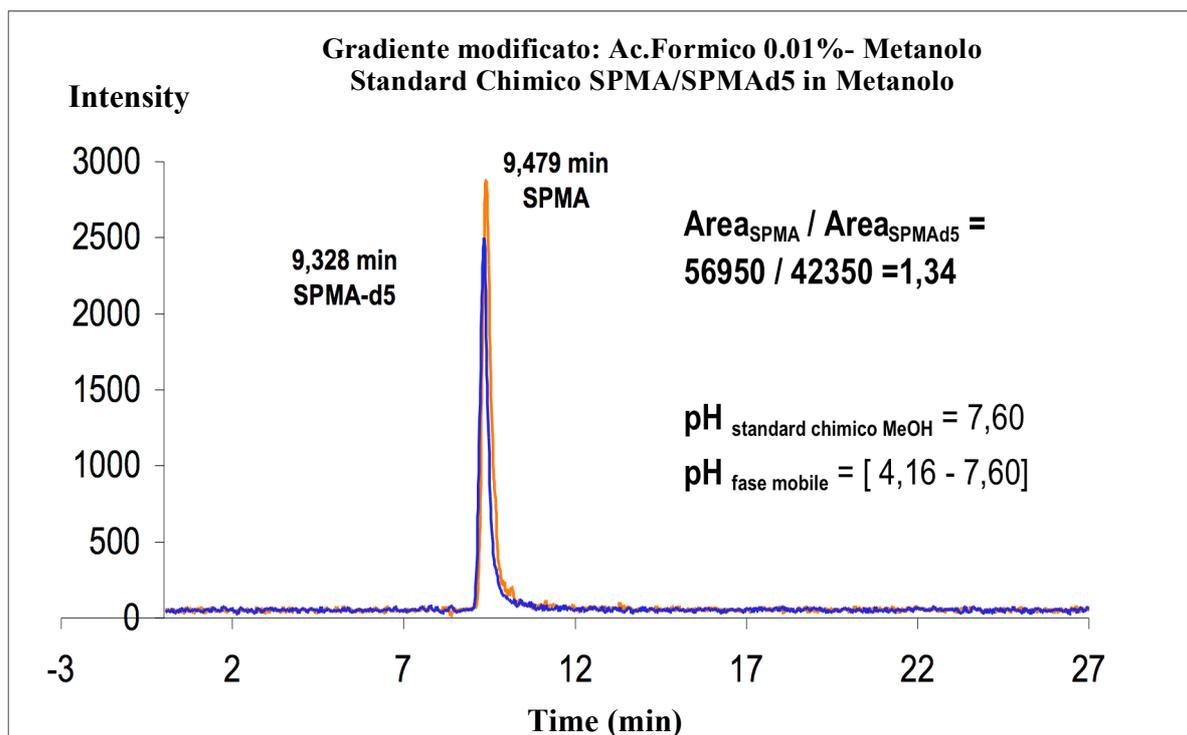
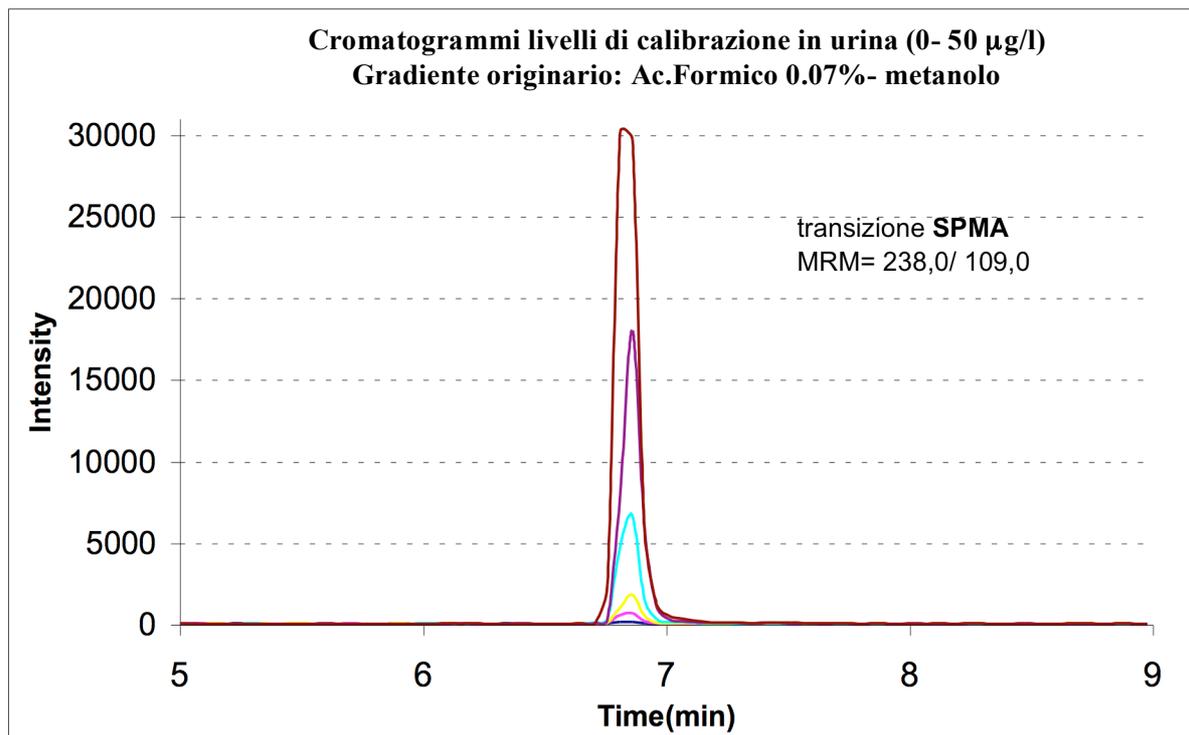


Figura 7. Confronto cromatogrammi segnale di massa SPMA/SPMA<sub>d5</sub> di due standard chimici 12.5 µg/l in fase mobile (a) e in metanolo (b) acquisiti con il gradiente modificato.

a)



b)

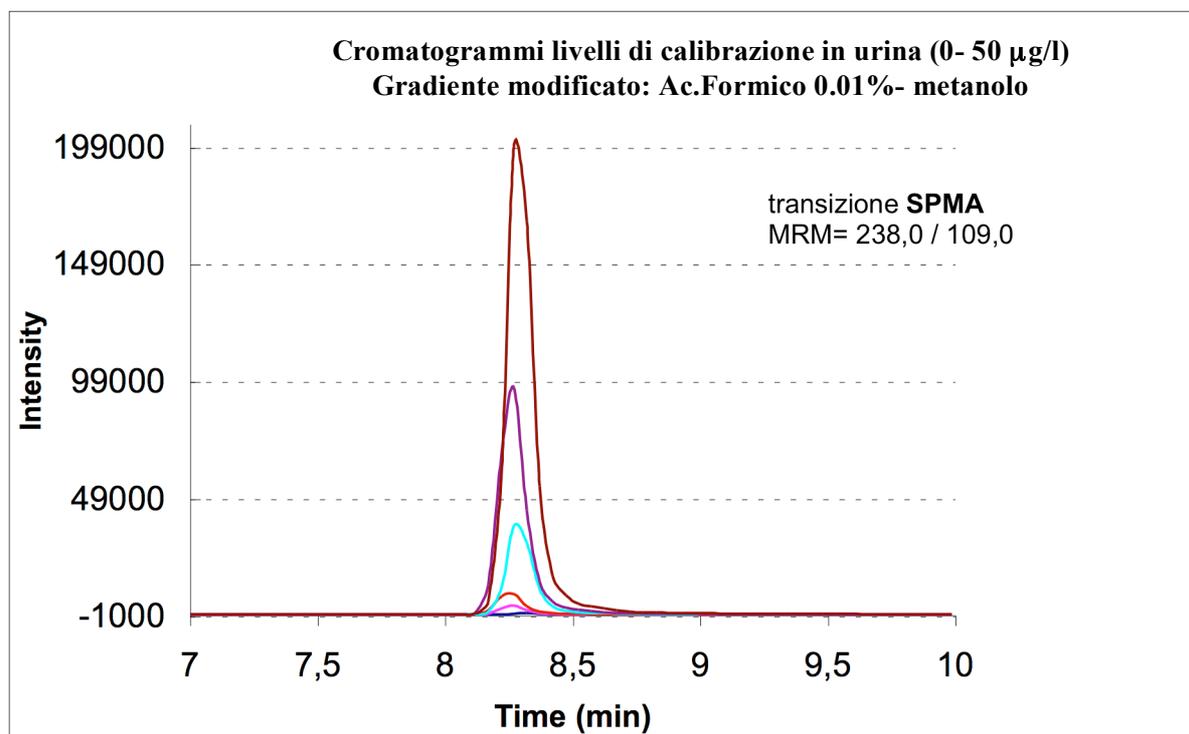


Figura 8. Confronto cromatogrammi dei segnali di massa SPMA dei livelli di calibrazione in urina (range concentrazione 0-50  $\mu\text{g/l}$ ) acquisiti con il gradiente originale (a) e con il gradiente modificato (b).

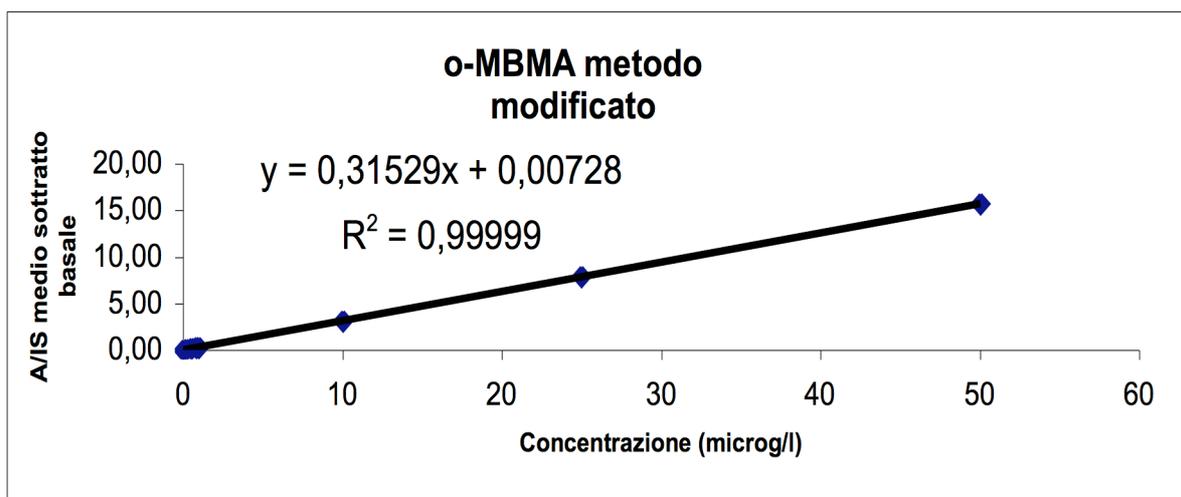
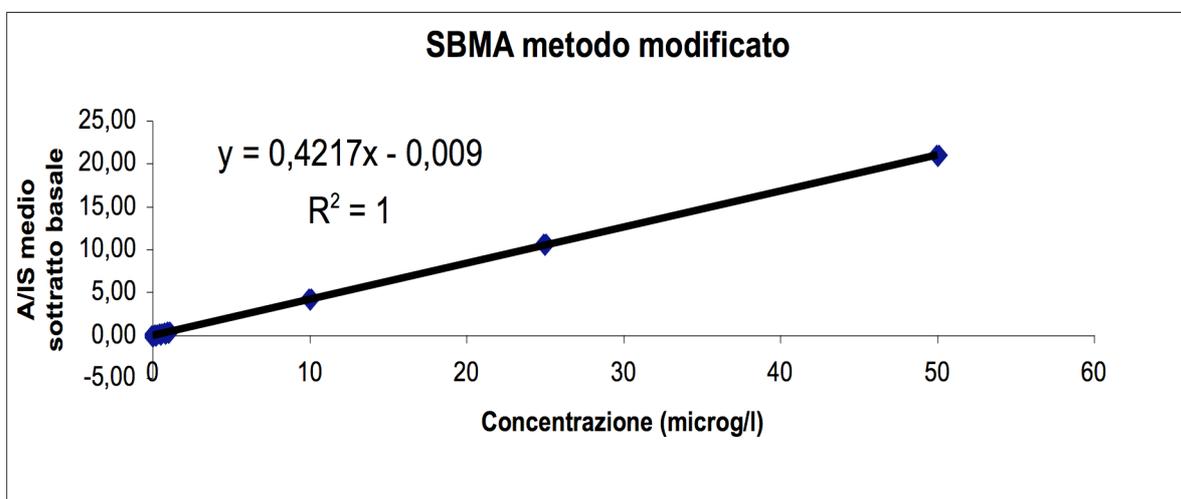
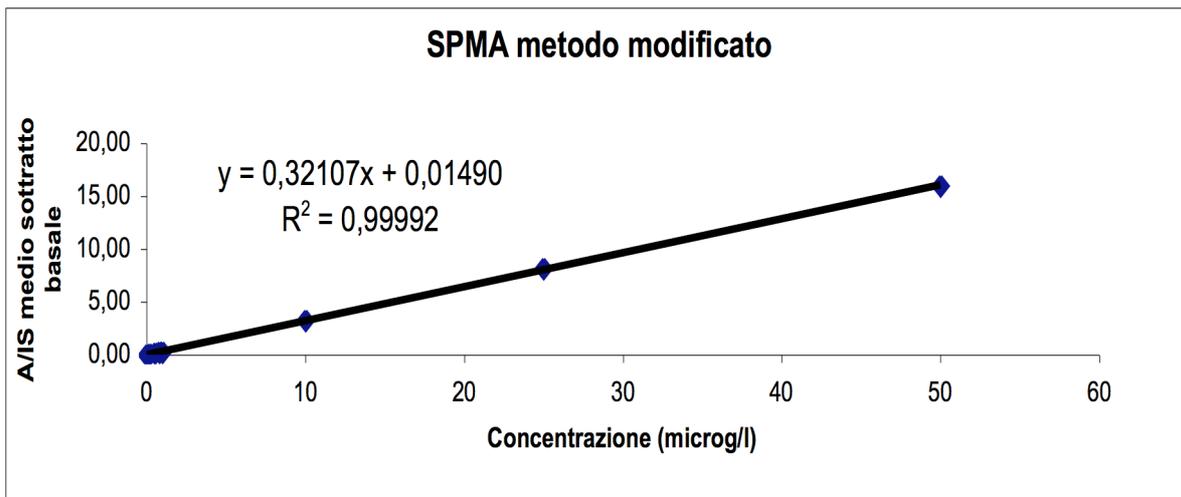


Figura 7. Esempi di curve di calibrazione in matrice biologica (0; 0.2; 0.5; 0.8; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{g/l}$ ).

## 8. TABELLE

	<b>SPMA</b>	<b>SBMA</b>	<b>O-MBMA</b>
<b>Range di calibrazione (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	0.6-50.0	0.7-50.0	0.8-50.0
<b>Coefficiente angolare (<math>\pm</math> DS)</b>	0.283 ( $\pm$ 0.016)	0.256 ( $\pm$ 0.019)	0.200 ( $\pm$ 0.015)
<b>Intercetta (<math>\pm</math> DS)</b>	0.020 ( $\pm$ 0.029)	0.027 ( $\pm$ 0.042)	0.037 ( $\pm$ 0.048)
<b>Coefficiente di regressione lineare (<math>r^2</math>)</b>	0.9999	0.9998	0.9995
<b>Limite di rivelazione (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	0.30	0.35	0.40
<b>Limite di quantificazione (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	0.60	0.70	0.80

Tabella 1. Parametri caratterizzanti le curve di calibrazione: area SPMA/ area SPMA<sub>d5</sub>, area SBMA/ area SBMA<sub>d7</sub> e area o-MBMA/ area SBMA<sub>d7</sub> Vs Concentrazione ( $\mu\text{g/l}$ ), analizzate ognuna in triplicato, in differenti giorni entro 2 settimane dalla preparazione.

Concentrazione nominale ( $\mu\text{g/l}$ )	Intra-day		Inter-day	
	DSR %	BIAS%	DSR%	BIAS%
<b>SPMA</b>				
2	9.0	-8.9	5.6	-5.7
20	3.9	0.1	6.2	2.9
50	5.0	-4.0	2.8	-2.0
<b>Media</b>	<b>6.0</b>	<b>-4.3</b>	<b>4.9</b>	<b>-1.6</b>
<b>SBMA</b>				
2	2.8	-4.4	14.0	2.0
20	4.7	8.8	6.0	8.2
50	2.2	10.8	2.7	5.8
<b>Media</b>	<b>3.2</b>	<b>5,1</b>	<b>7.6</b>	<b>5.3</b>
<b>o-MBMA</b>				
2	8.2	7.9	5.3	9.4
20	4.1	14.2	4.1	14.2
50	1.7	14.9	3.8	11.6
<b>Media</b>	<b>4.7</b>	<b>12.3</b>	<b>4.4</b>	<b>11.7</b>

Tabella 2. Precisione ed accuratezza per SPMA, SBMA e o-MBMA nei Quality Control sample. Numero di replicati = 6.

	<b>SPMA</b>	<b>SBMA</b>	<b>SBMMA</b>
	<b>%Recovery</b>	<b>%Recovery</b>	<b>%Recovery</b>
	78,9	65,7	69,9
	85,1	76,8	86,6
<b>MEDIA</b>	<b>82.0</b>	<b>71.2</b>	<b>78.3</b>
DS	4,4	7,8	11,8
<b>DSR%</b>	<b>5,4</b>	<b>11,0</b>	<b>15,1</b>

Tabella 3. Recupero da processo di estrazione in fase solida su due livelli di concentrazione (Standard chimico estratto /standard chimico non estratto).

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DS</b>	<b>DSR</b>
<b>SPMA</b>	m	0,270	0,295	0,282	0,310	0,275	0,289	0,262	0,279	0,280	0,283	0,016	<b>5,7%</b>
<b>SBMA</b>	m	0,222	0,252	0,264	0,257	0,261	0,287	0,252	0,253	0,248	0,256	0,019	<b>7,5%</b>
<b>SBMMA</b>	m	0,184	0,203	0,224	0,210	0,208	0,187	0,184	0,172	0,181	0,200	0,015	<b>7,7%</b>

Tabella 4. Precisione inter-day del coefficiente angolare delle curve di calibrazione ( $y = mx + b$ ) ottenute analizzando differenti urine.

<b>INTRA DAY</b>		
	<b>DSR</b>	<b>BIAS</b>
<b>SPMA</b>	<b>8.1%</b>	<b>&lt; 19.8% (0.4-19.8)</b>
<b>SBMA</b>	<b>5.2%</b>	<b>≤23.1% (12.6-23.1)</b>
<b>SBMMA</b>	<b>9.6%<sup>a</sup></b> <b>29.9%<sup>b</sup></b>	<b>&lt; 19.4% (0.6-19.3)<sup>a</sup></b> <b>&lt;41.1% (0,4-41.0)<sup>b</sup></b>

Tabella 5. Specificità al LOQ su 3 urine; LOQ: 0,6 µg/l per SPMA, 0,7 µg/l per SBMA e 0,8 µg/l per o-MBMA, analisi di ogni urina in doppio.

a: Calcolo rispetto a curva di calibrazione senza internal standard

b: Calcolo rispetto a curva di calibrazione con internal standard

<b>SPMA</b>	Concentrazione calcolata(µg/l)	Concentrazione calcolata(µg/l)	media	Bias%	DSR	% <b>stabilità</b>
	1 giorno	10 giorno				
QC (µg/l)						
2	1,8	1,9	1,9	-6,0	4,4	<b>106,5</b>
20	20,0	21,6	20,8	4,0	5,4	<b>107,9</b>
50	48,0	48,4	48,2	-3,5	0,6	<b>100,9</b>
<b>SBMA</b>	Concentrazione calcolata(µg/l)	Concentrazione calcolata(µg/l)	media	Bias%	RSD	% <b>stabilità</b>
	1 giorno	10 giorno				
QC (µg/l)						
2	1,9	1,8	1,8	-8,5	5,2	<b>92,9</b>
20	21,6	19,5	20,5	2,7	7,2	<b>90,4</b>
50	55,0	50,1	52,6	5,1	6,5	<b>91,2</b>
<b>SBMMA</b>	Concentrazione calcolata(µg/l)	Concentrazione calcolata(µg/l)	media	Bias%	RSD	% <b>stabilità</b>
	1 giorno	10 giorno				
QC (µg/l)						
2	2,2	1,9	2,0	2,3	10,0	<b>86,8</b>
20	23,2	20,2	21,7	8,4	9,8	<b>87,1</b>
50	58,3	50,7	54,5	9,0	9,9	<b>86,9</b>

Tabella 6. Stabilità livelli QC (2,0, 20, 50 µg/l) dopo cicli di congelamento e scongelamento.

	% di campioni quantificabili	Media concentrazione urinaria $\pm$ DS ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)
<b>SPMA</b>	27	1.65 $\pm$ 1.56
<b>SBMA</b>	100	13.91 $\pm$ 27.02
<b>o-MBMA</b>	23	3.05 $\pm$ 6.30

Tabella 7. Risultati delle analisi in HPLC–MS/MS in 396 campioni di urina di vigili urbani.

	<b>SPMA</b> ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	<b>SBMA</b> ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	<b>o-MBMA</b> ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)
<b>Non fumatori</b>	0.87 $\pm$ 0.80	15.69 $\pm$ 31.40	2.32 $\pm$ 4.27
<b>Fumatori</b>	1.90 $\pm$ 1.66	9.90 $\pm$ 10.70	3.79 $\pm$ 7.82

Tabella 8. Valori di SPMA e SBMA rispetto alla abitudine al fumo (soggetti fumatori / non fumatori) con  $p < 0.05$ . Valori o-MBMA per categoria non statisticamente significativi.

	<b>SPMA</b> ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)	<b>SBMA</b> ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)
<b>Non fumatori</b>	0.87 $\pm$ 0.80	15.69 $\pm$ 31.40
<b>Fumatori moderati (&lt;15 sig/die)</b>	1.54 $\pm$ 1.56	10.24 $\pm$ 11.99
<b>Forti fumatori</b>	2.23 $\pm$ 1.94	9.82 $\pm$ 9.65
<b>Forti fumatori (&gt;15 sig/die) + sigarette per turno (almeno 10 sig/turno)</b>	2.48 $\pm$ 1.15	8.69 $\pm$ 7.21

Tabella 9. Valori di SPMA, SBMA rispetto a categorie di fumatori ( $p < 0.05$ ).

	SPMA	SBMA	O-MBMA
<b>Range di calibrazione (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	0.2-50.0	0.2-50.0	0.2-50.0
<b>Coefficiente angolare (<math>m</math>)</b>	0.321	0.422	0.315
<b>Intercetta (<math>b</math>)</b>	0.015	-0.009	0,007
<b>Coefficiente di regressione lineare (<math>r^2</math>)</b>	0.9999	1.0000	0.9999
<b>Limite di rivelazione (<math>\mu\text{g/l}</math>) calcolato</b>	0.34	0.25	0.10
<b>Limite di quantificazione (<math>\mu\text{g/l}</math>) calcolato</b>	0.68	0.49	0.20

Tabella 10. Metodo analitico modificato: parametri caratterizzanti le curve di calibrazione (area SPMA/ area SPMA<sub>d5</sub>, area SBMA/ area SBMA<sub>d7</sub> e area o-MBMA/ area SBMA<sub>d7</sub> Vs Concentrazione  $\mu\text{g/l}$ ), analizzate ognuna in quintuplicato, in un'unica sessione d'analisi.

	QC ( $\mu\text{g/l}$ )	Bias%	Concentrazione calcolata ( $\mu\text{g/l}$ )	DSR%
<b>SPMA</b>	0,8	6,2	0,8	4,6
	10,0	4,8	9,5	2,0
	50,0	6,2	46,9	2,0
	<b>medie</b>	<b>5,7</b>		<b>2,9</b>
<b>SBMA</b>	0,8	<b>26,9</b>	1,0	2,7
	10,0	0,6	10,1	2,3
	50,0	0,0	50,0	1,7
	<b>medie</b>	<b>9,1</b>		<b>2,2</b>
<b>o-MBMA</b>	0,8	7,7	0,9	5,8
	10,0	2,1	10,2	2,2
	50,0	0,0	50,0	2,8
	<b>medie</b>	<b>3,3</b>		<b>3,6</b>

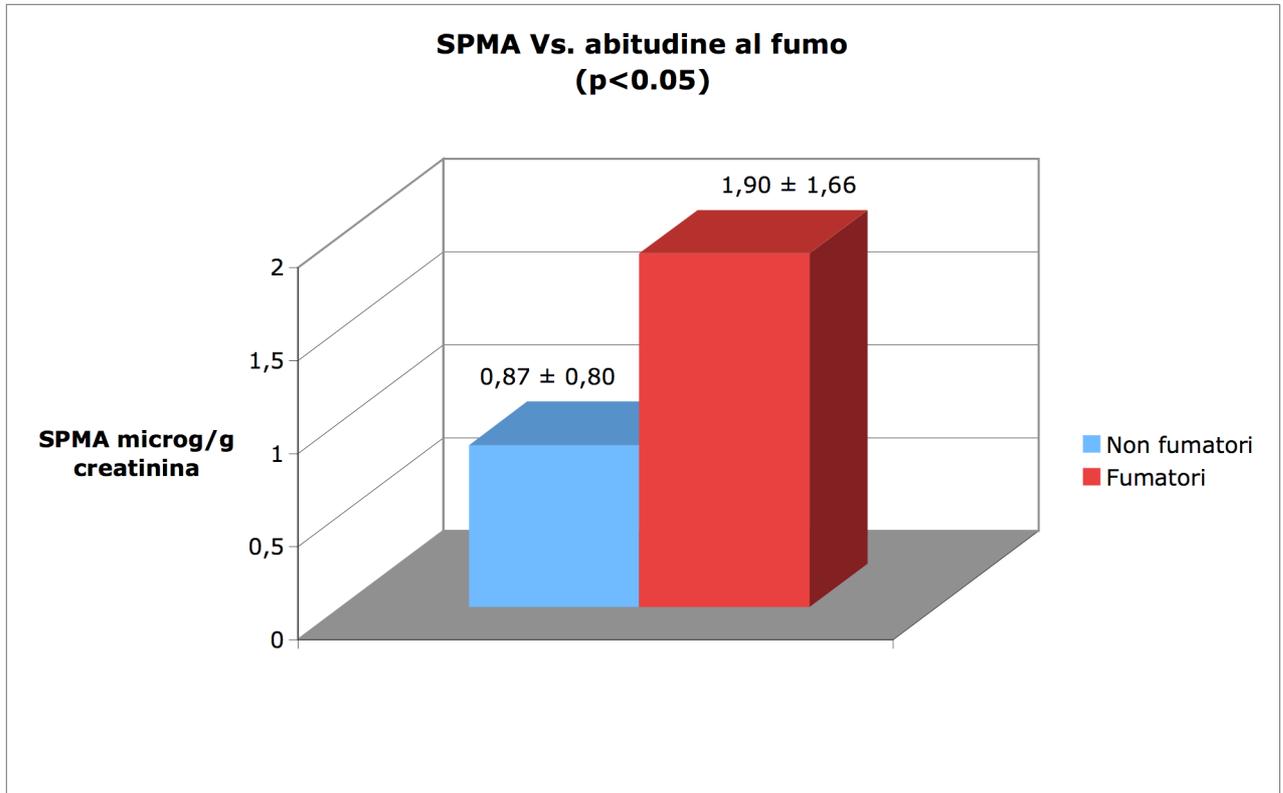
Tabella 11. Metodo analitico modificato: Precisione e accuratezza intra-day (media di 5 ripetuti per QC).

		<b>SPMA</b>	<b>SBMA</b>	<b>o-MBMA</b>
<b>effetto matrice %</b>	<b>MEDIA</b>	<b>71,2</b>	<b>93,8</b>	<b>55,0</b>
	DS	9,0	10,9	4,6
	<b>DSR%</b>	<b>12,6</b>	<b>11,6</b>	<b>8,4</b>
<b>efficienza di estrazione %</b>	<b>MEDIA</b>	<b>123,8</b>	<b>101,1</b>	<b>159,8</b>
	DS	20,3	39,5	40,2
	<b>DSR%</b>	<b>16,4</b>	<b>39,1</b>	<b>25,5</b>
<b>efficienza totale %</b>	<b>MEDIA</b>	<b>86,4</b>	<b>82,7</b>	<b>80,5</b>
	DS	0,9	4,7	6,5
	<b>DSR%</b>	<b>1,0</b>	<b>5,6</b>	<b>8,1</b>

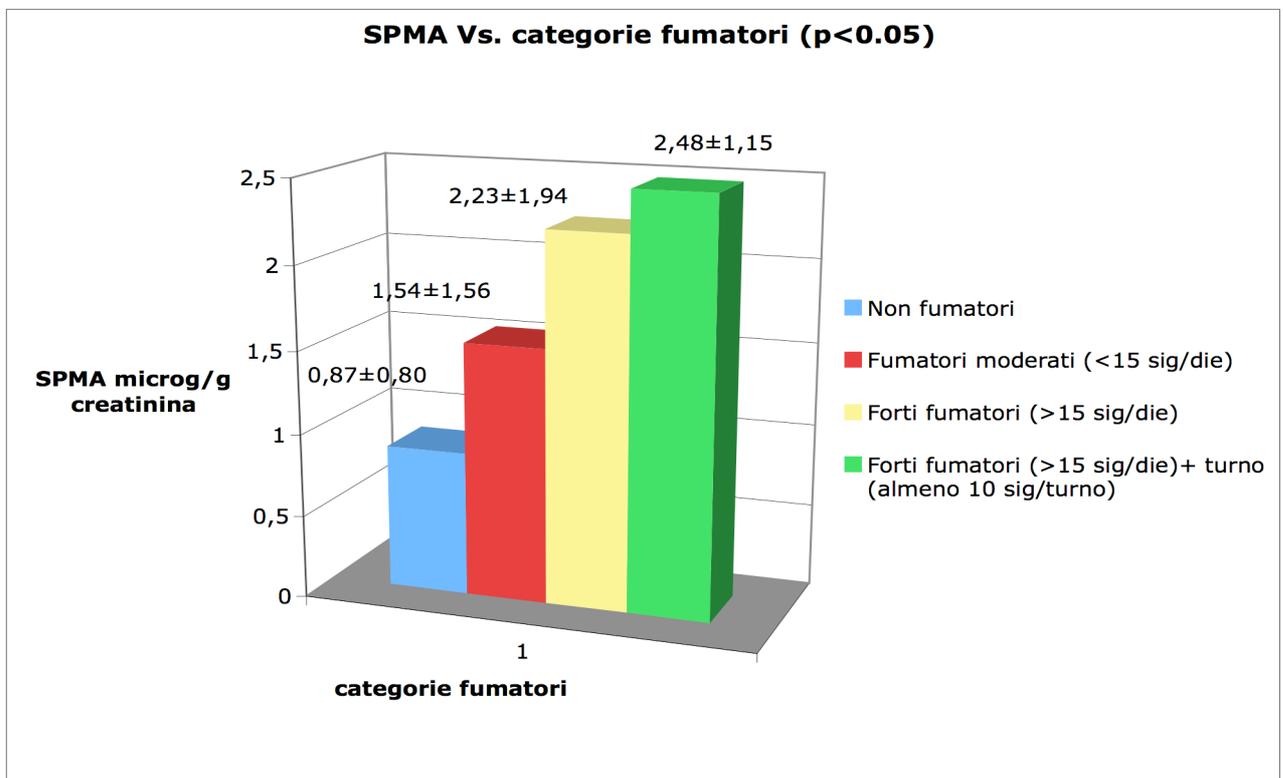
Tabella 12. Metodo analitico modificato: Calcolo effetto matrice, efficienza di estrazione e efficienza totale del processo analitico (per ciascun parametro esaminato valore medio su tre livelli di concentrazione analizzati).

## 9. ISTOGRAMMI

a)

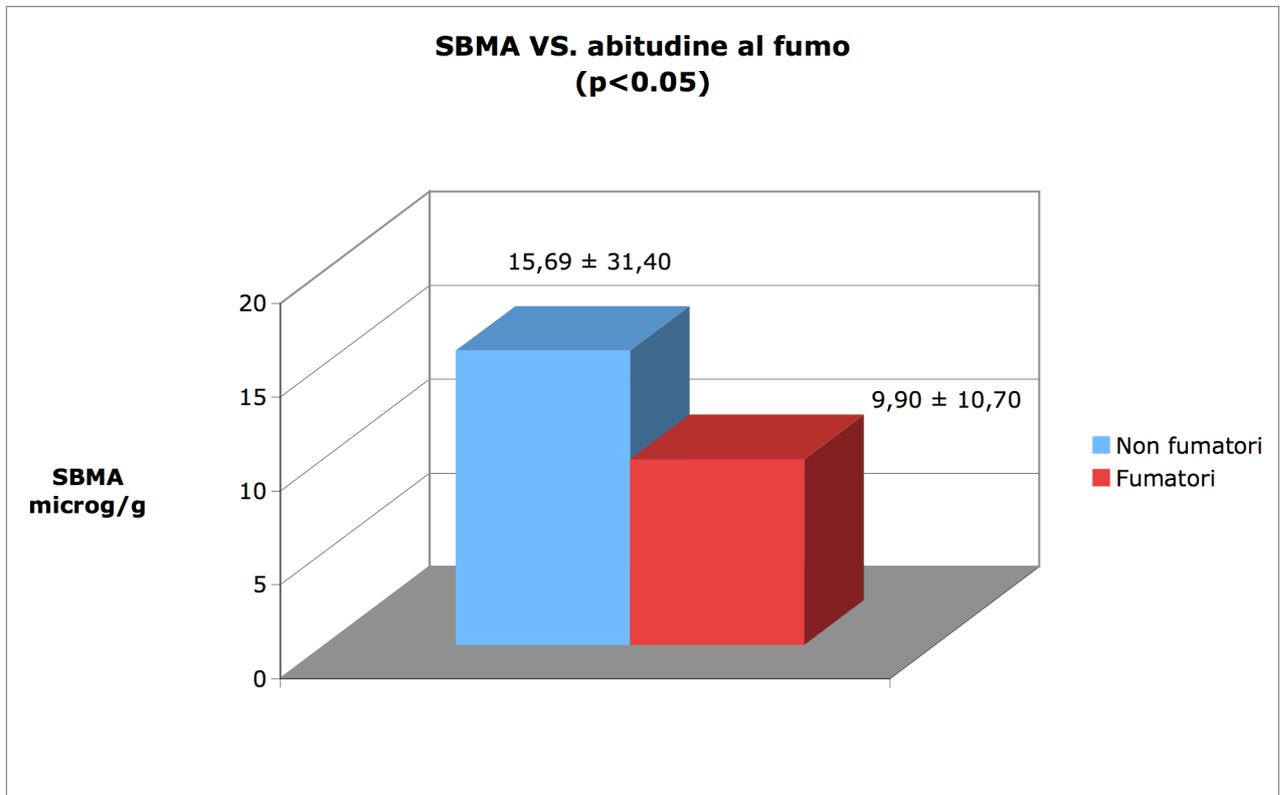


b)

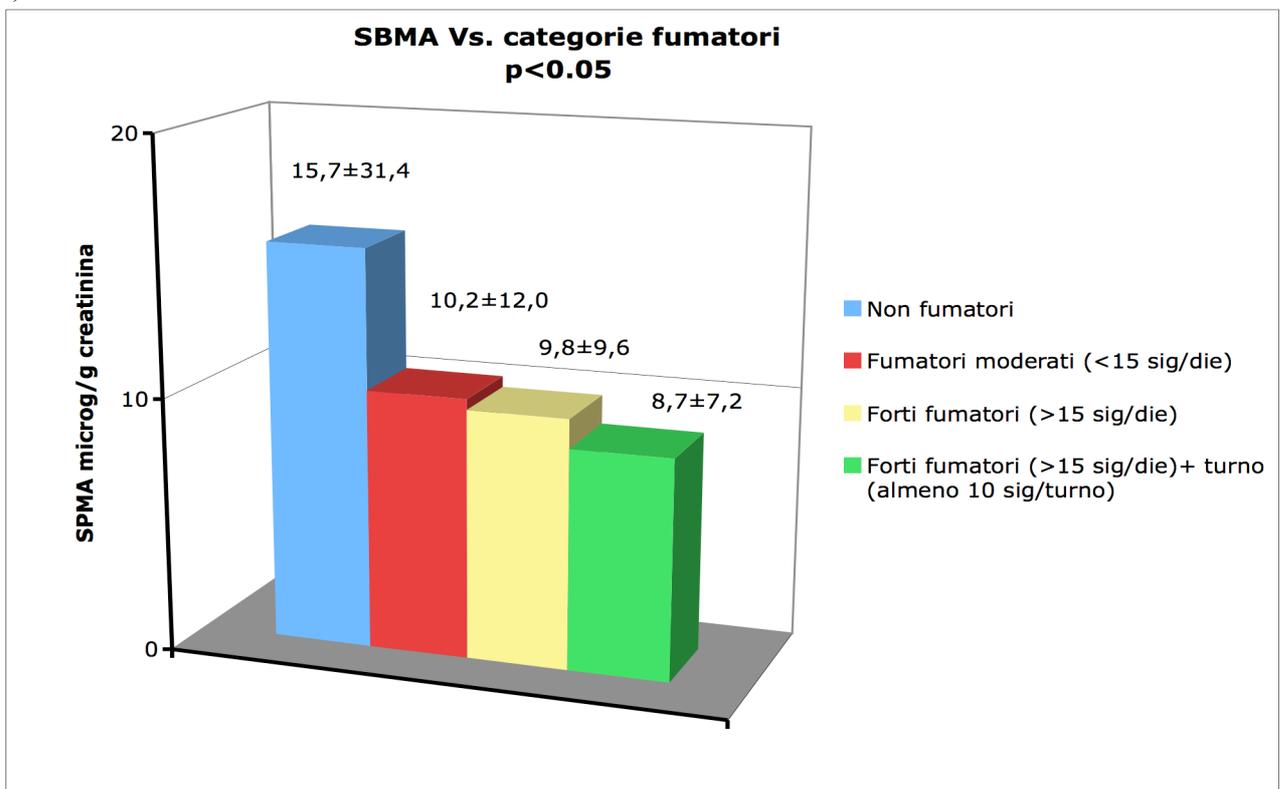


Istogramma 1: Valori SPMA rispetto a fumo dicotomico (a) e rispetto al fumo categorico (b).

a)



b)



Istogramma 2: Valori SBMA rispetto a fumo dicotomico (a) e rispetto al fumo categorico (b)

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Kehoe, RA, Thamann F, Cholack J, 1933. *Lead absorption and excretion in certain trades*. J. Ind. Hyg. 15: 306–319.
2. Yant WP, Schrenk HH, Sayers RR, Howarth AA, Reinhart WA, 1936. *Urine sulfate determination as a measure of benzene exposure*. J. Ind. Hyg. Toxicol. 18: 69.
3. Council directive 77/312/EEC, 1977. *On biological screening of the population for lead*.
4. GerES I–IV, 1985–2003. German Environmental Survey. *Umweltbundesamt*. <http://www.umweltbundesamt.de/survey-e/us8586/uprog.htm>.
5. Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring, Seiwert M, 2007a. *20 years of German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring and trends over time*. Int. J. Hyg. Environ. Health. 210: 271–297.
6. NHANES, 1999—2000. National Health and Nutrition Examination Survey. [http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/nhanes99\\_00.htm](http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/nhanes99_00.htm).
7. Needham, LL, Calafat AM, Barr D, 2007. *Uses and issues of Biomonitoring*. Int. J. Hyg. Environ. Health, 210: 229–238.
8. HESI, 2004. Health and Environmental Science Institute. <http://www.hesiglobal.org/S>
9. Zielhuis RL, 1984. Recent and potential advances applicable to the protection of workers' health—biological monitoring. II. In: Berlin, A., Yodaiken, R.E., Henman, B.A. (Eds.), *Assessment of toxic agents at the workplace—roles of ambient and biological monitoring*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
10. Suchenwirth R, Ewers U, Dunkelberg H, 1996. *Anwendbarkeit von Modellrechnungen bei Expositions- und Risikoabschätzungen*. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 1: 165–168.
11. Angerer J, Bolt HM, Brüning T, Drexler H, Eikmann T, Ewers U, Gieler U, Greim H, Hallier E, Letzel S, Mersch-Sundermann VH, Neuberger M, Nowak D, Rüdiger HW, 2004. *Über das Biological Monitoring, den Unwillen Gesundheitsrisiken rational abzuschätzen und die Lust an radikalen Maßnahmen*. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 9: 61–64.
12. Liebl B, Schettgen T, Kerscher G, Broding HC, Otto A, Angerer J, Drexler H, 2004. *Evidence for increased internal exposure to lower chlorinated polychlorinated biphenyls (PCB) in pupils attending a contaminated school*. Int. J. Hyg. Environ. Health 207: 315–324.
13. Midasch O, Schettgen T, Angerer J, 2006. *Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population*. Int. J. Hyg. Environ. Health 209: 489–496.

14. Fromme H, Midasch O, Twardella D, Angerer J, Boehmer S, Liebl B, 2007. *Occurrence of perfluorinated substances in an adult German population in southern Bavaria*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 80: 313–319.
15. Calafat AM, Kuklennyik Z, Caudill SP, Reidy JA, Needham LL, 2006a. *Perfluorochemicals in pooled serum samples from United States residents in 2001 and 2002*. *Environ. Sci. Technol.* 40: 2128–2134.
16. Calafat AM, Needham LL, Kuklennyik Z, Reidy JA, Tully JS, Aguilar-Villalobos M, Naeher LP, 2006b. *Perfluorinated chemicals in selected residents of the American continent*. *Chemosphere* 63: 490–496.
17. Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring M., Seiwert M, 2007a. *20 years of German Environmental Survey (GerES): human biomonitoring and trends over time*. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 210: 271–297.
18. Wittsiepe J, Schrey P, Ewers U, Selenka F, Wilhelm M, 2000. *Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years (1989–1998)*. *Chemosphere*; 40: 1103–1109.
19. Wittsiepe J, Fu"rst P, Schrey P, Lemm F, Kraft M, Eberwein G, Winneke G, Wilhelm M, 2007. *PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers*. *Chemosphere* 67: 286–294.
20. Becker K, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Hoppe, HW, Ball M, Schulz, C, Thumulla J, Seifert B, 2006. *GerES IV Pilot Study: assessment of the exposure of German children to organophosphorus and pyrethroid pesticides*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209: 221–233.
21. Koch, HM, Becker K, Wittassek MR, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, 2006. *Di-n-butylphthalate (DnBP) and Butylbenzylphthalate (BBzP)-urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children*. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 17: 378-87.
22. Alessio L, Buratti M, Berteli G, Del'Orto A: In : Bertazzi PA, Alessio L, Duca PG, Marubini E (eds). *Monitoraggio biologico negli ambienti di lavoro*. Principi- Metodi- Applicazioni Milano, Collana Franco Angeli, 1984, 23-56.
23. Wilhelm M, Idel H, 1996. *Hair analysis in environmental medicine*. *Zbl. Hyg. (now Int. J. Hyg. Environ. Health)* 198: 485–501.
24. Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes, 2005. *Haaranalysen in der Umweltmedizin. Stellungnahme der Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes*, *Bundesgesetzbl.—Gesundheitsforsch.—Gesundheitsschutz* 48: 246–250.
25. Gulson BL, 1996. *Nails: concern over their use in lead exposure assessment*. *Sci. Total Environ.* 177: 323–327.
26. van Wijngaarden E, Beck C, Shamlaye CF, Cernichiari E, Davidson PW, Myers GJ, Clarkson TW, 2006. *Benchmark concentrations for methyl mercury obtained from the*

- 9-year follow-up of the Seychelles Child Development Study*. Neurotoxicology 27: 702–709.
27. Karagas MR, Stukel TA, Tosteson TD, 2002. *Assessment of cancer risk and environmental levels of arsenic in New Hampshire*. Int. J. Hyg. Environ. Health 205: 85–94.
  28. Wilhelm M, Pesch B, Wittsiepe J, Jakubis P, Miskovic, P, Keegan T, Nieuwenhuijsen MJ, Ranft U, 2005. *Comparison of arsenic levels in fingernails with urinary. As species as biomarkers of arsenic exposure in residents living close to a coal-burning power plant in Prievidza District, Slovakia*. J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol. 15: 89–98.
  29. Timchalk C, Poet TS, Kousba AA, Campbell JA, Lin Y, 2004. *Noninvasive biomonitoring approaches to determine dosimetry and risk following acute chemical exposure: Analysis of lead or organophosphate insecticide in saliva*. J. Toxicol. Environ. Health A 67: 635–650.
  30. Wilhelm M, Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, Ranft U, 2002. *Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density*. Sci. Total Environ. 297: 109–118.
  31. Manno M, Sannolo N, 2004. *Significato tossicologico degli indicatori biologici*. G. Ital. Med. Lav. Erg. 26: 270-277.
  32. Albertini RJ, 2001. *Developing sustainable studies on environmental health*. Mutat. Res. 480-481: 317-331.
  33. Franco G, Alessio L, in: Alessio L, Bertazzi PA, Forni A, Gallus G, Imbriani M, (eds). *Il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a tossici industriali*. Pavia, I libri della Fondazione Maugeri, 2000, Vol.1, 1-15.
  34. Henderson RF, Bechtold WE, Bond JA, Sun JD, 1989. *The use of biological markers in toxicology*. Crit. Rev. Toxicol. 20: 65-82.
  35. Watson WP, Mutti A, 2004. Review: *Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects*. Biomarkers, 9: 211-242.
  36. Miraglia N, Assennato G, Clonfero E, Fustinoni S, Cannolo N, 2004. *Indicatori di dose biologicamente efficace*. G. Ital. Med. Lav. Erg., 26: 298-301.
  37. De Palma G, Corradi M, Mutti A, Baccarelli A, Pesatori A, Bertazzi PA, 2004. *Nuovi indicatori di effetto*. G. Ital. Med. Lav. Erg., 26: 302-310.
  38. NRC 1989 (National Research Council), *Biologic markers in reproductive toxicology*, National Academy Press, Washington DC, 395 pp.
  39. Mutti A, 1995. *Use of intermediate end-points to prevent long-term outcomes*. Toxicol. Lett., 77: 121-125.

40. Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt HM, 2002. *The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences*. Toxicol Lett. 128: 229-41.
41. Foà V, Colombi A,: Tossicologia professionale. In: Ambrosi L., Foà V. Trattato di medicina del lavoro. Torino, UTET, 1996, 149-170.
42. Foà V, Alessio L,: Biological monitoring. General Principles. In : JM Stellmann L ed. Encyclopaedia of occupational health and safety. (4th ed, vol I. Geneva, ILO, 1998, 27.2-27.6).
43. Antero V, Riihimaki J, Liesivuori J, Jarvisalo S, Hernberg. Biological Monitoring, Occupational Medicine. Ed. Carl Zenz Cap. 10.
44. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M, 2007. Review: *Human biomonitoring: State of the art*. Int. J. Hyg. Environ.-Health; 210: 201–228.
45. Consonni D, Bertazzi PA, 2004. *Monitoraggio biologico nella sorveglianza sanitaria ed epidemiologica: l'approccio epidemiologico*. G. Ital. Med. Lav. Erg., 26: 334-335.
46. Ghittori S, Imbriani M, 2001. *S-phenylmercapturic acid in urine as a biomarker of environmental benzene exposure, in Mercapturic acid as biomarker of exposure to industrial chemicals*, Maugeri Foundation books, 2: 85.
47. Wallace LA, Nelson WC, Ziegenfus R, 1991. *The Los Angeles team study: Personal exposures, indoor-outdoor air concentrations, and breath concentrations of 25 volatile organic compounds*. J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol. 1: 157-192.
48. Toxicological Profile For Benzene. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.html>
49. Srbova J, Teisinger J, Skramovsky S, 1950. *Absorption and elimination of inhaled benzene in man*. Arch. Ind. Hyg. Occup. Med. 2: 1-8.
50. Briff RS, Lynch J, Bernath T, Scala RA, 1980. *Benzene in the workplace*. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 41: 616-623.
51. Nomiya K, Nomiya H, 1974. *Respiratory retention, uptake and excretion of organic solvents in man*. Int Arch Arbeitsmed. 32: 75-83.
52. Lauwerys R. Benzene Human biol. Monit. Ind. Chemicals series 1983 pag. 1 (22) Commission of the European Communities Ed. By L. Alessio, A. Berlin, R. Roi, M. Boni
53. Laitinen J, Kangas J, Pekari K, et al., 1994. *Short time exposure to benzene and gasoline at garages*. Chemosphere. 28: 197-205.
54. Ghantous H, Danielsson BR, 1986. *Placental transfer and distribution of toluene, xylene and benzene, and their metabolites during gestation in mice*. Biol. Res. Pregnancy Perinatol. 7: 98-105.
55. Sato A, Nakajima T, Fujiwara Y, Hirosawa K, 1975. *Kinetics studies on sex different*

*in susceptibility to chronic benzene intoxication with special referente to body fat content.* Br. J. Ind. Med. 32: 321-328.

56. Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, Bonzini M, Bertazzi PA, Foa` V, Garte S, Farmer PB, Levy LS, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo DF. 2005. *Monitoring Low Benzene Exposure: Comparative Evaluation of Urinary Biomarkers, Influence of Cigarette Smoking, and Genetic Polymorphisms.* Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev. 14: 2237-44.
57. Medeiros AM, Bird MG, 1997. Review: *Potential biomarkers of benzene exposure* J. Toxicol. Environ. Health. 51: 519-39.
58. Nakajima T, Okuyama S, Yonekura I, et al., 1985. *Effects of ethanol and phenobarbital administration on the metabolism and toxicity of benzene.* Chem. Biol. Interact. 55: 23-38.
59. Aksoy M, Erdem S, DinCol G, 1974. *Leukemia in shoe-workers exposed chronically to benzene.* Blood. 44: 837-41.
60. Vigliani EC, Forni A, 1976. Review: *Benzene and leukemia.* Environ. Res. 11: 122-7.
61. Rinsky RA, Young RJ, Smith AB, 1981. *Leukemia in benzene workers.* Am. J. Ind. Med. 2: 217-45.
62. International Agency for Research on Cancer (IARC). WHO: 1982; vol. 29.
63. Aksoy M, 1980. *Different types of malignancies due to occupational exposure to benzene: a review of recent observations in Turkey.* Environ. Res. 23: 181-90.
64. Decouflé P, Blattner WA, Blair A, 1983. *Mortality among chemical workers exposed to benzene and other agents.* Environ. Res. 30: 16-25.
65. Yin SN, Hayes RB, Linet MS, Li GL, Dosemeci M, Travis LB, Li CY, Zhang ZN, Li DG, Chow WH, Wacholder S, Wang YZ, Jiang ZL, Dai TR, Zhang WY, Chao XJ, Ye PZ, Kou QR, Zhang XC, Lin XF, Meng JF, Ding CY, Zho JS, Blot WJ, 1996. *A cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China: overall results.* Am. J. Ind. Med. 29: 227-35.
66. Ott MG, Townsend JC, Fishbeck WA, 1978. Langner RA, *Mortality among individuals occupationally exposed to benzene.* Arch. Environ. Health. 33: 3-10.
67. Tsai SP, Wen CP, Weiss NS, Wong O, McClellan WA, Gibson RL, 1983. *Retrospective mortality and medical surveillance studies of workers in benzene areas of refineries.* J. Occup. Med. 25: 685-92.
68. Bond GG, McLaren EA, Baldwin CL, Cook RR, 1987. *An update of mortality among chemical workers exposed to benzene.* Br. J. Ind. Med. 44: 215.
69. Wong O, 1987. *An industry wide mortality study of chemical workers occupationally exposed to benzene. II. Dose response analyses.* Br. J. Ind. Med. 44: 776.

70. Ireland B, Collina JJ, Buckley CF, Riordan SG, 1997. *Cancer mortality among workers with benzene exposure*, *Epidemiology*; 8: 318.
71. Lan Q, Zhang L, Li G, et al. 2004. *Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene*. *Science* 306: 1774- 6.
72. Norpoth K, Stücker W, Krewet E, Müller G, 1988. *Biomonitoring of benzene exposure by trace analyses of phenylguanine*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 60: 163-8.
73. Mueller G, Koelbel M, Heger M, Norpoth K, *Urinary S phenylmercapturic acid and Phenylguanine as indicators of benzene exposure*. In : *Biological monitoring of exposure to chemicals: Organic Compounds 1987*. 91-98. Ed. by Ho MH, Dillon HK
74. Jowa L, Witz G, Snyder R, Winkle S, Kalf GF, 1990. *Synthesis and characterization of deoxyguanosine-benzoquinone adducts*. *J. Appl. Toxicol.* 10: 47-54.
75. Schatz-Kornbrust E, Goldstein BD, Witz G. 1991. *The binding of trans,trans-muconaldehyde to deoxyguanosine and calf thymus DNA*. *Toxicologist* 11: 253.
76. Dean BJ, 1985. *Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols*. *Mutat. Res.* 154: 153-181.
77. Glatt H, Padykula R, Berchtold G A, Ludewig G, Platt KL, Klein J, Oesch F, 1989. *Multiple activation pathways of benzene leading to product with varying genotoxic characteristics*. *Environ. Health Perspect.* 82: 81-90.
78. Glatt H, Witz G, 1990. *Studies on the induction of gene mutations in bacterial and mammalian cells by the ring-opened benzene metabolites trans,trans-muconaldehyde and trans,trans-muconic acid*. *Mutagenesis* 5: 263-266.
79. Witz G, Gad SC, Tice RR, Oshiro Y, Piper CE, Goldstein BD, 1990. *Genetic toxicity of the benzene metabolite trans,trans-muconaldehyde in mammalian and bacterial cells*. *Mutat. Res.* 240: 295-306.
80. Forni A, Pacifico E, Limonta A, 1971a. *Chromosome studies in workers exposed to benzene or toluene or both*. *Arch. Environ. Health*; 22: 373-378.
81. Forni A, Cappellini A, Pacifico E, Vigliani E, 1971b. *Chromosome changes and their evolution with past exposure to benzene*. *Arch. Environ. Health*; 23: 385-391.
82. Hite M, Pecharo M, Smith I, Thornton S, 1980. *The effect of benzene in micronucleus test*. *Mutat. Res.* 77: 149-155.
83. Tice RR, Costa DL, Drew RT, 1980. *Cytogenetic effects of inhaled benzene in murine bone marrow: Induction of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and cellular proliferation inhibition in DBA/2 mice*. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 77: 2148-2152.
84. Tice RR, Vogt TF, Costa DL, 1982. *Cytogenetic effects of inhaled benzene in murine bone marrow in genotoxic effect of airborne agents*. *Environ. Sci. Res.* 25: 257-275.

85. Toxicological profile for Toluene. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.html>
86. Environmental health criteria 52. Toluene. Geneva, Switzerland: World Health Organization. WHO. 1985.
87. Brugnone F, Perbellini L, Apostoli P, et al., 1983. *Decline of blood and alveolar toluene concentration following two accidental human poisonings*. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 53: 157-165.
88. Brugnone F, Perbellini L, Faccini GB, et al., 1989. *Breath and blood levels of benzene, toluene, xylene and styrene in nonoccupational exposure*. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 61: 303-311.
89. Orbaek P, Nise G, 1989. *Neurasthenic complaints and psychometric function of toluene-exposed rotogravure printers*. Am. J. Ind. Med. 16: 67-77.
90. Angerer J, Schildbach M, Kramer A, 1998a. *S-p-toluylmercapturic acid in the urine of workers exposed to toluene: A new biomarker for toluene exposure*. Arch. Toxicol. 72: 119-23.
91. Toluene IARC monographs (Vol. 47, Vol. 71; 1999).
92. Toxicological Profile for Xylene <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp71.html>
93. Sedivec V, Flek J, 1976b. *The absorption, metabolism, and excretion of xylenes in man*. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 37: 205-217.
94. Riihimaki V, 1979b. *Percutaneous absorption of m-xylene from a mixture of m-xylene and isobutyl alcohol in man*. Scand. J. Work Environ. Health 5: 143-150.
95. Norstrom A, Andersson B, Levin JO, et al., 1989. *Biological monitoring of o-xylene after experimental exposure in man: Determination of urinary excretion products*. Chemosphere 18: 1513-1523.
96. Riihimaki V, 1979a. *Conjugation and urinary excretion of toluene and m-xylene metabolites in a man*. Scand. J. Work Environ. Health 5: 135-142
97. Timbrell J. *Principles of biochemical toxicology*. Cap 4. Factors affecting toxic responses metabolism. Taylor & Francis Edition. 3<sup>rd</sup> edition
98. Chasseaud LF, 1979. *The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents*. Adv. Cancer. Res. 29: 175-274.
99. Dutton GJ, 1978. *Developmental aspects of drug conjugation, with special reference to glucuronidation*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18: 17-35.
100. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J. Biol. Chem. 249: 7130-9.
101. Hayes JD, Pulford DJ, 1995. *The glutathione S-transferase supergene family:*

- regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30: 445-600.*
102. Wedeen RP, 1996. Commentare on “*Adjustment of creatinine-adjusted value to urine flow rate in lead workers*”. Arch. Environ. Health. 51: 333-334.
  103. Nerland DE, Pierce WM Jr., 1990. *Identification of N-acetyl-S-(2,5-dihydroxyphenyl)-L-cysteine as a urinary metabolite of benzene, phenol, and hydroquinone. Drug. Metab. Dispos. 18: 958-61.*
  104. Sabourin PJ, Bechtold WE, Henderson RF, 1988. *A high pressure liquid chromatographic method for the separation and quantitation of water-soluble radiolabeled benzene metabolites. Anal. Biochem. 170: 316-27.*
  105. Inoue O, Kanno E, Yusa T, Kakizaki M, Watanabe T, Higashikawa K, Ikeda M, 2000. *Urinary phenylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to benzene. Ind. Health. 38: 195-204.*
  106. Parke DV, Williams RT, 1953a. *Studies in detoxication 49. The metabolism of benzene containing [14C] benzene. Biochem. J. 54: 231-238.*
  107. Sabourin PJ, Bechtold WE, Birnbaum LS, et al., 1988. *Differences in the metabolism and disposition of inhaled [3H]benzene by F344/N rats and B6C3F1 mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 94: 128-140.*
  108. Jongeneelen FJ, Dirven HA, Leijdekkers CM, Henderson PT, Brouns RM, Halm K. 1987. *S-phenyl-N-acetylcysteine in urine of rats and workers after exposure to benzene. J. Anal. Toxicol. 11: 100-4.*
  109. van Sittert NJ, Boogaard PJ, Beulink GDJ, 1993. *Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. Br. J. Ind. Med. 50: 460-469.*
  110. Stommel P, Muller G, Stucker W, Verkoyen C, Schobel S, Norpoth K, 1989. *Determination of S-phenylmercapturic acid in the urine an improvement of the biological monitoring of benzene exposure. Carcinogenesis; 10: 279-82.*
  111. Popp W, Rauscher D, Muller G, et al., 1994. *Concentrations of benzene in blood and S-phenylmercapturic and t,t-muconic acid in urine in car mechanics. Int. Arch Occup. Environ. Health. 66: 1-6.*
  112. Inoue O, Kanno E, Yusa T, Kakizaki M, Watanabe T, Higashikawa K, Ikeda M. 2001, *A simple HPLC method to determine urinary phenylmercapturic acid and its application to gasoline station attendants to biomonitor occupational exposure to benzene at less than 1 ppm. Biomarkers; 6: 190-203.*
  113. Qu Q, Shore R, Li G, et al., 2005. *Biomarkers of benzene: Urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. Chem. Biol. Interact. 153-154: 85-95.*
  114. Takahashi S, Kagawa M, Shiwaku K, Matsubara K, 1994. *Determination of s-benzyl-*

- n*-acetyl-*l*-cysteine by gas chromatography/ mass spectrometry as a new marker of toluene exposure. J. Anal. Toxicol. 18: 78–80.
115. Inoue O, Kanno E, Kasai K, Ukai H, Okamoto S, Ikeda M, 2004. *Benzylmercapturic acid is superior to hippuric acid and o-cresol as a urinary marker of occupational exposure to toluene.* Toxicol. Lett. 147: 177–186.
  116. van Doorn R, Bos RP, Brouns RM, Leijdekkers CM, Henderson PT, 1980. *Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat.* Arch. Toxicol. 43: 293–304.
  117. Moriwaki H, Tsujimoto Y, Noda T, Shimizu M, Tanaka M (2000) *Determination of mercapturic acids in urine by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.* Analyst 125:715–718
  118. Sabatini L, Barbieri A, Indiveri P, Mattioli S, Violante FV, 2008. *Validation of an HPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of phenylmercapturic acid, benzylmercapturic acid and o-methylbenzylmercapturic acid in urine as biomarkers of exposure to benzene, toluene and xylenes.* J. Chromatogr. B Analyt. Technol Biomed. Life Sci. 863: 115–122.
  119. Gonzalez-Reche LM, Schettgen T, Angerer J, 2003. *New approaches to the metabolism of xylenes: verification of the formation of phenylmercapturic acid metabolites of xylenes.* Arch. Toxicol. 77: 80–85.
  120. Melikian AA, O'Connor R, Prahalad AK, Hu P, Li H, Kagan M, Thompson S. 1999. *Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Carcinogenesis. 20: 719-26.
  121. Chou JS, Lin YC, Ma YC, Sheen JF, Shih TS, 2006. *Measurement of benzylmercapturic acid in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem quadrupole mass spectrometry.* J. Anal. Toxicol. 30: 306-12.
  122. Barbieri A, Sabatini L, Accorsi A, Roda A, Violante FS. 2004. *Simultaneous determination of t,t-muconic, S-phenylmercapturic and S-benzylmercapturic acids in urine by a rapid and sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method.* Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 18: 1983-8.
  123. Marchese S, Curini R, Gentili A, Perret D, Rocca LM, 2004. *Simultaneous determination of the urinary metabolites of benzene, toluene, xylene and styrene using high-performance liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry.* Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 18: 265-72.
  124. USFDA, 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>
  125. Qu Q, Melikian AA, Li G, Shore R, Chen L, Cohen B, Yin S, Kagan MR, Li H, Meng M, Jin X, Winnik W, Li Y, Mu R, Li K, 2000. *Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: urine metabolites.* Am. J. Ind. Med. 37: 522-31.
  126. Lin LC, Tyan YC, Shih TS, Chang YC, Liao PC, 2004. *Development and validation*

- of an isotope-dilution electrospray ionization tandem mass spectrometry method with an on-line sample clean-up device for the quantitative analysis of the benzene exposure biomarker S-phenylmercapturic acid in human urine.* Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 18:1310-6.
127. Lin LC, Shih JF, Shih TS, Li YJ, Liao PC, 2004. *An electrospray ionization tandem mass spectrometry based system with an online dual-loop cleanup device for simultaneous quantitation of urinary benzene exposure biomarkers trans,trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid.* Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 18: 2743-52.
  128. Liao PC, Li CM, Lin LC, Hung CW, Shih TS, 2002. *An online automatic sample cleanup system for the quantitative detection of the benzene exposure biomarker S-phenylmercapturic acid in human urine by electrospray ionization tandem mass spectrometry.* J. Anal. Toxicol. 26: 205-10.
  129. Inoue O, Kanno E, Yusa T, Kakizaki M, Ukai H, Okamoto S, Higashikawa K, Ikeda M, 2002. *Urinary benzylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to toluene.* Int. Arch. Occup. Environ. Health. 75: 341-7.
  130. ACGIH, 2006, <http://www.acgih.org> .
  131. Bono R, Traversi D, Maestri L, Schilirò T, Ghittori S, Baiocchi C, Gilli G, 2005. *Urban air and tobacco smoke in benzene exposure in a cohort of traffic policemen.* Chem Biol Interact. 153: 239-42.
  132. Violante FS, Sanguinetti G, Barbieri A, Accorsi A, Mattioli S, Cesari R, Fimognari C, Hrelia P, 2003. *Lack of correlation between environmental or biological indicators of benzene exposure at parts per billion levels and micronuclei induction.* Environ. Res., 91: 135-42.
  133. Rolle-Kampczyk UE, Rehwagen M, Diez U, Richter M, Herbarth O, Borte M, 2002. *Passive smoking, excretion of metabolites, and health effects: results of the Leipzig's Allergy Risk Study (LARS).* Arch Environ Health. 57: 326-31.
  134. Schettgen T, Musiol A, Alt A, Kraus T, 2008. *Fast determination of urinary S-phenylmercapturic acid (S-PMA) and S-benzylmercapturic acid (S-BMA) by column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 863: 283–292.
  135. Paci E, Pignini D, Cialdella AM, Faranda P, Tranfo G, 2007. *Determination of free and total S-phenylmercapturic acid by HPLC/MS/MS in the biological monitoring of benzene exposure.* Biomarkers. 12: 111-22.